



Physiologische und regulatorische Konsequenzen der Überproduktion einer Lipase in *Pseudomonas*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Horst Funken

aus Nettetal

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 Jäger

Korreferent: Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2010

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Kai-Malte Bartels, Horst Funken, Andreas Knapp, Melanie Bocker, Michael Bott, Susanne Wilhelm, Frank Rosenau (2011)

“Glycosylation is required for outer membrane localisation of the lectin LecB in *Pseudomonas aeruginosa*.” J. Bacteriol. 2011 Jan 7. [Epub ahead of print]

Kai-Malte Bartels, Horst Funken, Melanie Bocker, Michael Bott, Manjeet Bains, Robert E.W. Hancock, Susanne Wilhelm, Frank Rosenau, Karl-Erich Jaeger (2010)

“Glycosylated outer membrane porin OprF interacts with lectin LecB on the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*.” Eingereicht, JBC/2010/142893

Horst Funken, Melanie Bocker, Michael Bott, Susanne Wilhelm, Karl-Erich Jaeger, Frank Rosenau

“Lipases have a regulatory function on pyoverdine production in *Pseudomonas putida* KT2440.” Manuskript in Vorbereitung

Stephanie Serici, Rien Hoge, Horst Funken, Melanie Bocker, Michael Bott, Laurence Rahme, Susanne Wilhelm, Frank Rosenau

“The subtilisin autotransporter SprS influences its own expression, is involved in protease regulation, biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.” Manuskript in Vorbereitung

Posterpräsentationen

Funken H., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K.E. (2008)

“Stress response of *Pseudomonas putida* upon overexpression of a heterologous lipase.”

VAAM-Jahrestagung 2008, Osnabrück-Deutschland

Funken H., Brocker M., Bott M., Jaeger K.E., Wilhelm S., Rosenau F. (2009)

“Changes in the Proteome of *P. putida* upon overexpression of a heterologous lipase”

VAAM-Jahrestagung 2009, Bochum-Deutschland

Funken H., Brocker M., Bott M., Jaeger K.E., Wilhelm S., Rosenau F. (2009)

“Changes in the proteome of *P. putida* upon overexpression of a heterologous lipase.”

Pseudomonas Conference 2009, Hannover-Germany

Funken H., Brocker M., Bott M., Jaeger K.E., Wilhelm S., Rosenau F. (2009)

“Proteome analysis of *Pseudomonas putida* response to overexpression of a heterologous lipase”

Proteomic Forum 2009, Berlin-Germany

Vorträge

Funken H., Brocker M., Bott M., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K.E (2009)

“Response of *Pseudomonas putida* upon overexpression of a heterologous lipase”

PSYOMO-Meeting 2009, Madrid-Spain

Pelzer A., Funken H., Thies S., Wilhelm S., Jaeger K.E., Rosenau F. (2010)

“Pseudomonads as versatile expression hosts”

28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung 2010,
Aachen-Germany

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie. Darüber hinaus möchte ich mich für das stetige Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie die konstruktiven Diskussionen in den letzten Jahren bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Frau Dr. Susanne Wilhelm und Herrn Dr. Frank Rosenau bedanke ich mich für die engagierte Betreuung, die konstruktiven und anregenden Diskussionen und die freundschaftliche Unterstützung sowie für die Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Frau Dr. Melanie Brocker und Frau Christina Mack aus dem „Institut für Biotechnologie“ des Forschungszentrum Jülich möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung der MALDI-MS Messungen bedanken.

Herrn Dr. Christian Schulz und Ulrike Viets aus dem „Institut für Biotechnologie“ des Forschungszentrum Jülich möchte ich mich für die Hilfe bei der 2-D-DIGE Methode bedanken.

Bei Herrn Dr. Sascha Hausmann und Herrn Dr. Kai-Malte Bartels möchte ich mich für die vielen, sehr hilfreichen Diskussionen und die Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET, vor allem der Labore 206 und 306, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit danken. Besonders danken möchte ich Herrn Rien Hoge für die Hilfe bei der 2-D-Gelelektrophorese und Herrn Andreas Knapp und Frau Martina Paul für die Unterstützung am Ende meiner Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die Unterstützung in den letzten Jahren und vor allem im Laufe meiner Promotion besonders danken.

Abschließend möchte ich noch Alexandra danken, die immer für mich da war und mir stets Halt gegeben hat.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VII
Abkürzungen	X
1. Einleitung	1
1.1 Proteomik	1
1.2 Lipasen.....	2
1.2.1 Lipasen aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.3 Siderophore	7
1.3.1 Siderophore in fluoreszierenden <i>Pseudomonaden</i>	8
1.3.2 Der alternative Sigma Faktor PvdS	11
1.4 Virulenz in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	12
1.4.1 „ <i>Quorum sensing</i> “ in <i>P. aeruginosa</i>	13
1.5 Rhamnolipide aus <i>P. aeruginosa</i>	15
1.6 Zielsetzung.....	17
2. Material & Methoden	19
2.1 Chemikalien & Enzyme	19
2.2 Bakterienstämme und Plasmide.....	19
2.3 Oligonukleotide.....	20
2.4 Anzucht von Bakterien.....	21
2.4.1 Nährmedien	21
2.4.2 Indikatormedien.....	22
2.4.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	22
2.5 Isolierung von Nukleinsäuren.....	23
2.5.1 DNA.....	23

2.5.2 RNA.....	23
2.6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	23
2.7 In vitro-Rekombination von DNA.....	24
2.8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	24
2.9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	24
2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.10.1 Standard-PCR	24
2.10.2 Ortsspezifische Mutagenese	25
2.10.3 Reverse Transkription von RNA mit anschließender <i>real-time</i> -PCR.....	25
2.11 Sequenzierung von DNA	25
2.12 Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten (GZE)	26
2.13 Löslichkeitsanalyse von Proteinen	26
2.14 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen	26
2.15 Bestimmungen von Proteinkonzentrationen.....	26
2.16 Spektralphotometrische Bestimmung von Lipaseaktivität	26
2.17 Bestimmung von Sidherophoren.....	27
2.17.1 Bestimmung von Pyoverdin (Meyer & Abdallah 1987)	27
2.17.2 Bestimmung von Pyocyanin	27
2.18 Rhamnolipid-Nachweis	27
2.18.1 Extraktion von Rhamnolipiden	27
2.18.2 Orcinol-Test.....	28
2.18.3 Dünnschichtchromatographie von Rhamnolipiden.....	28
2.19 Präzipitation von Proteinen (Peterson, 1977)	28
2.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.21 Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese (2-D-Gele)	29
2.21.1 Probenvorbereitung	29
2.21.2 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	29
2.21.3 Beladen der <i>IPG Strips</i>	30

2.21.4 Isoelektische Fokussierung	30
2.21.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.22 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation time of flight Massenspektrometrie	31
2.23 Immunologischer Nachweis von Proteinen	32
2.24 Computerprogramme und Datenbanken.....	32
3. Ergebnisse:	34
3.1 Expression einer heterologen Lipase in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	34
3.1.1 Expression des <i>lipAH</i> Operons in <i>P. putida</i>	35
3.1.2 Die Lipase A kann aktiv in <i>P. putida</i> exprimiert werden	36
3.1.3 Maximale Lipaseaktivität bei 0,2 mM IPTG Konzentration im Expressionsmedium	37
3.2 Die heterologe <i>lipAH</i> Expression hat Auswirkungen auf den Phänotyp von <i>P. putida</i>	39
3.2.1 <i>P. putida</i> zeigt verändertes Wachstum bei heterologer Lipaseexpression	39
3.2.2 <i>P. putida</i> synthetisiert bei heterologer Lipaseexpression Siderophore	40
3.2.2.1 Nachweis von Pyoverdin im Kulturüberstand von <i>P. putida</i>	41
3.2.2.2 Nachweis von Pyocyanin im Kulturüberstand von <i>P. putida</i>	43
3.3 <i>P. putida</i> besitzt ein verändertes Proteom bei heterologer Lipaseexpression	43
3.3.1 Das Proteom von <i>P. putida</i> zeigt Veränderungen bei heterologer Lipaseexpression	45
3.3.2 Identifizierung der unterschiedliche exprimierten zellulären Proteine.....	46
3.4 Lipasen haben Einfluss auf die Produktion von Pyoverdin	49
3.4.1 Homologe Expression von <i>pp4218</i>	49
3.4.2 <i>P. putida</i> produziert Pyoverdin auch bei homologer Expression von <i>pp4218</i> ..	50
3.4.3 Die putative Lipase/Esterase PP4218 zeigt keine Enzymaktivität	51
3.4.4 Erfolgreiche Transkription von <i>pp4218</i> bei homologer Expression.....	53
3.5 Bioinformatischer Vergleich der Lipase A und PP4218	53

3.6 Nachweis von Siderophoren in <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1 ($\Delta lipAH$)	55
3.6.1 Lipase beeinflusst die Menge an Pyoverdin in <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1	56
3.6.2 Lipase vermindert die Menge an Pyocyanin in Kulturüberstand von <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lipAH$	57
3.6.3 Die Pyoverdin-Bildung ist abhängig von LipA und nicht von LipC	59
3.7 Analyse des extrazellulären Proteoms von <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lipAH$	60
3.8 Die Expression des <i>lipAH</i> operons beeinflusst auch die Expression PvdS abhängiger Gene in <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lipAH$	62
3.9 Einfluss des <i>lipAH</i> operons auf die Virulenz von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
3.9.1 LipA beeinflusst die Rhamnolipidproduktion in <i>P. aeruginosa</i>	64
3.9.2 Das <i>lipAH</i> operon beeinflusst die „Quorum sensing“-Systeme von <i>P. aeruginosa</i>	66
3.10 Einfluss des ECF-Sigma -Faktors PvdS auf LipA.....	68
3.10.1 Veränderte Lipaseaktivität in einem <i>P. aeruginosa</i> $\Delta pvdS$ Stamm	69
3.10. Die Mutante <i>P. aeruginosa</i> $\Delta pvdS$ kann mit plasmidkodiertem <i>pvdS</i> komplementiert werden.....	71
4. Diskussion.....	73
5. Zusammenfassung.....	95
6. Literatur:.....	99
7. Anhang	114

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1.1: Reaktionsschema der von Lipasen katalysierten Hydrolyse eines Triacylglycerols	3
Abb. 1.2: 3D-Strukturmodell der <i>P. aeruginosa</i> -Lipase LipA	5
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte der Bildung der reifen Lipase LipA in <i>P. aeruginosa</i>	6
Abb. 1.4: Primärstruktur des Pyoverdins aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (Yeterian <i>et al.</i> , 2009). Es wurde die Standard Schreibweise für Aminosäuren benutzt mit der Ausnahme von N-formyl-N-hydroxyornithin (FoOHOrn).	9
Abb. 1.4: Vergleich der drei bekannten Pyoverdin Strukturen.	10
Abb. 1.5: Modell des Pyoverdin Signalsystems.	12
Abb. 1.6: Schematische Darstellung einer <i>P. aeruginosa</i> -Zelle mit Zell-assoziierten sowie sekretierten Virulenzfaktoren (Van Delden & Iglewski, 1998).	13
Abb. 1.7: Modell des QS-Netzwerk in <i>P. aeruginosa</i>	15
Abb. 1.8: Chemische Struktur von Mono- und Di- Rhamnolipiden.....	16
Abb. 3.1: SDS-PAGE Analyse von <i>P. putida</i> Zellextrakten.	35
Abb. 3.2: Bestimmung der lipolytischen Aktivität bei Expression des <i>lipAH</i> -Operons in <i>P. putida</i> auf Tributyrinagarplatten (A) und Messung der lipolytischen Aktivität in Kulturüberständen und Gesamtzelextrakten mit <i>pNPP</i> als Substrat (B).	36
Abb. 3.3: Immunologischer Nachweis von LipA und LipH nach heterologer Expression in <i>P. putida</i> . Dargestellt sind GZE von <i>P. putida</i> -Kulturen nach 16 h Wachstum unter Expressionsinduzierenden Bedingungen.	37
Abb. 3.4: Einfluss der IPTG Konzentration im Medium auf die heterologe Lipaseexpression.	38
Abb. 3.5: Wachstumskurve von <i>P. putida</i> bei heterologer Lipase-Expression.	40
Abb. 3.6: Färbung der <i>P. putida</i> Kulturen mit und ohne Expression der heterologen Lipase A aus <i>P. aeruginosa</i>	41
Abb. 3.7: Nachweis und Quantifizierung von Pyoverdin in Kulturüberständen von <i>P. putida</i> nach heterologer <i>lipAH</i> Expression.	42
Abb. 3.8: Zelluläres Proteom von <i>P. putida</i>	44
Abb. 3.9: Vergleichende Expressionsprofile von <i>P. putida</i> -Kulturen, welche entweder das Leervektorplasmid pVLT33 oder das pVLT- <i>lipAH</i> Expressionsplasmid enthielten.	46

Abb. 3.10: Klassifizierung aufgrund der <i>lipAH</i> -Expression in <i>P. putida</i> veränderter Proteine (nach Heim <i>et al.</i> , 2003).....	48
Abb. 3.11: Organisation der Pyoverdine Gene im Genom von <i>P. putida</i> (nach Matthijs <i>et al.</i> , 2009).	49
Abb. 3.12: Pyoverdin-Nachweis nach homologer Expression einer putativen Lipase in <i>P. putida</i>	50
Abb. 3.13: Lipase-/Esterase- Aktivitätstests der putativen Lipase PP4218 mit <i>para</i> -Nitrophenyl-Palmitat (A) und <i>para</i> -Nitrophenyl-Caproat (B) sowie Tributyrin als Substrat (C). Die	52
Abb. 3.14: Paarweiser Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von PP4218 aus <i>P. putida</i> und der Lipase A aus <i>P. aeruginosa</i>	54
Abb. 3.15: Kulturfarbe der $\Delta lipAH$ -Mutanten von <i>P. aeruginosa</i> . <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1-Kulturen enthielten entweder den Leervektor pBBR(1)MCS oder das pBBL7(<i>lipAH</i>)-Expressionsplasmid und wurden 16 h nach Expressionsinduktion fotografiert.	55
Abb. 3.16: Pyoverdin-Nachweis und -Quantifizierung in Kulturüberständen von <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lipAH$..	56
Abb. 3.17: Bestimmung der Konzentration des Siderophores Pyocyanin in den Kulturüberständen des <i>lipAH</i> -defizienten <i>P. aeruginosa</i> Stammes PABST7.1.....	58
Abb. 3.18: Pyoverdin Quantifizierung in Kulturüberständen von <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lipAHC$	59
Abb. 3.19: Extrazelluläres Proteom von <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1	61
Abb. 3.20: RT-PCR von PvdS-regulierten Genen in <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lipAH$ und $\Delta lipAH$ mit <i>lipAH</i> -Expression.....	63
Abb. 3.21: Nachweis von Rhamnolipiden im Kulturüberstand von <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lipAH$	65
Abb. 3.22: Veränderung der Transkriptmenge in <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lipAH$ bei Expression von <i>lipAH</i>	67
Abb. 3.23: Dünnschichtchromographischer Nachweis von PQS.	68
Abb. 3.24: Lipaseaktivität von <i>P. aeruginosa</i> Wildtyp und $\Delta pvdS$ -Mutante im Kulturüberstand und im Ganzzelextrakt.	69
Abb. 3.25: Bestimmung der Transkriptmenge von <i>lipA</i> und <i>lipH</i> in einer $\Delta pvdS$ -Mutante relativ zum „House keeping“-Gen <i>rpoD</i>	70
Abb. 3.26: Immunologischer Nachweis von LipA in GZE von <i>P. aeruginosa</i> Wildtyp und $\Delta pvdS$ -Mutante..	71
Abb. 3.27: Pyoverdinkonzentration und Lipaseaktivität in einer mit pVLT- <i>pvdS</i> komplementierten <i>P. aeruginosa</i> $\Delta pvdS$ -Mutante.....	72
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Sekretion der Lipase A und des Pyoverdins..	82

Abb. 4.2: Schematische Darstellung der PvdS-abhängigen Genregulation	83
Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Signalübertragung eines extrazellulären Signals über ein Zweikomponenten System aus Sensor kinase und Antwortregulator.	90
Abb. 4.4: Schematische Darstellung des regulatorischen Netzwerks in <i>P. aeruginosa</i> und Einfluss der Lipase auf die Genregulation.	93
Abb. 7.1: Klonierung des <i>lipAH</i> -Operons in den Expressionsvektor pVLT33.	115
Abb. 7.2: Klonierung der Expressionsvektoren pVLT-4218 und pVLT- <i>pvdS</i>	116
Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	19
Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Vektoren.....	20
Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	20
Tab. 2.4: Endkonzentrationen der zur Selektion verwendeten Antibiotika	23
Tab 2.5: Unterschiedliche Gelstreifen und deren Ladekapazität	30
Tab. 2.6: Parameter der Isoelektrischen Fokussierung.....	30
Tab. 3.1: Identifizierte Proteine, welche unter <i>lipAH</i> -Expressionsbedingungen in <i>P. putida</i> reguliert werden. Bei Proteinen die mehrfach	47
Tab. 3.2: Identifizierte Proteine welche unter <i>lipAH</i> Expressionsbedingungen in <i>P. aeruginosa</i> reguliert werden.....	62
Tab. A1: Identifizierte Proteine der „master map“ von <i>P. putida</i>	114

Abkürzungen

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

λ Wellenlänge

A

A Ampere

A. dest. Aqua destillata

AS Aminosäure

Abb. Abbildung

Amp Ampicillin

APS Ammoniumpersulfat

B

bp Basenpaar(e)

BPB Bromphenolblau

BSA Rinderserumalbumin

C

Cb Carbenicillin

Cm Chloramphenicol

CP Cytoplasma

C-Terminus Carboxyterminus

CF Cystische Fibrose

D

Da Dalton

DMF N,N-Dimethylformamid

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat

Dsb disulfide bond formation

E

ECF	extracytoplasmatische Funktion
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

G

GEP	general export pathway
GSP	general secretory pathway
GZE	Gesamtzellextrakt
GZL	Gesamtzelllysat

H

h	Stunde(n)
HRP	Merettich-Peroxidase

I

IB	inclusion bodies
IEF	isoelektische Fokussierung
IM	innere Membran
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
IR	intergenische Region
IS	„iron starvation“

K

kat	Katal
kb	Kilobasen
KÜ	Kultur Überstand

L

LB	Luria-Bertani Broth
Lif	Lipase-spezifische Foldase
LPS	Lipopolysaccharid

M

Mbp	Megabasenpaare
MCS	„multiple cloning site“; Polylinker
min	Minute(n)

N

NaDoc	Natriumdesoxycholat
NTA	Nitrilo-3-Essigsäure
N-Terminus	Aminoterminus

O

O.D.	Optische Dichte
ORF	„open reading frame(s)“, offene(r) Leserahmen

P

p.a.	pro analysi
Pa	Pascal
PCR P	olymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
P _{lac}	Promotor des <i>lacZYA</i> -Operons
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenyl-Palmitat
ppm	parts per million
PVDF	Polyvenylidendifluorid
Pvd(s)	Pyoverdin(e)

Q

QS	„ <i>Quorum sensing</i> “
----	---------------------------

R

RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

S

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAG	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

T

TCA	Trichloressigsäure
TE Tris-	EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat

U

Ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett

V

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

W

W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

X

X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
-------	---

1. Einleitung

Für die Forschung in den Biowissenschaften ist ein weitgehend qualitativer und beschreibender, auf das molekulare Detail ausgerichteter Ansatz charakteristisch. Viele Prozesse in einer Bakterienzelle wirken sich jedoch nicht nur unmittelbar auf den darauf folgenden Prozess aus, sondern können viele unterschiedliche Wirkungen an vielen verschiedenen Abläufen in der Zelle haben. Um alle stattfindenden Ereignisse zu erkennen und zu beschreiben, ist es nötig, eine Bakterienzelle als ein Gesamtsystem zu betrachten. Für diesen Zweck wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedenster Methoden entwickelt. Die „*Genomics*“, der Begriff wurde schon Anfang des vergangenen Jahrhunderts geprägt (Winckler, 1920), beschäftigt sich dabei mit der Gesamtheit aller Gene eines einzelnen Organismus. Die „*Transcriptomics*“ beschäftigt sich mit der Summe der zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribierten Gene, also die Gesamtheit aller hergestellten mRNA-Moleküle. Die „*Metabolomics*“ umfasst die Wechselwirkung der in einem Organismus enthaltenen Metaboliten, deren Identifizierung und Quantifizierung. Weitere Techniken sind die „*Proteomics*“, „*Fluxomics*“ und „*Interactomics*“. Die enorme Menge an Daten, welche aus diesen Methoden gewonnen werden, können mittels mathematischer Modelle und Computervorhersagen dazu genutzt werden, die Prozesse eines Organismus zu simulieren und vorherzusagen. Dies ist das Ziel der heutigen Systembiologie.

1.1 Proteomik

Mit der endgültigen Entschlüsselung des menschlichen Erbguts (Venter *et al.*, 2001), gilt die Genomforschung schon als "alter Hut". Deshalb wird der Fokus in der heutigen Wissenschaft immer mehr auf die Erforschung des Proteoms (Wilkins, 1996) gelegt. Die Proteomik (James, 1997) (englisch: *proteomics*) umfasst die Erforschung des Proteoms, der Gesamtheit aller in einer Zelle oder einem Lebewesen unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine. Das Proteom ist im Gegensatz zum statischen Genom dynamisch und kann sich daher in seiner qualitativen und quantitativen Proteinzusammensetzung aufgrund veränderter Bedingungen (Umweltfaktoren, Temperatur, Genexpression, Wirkstoffgabe etc.) verändern (Anderson & Anderson, 1998). Die Veränderungen des Proteoms können zum Teil sehr schnell erfolgen - bspw. durch

Phosphorylierungen und Dephosphorylierung von Proteinen, die im Rahmen der Signaltransduktion eine sehr wichtige Rolle spielen. Wesentliche Teilgebiete sind die Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen, die vor allem von Tertiärstrukturen der Proteine und den Wechselwirkungen ihrer Domänen abhängen. Weiterhin gehört auch die quantitative Analyse der Proteinexpression in den Bereich der Proteomik. Sie ergänzt somit die Daten, die in der Genexpressionsanalyse gewonnen werden und gibt Aufschluss über die Komponenten von Stoffwechselwegen und molekularen Regelkreisen.

Die einzelnen Schritte der Proteom-Analyse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen (Westermeier, 2009):

- Probenvorbereitung unter Aufrechterhaltung der Proteinzusammensetzung bezogen auf einen gegenwärtigen Status der Zelle bzw. verschiedene Zustände einer Zelle
- Zweidimensionale Elektrophorese
- Spot-Detektion
- Bildanalyse mit Hilfe geeigneter Software
- Exzision der veränderten Proteinspots
- Enzymatischer Verdau der Proteine in den Gelstücken
- Identifizierung und Charakterisierung der Proteine mittels Massenspektrometrie
- Bioinformatik für Proteinidentifizierung und Datenbanksuche

Das Proteom eines Bakteriums kann durch viele Prozesse verändert werden. So können Proteine modifiziert oder abgebaut werden. Eine Klasse von Enzymen, welche für solche Veränderungen verantwortlich sein kann, sind die Lipasen.

1.2 Lipasen

Schon Anfang des 20. Jahrhunderts stellten Wissenschaftler fest, dass es Bakterien gibt, welche in der Lage sind, Fette zu spalten (Eijkman, 1901). Diese Degradierung wird durch „lipolytische Enzyme“ katalysiert, wobei der Begriff neben Phospholipasen (EC 3.1.4.3) auch Lipasen (EC 3.1.1.3) und Esterasen (EC 3.1.1.1) umfasst. Phospholipasen sind Enzyme, die Phospholipide in Fettsäuren und weitere lipophile Substanzen spalten. Lipasen und Esterasen hingegen hydrolysieren Glycerolester von langen bzw. kurzkettigen Fettsäuren (Abb. 1.1). Lipasen finden sich in Natur in fast allen Lebensformen, sie konnten sowohl in Säugetieren, Pflanzen und Pilzen, als auch in prokaryontischen Mikroorganismen identifiziert werden (Krisch, 1971; Hong *et al.*, 1991). Die physiologischen Funktionen von Lipasen in

Mikroorganismen sind noch weitgehend unverstanden (Rosenau & Jaeger, 2004), bei höheren Organismen jedoch besteht ihre Funktion darin, Speicherfette zu mobilisieren (Borgström & Brockmann, 2004).

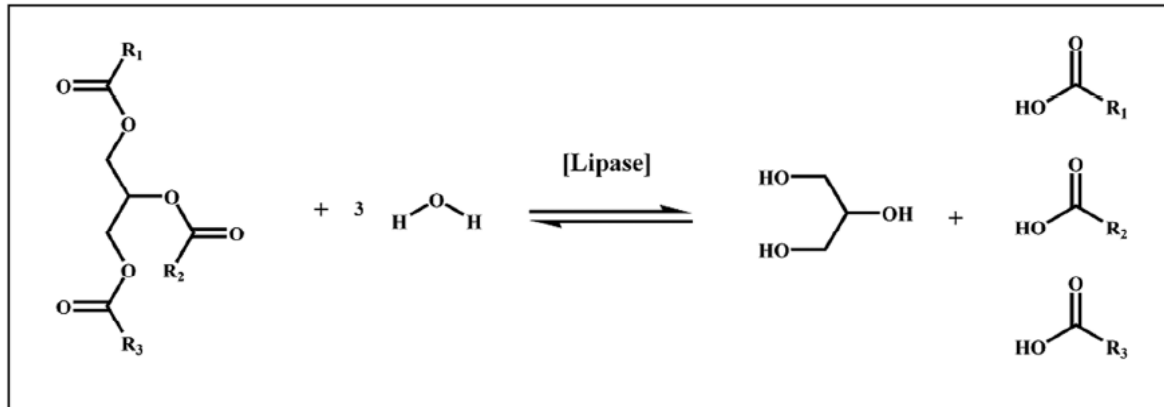


Abb. 1.1: Reaktionsschema der von Lipasen katalysierten Hydrolyse eines Triacylglycerols zu Glycerin und freien Fettsäuren bzw. der Synthese eines Triacylglycerols aus Glycerin und freien Fettsäuren.

Lipolytische Enzyme sind wegen ihres biotechnologischen Potentials (Jaeger *et al.*, 1997; Jaeger & Reetz, 1998; Houde *et al.*, 2004; Salameh & Wiegel, 2007) und ihrer Funktion als Virulenzfaktoren bei pathogenen Mikroorganismen (Jaeger *et al.*, 1991; Jaeger *et al.*, 1992a; Jaeger *et al.*, 1992b; Jaeger *et al.*, 1994a; Upton & Buckley, 1995; Koenig *et al.*, 1996; Aragon *et al.*, 2002; Mullen *et al.*, 2007) stark in das wissenschaftliche Interesse gerückt. Im Gegensatz zu Esterasen, welche nur kurzkettige, wasserlösliche Fettsäureester ($\leq C_{10}$) spalten, hydrolysieren Lipasen zusätzlich auch langkettige, wasserunlösliche Triacylglycerole ($\geq C_{10}$) (Verger, 1997). Und auch in der Kinetik der katalysierten Reaktion unterscheiden Lipasen sich deutlich von den Esterasen (Sarda & Desnuelle, 1958). Während die Hydrolyse von Carbonsäureestern bei den Esterasen sich gemäß der Michaelis-Menten Kinetik verhält, folgt die Spaltung von Triglyceriden in Di- und Monoglyceriden, Glycerol und freien Fettsäuren durch Lipasen (Brockerhoff & Jensen, 1974) einem sigmoidalen Reaktionsverlauf.

Aufgrund von durchgeführten Homologievergleichen der Aminosäuresequenzen werden Lipasen in acht Familien unterteilt (Arpigny & Jaeger, 1999). Zudem wurden bereits viele bakteriellen Lipasen isoliert und charakterisiert (Saxena *et al.*, 2003) und auch deren Struktur aufgeklärt. Zu den aufgeklärten Kristallstrukturen zählen unter anderem diejenigen der Lipasen aus *Burkholderia glumae* (Noble *et al.*, 1993), *Chromobacterium viscosum* (Lang *et al.*, 1996), *Pseudomonas aeruginosa* (Nardini *et al.*, 2000), *B. subtilis* (van Pouderoyen *et al.*,

2001) und *B. stearrowthermophilus* (Tyndall *et al.*, 2002). Lipasen gehören häufig zur Familie der Serin-Hydrolasen (Derewenda & Derewenda, 1991), die wegen eines enthaltenden charakteristischen Strukturmotivs auch häufig als α/β Hydrolasen bezeichnet werden (Ollis *et al.*, 1992; Nardini & Dijkstra, 1999) und zu denen neben lipolytischen Enzymen unter anderem auch verschiedene Proteasen und andere Hydrolasen zählen (Pelletier & Altenbuchner, 1995).

1.2.1 Lipasen aus *Pseudomonas aeruginosa*

In *P. aeruginosa* sind 2 homologe Lipasen der Familie I.1 identifiziert worden (Arpigny & Jaeger, 1999). *P. aeruginosa* stellt damit das erste Gram-negative Bakterium mit 2 dieser Lipasen dar. Annotiert wurden diese beiden Lipasen als LipA und LipC. Die von *P. aeruginosa* gebildete Lipase LipA hat ein apparentes Molekulargewicht von 29 kDa. Das 311 Aminosäuren große Präprotein wird mit einer 26 AS langen N-terminalen Signalsequenz von einem 936 bp großen Gen (*lipA*) codiert. Um einen enzymatisch aktiven Zustand zu erhalten benötigt die Lipase A zwingend die Anwesenheit der 37,5 kDa Lipase-spezifischen Foldase LipH (Wohlfarth *et al.*, 1992). Zusammen mit *lipA* befindet sich das 1023 bp lange Gen (*lipH*) welches für die Foldase codiert, in einem bicistronischen Operon. Die Expression der Lipase unterliegt der Kontrolle von zwei Promotoren, zum einen einem RpoN (σ_{54}) abhängigen Promotor P1 und zum anderen einem noch nicht näher charakterisierten Promotor P2, der sich weitere 330 bp stromaufwärts von P2 befindet (Duefel, 2000). Ein für den Promotor P1 erforderlicher spezifischer Aktivator der Transkriptionsinitiation konnte mit LipR als Teil eines Zweikomponenten-Regulationssystems zusammen mit LipQ, die eine putative signaltransduzierende Sensorkinase darstellt, sowohl in *P. aeruginosa* als auch in dem verwandten Stamm *P. alcaligenes* gefunden werden (Duefel, 2000; Nishijyo *et al.*, 2001; Krzeslak *et al.*, 2008), wobei das transduzierte Signal bisher noch nicht näher charakterisiert wurde (Nishijyo *et al.*, 2001).

LipA ist die erste Lipase der Familie I.1 (Arpigny & Jaeger, 1999), deren Struktur aufgeklärt werden konnte (Nardini *et al.*, 2000). So konnte der typische Faltungstyp der α/β -Hydrolasen (Ollis *et al.*, 1992) anhand der Struktur ermittelt werden. Die katalytische Triade des aktiven Zentrums wird durch die Aminosäuren Ser82, Asp229 und His251 gebildet. Zwischen den Resten Cys183 und Cys235 weist das reife Protein eine intramolekulare Disulfidbrücke auf,

die das Enzym stabilisiert, aber nicht für die korrekte Faltung, Interaktion mit LipH und somit für seine katalytische Aktivität essentiell ist (Liebeton *et al.*, 2001). Der *loop*, der das an der katalytischen Triade beteiligten His251 enthält, wird durch ein oktaedrisch koordiniertes Ca^{2+} -Ion stabilisiert und ist somit für die katalytische Aktivität des Enzyms vonnöten (Nardini *et al.*, 2000).

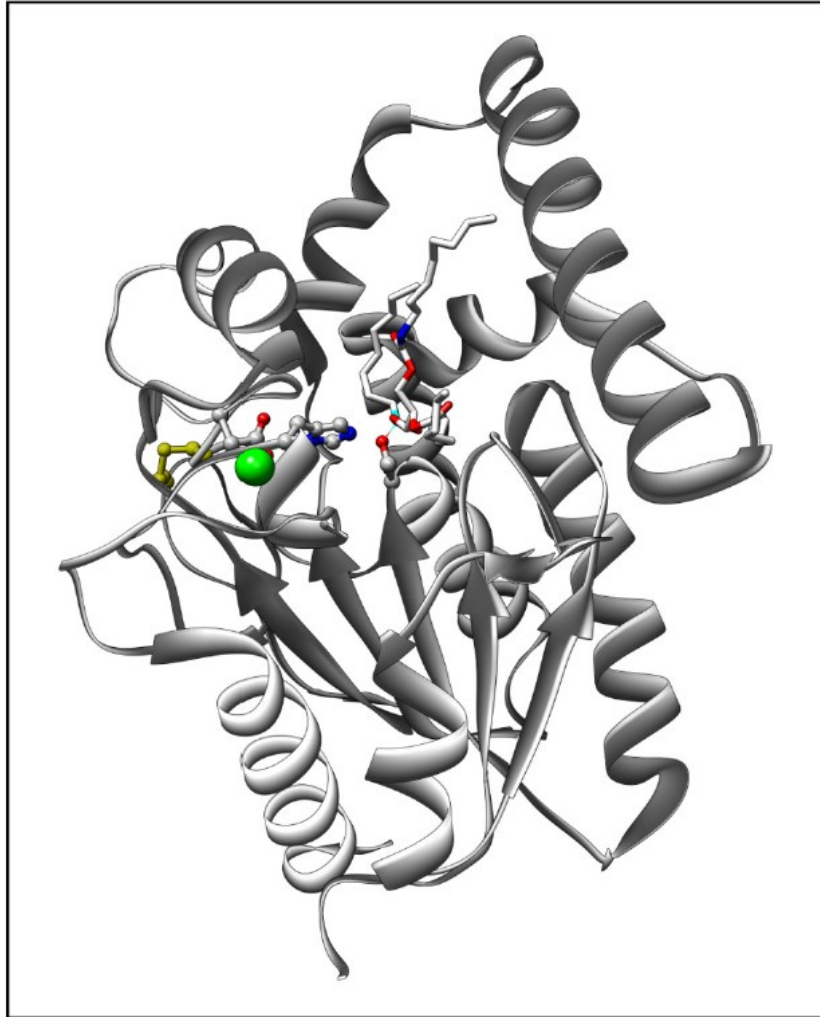


Abb. 1.2: 3D-Strukturmodell der *P. aeruginosa*-Lipase LipA (nach Nardini *et al.*, 2000; PDB Code 1ex9) in der „ribbon“ Darstellung. Als sticks gezeigt ist der kovalent vom nucleophilen Ser82 gebundene Phosphonat Inhibitor. Das Ca^{2+} -Ion (grün) und die intramolekulare Disulfidbrücke bildenden Seitenketten des Cys183 und Cys235 (gelb), sowie die Seitengruppen der Aminosäuren Ser82, Asp229 und des His251 der sog. katalytischen Triade sind als „ball and stick“ dargestellt. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Die Lipase ist ein extrazelluläres Protein und wird über den TypII- Sekretionsapparat (Abb. 1.3) in das extrazelluläre Milieu abgegeben (Jaeger *et al.*, 1991). Der Sec-Apparat erkennt das Präprotein aufgrund der N-terminalen Signalsequenz und transportiert es über die innere Membran. Im Periplasma wird durch die Dsb-Proteine („disulfide bond formation“) die

Disulfidbrücke geknüpft (Urban *et al.*, 2000). Nach erfolgreicher Faltung in die aktive Konformation, vermittelt durch das in der Membran verankerte LipH (Jaeger *et al.*, 1994a; Schneidinger, 1997), erfolgt die Sekretion mittels des Xcp-Apparates (Tomassen *et al.*, 1992; Lazdunski *et al.*, 1996; Filloux *et al.*, 1998) (Abb. 1.3).

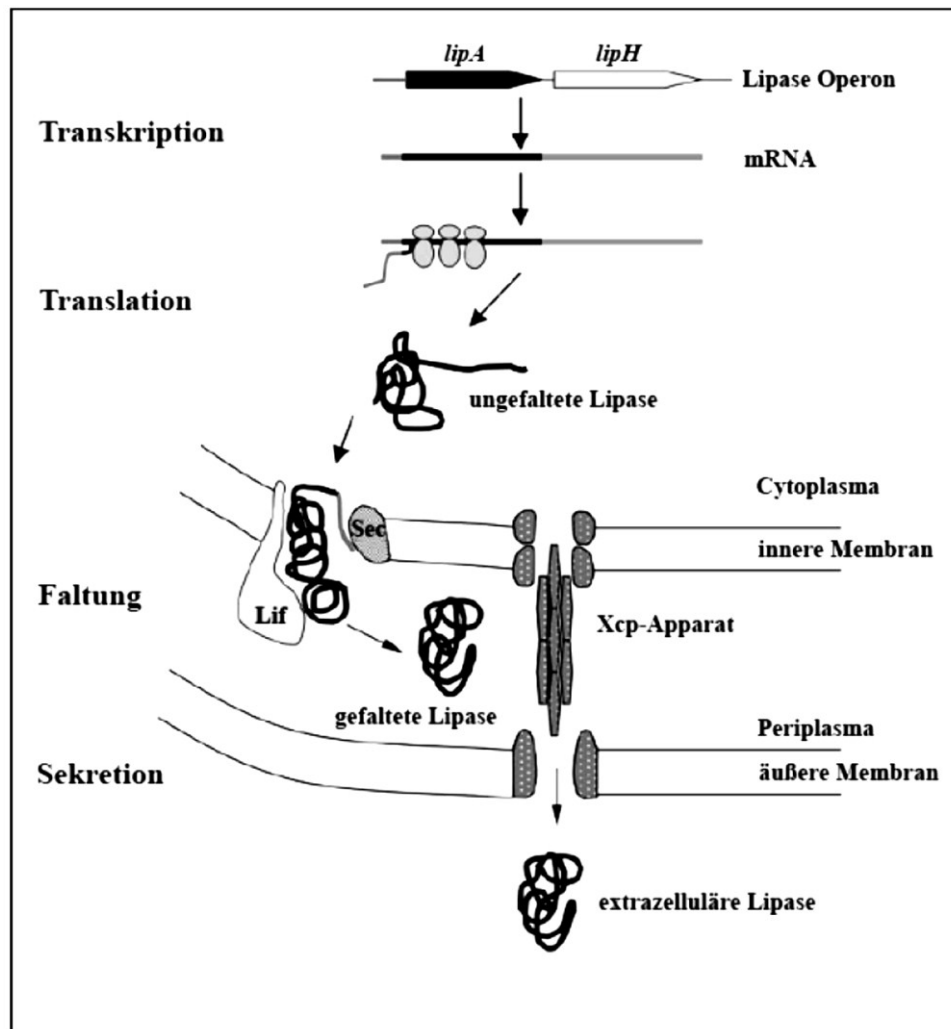


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte der Bildung der reifen Lipase LipA in *P. aeruginosa* (nach Rosenau *et al.*, 2004). Nach Transkription des bicistronischen Operons und Translation wird die ungefaltete Lipase über ihre N-terminale Signalsequenz erkannt und über den Sec-Apparat in das Periplasma transportiert, wo sie gefaltet und prozessiert wird. Anschließend erfolgt die Translokation in das extrazelluläre Medium über den Xcp-Apparat.

Die zweite Lipase aus *P. aeruginosa* LipC wird von einem 918 bp großem Gen codiert (*lipC*), sie besteht aus 306 Aminosäuren und besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 31,9 kDA. Anders als bei *lipA* konnte direkt stromabwärts von *lipC* kein Gen für eine Lipasespezifische Foldase identifiziert werden (Martinez *et al.*, 1999). LipA und LipC sind bei Aminosäurevergleich zu 55% identisch. Auf genetischer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass es unter anderen physiologischen Bedingungen als LipA gebildet wird, während

eine Beteiligung des Chaperons LipH, das zusammen mit LipA in einem bicistronischen Operon lokalisiert ist, an der Faltung von LipC vermutet wurde (Martinez *et al.*, 1999). Einen direkten biochemischen Beweis, dass LipH als erste Lipase-spezifische Foldase tatsächlich mit zwei Lipasen interagiert und sie in ihre katalytisch aktive Konformation überführen kann, konnte bisher nur *in vitro* gezeigt werden (Hausmann, 2009). Im Vergleich zu LipA besitzt LipC eine um ein Vielfaches geringere Aktivität gegen *para*-nitrophenyl-Palmitat im *P. aeruginosa* Wildtyp (Heckmann, 2001; Hausmann, 2009). *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass LipC ein sehr weites Substratspektrum aufweist und keine Präferenz zu einem bestimmten Substrat besitzt (Hausmann, 2009).

Die Translokation in den Extrazellularraum wird wahrscheinlich über die Typ-II Sekretion vermittelt. LipC wurde im Rahmen einer Arbeit identifiziert, in der in Komplementationsversuchen mit einer genomischen Cosmid-Bank in einer *P. aeruginosa* *xcpQ* Deletionsmutante alternative Faktoren gesucht wurden, die den in diesem Stamm beobachteten Sekretionsdefekt von LipA wiederherstellen konnten (Martinez *et al.*, 1999). Durch Expression von LipC in *P. aeruginosa* $\Delta xcpQ$ war der Stamm wieder in der Lage, auf Lipid-Agar Selektionsmedium zu wachsen. Somit wird LipC möglicherweise nicht über den „klassischen“ Xcp- Sekretionsapparat, der von dem Gencluster bestehend aus *xcpP* bis *xcpZ* gebildet wird, sekretiert.

Eine der wahrscheinlichen physiologischen Funktionen der Lipasen ist die Bereitstellung von Nährstoffen. Weitere überlebenswichtige Elemente, wie z.B. das Eisen, muss sich das Bakterium vermutlich mit Hilfe anderer Enzyme beschaffen.

1.3 Siderophore

Eisen ist ein überlebenswichtiges Element für fast alle Mikroorganismen (Neilands *et al.*, 1987; Ratledge & Dover, 2000)). Eisen fungiert als ein Cofaktor für Redox-abhängige Enzyme, welche in sehr vielen zellulären Prozessen beteiligt sind, wie z.B. dem Elektronen-Transport, der RNA Synthese oder auch dem Schutz gegen reaktive Sauerstoff Zwischenprodukte (Braun *et al.*, 1997). Eisenbeschaffung in der Natur ist kompliziert, zwar ist Eisen das viert meist vorkommende Element in der natürlichen Umgebung, jedoch hauptsächlich in der oxidierten Fe(III), Form welche unter neutralen pH-Bedingungen eine sehr geringe Löslichkeit besitzt (Schröder *et al.*, 2003; Crosa *et al.*, 2004). Dies stellt ein

großes Problem in der Verfügbarkeit für Organismen dar. Das benötigte Fe(II) dagegen ist bei einem neutralem pH gut löslich und für Bakterien verfügbar, ist aber seltener vorhanden (Schröder *et al.*, 2003). Viele Bakterien überwinden diese Probleme, indem sie hoch affine Eisen-Komplexbildner synthetisieren, die so genannten Siderophore (Neilands *et al.*, 1981). Diese Siderophore werden ins extrazelluläre Milieu abgegeben, um dort Eisen(III) zu komplexieren und wieder an die äußere Membran heranzuführen. An der äußeren Membran binden die Siderophore an spezifische Rezeptoren. Über einen Energie verbrauchenden Prozess kann so Eisen(III) in die Zelle aufgenommen werden (Braun, 1995; Postle, 1999; Schalk, 2008). Im Periplasma wird das Fe(III) zu Fe(II) oxidiert und so für das Bakterium verfügbar gemacht (Imperi *et al.*, 2009). Das Siderophor selber wird durch einen Recycling Zyklus wieder ins extrazelluläre Milieu abgegeben und kann erneut Eisenkomplexe bilden (Imperi, *et al.*, 2009).

Siderophore wurden nicht nur in Bakterien gefunden, sondern auch in Pilzen und Gräsern (Neilands, *et al.*, 1952), jedoch sind die Siderophore aus Bakterien die am meisten untersuchten.

1.3.1 Siderophore in fluoreszierenden *Pseudomonaden*

Ein charakteristisches Merkmal von fluoreszierenden *Pseudomonaden* ist die Fähigkeit, unter Eisen limitierten Bedingungen das gelb-grün fluoreszierende Pigment und Siderophor Pyoverdin (Pvd) zu bilden (Meyer, 2000; Ravel & Cornelis, 2003; Cornelis *et al.*, 2007;2009; Visca *et al.*, 2007). Pyoverdine bestehen aus einem konservierten di-hydroxy-Chinolin Chromophor, einer 6 – 12 Aminosäure langen, variablen Peptidkette und einer Seitenkette, welche im Normalfall aus einer Dicarboxyl-Säure oder einem Amid besteht (Abb. 1.4) (Ravel & Cornelis, 2003; Visca *et al.*, 2007; Schalk, 2008). Während alle fluoreszierenden *Pseudomonaden* den Chromophor der Pvd gemein haben, ist die spezifische Erkennung des dazugehörigen Transporters in der äußeren Membran von der Peptidkette abhängig. Sowohl der Chromophor (Mossialos *et al.*, 2002) als auch die Peptidkette des Pyoverdins (Ravel & Cornelis, 2003) werden über eine nicht ribosomale Peptidsynthese synthetisiert. Ein spezifischer, TonB abhängiger, Rezeptor in der äußeren Membran erkennt und bindet das dazugehörige Pyoverdin (Smith *et al.*, 2005). Die Gene, welche für den Rezeptor und die nicht ribosomal hergestellten Peptide codieren, gehören zu dem so genannten variablen Locus

der Pyoverdine Gene (Ravel & Cornelis, 2003; Smith *et al.*, 2005; Cornelis *et al.*, 2007; Visca *et al.*, 2007).

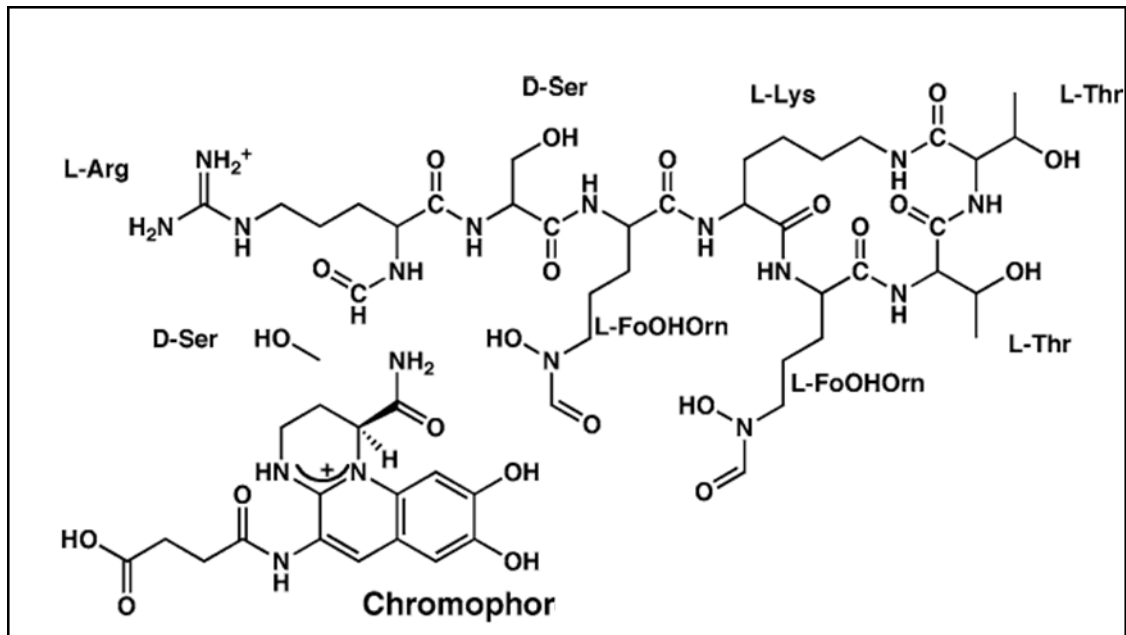


Abb. 1.4: Primärstruktur des Pyoverdins aus *P. aeruginosa* PAO1 (Yeterian *et al.*, 2009). Es wurde die Standard Schreibweise für Aminosäuren benutzt mit der Ausnahme von N-formyl-N-hydroxyornithin (FoOHOrn).

Aus der Gattung der fluoreszierenden Pseudomonaden wurden schon mehr als 100 verschiedenen Pyoverdine identifiziert, welche eine große Klasse von Siderophoren mit sehr großen Strukturunterschieden bilden (Schalk, 2008). Das am beste studierte Pyoverdin ist das aus dem humanpathogenen Bakterium *P. aeruginosa* (Abb. 1.4). Während der Infektion bildet *P. aeruginosa* Pyoverdine aus, um auch bei starkem Konkurrenzkampf mit dem Wirt an Eisen zu gelangen. Aus diesen Gründen wird das Pyoverdin als Virulenzfaktor betrachtet (Lamont *et al.*, 2002). Pyoverdine haben eine extrem hohe Affinität zu Fe(III) und besitzen eine Bindungskonstante bis zu 10^{32} M^{-1} (Albrecht-Gary *et al.*, 1994). Dabei bilden sowohl das Chromophor, als auch der Peptidrest jeweils zwei Komplexbindungsstellen. Zusammen können sie Eisen(III) effizient in einer Stöchiometrie von 1:1 komplexieren (Schalk, 2008). In *P. aeruginosa* konnten drei, strukturell unterschiedliche Pyoverdine identifiziert werden (Pvd Typ I, II, und III) (Cornelis *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1997; De Vos *et al.*, 2001; Ernst *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005). Jeder Stamm von *P. aeruginosa* produziert einen dieser drei Typen von Pyoverdin, das an der äußeren Membran von einem spezifischen Rezeptor erkannt wird (De Chial *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2003). Bisher konnten lediglich drei verschiedene Pyoverdinstrukturen aufgeklärt werden (Abb. 1.5), einmal die Kristallstruktur des

PseudobactinA aus *Pseudomonas* B10 und jeweils die NMR-Struktur eines Pvd-Gallium(III) Komplexes von *Pseudomonas fluorescens* (GMII) und *Pseudomonas putida* (G4R) (Teintze *et al.*, 1981; Mohn *et al.*, 1994; Atkinson *et al.*, 1998).

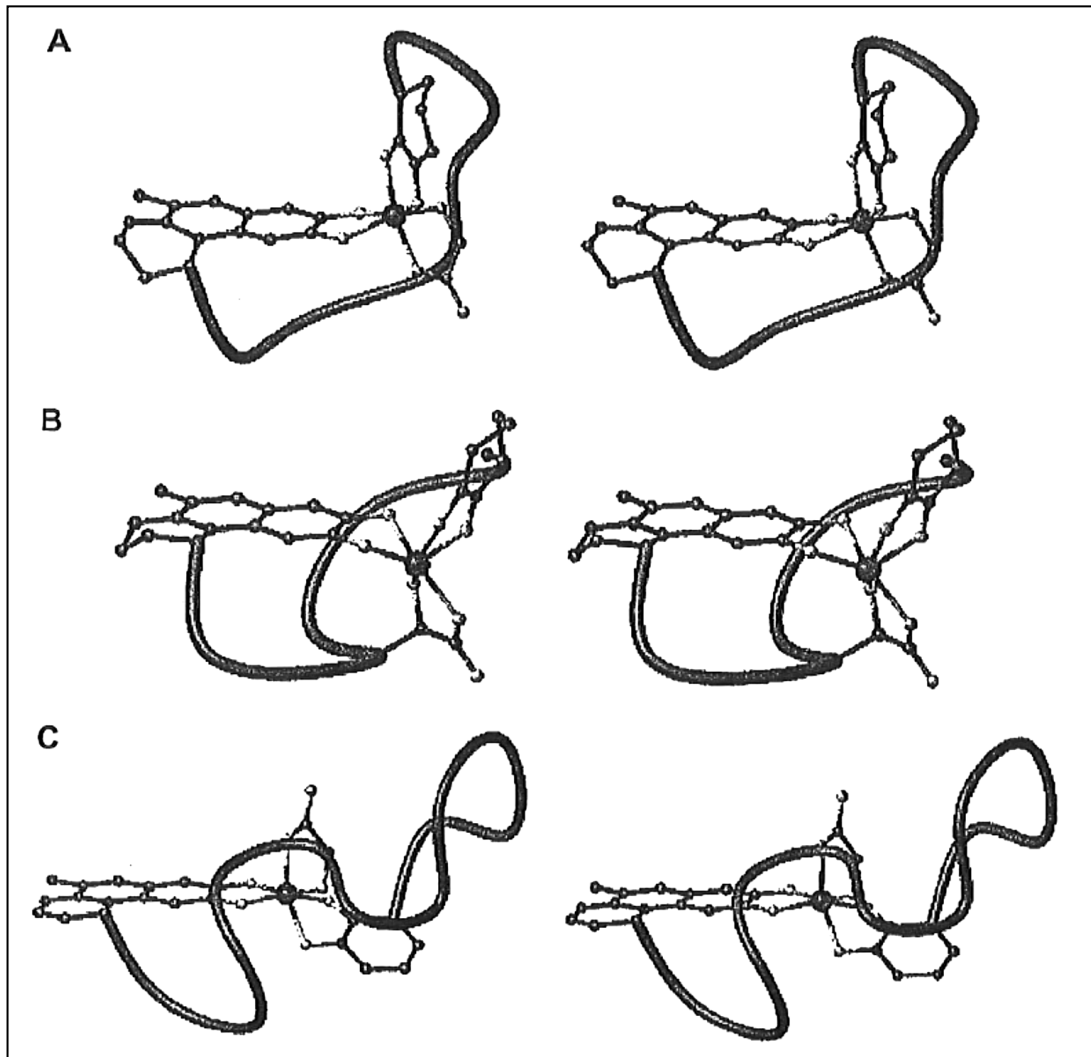


Abb. 1.4: Vergleich der drei bekannten Pyoverdinin-Strukturen. Ball, Stick und Ebenen Ansicht des ferric pseudobactin (A); Pvd GMII-Ga(III) Komplex (b); und Pvd G4R-Ga(III) Komplex (C). Nur die Schweratome, welche sich in der Nähe des Komplexierungszentrum befinden, sind im Detail dargestellt. Die Hauptpeptidkette wird durch ein Band durch die C α Position dargestellt. Der Succinaterest an Position C3 des Chromophors ist nicht dargestellt.

Vergleiche der Strukturen zeigen, dass die Koordination der verschiedenen Pyoverdine unterschiedlich ist. Pseudobactin B10-Fe(III) und Pvd-Ga(III) besitzen eine Λ Konfiguration und das Pvd G4R-Ga(III) eine Δ Konfiguration um das Metall-Ion. Die größte Gemeinsamkeit dieser drei Pvd's besteht darin, dass sie alle eine offene Seite besitzen, welche Zugang zum Pyoverdinin bietet; zugleich jedoch weisen sie in der Art dieses Zugangs große

Unterschiede auf. Dieser Mangel an struktureller Gleichheit sowie die Unterschiede in der Faltung der Peptidketten um das Metall Ion sprechen dafür, dass die Spezifität der Erkennung und des Transports über Rezeptoren stark von der Faltung des Peptidrestes abhängig ist (Schalk, 2008).

Neben den Pyoverdinen wurden auch noch andere Siderophore in fluoreszierenden Pseudomonaden identifiziert. Diese besitzen jedoch eine geringere Affinität zu Eisen als das Pyoverdin. Zu den so genannten sekundären Siderophoren gehören unter anderem das Thioquinolobactin, Pyochelin, Pseudomonine, Corrugatin und das Ornicorrugatin (Cox & Graham, 1979; Risse *et al.*, 1998; Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Cornelis & Matthijs, 2002; Matthijs *et al.*, 2007; 2008). Die Fähigkeit, mehrere hochaffine Siderophore zu bilden, bietet den fluoreszierenden Pseudomonaden einen bedeutenden Vorteil im Wettbewerb mit anderen Mikroorganismen bei der Beschaffung von Eisen in den entsprechenden ökologischen Nischen (Ravel & Cornelis, 2003).

1.3.2 Der alternative Sigma Faktor PvdS

In den meisten Bakterien stellen die Sigma Faktoren mit extracytoplasmatischer Funktion (ECF) die größte Gruppe da (Gruber & Gross, 2003). ECF Sigma Faktoren sind kleine regulatorische Proteine und gehören zur σ^{70} Familie und sind jene mit den größten Sequenzunterschieden relativ zu anderen Sigma Faktoren (Helman, 2002). Eine Unterfamilie der ECF Sigma Faktoren bilden die so genannten „iron starvation“ (IS) Sigma Faktoren, welche unter Eisenmangel Bedingungen gebildet werden (Visca *et al.*, 2002).

Der IS Sigma Faktor PvdS ist ein zentraler Regulator in der Virulenz von *P. aeruginosa*. PvdS wird während der Lungeninfektion bei Patienten mit zystische Fibrose exprimiert und ist für die Bildung von Biofilmen und der Pathogenität in Mausmodellen mit Endokarditis notwendig (Xiong *et al.*, 2000; Hunt *et al.*, 2002; Banin *et al.*, 2005; Visca *et al.*, 2007). PvdS regelt die Transkription von mindestens 26 Genen oder Operons, unter anderem von Genen, welche in der Synthese wichtiger Virulenzfaktoren wie z.B. der Proteasen PrpL und AprA sowie dem endogenen Siderophore Pyoverdin beteiligt sind (Tiburzi *et al.*, 2008). Die Expression von PvdS hingegen wird vom Fur-Fe(II) Repressor-Protein reguliert, welches an den *pvdS* Promotor bindet und so die RpoD abhängige Transkription unter Eisen-reichen Bedingungen blockiert (Barton *et al.*, 1996; Leoni *et al.*, 1996). Die posttranslationale

Kontrolle von PvdS benötigt Pyoverdinin und findet über eine Signalkaskade statt. Diese beinhaltet sowohl das Pyoverdinin als auch den dazu gehörigen Membran-Rezeptor FpvA und den in der inneren Membran lokalisierte Antisigma Faktor FpvR. In Abwesenheit von Eisen-beladenem Pyoverdinin wird der Aktivität des PvdS durch FpvR entgegengewirkt (Lamont *et al.*, 2002). Die Bindung von Eisen beladenem Pyoverdinin an FpvR hingegen bewirkt eine Übertragung eines Signals durch das Periplasma, welches dazu führt, dass PvdS aktiviert wird, welches wiederum die Transkription der PvdS kontrollierten Gene aktiviert (Lamont *et al.*, 2002; Rédley & Poole, 2005).

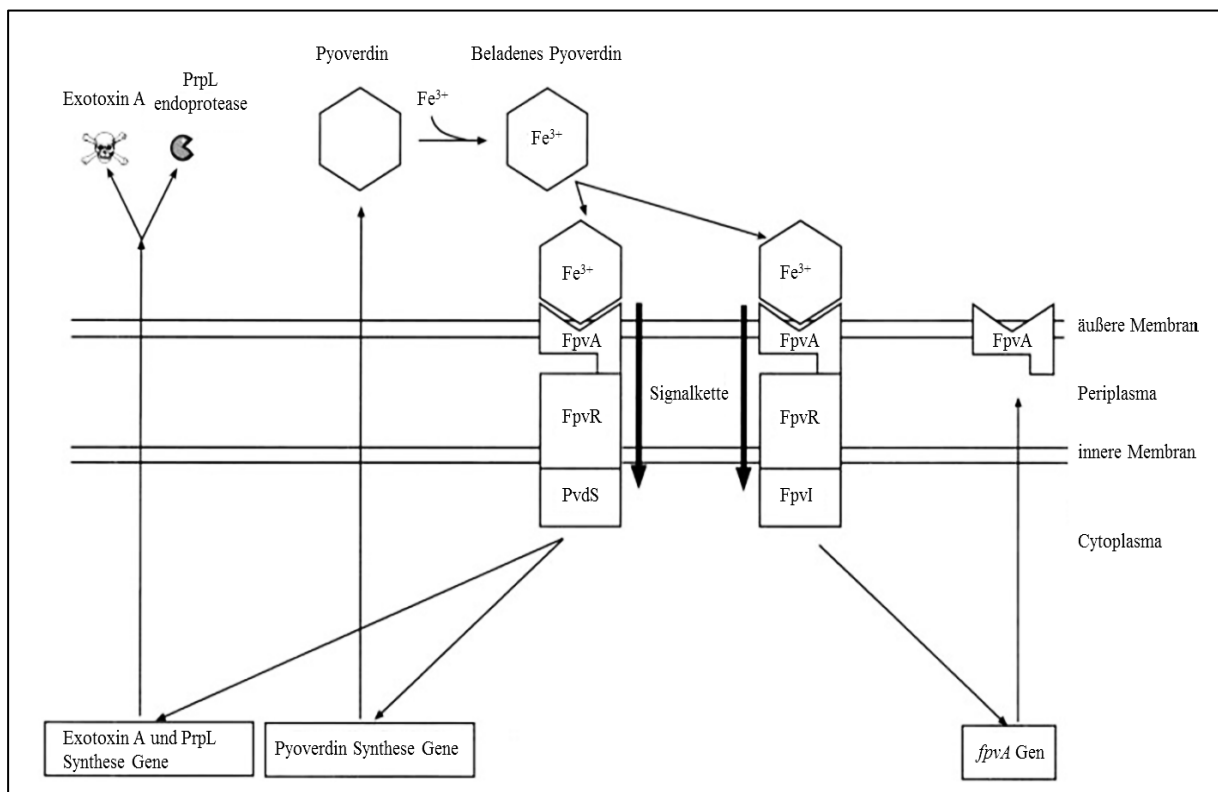


Abb. 1.5: Modell des Pyoverdinin Signalsystems. Eisen(III) beladenes Pyoverdinin bindet am FpvA Rezeptor-Protein, überführt ein Signal an das FpvR Protein, welches wiederum die Aktivität des PvdS und FpvI unterdrückt. Anschließend bindet PvdS und FpvI die RNA Polymerase. Dieser Polymerase PvdS Komplex exprimiert nun die Gene, welche für die Pyoverdine, PrpL Endoprotease und ExotoxinA benötigt werden (Lamont *et al.*, 2002), der Polymerase FpvI Komplex führt zur Expression der *fpvA* Gene (Lamont *et al.*, 2003).

1.4 Virulenz in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Das γ -Proteobakterium *P. aeruginosa* ist aufgrund seines großen Genoms sehr vielseitig und anpassungsfähig. Als opportunistischer Krankheitserreger kann es Infektionen bei Menschen, Tieren und Pflanzen hervorrufen (Smith & Iglewski; 2003). Insbesondere befällt dieser Organismus immunsupprimierte Patienten, die an Krebs, AIDS, Brandwunden oder der

Erbkrankheit cystische Fibrose (CF) leiden (Fergie *et al.*, 1994; Lyczak *et al.*, 2002). Infektionen des bronchopulmonalen Traktes durch *P. aeruginosa* gelten bei CF-Patienten als Haupttodesursache (Jaeger, 1994; Gomez & Prince, 2007). Therapien gegen *P. aeruginosa* Infektionen sind aufgrund der hohen intrinsischen Antibiotikaresistenz sowie der Ausbildung von Biofilmen auf dem Wirtsgewebe stark erschwert (Høiby, 2002; Conway *et al.*, 2003). Das enorme pathogene Potenzial kann auf die Produktion und Sekretion einer Vielzahl von Virulenzfaktoren zurückgeführt werden. Zu den Virulenzfaktoren zählen neben den Zell-assoziierten Komponenten wie dem Exopolysaccharid Alginat die Lipopolysaccharide (LPS), die Pili und das Flagellum, aber auch zahlreiche von den Bakterien sekretierte extrazelluläre Enzyme (Winkler *et al.*, 1985; Kadurugamuwa & Beveridge, 1995; Van Delden & Iglewski, 1998) (Abb. 1.6). Hierzu gehören beispielsweise das Exotoxin A (ToxA) und Exoenzym S sowie mehrere Proteasen, Phospholipasen, Lipasen und Siderophore (Zulianello *et al.*, 2006). Viele dieser Virulenzfaktoren werden über ein Zelldichte-abhängiges Regulationsnetzwerk kontrolliert, das so genannte „*Quorum sensing*“ System.

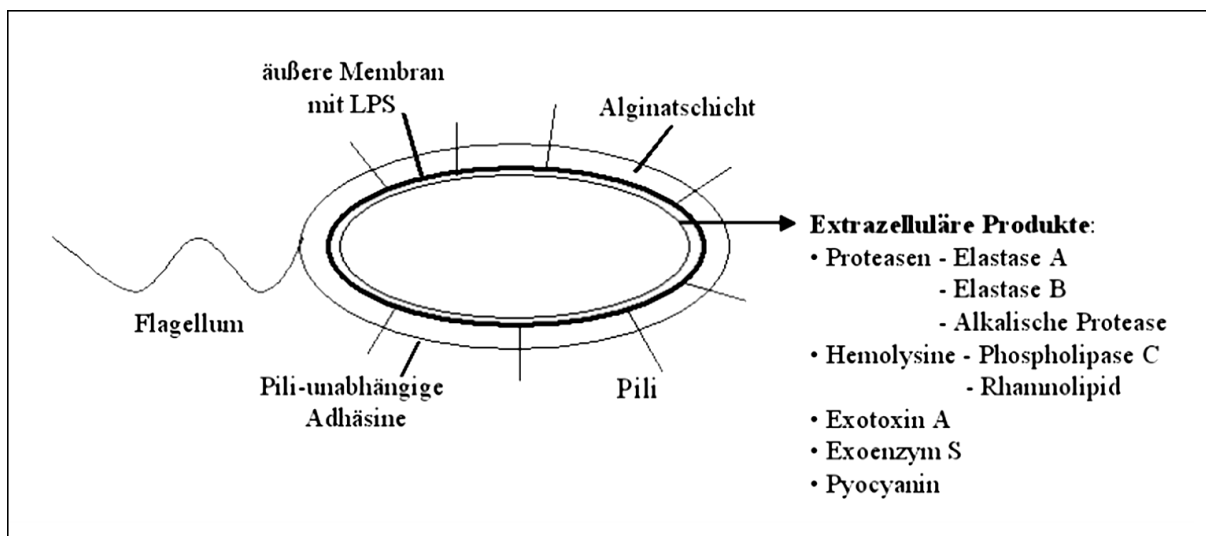


Abb. 1.6: Schematische Darstellung einer *P. aeruginosa*-Zelle mit Zell-assoziierten sowie sekretierten Virulenzfaktoren (Van Delden & Iglewski, 1998).

1.4.1 „*Quorum sensing*“ in *P. aeruginosa*

Lange Zeit wurden Bakterien als einzellige Lebewesen angesehen, welche unabhängig voneinander ihre biologische Funktion ausübten. Nach heutiger Ansicht stellt diese strikte einzellige Lebensweise eher die Ausnahme dar. Stattdessen leben die meisten Bakterien in der

Natur in Biofilmen zusammen (Costerton *et al.*, 1995, 1999). Bakterien innerhalb eines, an einer Oberfläche angehafteten Biofilms können an unterschiedlichen Positionen unterschiedliche und sogar spezialisierte Aktivitäten zeigen (Xu *et al.*, 1998; Wimpenny *et al.*, 2000). Für die Organisation einer solchen multizellulären Gemeinschaft wird eine Zell-Zell-Kommunikation benötigt. Diese wurde in den 60er Jahren anhand der Zelldichte-abhängigen Regulation der Biolumineszenz bei *Vibrio fischeri* entdeckt (Kemptner & Hanson, 1968; Nealson *et al.*, 1970). 1981 konnte von Eberhard *et al.* gezeigt werden, dass die Zelldichte-abhängige Regulation der Biolumineszenz bei *Vibrio fischeri* auf die Produktion von niedermolekularen Substanzen zurückzuführen ist, den so genannten „Autoinducern“. Seit den 90er Jahren ist die Zell-Zell-Kommunikation über „Autoinducer“ unter Gram-negativen Bakterien als weit verbreitetes System akzeptiert (Fuqua *et al.*, 1996; Swift *et al.*, 1999). Eines der am besten untersuchten Zell-Zell-Kommunikationssysteme ist das von *P. aeruginosa*. Das so genannte Las-System, welches unter anderem für die Expression des Virulezfaktors ElastaseB (LasB) verantwortlich ist, war eins der ersten beschriebenen Systeme (Gambello & Iglewski, 1991). Dabei synthetisiert die Signalmolekül-Synthase LasI das langkettige *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-*L*-Homoserinlacton (3-oxo-C12-HSL) (Pearson *et al.*, 1994) welches daraufhin entweder über langsame Diffusion oder durch einen aktiven Transport über die MexAB-OprM Pumpe aus *P. aeruginosa* heraus oder hinein transportiert wird (Pearson *et al.*, 1999). Bindet das 3-oxo-C12-HSL an den entsprechenden Transkriptionsaktivator LasR, führt dies zu einer verstärkten Transkription von *lasI* und damit zu einer sehr schnell ansteigenden Konzentration von Autoinducern.

Neben dem Las-System besitzt *P. aeruginosa* noch mindestens ein weiteres Zell-Zell-Kommunikationssystem, das so genannt Rhl-System. Das Rhl-System benutzt im Gegensatz zu dem Las-System kurzkettige Signalmoleküle, die *N*-Butanoyl-*L*-Homoserinlactone (C4-HSL) (Pearson *et al.*, 1995). Diese kurzkettigen Signalmoleküle können frei durch die Zellmembran diffundieren und stellen so schnell ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer Konzentration ein (Pearson *et al.*, 1999).

Innerhalb dieser Systeme gibt es noch einen dritten analogen Rezeptor, QscR. QscR agiert ebenfalls mit 3-oxo-C12-HSL und reguliert die Genexpression von spezifischen Regulons welche sich mit denen von *las* und *rhl* überschneiden (Abb. 1.7) (Chugani *et al.*, 2001; Lequette *et al.*, 2006; Fuqua 2006). Je nach Anwesenheit von AHLs bildet es inaktive Heterodimere mit LasR oder RhlR und verhindert damit die Expression von QS-abhängigen Genen (Ledgham *et al.*, 2003).

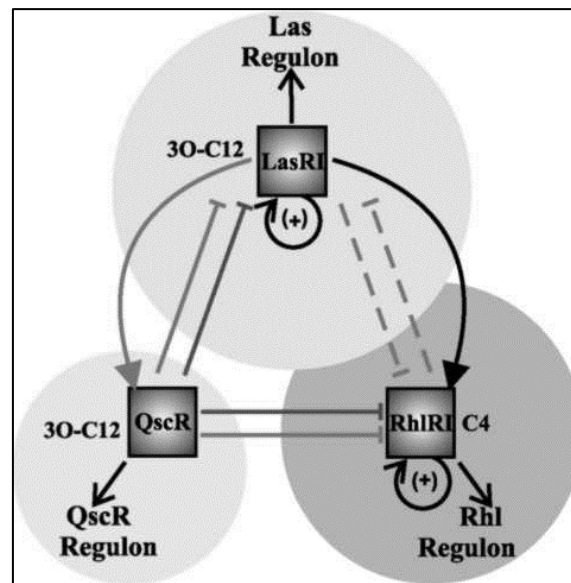


Abb. 1.7: Modell des QS-Netzwerk in *P. aeruginosa* (ohne das *Pseudomonas* quinolon Signal). Dunkle schwarze Pfeile zeigen direkte transkriptionelle Kontrolle, helle graue Pfeile zeigen Protein-AHL-Interaktionen und dunkelgraue Pfeile zeigen Protein-Protein Interaktionen (Fuqua 2006).

Eine Verbindung zwischen dem Las- und dem Rhl-System stellt das *Pseudomonas-Quinolon*-Signal (PQS) dar. Dieses Signalmolekül wird ebenfalls von *P. aeruginosa* ausgeschieden und wurde als 2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolon identifiziert (Pesci *et al.*, 1999; Diggle *et al.*, 2003). Im Aufbau ähnelt PQS den Quinolone-Antibiotika, zeigt aber selber keine antibakterielle Wirkung. Die Produktion von PQS ist abhängig vom Las-System und unterliegt einer komplexen Regulation, bei der das Verhältnis zwischen 3-oxo-HSL und C4-HSL eine wichtige Rolle spielt. Für die Bioaktivität von PQS ist das RhlR vonnöten (Pesci *et al.*, 1999).

In vitro konnte gezeigt werden, dass das QS-System von *P. aeruginosa* hierarchisch aufgebaut ist. An oberster Stelle steht dabei das Las-System welches das Rhl-System kontrolliert (Pesci *et al.*, 1997) und das PQS-System als Mediator zwischen dem Las- und Rhl-System.

1.5 Rhamnolipide aus *P. aeruginosa*

P. aeruginosa ist dafür bekannt, unter Wachstums-limitierenden Bedingungen Biotenside zu produzieren. Biotenside besitzen wie auch die synthetischen Tenside eine amphiphile

Molekülstruktur, der hydrophile Molekülteil besteht dabei normalerweise aus Zuckern, Aminosäuren oder aus Carboxylat- oder Phosphatgruppen. Der hydrophobe Teil zeigt typischerweise eine Zusammensetzung aus gesättigten, ungesättigten (Hydroxy-) Fettsäuren oder Fettalkoholen auf (Lang & Wullbrandt, 1999). Dank dieses amphiphilen Charakters werden sie eingesetzt, um Oberflächenspannungen oder Grenzflächenspannungen herabzusetzen.

Biotenside, welche aus L-Rhamnose und überwiegend β -Hydroxydecano- oder β -Hydroxydodecano-Untereinheiten aufgebaut sind werden als Rhamnolipide bezeichnet. Im Normalfall bestehen sie aus einem 3-hydroxyfettsäure Dimer, welches über eine β -glykosidische-Bindung mit einem Mono- oder Di-Rhamnose Rest verknüpft ist (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Anhand der Rhamnose Moleküle unterscheidet man daher Mono-Rhamnolipide und Di-Rhamnolipide (Abb. 1.8). Es konnten jedoch auch Rhamnolipide mit nur einer Fettsäurekette identifiziert werden (Syldatk *et al.*, 1985; Gruber *et al.*, 1993), diese sind allerdings sehr selten. Arino *et al.*, 1996 hat das Verhältnis der unterschiedlichen Rhamnolipide wie folgt beschrieben:

67% di-RL mit 2 Fettsäureketten; 22% mono-RL mit 2 Fettsäureketten; 9% di-RL mit nur einer Fettsäurekette und 3% mono-RL mit nur einer Fettsäurekette.

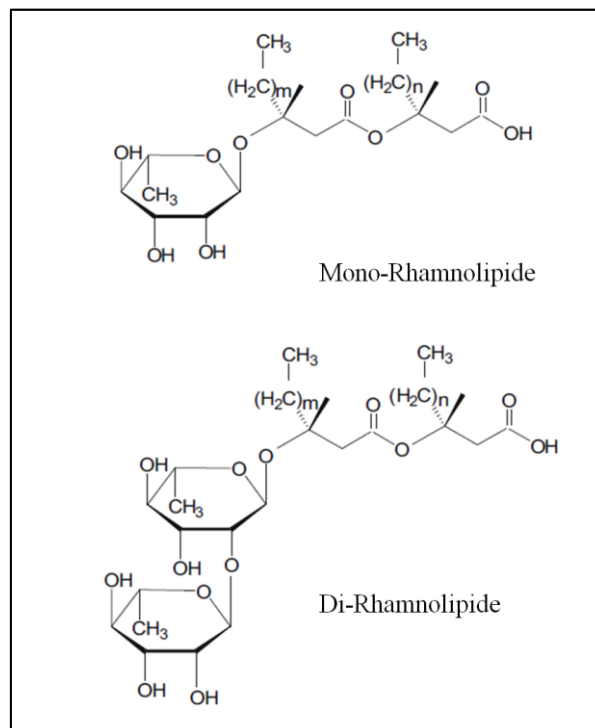


Abb. 1.8: Chemische Struktur von Mono- und Di- Rhamnolipiden.

Die Biosynthese der Rhamnolipide erfolgt über drei in der Reihenfolge festgelegte Schritte (Soberón-Chávez *et al.*, 2005): (1) RhlA (codiert vom *rhlA* Gen) ist an der Synthese der Fettsäure-dimere aus den 3-Hydroxyfettsäurevorstufen beteiligt (Déziel *et al.*, 2003; Lépine *et*

al., 2002; Zu & Rock, 2008). (2) Die Membran gebundene Rhamnosyltransferase RhlB (codiert vom *rhlB* Gen) verknüpft die Fettsäureketten mit dTDP-L-Rhamnose zu mono-RL (Ochsner *et al.*, 1994). (3) Das gebildete mono-RL dient, zusammen mit einem weiterem dTDP-L-Rhamnose Molekül als Substrat für die Rhamnosyltransferase RhlC (codiert vom *rhlC* Gen) und produziert so di-RL (Rahim *et al.*, 2001).

Die Produktion von Rhamnolipiden unterliegt auf transkriptioneller Ebene einer strengen Regulation durch das Quorum sensing System. Die QS-regulierten Gene *rhlA* und *rhlB* sind zusammen in einem Operon organisiert und liegen mit den für das QS-System wichtigen Genen *rhlR* und *rhlI* in einem Gencluster (Lazdunski *et al.*, 2004). Das *rhlC* Gen hingegen ist mit keinem anderen *rhl* Gen verknüpft, sondern wird mit einem anderen Gen, dessen Funktion bisher nicht geklärt werden konnte, in einem Operon kodiert (PA1130). Dieses Operon wird auf transkriptioneller Ebene auf ähnliche Weise wie das *rhlAB* Operon reguliert (Rahim *et al.*, 2001).

1.6 Zielsetzung

Mikrobielle Lipasen, darunter die besonders geeigneten Lipasen der Gattung *Pseudomonas*, finden vor allem Anwendung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie. Von besonderem Interesse ist dabei ihre hohe Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln in Verbindung mit ihrer häufig geringen Substratspezifität. Außerdem zeigen sie gegenüber einem breiten Substratspektrum hohe Stereo- und Regioselektivität und werden deshalb als Katalysatoren bei der Herstellung enantiomerenreiner Wirkstoffe eingesetzt (Jaeger & Reetz, 1998; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Die Expression von aktiven Lipasen aus *Pseudomonas* ist aufgrund der komplexen Regulations-, Faltungs- und Sekretionsvorgänge, der diese Enzyme unterliegen, ein hoch komplexer Prozess. Auch aufgrund ihrer Funktion als Virulenzfaktoren bei pathogenen Mikroorganismen (Jaeger *et al.*, 1994; Mullen *et al.*, 2007) sind Lipasen in das wissenschaftliche Interesse gerückt.

Die Lipase A (LipA) aus *P. aeruginosa* ist eine der am besten untersuchtesten bakteriellen Lipasen. Aus diesem Grund wurde LipA als Modellenzym ausgewählt und dazu benutzt, die physiologischen und regulatorischen Auswirkungen einer Lipaseüberproduktion in *Pseudomonas* zu untersuchen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Lipase- und das zugehörige Foldasegen (*lipA/H*) sowohl im heterologen Wirt *P. putida* als auch im

homologen Wirt *P. aeruginosa* zu exprimieren und mögliche Veränderungen in der Physiologie der betrachteten Organismen zu bestimmen. Hierzu sollten sowohl mögliche phänotypische Veränderungen der Kulturen untersucht werden, als auch die Auswirkungen der Lipaseüberproduktion auf das entsprechende Proteom des jeweiligen Expressionswirtes. Die Proteomdaten sollten aus den Zellkompartimenten gewonnen werden, in denen die Lipase A im entsprechenden Wirt zu finden ist, d.h. das zelluläre Proteom von *P. putida* (ohne entsprechenden Sekretionsweg) und das extrazelluläre Proteom (Sekretom) von *P. aeruginosa*.

Hierzu sollten einschlägige Methoden für globale Expressionsanalysen und qPCR in Hochdurchsatz Verfahren und gegebenenfalls DNA-*microarray* Techniken etabliert werden.

Die daraus resultierenden Erkenntnisse, wie physiologische oder regulatorische Konsequenzen der Lipase-Expression, sollten im Verlauf der Arbeit weiter charakterisiert werden.

2. Material & Methoden

2.1 Chemikalien & Enzyme

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

Antibiotika: Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)

Chemikalien: Biomol (Hamburg), Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), GE-Healthcare (Upsala, Sweden), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg)

Enzyme: Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym von Roth (Karlsruhe), T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A und T4-DNA- Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Pfu- DNA-Polymerase von Stratagene (Heidelberg), DNaseI und Trypsin Gold von Promega (Mannheim)

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

Antikörper: Der Zweitantikörper, Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat, wurde von der Firma BioRad (München) bezogen.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle / Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5α	supE44 Δ(lacZYA-argF)U196 (Φ80ΔlacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PABST7.1	Δ(¾lipA ½lipH) miniD-180 (tetA tetR lacIq PlacUV5-T7gene1)	Jaeger <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAF3	PABS1, lipC::GM ^r	Friedrich. 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ΔpvdS	PAO1, pvdS::Gm ^r	Ochsner <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Wildtyp	Nelson <i>et al.</i> , 2002

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Vektoren

Vektor	Genotyp	Quelle / Referenz
pBBR1MCS	mob <i>lacZ</i> α <i>P_{lac}</i> Cm ^R	Kovach et al., 1994
pVLT33	<i>lacI^q</i> <i>P_{tac}</i> Km ^r mob <i>rep</i>	De Lorenzo et al., 1993
rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle / Referenz
pBBL7	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipAH</i> <i>P_{lac}</i> -kontrolliert), Cm ^r	Wilhelm et al., 2007
pBBLCH	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipCH</i> <i>P_{lac}</i> -kontrolliert), Cm ^r	Heckmann, unveröffentlicht
pVLT33- <i>lipAH</i>	pVLT33 (2308 bp; <i>lipAH</i> <i>P_{tac}</i> -kontrolliert), Km ^r	diese Arbeit
pVLT-4218	pVLT33 (956 bp; pp4218 <i>P_{tac}</i> -kontrolliert), Km ^r	diese Arbeit
pVLT- <i>pvdS</i>	pVLT33 (563 bp; pp4218 <i>P_{tac}</i> -kontrolliert), Km ^r	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	OligonucleotidNukleotidsequenz	Merkmal
<i>lipA</i> up	CCAAATACCCCATCGTGCTG	RT Primer für PAO1 & PP KT2440
<i>lipA</i> dn	CTGTGGCCGATCAGGTTGAC	RT Primer für PAO1 & PP KT2440
<i>lipH</i> up	GCTGATGCAGCAATACATCG	RT Primer für PAO1 & PP KT2440
<i>lipH</i> dn	CTCCAGGGTGAAGTGGTTGT	RT Primer für PAO1 & PP KT2440
<i>lipC</i> up	ACCATCTGGACGAAGTCAAC	RT Primer für PAO1
<i>lipC</i> dn	AGAGTCCGACGTTCTGAG	RT Primer für PAO1
<i>pvdS</i> up	ACAGCTCAGCTACCTGTTCC	RT Primer für PAO1
<i>pvdS</i> dn	TAGTTGATGTGCGAGGTTTC	RT Primer für PAO1
<i>prpL</i> up	CAAGGACCTCTCGGTCAA	RT Primer für PAO1
<i>prpL</i> dn	GAGTCGGCGAAATACGATAC	RT Primer für PAO1
<i>pvdD</i> up	TCAACCATCAGAGCGAGATA	RT Primer für PAO1
<i>pvdD</i> dn	CTGAATATCCAGCGTCAGG	RT Primer für PAO1
<i>pvdE</i> up	CGGTACTGACACACGACATT	RT Primer für PAO1
<i>pvdE</i> dn	GACTGTCAGCAGGAACATTG	RT Primer für PAO1
<i>tonB</i> up	AAGACCATGCAGGTGAATTT	RT Primer für PAO1
<i>tonB</i> dn	CTTGGGTTCTCGATCTTC	RT Primer für PAO1
<i>cbrA</i> up	AGTTGTTCGAACCGTTCTTC	RT Primer für PAO1
<i>cbrA</i> dn	GGCTCTCGATGGTTATCTGT	RT Primer für PAO1
<i>cbrB</i> up	ACCATTATCCGATCTGCATT	RT Primer für PAO1
<i>cbrB</i> dn	GAAGGAGGGGATGGTGTAG	RT Primer für PAO1

<i>rhlI up</i>	CAGTTCGAGCATCCGCAAAC	RT Primer für PAO1
<i>rhlI dn</i>	GCTGCACAGGTAGGCGAAGA	RT Primer für PAO1
<i>rhlR up</i>	TGCTGACCCAGAAGCTGACC	RT Primer für PAO1
<i>rhlR dn</i>	TGCTCAGGATGATGGCGATT	RT Primer für PAO1
<i>rpoD up</i>	CAGCTCGACAAGGCCAAGAA	RT Primer für PAO1
<i>rpoD dn</i>	CCAGCTTGATCGGCATGAAC	RT Primer für PAO1
<i>pp4218 up</i>	CGCCTGCAGGTAATGATCTA	RT Primer für PP KT2440
<i>pp4218 dn</i>	GTGGCGTATTGCTGGTAGAA	RT Primer für PP KT2440
<i>rpoD up</i>	GTATATGCGCGAAATGGGTA	RT Primer für PP KT2440
<i>rpoD dn</i>	ATGTAACCGCTGAGAACGTC	RT Primer für PP KT2440
<i>pvdS-XbaI up</i>	AACATAATTTGTTTCTAGATG TGTGGGTCT	Klonierung von pVLT- <i>pvdS</i>
<i>pvdS-HindIII dn</i>	CGC CGC TAC AAG CTT TGA GGA ATG CT	Klonierung von pVLT- <i>pvdS</i>
<i>PP4218-KpnI up</i>	GTCGGATCCCTTACAGATGCT GCTGCAGTGCCTCGAC	Klonierung von pVLT-4218
<i>PP4218-BamHI dn</i>	CAGGTGGTACCGCACAGTTG GTGGGT	Klonierung von pVLT-4218
<i>lipA-HindIII up</i>	CAGGAATTCGATATCAAGCT TATCGATA	Klonierung von pVLT- <i>lipAH</i>
<i>lipA-HindIII dn</i>	TAGACCAAGCTTGATATCGA ATTCCTGCAG	Klonierung von pVLT- <i>lipAH</i>

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

2.4 Anzucht von Bakterien

Alle Nähr- und Testmedien wurden für 20 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter: 0,22 μm Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60 °C nachträglich zugesetzt.

2.4.1 Nährmedien

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

Lösung I 30 g/L Bernsteinsäuresalz

Lösung II 20 g/L MgSO₄ x 7 H₂O

Lösung III 2 g/L CaCl₂ x 2 H₂O

Lösung IV 70 g/L Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 30 g/L KH₂PO₄; 5 g/L NaCl; 10 g/L NH₄Cl

Lösung V 1,6 g/L MnSO₄; 2,8 g/L H₃BO₃; 0,04 g/L Cu(NO₃)₂; 0,24 g/L ZnSO₄;
0,8 g/L Na₂MoO₄

Lösung VI 5 g/L FeSO₄; 0,16 % (v/v) HCl

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und in folgendem Verhältnis eingesetzt: 10% (v/v) Lsg. I; 1 % (v/v) Lsg. II; 1 % (v/v) Lsg. III; 10 % (v/v) Lsg. IV. Zusätzlich wurde 0,1 % (v/v) Lsg. V und 0,12 % (v/v) Lsg. VI zugesetzt.

LB-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g/L NaCl;

10 g/L Trypton ;

5 g/L Hefeextrakt

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

2.4.2 Indikatormedien

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

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

Tributyrin-Agar (Kok *et al.*, 1993):

7,5 ml Tributyrin und 0,75 g Gummi arabicum ad 15 ml A. dest.

Die Lösung wurde gemischt, mit Ultraschall (3 min, 75 W, 100 %) emulgiert und zu 500 mL autoklaviertem LB-Agar (60 °C) gegeben.

2.4.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium. *P. putida* Kulturen wurden bei 30 °C in M9-Medium inkubiert. Dabei wurden Stämme mit plasmid- oder genomcodierten Resistenzmarkern unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (siehe Tab. 2.4). Übernachtskulturen (ÜK) wurden für mindestens 16 h inkubiert. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 mL wurden im Reagenzglas auf einem Brutroller angezogen, während größere Kulturen im Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: max. 1/5 bis 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Rundschüttler bei 150 UpM bebrütet wurden. Zur Überexpression heterologer Gene wurde, soweit nicht anders angegeben, die Expression bei einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} von 0,5 entsprach, durch die Zugabe von IPTG

(Endkonzentration 0,4 mM für *E. coli* und *P. putida* bzw. 1 mM für *P. aeruginosa*) induziert. Vorkulturen wurden entweder mit Einzelkolonien von Stamm- bzw. Transformationsplatten oder mit 1/500 Volumen aus einer Gefrierkultur inokuliert. Hauptkulturen wurden mit einer ÜK auf eine Zelldichte angeimpft, die einer O.D.580 nm von 0,05 entsprach. Die Zelldichte von Kulturen wurde turbidometrisch in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7 % (v/v) DMSO vermischt und bei -80 °C gelagert.

Tab. 2.4: Endkonzentrationen der zur Selektion verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	für <i>E. coli</i> [µg/ml]	für <i>P. aeruginosa</i> [µg/ml]	für <i>P. putida</i> [µg/ml]
Ampicilin (Amp)	100	-	-
Chloramphenicol (Cm)	50	300	450
Tetracyclin (Tc)	50	100	50
Kanamycin (Km)	50	300	50

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1 DNA

Chromosomale DNA aus *P. aeruginosa* und *P. putida* Zellen wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen isoliert. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, *P. putida* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der von Birnboim & Doly (1979) beschriebene Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung der Minipräp-Kits der Firmen Eppendorf (Hamburg) und Analytik Jena (Jena) nach Herstellerangaben. Des Weiteren wurden die Midipräp-Kits der Firma Qiagen (Hilden) und Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

2.5.2 RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Handbook 06/2001) verwendet. Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde ein zweiter 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.

2.6 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 0,6 - 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 erwarteten Fragmentgrößen die „1 kb-ladder“ von Invitrogen (Karlsruhe) sowie die 1 kb und 50 bp „GeneRuler™ Ladder“ von Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystem 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 des „innuPREP Gel Extraction“ Kit der Firma Analytik Jena (Jena) nach Angaben des Herstellers.

2.7 *In vitro*-Rekombination von DNA

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

2.8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt. Die Herstellung und Verwendung von elektokompetenten *P. aeruginosa* und *P. putida* wurde wie von Choi *et al.* (2005) beschrieben durchgeführt.

2.9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 mL einer ÜK des Plasmid-haltigen Donorstamms *E. coli* S17-1 mit 1 mL Zellen des jeweiligen Rezipientenstammes, die zuvor für 10 min bei 46 °C inkubiert wurden, gemischt und durch Zentrifugation (3 min; 5.000 g; 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 von 10⁻¹ bis 10⁻⁶ auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion von *E. coli* wurden 25 µg/mL Irgasan (Ciba Geigy, Basel, Schweiz) eingesetzt.

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.10.1 Standard-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 *Pfu*- oder Turbo-*Pfu*-Polymerase im Reaktionspuffer des jeweiligen Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 × (10 min 98 °C); 30 × (1 min 95 °C; 0,5 min 55–70 °C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5–2 min 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); 1 × (5 min 72 °C). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „innuPREP Gel Extraction“ Kit der Firma Analytik Jena

(Jena) nach Angaben des Herstellers. Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.10.2 Ortsspezifische Mutagenese

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

2.10.3 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 Oligonukleotidstarmoleküle 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 ermittelt.

Die Programmeinstellungen waren folgende:

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

Real-time-PCR Reaktionen wurden in einem ep Gradient S realplex4 Automaten der Firma Eppendorf durchgeführt.

2.11 Sequenzierung von DNA

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

2.12 Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten (GZE)

Um die Expression von Proteinen in *E. coli*, *P. putida* und *P. aeruginosa* nachzuweisen und den zeitlichen Verlauf zu analysieren, wurden Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte (GZE) hergestellt. Aus den Expressionskulturen wurden Proben entnommen und die Zelldichte über Messung der O.D.580 bestimmt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 6.000 UpM, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und im Bedarfsfall sterilfiltriert (Schleicher und Schüll, NC45 Membranfilter, 0,45 µm Porendurchmesser). Das Zellsediment wurde je nach weiterem Verwendungszweck in entsprechendem Puffer aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W250, 2 × 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt) oder einem Aufschluss mittels „French Press“ (Thermo, 3x 1500 PSI) unterzogen. Die erhaltenen Proben wurden sofort verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.13 Löslichkeitsanalyse von Proteinen

Um festzustellen, ob Proteine in Lösung oder als Präzipitat vorlagen, wurden die zu untersuchenden Proben zentrifugiert (15 min, 13.000 UpM, RT). Der Überstand wurde vorsichtig von dem evtl. aufgetretenen Sediment getrennt und die Proteinkonzentration beider Fraktionen mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kit“ der Firma Pierce (Rockford, USA) quantifiziert oder durch eine SDS-PAGE (2.20) untersucht.

2.14 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden unter Verwendung der Zentrifugationskonzentratoren Vivaspin 20 (Vivascience, Hannover) mit jeweils für das Protein geeigneten Ausschlussgrößen in Ausschwingrotoren einer Kühlzentrifuge bei 3.000 x g konzentriert. Zur Umpufferung wurden die Proteinlösungen nach dem Konzentrieren dreimal mit dem Zielpuffer auf das ursprüngliche Volumen der Probe aufgefüllt und erneut konzentriert. Der Erfolg der Umpufferung wurde jeweils durch eine Löslichkeitsanalyse (2.13) bestimmt.

2.15 Bestimmungen von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen von Lösungen wurden mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kits“ der Firma Pierce (Rockford, USA) ermittelt. Proteinkonzentrationen für die 2 dimensionale Gelelektrophorese (2.21) wurden mit Hilfe des „2-D Quant Kit“ der Firma GE Healthcare (Upsala, Schweden) bestimmt.

2.16 Spektralphotometrische Bestimmung von Lipaseaktivität

Lipaseaktivitäten wurden photometrisch über die enzymatische Umsetzung von Fettsäuren mit verestertem *para*-Nitrophenol (*p*NP) bestimmt. Durch die Esterhydrolyse des farblosen Substrates wird *p*-Nitrophenol freigesetzt, das in basischer Lösung Licht der Wellenlänge $\lambda = 410 \text{ nm}$ absorbiert. Die Zunahme der O.D._{410 nm} pro Zeiteinheit ist daher ein Maß für die

Aktivität der Lipase. Für die qualitative und quantitative Bestimmung der Lipaseaktivität einer Lösung wurde das Substrat *p*NPP verwendet (nach Winkler & Stuckmann, 1979).

Substratemulsion: 207 mg Natriumdesoxycholat; 100 mg Gummi arabicum; 90 mL Sørensen Phosphatpuffer pH 8,0 (Lösung A: 8,9 g/L Na₂HPO₄; Lösung B: 0,68 g/L KH₂HPO₄ [A:B → 17:1]); 30 mg *p*NPPalmitat in 10 mL Isopropanol.

Für den Test in Mikrotiterplatten wurden je 200 µL der Substratemulsion mit 5 bis 40 µL Probe vermischt und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Während dieser Zeit wurde die O.D._{410 nm} alle 30 s mit einem Spectramax Plus Spektralphotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bestimmt. Die Auswertung der Daten wurde mit der SOFTmax Pro 3.1.2 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) durchgeführt. Für die Durchführung des *p*NPP-Tests in größeren Volumina wurden je 1 mL Substratemulsion mit bis zu 50 µL Probe gut gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die O.D._{410 nm} der einzelnen Ansätze im GENESYS 10 VIS Spektralphotometer (Thermo Scientific, Madison, USA) bestimmt. Eine Absorption von 1 bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ entspricht einer Lipaseaktivität von 0,161 nkat oder einer Lipasemenge von 0,212 ng.

2.17 Bestimmung von Sidherophoren

2.17.1 Bestimmung von Pyoverdin (Meyer & Abdallah 1987)

Das Vorhandensein von Pyoverdin kann durch zwei verschiedene Tests bestimmt werden. Aufgrund der Primärstruktur des Pyoverdin fluoresziert es bei Anregung mit einer Wellenlänge von 325 nm (UV Licht) und kann so einfach detektiert, aber nicht quantifiziert werden. Die zweite Methode basiert auf einem spektralphotometrischen Test. Ein Zellfreier Kulturüberstand aus der spät stationären Wachstumsphase wird auf eine O.D._{580nm} normalisiert und daraufhin die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Konzentration an Pyoverdin lässt sich mit einem Extinktionskoeffizient von ($1,9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnen (Wilderman et al., 2001).

2.17.2 Bestimmung von Pyocyanin

Nach dem modifizierten Protokoll von Cox (1986) wurden 4 ml Kulturüberstand einer NBÜbernachtkultur viermal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Der relative Pyocyanin-Gehalt der organischen Phase wurde spektralphotometrisch bei 695 nm bestimmt. Nach Essar *et al.* (1990) wurde dieser Wert mit 85,36 multipliziert und somit die Pyocyanin-Konzentration in µg pro ml Kulturüberstand berechnet.

2.18 Rhamnolipid-Nachweis

2.18.1 Extraktion von Rhamnolipiden

Rhamnolipide wurden jeweils aus 500 µl einer ÜB-Kultur extrahiert. Hierzu wurde dem Kulturüberstand zweimalig 600 µl Ethylacetat hinzugegeben. Nach Vereinigung der

Diethylether-Phasen wurde diese in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamnurg) vollständig evaporiert.

2.18.2 Orcinol-Test

Rhamnolipid-Gehalte in Kulturüberständen wurden über einen, nach Ochsner (1993) modifizierten, Orcinol-Test (Chandrasekaran & Bemiller, 1980) ermittelt. Dabei wurden 100 µl Kulturüberstand einer LB-Übernachtskultur (falls erforderlich mit Medium verdünnt) zweimal mit 600 µl Ethylacetat extrahiert, die gesammelten organischen Phasen in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) eingetrocknet und in 100 µl Wasser gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Orcinol (1,6 % (w/v) in Wasser) und 800 µl H₂SO₄ (60 %) wurde das Gemisch 30 min bei 80°C erhitzt und die Absorption bei 421 nm gemessen. Rhamnosekonzentrationen wurden durch Vergleich mit Rhamnose-Standards und Rhamnolipidkonzentrationen unter Bezugnahme auf die folgende Gleichung ermittelt:

1 µg Rhamnose $\hat{=}$ 2,5 $\pm$ 0,5 µg Rhamnolipid.

2.18.3 Dünnschichtchromatographie von Rhamnolipiden

Die Rhamnolipide aus 500 µl Kulturüberständen wurden mit Diethylether extrahiert (2.18.1) und in 10 µl Ethanol aufgenommen. Die Proben wurden auf die Kieselgel 60 F254 (Merck, Darmstadt) Glasplatte (20 cm $\times$ 20 cm) punktförmig mit einer Hemmelton-Pipette aufgetragen. Die Platte wurde in einen mit dem Laufmittel (Chloroform: Methanol: Essigsäure (65:15:2)) gesättigten Tank gestellt und wieder herausgeholt, sobald die Lauffront 2 cm von dem Plattenrand entfernt war. Die bei RT getrocknete DC-Platte wurde mit dem Farbreagenz: 0,15 g Orcinol (Sigma); 42 ml A.dest; 8,4 ml Schwefelsäure besprüht und in trockenem Zustand bei 110°C 10 min inkubiert. Die Rhamnolipid-Dots färbten sich braun. Die Dokumentation erfolgte mit einem Scanner. Als Standard wurde gereinigte Rhamnolipide (nach Deziel, 1999) aufgetragen.

2.19 Präzipitation von Proteinen (Peterson, 1977)

Proteinproben wurden mit 0,1 Volumen Natriumdesoxycholat-Lösung vermischt, mit 0,2 Volumen 70 %iger (w/v) Trichloressigsäure versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (30 min, 13.000 UpM, RT) wurde das Sediment zweimal mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen und getrocknet.

2.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970), bestehend aus einem 5 %-igen Sammel- und einem 12 %-igen Trenngel. Die Proben wurden in

SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250)

aufgenommen und vor dem Auftragen 10 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merril (1990) mit „Coomassie Brilliant Blue R-250“ (Serva, Heidelberg) oder mittels „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese durch TCA-Fällung präzipitiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von weniger als 15 kDa und für analytische Gele, bei denen eine hohe Trennleistung erforderlich war, wurden diskontinuierliche Tricin-Gelsysteme mit 4 %-igen Sammel- und 15 %-igen Trenngelen verwendet (Schagger, 2006).

2.21 Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese (2-D-Gele)

2.21.1 Probenvorbereitung

Bei Proben für die 2-D-Gele wird zwischen Überstand und ganzen Zellen unterschieden. Für Überstandsgele wurde eine entsprechende Menge Kultur geerntet (15 min, 6000 UpM, 4°C) und der Überstand sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter: 0,22 μ m Porendurchmesser). Anschließend wurden die Proteine mittels TCA-Fällung präzipitiert (2.19) und daraufhin in

Rehydrationsbuffer: 8 M Harnstoff; 2% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) IPG Puffer (GE Healthcare, Schweden); 0,1% (v/v) Bromphenolblau (1%tig)

aufgenommen. Die Konzentration der Proteine wurde mittels „2-D-Quant Kit“ (GE Healthcare, UK) überprüft.

Für 2-D-Gele von ganzen Zellen wurde eine entsprechende Kultur geerntet (15. min, 6000 UpM 4°C) und das Pellet in

Resuspendierungspuffer: 50 mM TrisHCl (pH 7); 7 M Harnstoff; 1 M Thioharnstoff; 4% (w/v) CHAPS

resuspendiert. Aus diesem Puffer-Zell-Gemisch wurde mittels „French Press“ ein Gesamtzellextrakt (2.12) hergestellt und anschließend zur Entfernung größerer Zelltrümmer zentrifugiert (10 min., 4000 UpM, 4°C). Die im Überstand enthaltene Proteine werden anschließend mittels TCA-Fällung präzipitiert (2.19) und deren Konzentration mit dem „2-D-Quant Kit“ (GE Healthcare, UK) bestimmt.

2.21.2 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Für die Methode der „2-D Fluorescence *Difference Gel Electrophoresis*“ (DIGE) wurden die Proteine mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Für diese Zwecke wurde die Farbstoffe Cy2, Cy3 und Cy5 der Firma GE Healthcare (UK) aus dem „Amersham CyDye

DIGE Fluors (minimal dyes) for Ettan DIGE“ Kit benutzt und nach Herstellerangaben verwendet. Eine einzige Ausnahme besteht darin, dass statt 50 µg Protein 100 µg Protein verwendet wurden.

2.21.3 Beladen der IPG Strips

Für die Auftrennung im elektrischem Feld wurden fertige Gelstreifen der Firma GE Healthcare (UK) in unterschiedlichen Formaten benutzt. Zur Beladung der Gelstreifen wurde das in Tabelle 2.5 aufgeführte Volumen mit entsprechender Proteinkonzentration luftblasenfrei in einen „Strip Holder“ (GE Healthcare, UK) gegeben. Der Gelstreifen wurde auf den Flüssigkeitsfilm gegeben, so dass ein direkter Kontakt zwischen Gel und Flüssigkeit bestand. Es ist darauf zu achten das sich keine Luftblasen bilden und der Gelstreifen ohne Druck aufgelegt wird. Anschließend wurde alles mit „Cover Fluid“ (GE Healthcare, UK) überschichtet und für mind. 9 h stehen gelassen.

Tab 2.5: Unterschiedliche Gelstreifen und deren Ladekapazität. NL steht für negativen Logarithmus

Länge des Gel	pH Gradient	Probenvolumen	Proteinmenge	
			Standard	DIGE
13 cm	pH 3 – 11 NL	250 µl	175 µg	-
13 cm	pH 4 – 7	250 µl	175 µg	-
24 cm	pH 3- 10 NL	450 µl	250 µg	100 µg
24 cm	pH 4 – 7	450 µl	250 µg	100 µg

2.21.4 Isoelektische Fokussierung (1. Dimension)

Die Isoelektrische Fokussierung wurde in einem „Ettan IPGphor 3“ System durchgeführt. Die einzelnen Schritte unterscheiden sich je nach Länge und pH Bereich der einzelnen Gelstreifen. Tabelle 2,6 zeigt eine Übersicht der verwendeten Programme.

Tab. 2.6: Parameter der Isoelektrischen Fokussierung. Abhängig von Länge und pH Bereich der Gelstreifen

<i>Immobiline DryStrip</i>		Ladung durch Rehydrierung				Temperatur [°C]	Stromstärke pro Streifen
Länge [cm]	pH Bereich	Schritt	Methode	Volt [V]	Zeit [h bzw. Vh]		
13	4 - 7	1	Step&Hold	500	500 Vh	20	50 µA
		2	Gradient	1000	800 Vh		
		3	Gradient	8000	11300 Vh		
		4	Step&Hold	8000	5400 Vh		
13	3 – 11 NL	1	Step&Hold	500	500 Vh	20	50 µA
		2	Gradient	1000	800 Vh		
		3	Gradient	8000	11300 Vh		
		4	Step&Hold	8000	2900 Vh		

24	4 – 7	1	Step&Hold	150	3 h	20	75 μ A
		2	Step&Hold	300	3 h		
		3	Gradient	1000	6 h		
		4	Gradient	10000	1 h		
		5	Step&Hold	10000	5 h		
24	3 – 10 NL	1	Step&Hold	500	500 Vh	20	50
		2	Gradient	1000	800 Vh		
		3	Gradient	8000	11300 Vh		
		4	Step&Hold	8000	62500 Vh		

2.21.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2. Dimension)

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970), bestehend aus einem 12,5 %-igen Trenngel.

Die elektrophoretische Trennung für 13 cm breite Gele erfolgte in der Gelapparatur „Rubby 600 SE“ der Firma GE Healthcare (UK) bei einer Spannung von 100 – 300 Volt. Für 24 cm breite Gele erfolgte die elektrophoretische Trennung in der Gelaparatur „Ettan DALT six“, ebenfalls von der Firma GE Healthcare (UK). Die Auftrennung erfolgte über Nacht in zwei Schritten:

Schritt 1: 50 V Limit, 10 mA/Gel, 1 W/Gel für 1 h

Schritt 2: 250 V Limit, 30 mA/Gel, 2,5 W/Gel für 16 h

Dabei wurde der Gelstreife aus der Isoelektrischen Fokussierung auf das Gel aufgesetzt und mittels Agraose-Lösung (2%tig (w/v)) luftblasenfrei fixiert.

Fluoreszenz markierte Gele wurden nach Beendigung mittels des „Thyphon“ Scanners (GE Healthcare, UK) gescannt und anschließend nach Merril (1990) mit „Coomassie Brilliant Blue R-250“ (Serva, Heidelberg) oder mittels „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt.

2.22 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation time of flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) (Schaffer *et al.*, 2001)

Die Identifikation von Proteinen aus 1-D und 2-D Gelen wurde mittels *mass fingerprinting* von tryptisch verdauten Proteinen durchgeführt. Proteinspots wurden aus dem Gel herausgelöst und so lange mit

Waschpuffer 10 mM Na₂HCO₃ in 30% (v/v) Acetonitril

gewaschen bis keine Blaufärbung mehr zu erkennen war. Anschließend wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und mit 3 μ l Trypsin (0,02 μ g/ μ l in 3 mM TrisHCl) rehydriert und daraufhin mit weiteren 3 μ l TrisHCl überschichtet. Die Elution der Proteine

erfolgte nacheinander mit 3 µl H₂O (wässrige Phase) und 5 µl 0,2% (v/v) Trifluoressigsäure in 30% (v/v) Acetonitril.

MALDI-TOF-MS wurde durchgeführt mit einem „Ultraflex III TOF/TOF“ Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen). Zum Vergleich der gemessenen Massenspektren mit dem theoretischen Proteom von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. putida* KT2440 wurde die MASCOT Software (Perkins et al., 1999) verwendet.

2.23 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch SDS-PAGE (2.20) aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung der Apparatur „Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, München) übertragen (Wilson & Yuan, 1989). Der Proteintransfer erfolgte für 15 min bei 150 mA und weitere 25 min bei 300 mA konstanter Stromstärke in

Dunn-Carbonat-Puffer (10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20 % (v/v) Methanol) (Dunn, 1986).

Anschließend wurde die PVDF-Membran mindestens 1 h in

TBST (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,2 % (v/v) Tween 20)

mit 2 % (w/v) Milchpulver blockiert.

Der indirekte immunologische Nachweis von dem auf der PVDF-Membran immobilisierten LipA- und LipH-Protein erfolgte unter Verwendung eines LipA- bzw. LipH-spezifischen polyklonalen Antiserums in einer Verdünnung von 1:50.000 bzw. 1:200.000. Die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „ECL-Western Blotting Detection“-System (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Großbritannien) unter Verwendung des Zweit-Antikörpers Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Bio-Rad, München) in einer Verdünnung von 1:5.000. Die Visualisierung der Signale erfolgte mit dem Stella Chemilumineszenz-Detektor (raytest, Straubenhardt). Die densitometrische Quantifizierung der Signale wurde mit Hilfe der AIDA Software (raytest, Straubenhardt) durchgeführt.

2.24 Computerprogramme und Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software). Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul et al., 1997). Alignments wurden mit Bio-Edit (Hall, 1999) erstellt. Das Design von Primern wurde mit Hilfe des Primer3 Tools durchgeführt (Rozen & Skaletsky, 2000). DNA-Sequenzinformationen von *P. aeruginosa* und

P. putida wurden von dem „*Pseudomonas*-Genome Project“ bezogen (<http://www.pseudomonas.com>).

Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des „Peptide Cutter“ (<http://expasy.org/tools/peptidecutter/>) auf Protease Schnittstellen untersucht und die theoretische Masse der Peptidestücke wurde anschließend mittels „Peptide Mass“ (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>) ermittelt.

Die Auswertung der Proteom-Daten erfolgte mit der DECODON Delta 2D Software 4.1 (Decodon, Greifswald).

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

3. Ergebnisse:

3.1 Expression einer heterologen Lipase in *Pseudomonas putida* KT2440

In vielen Industriezweigen von heute werden zur Fertigung von Produkten Proteine/Enzyme aus Mikroorganismen verwendet. Typische Vertreter solcher Mikroorganismen sind Gram-positive oder Gram-negative Bakterien wie z.B. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und auch immer mehr *Pseudomonas putida*. Nicht immer können Enzyme im homologen Wirt exprimiert werden, die Ursachen dafür können vielfältig sein. So kann z.B. die Expressionsrate im homologen Wirt zu gering sein oder das Endprodukt in zu hoher Konzentration toxisch auf das Bakterium wirken. Ein weiterer Grund kann sein, dass das homologe Bakterium nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen kultiviert werden kann welche für industrielle Prozesse zu aufwendig oder einfach zu kostspielig sind. Aus diesen und auch anderen Gründen bedient sich die Industrie oft der Weißen Biotechnologie und produziert Proteine in einem heterologen Wirt. Bei der heterologen Expression wird das Gen des gewünschten Proteins eines Organismus in einen Vektor kloniert und in einem anderen Organismus exprimiert. Bei der heterologen Genexpression wird eine hohe Ausbeute an aktivem Protein, bei möglichst geringen Kosten angestrebt.

In den seltensten Fällen wird darauf geachtet, welche Auswirkungen die heterologe Expression auf den Organismus hat, der das Protein exprimiert. Dabei kann gerade eine heterologe Expression zu vielen Veränderungen im Stoffwechsel oder anderen wichtigen Zellprozessen führen. Zur genaueren Untersuchung, was während einer Lipaseexpression im Wirtsbakterium passiert, wurde in dieser Arbeit das Operon der „Lipase“ (LipA) und der dazu gehörigen „Foldase H“ (LipH) aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in einen Expressionsvektor der pVLT-Reihe (de Lorenzo *et al.*, 1993) kloniert und im heterologen Wirt *Pseudomonas putida* KT2440 als auch im homologen Wirt exprimiert.

3.1.1 Expression des *lipAH* Operons in *P. putida*

Für die Expression der *lipAH*-Gene in *P. putida* wurde das *lipAH*-Operon aus dem bestehendem Plasmid pBBL7 (Wilhelm *et al.*, 2007) durch die Restriktionsendonuklease *HindIII* hydrolysiert und in den Expressionsvektor pVLT33 kloniert (siehe Anhang). In dem so entstandenen Plasmid (pVLT-*lipAH*) lagen die Gene des Operons unter der Kontrolle des induzierbaren *Ptac*-Promotors.

Die Plasmide wurden mittels Elektroporation in *P. putida* eingebracht und die Expression des *lipAH* Operon durch Zugabe von IPTG induziert. Die erfolgreiche Expression sollte mittels SDS-PAGE Analyse (2.20) beobachtet werden (Abb. 3.1). Dazu wurden Zellextrakte von Kulturen hergestellt, welche bei einer OD_{580 nm} von 0,3 mittels IPTG induziert wurden und für 16 h unter induzierenden Bedingungen kultiviert wurden. Anschließend wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. Bei der anschließenden Elektrophorese waren jedoch nach 16 h Expression keine deutlichen Expressionsbanden auf Höhe der Lipase (29 kDa) oder der Foldase (37 kDa) im Vergleich zum Leervektor zu erkennen. Jedoch konnten zahlreiche andere Unterschiede zwischen der Leervektor- und der *lipAH*-Expressionskultur beobachtet werden (Abb. 3.1).

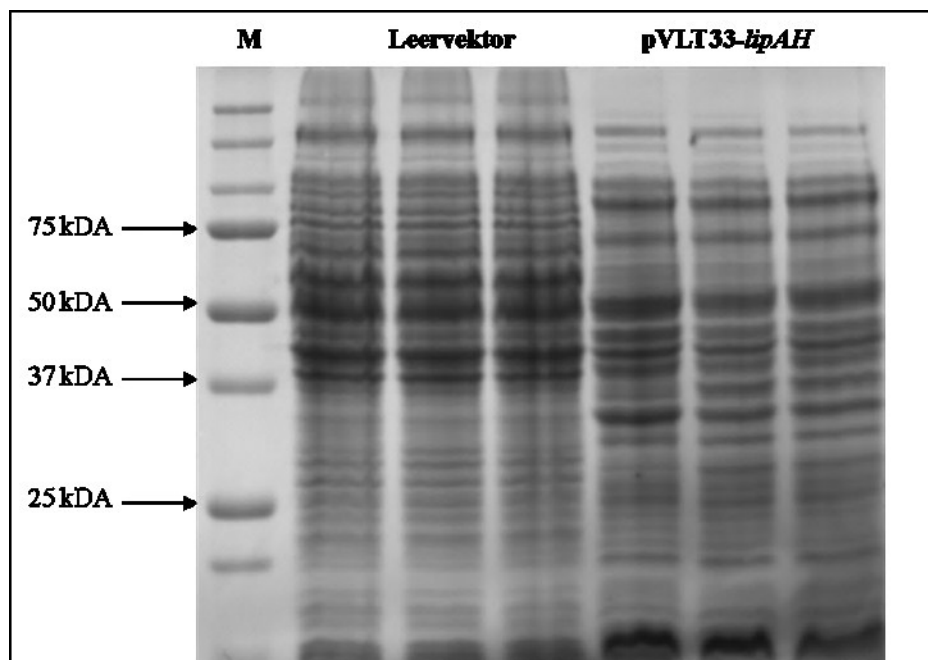


Abb. 3.1: SDS-PAGE Analyse von *P. putida* Zellextrakten. Mehrere gleichzeitig bebrütete *P. putida* Kulturen, welche entweder den Leervektor (pVLT33) oder das *lipAH* Expressionsplasmid (pVLT-*lipAH*) trugen wurden für 16 h unter induzierenden Bedingungen bei 30°C bebrütet. Anschließend wurden GZE der Kulturen hergestellt und jeweils gleiche Proteinmengen auf ein 12,5 %iges SDS Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

3.1.2 Die Lipase A kann aktiv in *P. putida* exprimiert werden

Da die Lipase nicht deutlich erkennbar überexprimiert wurde (Abb. 3.1), wurden die selben *P. putida* Kulturen zum Nachweis der erfolgreichen Lipaseexpression auf ihre Lipaseaktivität hin getestet. Hierzu wurden entsprechende Einzelkolonien auf Tributyrin Indikatorplatten gepickt und die Entstehung von klaren Höfen durch Lipaseaktivität um die Kolonie herum beobachtet (Abb. 3.2). Zudem wurden die lipolytische Aktivität des Kulturüberstandes und des präparierten Gesamtzellextraktes mit einem *p*NPP-Test (2.16) bestimmt. Als Kontrolle wurden sowohl Kulturüberstand als auch Gesamtzellextrakt einer *P. aeruginosa* Kultur verwendet.

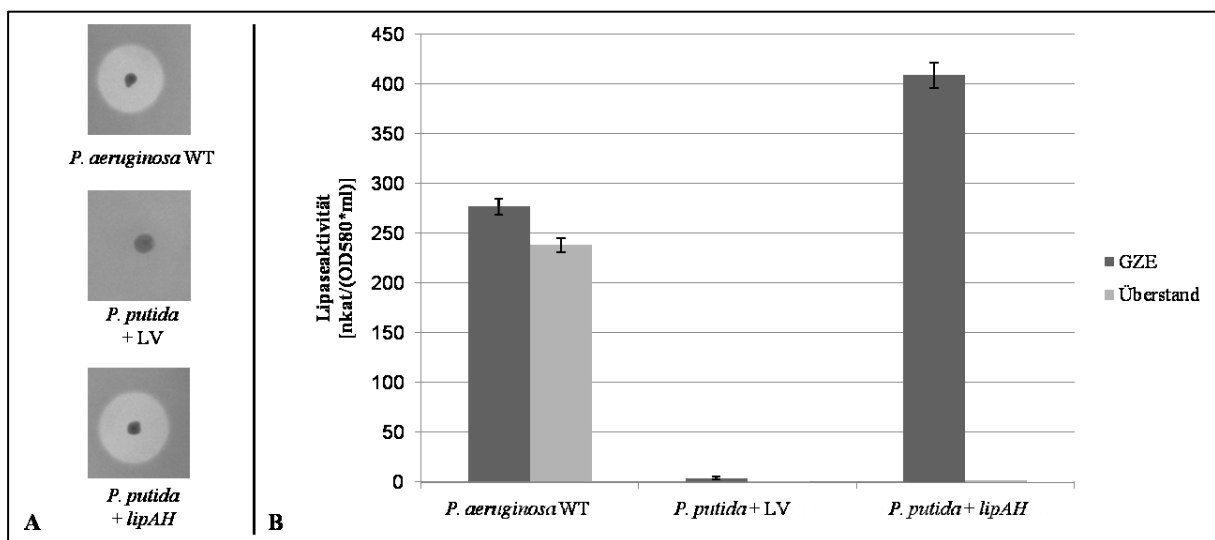


Abb. 3.2: Bestimmung der lipolytischen Aktivität bei Expression des *lipAH*-Operons in *P. putida* auf Tributyrinagarplatten (A) und Messung der lipolytischen Aktivität in Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten mit *p*NPP als Substrat (B). Die Hofbildung der Kulturen wurde durch Inkubation von jeweils drei unabhängig voneinander angezogenen Kulturen auf Indikatorplatten bestätigt. Die in (B) gezeigte lipolytische Aktivität gegenüber *p*NPP stellt den Mittelwert aus fünf getrennt vorgenommenen Messungen dar, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken angezeigt ist. Eine Kultur von *P. aeruginosa* wurde als Positivkontrolle verwendet.

Wie anhand von Abbildung 3.2 deutlich zu erkennen ist, bildet *P. putida* nur deutliche Lipaseaktivitäts-Höfe auf Tributyrinagarplatten, wenn der Stamm das Expressionsplasmid trägt. Im Gegensatz zum homologen Wirt *P. aeruginosa* findet sich keinerlei Lipaseaktivität im Kulturüberstand, sondern ausschließlich im Gesamtzellextrakt. Dies zeigt, dass in *P. putida* keine Sekretion von LipA stattfindet. Die Aktivität der im Gesamtzellextrakt von *P.*

putida gebildeten Lipase entspricht dabei ungefähr der Gesamtaktivität der Lipase in *P. aeruginosa*.

In einem weiteren Versuch wurden sowohl LipA als auch LipH immunologisch mittels Western-Blot unter Verwendung eines gegen LipA bzw. LipH gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden die Expressionskulturen auf eine OD_{580 nm} von 0,15 eingestellt und die Expression bei einer OD_{580 nm} von 0,3 – 0,5 durch Zugabe von IPTG (0,4 mM Endkonzentration) induziert. Die Expressionskulturen wurden für 16 h bei 30°C bebrütet und anschließend Gesamtzellextrakte präpariert. Der immunologische Nachweis von LipA und LipH wurde mittels SDS-PAGE (2.20) und Western-Blot (2.23) durchgeführt (Abb. 3.3).

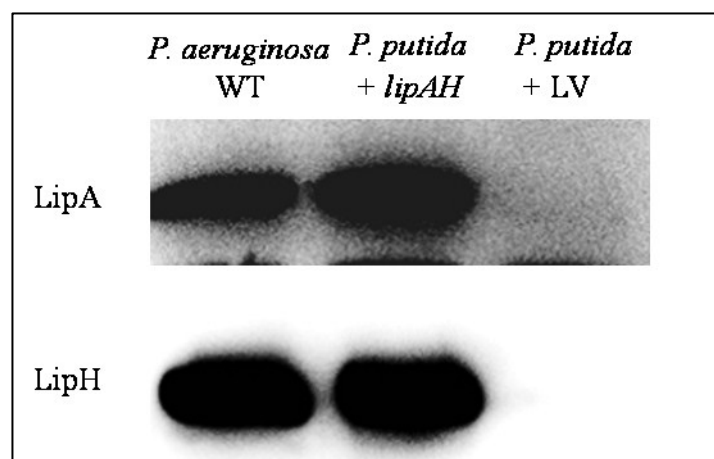


Abb. 3.3: Immunologischer Nachweis von LipA und LipH nach heterologer Expression in *P. putida*. Dargestellt sind GZE von *P. putida*-Kulturen nach 16 h Wachstum unter Expressionsinduzierenden Bedingungen. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580 nm} = 0,15).

In Kulturen welche das Expressionsplasmid pVLT-*lipAH* trugen und deren Expression mittels IPTG induziert wurde, konnten deutliche Signale sowohl von LipA als auch von LipH beobachtet werden. Bei Kulturen, welche nur den Leervektor pVLT33 enthielten, ansonsten jedoch völlig identisch behandelt wurden, ließ sich weder ein Signal auf der Höhe von LipA noch auf der von LipH beobachten.

3.1.3 Maximale Lipaseaktivität bei 0,2 mM IPTG Konzentration im Expressionsmedium

Um eine möglichst effiziente Lipaseexpression in *P. putida* zu etablieren, wurde die Expressionseffizienz anhand von unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen im Expressionsmedium untersucht. Dazu wurden Expressionskulturen mit verschiedenen Konzentrationen von IPTG induziert und anschließend die Lipaseaktivität im Gesamtzellextrakt gegen pNPP als Substrat gemessen (2.16) (Abb. 3.4). Schon bei relativ

niedrigen Konzentrationen von IPTG im Expressionsmedium konnte Lipaseaktivität festgestellt werden, welche sich mit zunehmender IPTG Konzentration steigerte und ihr Maximum bei einer Konzentration von 0,2 mM IPTG erreichte.

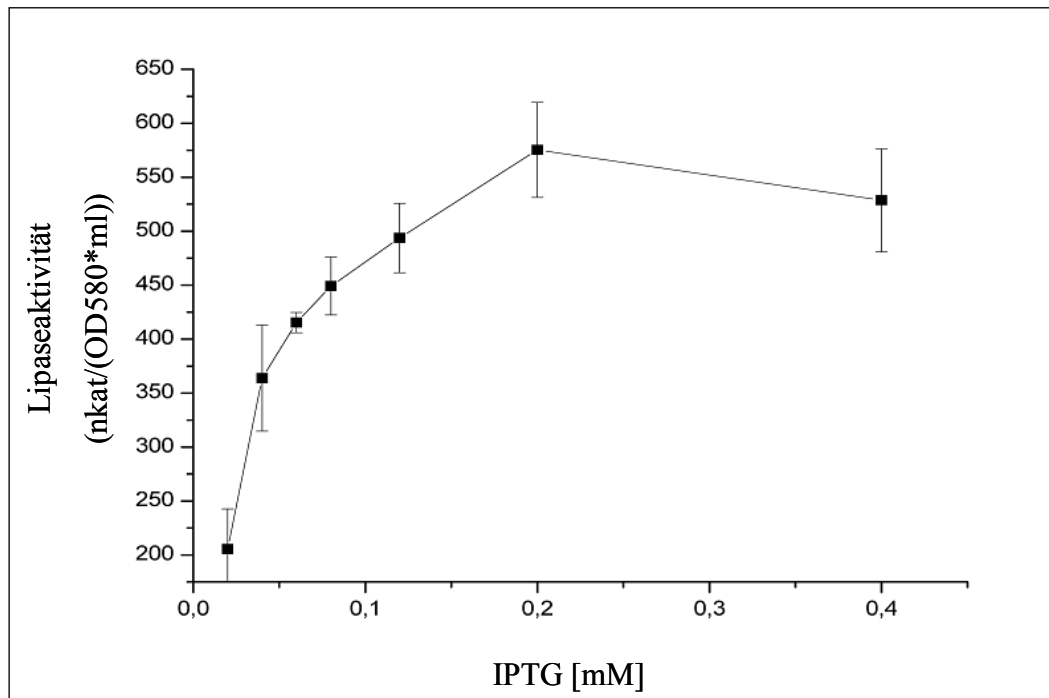


Abb. 3.4: Einfluss der IPTG Konzentration im Medium auf die heterologe Lipaseexpression. Kulturen von *P. putida* wurden bis zu einer OD_{580 nm} von 0,3 bebrütet. Daraufhin wurde die Expression des Plasmid-kodierten *lipA*-Gens mit aufsteigenden IPTG Konzentrationen induziert und nach 16 h Wachstum die Lipaseaktivität im Gesamtzellextrakt mittels *p*NPP-Test bestimmt und auf die entsprechenden Zelldichte (OD_{580 nm}) bezogen. Die Abbildung zeigt Messungen von vier unabhängigen Experimenten.

Anhand dieser Ergebnisse wurden alle weiteren *lipAH* Expressionen in *P. putida* mit 0,2 mM IPTG induziert.

Es konnte gezeigt werden, dass das Lipase-Operon aus *P. aeruginosa* heterolog in *P. putida* exprimiert werden konnte. Die Expression mittels des P_{tac} führte zur Bildung einer geringen Menge, aktiver Lipase und erreichte ein Optimum bei einer IPTG-Konzentration von 0,2 mM. Die Lipase wird in *P. putida* nicht sekretiert, aber sowohl das LipA als auch das LipH Protein konnten im Western-Blot im Genzellextrakt nachgewiesen werden.

3.2 Die heterologe *lipAH* Expression hat Auswirkungen auf den Phänotyp von *P. putida*

Wenn ein Bakterium als Expressionswirt benutzt wird, kann es zu Änderungen des Phänotyps kommen. Proteine aus heterologer Genexpression können sich nach der Synthese im Bakterium anreichern, weil z.B. mögliche Sekretionsapparate fehlen und so zu Störungen des natürlichen Stoffwechsels führen. Die ursprüngliche Aktivität des heterolog produzierten Proteins kann zu drastischen Änderungen im Metabolithaushalt des Wirts führen und so Einfluss auf den Phänotyp nehmen. Ein extremes Beispiel wäre z.B. die Expression eines für die Wirtszelle toxischen Proteins, dessen Aktivität zum Absterben der gesamten Kultur führen kann. Aber nicht jede Expression muss nachteilig für das Wirtsbakterium sein. So können manche Proteine zu einer besseren Nährstoffaufnahme führen und so das Wachstum des Bakteriums verbessern. Im folgendem wurden einige Phänotypen von *P. putida* in Abhängigkeit von der heterologen Lipaseexpression untersucht.

3.2.1 *P. putida* zeigt verändertes Wachstum bei heterologer Lipaseexpression

Der Einfluss der heterologen Proteinexpression auf das Wuchsverhalten von *P. putida* wurde anhand einer Wuchskurve getestet. Hierzu wurden mehrere *P. putida* Kulturen in M9 Medium (2.4.1) auf eine $OD_{580\text{ nm}}$ von 0,1 eingestellt und bei 30°C bebrütet. Die Hälfte der Kulturen enthielt den Leervektor pVLT33 und die andere Hälfte das pVLT-*lipAH* Expressionsplasmid. Alle Kulturen wurden bei einer $OD_{580\text{ nm}}$ von 0,3 durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert. Die Entwicklung der Zelldichte wurde spektralphotometrisch über einen Zeitraum von 26 h verfolgt und in Abbildung 3.5 dargestellt. Die Kulturen welche nur den Leervektor trugen erreichten nach ca. 250 min die exponentielle Wuchsphase und nach weiteren 250 min ihre maximale Zelldichte von $OD_{580\text{ nm}} = 2$. *P. putida* Kulturen, welche hingegen das Expressionsplasmid pVLT-*lipAH* trugen, erreichten erst nach ca. 330 Min die exponentielle Wuchsphase und die maximale Zelldichte bei $OD_{580\text{ nm}}$ betrug nach 700 Min nur etwa 1,2.

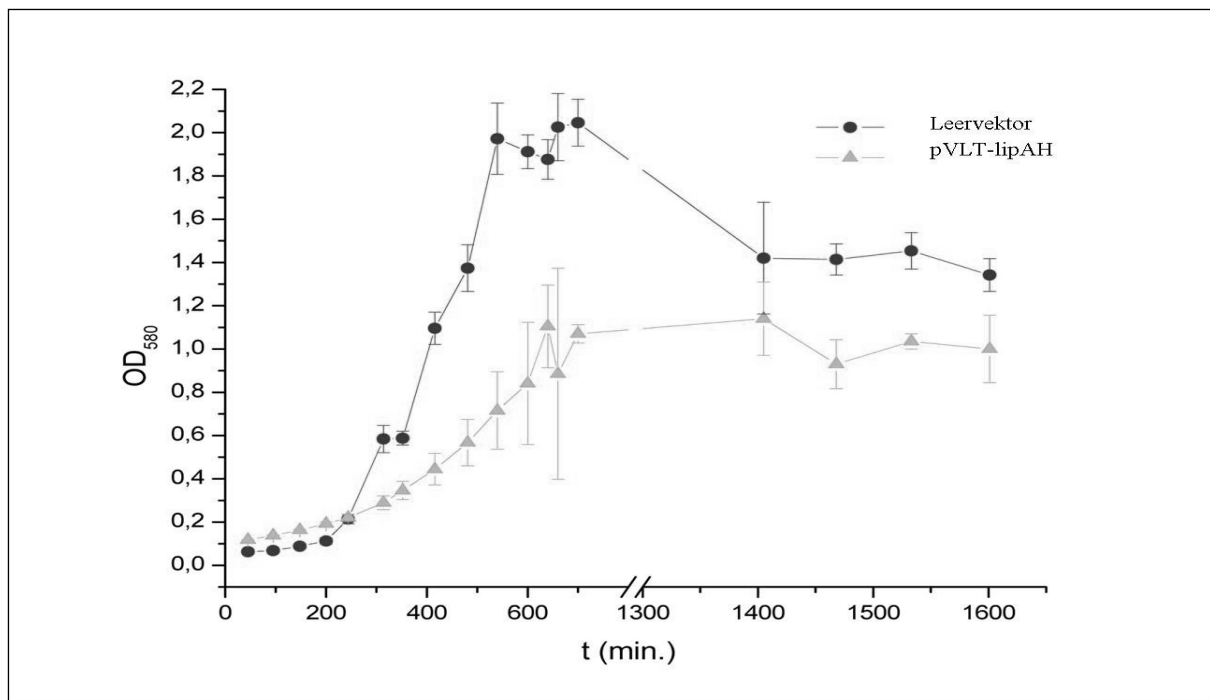


Abb. 3.5: Wachstumskurve von *P. putida* bei heterologer Lipase-Expression. Dargestellt ist sowohl das Wachstum von Bakterien, welche das Leervektor Plasmid tragen (Punkt) als auch Bakterien, welche das Expressionsplasmid pVLT-*lipAH* tragen (Dreieck). Jede Kurve enthält die Daten von fünf unabhängigen Kulturen, welche bei 30°C bebrütet wurden. Allen Kulturen wurde bei einer OD₅₈₀ von 0,25 IPTG in einer Endkonzentration von 0,2 mM hinzugegeben. Die Standardabweichung der Messungen ist als Fehlerbalken dargestellt.

Die heterologe Expression des *lipAH*-Operons in *P. putida* führte ab der Induktion der Expression durch IPTG-Zugabe zu einem deutlich verzögerten Wachstum der Bakterien. Und auch die maximale Zelldichte der Expressionskulturen war deutlich verringert im Vergleich zu den Kontrollkulturen.

3.2.2 *P. putida* synthetisiert bei heterologer Lipaseexpression Siderophore

Bei der Aufnahme der Wuchskurve fiel ein Detail besonders ins Auge (Abb. 3.6): die Lipase exprimierenden *P. putida* Kulturen wurden grün.

Fluoreszierende Pseudomonaden können unter eisenlimitierenden Bedingungen kleine Moleküle, so genannte Siderophore, synthetisieren und ins extrazelluläre Milieu sekretieren. Dort binden sie mit hoher Affinität Eisen(III) und führen dieses an die Bakterienzelle heran, wo es über spezifische Rezeptoren aufgenommen werden kann. Das häufigste Siderophor in

fluoreszierenden Pseudomonaden ist das Pyoverdin. Werden Pyoverdine in das extrazelluläre Milieu abgegeben führt dies zu einer für Pyoverdine charakteristischen gelb-grünen Färbung der Bakterienkultur. Ein zweites, weit verbreitetes Siderophor ist das Pyocyanin. Es besitzt ebenfalls eine hohe, wenn auch nicht so hohe Eisenaffinität wie das Pyoverdin. Bakterienkulturen mit Pyocyaninen im Kulturüberstand besitzen eine charakteristische grün-blau Färbung (Albrecht-Gary *et al.*, 1994).

Wächst *P. putida* in M9 Medium, welches mit Eisen angereichert ist (2.4.1) so ist die Kultur nahezu ungefärbt. Exprimiert man jedoch die heterologen- Gene der Lipase A und Foldase H aus *P. aeruginosa* in diesem Bakterium, bekommen die Kulturen eine leuchtend grüne Färbung (Abb. 3.6). Dies lässt vermuten, dass Kulturen, welche die Lipase exprimieren, auch Pyoverdine bilden.

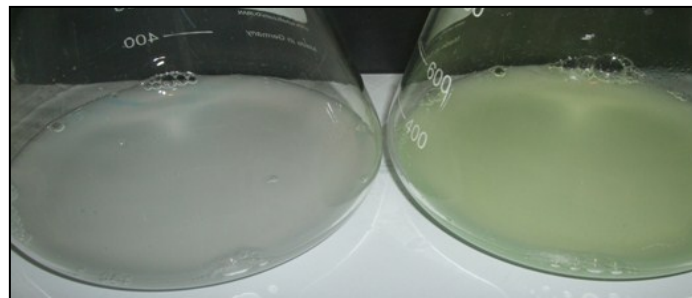


Abb. 3.6: Färbung der *P. putida* Kulturen mit und ohne Expression der heterologen Lipase A aus *P. aeruginosa*. *P. putida*-Kulturen die den Leervektor pVLT33 (links) bzw. das pVLT-*lipAH* Expressionsplasmid (rechts) enthielten, wurden in M9 Medium bebrütet und bei einer OD_{580 nm} von 0,3 mit 0,2 mM IPTG versetzt. Die Kulturen mit dem *lipAH* Expressionsplasmid bekamen eine hell-grüne Färbung während die Kulturen mit Leervektor weiß blieben.

3.2.2.1 Nachweis von Pyoverdin im Kulturüberstand von *P. putida*

Die Eigenschaft der Pyoverdine unter, UV-Licht zu fluoreszieren, kann dazu genutzt werden, diese in Kulturüberständen von Bakterien nachzuweisen. Dazu wurden zellfreie Kulturüberstände mit Licht einer Wellenlänge von 328 nm bestrahlt und die Fluoreszenz betrachtet (Abb. 3.7 A). Die Fluoreszenz gibt nicht nur Aufschluss über die Anwesenheit von Pyoverdinen, sondern anhand der Stärke der Fluoreszenz kann auch auf die Menge der sekretierten Pyoverdine zurückgeschlossen werden. Die Quantifizierung der Pyoverdine im

Kulturüberstand wurde spektralphotometrisch nach Höfte *et al.*, 1993 bei einer Wellenlänge von 403 nm durchgeführt (2.17.1) (Abb. 3.7 B).

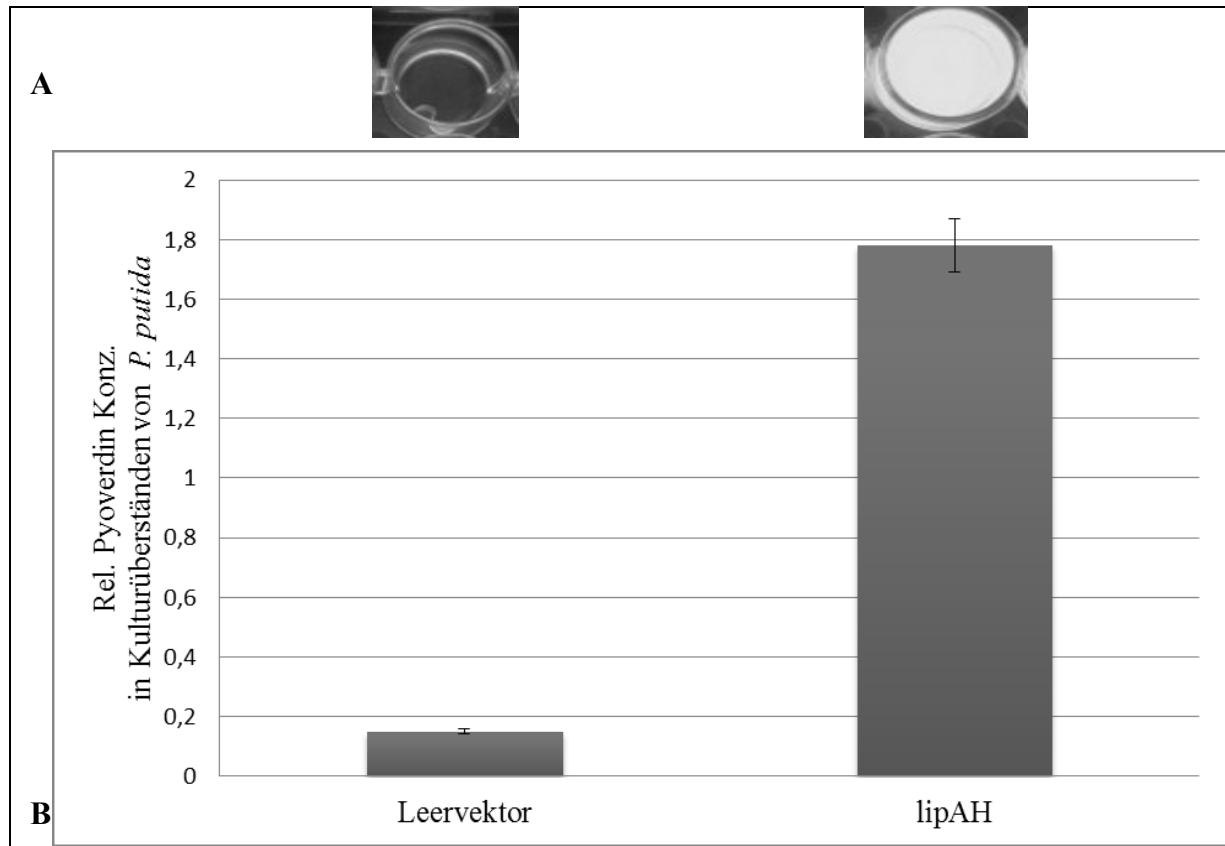


Abb. 3.7: Nachweis und Quantifizierung von Pyoverdin in Kulturüberständen von *P. putida* nach heterologer *lipAH* Expression. A: Nachweis von Pyoverdinen unter UV-Licht. Links sieht man den schwach fluoreszierender Kulturüberstand einer Leervektorkontrolle (pVLT33) und rechts den stark fluoreszierender Kulturüberstand einer pVLT-*lipAH* Expressionskultur. B: Quantitativer Nachweis von Pyoverdinen nach Höfte *et al.*, 1993. Die Abbildung zeigt Messungen von sechs unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung der Messergebnissen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Wie in Abbildung 3.7 deutlich zu erkennen ist, bilden die *P. putida*-Kulturen mit dem Leervektor nahezu keine Pyoverdine, wohingegen jene, welche die Lipase A exprimieren eine um die zehnfache höhere Menge an Pyoverdinen produzieren.

Kulturen von *P. putida*, welche das heterologe *lipAH*-Operon exprimieren produzieren und sekretieren Siderophore. Unter Standardlaborbedingungen, mit ausreichend Eisen im Medium konnte dies bisher nicht festgestellt werden, dies deutet darauf hin, dass die Produktion der Siderophore eine direkte Auswirkung der Lipaseexpression ist.

3.2.2.2 Nachweis von Pyocyanin im Kulturüberstand von *P. putida*

Pyocyanine können durch eine Chloroformextraktion aus bakteriellem Kulturüberstand isoliert (2.17.2) und spektralphotometrisch gemessen werden. Pyocyanine in Kulturüberständen von *P. putida*-Kulturen, welche entweder den Leervektor pVLT oder aber das Expressionsplasmid pVLT-*lipAH* trugen, konnten nicht nachgewiesen werden.

3.3 *P. putida* besitzt ein verändertes Proteom bei heterologer Lipaseexpression

Proteom-Untersuchungen bieten eine gute Möglichkeit, sich einen Überblick über Veränderungen hinsichtlich der Proteinzusammensetzung in einem Bakterium zu verschaffen. Auf einen Blick lassen sich mehrere hundert bzw. tausende Proteine gleichzeitig beobachten und deren Anteil am Gesamtproteingehalt quantifizieren. Ein Vergleich zwischen zwei oder mehreren Bedingungen, wie z.B. Mutante und Wildtyp oder Expression und Leervektorkontrolle, lässt schnell Rückschlüsse zu, was in der Bakterienzelle passiert sein könnte und welche regulatorischen Prozesse stattfinden. Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine „master map“ (Übersichtskarte) des *P. putida*-Proteoms (Ganzzellextrakt) (Abb. 3.8) angefertigt.

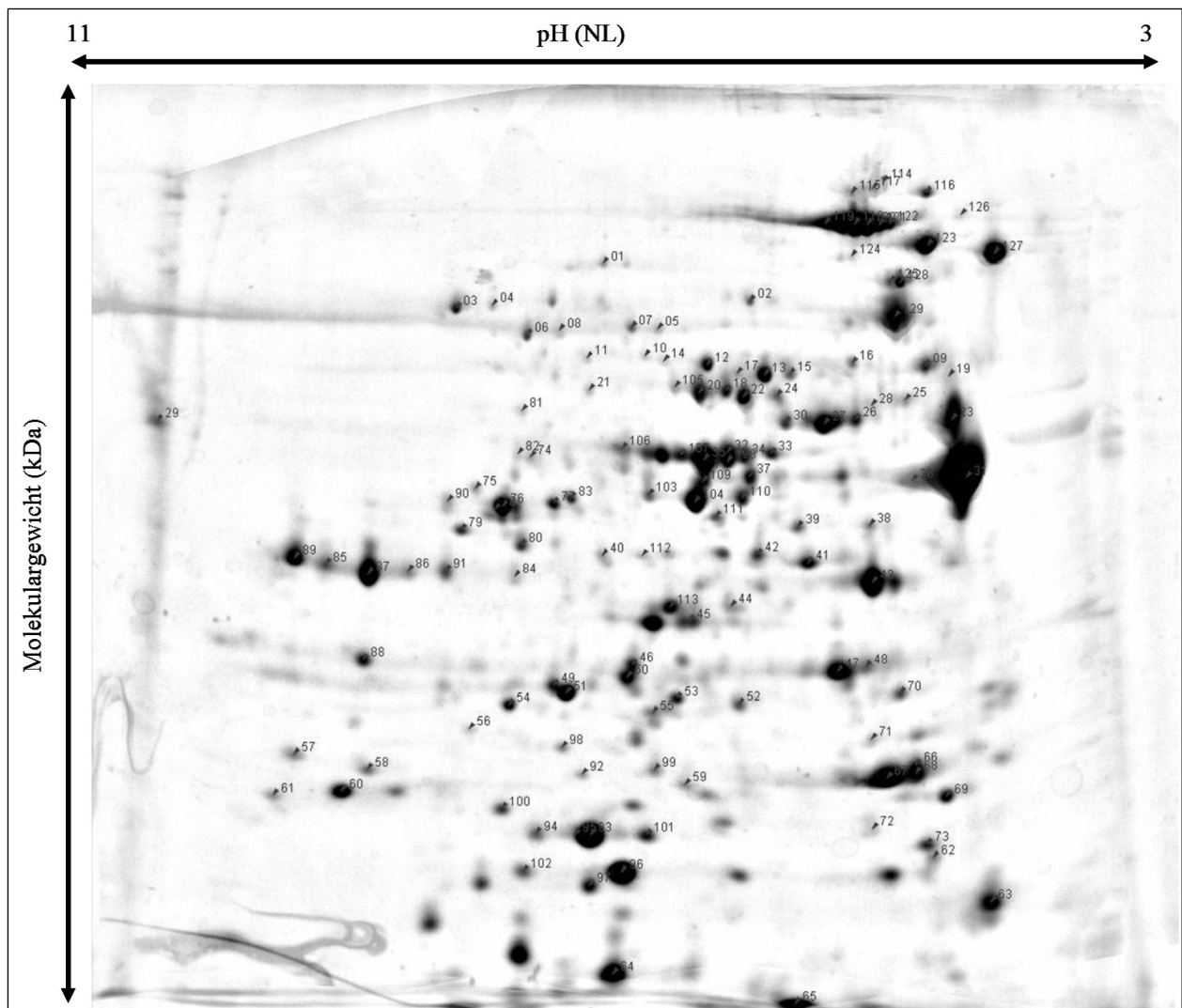


Abb. 3.8: Zelluläres Proteom von *P. putida*. Die „master map“ besteht aus zwölf separaten 2D Gelen. Jeweils sechs Gele von Kulturen, welche den Leervektor pVLT33 trugen und sechs Gele von pVLT-*lipAH* tragenden *P. putida*-Kulturen. Alle Gele wurden mit Coomassie *Briliant Blue* gefärbt, gescannt mit der DELTA2D Software (DECODON, Greifswald) zu einem Bild fusioniert und anschließend mit derselben Software analysiert. Der gewählte pH-Bereich reicht von pH 11 bis pH 3 und ist im negativen Logarithmus (NL) abgebildet.

Diese Übersichtskarte besteht aus vielen verschiedenen Einzelbildern, welche zu einem Gesamtbild miteinander fusioniert wurden und enthalten somit alle Spots welche im Gesamtprojekt sichtbar gemacht werden konnten. Die Einzelbilder beinhalten sowohl Proteome von Kulturen welche den Leervektor enthielten als auch Proteome von *lipAH*-Expressionskulturen. Die Kulturen wurden hierzu jeweils bei 30°C bis zu einer OD_{580 nm} von 0,3 bebrütet und die Expression mittels 0,2 mM IPTG induziert. Nach 16 h Wachstum wurden die Proteine isoliert (2.19). Das Ziel war es möglichst viele Proteine auf dieser „master map“ zu identifizieren. Die Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Trypsin-Verdau und anschließenden MALDI-TOF-MS-Messungen analysiert. Alle

reproduzierbar identifizierten Proteine sind in Tabelle A.1 aufgeführt und in der „master map“ mit den entsprechenden Nummern beziffert.

3.3.1 Das Proteom von *P. putida* zeigt Veränderungen bei heterologer Lipaseexpression

Aus den jeweiligen *P. putida*-Kulturen, welche 16 h unter Expressions-induzierenden Bedingungen bebrütet wurden, wurde ein Ganzzellextrakt hergestellt und daraufhin die Gesamtheit aller Proteine isoliert (2.19). Durch anschließende 2D-Gelelektrophorese wurde das Proteom nach 16 h heterologer Expression untersucht. Im folgendem wurden die Daten mit der DELTA-2D-Software von DECODON (Deutschland, Greifswald) analysiert. In Abbildung 3.9 wurden die Expressionsmuster der Kulturen mit dem Leervektor pVLT33 und dem Expressionsvektor pVLT-*lipAH* gegeneinander aufgetragen, so dass Unterschiede im Expressionsverhalten zellulärer Proteine sichtbar wurden. Proteine, welche in beiden Fällen gleich stark exprimiert wurden liegen auf bzw. nahe an den mittleren Diagonalen. Umso weiter sich die Spots von der mittleren Diagonalen entfernen, desto unterschiedlicher ist das Expressionsverhalten zueinander. Spots die mehr ins Orange gehen, sind in Kulturen, welche das *lipAH*-Operon enthalten höher exprimiert, wohingegen Spots, welche ins Blaue gehen, weniger stark exprimiert werden.

Wie in Abbildung 3.9 zu sehen ist befinden sich fast alle Spots auf oder nahe an der mittleren Diagonale und zeigen dementsprechend ein vergleichbares Expressionsprofil in den unterschiedlichen Versuchsansätzen. Weiterhin gibt es aber auch Spots, welche sich vom Expressionslevel unterscheiden und von den Diagonalen abweichen. Mit Hilfe der DECODON-Delta2D Software wurden alle veränderten Expressionen mit statistischen Mitteln (t-Test, ANOVA) auf ihre Signifikanz hin überprüft und anschließend der Grad der Veränderung berechnet. Für weitere Betrachtungen wurden nur Proteine mit einem mindestens 2-fach erhöhten oder 2-fach verringerten Expressionsverhalten berücksichtigt. Die Auswertungen ergaben, dass ca. 10 % aller detektierten Spots auf den Gelen den gewählten Kriterien (im t-Test < 95) entsprechen und über eine gegebene Signifikanz verfügen.

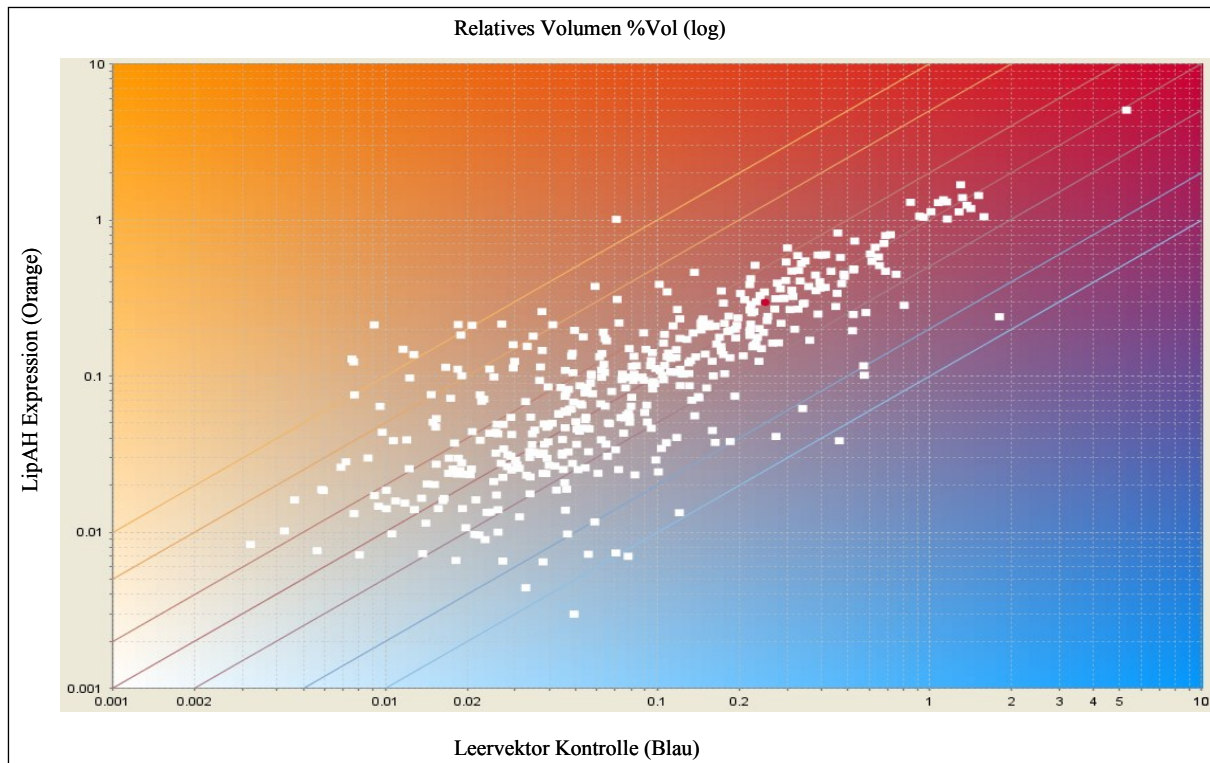


Abb. 3.9: Vergleichende Expressionsprofile von *P. putida*-Kulturen, welche entweder das Leervektorplasmid pVLT33 oder das pVLT-*lipAH* Expressionsplasmid enthielten. Spots auf der mittleren Diagonalen stehen für Proteine, welche in beiden Fällen eine gleiche Expression aufweisen. Spots im oberen orangen Teil stehen für Proteine mit erhöhter Expression bei *lipAH*-Expression und Spots im unteren blauen Bereich für Proteine mit höherer Expression in Kulturen mit dem Leervektor.

3.3.2 Identifizierung der unterschiedliche exprimierten zellulären Proteine

Ungefähr 30 Proteine wiesen während der *lipAH*-Expression im Vergleich zu Kulturen mit dem Leervektor eine erhöhte Expression auf, während weitere 30 Proteine eine verringerte Expression zeigten. 35 dieser insgesamt 60 Proteine konnten reproduzierbar identifiziert werden. In fünf Fällen wurden verschiedene Spots ein und demselben Protein zugeordnet. Weitere Proteine konnten einmalig identifiziert, die Ergebnisse aber nicht reproduziert werden, so dass diese Proteine im weiteren keine Beachtung finden. Alle identifizierten Proteine sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Die identifizierten Proteine wurden in physiologische Klassen unterteilt (Abb. 3.10), welche sich an einer Studie orientiert (Heim *et al.*, 2003), in der ebenfalls ein Proteom von *P. putida* beschrieben wurde. Die größte Gruppe stellen dabei einzelne Proteine dar, die keiner der

Gruppen zugewiesen werden konnten. Die zweitgrößte Gruppe stellen die Membranproteine dar, gefolgt von Proteinen welche der Antwort auf oxidativen Stress zugeordnet werden.

Tab. 3.1: Identifizierte Proteine, welche unter *lipAH*-Expressionsbedingungen in *P. putida* reguliert werden. Eine Erhöhung der Proteinexpression ist mit einem + und dem Faktor der Erhöhung angegeben. Eine Erniedrigung mit einem -.

Nr.	Art der Regulation		Gen Nr.	Gen Name	Genprodukt
1	+	3,5	PP_0444	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1
2	+	2,3	PP_0837		hypothetical protein
3	+	2,7	PP_1000	<i>argI</i>	ornithine carbamoyltransferase
4	+	2,7	PP_1084		antioxidant, AhpC/Tsa family
5	+	2	PP_1215	<i>ruvC</i>	Holliday junction resolvase
6	+	3,4	PP_1297		general amino acid ABC transporter
7	+	3,5	PP_1733	<i>minD</i>	septum site-determining protein MinD
8	+	2,6	PP_2089	<i>oprF</i>	outer membrane protein OprF
9	+	3	PP_2247		endoribonuclease, putative
10	+	2,5	PP_2439	<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase, C subunit
11	+	2,8	PP_2453	<i>ansA</i>	L-asparaginase II
12	+	4,3	PP_2472		hypothetical protein
13	+	2,6	PP_3587	<i>tpx</i>	thiol peroxidase
14	+	17,8	PP_4217	<i>fpvA</i>	outer membrane ferripyoverdine receptor
15	-	0,35	PP_0849	<i>ndk</i>	nucleoside diphosphate kinase
16	-	0,27	PP_0893		ThiJ/PfpI family protein
17	-	0,6	PP_0931	<i>gatA</i>	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase
18	-	0,42	PP_0944	<i>fumC</i>	fumarate hydratase
19	-	0,4	PP_1184		dienelactone hydrolase family protein
20	-	0,5	PP_1232		hypothetical protein
21	-	0,3	PP_1360	<i>groES</i>	co-chaperonin GroES
22	-	0,5	PP_1430	<i>algY</i>	serine protease AlgY
23	-	0,21	PP_1506	<i>adk</i>	adenylate kinase
25	-	0,36	PP_2609		transcriptional regulator, IclR family
26	-	0,4	PP_3378	<i>kguK</i>	2-ketogluconate kinase
27	-	0,5	PP_4179	<i>htpG</i>	heat shock protein 90
28	-	0,4	PP_4460		transcriptional regulator, LysR family
29	-	0,3	PP_4519	<i>tolC</i>	agglutination protein
30	-	0,5	PP_4867		branched-chain amino acid ABC transporter
31	-	0,4	PP_4923		outer membrane efflux protein

Bezieht man in die Betrachtung der verändert exprimierten Proteine die unterschiedlichen Phänotypen der Expressionskulturen mit ein, fällt vor allem das Protein PP4217, „outer membrane ferripyoverdine receptor“, auf. Dieses Protein ist ein Rezeptor für Eisen-beladenes

Pyoverdine, der für die Eisenaufnahme zuständig ist. Bindet eisenbeladenes Pyoverdine an den Rezeptor wird eine Signalkaskade eingeschaltet, welche die Produktion von weiteren Pyoverdinen zur Folge hat (Abb. 1.15).

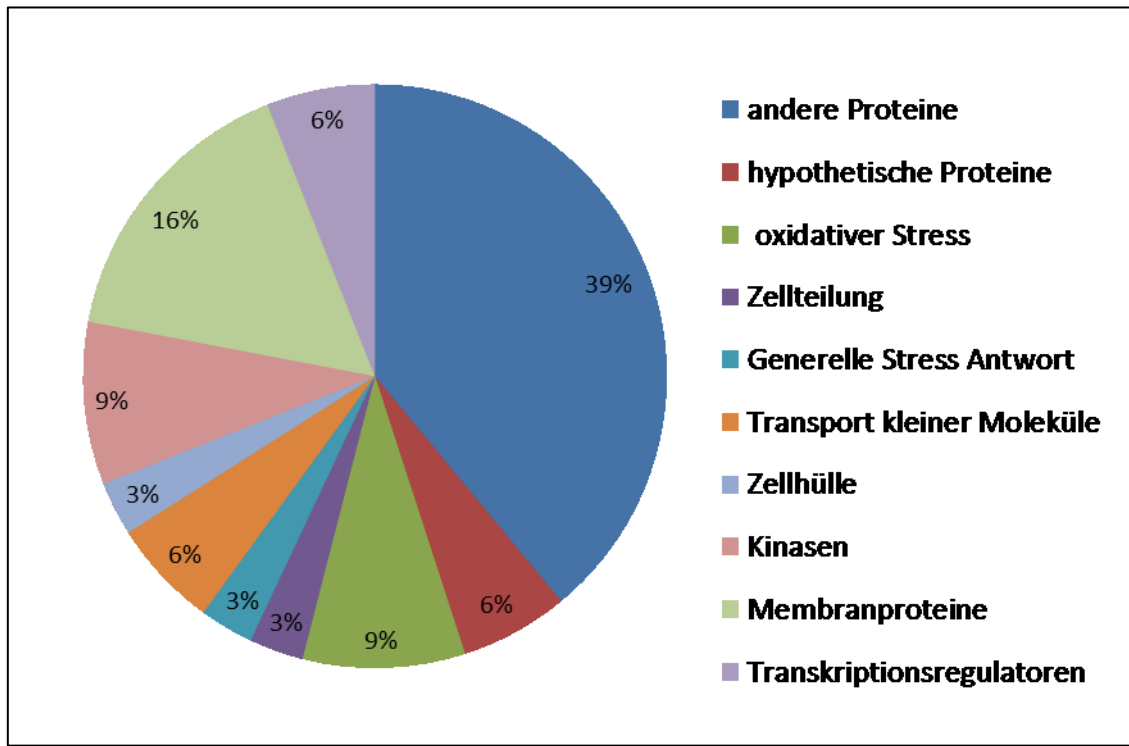


Abb. 3.10: Klassifizierung aufgrund der *lipAH*-Expression in *P. putida* veränderter Proteine (nach Heim *et al.*, 2003). Die Gesamtheit der identifizierten Proteine wurde gleich 100 % gesetzt. Physiologische Gruppen unter 3 % wurden unter „andere Proteine“ zusammengefasst.

Das Proteom von *P. putida* Kulturen, welche die heterologe Lipase exprimierten, unterschied sich in ca. 5% aller Proteine von dem aus Kulturen, welche nur den Leervektor trugen. Die identifizierten Unterschiede zeigten eine deutliche Veränderung in der oxidativen Stressantwort und in der Zusammensetzung der Membranproteine. Auch die Veränderung der Siderophore kann am Beispiel des PP4217 im Proteom beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Lipase auf die Pyoverdine-Synthese genauer untersucht.

3.4 Lipasen haben Einfluss auf die Produktion von Pyoverdinin

Aufgrund der deutlich erhöhten Pyoverdinin-Synthese, die durch die *lipAH*-Expression in *P. putida* hervorgerufen wurde, und der stark erhöhten Produktion des PP4218, wie die Proteom-Analysen der entsprechenden Kulturen zeigten, wurde der Einfluss von Lipasen auf die Pyoverdinin-Produktion in *P. putida* genauer untersucht. Bei Betrachtung des Genoms von *P. putida* zeigt sich, dass stromabwärts der Strukturgene der Pyoverdine ein Gen liegt, welches als putatives Lipase/Esterase-Familie-Protein annotiert wurde (Abb. 3.11). Matthijs *et al.* (2009) konnten zeigen, dass eine Transposonmutante dieses Gens einen Pyoverdinin-negativen Phänotypen aufwies.

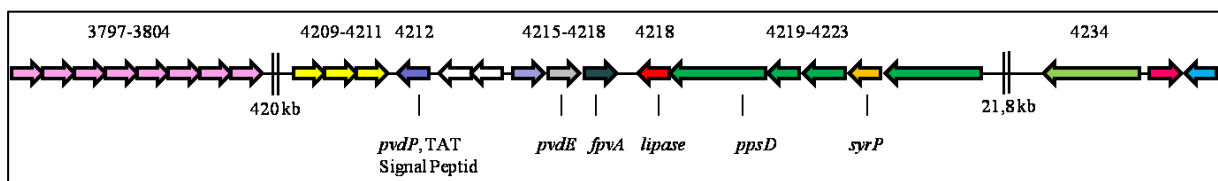


Abb. 3.11: Organisation der Pyoverdine Gene im Genom von *P. putida* (nach Matthijs *et al.*, 2009). Die Gennamen, soweit bekannt stehen kursiv gedruckt darunter. Die Gennummern nach der *Pseudomonas*-Datenbank sind jeweils über den Genen aufgeführt.

Das eine Mutation in der annotierten Lipase/Esterase PP4218 dazu führt, dass keine Pyoverdine mehr synthetisiert werden können, und die heterologe Expression von *lipAH* zu einer erhöhten Pyoverdinin-Synthese führt, zeigt deutlich den Zusammenhang zwischen Lipasen und Pyoverdinin. Deshalb wurde im Folgenden das PP4218 homolog in *P. putida* exprimiert.

3.4.1 Homologe Expression von *pp4218*

Die Beobachtungen, dass die heterologe Expression der Lipase A aus *P. aeruginosa* eine Veränderung des Pyoverdinin-Phänotypen von *P. putida* zur Folge hat und in der Literatur (Matthijs *et al.*, 2009) ein Zusammenhang zwischen einer putativen Lipase und der Pyoverdinin-Synthese gezeigt wurde, führte dazu, dass im Folgendem getestet wurde, ob eine homologe Expression der putativen Lipase PP4218 in *P. putida* ebenfalls zu einem Pyoverdinin-positiven Phänotypen führt. Hierzu wurde das Gen von *pp4218* mit spezifischen

Primern (2.3), welche entsprechende Restriktionsschnittstellen trugen, amplifiziert und in den Expressionsvektor pVLT33 kloniert. Der entstandene Vektor pVLT4218 wurde zur homologen Expression von *pp4218* in *P. putida* verwendet. Hierzu wurden *P. putida* Zellen mit dem Plasmid transformiert. Daraufhin wurden Kulturen auf eine $OD_{580\text{ nm}}$ von 0,05 angeimpft und bis zu einer $OD_{580\text{ nm}}$ von ca. 0,3 kultiviert. Anschließend wurde die Expression von *pp4218* mittels Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert. Nach weiteren 16 h Wachstum wurden die Zellen vom Überstand getrennt und sowohl auf Pyoverdine als auch auf Lipase/Esterase-Aktivität hin getestet.

3.4.2 *P. putida* produziert Pyoverdine auch bei homologer Expression von *pp4218*

Pyoverdine wurden anhand der für Pyoverdine-produzierende Bakterien charakteristischen Kulturfärbung und über ihre Eigenschaft unter UV-Licht zu fluoreszieren, in den Expressionskulturen nachgewiesen (Abb. 3.12). Die Quantifizierung von Pyoverdine in Kulturüberständen erfolgte durch einen photometrischen Test bei einer Wellenlänge von 403 nm (2.17.1). Wie in Abbildung 3.12 zu erkennen ist, bilden *P. putida*-Kulturen, welche die putative Lipase *pp4218* exprimieren, einen deutlichen gelb-grünen Phänotyp. Der Nachweis von Pyoverdinen mittels UV-Licht erbrachte einen positiven Befund. Die Leervektor Kontrolle hingegen zeigte nur geringe bis gar keine Fluoreszenz.

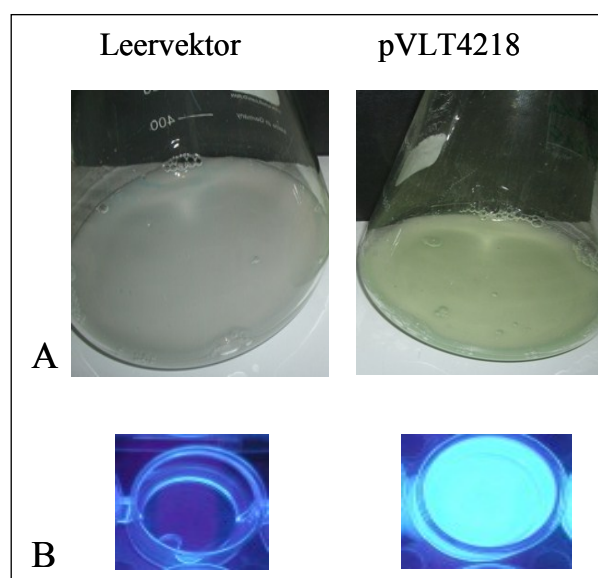


Abb. 3.12: Pyoverdine-Nachweis nach homologer Expression einer putativen Lipase in *P. putida*.
A: Färbung des Kulturüberstandes nach 16 h induziertem Wachstum. Die Kulturen mit dem Leervektor pVLT33

zeigten eine trübe, weiße Färbung. Die *pp4218*-Expressionskultur hingegen verfärbten sich grün-gelb. B: Kulturüberstand unter UV-Licht. In der Leervektor-Kontrolle war keine Fluoreszenz zu messen, wohingegen sich bei den Expressionskulturen eine deutliche Fluoreszenz zeigte.

Die homologe Expression der putativen Lipase *pp4218* führt ebenfalls zur Produktion und Sekretion von Pyoverdinin in *P. putida*.

3.4.3 Die putative Lipase/Esterase PP4218 zeigt keine Enzymaktivität

Eine mögliche Lipase/Esterase-Aktivität des Proteins PP4218 sollte unter Verwendung von Standardsubstraten gezeigt werden. Kulturen mit dem *pp4218*-Expressionsplasmid wurden wie für die Kulturen mit dem *lipAH*-Expressionsplasmid beschrieben angezogen. Die Zellpellets vom Kulturüberstand getrennt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und mittels Ultraschall-Zellaufschluss (2.12) aufgeschlossen. Zellextrakte und Kulturüberstände wurden jeweils separat auf Lipase- und Esteraseaktivität getestet. Als Substrate dienten *para*-Nitrophenyl-Palmitat (*pNPP*) und *para*-Nitrophenyl-Caproat (*pNPC*) (Abb. 3.13). Weiterhin wurden Einzelkolonien auf Tributyrin Indikatorplatten gepickt und gegebenenfalls die Entstehung klarer Höfe um die Kolonien beobachtet (Abb. 3.13).

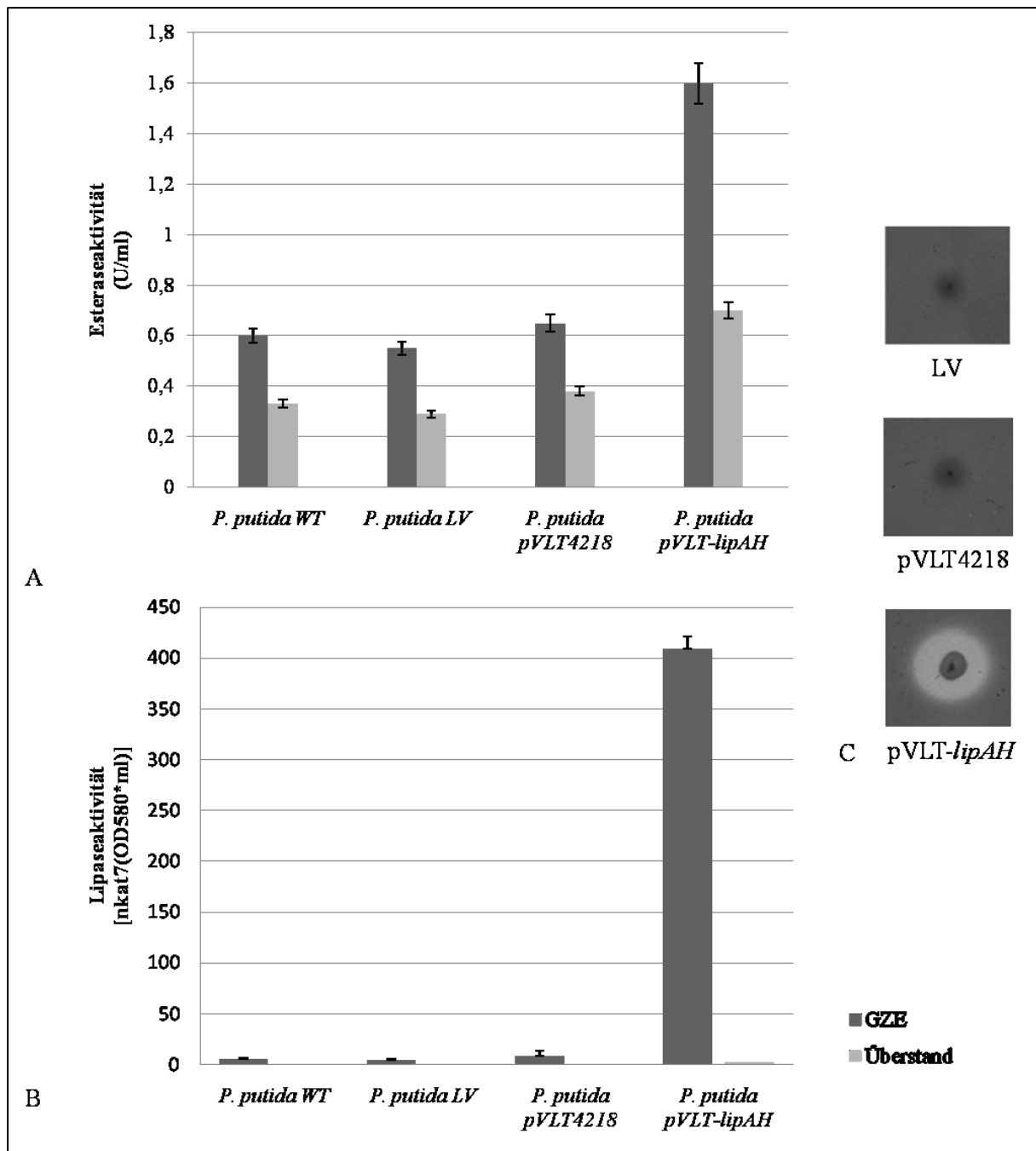


Abb. 3.13: Lipase-/Esterase- Aktivitätstests der putativen Lipase PP4218 mit *para*-Nitrophenyl-Palmitat (A) und *para*-Nitrophenyl-Caproat (B) sowie Tributyrin als Substrat (C). Die Aktivitäten wurden mit drei Standardsubstraten für Lipasen/Esterasen getestet. Zwei Substrate wurden mittels spektralphotometrischer Tests und ein weiteres in einem Plattentest untersucht. Der *P. aeruginosa*-Wildtypstamm PAO1 diente als Positivkontrolle. Die Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

Nach homologer Expression des Proteins PP4218 in *P. putida* konnte gegen keines der getesteten Standardsubstrate eine erhöhte Aktivität gegenüber der Leervektorkontrolle pVLT33 bestimmt werden.

3.4.4 Erfolgreiche Transkription von *pp4218* bei homologer Expression

Während der homologen Expression von *pp4218* konnte die gleiche Grünfärbung beobachtet werden wie bei der heterologen *lipAH*-Expression. Lipase- und Esteraseaktivität konnte unter Verwendung der Standardsubstrate jedoch nicht beobachtet werden. Eine erfolgreiche Expression von *pp4218* wurde deshalb mittels qRT-PCR nachgewiesen (2.10.3). Hierzu wurde die Gesamt mRNA aus Expressionskulturen nach 16 h Wachstum isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anhand von spezifischen Primern gegen *pp4218* (2.3) und dem fluoreszierendem Farbstoff „SYBR Green“ konnte die Menge an Transkript relativ zum „*housekeeping gene*“ *rpoD* quantifiziert werden. Zum Vergleich wurde ebenfalls die Gesamt-RNA aus Leervektor-Kontrollkulturen isoliert und ebenfalls die Transkriptmenge an *pp4218* bestimmt. Vergleiche zwischen Kulturen mit dem Leervektor und den Expressionskulturen ergaben, dass in den Expressionskulturen eine Steigerung um den Faktor zehn an *pp4218* Transkript vorhanden war. Dem zufolge ist die Expression von *pp4218* erfolgreich gewesen und der Grund für das Fehlen der Lipase/Esterase-Aktivität woanders zu suchen, wie z.B. im Fehlen des richtigen Substrats.

In *P. putida* haben lipolytische Proteine einen großen Einfluss auf die Pyoverdinin-Synthese. Sowohl die heterologe Lipase A als auch das homologe Lipase/Esterase Protein PP4218 führten bei Expression zur Synthese von Pyoverdinin.

3.5 Bioinformatischer Vergleich der Lipase A und PP4218

Sowohl die homologe Expression von *pp4218* als auch die heterologe Expression von *lipAH* führen in *P. putida* zu einem Pyoverdinin-positiven Phänotyp. Die Lipase A ist eine der am besten beschriebenen Lipasen aus Bakterien, PP4218 hingegen ist noch nicht beschrieben und wurde lediglich als Lipase/Esterase-Protein vorhergesagt (Matthijs *et al.*, 2009; Winsor *et al.*, 2009; Pseudomonas.com). Das Gen von *pp4218* besteht aus 966 Basenpaaren (319 Aminosäuren) und hat einen GC-Gehalt von 63,5 % (LipA: 936 bp, 312 AS, 65,8% GC). Computerberechnungen haben ergeben, dass *pp4218* wahrscheinlich mit *ppsD*, einem Protein

welches zur Siderophore-Produktion benötigt wird, zusammen in einem Operon codiert wird (Winsor *et al.*, 2009; Pseudomonas.com).

Ein Sequenzvergleich von LipA und PP4218 auf Aminosäureebene (Abb. 3.14) zeigt, dass die beiden Proteine eine Identität von ca. 25% und weiterhin eine Ähnlichkeit von ca. 35% besitzen. Eine katalytische Triade, wie sie bei LipA existiert, ist nicht zu finden.

<i>P. putida</i> PP4218	M---SLNP-----DIAAYLCIVFAGRSAGKVIEMHFLAADEARRQFEESALIPAGKADEPDCTSDLSLTTRRGHTLP
<i>P. aeruginosa</i> LipA	MKKKSLPLGLAIGLASIAAS-ELICASTYTQTKYET-VLA--HGMLGFD--N--ILG-VDYWFGIPS-FLR-REG----
<i>P. putida</i> PP4218	VRIV--RPPQDEA-LAGALLY-----LHGGSYV--VGSLSHD--TLCWNLAQIASVP-VIA---VGYRIAPQWR
<i>P. aeruginosa</i> LipA	AQVYVTEVSQIDTSEVRGEQLLQQVEEIVALSQPKVNIIGH--SHGGFTIRY-VA--AVRPDLIASATSVG---APH--
<i>P. putida</i> PP4218	FPTASDDALDAWRWLV--EQAEAL-LGIDAQFLAVVGDSSVGSLLATILANQLAQRDL--P-APRLQVMIYP--VTIAS
<i>P. aeruginosa</i> LipA	--KGSDDA-DFLRQIPPGSAGEAVLSGL-VNSLGLALISFLSSGSTGT--QNSLGSLESINSEGAARFNAK-YPQGIPTSA
<i>P. putida</i> PP4218	CRRPSVQRYGSG-YLLEAQILEWBYQQYATVPADRH-DPRFSPILG--SVASNSAHALM-TIAECDPIHDGG--VA--YA
<i>P. aeruginosa</i> LipA	C-----GEGYKVNQ--VS-YYSWSSSLTNFIDPS-DAFLGASSLTFKNGTANDGLVGTCSH-H-IGMVIDRMYR
<i>P. putida</i> PP4218	*R-HLEQAGVAVQLAVIFGVTHDFMRMCSLIEEADEGLAMVVEALCQH-----L
<i>P. aeruginosa</i> LipA	MNHIDE--VNQ-VF-GIT-----SLEETSP-----VSVYRQHANRLKNASL

Abb. 3.14: Paarweiser Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von PP4218 aus *P. putida* und der Lipase A aus *P. aeruginosa*. Verwendet wurde eine BLOSUM62-Matrix mit einer „open gap penalty“ von 5,0 und einer „gap extension penalty“ von 0,1. Es wurde eine Identität (schwarz unterlegt) von 24,7% und Ähnlichkeit (gelb unterlegt) von 34,6% festgestellt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade von LipA sind mit einem * über den Aminosäuren gekennzeichnet.

Weitere Vorhersagen durch den „Signal-P prediction server“ (Bendtsen *et al.*, 2004; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) ergaben ein mögliches Signalpeptid an PP4218, welches dazu führen könnte das PP4218 außerhalb des Zytoplasmas lokalisiert ist.

Die putative Lipase/Esterase PP4218 aus *P. putida* und die Lipase A aus *P. aeruginosa* besitzen nur eine geringe Ähnlichkeit. Die katalytische Triade von LipA ist in PP4218 nicht zu finden und könnte zusammen mit der geringen Ähnlichkeit der Grund für das unterschiedliche Substratspektrum sein.

Die Pyoverdine-Synthese und Regulation wurde bisher am meisten und besten in *P. aeruginosa* untersucht. Um den Einfluss der Lipase auf die Pyoverdine besser untersuchen zu können, wurde im Folgendem ein *lipAH*-Deletionsstamm von *P. aeruginosa* (PABST7.1) auf Pyoverdine untersucht.

3.6 Nachweis von Siderophoren in *P. aeruginosa* PABST7.1 ($\Delta lipAH$)

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde die Produktion von Siderophoren und im Speziellen von Pyoverdinen auch im homologen Wirt der Lipase A, *P. aeruginosa*, untersucht. *P. aeruginosa* besitzt neben der Lipase A noch weitere lipolytisch aktive Enzyme. Dazu zählen sowohl die Lipase C (LipC), welche zur Erlangung der aktiven Konformation ebenfalls die Foldase LipH benötigt (Hausmann, *et al.*, 2009), als auch die Esterase A (EstA) (Wilhelm *et al.*, 1997) sowie einige Phospholipasen (Istivan & Coloe, 2006). Für die Untersuchungen der Siderophore wurden daher die $\Delta lipAH$ -negative Mutante PABST7.1 (Schneidinger, 1997) benutzt. Dabei ist zu beachten, dass eine Mutation in der für die Faltung von LipA benötigten Foldase LipH auch zu einer Inaktivierung von LipC führt, so dass keine aktive Lipase mehr in *P. aeruginosa* vorhanden ist.

Die $\Delta lipAH$ -Mutante wurde für die Experimente einmal mit dem *lipAH*-Expressionsplasmid pBBL7 (Wilhelm *et al.*, 2007) und einmal mit dem entsprechenden Leervektor Plasmid pBBR1MCS transformiert (2.8) und anschließend in LB-Medium bei 37°C bebrütet. Aus einer Vorkultur wurde eine Hauptkultur auf eine OD_{580 nm} von 0,05 angeimpft und bis zu einer OD_{580 nm} von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Expression von *lipAH* mittels Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Wie Abbildung 3.15 zeigt, färbten sich die *P. aeruginosa* Kulturen, welche die Lipase exprimieren, ähnlich Grün wie die Lipase-exprimierenden *P. putida*-Bakterien. Daher wurde der Kulturüberstand der *P. aeruginosa*-Kulturen nach 16 h Wachstum und Expression auf die Anwesenheit von Siderophoren hin getestet.

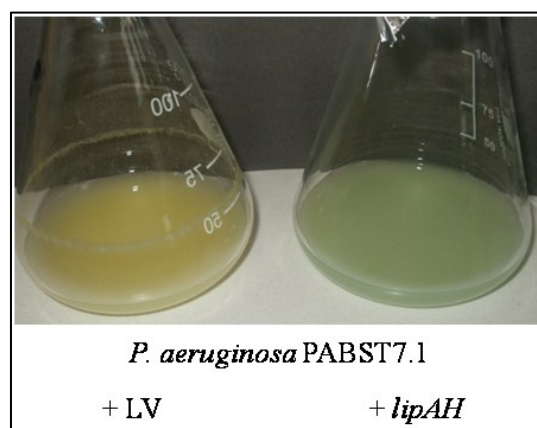


Abb. 3.15: Kulturfarbe der $\Delta lipAH$ -Mutanten von *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* PABST7.1-Kulturen enthielten entweder den Leervektor pBBR(1)MCS oder das pBBL7(*lipAH*)-Expressionsplasmid und wurden 16 h nach Expressionsinduktion fotografiert.

3.6.1 Lipase beeinflusst die Menge an Pyoverdin in *P. aeruginosa* PABST7.1

Die charakteristisch gefärbten Kulturüberstände der $\Delta lipAH$ -Mutanten (Abb. 3.15), welche entweder mit dem Leervektor- oder dem Expressionsplasmid transformiert waren, wurden unter UV-Licht auf die Anwesenheit von Pyoverdinen untersucht. Der Gehalt an Pyoverdin wurde anschließend mittels spektralphotometrischen Tests quantifiziert (2.17.1).

Sowohl die Lipase-Mutante mit dem Leervektor als auch die Lipase-Mutante mit dem *lipAH*-Expressionsplasmid zeigen eine deutliche Fluoreszenz unter UV-Licht (Abb. 3.16 A). Anhand der Intensität der Fluoreszenz wurde deutlich, dass der Gehalt an Pyoverdinen in der Mutante ohne Lipase-Expression deutlich geringer war. Diese Ergebnisse wurden durch die Quantifizierung der Pyoverdine bestätigt. Im Kulturüberstand von *lipAH*-exprimierenden Kulturen fand sich etwas mehr als das 2,5-fache an Pyoverdinen. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur in *P. putida*, sondern auch in *P. aeruginosa* ein Zusammenhang zwischen der Lipase-Synthese/Aktivität und der Pyoverdine-Produktion besteht.

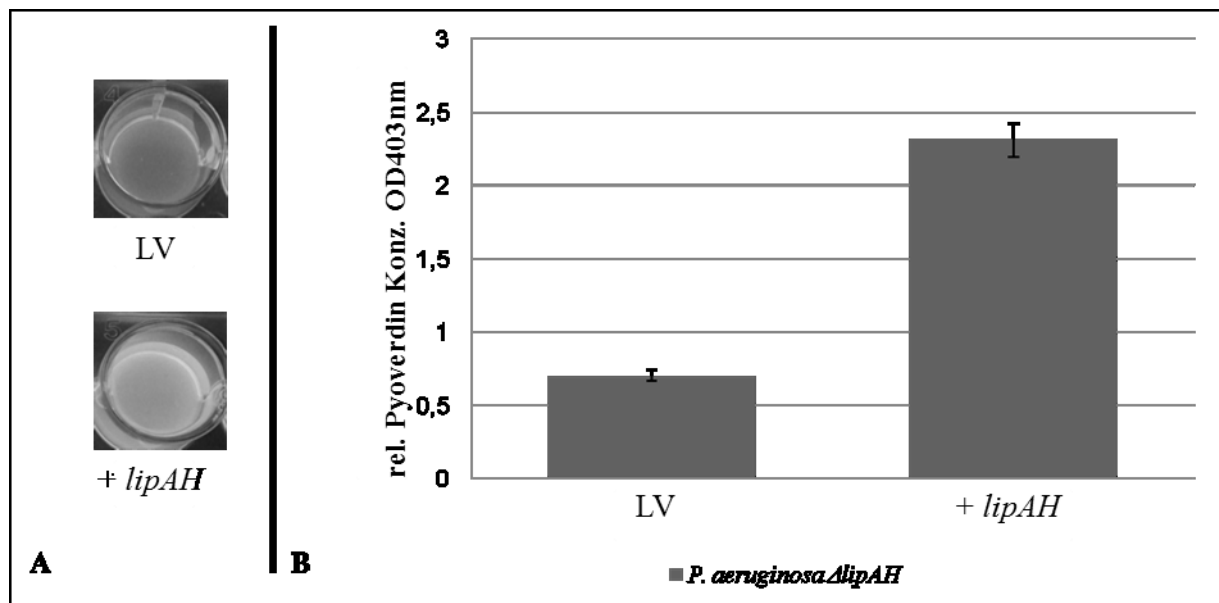


Abb. 3.16: Pyoverdin-Nachweis und -Quantifizierung in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$.

A: Nachweis von Pyoverdinen in zellfreien Kulturüberständen von $\Delta lipAH$ -Mutanten unter UV-Licht. B: Quantifizierung der extrazellulären Pyoverdine nach Höfte *et al.*, 1993. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten.

3.6.2 Lipase vermindert die Menge an Pyocyanin in Kulturüberstand von *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$

Bei der Kultivierung der *lipAH*-Mutanten fiel auf, dass sich die Farbe von Übernachtskulturen, welche den Leervektor enthielten, deutlich von denen mit dem plasmidkodiertem *lipAH*-Gen unterschied (Abb. 3.15). Die Farbe von *P. aeruginosa*-Kulturen wird neben Pyoverdin auch durch das blaue Pigment Pyocyanin beeinflusst, dessen Produktion vom „Quorum sensing“-System Rhl reguliert wird. Pyocyanin hat eine wichtige Funktion bei der Virulenz von *P. aeruginosa*, da es die Cilienbewegung von Epithelzellen sowie die Proliferation von Lymphozyten hemmt und durch Radikalbildung zu Gewebeschäden führt (Ulmer *et al.*, 1990; Whiteley *et al.*, 1999). Um die Pyocyaninproduktion der verschiedenen *P. aeruginosa*-Kulturen zu vergleichen, wurden die Pyocyanine aus den Kulturüberständen von LB-Übernachtskulturen mit Chloroform extrahiert (2.17.2). Abbildung 3.17 zeigt eine deutliche blaue Färbung in der *lipAH*-Mutante, und eine klare, durchsichtige Phase in der *lipAH*-Mutante mit Plasmidkodiertem *lipAH*-Operon. Zur Quantifizierung der Pyocyaninproduktion wurde die Absorption der Chloroform-Extrakte bei 695 nm gemessen und die Konzentration in μg Pyocyanin pro ml Kulturüberstand berechnet. Der $\Delta lipAH$ -Stamm mit dem Leervektorplasmid produziert im Vergleich zur *lipAH*-Mutante, welche mit dem Plasmid pBBR1-*lipAH* komplementiert wurde, die dreifache Menge an Pyocyanin.

Im Gegensatz zum Pyoverdin wird die Pyocyaninproduktion negativ von dem Vorhandensein der Lipase beeinflusst.

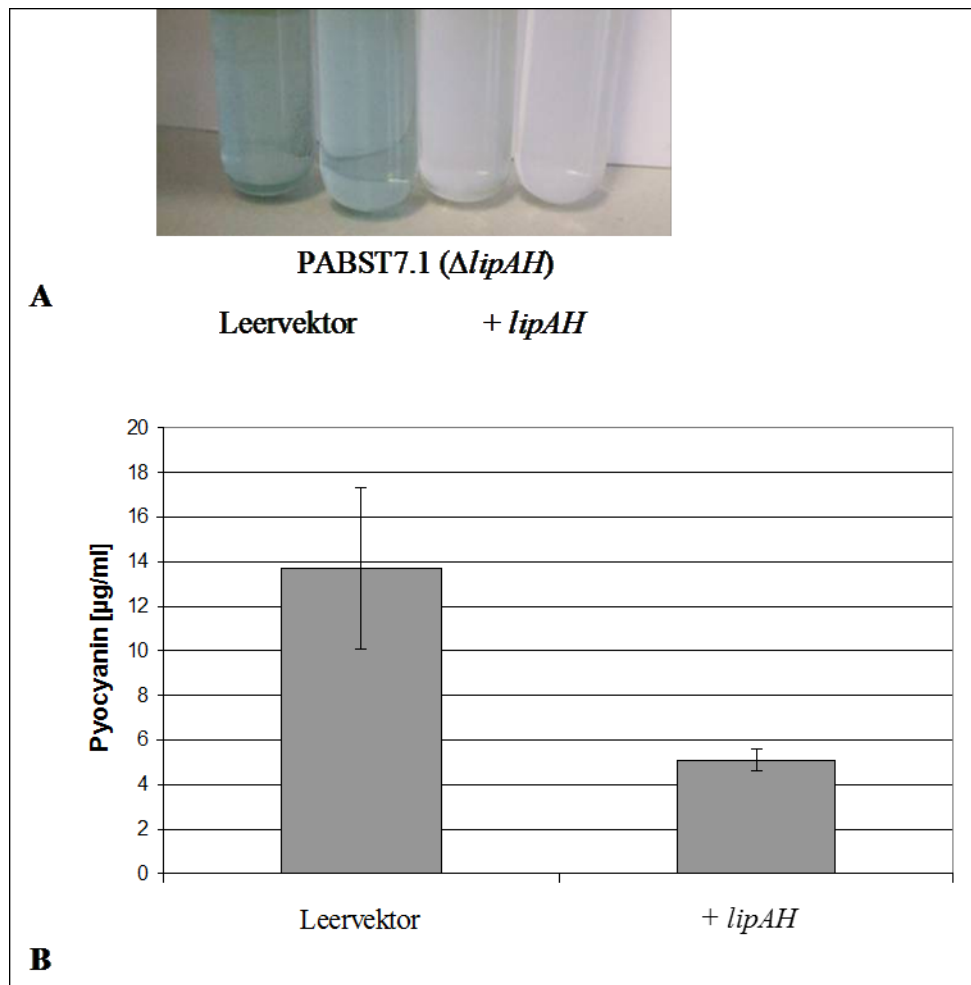


Abb. 3.17: Bestimmung der Konzentration des Siderophores Pyocyanin in den Kulturüberständen des *lipAH*-defizienten *P. aeruginosa* Stammes PABST7.1. A: Chloroformextraktion von Kulturüberständen. Eine bläuliche Verfärbung zeigt das Vorhandensein von Pyocyaninen. B: Quantifizierung der Pyocyanin Konzentration in Kulturüberständen von *lipAH*-Mutanten und deren Komplementation.

Die Lipase A besitzt in *P. aeruginosa* einen deutlichen Einfluss auf die Produktion von Siderophoren. Während die Synthese von Pyoverdin von LipA positiv beeinflusst wird verringert sich die Synthese von Pyocyanin mit Anwesenheit von LipA. Sowohl *P. aeruginosa* als auch *P. putida* produzieren in Abhängigkeit von LipA verschiedene Mengen an Pyoverdin.

3.6.3 Die Pyoverdin-Bildung ist abhängig von LipA und nicht von LipC

Durch die Deletion auch von *lipH* im $\Delta lipAH$ -Operon von *P. aeruginosa* PABST7.1 kommt es nicht nur zum Fehlen von LipA, auch die Lipase C kann nicht mehr in eine aktive Konformation überführt werden. Damit getestet werden konnte, ob das Fehlen von LipA oder die Inaktivität von LipC für die gefundenen Ergebnisse zuständig waren, wurde eine $\Delta lipAHC$ -Mutante (PAF3) verwendet, in der einmal das *lipAH*-Operon (pBBL7) und einmal ein artifizielles *lipCH*-Operon (pBBLCH) exprimiert wurde. Die Kulturen wurden wie bei der $\Delta lipAH$ -Mutante beschrieben behandelt und die Expression ebenfalls durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Pyoverdin Konzentrationen in den Kulturüberständen photometrisch bestimmt und mit einer Leervektorkontrolle verglichen (Abb. 3.18).

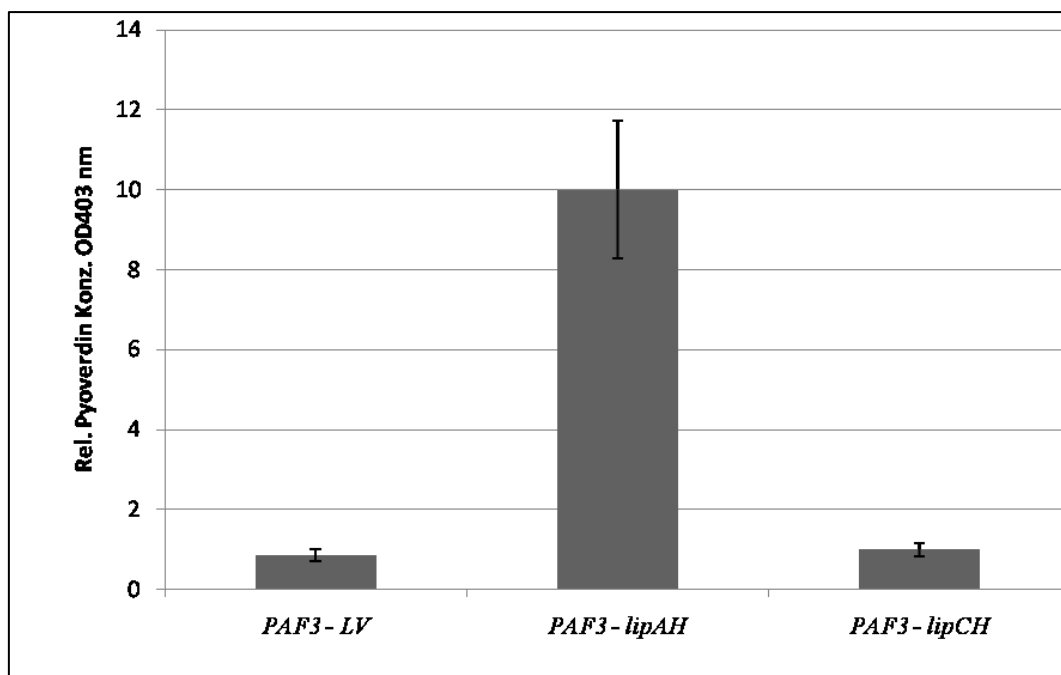


Abb. 3.18: Pyoverdin Quantifizierung in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* $\Delta lipAHC$. A: Quantifizierung der extrazellulären Pyoverdine nach Höfte *et al.*, 1993 in einer *P. aeruginosa* $\Delta lipAHC$ -Mutante (PAF3), welche entweder den Leervektor (LV) oder ein *lipAH*- bzw. *lipCH*-Expressionsplasmid beinhalten. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten, die Standardabweichung der Messwerte sind als Fehlerbalken dargestellt.

Wie in der Abbildung 3.18 zu erkennen ist findet sich in der *P. aeruginosa* PAF3-Mutante insgesamt nur sehr wenig Pyoverdin. Die Pyoverdinkonzentration kann nur durch die

Expression von *lipAH* gesteigert werden, die Expression von *lipCH* hat keine Auswirkung auf den Pyoverdin Gehalt in den Kulturüberständen.

Die Veränderung in der Pyoverdin-Synthese ist auf LipA und nicht auf LipC zurückzuführen. Aufgrund dessen wurde im Weiteren der Fokus der Untersuchungen auf die *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ -Mutante gelegt.

3.7 Analyse des extrazelluläres Proteoms von *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$

Sowohl Pyoverdine als auch Pyocyanine sind sekretierte Moleküle und üben ihre physiologische Funktion, Eisen zu komplexieren, im extrazellulären Milieu aus. Die Lipase A aus *P. aeruginosa* zählt ebenfalls zu den sekretierten Proteinen, ihre physiologische Bedeutung konnte bis heute aber nicht endgültig geklärt werden. Die Ergebnisse der Pyoverdin-Konzentrationen und Lipaseaktivitäten basieren auf Kulturüberständen von *Pseudomonas*, im weiteren wurde auch das Sekretom von *P. aeruginosa* mittels 2D-Gelelektrophorese ermittelt und auf Auffälligkeiten hin untersucht. Hierzu wurden die Kulturüberstände von *P. aeruginosa* PABST7.1, welche entweder den Leervektor oder das *lipAH*-Expressionsplasmid enthielten, 16 h nach Induktion durch Zentrifugation vom Zellpellet getrennt und mittels Sterilfiltration von eventuell noch vorhandenen Zellen getrennt. Anschließend wurde die Gesamtheit aller sekretierten Proteine mittels TCA-Fällung (2.19) präzipitiert und durch mehrmaliges Waschen mit Aceton gereinigt. Im Gegensatz zu dem unter 3.3 gezeigtem 2-D-Gel wurden die Proteine mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, dann zusammen in einer 2-D Gelelektrophorese aufgetrennt (2.21) und anschließend die Fluoreszenz der Farbstoffe unter Verwendung von verschiedenen Lasern gescannt. Abbildung 3.19 zeigt ein solches, so genanntes DIGE-Gel („*differential gel electrophoresis*“).

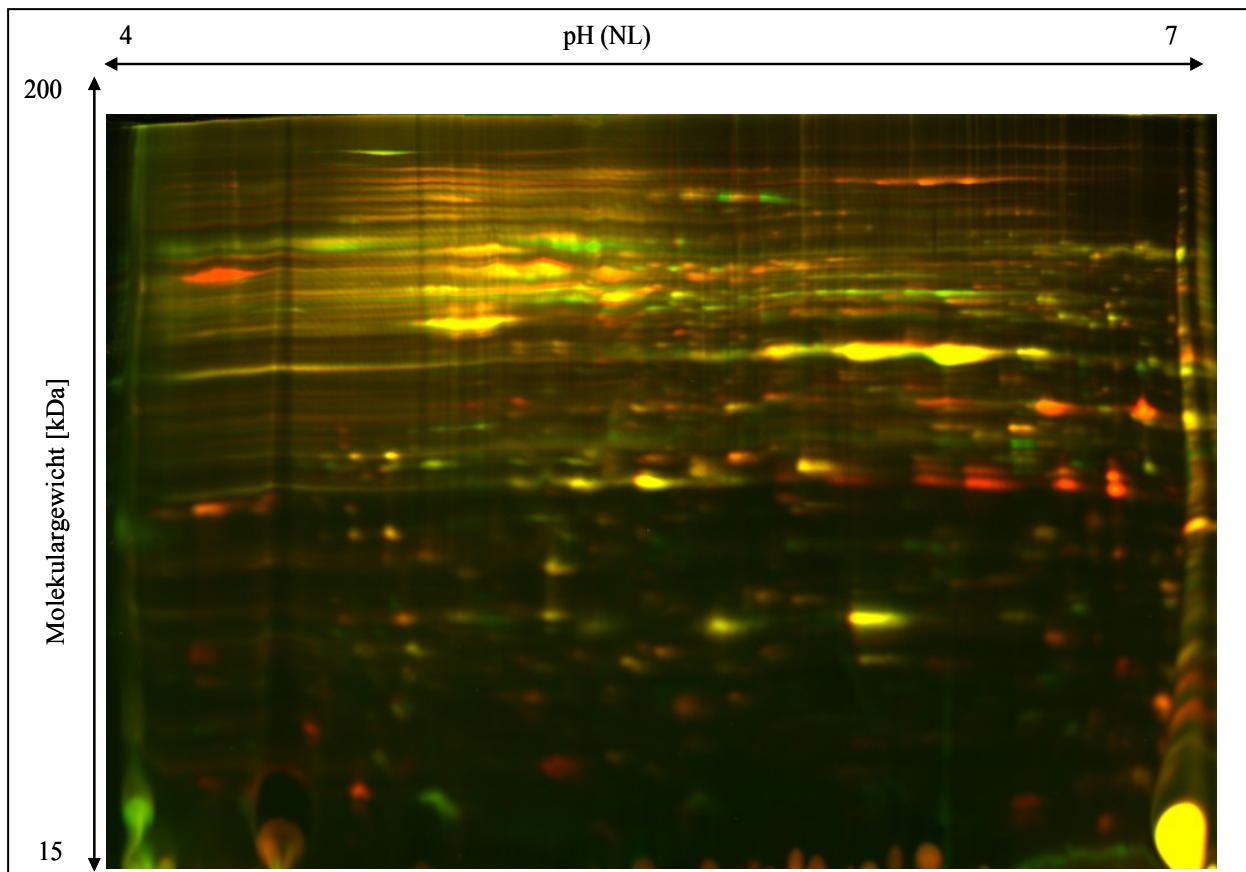


Abb. 3.19: Extrazelluläres Proteom von *P. aeruginosa* PABST7.1. Rote Spots zeigen Proteine, welche ausschließlich im Kulturüberstand von *lipAH* exprimierenden *P. aeruginosa* gefunden wurden. Grüne Spots hingegen zeigen Proteine, welche nur in Kulturen gefunden wurden, die den Leervektor enthielten. Gelbe Spots zeigen Übereinstimmungen im Expressionsverhalten der unterschiedlichen Kulturen.

Anhand der unterschiedlichen Farben können die Spots den einzelnen Proteinproben zugeordnet werden. Proteine, welche nur in *lipAH*-exprimierenden Kulturen vorhanden sind, erscheinen rot; solche die nur in der *lipAH*-Mutante mit dem Leervektorplasmid gebildet werden, grün. Übereinstimmende Proteinspots erscheinen gelb. Wie in Abb. 3.19 deutlich zu erkennen ist, unterscheidet sich das Protein-Expressionsprofil der Leervektor-Kulturen und das der Expressions-Kulturen an manchen Stellen deutlich. Eine Vielzahl von Proteinen wird nur exprimiert, wenn das *lipAH* Operon im Bakterium vorhanden ist. Es gibt aber auch einige wenige Proteine, die unter Lipaseexpressionsbedingungen nicht gebildet werden, dafür aber sehr wohl in den Leervektor-Kulturen vorhanden sind. Diejenigen Spots, welche sich in den verschiedenen Kulturen unterschieden, wurden aus dem Gel ausgestochen und nach tryptischem Verdau mittels MALDI-TOF-MS-Analyse (2.22) identifiziert. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Identifizierte Proteine welche unter *lipAH* Expressionsbedingungen in *P. aeruginosa* reguliert werden. Ein + gibt an, dass das Protein nur zu finden ist wenn das Lipase-Operon exprimiert wird. Bei einem – hingegen fehlt das Protein.

Nr.	Art der Regulation	Gen Nr.	Gen Name	Gen Produkt
1	+	PA1249	aprA	<i>Alkaline metalloproteinase precursor</i>
2	+	PA0572		<i>hypothetical protein</i>
3	+	PA4761	dnaK	<i>molecular chaperone DnaK</i>
4	+	PA4175	prpL	<i>Pvds-regulated endoprotease, lysyl class</i>
5	+	PA3529		<i>probable peroxidase</i>
6	+	PA0852	cbpD	<i>chitin-binding protein CbpD precursor</i>
7	+	PA1618		<i>conserved hypothetical protein</i>
8	+	PA0462		<i>Hypothetical protein</i>
9	+	PA4922	azu	<i>azurin precursor</i>
10	-	PA4453		<i>conserved hypothetical protein</i>
11	-	PA0958	oprD	<i>Outer membrane porin OprD</i>
12	-	PA5167		<i>Probable c4-dicarboxylate-binding protein</i>

Von besonderem Interesse sind die Proteine PA4175 und PA1249, welche nur in den *lipAH*-exprimierenden Kulturen identifiziert wurden. Es handelt sich dabei um eine Endoprotease PrpL (=Protease IV), von der bekannt ist, dass sie unter direkter Kontrolle des alternativen Sigma faktors PvdS steht und nur transkribiert wird, wenn dieser vorhanden ist (Wilderman *et al.*, 2001) Und auch die alkalische Protease AprA ist ein von PvdS reguliertes Protein. Dadurch wird ein indirekter Zusammenhang zwischen der Lipase und dem für die Pyoverdinin-Regulation verantwortlichen Sigma Faktor PvdS hergestellt.

Das extrazelluläre Proteom von *P. aeruginosa* PABST7.1 stellt einen Zusammenhang von Lipase und dem Pyoverdinin-Regulator PvdS her.

3.8 Die Expression des *lipAH* operons beeinflusst auch die Expression PvdS abhängiger Gene in *P. aeruginosa* Δ *lipAH*

Da Proteinmengen nicht immer in einem direkten Zusammenhang mit Transkriptmengen stehen, ist es sinnvoll, sich sowohl die Proteinexpression (Proteom) als auch die Expression

(Transkriptom) der entsprechenden Gene anzuschauen. Im Sekretom von *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ fehlte das Protein PrpL. PrpL ist eine Endoprotease, deren Expression unter der Kontrolle des Sigma Faktors PvdS steht (Wilderman *et al.*, 2001). Deshalb wurden im folgendem die Transkriptmengen von *prpL* und weiteren PvdS-abhängigen Genen mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurden wiederum vergleichende Proben von *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ und $\Delta lipAH$ mit *lipAH* Expressionsplasmid unter identischen Bedingungen wie für die Proben des Proteoms angezogen und anschließend die Gesamt mRNA isoliert. Als Vertreter der PvdS-abhängigen Gene wurden *pvdD*, *pvdE*, *tonB* und *prpL* ausgewählt. Zusätzlich wurden noch die Gene *lipA*, *lipH* und *lipC* untersucht und auch der Sigma Faktor *pvdS* selbst. Die auf *rpoD* normierten Transkriptmengen sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

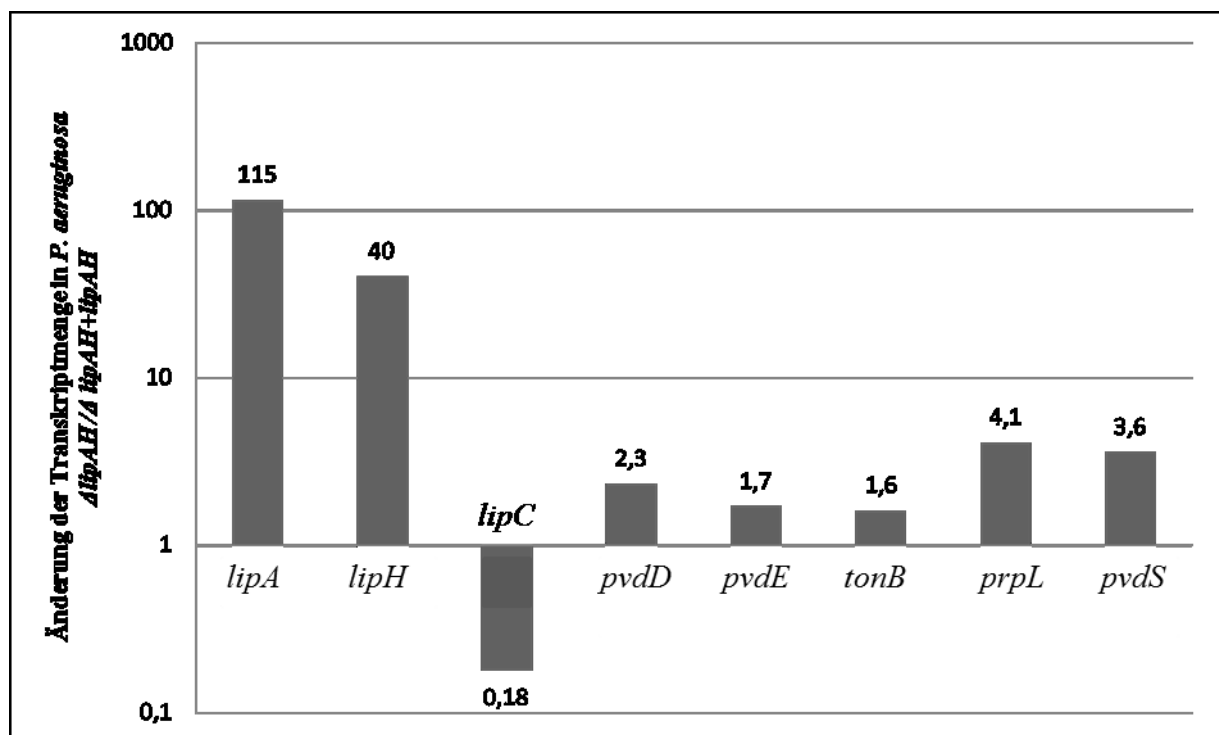


Abb. 3.20: RT-PCR von PvdS-regulierten Genen in *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ und $\Delta lipAH$ mit *lipAH*-Expression. Werte > 1 stehen für Gene mit erhöhter Transkriptmenge in Kulturen, welche das *lipAH*-Operon exprimieren, Werte < 1 haben eine erhöhte Transkriptmenge in Kulturen ohne das *lipAH*-Operon. Alle Werte wurden auf das konstitutiv exprimierte *rpoD*-Gen normiert. Die Abbildung stellt Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar.

LipA besitzt einen Einfluss auf die Transkription des Sigma-Faktors PvdS und die von ihm regulierten Gene. Die Expression von LipA führt zu einem ansteigen der Transkriptmenge von *pvdS*, dies zeigt, dass LipA einen regulatorischen Einfluss auf PvdS und damit auch auf das Pyoverdine besitzt.

Der Sigmafaktor PvdS reguliert die Transkription von vielen Genen, welche auch an der Virulenz von *P. aeruginosa* beteiligt sind. Im folgendem wurden deshalb auch andere Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* untersucht.

3.9 Einfluss des *lipAH* operons auf die Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt eine Vielzahl von Proteinen, die an der Virulenz des Bakteriums beteiligt sind. Viele dieser Virulenzfaktoren sind im extrazellulären Milieu lokalisiert, so z.B. Lipasen, Pyoverdine, Rhamnolipide, Toxin A und Proteasen (AprA, PrpL, LasB). Die Synthese vieler dieser Virulenzfaktoren wird über das „*Quorum Sensing*“-System von *P. aeruginosa* reguliert. Es ist sowohl von ToxA als auch von PrpL sowie den Pyoverdinen bekannt, dass sie direkt über den ECF-Sigma-Faktor PvdS reguliert werden. Wie die bisherigen Ergebnisse zeigten hat die Lipase LipA einen deutlichen Einfluss auf das von *pvdS*-regulierte System von *P. aeruginosa*. Im Weiteren sollte deshalb der Einfluss der Lipase auf andere Virulenzfaktoren und auf das „*Quorum sensing*“-System von *P. aeruginosa* untersucht werden.

3.9.1 LipA beeinflusst die Rhamnolipidproduktion in *P. aeruginosa*

Rhamnolipide sind Biodetergenzien, die zugleich als Virulenzfaktoren gelten. Sie erhöhen die Löslichkeit hydrophober Kohlenwasserstoffe und so deren Bioverfügbarkeit (Beal & Betts, 2000). Weiterhin wird die Reibung zwischen Zellen und Oberflächen verringert, so dass Rhamnolipide sowie deren Vorstufen wie „Schmierstoffe“ wirken und die Beweglichkeit des Bakteriums verbessern (Köhler et al., 2000; Déziel, et al., 2003). Die Rhamnolipid-Biosynthese ist Zelldichte-abhängig und wird durch die Rhamnosyltransferase 1(RhlAB) durchgeführt. Die Strukturgene *rhlAB* sind zusammen mit den Genen *rhlR/rhlI* in einem Gencluster lokalisiert und werden durch das RHL-System reguliert (Ochsner & Reiser, 1995).

Um den Einfluss der Lipase auf die Rhamnolipid-Biosynthese zu untersuchen, wurden die Kulturüberstände von *P. aeruginosa lipAH*-Mutanten, welche entweder das *lipAH*-Operon plasmidkodiert oder das Leervektorplasmid trugen, mit dem *P. aeruginosa* Widtypstamm

PAO1 auf ihren Rhamnolipidgehalt hin verglichen. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C für 16 h in LB-Medium. Anschließend wurden die Rhamnolipide mittels Ethylacetat extrahiert (2.18.1). Ein qualitativer Nachweis der Rhamnolipide erfolgte durch Dünnschichtchromatographie mit anschließender Färbung (2.18.3) (Abb. 3.21 A). Ein quantitativer Nachweis der Rhamnolipide erfolgte mit einem Orcinol-Test (Chandrasekaran & Bemiller, 1980) (Abb. 3.21 B). Hierbei handelt es sich um einen photometrischen Test zum Nachweis von 3-Desoxy-Hexosen (Rhamnose), der die indirekte Quantifizierung von Rhamnolipiden ermöglicht.

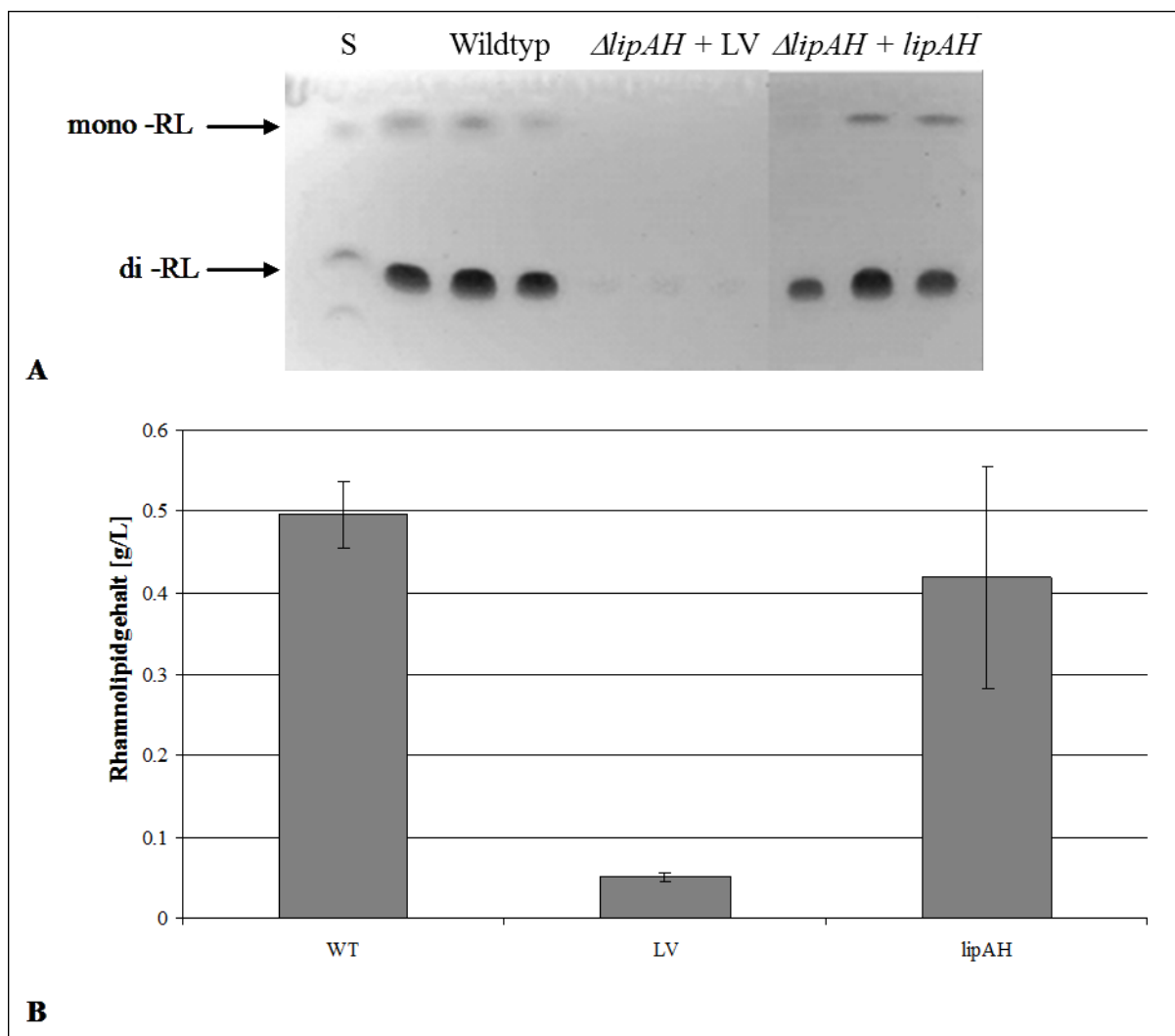


Abb. 3.21: Nachweis von Rhamnolipiden im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$. A: Dünnschichtchromatographische Auftrennung isolierter Rhamnolipide aus Kulturüberständen von *P. aeruginosa* Wildtyp (WT), *P. aeruginosa* PABST7.1 + Leervektorplasmid ($\Delta lipAH + LV$) und *P. aeruginosa* PABST7.1 mit *lipAH* plasmidkodiert ($\Delta lipAH + lipAH$). Als Standard wurden gereinigte Rhamnolipide aufgetragen. B: Bestimmung des Rhamnolipidsgehalts aus Kulturüberständen anhand des photometrischen Orcinol-Tests. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Sowohl mittels Dünnschichtchromatographie als auch mit Orcinol-Tests lässt sich deutlich nachweisen, dass die $\Delta lipAH$ -Mutante nur sehr wenig bis gar keine Rhamnolipide produziert. Demgegenüber produziert die komplementierte $\Delta lipAH$ -Mutante sowohl Mono- als auch Di-Rhamnolipide in gleichen Mengen wie der Wildtyp. Dies deutet auf eine klare Beteiligung der Lipase an der Rhamnolipidproduktion hin.

3.9.2 Das *lipAH* operon beeinflusst die „Quorum sensing“-Systeme von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt zwei gut charakterisierte QS-Systeme, das Las-System und das Rhl-System. Diese Systeme produzieren die Signalmoleküle 3-oxo-C12-HSL bzw. C4-HSL und in geringeren Mengen das 3-oxo-C6-HSL und C6-HSL, sowie Signalmoleküle mit acht bzw. zehn C-Atomen in der Acyl-Seitenkette. Beide Systeme bestehen aus den Synthetasen LasI und RhlI und den Regulatoren LasR bzw. RhlR.

Um den Einfluss von LipAH auf die Produktion der Signalmoleküle zu testen wurden die Transkriptmengen der *lasR/lasI*- und *rhlR/rhlI*-Gene in der $\Delta lipAH$ -Mutante mit denen der Mutante mit *lipAH*-Expression verglichen. Hierzu wurde die Gesamt-RNA nach 16 h Kultivierung bei 37°C isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (2.10.3). Die so gewonnene cDNA wurde für eine anschließende qRT-PCR verwendet, als endogene Kontrolle wurde wiederum das konstitutiv exprimierte *rpoD*-Gen verwendet. Wie in Abbildung 3.22 dargestellt steigt sowohl die Transkriptmenge von *lasR/lasI* als auch die von *rhlI/rhlR* in der *lipAH*-exprimierenden Kultur an, wobei die von *lasI* nicht so stark ansteigt wie die der übrigen Transkripte.

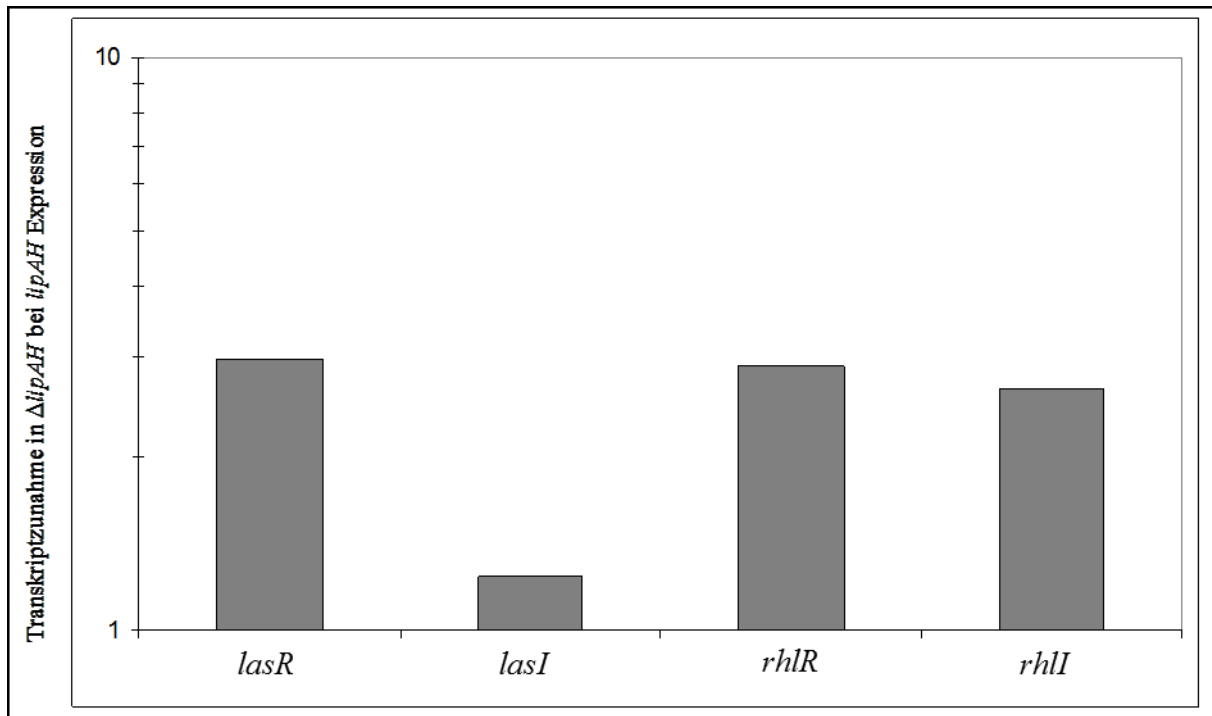


Abb. 3.22: Veränderung der Transkriptmenge in *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ bei Expression von *lipAH*. Dargestellt ist die Zunahme an Transkript in einer *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ -Mutante bei Expression von plasmidkodiertem *lipAH*. Die mRNA wurde nach 16 h induziertem Wachstum bei 37°C isoliert und für die RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Als endogene Kontrolle wurde der Sigma Faktor *rpoD* verwendet. Die Änderung der Transkriptmenge bezieht sich auf die Transkriptmenge in der Mutante, welche den Leervektor enthielt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Ein weiteres Signalmolekül des „*Quorum sensing*“ stellt das *Pseudomonas* quinolone-Signal (PQS) dar. Die Produktion dieses 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolon ist abhängig vom Las-System, benötigt andererseits auch das *rhlR*-Gen für seine Bioaktivität (Pesci *et al.*, 1999). PQS wird in der frühen Stationärphase gebildet und erhöht die Expression von *lasB*, *rhlR* und *rhlI* (Pesci *et al.*, 1999; McKnight *et al.*, 2000; Diggle *et al.*, 2003).

Im Folgendem sollte auch der Gehalt an PQS in Abhängigkeit von LipAH bestimmt werden. Hierzu wurde aus $\Delta lipAH$ -Kulturen, welche einmal das Leervektorplasmid und einmal das *lipAH*-Expressionsplasmid enthielten, für 16 h nach Induktion kultiviert und anschließend die PQS-Moleküle aus dem Überstand extrahiert. Daraufhin folgte eine dünnschichtchromatographische Auftrennung und die Detektion der PQS-Moleküle unter UV-Licht (Abb. 3.23). Als Kontrolle diente dabei gereinigtes PQS.

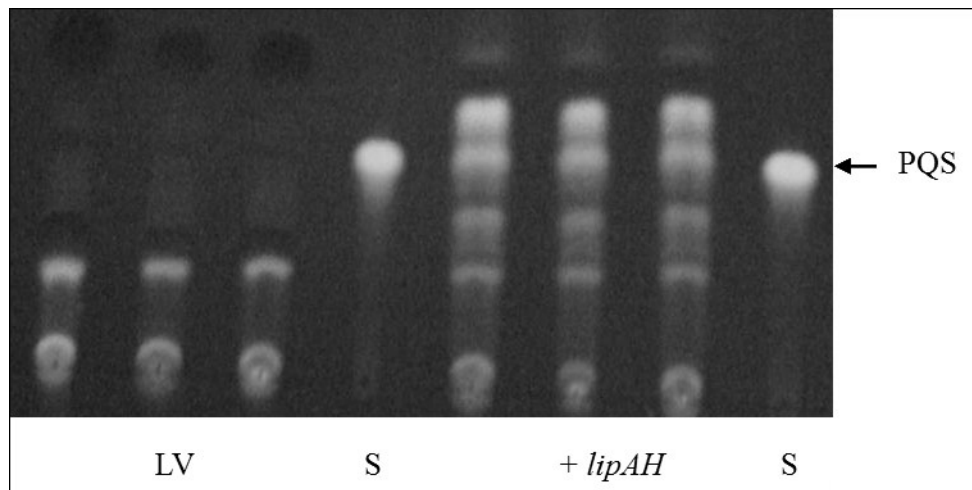


Abb. 3.23: Dünnschichtchromographischer Nachweis von PQS. Aufgetragen wurden Ethylacetat-Extrakte von Kulturüberständen von *P. aeruginosa* PABST7.1, der entweder das Leervektorplasmid (LV) oder das *lipAH*-Expressionsplasmid (+*lipAH*) enthielt. Als Standard (S) wurde gereinigtes PQS aufgetragen. Die PQS-Moleküle wurden mittels UV-Licht auf der DC-Platte sichtbar gemacht.

Wie Abbildung 3.23 zeigt ist in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* PABST7.1 auf der Höhe des PQS-Standards kein Signal zu beobachten. Wird jedoch das *lipAH*-Operon exprimiert, ist ein PQS-Signal zu beobachten, zur genauen Identifizierung sind aber noch zusätzliche Analysen, wie z.B. Identifizierung durch Massenspektrometrie erforderlich. Die zusätzlichen Banden im Vergleich zum Standard und zum Δ *lipAH* Stamm entsprechen Vorstufen der PQS-Synthese wie z.B. Anthranilat oder HAA.

Die Lipase A besitzt nicht nur einen Einfluss auf die Transkription des Sigma-Faktors PvdS und der Rhamnolipid-Gene sondern auch auf die QS-Systeme von *P. aeruginosa*. Die Transkriptmengen der QS-Systeme unterscheiden sich je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der Lipase voneinander. Auch die Synthese von PQS ist von der Anwesenheit der Lipase abhängig.

3.10 Einfluss des ECF-Sigma -Faktors PvdS auf LipA

Der Sigma Faktor PvdS reguliert eine Vielzahl von Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa*. Die meisten dieser Virulenzfaktoren sind sekretierte Proteine so wie auch die Lipase LipA. Um einen möglichen Einfluss von PvdS auf die Synthese und Aktivität der Lipase A zu

untersuchen wurde eine Deletionsmutante des Gens *pvdS* konstruiert (Ochsner et al., 2002). Dieser $\Delta pvdS::Gm$ Stamm (folgend nur noch $\Delta pvdS$ genannt) ist aufgrund seiner Mutation nicht mehr in der Lage, Pyoverdine und andere *pvdS*-abhängige Virulenzfaktoren wie z.B. ToxA oder PrpL zu bilden (Ochsner et al., 2002).

3.10.1 Veränderte Lipaseaktivität in einem *P. aeruginosa* $\Delta pvdS$ Stamm

P. aeruginosa $\Delta pvdS$ Kulturen wurden in M9 Medium ohne Eisenzusatz (2.4.1) über Nacht bei 37 °C und 150 Upm bebrütet. Anschließend wurden die Kulturen mittels Zentrifugation geerntet und der Kulturüberstand von dem Zellen getrennt. Die Zellen wurden wieder in M9 Medium suspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen (Gesamtzellextrakt) und zusammen mit dem Kulturüberstand auf Lipaseaktivität hin untersucht (Abb. 3.24). Sowohl im GZE als auch im Kulturüberstand war die Lipaseaktivität in der $\Delta pvdS$ -Mutante deutlich verringert.

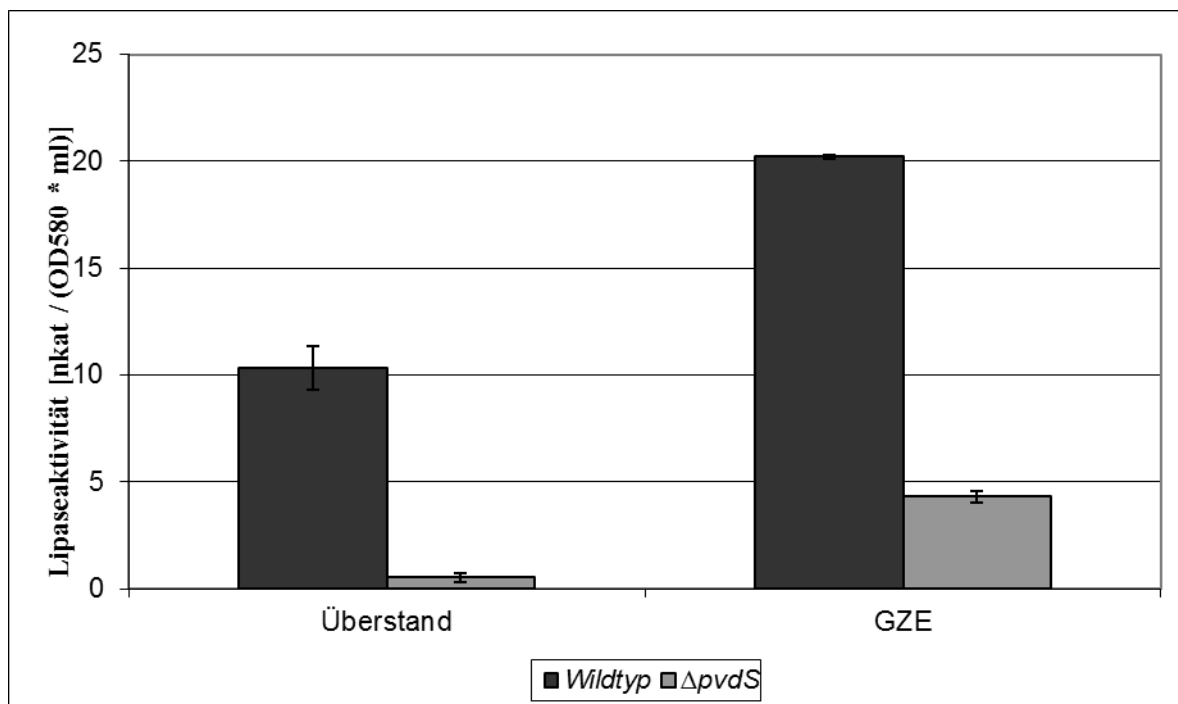


Abb. 3.24: Lipaseaktivität von *P. aeruginosa* Wildtyp und $\Delta pvdS$ -Mutante im Kulturüberstand und im Ganzzellextrakt. Die Kulturen wurden in Eisenmangel-Medium über Nacht bebrütet. Die Lipaseaktivität wurde mittels *p*NPP-Test bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Aufgrund der verminderten Lipase-Aktivität in der *ApvdS*-Mutante wurde die Transkriptmenge der Gene, *lipA* und *lipH* mittels RT-PCR bestimmt. Hierzu wurde die Gesamt mRNA sowohl aus dem Wildtyp als auch aus der *ApvdS*-Mutante zum gleichen Zeitpunkt wie bei der Lipaseaktivitätsmessung isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente in der folgenden RT-PCR als Template. Mittels Normierung auf das „Housekeeping“-Gen *rpoD* konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge von *lipA* in der *ApvdS*-Mutante um den Faktor 14 reduziert ist. Die Transkriptmenge von *lipH* hingegen ist nicht so stark reduziert und liegt bei einer Verringerung um den Faktor zwei (Abb. 3.25).

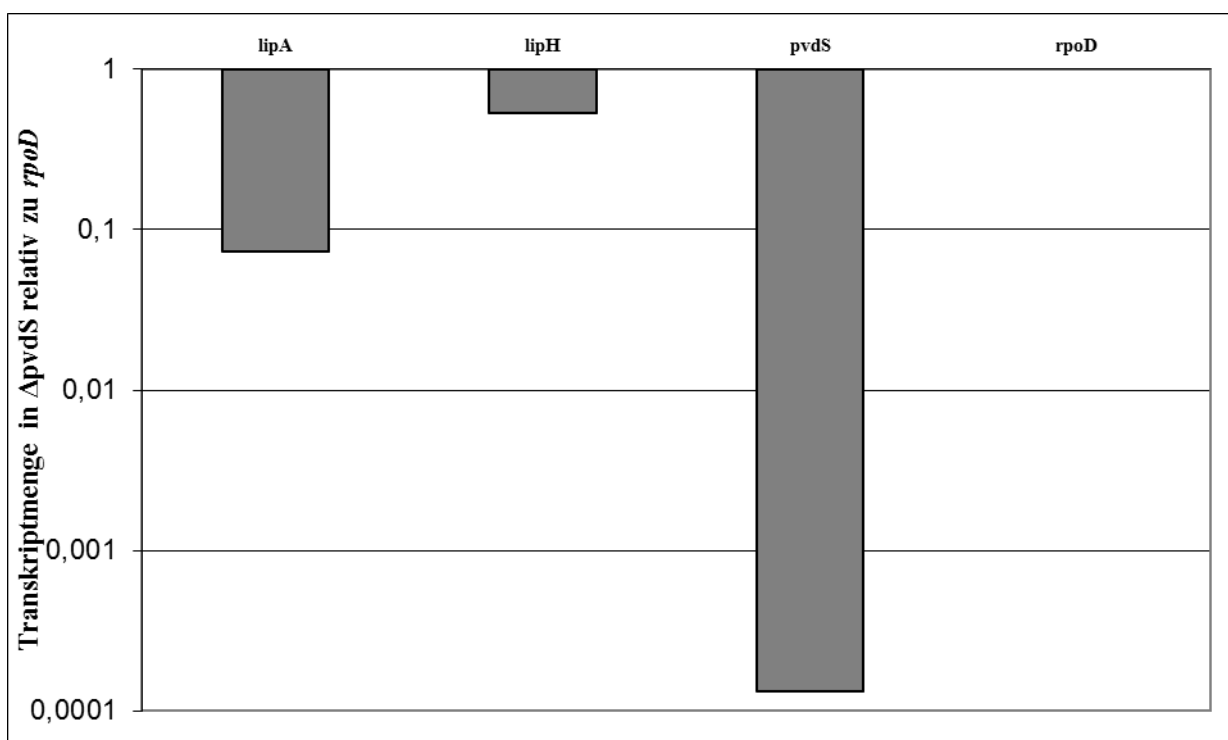


Abb. 3.25: Bestimmung der Transkriptmenge von *lipA* und *lipH* in einer *ApvdS*-Mutante relativ zum „House keeping“-Gen *rpoD*. Dargestellt ist die Zunahme/Abnahme an Transkript in einer *P. aeruginosa* *ApvdS*-Mutante im Vergleich zum *P. aeruginosa* Wildtyp. Als endogene Kontrolle wurde der Sigmafaktor *rpoD* verwendet. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus vier unabhängigen Messungen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Im Anschluss an die Transkript-Messungen wurde geschaut ob die Verringerung des spezifischen *lipA*-Transkripts auch Konsequenzen für die Proteinmenge von LipA hat. Hierzu wurden Western-Blot Analysen vom *P. aeruginosa* Wildtyp und der *ApvdS*-Mutante durchgeführt (Abb. 3.26). Die Stämme wurden wiederum für 16 h bei 37°C bebrütet und anschließend geerntet. Das Zellpellet wurde zu einem Genzzellextrakt verarbeitet und für die

SDS-PAGE und anschließenden Western-Blot mit gegen LipA gerichteten Antikörpern verwendet.

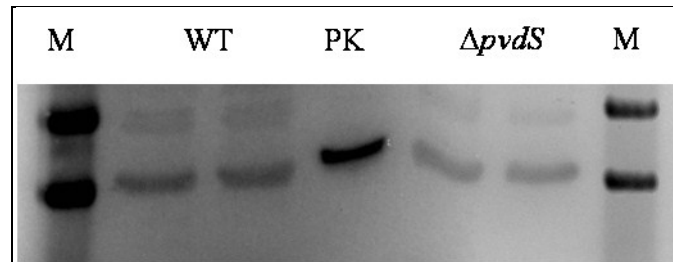


Abb. 3.26: Immunologischer Nachweis von LipA in GZE von *P. aeruginosa* Wildtyp und $\Delta pvdS$ -Mutante. Dargestellt ist ein Western-Blot von Ganzzellextrakten, die vorher zur Vergleichbarkeit auf gleiche Zelldichten ($OD_{580\text{ nm}}$ von 0,15) eingestellt wurden. Die Detektion erfolgte über einen gegen LipA gerichteten Antikörper. Als Positivkontrolle (PK) wurde gereinigte LipA verwendet. Jeweils links und rechts ist ein Größenstandard (M) mit aufgetragen. In der Abbildung werden nur die relevanten Teile des Western-Blots gezeigt.

Der Sigmafaktor PvdS reguliert die Transkription von *lipA*. Eine Deletion des Sigmafaktors PvdS führt in *P. aeruginosa* zu einer Verringerung der *lipA* Transkription und damit auch zu einer Verringerung der Lipaseaktivität. Die Verringerung der Transkription führt jedoch nicht zum völligen Fehlen von der Lipase wie anhand des Western-Blot gezeigt werden konnte.

3.10. Die Mutante *P. aeruginosa* $\Delta pvdS$ kann mit plasmidkodiertem *pvdS* komplementiert werden

Das Gen des Sigma-Faktors *pvdS* wurde mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pVLT33 kloniert. Das entstandene Plasmid pVLT-*pvdS* wurde mittels Elektroporation in die *P. aeruginosa* $\Delta pvdS$ -Mutante eingebracht. Vergleichende Kulturen der $\Delta pvdS$ -Mutante mit dem Leervektor bzw. mit dem mit pVLT-*pvdS* und dem *P. aeruginosa* Wildtyp wurden in M9-Medium ohne Eisenzusatz bis zu einer $OD_{580\text{ nm}}$ von 0,3 bei 37°C bebrütet und anschließend mit 0,4 mM IPTG versetzt. Nach 16 h Wachstum wurde sowohl die Färbung der Kulturen, wie auch die Menge an Pyoverdin und die Lipaseaktivität im Kulturüberstand überprüft. Wie Abb. 3.27 zeigt lassen sich durch die Expression von pVLT-*pvdS* in der $\Delta pvdS$ -Mutante sowohl der Pyoverdin-Phänotyp als auch die Lipaseaktivität im Kulturüberstand wiederherstellen.

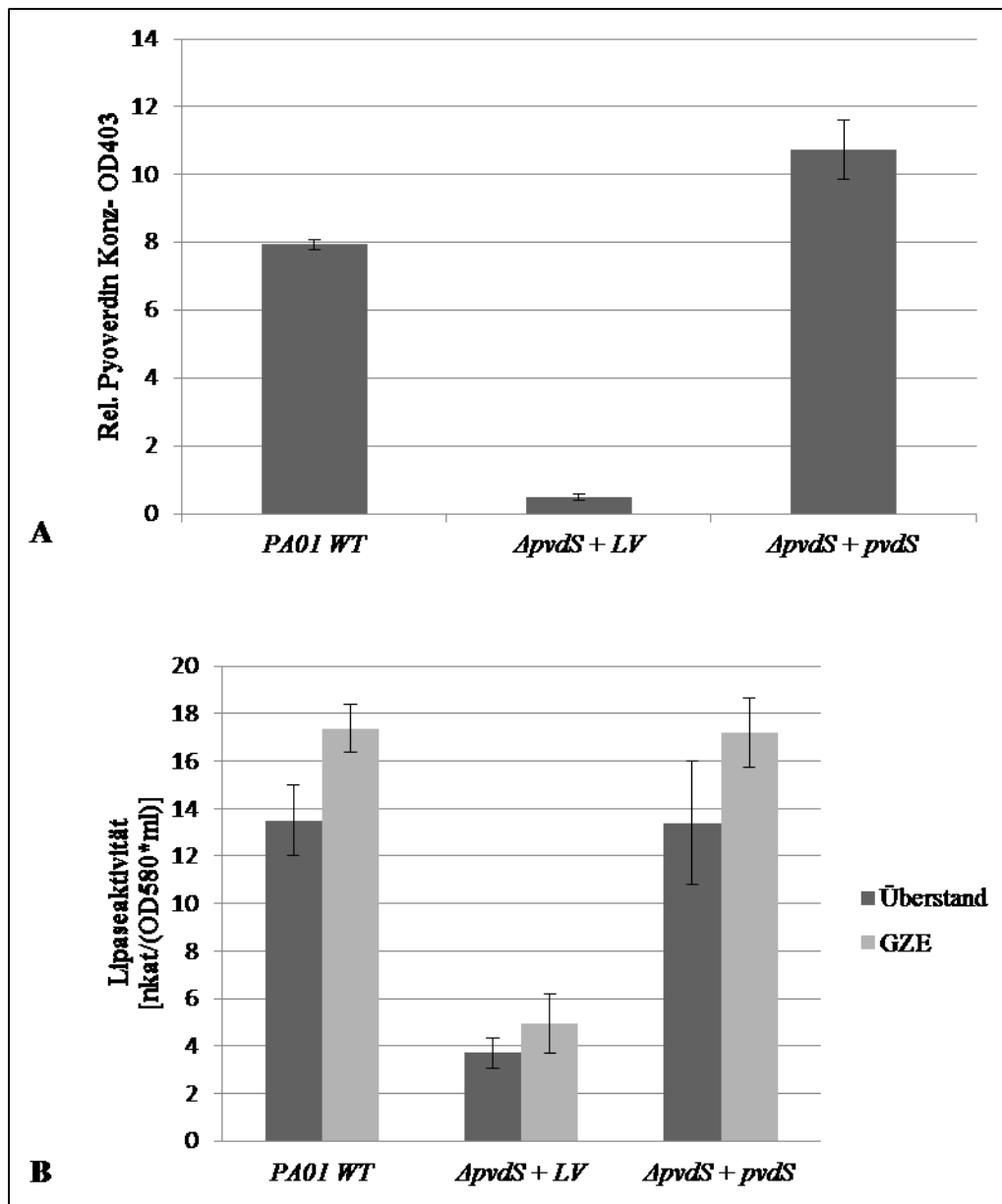


Abb. 3.27: Pyoverdinkonzentration und Lipaseaktivität in einer mit pVLT-*pvdS* komplementierten *P. aeruginosa* $\Delta pvdS$ -Mutante. Die Kulturen wurden in Eisenmangel-Medium bis zu einer $OD_{580nm} = 0,3$ bebrütet, anschließend durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert und nach weiteren 16 h wurde der Kulturüberstand vom Zellpellet getrennt. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und zu einem Ganzzellextrakt verarbeitet. Die Pyoverdin-Menge wurde nur im Kulturüberstand bestimmt, während die Lipaseaktivität sowohl im Überstand als auch im GZE gemessen wurde. Die Werte zeigen Messungen von vier unabhängigen Versuchen.

Durch die Plasmid-gestützte Expression des Sigma-Faktors PvdS in der $\Delta pvdS$ -Mutante lässt sich sowohl die Pyoverdin-Synthese als auch die Lipaseaktivität wiederherstellen. Dies zeigt, dass die verringerte Lipaseaktivität tatsächlich durch das Fehlen des Sigma-Faktors PvdS hervorgerufen wurde.

4. Diskussion

Pseudomonas putida KT2440 ist als Saprophyt ubiquitär verbreitet und besitzt somit eine hohe metabolische Vielseitigkeit. Genauso wie *Pseudomonas aeruginosa* gehört *P. putida* ebenfalls zu der γ -Subklasse der Proteobacteria (Palleroni, 1984). Das Genom von *P. putida* wurde im Jahr 2002 komplett sequenziert (Nelson *et al.*, 2002) und besitzt eine Größe von 6,18 Mbp und hat einen GC-Gehalt von 61,6 %. Obwohl das Genom zu 85 % homolog zu dem von *P. aeruginosa* ist (Nelson *et al.*, 2002), wurde *P. putida* als erstes Gram-negatives Bakterium als biologisch sicher eingestuft (Bagdasarian *et al.*, 1981; Federal Register, 1982). Sequenzanalysen zeigen keine Gene in *P. putida* auf, welche für Virulenzfaktoren wie z.B. das Exotoxin A, die Elastase oder die Phospholipase C kodieren. Weiterhin gibt es keine Gene für den Typ-III Sekretionsweg und das Operon, das für die Rhamnolipidproduktion verantwortlich ist, fehlt ebenfalls (Nelson *et al.*, 2002; Martins dos Santos *et al.*, 2004). Als G.R.A.S. (*generally regarded as safe*)-Organismus ist *P. putida* für die Mikrobiologie und Biotechnologie als heterologer Expressionswirt besonders geeignet und von großem Interesse (Ramos *et al.*, 1987; Gilbert *et al.*, 2003).

Das Vorgehen für eine heterologe Proteinexpression ist in den meisten Fällen gleich. Das Gen des gewünschten Proteins wird amplifiziert und in einen geeigneten Expressionsvektor unter Kontrolle eines gewünschten Promotors kloniert. Das entstandene Expressionsplasmid wird in den heterologen Expressionswirt eingebracht und das gewünschte Gen exprimiert. Je nachdem um welche Art Protein es sich dabei handelt, folgen mehr oder weniger komplexe Reinigungs- und/oder Rückfaltungsschritte, um an das aktive Protein zu gelangen. Eine Optimierung der Expression erfolgt dabei oft nur über die Regulierung von Nährstoffen, die Auswahl des Promotors oder, wie am Beispiel des Lactose-Operons, über die Konzentration des Induktors. Für industrielle Prozesse ist dabei meist nur eine einfache, kostengünstige und möglichst effektive Expression von Interesse und nicht die physiologischen Prozesse, die während der heterologen Genexpression sonst noch im Wirt passieren. Dabei kann das Wissen um die Vorgänge im Wirt dazu genutzt werden, die Expression des gewünschten Gens und damit die Ausbeute an Protein zu steigern. Weiterhin wäre es möglich, das Wissen zu nutzen, um mögliche Schwierigkeiten während der Expression zu umgehen oder zu lösen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, dass physiologisches Verhalten von *Pseudomonas* bei Expression einer Lipase zu untersuchen. Dies wurde anhand von phänotypischen

Betrachtungen und mit Proteomanalysen durchgeführt. Als zu exprimierende Lipase wurde die Lipase A aus *P. aeruginosa* ausgewählt. Die Lipase A (LipA) gehört zu den am besten beschriebenen Lipasen aus Bakterien und ist von großem biotechnologischem Interesse (Jaeger & Reetz, 1998; Jaeger & Eggert, 2002, Drepper et al., 2006). Die Lipase A sollte sowohl homolog in *P. aeruginosa* als auch heterolog in *P. putida* exprimiert werden.

Für die heterologe Expression von *lipA* und des dazugehörigen Foldase-Gens *lipH* wurde der Expressionsvektor pVLT33 (de Lorenzo *et al.*, 1993) verwendet und das *lipAH*-Operon unter Kontrolle des in *Pseudomonas* induzierbaren *tac* Promotors kloniert. Die Vektoren der pVLT-Reihe sind nur in geringer Kopienzahl in der Bakterienzelle vorhanden und führen im Zusammenspiel mit dem P_{tac} zu einer mäßigen Expressionsrate. Dies wurde so gewählt, um die Effekte der Lipaseexpression von anderen Stressbedingungen separieren zu können. Die Expression wurde unter Standardbedingungen durchgeführt und wurde anhand von SDS-PAGE (Abb. 3.1) und Lipaseaktivitäts-Tests (Abb. 3.2) auf ihren Erfolg hin überprüft. Auf einer SDS-PAGE Analyse der Expressionskulturen zeigten sich keine deutlichen Proteinbanden auf Höhe von LipA (29 kDa) bzw. LipH (37 kDa), was durch die moderate Expression und die daraus resultierenden geringen Proteinmengen zu erklären ist. Jedoch ist eine deutliche Veränderung des Proteinmusters in den *lipAH*-exprimierenden Kulturen festzustellen. Dabei waren sowohl Proteinbanden zu erkennen, die während der Expression des *lipAH*-Operons verstärkt auftraten als auch welche, die geringer vertreten waren. Dies zeigt eine deutliche Veränderung des Proteoms von *P. putida* auf die heterologe Expression der Lipase. Obwohl keine zusätzlichen Lipase und Foldase Proteinbanden auf dem Gel zu sehen waren, zeigte der immunologische Nachweis der Lipase und Foldase (Abb. 3.3), dass die beiden Gene exprimiert und die mRNA translatiert wurden. Aufgrund der positiven Aktivitäts-Tests konnte gezeigt werden, dass die Lipase von der Foldase in ihre aktive Konformation überführt werden kann (Rosenau *et al.*, 2004). Weiterhin zeigen die Aktivitäts-Tests auch, dass die aktive Lipase wie erwartet nur im Ganzzellextrakt von *P. putida* zu finden ist und nicht im Kulturüberstand, da die Sekretion der Lipase ins extrazelluläre Milieu aufgrund des Fehlen eines funktionellen Typ-II Sekretionssystems in *P. putida* nicht stattfinden kann. Die Sekretion von enzymatisch aktiver Lipase ist ein höchst komplexer Prozess, an dem im homologem Wirt *P. aeruginosa* 30 akzessorische Proteine beteiligt sind (Rosenau & Jaeger, 2000; Rosenau & Jaeger, 2004). Die Lipase kann in *P. putida* aufgrund ihrer N-terminalen Signalsequenz zwar wahrscheinlich über den Sec-Apparat in das

Periplasma transportiert werden, dort aber fehlt der entsprechende Typ-II Sekretion Proteinkomplex, welcher im *P. putida*-Genom nur unvollständig kodiert zu finden ist (Groot *et al.*, 1999; Sundkvist, 2001). Eine Sekretion über die äußere Membran ist daher nicht möglich und die Lipase akkumuliert im Periplasma. Dass die Lipase im Periplasma von der Foldase korrekt gefaltet werden kann, zeigte die detektierte Lipaseaktivität im Ganzzelleextrakt.

Die heterologe Proteinexpression kann in Bakterien zu unterschiedlichen Phänotypen führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das Wuchsverhalten von *P. putida* bei heterologer Expression der Lipase A aus *P. aeruginosa* betrachtet (Abb. 3.5). Dabei zeigte sich, dass jene Kulturen, welche das *lipAH*-Operon exprimierten, ab dem Zeitpunkt der Induktion durch IPTG Zugabe eine deutlich langsamere Teilungsrate aufwiesen. Die Zusatzbelastung der Bakterienzelle durch die heterologe Genexpression führt dabei auch zu einer deutlichen Verringerung der maximalen Zelldichte von *P. putida*. Dies kann durch den deutlich erhöhten Energieverbrauch durch die zusätzliche Proteinbiosynthese der Bakterienzelle erklärt werden. In dem hier beschriebenen Fall müssen zwei zusätzliche Proteine synthetisiert werden, welche normalerweise nicht in der Zelle vorhanden sind. Die Proteinbiosynthese ist ein sehr energieverbrauchender Prozess; Kulturen, die diese Zusatzaufgabe nicht bewerkstelligen müssen, haben daher einen Wuchsvorteil. Ein weiterer deutlicher Unterschied, zwischen den *lipAH*-Expressionskulturen und den entsprechenden Kulturen mit Leervektor konnte in der Färbung der Kulturüberstände beobachtet werden. Kulturen, welche die Lipase produzieren, zeigten über die Zeit einen Wechsel von klarem Weiß zu einem leuchtenden Grün-gelb (Abb. 3.6). Eine solche Veränderung der Färbung ist charakteristisch für das Vorhandensein von Siderophoren (Neilands *et al.*, 1981, Meyer, 2000; Meyer *et al.*, 2008). Siderophore werden von fluoreszierenden Pseudomonaden ins Medium sekretiert, um dort Eisen(III) zu komplexieren. Der Siderophor-Eisen-Komplex wird dann an der Bakterienzelle über spezifische Rezeptoren und Transporter ins Periplasma aufgenommen. Das komplexierte Eisen wird dort durch einen Reduktionsschritt vom Siderophor gelöst und das Eisen so für das Bakterium verfügbar gemacht (Braun, 1995; Postle, 1999; Schalk, 2008). Das Siderophor Pyoverdin besitzt einen Di-hydroxy-quinolin Chromophor, welcher, wenn er Eisen gebunden hat, zu der grün-gelben Farbe führt und für die Fluoreszenz unter UV-Licht verantwortlich ist. Diese Fluoreszenz ist auch der ausschlaggebende Grund für die Namensgebung der „fluoreszierenden“ Pseudomonaden. In den Kulturüberständen der *lipAH*-exprimierenden *P.*

putida Kulturen konnte das Siderophor Pyoverdin nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Pyoverdin ist das Siderophor in fluoreszierenden Pseudomonaden mit der höchsten Eisenaffinität (Wolz *et al.*, 1994; Matthijs *et al.*, 2009) und wird als das Haupt-Siderophor betrachtet (Yeterian *et al.*, 2009). In der Regel werden Pyoverdine nur unter Eisenlimitierenden Bedingungen produziert (Meyer & Abdallah, 1987), da sie von dem „*iron starvation*“ (IS)-Sigma-Faktor PvdS reguliert werden (Ravel & Cornelis, 2003, Shirley & Lamont, 2009) und dieser wiederum durch den Eisenaufnahme regulator Fur („*Ferric uptake regulator*“) kontrolliert wird (Leoni *et al.*, 1996; Beare *et al.*, 2003; Tiburzi *et al.*, 2008). Dennoch kann in Lipase exprimierenden Kulturen das Pyoverdin nachgewiesen werden. Dass die Kulturen, welche das Leervektorplasmid pVLT33 enthielten, keine Pyoverdine produzieren, zeigt, dass die Pyoverdinproduktion eine Konsequenz der heterologen Genexpression sein muss. Die Eisenkonzentration im verwendeten M9-Medium liegt mit 35 μM über der für Bakterien benötigten Konzentration von 0,3 μM – 1,8 μM (Neilands, 1981; Vasil & Ochsner, 1999) und kann daher nicht ausschlaggebend für die Produktion des Siderophors sein. Die Veränderung in der Pyoverdin-Produktion in *P. putida* ist daher eine direkte Folge der *lipAH*-Expression.

Die Expression des Lipase-Foldase-Operons führt nicht nur zu Veränderungen in den Phänotypen von *P. putida*, sondern auch zu Unterschieden im zellulären Proteom. Um die bereits gefundenen Veränderungen genauer zu charakterisieren und mögliche weitere zu finden wurde das Proteom von *P. putida* analysiert.

Die Proteome von *P. putida* Kulturen, welche entweder das Leervektor- oder aber das *lipAH*-Expressionsplasmid pVLT33-*lipAH* trugen, unterschieden sich in ca. 60 Fällen der detektierbaren Proteinspots signifikant voneinander (Abb. 3.8; 3.9). Um einen besseren Überblick zu bekommen und um zu sehen, ob es Auffälligkeiten in einem bestimmten Bereich des Stoffwechsels gab, erfolgte eine Einteilung der identifizierten Proteine in verschiedene physiologische Gruppen. Diese Einteilung zeigt, dass die meisten Veränderungen während der Lipaseexpression bei den Membranproteinen zu finden sind, gefolgt von Proteinen, welche für die Abwehr von oxidativem Stress in *P. putida* benötigt werden. Während sich bei den Membranproteinen jeweils Proteine finden lassen, welche unter *lipAH*-exprimierenden Bedingungen sowohl hoch- als auch herunter- reguliert sind, zeigen alle Proteine der oxidativen Stressantwort ein einheitlich erhöhtes Expressionsprofil während der *lipAH*-Expression. Das am deutlichsten veränderte Protein mit einer Zunahme um das ca. 20 fache während der Lipaseexpression ist das äußere- Membran Protein FpvA.

Das „*outer membrane ferripyoverdine receptor*“ Protein ist ein Rezeptor für mit Eisen beladenes Pyoverdin (Rédly & Poole, 2005; Cornelis, 2008; Cornelis, 2010) und sorgt über einen bis heute noch nicht ganz geklärten Mechanismus für dessen Aufnahme ins Periplasma (Imperi *et al.*, 2009). Gleichzeitig wird durch das Binden von Pyoverdin-Fe(III) an den Rezeptor eine Signalkaskade eingeleitet, welche dazu führt, dass die Transkription des IS-Sigma faktor gens *pvdS* aktiviert wird, welcher dann die Transkription von PvdS-kontrollierten Genen, unter anderem diejenige für die Pyoverdine, ermöglicht (Lamont *et al.*, 2002; Rédly & Poole, 2005; Cornelis, 2008). Durch eine erhöhte Produktion von Pyoverdin kommt es auch häufiger zum Binden von Pyoverdin-Fe(III) an den FpvA-Rezeptor. Dies wiederum führt zu einer verstärkten Transkription von *pvdS* selbst und PvdS-regulierten Genen. Es handelt sich dabei um eine Autoreglulation. Eine erhöhte Eisenaufnahme durch Siderophore, welche sich wie beschrieben eigenständig verstärkt, und die dadurch kontinuierlich steigende Eisenkonzentration in der Bakterienzelle, kann Aufgrund der „Fenton Reaktion“ zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; „*reactive oxygen species*“) führen (Vinckx, *et al.*, 2008). Dabei entsteht aus Eisen und Wasserstoffperoxid das gefährliche Hydroxyd-Radikal ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$; $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{OOH}\cdot + \text{H}^+$), welches die Proteine, Lipide und DNA der Zelle zerstören kann und deshalb toxisch auf das Bakterium wirkt (Fridovich, 1978). Das Entstehen dieser Radikale wird auch als oxidativer Stress bezeichnet. Gegen diesen Stress, im besonderem gegen freie Radikale, haben die meisten Organismen ein sehr ausgefeiltes Abwehrsystem entwickelt. Zu diesem Abwehrsystem gehören in *P. putida* auch die in *lipAH*-exprimierenden Kulturen hoch regulierten Proteine AhpC, Tpx und PP1084. Die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase Untereinheit C (AhpC) z.B. dient dabei als Radikalfänger für endogenes H_2O_2 (Seaver and Imlay, 2001) und ist eine direkte Antwort auf oxidativen Stress (Storz *et al.*, 1990; Mongkolsuk *et al.*, 2000; Ochsner *et al.*, 2000). Die im Proteom gefundenen Proteine der oxidativen Stressantwort stehen daher wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit der durch die Lipase bewirkte Eisenaufnahme und dem daraus resultierenden Stress.

Weitere Veränderungen im Proteom der *lipAH* exprimierenden Kulturen deuten auf weitere Regulationsereignisse auf Ebene der Transkription (Transkriptionsregulatoren, Zweikomponenten Systeme, Kinasen) hin. Die größte Veränderung des Proteoms von *P. putida*, durch die heterologe Expression der Lipase A aus *P. aeruginosa* ist im Zusammenhang mit einem verändertem Eisenstoffwechsel aufgrund von Siderophor-Produktion zu sehen.

Die heterologe Lipaseexpression führt zu einer Steigerung der Pyoverdin-Produktion in *P. putida* und infolgedessen zu einer erhöhten Eisenaufnahme in die Bakterienzelle. Dies kann zur Bildung von gefährlichen, reaktiven Sauerstoffspezies führen. Diesen ROS wird durch eine erhöhte Expression von Proteinen der oxidativen Stressantwort von *P. putida* begegnet.

Die Reaktion von *P. putida* auf die heterologe Lipaseexpression kann auf zwei Ereignisse zurückgeführt werden. Entweder ist die Erhöhung der Pyoverdin-Konzentration eine Antwort auf die Expression der heterologen Lipase aus *P. aeruginosa*, oder aber eine direkte Antwort auf die lipolytische Aktivität der Lipase in der Bakterienzelle.

Bei Betrachtungen des *P. putida* Genoms finden sich drei Genom Abschnitte, welche für die Pyoverdin regulierte Eisenaufnahme, -transport und -regulation verantwortlich sind (Abb. 3.11). In einem dieser drei Genabschnitte befinden sich die Gene für die nicht-Ribosomal-synthetisierten-Peptide (*pp4219* - *pp4223*), welche für die Struktur der Pyoverdine verantwortlich sind. Im gleichen Genabschnitt befinden sich auch die Rezeptorgene *fpvA* und *pvdE* (*pp4216* - *pp4217*), welche für die Pyoverdin-Sekretion und die Aufnahme des eisenbeladenen Pyoverdins benötigt werden. Genau zwischen diesen beiden Gruppen von Genen befindet sich noch das Gen *pp4218*, welches aufgrund von Sequenzvergleichen als putative Lipase/Esterase annotiert wurde (Pseudomonas.com). Matthijs *et al.* (2009) konnten zeigen, dass dieses Gen essentiell für die Pyoverdin-Produktion ist. Eine Transposoninsertion in *pp4218* führt selbst unter Eisenmangelbedingungen dazu, dass kein Pyoverdin mehr gebildet wird. Bei der Betrachtung von mehreren verschiedenen Genomen von fluoreszierenden Pseudomonaden wird deutlich, dass mehrere dieser Genome in unmittelbarer Nähe des Pyoverdin-Genclusters ein Gen enthalten, welches für eine Lipase/Esterase kodieren. So können z.B. in *Pseudomonas entomophila* L48, *Pseudomonas aeruginosa* PA7 oder *Pseudomonas putida* W619 Gene gefunden werden, die für eine Lipase oder Esterase kodieren (Pseudomonas.com). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Veränderungen der *lipAH*-exprimierenden Kulturen keine reine Antwort auf den Expressionsstress durch heterologe Genexpression ist, sondern tatsächlich eine Konsequenz aus der Aktivität der Lipase A aus *P. aeruginosa* darstellt.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde das Gen der annotierten Lipase *pp4218* ebenfalls in den Expressionsvektor pVLT33 unter Kontrolle von P_{tac} kloniert und in *P. putida* homolog exprimiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand der Expressionskulturen auf das Vorhandensein von Pyoverdin getestet (Abb. 3.12.). Tatsächlich führt auch die Expression

von *pp4218* zu einer verstärkten Pyoverdinin Produktion in *P. putida*. Dass trotz erfolgreicher Expression von *pp4218*, wie durch Transkriptanalysen gezeigt, keine Lipase- oder Esteraseaktivität gegen Standardsubstrate im Enzymtest zu beobachten war (Abb. 3.13), deutet entweder auf eine sehr spezifische oder sehr geringe Aktivität von PP4218 hin.

Genau wie bei der Expression von *lipAH* handelt es sich bei der Expression von *pp4218* unter dem *tac*-Promotor um eine moderate Expression. Dies bedeutet, dass das Protein nur in moderaten Mengen synthetisiert wird. Weiterhin können Lipasen unterschiedlich große Substratspektren besitzen und Fettsäureester mit unterschiedlichen Kettenlängen akzeptieren. So zeigt z.B. die Lipase C aus *P. aeruginosa* eine Akzeptanz der Kettenlänge von C₄ – C₁₈, während LipA eine deutliche Präferenz für die Substrate mit Kettenlängen von C₁₂, C₁₄ und C₁₆ aufweist (Hausmann, 2009). Für eine Lipase, welche eine sehr spezifische Funktion aufweist, wäre eine hohe Substratspezifität die wahrscheinlichste Erklärung, so dass nur sehr wenige Substrate/Kettenlängen akzeptiert werden. Die Pyoverdinin-Synthese ist ein sehr komplexer und energieaufwendiger Prozess, an dem viele Proteine beteiligt sind. Für die Bakterienzelle wäre es daher sehr ungünstig, wenn die Pyoverdinin-Produktion ohne triftigen Grund, also wenn genügend Eisen vorhanden ist, angeschaltet würde. Daher ist es von großem Vorteil für das Bakterium, das Pyoverdinin nur zu genau dem Zeitpunkt, wo es auch benötigt wird, nämlich unter Eisenmangel-Bedingungen, zu synthetisieren. Als Regulator könnte ein Lipase-Substrat dienen, welches nur unter genau diesen bestimmten Bedingungen vorhanden ist und auch nur dann umgesetzt werden kann.

Zur genaueren Charakterisierung von PP4218 wäre es nötig, das Protein in größerem Maßstab zu exprimieren und zu reinigen. Dies kann Bestandteil weiterer Arbeiten werden.

Sowohl die Expression von *lipA* als auch die von *pp4218* führten in *P. putida* zu einer erhöhten Pyoverdinkonzentration im extrazellulären Milieu. Das Protein PP4218 wurde anhand des konservierten His-Gly-Dipeptid und des konservierten Pentapeptids G-X₁-S-X₂-G (Ollis *et al.*, 1992) in die Gruppe der Lipase/Esterasen Familie eingeordnet. Vergleiche der Aminosäuresequenz mit anderen Proteinen ergaben eine 57%ige Identität mit einer annotierten Carboxylesterase Est2 aus *Pseudomonas aeruginosa* PA7, welche im Genom ebenfalls in der direkten Nähe eines Eisenrezeptors lokalisiert ist. Diese Carboxylesterase wurde aber ebenfalls nur anhand von Sequenzvergleichen als solche annotiert. Die größte Ähnlichkeit mit einem tatsächlich beschriebenen Protein, besitzt PP4218 mit der „Lipase

2“ aus *Moraxella* TA144 (Feller *et al.*, 1991) (31% Identität, 50% Ähnlichkeit). *Moraxella* TA144 stammt aus Seewasserproben der Antarktis und kann bei Temperaturen von 4°C kultiviert werden (Feller *et al.*, 1990). Die Lipase2 aus *Moraxella* TA144 ist ein extrazelluläres Protein, wobei allerdings auch Zell-assoziierte Lipaseaktivität gefunden wurde. Die maximale Lipaseaktivität konnte gegen *p*-Nitrophenyl-ester mit Butyrat als Seitenkette gefunden werden (Feller *et al.*, 1991).

Die annotierte Lipase PP4218 besitzt eine mögliche Signalsequenz (Bendtsen *et al.*, 2004; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP), dies könnte bedeuten, dass PP4218 über die innere Membran transportiert wird und seine physiologische Aufgabe im Periplasma ausübt. Eine weitere Sekretion über die äußere Membran kann hierdurch nicht ausgeschlossen werden. Die genaue Lokalisierung müsste experimentell analysiert werden, sofern dies für weitere Arbeiten interessant sein könnte.

Der Sequenzvergleich von PP4218 und LipA ergab eine geringe Identität von 25% und eine Ähnlichkeit von 35% (Abb. 3.14). Die geringe Ähnlichkeit der beiden Lipasen (LipA & PP4218) kann ein Grund für unterschiedliche Substratspektren im Enzymtest sein. Dass die Substratspektren sich an einem noch nicht identifiziertem Substrat/Bereich überlappen müssten, kann nicht ausgeschlossen werden und ist sogar anzunehmen, da beide Lipasen zu ein und demselben Phänotypen, zur Pyoverdin-Überproduktion, führen. Die spezifische Wirkung der Lipase auf die Pyoverdin-Produktion lässt vermuten, dass die Regulation der Lipase eng mit der Eisenkonzentration zusammenhängt. In *P. putida* ist die Transkription von *pp4218* abhängig vom IS-Sigma-Faktor PvdS und damit Eisen-reguliert, daher könnte auch in *P. aeruginosa* eine indirekte Regulation der Lipase über die Eisenkonzentration stattfinden.

Pyoverdinsynthese, -transport und -regulation wurden bisher am besten beschrieben in *P. aeruginosa* (Imperi *et al.*, 2009). Beinahe alle Gene, welche für die Synthese und Aufnahme von Pyoverdin benötigt werden, liegen in einem einzigem Gencluster zusammen (Ochsner *et al.*, 2002). Anders als in *P. putida* kann in dem entsprechenden Gencluster jedoch kein lipolytisch aktives Protein gefunden werden. *P. aeruginosa* besitzt jedoch eine Vielzahl lipolytisch aktiver Proteine, wie z.B. die Lipase A, Lipase C oder Esterase A. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der lipolytischen Aktivität, im besonderem den der Lipase A, auf die Physiologie von *P. aeruginosa* zu untersuchen.

Bei Analyse einer *P. aeruginosa* *AlipAH*-Mutante konnte dann auch tatsächlich gezeigt werden (3.15, 3.16), dass diese Kulturen wie erwartet kein Pyoverdin produzieren. Um jedoch noch zwischen dem Lipase A und dem Lipase C Defekt unterscheiden zu können, waren

weitere Analysen notwendig. Sowohl LipA als auch LipC benötigt die Anwesenheit der Foldase H um in ihre aktive Konformation gebracht zu werden (Hausmann, 2009), da in einer *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ -Mutante die Foldase H fehlt, kann LipC keine lipolytische aktive Konformation erreichen. In einem weiteren *P. aeruginosa* Stamm, wurde zusätzlich zu *lipA* und *lipH* auch das *lipC* Gen deletiert. In diesem Stamm wurde daraufhin, separat voneinander, einmal das *lipAH*-Operon und einmal das artifizielle *lipCH*-Operon von einem Plasmid exprimiert und anschließend die Färbung der Kulturen beobachtet. Nur die Kulturen, welche das *lipAH*-Operon exprimierten, waren in der Lage, Pyoverdin zu produzieren. Kulturen welche das *lipCH*-Operon exprimierten, bildeten hingegen kein Pyoverdin. Dies zeigt, dass die Aktivität von LipA für die Produktion von Pyoverdin benötigt wird, die Aktivität von LipC jedoch nicht.

Die Quantifizierung von Pyoverdin in den Kulturüberständen der *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ Kulturen mit den Plasmiden pVLT33 und pVLT-*lipAH* ergab einen signifikanten Unterschied in den Konzentrationen (Abb. 3.16). Analog zu *P. putida* steigt die Pyoverdin Konzentration in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* mit Anwesenheit der Lipase A deutlich an, so dass auch hier ein Zusammenhang zwischen der lipolytischen Aktivität der Lipase und den Pyoverdinen zu postulieren ist. Wodurch dieser Unterschied zu Stande kommt, ob es sich dabei um einen regulatorischen Effekt oder eine Beteiligung der Lipase an der Pyoverdin-Synthese handelt wurde im Weiteren untersucht.

Die Pyoverdinkonzentration in *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ ist stark reduziert, erreicht aber nicht einen so geringen Wert wie die Pyoverdin-Konzentration in *P. putida* ohne zusätzliche Lipaseexpression. Dies könnte auf das deutlich vielfältigere lipolytische System von *P. aeruginosa* zurückzuführen sein. Die eigentliche Aufgabe der Lipase könnte von einem anderen Protein mit lipolytischer Aktivität und überlappendem Substratspektrum übernommen werden, so dass die Pyoverdin Synthese nicht gänzlich zum Erliegen kommt. Anders als in *P. putida* konnte diesmal auch eine Veränderung im Pyocyanin, einem zweitem Siderophor in *P. aeruginosa*, festgestellt werden. Die *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ -Mutante zeigt eine deutlich höhere Konzentration an Pyocyanin als die Mutante mit *lipAH*-Expression (Abb. 3.17). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine direkte Antwort auf das Fehlen des Pyoverdins. Pyocyanin scheint hier dazu zu führen, dass der Eisenbedarf der Bakterienzelle auch mit verringerter Pyoverdinkonzentration gedeckt wird. Die beiden Siderophore besitzen die gleichen Funktionen, werden aber vom Organismus verschieden reguliert, so dass beim Ausfall eines Siderophors eine Eisenaufnahme weiterhin erfolgen kann. Das Pyoverdin wird jedoch bevorzugt gebildet, da es über eine deutlich höhere Eisenaffinität als das Pyocyanin

verfügt (Albrecht-Gary *et al.*, 1994) und zusätzlich auch als Signalmolekül für viele Virulenz-assoziierte Enzyme (PrpL, ToxA, AprA) benötigt wird (Imperi *et al.*, 2009).

Siderophore und die Lipase A haben gemein, dass sie ins extrazelluläre Milieu von *P. aeruginosa* sekretiert werden (Abb. 4.1). Die Lipase wird zunächst über den Sec-Apparat durch die Cytoplasmamembran transportiert und anschließend per Typ-II Sekretion durch die äußere Membran (Rosenau & Jaeger, 2000; Rosenau & Jaeger, 2004). Der Mechanismus der Pyoverdinesekretion ist bis heute nicht genau entschlüsselt (Imperi *et al.*, 2009), es wird aber vermutet, dass die Effluxpumpe MexAB-OprM, welche auch am Transport der „Quorum sensing“-Signalmoleküle beteiligt ist, an der Sekretion beteiligt ist (Poole *et al.*, 1993). Ein Kandidat für den Transport von Pyoverdin vom Cytoplasma ins Periplasma ist der Transporter PvdE in der inneren Membran, welcher als für die Pyoverdin Produktion essentiell beschrieben wurde (Mc Morran *et al.*, 1996; Imperi *et al.*, 2009). Ohne diesen ABC Transporter PvdE kann die Vorstufe von Pyoverdin nicht ins Periplasma gelangen, dort aber findet die Reifung des Pyoverdins statt, unter anderem die Formation des Chromophors, der für die Bindung des Eisens notwendig ist (Yeterian *et al.*, 2010).

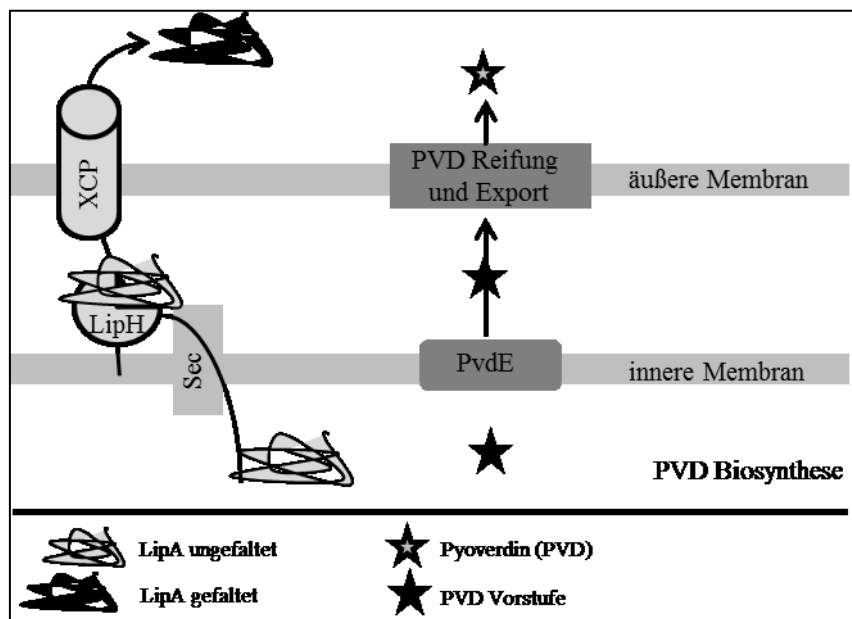


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Sekretion der Lipase A und des Pyoverdins. Die Lipase A wird mittels Sec-Apparat (Sec) und Typ-II Sekretionsmechanismus (Xcp) ins extrazelluläre Milieu sekretiert. Das Pyoverdin wird über den Transporter PvdE über die innere Membran transportiert und nach der Reifung ins extrazelluläre Milieu. Der genaue Sekretionsmechanismus des Pyoverdin ist bisher nicht bekannt.

Bei einer Analyse aller extrazellulären Proteine (Sekretom) von *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ im Vergleich zum komplementiertem Stamm (+pVLT-*lipAH*) finden sich deutliche Unterschiede (Abb. 3.19). Beispielsweise findet man die Protease IV (PrpL) nur in Kulturüberständen von

lipAH-exprimierenden Kulturen. Der Virulenzfaktor PrpL ist eine Protease, die direkt unter der Kontrolle des IS-Sigma Faktor PvdS steht (Wilderman *et al.*, 2001; Tiburzi *et al.*, 2008), welcher wiederum der Hauptregulator der Pyoverdin-Synthese ist (Lamont *et al.*, 2002; R  dley & Poole, 2005). Das Fehlen dieses PvdS-regulierten Proteins in der *AlipAH*-Mutante zeigt zum ersten Mal einen indirekten Zusammenhang zwischen der Lipase und den Pyoverdinen und lässt vermuten, dass die Einflüsse der Lipase auf die Pyoverdine auf Transkriptionsebene zu suchen sind und nicht oder nur bedingt bei der Reifung oder Transport der Pyoverdine.

Der Sigma-Faktor PvdS reguliert die Transkription von mindestens 26 Genen bzw. Operons in *P. aeruginosa* (Tiburzi *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass PvdS an einige *pvd*-Promotoren bindet, an denen in der -35 Region eine so genannte „IS-Box“ ausgewiesen ist. Diese IS-Box ist wichtig für die ordnungsgemäße Funktion und spezifische Erkennung des σ^{PvdS} , welcher die Initiation der Transkription bewirkt (Wilson & Lamont, 2000; Wilson *et al.*, 2001) (Abb. 4.2). Alle Promotoren, von denen bekannt ist, dass sie σ^{PvdS} reguliert sind, enthalten die IS-Box Sequenz, zusammengesetzt aus G/C G/C TAAAT T/A CG (Venturi, 2004). Unter anderem besitzen die Gene *pvdD*, *pvdE* und *prpL* eine solche IS-Box (Ochsner *et al.*, 2002) und standen bei Transkriptionsanalysen stellvertretend für σ^{PvdS} regulierte Gene.   berpr  ft man die Transkription dieser Gene in *P. aeruginosa AlipAH*, stellt man fest, dass bei der Expression des *lipAH* Operons sowohl die Transkriptmenge von *pvdS*, als auch die von PvdS regulierten Genen ansteigt (*pvdD*, *pvdE*, *prpL*) (Abb. 3.20). Somit kann hier erstmalig ein direkter Zusammenhang zwischen der Lipase und dem Sigma Faktor PvdS hergestellt werden.

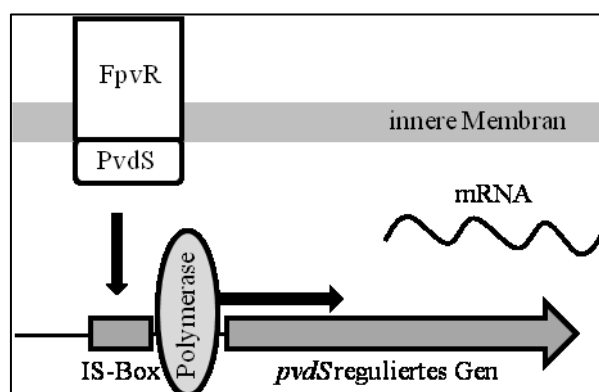


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der PvdS-abhängigen Genregulation. Der Sigmafaktor PvdS bindet an die so genannte „Iron starvation“ Box (IS-Box) und gibt so die Transkription der PvdS regulierten Gene frei. PvdS: Sigmafaktor PvdS; FpvR: Anti-Sigmafaktor FpvR.

Die bisherigen Betrachtungen zeigen deutlich, dass die Lipase an der Pyoverdin Produktion beteiligt ist und einen regulatorischen Effekt auf *pvdS* besitzt. Die meisten Gene, welche für die Pyoverdin-Synthese oder –Transport benötigt werden, stehen unter der direkten Kontrolle des Sigma Faktors PvdS. Untersucht man die Gene *lipA* und *lipC* in *P. aeruginosa* auf das Vorhandensein einer IS-Box, welche für PvdS-regulierte Gene charakteristisch ist, ist eine solche vor den Lipasegenen nicht zu finden. PvdS scheint somit die Expression der Lipasegene nicht direkt zu kontrollieren. In früheren Untersuchungen zur Lipase A konnte gezeigt werden, dass die Expression der Lipase von σ^{54} (RpoN) reguliert wird (Rosenau & Jaeger, 2000) und zudem auch noch von dem Zweikomponentensystem LipQ/LipR (auch CbrA/CbrB) abhängt. Die Sensorkinase LipQ stellt dabei die Phosphorylierungs-Komponente dar und überträgt eine Phosphatgruppe auf das LipR. LipR-P bindet daraufhin an eine „upstream activating sequence“ (UAS) und gibt dadurch die σ^{54} -abhängige Transkription frei (Rosenau & Jaeger, 2000; Krzeslak *et al.*, 2007).

Demgegenüber wurde bei der Untersuchung von *P. aeruginosa* $\Delta pvdS$ jedoch festgestellt, dass die Lipaseaktivität sowohl im Kulturüberstand als auch im Ganzzellextrakt sehr deutlich verringert ist (Abb. 3.24). Über Immunodetektion wurde indes gezeigt, dass die Lipase in *P. aeruginosa* $\Delta pvdS$ immer noch im Ganzzellextrakt zu finden ist (Abb. 3.26), so dass die verringerte Lipaseaktivität nicht nur auf eine stark verringerte Lipaseproduktion zurück zu führen ist. Transkripanalysen mittels RT-PCR zeigten, dass in der $\Delta pvdS$ -Mutante die Transkription von *lipA* um den Faktor 14 gegenüber dem Wildtyp verringert ist, trotz fehlender Konsensussequenz zum Binden von PvdS. Die Transkription der Gene *cbrA* und *cbrB* waren jedoch nicht beeinflusst und damit PvdS unabhängig. Die Komplementation der $\Delta pvdS$ -Mutante durch die Expression von *pvdS* in *trans* (pVLT-*pvdS*) führte wieder zur Lipaseaktivität und Pyoverdinkonzentration wie im *P. aeruginosa* Wildtyp (Abb. 3.27).

Dies zeigt, dass die Transkription der Lipase neben CbrA/CbrB auch noch von anderen Faktoren beeinflusst werden kann. So könnte es neben CbrB ein weiteres DNA-Bindeprotein geben, welches die Transkription von *lipA* ermöglicht, seinerseits aber von PvdS abhängig ist.

P. aeruginosa besitzt eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die für seine Pathogenität verantwortlich sind. Die meisten dieser Virulenzfaktoren werden über das „Quorum sensing“, ein Zelldichte abhängiges Zell-Zell-Kommunikationssystem, reguliert. Seit den 90er Jahren ist das „Quorum-sensing“ (QS) mittels Signalmolekülen als weit verbreitetes Kommunikationssystem unter Gram-negativen Bakterien anerkannt (Fuqua *et al.*, 1996; Swift

et al., 1999). Das QS-System von *P. aeruginosa* ist eines der bestuntersuchten, und dieser opportunistische Erreger verschiedener Infektionskrankheiten gilt als Modellorganismus für die Analyse komplexer QS-Netzwerke (Juhas *et al.*, 2005). Die Komplexität dieses QS-Systems wird bereits durch die hierarchische Anordnung der zwei separaten, jedoch interagierenden QS-Systeme (Las- und Rhl-System) und der Verwendung von verschiedenen Signalmolekülen (3-oxo-C12-HSL und C4-HSL) deutlich.

Die Produktion von Rhamnolipiden (RL) wird ebenfalls QS-abhängig reguliert. Die entsprechenden Strukturgene *rhlAB* sind mit den wichtigen QS-Genen *rhlR* und *rhlI* in einem Gencluster organisiert und werden durch das Rhl-System reguliert (Ochsner & Reiser, 1995). Rhamnolipide verbessern die Schwämbewegung von Bakterien, da sie aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften die Reibung zwischen Zellen und Oberflächen verringern (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003).

Gegenstand dieser Arbeit war es, den Einfluss der Lipase auf die Rhamnolipid-Produktion von *P. aeruginosa* zu untersuchen. Die Lipase A wird, wie die Rhamnolipide auch, durch das QS-System von *P. aeruginosa* beeinflusst genauso wie der für die Sekretion der Lipase benötigte Typ-II Proteinkomplex.

Die Ermittlung von Rhamnolipiden in den Kulturüberständen ergab im Fall des *P. aeruginosa* Lipase defizienten Stammes, dass keine Rhamnolipide gebildet werden. Im gleichem Stamm, jetzt mit *lipAH*-Expressionsplasmid (pBBL7), konnte sowohl mono- als auch di-Rhamnolipide in Mengen wie im Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Bei Untersuchungen einer *lipC*-Mutante von *P. aeruginosa*, in der jedoch noch ein aktives LipA vorhanden war, konnten Rosenau *et al.* (2010) zeigen, dass dort die Rhamnolipid Konzentration gegenüber dem Wildtyp deutlich verringert ist. Dies zeigt, dass auch die Rhamnolipidproduktion vom lipolytischen System in *P. aeruginosa* abhängig ist. Um den Einfluss der Lipasen genauer zu untersuchen, wurden die Transkriptmengen der für das QS-System verantwortlichen Gene *rhlR/rhlI* und *lasR/lasI* in Abhängigkeit zur Lipase gemessen (3.22). Hierzu wurden die mRNA sowohl aus Kulturen der Δ *lipAH*-Mutante als auch aus Kulturen der Mutanten, welche das *lipAH*-Operon vom Plasmid aus exprimierten, isoliert, anschließend die Transkriptmenge bestimmt und auf das „*housekeeping*“ Gen *rpoD* normiert. Alle vier analysierten mRNAs beider QS-Systeme sind deutlich vermehrt vorhanden, wenn das *lipAH*-Operon in *trans* exprimiert und somit komplementiert wird. Das Fehlen der Rhamnolipide in der *P. aeruginosa* Δ *lipAH*-Mutante scheint durch eine verringerte Transkription von *lasI/lasR* und *rhlI/rhlR* der QS-Systeme hervorgerufen worden sein und

zeigt, dass das lipolytische System einen regulatorischen Einfluss auf das „*Quorum sensing*“ besitzt.

Neben den AHL-Signalmolekülen gibt es in *P. aeruginosa* noch ein weiteres Signalmolekül, das *Pseudomonas-Quinolone*-Signal (PQS) (Pesci *et al.*, 1999; Diggle *et al.*, 2003). Das PQS steht in direktem Zusammenhang mit den anderen QS-Systemen in *P. aeruginosa*, da die Expression des *pqs*-Operons vom Las-System aktiviert wird und es für die Bioaktivität RhlR benötigt (Pesci *et al.*, 1999).

Die verringerte Transkription der QS-Gene in der *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ -Mutante kann einen direkten Einfluss auf die Synthese von PQS haben. Jedoch ist die Veränderung in den Transkriptmengen des QS-Systems nicht so hoch, dass dies ein komplettes Fehlen von PQS begründen würde. Genau dies wurde aber experimentell gezeigt. Der Nachweis von PQS Molekülen aus Extrakten der verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen zeigte, dass *lipAH* defiziente *P. aeruginosa* Stämme kein PQS produzieren (Abb. 3.23). In den Kulturüberständen von Kulturen, welche die Lipase in *trans* exprimieren sind jedoch PQS Moleküle vorhanden. Auch hier kann eine regulatorische Wirkung der Lipase/Lipaseaktivität nicht ausgeschlossen werden. So könnte das Produkt einer lipolytischen Spaltung durch die Lipase als Signalmolekül dienen und so eine Regulation bewirken.

In der Literatur werden „*Quorum Sensing*“ und Pyoverdine Synthese meist als eigenständige Systeme separat voneinander betrachtet. Dabei gibt es zwischen beiden Systemen große Schnittmengen. So z.B. gilt das Exotoxin A (ToxA) als „*Quorum Sensing*“ reguliert (Rumbaugh *et al.*, 2000; Smith & Iglewski, 2003), besitzt selber aber eine IS-Box und steht so unter der Kontrolle des Sigma-Faktors PvdS (Ochsner *et al.*, 2002). Auch die alkalische Protease (AprA) wird durch das Las-System reguliert (Gambello *et al.*, 1993) benötigt aber auch den IS-Sigma Faktor PvdS zur vollständigen Expression (Shigematsu *et al.*, 2001, Tiburzi *et al.*, 2008). Sowohl das „*Quorum Sensing*“ als auch das durch den Sigma-Faktor PvdS regulierte System tragen entscheidend zur Virulenz von *P. aeruginosa* bei. QS-regulierte Virulenzfaktoren sind unter anderem die Elastase, Lectine oder Rhamnolipide (Toder *et al.*, 1994; Ochsner & Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1997; Winzer *et al.*, 2000). Vom PvdS-System werden die oben genannten Virulenzfaktoren ToxA sowie die alkalische Protease aber auch die Protease PrpL reguliert (Visca *et al.*, 2006). Auch in der Regulation finden sich große Parallelen zwischen den beiden Systemen, die sich beide „autoinduzieren“. Während das QS-System mithilfe der AHL-Signalmoleküle und dem PQS funktioniert, welche die eigene Expression verstärken, ist das Signalmolekül des *pvdS*-Systems das Pyoverdine, welches sich

auch selbst verstärkt. Alle diese Signalmoleküle werden von *P. aeruginosa* sekretiert und können von anderen Bakterien der gleichen Art wahrgenommen werden.

Das PQS besitzt neben der Wirkung als Signalmolekül des „*Quorum sensing*“ noch eine weitere wichtige Eigenschaft. PQS kann aufgrund seiner Struktur Komplexe mit Eisen in einer Stöchiometrie von 3:1, bilden. Das von PQS gebundene Eisen steht der Bakterienzelle somit nicht mehr zur Verfügung, da PQS keine Siderophor Eigenschaft besitzt und das Eisen nicht an die Bakterienzelle abgibt. So kann eine hohe Konzentration an PQS zu einem Eisenmangel führen und stimuliert so die Synthese von Siderophoren wie dem Pyoverdin. Die positive verstärkende Eigenschaft von PQS auf die Transkription von Pyoverdin-Genen konnte auch in früheren Versuchen gezeigt werden (Bredenbruch *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2007; Heeb *et al.*, 2010).

Die Lipase A aus *P. aeruginosa* zählt ebenfalls zu den Virulenzfaktoren und wird zumindest indirekt durch das QS-System kontrolliert (Heurlier *et al.*, 2004). LipA hat aber, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, selbst einen deutlichen Einfluss auf das PQS. In einer *ΔlipAH*-Mutante ist die Transkription der Gene des QS-Systems herabgesetzt, was wiederum einen Einfluss auf die Transkription der *pqs*-Gene hat. In der *ΔlipAH*-Mutante fehlt das PQS vollständig, ob dieser Effekt jedoch über die verringerte Transkription des QS-Systems erfolgt oder aber die Lipase einen eigenen, direkten Einfluss auf die Biosynthese des PQS hat kann nicht ganz geklärt werden. Es gibt aber erste Hinweise aus DNA-„*microarray*“ Studien auf einen direkten Einfluss der Lipase auf die PQS Produktion. Die Reduktion der Pyoverdinmenge in der *ΔlipAH*-Mutante von *P. aeruginosa* können sich zum Teil auch durch die veränderte PQS Konzentration im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* erklären lassen. Dadurch, dass keine PQS-Moleküle mehr gebildet werden, können diese auch keine Komplexe mit Eisen bilden. Im Vergleich zu *P. aeruginosa* Kulturen, welche PQS-Moleküle synthetisieren, die dann mit Eisen Komplexe bilden, steigt die Konzentration an verfügbarem Eisen und damit müssen weniger Pyoverdinmoleküle gebildet werden. Die potentielle Beteiligung der Lipase an der PQS Biosynthese, direkt oder indirekt, kann aber nicht der einzige Grund für die Veränderung im Pyoverdinehaushalt sein, denn die Lipase bewirkt auch in Bakterien wie z.B. *P. putida*, welche nur ein unvollständiges QS-System besitzen, eine Veränderung im Pyoverdin Gehalt. *P. putida* besitzt zwar einige LuxR ähnliche Proteine aber ein *luxI* homologes Gen lässt sich nicht finden (Nelson *et al.*, 2002). Ebenfalls kann *P. putida* auch kein PQS bilden, wodurch die Pyoverdin-Produktion durch selbiges nicht

beeinflusst werden kann. In *P. aeruginosa* hingegen scheint der Einfluss der Lipase auf die Synthese des PQS ein weiterer, wichtiger Bestandteil der Pyoverdin-Regulation zu sein.

Die physiologische Bedeutung der Lipasen in *P. aeruginosa* konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden (Rosenau & Jaeger, 2000, Rosenau *et al.*, 2010). Es ist aber zu vermuten, dass die Lipasen aufgrund der komplexen Regulationsmechanismen nicht nur zur Nutzung von Fetten als C-Quelle gebildet werden. Vielmehr kann vermutet werden, dass die Lipasen bzw. das lipolytische System in *P. aeruginosa* eine regulatorische Funktion ausübt. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Esterase A (EstA) aus *P. aeruginosa* für die Beweglichkeit der Bakterien von entscheidender Bedeutung ist (Wilhelm *et al.*, 2007) und auch Einfluss auf die Rhamnolipidproduktion besitzt. Wie genau EstA diesen Einfluss ausübt, bleibt dabei ungeklärt, es wird aber vermutet, dass die Esterase Teil einer regulatorischen Kaskade ist, welche Lipide als Signalmoleküle benutzt (Rosenau *et al.*, 2010). Auch den Lipasen aus *P. aeruginosa* wird eine regulatorische Funktion zugesprochen, so wurde bereits gezeigt, dass die Lipasen sowohl einen Einfluss auf die Beweglichkeit als auch auf die Bildung von Biofilmen haben (Rosenau *et al.*, 2010). Die Erkenntnisse dieser Arbeit erweitern die regulatorischen Funktionen des lipolytischen Systems in *P. aeruginosa* um die Effekte auf die Pyoverdin-Synthese und den regulatorischen Effekt auf die Transkription der Gene des „*Quorum Sensing*“ Systems. Weiterhin wird die Synthese des PQS in *P. aeruginosa* von der Lipase beeinflusst.

Aufgrund der Transkriptanalyse mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Lipase einen verstärkenden Einfluss auf die Transkription von mehreren Genen des „*Quorum sensing*“ und der Pyoverdin-Synthese hat. Bei der Lipase handelt es sich um ein extrazelluläres Protein. Damit eine transkriptionelle Regulation stattfinden kann, muss daher ein Signal von außen durch die Membranen ins Innere der Zelle gelangen. Daraus resultiert, dass eine Regulation nur indirekt durch die Lipase ausgeübt werden kann. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Lipase ihre regulatorische Wirkung über einen noch nicht bekannten Signalweg ausübt. Dabei muss ein Signal von außerhalb der Bakterienzelle, wo die Lipase lokalisiert ist, durch die Lipidmembranen ins Cytoplasma übertragen werden, um dort einen regulatorischen Effekt auszuüben. Ein solcher Signalweg könnte über Reaktionsprodukte nach enzymatischer Spaltung durch die Lipase ermöglicht werden. Bei der Umsetzung von extrazellulären Edukten kann es zur Entstehung von kleinen (diffusionsfähigen) Signal-Faktoren (DSF) kommen. Bei den DSF handelt es sich um kleine ungesättigte Fettsäuren,

welche als Signalmolekül dienen können. Solche DSF sind aus *Xanthomonas campestris* bekannt und sind dort mit der Virulenz assoziiert (Dow *et al.*, 2003). Davies & Marques (2009) haben gezeigt, dass es solche DSF auch in *P. aeruginosa* gibt. Sie konnten eine ungesättigte Fettsäure, *cis*-2-Decensäure, identifizieren, welche für die Auflösung von Biofilmen verantwortlich ist. Schon vorher konnten DSF in vielen anderen verschiedenen Organismen gefunden werden (Barber *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004), jedoch sind nicht alle chemischen Strukturen bekannt. Beim Vergleich der verschiedenen DSF konnten jedoch einige Schlüsselstrukturen identifiziert werden. Das wichtigste Merkmal ist die Doppelbindung an der α,β Position des DSF (Wang *et al.*, 2004). Die andere Merkmale, einschließlich der *cis* Konfiguration der α,β Doppelbindung, wie die Kettenlänge und eine Methyl-Substitution tragen zur biologischen Aktivität bei (Wang *et al.*, 2004; He & Zhang, 2008). In *X. campestris* konnten bei Transkriptanalysen mittels DNA-„*microarrays*“ über 155 DSF-regulierte Gene identifiziert werden und in 12 funktionelle Gruppen eingeteilt werden. Zu diesen Gruppen gehören unter anderem die Gruppe 1) extrazelluläre Enzyme, 2) Lipopolysaccharid und EPS Synthese, 4) Flagellenbiosynthese, Beweglichkeit und Chemotaxis 6) Eisenaufnahme, 10) Transkriptionsregulatoren, 11) Membrankomponenten und -transporter und 12) Fettsäuremetabolismus (Barber *et al.*, 1997; He *et al.*, 2006). Weiterhin konnte anhand von genetischen und phänotypischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die DSF auch an der Flagellumsynthese, der Resistenz gegen Toxine und oxidativem Stress beteiligt sind (He *et al.*, 2006). Genauso wie die etablierten AHL abhängigen QS-Systeme RhlR/RhII bzw. LasR/LasI scheint die Regulation über DSF zelllichteabhängig zu sein (He & Zhang, 2008). In *X. campestris* interagierten DSFs mit einem Zweikomponenten-Regulationssystem.

Ein solches Zweikomponenten-Regulationssystem besteht aus einer Histidin-Proteinkinase, die einen konservierten Kinase-Anteil enthält, und einem Antwortregulator-Protein, das eine konservierte regulatorische Domäne besitzt. Die meisten Sensorkinasen sind Membran-gebundene Proteine. Die Erkennung von Reizen durch die Sensor-Domäne(n) kann extrazellulär und/oder intrazellulär erfolgen. Das DSF wird von dem Sensor erkannt und erzeugt so bei diesem eine Konformationsänderung, welche wiederum eine Autophosphorylierung ermöglicht und zu einer Übertragung der Phosphatgruppe vom Sensor auf den Antwortregulator führt und schließlich zur transkriptionellen Regulation (He & Zhang, 2008).

Lipasen sind Enzyme, die von Lipiden wie Glyceriden, freie Fettsäuren abspalten. Da sich die Lipase LipA von *P. aeruginosa* im extrazellulären Milieu befindet, sollten als Substrate

hauptsächlich extrazelluläre Substanzen bzw. zellassoziierte Substrate oder Zellbestandteile wie z.B. die Zellmembran selbst dienen. Die bei der Hydrolyse entstehenden freien (ungesättigten) Fettsäuren könnten dann als DSF ähnliche Signale fungieren, durch Diffusion oder Transportkanäle/Porine ins Periplasma der Bakterienzelle aufgenommen werden und als Stimulus für eine Sensorkinase dienen, welche das Signal auf einen Antwortregulator übermittelt und so zu einer aktivierenden, transkriptionellen Regulation führen (Abb. 4.3).

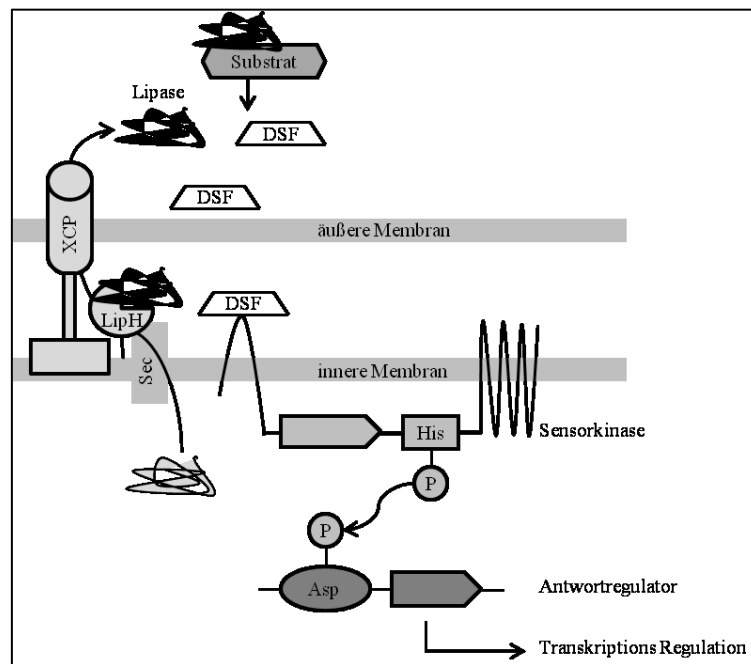


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Signalübertragung eines extrazellulären Signals über ein Zweikomponenten System aus Sensorkinase und Antwortregulator. Die Spaltung eines Substrates durch die Lipase erzeugt ein „Diffusionsfähiges Signal“ (DSF) welches an eine Sensorkinase bindet und damit eine Autophosphorylierung am Histidin (His) auslöst (P). Dieses wiederum führt zu einer Übertragung eines Phosphates auf ein Aspartat (Asp) des Antwortregulators und löst dadurch eine Transkriptionelle Regulation aus. Xcp: Typ-II Sekretion; LipH: Foldase

Betrachtet man das veränderte Proteom des Ganzzellextraktes von *P. putida* und das Sekretom von *P. aeruginosa*, finden sich einige Parallelen zu den beschriebenen Funktionen der DSF in *X. campestris*. So sind auch in *P. putida* Enzyme der Eisenaufnahme (FpvA), Membrantransporter (PP1297), Transkriptionsregulatoren (PP2609) und Enzyme zur Abwehr von oxidativen Stress (AhpC), in Abhängigkeit der Lipase, verändert. Die Untersuchungen in *P. aeruginosa* zeigten einen deutlichen Unterschied bei den extrazellulären Enzymen (Abb. 3.19).

Weiterhin ist bekannt das in *P. aeruginosa* das lipolytische System einen Einfluss auf die Biofilmbildung und auf die Beweglichkeit der Bakterien besitzt (Wilhelm *et al.*, 2007), genau die Funktionen die auch in *X. campestris* von den DSF reguliert werden. Zumindest der Einfluss von DSF auf die Biofilme konnte ja bereits für *P. aeruginosa* gezeigt werden (Davies & Marques, 2009). In *X. campestris* hängt die Erkennung und Synthese des DSF Signal vom *rpf* Gencluster ab. Die Synthese des DSF benötigt RpfF, ein Protein, welches auf Ebene der Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten mit einer Enoyl-CoA-Hydratase (Barber *et al.*, 1997) aufweist. Die Sensorkinase RpfC und der Regulator RpfG werden für die Erkennung benötigt (Dow *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2006; Ryan & Dow, 2008). *P. aeruginosa* besitzt kein solches *rpf* Gencluster und auch keine anderen Genbereiche, die für Proteine mit einer großen Ähnlichkeit kodieren würden (Ryan & Dow, 2008). Die Erkennung der DSF erfolgt jedoch in *P. aeruginosa* ebenfalls über eine Sensorkinase (PA1396), welche eine gleichartige Eingangsdomäne besitzt wie RpfC (Ryan & Dow, 2008). Mit dem dazugehörigen Antwortregulator (PA1397) kann auch in *P. aeruginosa* ein extrazelluläres Signal über dieses 2-Komponenten System zu einer transkriptionellen Regulation führen.

Die Lipase A wird im Cytoplasma gebildet und über die bekannten Sekretionsschritte ins extrazelluläre Milieu abgegeben. Durch die Umsetzung eines noch nicht bekannten Substrates entsteht eine freie, möglicherweise ungesättigte Fettsäure, welche als Signalmolekül fungieren kann. Davon ausgehend, dass es sich in *P. aeruginosa* ebenfalls, wie in *X. campestris*, um einen Zelldichte abhängigen Signalübertragungsweg handelt, wird ein Schwellenwert an Signalmolekülen benötigt, bis diese an eine Sensorkinase binden. Die aktivierte Sensorkinase durchläuft daraufhin eine Konformationsänderung und überträgt das Signal auf den entsprechenden Antwortregulator. Durch dieses Zwei-Komponenten-System führt eine extrazelluläre enzymatische Umsetzung mit dem daraus resultierenden Signal zu transkriptionellen Veränderungen in der Bakterienzelle.

Durch Transkriptanalyse mittels RT-PCR und Extraktion von PQS konnte gezeigt werden, dass die Lipase in *P. aeruginosa* sowohl Einfluss auf die PQS Synthese als auch auf die Transkription der beiden etablierten QS-System Rhl und Las besitzt. Nur wenn *P. aeruginosa* über eine aktive Lipase A verfügt, kann PQS produziert werden und die Transkripte der QS-Systeme nehmen signifikant zu. Auch die Transkription des IS-Sigma-Faktors PvdS wird durch die Lipase in *P. aeruginosa* beeinflusst. Das Fehlen von LipAH führt zu einer Abnahme an *pvdS*-Transkript und hat zur Folge, dass auch die PvdS-regulierten Gene weniger transkribiert werden.

Das Fehlen der Lipase bewirkt, dass PQS Signalmoleküle nicht mehr produziert werden. Dies führt wiederum dazu, dass die fehlenden PQS Moleküle die Transkription des Rhl-Systems nicht anregen. Durch die herabgesetzte Transkription des Rhl-Systems kommt es zu einer Verringerung der Rhamnolipidsynthese. Ob die Lipase auch auf die Rhamnolipidsynthese einen weiteren regulatorischen Effekt ausübt, kann nicht ausgeschlossen werden. Ist die Lipase vorhanden bzw. wird LipA überexprimiert, kann das PQS gebildet werden und es kommt zur verstärkten Transkription vom Rhl-System und auch zur Produktion von Rhamnolipiden.

Wie bereits erwähnt, besitzt PQS auch eine verstärkende Wirkung auf die Transkription der Pyoverdine-Gene. Aber auch ohne die Wirkung des PQS hat die Lipase einen regulatorischen Effekt auf die Pyoverdine-Synthese. Das potentielle, durch die Lipase entstandene Signal, welches über eine Sensorkinase transduziert wird, führt auch zu erhöhter Transkription von *pvdS* und PvdS-anhängigen Genen. Ein solches Signal kann auch den Einfluss der Lipase auf die Pyoverdine in Pseudomonaden ohne PQS System erklären, wie z.B. in *P. putida*.

Die angeregte Transkription von *pvdS* führt zur Bildung von Pyoverdinen, diese können dann Komplexe mit Eisen bilden und so wiederum die Transkription von *pvdS* anregen. Andersherum konnte gezeigt werden, dass PvdS auch einen Einfluss auf die Transkription der Lipase A hat. Dieser Einfluss kann nur indirekt sein und muss über ein noch nicht bekanntes Protein führen, wahrscheinlich einen durch PvdS regulierten Transkriptionsregulator, da die Lipase in ihrer Sequenz keine konservierte IS-Box aufweist.

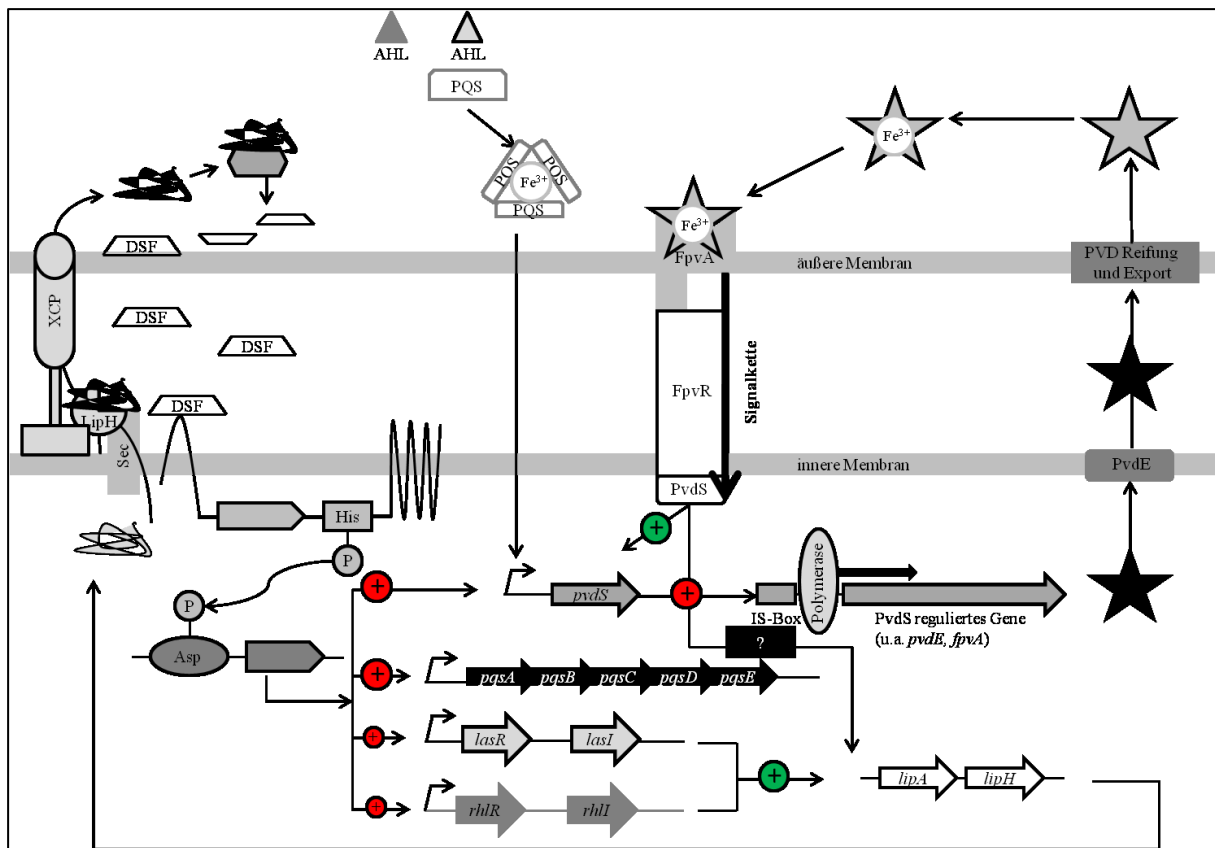


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des regulatorischen Netzwerks in *P. aeruginosa* und Einfluss der Lipase auf die Genregulation. Ein + zeigt einen transkriptionellen Effekt der in dieser Arbeit mittels RT-PCR gezeigt werden konnte. Ein + zeigt einen transkriptionellen Effekt, welcher aus der Literatur bekannt ist. ■ steht für die aktive Lipase, ★ steht für die Vorstufe des fertigen Pyoverdin, ☆ stellt ein gereiftes Pyoverdin dar, welches Komplexe mit Eisen eingehen kann. ■ steht für ein noch unbekanntes Substrat, welches durch die Lipase umgesetzt werden kann. Die daraus entstehenden Produkte DSF können als Signalmolekül dienen und so zur transkriptionellen Regulation führen.

➡ Stehen für Gene, Gennamen stehen kursiv im Pfeil; das △ steht für ein QS-Signalmolekül; PQS: Pseudomonas-Quinolon-Signal; XCP: Typ-II Sekretionsapparat; Sec: Sec-Apparat; His: Histidin der Sensorkinase; Asp: Aspartat des Antwortregulators; P: Phosphat; PvdE: Transporter des Pyoverdin über die innere Zellmembran; PvdS: Sigma-Faktor PvdS; FpvR: Anti-Sigma-Faktor FpvR; IS-Box: Erkennungssequenz des Sigma-Faktors PvdS; Polymerase: DANN Polymerase;

Anhand des dargestellten Modells (Abb. 4.4) kann zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zwischen der Lipase A und der Produktion von Pyoverdinen hergestellt werden. Dabei besitzt die Lipase einen indirekten regulatorischen Effekt auf die Transkription

mehrere Gene, unter anderem Gene der „*Quorum sensing*“-Systeme und den alternativen Sigma-Faktor PvdS.

Bisher wurde oft angenommen, dass die physiologische Funktion der Lipase die Bereitstellung von Nährstoffen ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Funktion der Lipase deutlich vielfältiger ist und großes regulatorisches Potential besitzt. Durch ihre Wirkung auf die QS-Systeme und den Sigma-Faktor PvdS kann die Lipase von ganz entscheidender Wirkung für die Virulenz von *P. aeruginosa* sein.

5. Zusammenfassung

Mikrobielle Lipasen, darunter die besonders geeigneten Lipasen der Gattung *Pseudomonas*, finden vor allem Anwendung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie.

Die Expression von aktiven Lipasen der Familie I.1 aus *P. aeruginosa* ist jedoch aufgrund der komplexen Regulation, Faltung und Sekretion ein hoch komplexer Prozess. Daher wurden in der Vergangenheit viele Expressionssysteme getestet, um zu einer höheren Produktivität zu gelangen. Nicht nur wegen ihrer biotechnologischen Bedeutung, sondern auch aufgrund ihrer Funktion als Virulenzfaktoren bei pathogenen Mikroorganismen (Stehr et al., 2003) sind Lipasen im wissenschaftlichen Focus.

In dieser Arbeit wurde ein systembiologischer Ansatz gewählt, in dem das Gen das für die Lipase A aus *P. aeruginosa* kodiert im heterologen Wirt *P. putida* und im homologen Wirt *P. aeruginosa* exprimiert wurde. Dabei wurden die unterschiedlichen Kulturen mittels *Proteomics* und qPCR untersucht. Die notwendigen Methoden wurden während dieser Arbeit neu am Institut etabliert.

Bei der Anzucht von *P. putida* unter Expression von *lipAH* konnte gezeigt werden, dass die heterologe Produktion der Lipase einen Stress ausübt, der das Wachstum deutlich verlangsamt und die Biomasse reduziert. Außerdem zeigte sich überraschend eine deutliche Grünfärbung welche auf eine gesteigerte Pyoverdin Produktion, die unter Standardlaborbedingungen für *P. putida* unüblich ist, zurück geführt werden konnte. Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lipaseexpression für die Pyoverdinsynthese notwendig ist, entweder durch die heterologe Lipase oder durch die im Pyoverdincluster natürlicherweise enthaltene Lipase (PP4218). Dieser vorhergesagten Lipase (PP4218) konnte jedoch mit den Standardsubstraten keine typische Lipaseaktivität zugewiesen werden.

Das zelluläre Proteom von *P. putida* zeigte unter Lipaseüberproduktion deutliche Veränderungen bei mindestens 60 Proteinen. Darunter waren Proteine, die mit der oxidativen-Stress Antwort assoziiert sind, als auch solche Proteine, die direkt an der Pyoverdin-Produktion beteiligt sind, was nach den physiologischen Untersuchungen zu erwarten war.

Die Analysen im homologen Wirt *P. aeruginosa* ergaben ebenfalls, dass die Lipase A die Pyoverdin Produktion beeinflusst; obwohl hier, im Gegensatz zu *P. putida*, kein Lipasegen direkt im Pyoverdincluster vorhanden ist.

Einerseits zeigte sich in der Lipase A-defizienten Mutante von *P. aeruginosa*, dass keinerlei Pyoverdinin produziert wird, ein Phänotyp, der durch *lipAH* in *trans* komplementierbar war. Andererseits konnte gezeigt werden, dass in dieser Mutante die Transkription des *pvdS*-Gens deutlich vermindert ist. PvdS ist ein alternativer, sogenannter „*iron starvation*“-Sigma-Faktor, der für die Transkription des *pvd* Genclusters verantwortlich ist. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass das Vorhandensein der Lipase A die Transkription von *pvdS* beeinflusst.

Interessanterweise war in einer *pvdS*-Mutante, *P. aeruginosa* $\Delta pvdS$, die Transkription des *lipA*-Gens deutlich verringert, obwohl vor dem Lipasegen die notwendige IS-Box zur Bindung von PvdS nicht vorhanden ist.

Doch nicht nur die Pyoverdininproduktion wird in der Lipase A-defizienten Mutante von *P. aeruginosa* beeinflusst, sondern auch die Transkription der *lasR/I* und *rhlR/I* Gene, deren Genprodukte für die Autoregulation und Synthese der Signalmoleküle (Homoserinlaktone) des „*Quorum sensing*“ (QS) Systems zuständig sind, ist deutlich reduziert. Außerdem findet sich kein PQS („*Pseudomonas-Quinolone-Signal*“) in Kulturüberständen. Diese Phänomene waren durch die Expression von *lipAH* in *trans* komplementierbar.

Ein Sekundärmetabolit, welcher durch das „QS“-System reguliert wird, ist das Rhamnolipid von *P. aeruginosa*. In der Tat konnten keine RL in *P. aeruginosa* $\Delta lipAH$ detektiert werden, bei Expression von *lipAH* in *trans* waren beide Rhamnolipide von *P. aeruginosa* wieder vorhanden.

Diese Befunde sind in einem regulatorischen Modell zusammengefasst, in dem durch die Lipase A Aktivität ein putatives Signalmolekül entsteht, welches nach Signaltransduktion sowohl die Gene des QS-Systems als auch das *pvdS* Gen und somit auch die PvdS-abhängige Genregulation beeinflusst.

Summary

Microbial lipases, especially those from the genus *Pseudomonas*, are often used in chemical and pharmaceutical industries.

The expression of active lipases of *P. aeruginosa* from family I.1 is often very difficult, because it depends on complex regulation-, folding- and secretion- mechanisms. Many expression systems were already tested in the past to increase productivity. It is not only the biotechnological function but also the function as virulence factor in pathogenic microorganism (Stehr *et al.*, 2003) that makes this lipase interesting for scientific work.

In this work, a systems-biological approach of heterologous expression in *P. putida* and homologous expression in *P. aeruginosa* of the lipase LipA was tested. The methods needed for proteomics and qPCR were established in this work and used for analysis of the expression cultures.

The presence of an expression plasmid within *P. putida* cells obviously causes a stress response, which results in slower growth rate and lower final cell density. Furthermore, after expression of the *lipAH* operon, the cultures start to produce the siderophore pyoverdine. In this work, for the first time, it was shown that pyoverdinesynthesis requires the production of lipase, either the heterologous LipA or the homologous putative lipases PP4218 which is located within the pyoverdine gene cluster of *P. putida*.

The cellular proteome of *P. putida* which expressed the heterologous lipase showed differences in proteinexpression of 60 proteins. Among these proteins, an oxidative stress response of bacteria and as expected from the phenotypes some of pyoverdinesynthesis were identified.

The analysis of lipase production in *P. aeruginosa* showed that the lipase also influenced pyoverdine production, although no lipases genes are located in the pyoverdine gene cluster. On one hand, it was shown that no pyoverdine production occurs in a *lipAH*-negative mutant of *P. aeruginosa* on the other hand, the alternative sigma factor PvdS which is necessary for pyoverdine production is also down-regulated. This shows for the first time that a lipase influences the transcription of the iron starvation sigma factor encoding gene *pvdS*.

Interestingly the transcription of the lipases was also down-regulated in a *pvdS*-negative mutant of *P. aeruginosa* although there is no IS-box present for binding of the PvdS.

The transcription of the quorum sensing related genes *rhII/R* and *lasI/R* was also affected in a *lipAH* mutant of *P. aeruginosa*. These gene products are needed for autoregulation and synthesis of the signal molecules of the quorum sensing system. Furthermore, no PQS (pseudomonas-quinolon-signal) were detected in the culture supernatant. All these effects can be complemented by expression of the lipase in *trans*.

Rhamnolipids (RL) are QS-regulated secondary metabolite of *P. aeruginosa*. Indeed no RLs are detectable in the *lipAH*-mutant of *P. aeruginosa*, while expression of *lipAH* in *trans* resulted in the formation of RL in the *P. aeruginosa* supernatant.

All these findings were summarized by proposing a regulatory network, hypothesis where the activity of LipA generates a putative signal molecule which after signal transduction affects the genes of the QS-system and the *pvdS* and also PvdS-regulated genes.

6. Literatur:

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Anderson, N. L. & Anderson, N. G. (1998).** Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**, 1853-1861.
- Aragon, V., Rossier, O. & Cianciotto, N. P. (2002).** *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology* **148**, 2223-2231.
- Arino, P., Castano, J., Castillo, J., Sanchez-Ortega, J. M. & Vila, J. (1996).** Perioperative mortality in elderly patients undergoing general surgery. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* **43**, 89-93.
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343 Pt 1**, 177-183.
- Atkinson, R. A., Salah El Din, A. L., Kieffer, B., Lefevre, J. F. & Abdallah, M. A. (1998).** Bacterial iron transport: ¹H NMR determination of the three-dimensional structure of the gallium complex of pyoverdine G4R, the peptidic siderophore of *Pseudomonas putida* G4R. *Biochemistry* **37**, 15965-15973.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F. C., Bagdasarian, M. M., Frey, J. & Timmis, K. N. (1981).** Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**, 237-247.
- Banin, E., Vasil, M. L. & Greenberg, E. P. (2005).** Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11076-11081.
- Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P. & Daniels, M. J. (1997).** A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* **24**, 555-566.
- Barton, H. A., Johnson, Z., Cox, C. D., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1996).** Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol* **21**, 1001-1017.
- Beal, R. & Betts, W. B. (2000).** Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* **89**, 158-168.
- Beare, P. A., For, R. J., Martin, L. W. & Lamont, I. L. (2003).** Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol Microbiol* **47**, 195-207.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004).** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795.

- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. (1999).** Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Stereoselective. Biotransformations. Weinheim, Wiley-VCH.
- Braun, V. (1995).** Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* **16**, 295-307.
- Braun, V. (1997).** Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Biol Chem* **378**, 779-786.
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Muller, R. & Haussler, S. (2005).** Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *J Bacteriol* **187**, 3630-3635.
- Chandrasekaran, E. V. & Bemiller, J. N. (1980).** Constituent analyses of glycosaminoglycans. In *Methods in Carbohydrate Chemistry VIII.*, pp. 89-96. Edited by R. L. Whistler, J. N. Bemiller, Academic Press, N.Y., San Francisco, London.
- Choi, K. H., Kumar, A. & Schweizer, H. P. (2006).** A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**, 391-397.
- Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C. & Greenberg, E. P. (2001).** QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2752-2757.
- Conway, S. P., Brownlee, K. G., Denton, M. & Peckham, D. G. (2003).** Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* **2**, 321-332.
- Cornelis, P. (2010).** Iron uptake and metabolism in *pseudomonads*. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1637-1645.
- Cornelis, P., Hohnadel, D. & Meyer, J. M. (1989).** Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Infect Immun* **57**, 3491-3497.
- Cornelis, P. & Matthijs, S. (2002).** Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent *pseudomonads*: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* **4**, 787-798.
- Cornelis, P. (2008).** The 'core' and 'accessory' regulons of *Pseudomonas*-specific extracytoplasmic sigma factors. *Mol Microbiol* **68**, 810-812.
- Cornelis, P., Matthijs, S. & Van Oeffelen, L. (2009).** Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **22**, 15-22.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- Cox, C. D. & Graham, R. (1979).** Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **137**, 357-364.

Cox, C. D. (1986). Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect Immun* **52**, 263-270.

Davies, D. G. & Marques, C. N. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* **191**, 1393-1403.

de Chial, M., Ghysels, B., Beatson, S. A. & other authors (2003). Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**, 821-831.

de Groot, A., Gerritse, G., Tommassen, J., Lazdunski, A. & Filloux, A. (1999). Molecular organization of the *xcp* gene cluster in *Pseudomonas putida*: absence of an *xcpX* (*gspK*) homologue. *Gene* **226**, 35-40.

de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. & Timmis, K. N. (1993). Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**, 17-24.

De Vos, D., De Chial, M., Cochez, C., Jansen, S., Tummler, B., Meyer, J. M. & Cornelis, P. (2001). Study of pyoverdine type and production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients: prevalence of type II pyoverdine isolates and accumulation of pyoverdine-negative mutations. *Arch Microbiol* **175**, 384-388.

Derewenda, Z. S. & Derewenda, U. (1991). Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem Cell Biol* **69**, 842-851.

Deziel, E., Lepine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A. & Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids

produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta* **1440**, 244-252.

Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**, 2005-2013.

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

Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J. & other authors (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* **14**, 87-96.

Dos Santos, V. A., Heim, S., Moore, E. R., Stratz, M. & Timmis, K. N. (2004). Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **6**, 1264-1286.

Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X. & Tang, J. L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10995-11000.

Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F., Wilhelm, S. & Jaeger, K. E. (2006). Novel biocatalysts for white biotechnology. *Biotechnol J* **1**, 777-786.

Dunn, S. D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**, 144-153.

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

Ernst, R. K., D'Argenio, D. A., Ichikawa, J. K. & other authors (2003). Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis. *Environ Microbiol* **5**, 1341-1349.

Essar, D. W., Eberly, L. & Crawford, I. P. (1990). Evolutionary differences in chromosomal locations of four early genes of the tryptophan pathway in fluorescent *pseudomonads*: DNA sequences and characterization of *Pseudomonas putida* *trpE* and *trpGDC*. *J Bacteriol* **172**, 867-883.

Federal Register (1982). Certified host-vector systems. 17197

Feller, G., Thiry, M. & Gerday, C. (1990). Sequence of a lipase gene from the antarctic psychrotroph *Moraxella TA144*. *Nucleic Acids Res* **18**, 6431.

Feller, G., Thiry, M., Arpigny, J. L. & Gerday, C. (1991). Cloning and expression in *Escherichia coli* of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain *Moraxella TA144*. *Gene* **102**, 111-115.

Fergie, J. E., Shema, S. J., Lott, L., Crawford, R. & Patrick, C. C. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of

factors associated with a poor outcome. *Clin Infect Dis* **18**, 390-394.

Filloux, A., Michel, G. & Bally, M. (1998). GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 177-198.

Fridovich, I. (1978). Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction. *Ciba Found Symp*, 1-4.

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.

Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**, 727-751.

Fuqua, C. (2006). The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *J Bacteriol* **188**, 3169-3171.

Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* **173**, 3000-3009.

Gambello, M. J., Kaye, S. & Iglewski, B. H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* **61**, 1180-1184.

Gilbert, E. S., Walker, A. W. & Keasling, J. D. (2003). A constructed microbial consortium for biodegradation of the organophosphorus insecticide parathion. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 77-81.

Gomez, M. I. & Prince, A. (2007). Opportunistic infections in lung disease:

Pseudomonas infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 244-251.

Gruber, T., Chemiel, H., Kappeli, O., Sticher, P. & Fichter, A. (1993). Integrated process for continuous rhamnolipid biosynthesis. In: Biosurfactants: Production, properties, applications. Edited by N. Kosaric. N. Y.: Marcel Dekker.

Gruber, T. M. & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**, 441-466.

Gupta, S. K. & Ghosh, T. C. (2001). Gene expressivity is the main factor in dictating the codon usage variation among the genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **273**, 63-70.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.

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

Hausmann, S. (2009). Einfluss des Lipase-spezifischen Chaperons LipH auf die Faltung und Sekretion der Lipasen LipA und LipC aus *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Hausmann, S., Jaeger, K.-E. (2010). Lipolytic Enzymes from Bacteria. An Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, pp 1099-1127. Edited by K. N. Timmis. Springer, Germany.

He, Y. W., Wang, C., Zhou, L., Song, H., Dow, J. M. & Zhang, L. H. (2006). Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *J Biol Chem* **281**, 33414-33421.

He, Y. W. & Zhang, L. H. (2008). Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 842-857.

Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P. & Camara, M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev*.

Heim, S., Ferrer, M., Heuer, H., Regenhardt, D., Nimtz, M. & Timmis, K. N. (2003). Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase. *Environ Microbiol* **5**, 1257-1269.

Helmann, J. D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**, 47-110.

Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Camara, M., Williams, P. & Haas, D. (2004). Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **186**, 2936-2945.

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

Höfte, M., Buysens, S., Koedam, N. & Cornelis, P. (1993). Zinc affects siderophore-mediated high affinity iron uptake systems in the rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Biomaterials* **6**, 85-91.

Hoiby, N. (2002). Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to

potential therapies. *J Cyst Fibros* **1**, 249-254.

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

Hong, K. H., Jang, W. H., Choi, K. D. & Yoo, O. J. (1991). Characterization of *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase: cloning and expression of the esterase gene in *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem* **55**, 2839-2845.

Houde, A., Kademi, A. & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol* **118**, 155-170.

Hunt, T. A., Peng, W. T., Loubens, I. & Storey, D. G. (2002). The *Pseudomonas aeruginosa* alternative sigma factor PvdS controls exotoxin A expression and is expressed in lung infections associated with cystic fibrosis. *Microbiology* **148**, 3183-3193.

Istivan, T.S. & P.J. Coloe (2006). Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* **152**(Pt 5), 1263-1274.

Imperi, F., Tiburzi, F. & Visca, P. (2009). Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20440-20445.

Ito, S., Honda, H., Tomita, F. & Suzuki, T. (1971). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C 12, C 13 and C 14 fractions). *J Antibiot (Tokyo)* **24**, 855-859.

Jaeger, K. E., Kharazmi, A. & Hoiby, N. (1991). Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function in vitro. *Microb Pathog* **10**, 173-182.

Jaeger, K. E., Adrian, F. J., Meyer, H. E., Hancock, R. E. & Winkler, U. K. (1992). Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochim Biophys Acta* **1120**, 315-321.

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

Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 29-63.

Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Liebeton, K., Haas, D., Reetz, M. T., Philippou, S., Gerritse, G., Ransac, S. & Dijkstra, B. W. (1996). Lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular biology and biotechnological application. In *Molecular Biology of Pseudomonads*, pp. 319-330. Edited by T. Nakazawa. Washington D.C.: American society for Microbiology

Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**, 396-403.

Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 390-397.

James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys* **30**, 279-331

Juhas, M., Eberl, L. & Tummler, B. (2005). Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **7**, 459-471.

Kadurugamuwa, J. L. & 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.

Kempner, E. S. & Hanson, F. E. (1968). Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol* **95**, 975-979.

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

Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B. & Hellingwerf, K. J. (1993). Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**, 2329-2342.

Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-802.

Krzeslak, J., Gerritse, G., van Merkerk, R., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2008). Lipase expression in *Pseudomonas alcaligenes* is under the control of a two-component regulatory system. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1402-1411.

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

Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7072-7077.

Lang, D., Hofmann, B., Haalck, L., Hecht, H. J., Spener, F., Schmid, R. D. & Schomburg, D. (1996). Crystal

structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 angstroms resolution. *J Mol Biol* **259**, 704-717.

Lang, S. & Wullbrandt, D. (1999). Rhamnose lipids--biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 22-32.

Lazdunski, A. M., Ventre, I. & Sturgis, J. N. (2004). Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**, 581-592.

Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N. & Lazdunski, A. (2003). Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol* **48**, 199-210.

Leoni, L., Ciervo, A., Orsi, N. & Visca, P. (1996). Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: effect of Fur and PvdS on promoter activity. *J Bacteriol* **178**, 2299-2313.

Lepine, F., Deziel, E., Milot, S. & Villemur, R. (2002). Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Mass Spectrom* **37**, 41-46.

Lequette, Y., Lee, J. H., Ledgham, F., Lazdunski, A. & Greenberg, E. P. (2006). A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J Bacteriol* **188**, 3365-3370.

Liebeton, K., Zacharias, A. & Jaeger, K. E. (2001). Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J Bacteriol* **183**, 597-603.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with

cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194-222.

Maier, R. M. & Soberon-Chavez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 625-633.

Martinez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D. N. (1998). Identification of an additional member of the secretin superfamily of proteins in *Pseudomonas aeruginosa* that is able to function in type II protein secretion. *Mol Microbiol* **28**, 1235-1246.

Martinez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D. N. (1999). LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. *Mol Microbiol* **34**, 317-326.

Matthijs, S., Tehrani, K. A., Laus, G., Jackson, R. W., Cooper, R. M. & Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ Microbiol* **9**, 425-434.

Matthijs, S., Budzikiewicz, H., Schafer, M., Wathlet, B. & Cornelis, P. (2008). Ornicorrugatin, a new siderophore from *Pseudomonas fluorescens* AF76. *Z Naturforsch C* **63**, 8-12.

Matthijs, S., Laus, G., Meyer, J. M., Abbaspour-Tehrani, K., Schafer, M., Budzikiewicz, H. & Cornelis, P. (2009). Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *Biometals*.

McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 2702-2708.

McMorran, B. J., Merriman, M. E., Rombel, I. T. & Lamont, I. L. (1996). Characterisation of the *pvdE* gene which is required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **176**, 55-59.

Mercado-Blanco, J., van der Drift, K. M., Olsson, P. E., Thomas-Oates, J. E., van Loon, L. C. & Bakker, P. A. (2001). Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J Bacteriol* **183**, 1909-1920.

Merril, C. R. (1990). Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**, 477-488.

Meyer, J. M. & Abdallah M. A. (1978). The fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physiocochemical Properties. *Journal of General Microbiology* **107**, 319-328

Meyer, J. M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K. & Budzikiewicz, H. (1997). Use of siderophores to type *pseudomonads*: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **143** (Pt 1), 35-43.

Meyer, J. M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* **174**, 135-142.

Meyer, J. M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schafer, M. & Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* **21**, 259-271.

Mohn, G., Koehl, P., Budzikiewicz, H. & Lefevre, J. F. (1994). Solution structure of pyoverdine GM-II. *Biochemistry* **33**, 2843-2851.

- Mongkolsuk, S., Whangsuk, W., Vattanaviboon, P., Loprasert, S. & Fuangthong, M. (2000).** A *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*ahpC*) mutant showed an altered peroxide stress response and complex regulation of the compensatory response of peroxide detoxification enzymes. *J Bacteriol* **182**, 6845-6849.
- Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C. & other authors (2002).** Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent *pseudomonads* involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* **45**, 1673-1685.
- Mullen, T., Markey, K., Murphy, P., McClean, S. & Callaghan, M. (2007).** Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**, 869-877.
- Nardini, M. & Dijkstra, B. W. (1999).** Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 732-737.
- Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E. & Dijkstra, B. W. (2000).** Crystal structure of *pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* **275**, 31219-31225.
- Nealson, K. H., Platt, T. & Hastings, J. W. (1970).** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**, 313-322.
- Neilands, J. B. (1952).** The isolation and properties of cytochrome c from different sources. *J Biol Chem* **197**, 701-708.
- Neilands, J. B. (1981).** Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* **50**, 715-731.
- Nelson, K. E., Weinl, C., Paulsen, I. T. & other authors (2002).** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**, 799-808.
- Nishijyo, T., Haas, D. & Itoh, Y. (2001).** The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **40**, 917-931.
- Noble, M. E., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. & Frenken, L. G. (1993).** The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett* **331**, 123-128.
- Ochsner, U. A. (1993).** Genetics and biochemistry of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactant synthesis. Dissertation. Swiss Federal Institute of Technology Zürich.
- Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994).** Isolation and characterisation of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**, 2044-2054.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 6424-6428.
- Ochsner, U. A., Vasil, M. L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K. & Hassett, D. J. (2000).** Role of the *Pseudomonas aeruginosa* *oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. *J Bacteriol* **182**, 4533-4544.

- Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002). GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* **45**, 1277-1287.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M. & other authors (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**, 197-211.
- Palleroni, N. J. & Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 606-609.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 197-201.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**, 5756-5767.
- Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-1210.
- Pelletier, I. & Altenbuchner, J. (1995). A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* **141** (Pt 2), 459-468.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3127-3132.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11229-11234.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-356.
- Poole, K., Heinrichs, D. E. & Neshat, S. (1993). Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* **10**, 529-544.
- Postle, K. (1999). Active transport by customized beta-barrels. *Nat Struct Biol* **6**, 3-6.
- Ramos, J. L., Wasserfallen, A., Rose, K. & Timmis, K. N. (1987). Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* **235**, 593-596.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. & Soberon-Chavez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **40**, 708-718.
- Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881-941.
- Ravel, J. & Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron

uptake in *pseudomonads*. *Trends Microbiol* **11**, 195-200.

Redly, G. A. & Poole, K. (2005). FpvIR control of *fpvA* ferric pyoverdine receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: demonstration of an interaction between FpvI and FpvR and identification of mutations in each compromising this interaction. *J Bacteriol* **187**, 5648-5657.

Risse, D., Beiderbeck, H. Taraz, K., Budzikiewicz, H. & Gustine, D. (1998). Corrugation, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugate*. *Z Naturforsch* **53**, 295-304

Rosenau, F., Isenhardt, S., Gdynia, A. Tielker D., Schmidt E., Tielen P., Schobert M., Jahn D., Wilhelm S. and Jaeger K.E. (2010). Lipase LipC affects motility, biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **309**, 25-34.

Rosenau, F. & Jaeger, K. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**, 1023-1032.

Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2004). Overexpression and Secretion of *Pseudomonas* Lipases. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishes.

Rosenau, F., Tommassen, J. & Jaeger, K. E. (2004). Lipase-specific foldases. *Chembiochem* **5**, 152-161.

Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386.

Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A. & Hamood, A. N. (2000). The role of quorum sensing in the in vivo virulence of

Pseudomonas aeruginosa. *Microbes Infect* **2**, 1721-1731.

Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F. & other authors (2006). Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 6712-6717.

Ryan, R. P., Fouhy, Y., Garcia, B. F., Watt, S. A., Niehaus, K., Yang, L., Tolker-Nielsen, T. & Dow, J. M. (2008). Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **68**, 75-86.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Salameh, M. & Wiegel, J. (2007). Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Adv Appl Microbiol* **61**, 253-283.

Sambrock, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual.

Sandkvist, M. (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* **69**, 3523-3535.

Sarda, L. & Desnuelle, P. (1958). [Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions.]. *Biochim Biophys Acta* **30**, 513-521.

Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B. & Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods* **52**, 1-18.

Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Gunther, K., Nickolaus, M., Hermann, T. & Bott, M. (2001). A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**, 4404-4422.

Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**, 16-22.

Schalk, I. J. (2008). Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem* **102**, 1159-1169.

Schneidinger, B. (1997). Überexpression und transkriptionelle Regulation des Lipaseoperons von *Pseudomonas aeruginosa* und funktionelle Charakterisierung der Lipase-spezifischen Foldase LipH. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum.

Schröder, I., Johnson, E. & de Vries, S. (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 427-447.

Seaver, L. C. & Imlay, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 7173-7181.

Shigematsu, T., Fukushima, J., Oyama, M., Tsuda, M., Kawamoto, S. & Okuda, K. (2001). Iron-Mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* **45**, 579-590.

Shirley, M. & Lamont, I. L. (2009). Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **191**, 5634-5640.

Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest* **112**, 1460-1465.

Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**, 56-60.

Smith, E. E., Sims, E. H., Spencer, D. H., Kaul, R. & Olson, M. V. (2005). Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 2138-2147.

Soberon-Chavez, G., Lepine, F. & Deziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 718-725.

Spencer, D. H., Kas, A., Smith, E. E., Raymond, C. K., Sims, E. H., Hastings, M., Burns, J. L., Kaul, R. & Olson, M. V. (2003). Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**, 1316-1325.

Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B. & Schäfer, W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *J. of Mol. Catalysis* **22**, 3447-355

Storz, G., Tartaglia, L. A., Farr, S. B. & Ames, B. N. (1990). Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet* **6**, 363-368.

Swift, S., Lynch, M. J., Fish, L., Kirke, D. F., Tomas, J. M., Stewart, G. S. & Williams, P. (1999). Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* **67**, 5192-5199.

Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U. & Wagner, F. (1985). Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Z Naturforsch C* **40**, 61-67.

Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. & Witte, L. (1985). Chemical and physical characterization of four

interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas spec.* DSM 2874 grown on n-alkanes. *Z Naturforsch C* **40**, 51-60.

Teintze, M., Hossain, M. B., Barnes, C. L., Leong, J. & van der Helm, D. (1981). Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* **20**, 6446-6457.

Tiburzi, F., Imperi, F. & Visca, P. (2008). Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **67**, 213-227.

Toder, D. S., Ferrell, S. J., Nezezon, J. L., Rust, L. & Iglewski, B. H. (1994). *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect Immun* **62**, 1320-1327.

Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **9**, 73-90.

Tyndall, J. D., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L. A., Taylor, P. & Walkinshaw, M. D. (2002). Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J Mol Biol* **323**, 859-869.

Ulmer, A. J., Pryjma, J., Tarnok, Z., Ernst, M. & Flad, H. D. (1990). Inhibitory and stimulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanine on human T and B lymphocytes and human monocytes. *Infect Immun* **58**, 808-815.

Upton, C. & Buckley, J. T. (1995). A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem Sci* **20**, 178-179.

Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**, 551-560.

van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K. E. & Dijkstra, B. W. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol* **309**, 215-226.

Vasil, M. L. & Ochsner, U. A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**, 399-413.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W. & other authors (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.

Venturi, V. (2004). Compiling extracytoplasmic function (ECF) Sigma factors regulated promoters in *Pseudomonas*. In: *Pseudomonas*, Volume 2. Edited by J.-L. Ramos. N. Y. Kluwer Academic

Viducic, D., Ono, T., Murakami, K., Katakami, M., Susilowati, H. & Miyake, Y. (2007). *rpoN* gene of *Pseudomonas aeruginosa* alters its susceptibility to quinolones and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1455-1462.

Vinckx, T., Matthijs, S. & Cornelis, P. (2008). Loss of the oxidative stress regulator OxyR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 impairs growth under iron-limited conditions. *FEMS Microbiol Lett* **288**, 258-265.

Visca, P., Leoni, L., Wilson, M. J. & Lamont, I. L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **45**, 1177-1190.

Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **15**, 22-30.

- Wang, L. H., He, Y., Gao, Y. & other authors (2004).** A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* **51**, 903-912.
- Westermeyer, R. & Schickle, H. (2009).** The current state of the art in high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Arch Physiol Biochem* **115**, 279-285.
- Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999).** Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13904-13909.
- Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z., Wilson, M. J., Cunliffe, H. E., Lamont, I. L. & Vasil, M. L. (2001).** Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **69**, 5385-5394.
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F. & Jaeger, K. E. (2007).** The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* **189**, 6695-6703.
- Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H. & Jaeger, K. E. (2007).** Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem* **8**, 55-60.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, r. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L. & Hochstrasser, D. F. (1996).** From Proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N. Y.)*, **14**, 61-65.
- Wilson, K. J. (1989).** Micro-level protein and peptide separations. *Trends Biochem Sci* **14**, 252-255.
- Wilson, M. J. & Lamont, I. L. (2000).** Characterization of an ECF sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 578-583.
- Wilson, M. J., McMorran, B. J. & Lamont, I. L. (2001).** Analysis of promoters recognized by PvdS, an extracytoplasmic-function sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 2151-2155.
- Wimpenny, J., Manz, W. & Szewzyk, U. (2000).** Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 661-671.
- Winkler, H. (1920).** Verbreitung und Ursache der Parthenogenesis im Pflanzen- und Tierreich. Verlag Fischer, Jena.
- Winkler, U. K. & Stuckmann, M. (1979).** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**, 663-670.
- Winkler, U., Wingender, J. & Jager, K. E. (1985).** [Infections of the respiratory tract with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis]. *Klin Wochenschr* **63**, 490-498.
- Winsor, G. L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M. D., Hancock, R. E. & 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. & 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.

Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. & Winkler, U. K. (1992). Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Gen Microbiol* **138**, 1325-1335.

Wolz, C., Hohloch, K., Ocaktan, A., Poole, K., Evans, R. W., Rochel, N., Albrecht-Gary, A. M., Abdallah, M. A. & Doring, G. (1994). Iron release from transferrin by pyoverdine and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **62**, 4021-4027.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469-3478.

Xiong, Y. Q., Vasil, M. L., Johnson, Z., Ochsner, U. A. & Bayer, A. S. (2000). The oxygen- and iron-dependent sigma factor *pvdS* of *Pseudomonas aeruginosa* is an important virulence factor in experimental infective endocarditis. *J Infect Dis* **181**, 1020-1026.

Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T. & McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4035-4039.

Yeterian, E., Martin, L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L. & Schalk, I. J. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **38**, 1447-1459.

Zhu, K. & Rock, C. O. (2008). RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**, 3147-3154.

Zulianello, L., Canard, C., Kohler, T., Caille, D., Lacroix, J. S. & Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**, 3134-3147.

7. Anhang

Tab. A1: Identifizierte Proteine der „master map“ von *P. putida*. Gen Nr. beziehen sich auf die Pseudomonas Datenbank (Pseudomonas.com).

Spot Nr.	Gen Nr.	Spot Nr.	Gen Nr.	Spot Nr.	Gen Nr.	Spot Nr.	Gen Nr.
1	PP_5026	37	PP_1726	73	PP_4722	109	PP_1486
2	PP_1856	38	PP_4881	74	PP_3754	110	PP_3070
3	PP_2901	39	PP_5196	75	PP_4383	111	PP_4305
4	PP_2901	40	PP_1429	76	PP_2453	112	PP_4669
5	PP_2089	41	PP_1297	77	PP_2453	113	PP_4666
6	PP_1031	42	PP_4215	78	PP_3511	114	PP_4217
7	PP_4187	43	PP_4201	79	PP_3552	115	PP_4217
8	PP_1031	44	PP_1555	80	PP_3801	116	PP_4345
9	PP_5413	45	PP_4345	81	PP_0581	117	PP_4217
10	PP_0931	46	PP_4486	82	PP_2137	118	PP_4217
11	PP_1232	47	PP_3804	83	PP_4659	119	PP_4217
12	PP_1430	48	PP_1638	84	PP_0237	120	PP_4217
13	PP_4519	49	PP_1184	85	PP_3954	121	PP_4217
14	PP_1184	50	PP_4689	86	PP_1071	122	PP_0350
15	PP_4519	51	PP_0112	87	PP_1071	123	PP_4727
16	PP_4923	52	PP_4115	88	PP_0824	124	PP_4179
17	PP_4519	53	PP_0227	89	PP_2287	125	PP_0765
18	PP_1001	54	PP_5165	90	PP_2453	126	PP_2089
19	PP_1206	55	PP_4460	91	PP_1071	127	PP_4378
20	PP_0944	56	PP_1317	92	PP_1211	128	PP_0765
21	PP_0883	57	PP_0961	93	PP_4981	129	PP_1361
22	PP_0268	58	PP_1594	94	PP_4981	130	PP_2901
23	PP_1206	59	PP_4428	95	PP_4506	131	PP_3804
24	PP_0268	60	PP_3611	96	PP_1185	132	PP_4217
25	PP_1612	61	PP_4138	97	PP_2903	133	PP_2195
26	PP_0452	62	PP_3587	98	PP_4366	134	PP_5271
27	PP_0542	63	PP_4722	99	PP_4366	135	PP_2334
28	PP_5085	64	PP_1982	100	PP_5271	136	PP_1237
29	PP_2089	65	PP_1360	101	PP_5271	137	PP_1084
30	PP_4772	66	PP_1211	102	PP_0837	138	PP_2089
31	PP_2089	67	PP_1084	103	PP_3681	139	PP_0837
32	PP_4960	68	PP_1084	104	PP_5181	140	PP_1000
33	PP_4867	69	PP_0538	105	PP_0944	141	PP_1215
34	PP_5145	70	PP_1215	106	PP_1000	142	PP_2439
35	PP_1141	71	PP_2163	107	PP_3070	143	PP_2543
36	PP_2089	72	PP_2472	108	PP_4867		

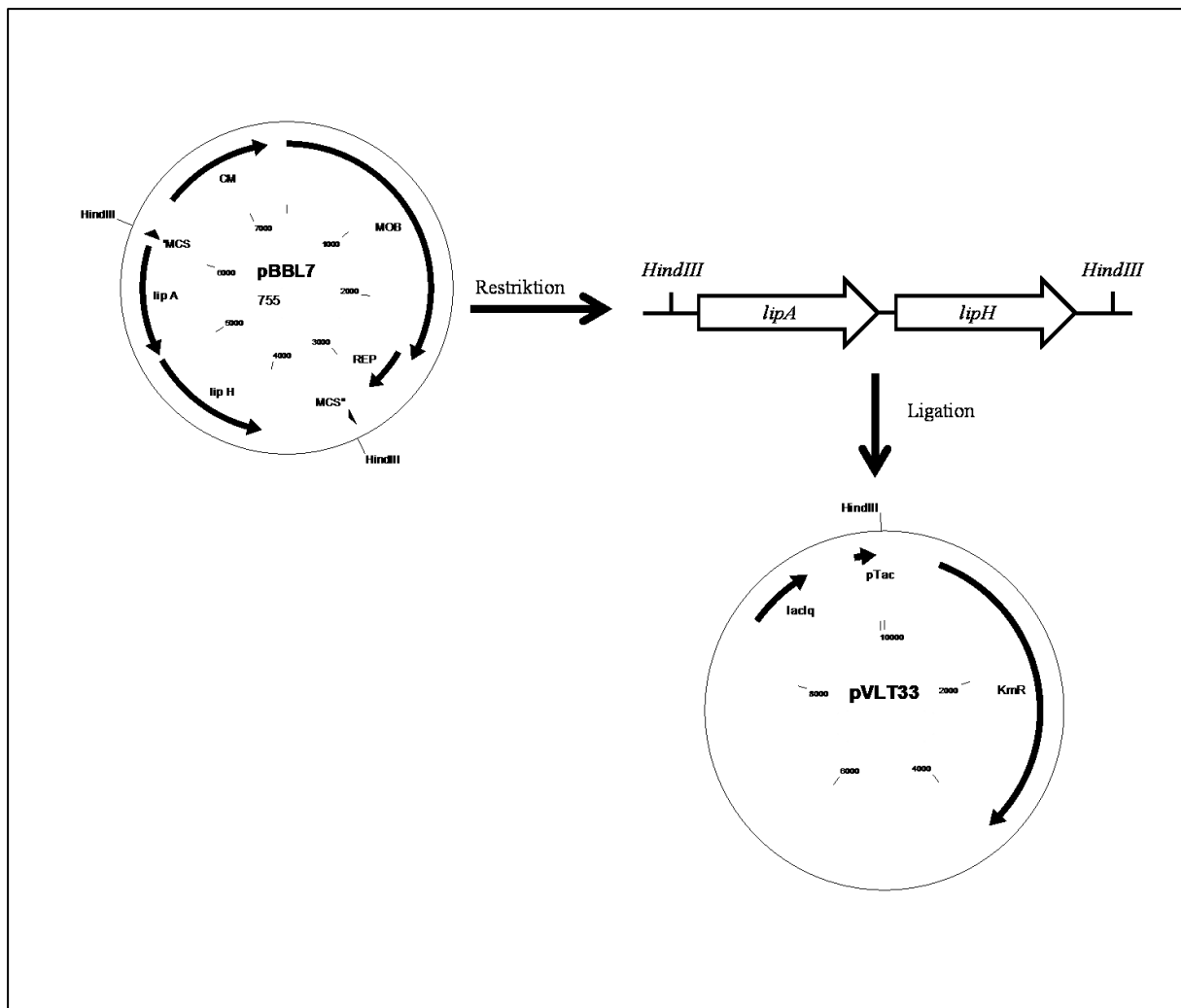


Abb. 7.1: Klonierung des *lipAH*-Operons in den Expressionsvektor pVLT33. Zur Isolierung des *lipAH*-Operons wurde der Vektor pBBL7 mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* hydrolysiert und das gewonnene Fragment in den ebenfalls mit *HindIII* hydrolysierten Vektor pVLT33 ligiert.

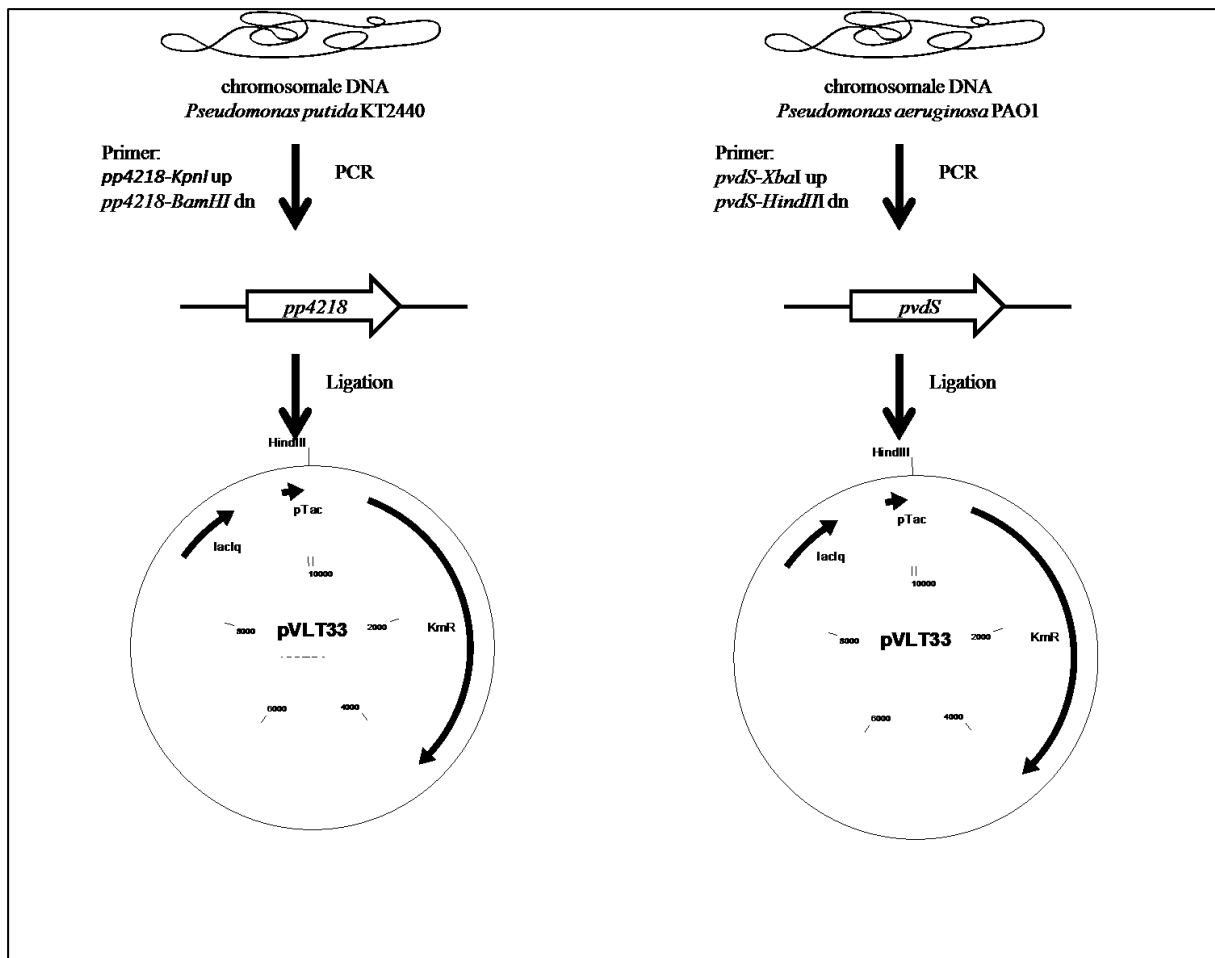


Abb. 7.2: Klonierung der Expressionsvektoren pVLT-4218 und pVLT-pvdS. Zur Erlangung des *pp4218* Gens wurde die chromosomale DNA von *P. putida* isoliert und das *pp4218* Gen mittels PCR und spezifischen Primern amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde anschließend durch die Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *BamHI* hydrolysiert und in den ebenfalls hydrolysierten Vektor pVLT33 ligiert. Zur Isolierung des *pvdS* Gens wurde die chromosomale DNA von *P. aeruginosa* isoliert und das *pvdS* Gen mittels PCR und spezifischen Primern amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde anschließend durch die Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII* hydrolysiert und in den ebenfalls hydrolysierten Vektor pVLT33 ligiert.

Name: Funken
Vorname: Horst
geboren am: 18.03.1982
Geburtsort: Nettetal-Breyell
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1989 – 1991 Gemeinschaftsgrundschule Nettetal-Lobberich
1991 – 2001 Gesamtschule Brüggen-Bracht
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

2001 – 2007 **Biologie Studium** an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Schwerpunkte: Mikrobiologie
Biotechnologie

2007 Abschluss des Studiums mit Diplom
Thema : „Oberflächendisplay biotechnologisch relevanter Proteine“. Institut für Molekulare Enzymtechnologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

seit 04/2007: Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: „Physiologische und regulatorische Konsequenzen der Überproduktion einer Lipase in *Pseudomonas*.“

Anstellungen:

04/2007-10/2010 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** im Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

08/2006-03/2010 **Wissenschaftliche Hilfskraft** im Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Düsseldorf, den 29.10.2010

Horst Funken