



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Biochemische und physiologische Charakterisierung
der Subtilase SprP aus *Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Alexander Pelzer

aus Viersen

Düsseldorf, November 2013



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Biochemische und physiologische Charakterisierung
der Subtilase SprP aus *Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Alexander Pelzer

aus Viersen

Düsseldorf, November 2013

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

Danksagung

Allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich danken.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Karl-Erich Jaeger, der mir diese Arbeit ermöglichte, sie durch kontinuierliche Anregungen und Diskussionen förderte und mich bei der Veröffentlichung meiner Ergebnisse unterstützte. Dankbar bin ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie.

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

Dem *CLIB-Graduate Cluster Industrial Biotechnology* sage ich Dank für mein Promotionsstipendium. Frau Dr. Sonja Meyer zu Berstenhorst und Frau Dr. Jessica Hilbig spreche ich meinen Dank für die engagierte Koordination und große Hilfsbereitschaft aus.

Herrn Dr. Horst Funken und Frau Dr. Susanne Wilhelm bin ich zu Dank verpflichtet für ihre hilf- und ideenreiche Unterstützung bei der Realisierung meiner Arbeit sowie für die Durchsicht des Manuskriptes. Bei Herrn Dr. Filip Kovačić und Herrn Dr. Frank Rosenau bedanke ich mich für zahlreiche konstruktive Diskussionen.

Ein großes Dankeschön richtet sich an Herrn Dr. Christian Schwarz (Lehrstuhl für Biochemie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) für sein großes Engagement rund um die Experimente mit dem Typ I-Sekretionssystem und die hervorragende Zusammenarbeit. Weiterhin danke ich Herrn Fabian Schulte (CeBiTec, Universität Bielefeld) für seine Unterstützung bezüglich der DNA-Affinitätschromatographie und Herrn Dr. Frank Bernhard (Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Frankfurt am Main) für die Durchführung der zellfreien Expressionsstudien.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tino Polen (IBG-1, Forschungszentrum Jülich) für die Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Transkriptomanalysen sowie für seine Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragestellungen darüber hinaus. Ich danke weiterhin Frau Dr. Melanie Bocker und Frau Christina Mack (IBG-1, Forschungszentrum Jülich) für die Analyse zahlreicher Proben mittels MALDI-TOF-MS.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie für die angenehme und freundliche Atmosphäre danken. Im Einzelnen: Frau Astrid Wirtz danke ich herzlich für die Unterstützung bei den HPLC-Analysen, Frau Sarah Rennertz für ihre helfende Hand während der Zeit im Labor und Herrn Dr. Stephan Thies für seine ständige Hilfsbereitschaft. Des Weiteren möchte ich meinen Studenten Dank sagen, insbesondere Frau Katrin Pünder und Herrn Sven Reimann, die zu dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem sei Herrn Alexander Fulton für viele wertvolle Tipps und dem Laborchef Herrn Marko Laschinski für die engagierte Unterstützung bei der Laborarbeit gedankt. Besonderer Dank gilt Herrn Andreas Knapp für die ständige Diskussionsbereitschaft und die tolle gemeinsame Zeit seit dem ersten Semester.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, die beizeiten immer wieder für erforderliche Abwechslungen sorgten.

Mein innigster Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Irma für ihr Weggeleit und ihre unermüdliche Unterstützung.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Publikationen

Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F., Wilhelm, S. (2010). Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mendez-Vilas, A. (ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Vol. 1. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 383-395.

Pelzer, A., Polen, T., Funken, H., Rosenau, F., Wilhelm, S., Bott, M., Jaeger, K.-E. (2013). Subtilase SprP exerts pleiotropic effects in *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, DOI: 10.1002/mbo3.150.

Pelzer, A., Schwarz, C., Smits, S., Wirtz, A., Wilhelm, S., Schmitt, L., Funken, H., Jaeger, K.-E. (2014). Functional expression, purification and biochemical properties of the subtilase SprP from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* (Manuskript in Vorbereitung).

Vorträge

Pelzer, A., Funken, H., Thies, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Rosenau, F. (2010). Pseudomonads as versatile expression hosts. DEHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen.

Pelzer, A., Funken, H., Polen, T., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2013). Subtilase SprP regulates virulence phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Bremen.

Posterpräsentationen

Pelzer, A., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Wilhelm, S. Characterization of a novel subtilisin-like serine protease of *Pseudomonas aeruginosa*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Karlsruhe (2011).

Pelzer, A., Serci, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Wilhelm, S. Two novel subtilases influence virulence associated phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V., Essen (2011).

Knapp, A., Pelzer, A., Hahn, R., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. Utilization of metabolic regulation for the production of heterologous proteins in *Burkholderia glumae*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Tübingen (2012).

Pelzer, A., Laschinski, M., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Wilhelm, S. The novel subtilase SprP influences the lifestyle of *Pseudomonas aeruginosa*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Tübingen (2012).

Pelzer, A., Funken, H., Polen, T., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. Subtilase SprP influence in *Pseudomonas aeruginosa* virulence phenotypes. 14th International Conference on *Pseudomonas*, Lausanne (2013).

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungen	X
1 Einleitung	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1 Regulation der Genexpression	3
1.1.2 Biofilmproduktion und Zellaggregation	5
1.1.3 Rhamnolipide	6
1.1.4 Die Beweglichkeit von <i>P. aeruginosa</i>	8
1.1.5 Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen	9
1.1.6 Das Siderophor Pyoverdin	11
1.2 Die Bedeutung der Proteasen	12
1.2.1 Serinproteasen	14
1.2.2 Subtilisin-ähnliche Serinproteasen (Subtilasen)	16
1.2.3 Proteolyse als Regulationsmechanismus in Gram-negativen Bakterien	17
1.3 Die Bedeutung der <i>P. aeruginosa</i> -Proteasen	19
1.4 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Bakterienstämme	22
2.2 Plasmide	23
2.3 Oligonukleotide	25
2.4 Kultivierung von Bakterien	27
2.4.1 Nährmedien	27
2.4.2 Antibiotika	28
2.4.3 Wachstumsbedingungen	28
2.4.4 Anaerobe Kultivierung von Bakterien	29
2.4.5 Kultivierung in Überexpressionskulturen	29
2.4.6 Kultivierung in Überexpressionskulturen für die Sekretion mittels HlyA T1SS	30
2.5 Konservierung von Bakterien	30
2.6 Qualitative Messung der Zellaggregation	30
2.7 Qualitative und quantitative Messung des Biofilms	30

2.8	Plattentests zur Analyse der Beweglichkeit von <i>P. aeruginosa</i>	31
2.8.1	Schwärmen	31
2.8.2	Schwimmen	31
2.8.3	<i>Twitching motility</i>	31
	DNA Techniken	31
2.9	Nukleinsäureextraktion.....	31
2.10	Bestimmung der DNA-Konzentration	31
2.11	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.12	Rekombination von DNA <i>in vitro</i>	32
2.13	Transformation von Bakterienzellen.....	32
2.13.1	Herstellung chemisch transformationskompetenter Zellen	32
2.13.2	Transformation chemisch transformationskompetenter Zellen	33
2.14	Elektroporation von Bakterien.....	33
2.14.1	Herstellung elektrokompeter Zellen	33
2.14.2	Transformation elektrokompeter Zellen.....	33
2.15	Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	33
2.16	Konstruktion von Deletionsmutanten.....	34
2.17	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
2.17.1	Standard-PCR.....	35
2.17.2	<i>Touchdown</i> PCR	35
2.17.3	Ortsspezifische Mutagenese durch <i>QuikChange</i> [®] PCR	35
2.17.4	<i>Real-time</i> PCR	36
2.17.4.1	Relative Quantifizierung	36
2.17.4.2	Absolute Quantifizierung.....	37
2.17.5	Reinigung von PCR-Produkten.....	37
2.18	Sequenzierung von DNA.....	37
2.19	DNA-Affinitätschromatographie	37
2.19.1	Immobilisierung biotinylierter DNA-Fragmente.....	37
2.19.2	Anreicherung DNA-bindender Proteine	38
	RNA Techniken	39
2.20	Isolierung bakterieller Gesamt-RNA.....	39
2.21	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	39
2.22	Reverse Transkription von RNA	39
2.23	Transkriptomanalyse (DNA-Chip-Technologie).....	39
2.23.1	DNA-Chip-Design	39
2.23.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	40

2.23.3	DNA-Chip-Hybridisierung.....	40
2.23.4	Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von DNA-Chips.....	40
2.23.5	Datenanalyse	40
	Proteinbiochemische Techniken	41
2.24	Zellaufschluss zur Proteinisolierung.....	41
2.25	Gewinnung von Kulturüberständen.....	41
2.26	Präzipitation von Proteinen durch Trichloressigsäure.....	41
2.27	Löslichkeitsanalyse von Proteinen	42
2.28	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)	42
2.29	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.30	Proteaselagerung	43
2.31	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	43
2.32	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.33	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gele).....	45
2.33.1	Probenvorbereitung	45
2.33.2	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	45
2.33.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2. Dimension)	46
2.33.4	Datenanalyse	46
2.34	MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)	46
2.34.1	Tryptischer Verdau von Proteinen (in-Gel).....	46
2.34.2	Bestimmung der Peptidmassen.....	47
2.35	Enzymaktivitätstests	47
2.35.1	Proteaseaktivität: Zymographie	47
2.35.2	Proteaseaktivität: Resorufin-markiertes Casein	47
2.35.2.1	Temperaturabhängige Proteaseaktivität.....	48
2.35.2.2	pH-Wert-abhängige Proteaseaktivität.....	49
2.35.2.3	Bestimmung der Aktivität von Proteaseinhibitoren	49
2.35.3	Proteaseaktivität: Analyse einer Peptidbibliothek	49
2.35.4	β -Galaktosidaseaktivität: ONPG-Test	50
2.36	Nachweis von Rhamnolipiden.....	51
2.36.1	Extraktion von Rhamnolipiden	51
2.36.2	Quantifizierung von Rhamnolipiden.....	51
2.36.3	Dünnschichtchromatographie	51
2.37	Qualitative und quantitative Messung der Pyoverdine	52
2.38	Computerprogramme und Datenbanken	52

3	Ergebnisse.....	53
3.1	Identifizierung der Multidomänenstruktur von SprP.....	53
3.1.1	SprP zeigt Homologie zur Familie der E-H-S Subtilasen	53
3.1.2	Homologe Proteine stammen nahezu ausschließlich aus der Gattung <i>Pseudomonas</i>	56
3.2	Homologe und heterologe T7-Überexpression von <i>sprP</i> führt zur Bildung von <i>inclusion bodies</i>	57
3.3	Die Konstruktion eines SprP-Fusionsproteins ermöglicht die Sekretion über das HlyA Typ I-Sekretionssystem in <i>E. coli</i>	60
3.3.1	Sekretion des SprP-Fusionsproteins in löslicher und aktiver Form	61
3.3.2	Etablierung einer Methode für die Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem <i>E. coli</i> -Überstand	63
3.4	SprP wird durch autokatalytische Prozessierung aktiviert	65
3.4.1	SprP wird als Zymogen produziert.....	65
3.4.2	Aktives SprP besitzt ein Molekulargewicht von 26 kDa	68
3.5	Die Aktivität von SprP ist abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert	72
3.5.1	SprP besitzt ein Temperaturoptimum von 50 °C.....	73
3.5.2	SprP besitzt ein pH-Wert-Optimum von 7 - 8.....	74
3.6	Serinproteaseinhibitoren reduzieren die Aktivität von SprP	74
3.7	SprP präferiert die Spaltung basischer und hydrophober Peptide	76
3.8	SprP gehört zu der Familie der E-H-S Subtilasen	80
3.9	Teildeletionen des SprP-Proteins führen zur Inaktivierung	81
3.10	Identifizierung regulatorischer Faktoren der <i>sprP</i> -Genexpression.....	83
3.10.1	HexR ist ein potenzieller Transkriptionsregulator der Genexpression.....	86
3.10.2	Die Promotoraktivität von <i>sprP</i> ist hitzeinduziert	90
3.11	Die <i>sprP</i> -Deletion verursacht pleiotrope Effekte in <i>P. aeruginosa</i>	92
3.11.1	<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i> bildet starke Zellaggregate	92
3.11.2	<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i> produziert verstärkt Biofilme	93
3.11.3	<i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i> ist unbeweglich.....	95
3.12	Die SprP-Aktivität ist Voraussetzung für die Komplementation von <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i>	97
3.13	Die <i>sprP</i> -Deletion führt zu zahlreichen Änderungen im Proteom von <i>P. aeruginosa</i>	100
3.13.1	Quantitative Änderungen von Proteinen des Kohlenhydratmetabolismus	100
3.13.2	Quantitative Änderungen zahlreicher extrazellulärer Proteasen	102
3.14	Die <i>sprP</i> -Deletion führt zu zahlreichen Änderungen im Transkriptom von <i>P. aeruginosa</i>	103

3.14.1	Gene mit verringertem relativen mRNA-Spiegel beeinflussen die Denitrifikation von <i>P. aeruginosa</i>	105
3.14.1.1	Die Gene der Denitrifikation werden unter aeroben Bedingungen transkribiert	106
3.14.1.2	<i>P. aeruginosa</i> $\Delta sprP$ besitzt ein Wachstumsdefizit unter anaeroben Bedingungen	108
3.14.1.3	Stickstoffmonoxid komplementiert die Zellaggregation von <i>P. aeruginosa</i> $\Delta sprP$	109
3.14.2	Gene mit erhöhtem relativen mRNA-Spiegel beeinflussen die Synthese von Sekundärmetaboliten	110
3.14.2.1	<i>P. aeruginosa</i> $\Delta sprP$ weist eine erhöhte Rhamnolipidproduktion auf	111
3.14.2.2	<i>P. aeruginosa</i> $\Delta sprP$ weist eine erhöhte Pyoverdininproduktion auf.....	113
4	Diskussion	116
4.1	Produktion, Reinigung und Prozessierung der Subtilase SprP.....	116
4.2	Charakterisierung biochemischer Eigenschaften von SprP	123
4.3	Untersuchungen zur Regulation der <i>sprP</i> -Expression	128
4.4	Physiologische Konsequenzen der <i>sprP</i> -Deletion	133
5	Zusammenfassung	150
6	Summary	152
7	Literatur.....	154
8	Anhang	174

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Hierarchische Organisation des Las- und Rhl-Systems in <i>P. aeruginosa</i>	4
Abb. 1.2	Struktur der Mono- und Di-Rhamnolipide aus <i>P. aeruginosa</i>	7
Abb. 1.3	Schematische Übersicht über die Gene und Proteine der Denitrifikation sowie der Denitrifikation-Regulation.....	10
Abb. 1.4	Schematische Übersicht des Pyoverdinin-Signalwegs.....	12
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von Serinproteasen.	15
Abb. 3.1	Schematische Darstellung der identifizierten Domänen in der Aminosäuresequenz von SprP.	54
Abb. 3.2	Strukturhomologiemodell von SprP.	55
Abb. 3.3	SDS-PAGE-Analyse der T7-abhängigen Überexpression von <i>sprP</i> in diversen Expressionsstämmen.....	58
Abb. 3.4	SDS-PAGE-Analyse der T7-abhängigen Überexpression von <i>sprPΔduf</i> und <i>sprPΔs8</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	59
Abb. 3.5	Schematische Darstellung des konstruierten SprP-Fusionsproteins für die Proteinsekretion mit dem HlyA T1SS in <i>E. coli</i>	61
Abb. 3.6	Proteaseaktivität im Überstand von <i>E. coli</i> nach der Expression von <i>sprP-hlyA1</i>	62
Abb. 3.7	SDS-PAGE-Analyse einer Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem <i>E. coli</i> -Überstand.....	64
Abb. 3.8	Zunahme der proteolytischen Aktivität von SprP im Verlauf der Inkubation bei 8 °C.....	65
Abb. 3.9	Induktion der Aktivierung des Vorläufer-SprP durch aktives SprP.....	66
Abb. 3.10	SDS-PAGE-Analyse der durch autokatalytische Prozessierung entstehenden Proteinfragmente.	67
Abb. 3.11	Identifizierung des aktiven SprP mittels Größenausschlusschromatographie.....	69
Abb. 3.12	Standardgerade für die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes des aktiven SprP.	70
Abb. 3.13	Identifizierung des aktiven SprP mittels Zymographie.....	71
Abb. 3.14	Zeitaufgelöste Hydrolyse von Resorufin-markiertem Casein durch SprP.	72
Abb. 3.15	Temperaturabhängige Aktivität von SprP.	73
Abb. 3.16	pH-Wert-abhängige Aktivität von SprP.	74
Abb. 3.17	Inhibitorische Wirkung verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Aktivität von SprP.....	75

Abb. 3.18	Fluoreszenzmessung einer Peptidmischung und Bestimmung der Fluoreszenzzunahme pro Minute.....	77
Abb. 3.19	Identifizierung von SprP-Substraten.	78
Abb. 3.20	Sequenzlogo der Tripeptide der identifizierten Peptidmischungen.	79
Abb. 3.21	SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP sowie die Analyse der proteolytischen Aktivität.	80
Abb. 3.22	SDS-PAGE-Analyse der Reinigung der SprP-Deletionsvarianten SprP Δ S8-FP und SprP Δ DUF-FP sowie Analyse der proteolytischen Aktivität.	82
Abb. 3.23	Übersicht über die reverse Transkription mit anschließender PCR zum Nachweis von <i>pa1241</i> und <i>sprP</i> -Transkripten.	84
Abb. 3.24	Promotoraktivität der beiden Gene <i>sprP</i> und <i>pa1241</i> in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sowie des Gens <i>sprP</i> in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>pa1241</i>	85
Abb. 3.25	SDS-PAGE-Analyse der mittels DNA-Affinitätschromatographie isolierten DNA-bindenden Proteine.	87
Abb. 3.26	Identifizierung einer HexR-Bindestelle in der Intergen-Region von <i>pa1240</i> und <i>pa1241</i>	88
Abb. 3.27	Visualisierung der Zellaggregation in Flüssigkulturen hervorgerufen durch die Überexpression des <i>hexR</i> -Gens.	90
Abb. 3.28	Promotoraktivität von <i>sprP</i> in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 bei 37 °C und 43 °C.	91
Abb. 3.29	Zellaggregation von <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i> in Flüssigkulturen.	93
Abb. 3.30	Mikroskopische Betrachtung von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i>	93
Abb. 3.31	Qualitativer und quantitativer Nachweis der Biofilmproduktion von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i>	94
Abb. 3.32	Plattentests zur Analyse der Bewegungsformen von <i>P. aeruginosa</i>	96
Abb. 3.33	Zellaggregation von <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i> nach der Expression verschiedener <i>sprP</i> -Varianten.	98
Abb. 3.34	Biofilmproduktion von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i> nach der Expression verschiedener <i>sprP</i> -Varianten.	99
Abb. 3.35	2D-Gel des intrazellulären Proteoms und Darstellung der identifizierten Proteine mit Änderungen der relativen Proteinmenge.	101
Abb. 3.36	2D-Gel des extrazellulären Sekretoms und Darstellung der identifizierten Proteine mit Änderungen der relativen Proteinmenge.	102
Abb. 3.37	COG-Klassifizierung aller Genprodukte, deren Gene veränderte relative mRNA-Spiegel aufweisen.	104
Abb. 3.38	Quantifizierung der <i>nark1</i> -, <i>nirS</i> - und <i>nosZ</i> -Transkription mittels <i>real-time</i> PCR.	107
Abb. 3.39	Wachstumsdefizit von <i>P. aeruginosa</i> unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen.	108

Abb. 3.40	Zellaggregation von <i>P. aeruginosa</i> $\Delta sprP$ in LB-Medium mit und ohne Zugabe von Natrium-Nitroprussid.	109
Abb. 3.41	Quantifizierung der Rhamnolipide mittels Orcinol-Test.	112
Abb. 3.42	Dünnschichtchromatographie zur Darstellung der Rhamnolipid-Spezies aus <i>P. aeruginosa</i>	113
Abb. 3.43	Qualitative und quantitative Analyse der Pyoverdine verschiedener <i>P. aeruginosa</i> -Stämme.	114
Abb. 4.1	Schematische Darstellung der Prozessierung und der Eigenschaften der Subtilase SprP.	127
Abb. 4.2	Modell der Expression und Regulation von <i>pa1241</i> und <i>sprP</i>	132
Abb. 4.3	Modell der Denitrifikation in <i>P. aeruginosa</i> $\Delta sprP$	141
Abb. 4.4	Modell der Pyoverdinproduktion in <i>P. aeruginosa</i> $\Delta sprP$	146
Abb. 4.5	Schematische Darstellung der Auswirkungen der <i>sprP</i> -Deletion in <i>P. aeruginosa</i>	148
Abb. 8.1	Aminosäuresequenz des SprP-Fusionsproteins für die Sekretion über das HlyA T1SS in <i>E. coli</i>	175

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.....	22
Tab. 2.2	Übersicht über die verwendeten Plasmide.....	23
Tab. 2.3	Übersicht über die rekombinanten Plasmide.....	23
Tab. 2.4	Oligonukleotide für die Konstruktion rekombinanter Plasmide.....	25
Tab. 2.5	Oligonukleotide für die DNA-Affinitätschromatographie.....	26
Tab. 2.6	Oligonukleotide für <i>QuikChange</i> [®] PCR.....	26
Tab. 2.7	Oligonukleotide für reverse Transkriptionen und <i>real-time</i> PCR.....	27
Tab. 2.8	Endkonzentrationen der Antibiotika für verschieden Stämme.....	28
Tab. 2.9	Bedingungen der Standard-PCR.....	35
Tab. 2.10	Bedingungen der <i>QuikChange</i> [®] PCR.....	36
Tab. 2.11	Einstellungen für die isoelektrische Fokussierung.....	46
Tab. 2.12	Übersicht der verwendeten Proteaseinhibitoren.....	49
Tab. 3.1	Ausgewählte Gene mit verringerten relativen mRNA-Spiegeln in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i>	105
Tab. 3.2	Ausgewählte Gene mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i>	110
Tab. 8.1	Übersicht über DUF-homologe Proteine.....	174
Tab. 8.2	Übersicht über die intrazellulären Proteine mit veränderten relativen Proteinmengen.....	176
Tab. 8.3	Übersicht über die extrazellulären Proteine mit veränderten relativen Proteinmengen.....	177
Tab. 8.4	Übersicht über alle Gene mit verringerten relativen mRNA-Spiegeln in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i>	178
Tab. 8.5	Übersicht über alle Gene mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln in <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i>	180

Abkürzungen

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten. Die Aminosäuren wurden im Einbuchstaben- bzw. Dreibuchstabencode nach IUPAC abgekürzt.

2D	Zweidimensional
A	Ampere
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> ; destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i> ; ATP-bindende Kasette
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensusfonylfluorid
AHL	<i>N</i> -Acyl-Homoserin-Lacton
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary unit</i> ; beliebige Einheit
bp	Basenpaar(e)
Cb	Carbenicillin
CECF	<i>continuous exchange cell free</i> ; kontinuierlicher Austausch zellfrei
CF	Cystische Fibrose
Cm	Chloramphenicol
COG	<i>clusters of orthologous groups</i> ; Cluster orthologer Gruppen
CP	Cytoplasma
Ct	<i>cycle threshold</i> ; Schwellenwert-Zyklus
C-Terminus	Carboxyterminus
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (cDNA, eDNA)	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA, extrazelluläre DNA)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPA	3-(2,4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionsäure
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
DTT	Dithiothreitol
DUF	Domäne unbekannter Funktion
EC	<i>enzyme commission</i> ; Enzym-Kommission
ECF	extracytoplasmatische Funktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPG	Eppendorfgefäß
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FP	Fusionsprotein
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g (mg, µg)	Gramm (Milli-, Mikro-)
Gm	Gentamicin
GOI	<i>gene(s) of interest</i> ; Gen(e) von Interesse
GZE	Gesamtzellextrakt
h	<i>hour(s)</i> ; Stunde(n)

HAA	3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)alkanoat
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> ; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEF	isoelektrische Fokussierung
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat
kPa	Kilopascal
KÜ	Kulturüberstand
l (ml, μ l)	Liter (Milli-, Mikro-)
λ	Wellenlänge
LC/MS	<i>liquid chromatography/mass spectrometry</i> ; Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie
LV	Leervektor
m (μ m, nm)	Meter (Mikro-, Nano-)
M	molar
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i> ; Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation - Flugzeit
MCA	7-Methoxycoumarin-4-Acetyl
MCS	<i>multiple cloning site</i> ; Polylinker
min	Minute(n)
Mol (pmol, nmol)	Mol (Piko-, Nano-)
NaDOC	Natriumdesoxycholat
NTA	<i>nitrilotriacetic</i> ; Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
O.D.	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid
ORF(s)	<i>open reading frame(s)</i> ; offene(r) Leserahmen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
<i>Plac</i>	Promotor des <i>lacZYA</i> -Operons
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Periplasma
PQS	<i>Pseudomonas quinolone signal</i> ; <i>Pseudomonas</i> -Chinolone-Signal
Pvd	Pyoverdin
QS	<i>Quorum sensing</i>
RL	Rhamnolipid
RNA (mRNA)	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure (messenger RNA; Boten-RNA)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> ; Größenausschlusschromatographie
SNP	<i>sodium nitroprusside</i> ; Natrium-Nitroprussid
SS	Signalsequenz
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> ; Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin

TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanylchloromethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i> ; Enzymeinheit
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V (Vh)	Volt (Voltstunden)
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Die Gattung *Pseudomonas* wurde erstmals 1894 von Walter Migula¹ beschrieben. Phylogenetisch wird die Gattung *Pseudomonas* der Familie der *Pseudomonaceae*, einer heterologen Gruppe der *Proteobacteria*, zugeordnet². Pseudomonaden sind Gram-negative, nichtsporenbildende Bakterien, die sich durch ihre Oxidaseaktivität von den Enterobakterien unterscheiden³. Die chemoorganotrophen Pseudomonaden sind in der Lage, eine Vielzahl organischer Substrate wie heterozyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe zu metabolisieren⁴. Diese Fähigkeit, zahlreiche organische Substrate für die Energiegewinnung nutzen zu können und die Anpassungsfähigkeit dieses anspruchslosen Organismus an diverse Umweltbedingungen, macht die Gattung *Pseudomonas* zu einem ubiquitär verbreiteten Bakterium^{5,6}. Innerhalb der Gattung *Pseudomonas* existieren verschiedene Vertreter, die von besonderer Bedeutung sind. Zu diesen zählen der biotechnologisch relevante Stamm *Pseudomonas putida* KT2440, der pflanzenpathogene Stamm *Pseudomonas syringae* und der humanpathogene Erreger *Pseudomonas aeruginosa*⁷⁻⁹.

Innerhalb der *Proteobacteria* wird *P. aeruginosa* aufgrund von 16S-rRNA-Homologievergleichen den γ -*Proteobacteria* zugeordnet¹⁰. Bei *P. aeruginosa* handelt es sich um ein stäbchenförmiges, polar begeißeltes Bakterium mit einer Breite von 0,5 - 0,8 μm und einer Länge 1,5 - 3,0 μm . Seinen Namen verdankt *P. aeruginosa* (*aerugo*, lat. = Grünspan) der charakteristischen grünen Farbe dieser Spezies, die durch die Produktion der fluoreszierenden Pigmente Pyocyanin (blaugrün) und Pyoverdin (grüngelb) zustande kommt¹¹⁻¹³. Das natürliche Habitat von *P. aeruginosa* umfasst Böden, Sümpfe sowie pflanzliche und tierische Gewebe^{14,15}.

Das Genom von *P. aeruginosa* wurde vollständig sequenziert und im Jahr 2000 publiziert¹⁵. Mit 6,3 Millionen Basenpaaren und 5570 Genen zählt das Genom zu den größeren bekannten bakteriellen Genomen. Die Mehrheit der ORFs besitzt mit 66,6 % einen hohen GC-Gehalt. Die Genomdaten von *P. aeruginosa* und weiterer *Pseudomonas*-Spezies sind in der *Pseudomonas*-Datenbank (www.pseudomonas.com) hinterlegt¹⁶.

Einige Enzyme und Metabolite von *P. aeruginosa* machen diesen Stamm aus biotechnologischer Sicht sehr interessant. Zu diesen zählen insbesondere die sekretierte Lipase LipA als potenzieller Katalysator in der chemischen Industrie sowie die sekretierten Rhamnolipide aufgrund deren ausgezeichneter Wirkung als Biotenside, der geringen Toxizität und der biologischen Abbaubarkeit¹⁷⁻²².

Das Hauptaugenmerk liegt allerdings auf der außergewöhnlichen Pathogenität. *P. aeruginosa* ist in der Lage, Infektionen bei Pflanzen, Tieren und Menschen herbeizuführen^{23,24}. Als fakultativ pathogener Erreger infiziert *P. aeruginosa* insbesondere immunsupprimierte und immundefiziente Personen, die nicht in der Lage sind, eine *P. aeruginosa*-Infektion zu bekämpfen. Infektionen des Menschen treten durch die ubiquitäre Verbreitung des Bakteriums sowohl in der Umwelt als auch im Krankenhaus (Nosokomialinfektion) auf²⁵. Gefährdet sind u. a. Patienten mit einer Verminderung der neutrophilen Granulozyten (Neutropenie) durch eine Chemotherapie, Patienten mit einer Immunsuppression nach einer Organtransplantation sowie Patienten, die an Krankheiten wie AIDS und Cystischer Fibrose (CF) leiden^{8,26-28}. Besonders die häufig auftretenden nosokomialen Infektionen stellen ein großes Problem dar. *P. aeruginosa* gehört zu den häufigsten Krankheitserregern, die akute und chronische Atemwegsinfektionen bei Krankenhauspatienten hervorrufen^{29,30}. Bei Patienten mit einer Lungenentzündung, die künstlich beatmet werden, liegt die Sterblichkeitsrate nach einer *P. aeruginosa* Infektion bei ca. 30 %²⁷. Bei Patienten, die an der erblichen autosomal-rezessiven Stoffwechselerkrankung CF leiden, ist eine Infektion des bronchopulmonalen Traktes mit *P. aeruginosa* die Haupttodesursache^{31,32}. Weiterhin ist *P. aeruginosa* für die Infektionen von Brandwunden und der Cornea sowie für postoperative Wundinfekte, die bakterielle Meningitis, Blutbahninfektionen und chronische Harnwegsinfektionen verantwortlich^{8,33-38}. Eine der wahrscheinlich bedeutendsten Eigenschaften von *P. aeruginosa* ist die Fähigkeit der schnellen Anpassung an verschiedene Umgebungen, die letztendlich eine erfolgreiche Kolonisierung ermöglicht³⁹. Diese außergewöhnliche Pathogenität kann auf eine Vielzahl zellgebundener und extrazellulärer Virulenzfaktoren zurückgeführt werden, die *P. aeruginosa* befähigen, Wirtszellen zu manipulieren und zu zerstören⁴⁰⁻⁴⁴. Die Produktion dieser Virulenzfaktoren unterscheidet sich bei akuten Infektionen im Vergleich zu chronischen Infektionen deutlich voneinander^{45,46}. Für die Kontrolle der Virulenzfaktoren nutzt *P. aeruginosa* u. a. zahlreiche Transkriptionsregulatoren und ein äußerst komplexes *Quorum sensing*-System^{15,47,48}.

Die Therapie von *P. aeruginosa*-Infektionen ist problematisch und stellt ein großes medizinisches Problem dar. Alle bekannten Mechanismen der bakteriellen Antibiotikaresistenz treten bei *P. aeruginosa* auf. Die intrinsische (innewohnende) Resistenz kommt durch effektive Effluxpumpen, eine geringe Permeabilität der äußeren Membran und β -Lactamasen, die effektiv β -Lactam-Antibiotika degradieren, zustande^{49,50}. Die extrinsische (erworbene) Resistenz kann durch die Übertragung von Genen mittels horizontalem Gentransfer erworben werden⁵¹. Als adaptive Reaktion auf die Umgebung können diese Resistenzmechanismen durch eine gezielte

Änderung der Genexpression kontrolliert werden^{51,52}. Des Weiteren erschwert eine hohe Toleranz gegenüber Desinfektionsmitteln die Bekämpfung von *P. aeruginosa*¹⁵.

Die Zahl resistenter *P. aeruginosa*-Stämme steigt und es bedarf der Entwicklung neuartiger Wirkstoffe sowie innovativer Strategien zur Behandlung der Infektionen^{53,54}. Die Entwicklung dieser Wirkstoffe gestaltet sich jedoch schwierig, da *P. aeruginosa* meist auch gegen diese Substanzen umgehend Resistenzen entwickeln kann⁵⁵. Eine vielversprechende neuartige Entwicklung ist die Verwendung von *E. coli*-Stämmen, die gentechnisch derart verändert wurden, dass diese als gezieltes Pathogen für *P. aeruginosa* fungieren⁵⁶.

1.1.1 Regulation der Genexpression

Die interzelluläre Kommunikation von Bakterien über diffusionsfähige Signalmoleküle macht koordinierte Reaktionen von bakteriellen Gemeinschaften auf bestimmte Reize aus der Umwelt möglich. Das *Quorum sensing* (QS)-System ist das interzelluläre Kommunikationssystem von *P. aeruginosa*. Dieses System, das zu den komplexesten und am besten studierten mikrobiellen Systemen zählt, ermöglicht die zelldichteabhängige Regulation der Genexpression^{57,58}. Als Signalmoleküle dienen sog. Autoinduktoren (*Autoinducer*), die von *P. aeruginosa* sekretiert werden und in der Umgebung akkumulieren. Wird eine gewisse Autoinduktorkonzentration überschritten, diffundieren die Autoinduktoren in die Zellen zurück und es findet die Aktivierung spezieller Transkriptionsregulatoren statt⁵⁹.

In *P. aeruginosa* existieren zwei QS-Systeme, die *N*-Acyl-Homoserin-Lactone (AHL) als Signalmolekül verwenden. Das Las-System nutzt vor allem *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-Homoserin-Lacton (3-oxo-C12-HSL) als Signalmolekül für die Aktivierung des Transkriptionsregulators LasR⁶⁰. Das Rhl-System nutzt als Signalmolekül *N*-Butanoyl-L-Homoserin-Lacton (C4-HSL), durch dessen Bindung der Transkriptionsregulator RhlR aktiviert wird⁶¹. Für die Synthese der jeweiligen Signalmoleküle sind die beiden Synthasen LasI und RhlI verantwortlich^{60,61}. Die beiden Systeme sind hierarchisch organisiert, denn der aktivierte Transkriptionsregulator LasR induziert die Expression des *rhlR*-Gens. Auf diese Weise reguliert das Las-System die Aktivität des Rhl-Systems⁶² (Abb. 1.1).

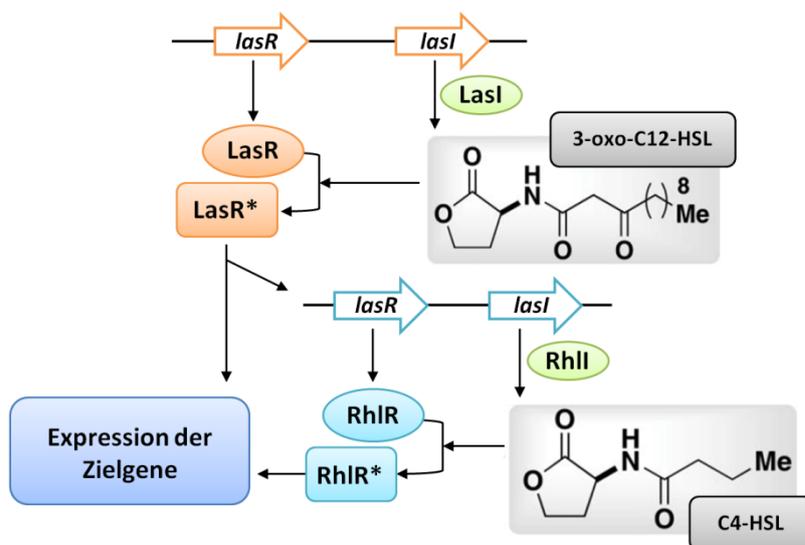


Abb. 1.1 Hierarchische Organisation des Las- und Rhl-Systems in *P. aeruginosa*. Die Synthase LasI synthetisiert 3-oxo-C12-HSL, das durch Bindung den Transkriptionsregulator LasR aktiviert. Aktiviertes LasR induziert wiederum die Expression des *rhIR*-Gens. RhIR wird indes durch die Bindung des Signalmoleküls C4-HSL aktiviert, das von der Synthase RhII synthetisiert wird. Die beiden aktivierten Transkriptionsregulatoren LasR und RhIR induzieren die Expression verschiedener Zielgene (modifiziert nach Welch *et al.*⁶³). Me = Methyl, * = aktivierter Transkriptionsregulator.

Mit diesen auf AHL-basierenden Systemen ist ein weiteres System verknüpft, das 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS; *Pseudomonas quinolone signal*) als Signalmolekül verwendet⁶⁴. PQS ist vermutlich unabhängig von der Zelldichte aktiv und interagiert mit dem Las- und Rhl-System. Zum einen wird die Transkription von *rhII* positiv durch PQS beeinflusst⁶⁵. Zum anderen wird die Synthese des aktiven PQS durch LasR und RhIR reguliert^{66,67}. Das QS-System reguliert insgesamt bis zu 10 % des *P. aeruginosa* Transkriptoms⁶⁸.

P. aeruginosa verfügt über das drittgrößte Genregulationsnetzwerk aller bisher charakterisierten Bakterien⁶⁹. Ungefähr 10 % aller ORFs (*open reading frames*) kodieren für regulatorische Proteine^{15,69}. Verglichen mit anderen Bakterien besitzt *P. aeruginosa* eine große Anzahl von Transkriptionsregulatoren, Zweikomponenten-Systemen und extracytoplasmatischen Sigmafaktoren (ECF-Sigmafaktoren)^{15,70}. ECF-Sigmafaktoren sind alternative Sigmafaktoren mit extracytoplasmatischer Funktion. Im Allgemeinen sind bakterielle Sigmafaktoren, die eine hohe Affinität für spezifische Klassen von Promotorsequenzen besitzen, positive Regulatoren der Genexpression. Durch die Interaktion mit der RNA-Polymerase erhöhen sie die Bindewahrscheinlichkeit der RNA-Polymerase für diese Promotorsequenzen und initiieren die Transkription. Bakterien besitzen i.d.R. einen σ^{70} -Faktor, der die Genexpression der sog. *housekeeping* Gene bei gewöhnlichen Umweltbedingungen kontrolliert. In *P. aeruginosa* ist RpoD der zentrale σ^{70} -Faktor, der diese Funktion übernimmt⁷¹. Zudem existieren mindestens

sieben alternative Sigmafaktoren, die andersartige Klassen von Promotorsequenzen binden und die Genexpression diverser Gengruppen kontrollieren^{70,72}. Die zahlreichen Zwei-Komponentensysteme von *P. aeruginosa* ermöglichen es dem Bakterium, unmittelbar auf Stimuli aus der Umgebung mit Änderungen der Genexpressionen zu reagieren^{16,73}. Des Weiteren besitzt *P. aeruginosa* 16 atypische Kinasen, die vermutlich an Phosphorylierungskaskaden im Verlauf einer Signaltransduktion beteiligt sind und wichtige Kontrollstellen der Regulation darstellen⁷³. Es wurde erst ein Teil des gesamten Genregulationsnetzwerks von *P. aeruginosa* entschlüsselt. Die Funktion vieler Transkriptionsregulatoren und zahlreicher Sigmafaktoren ist bislang unbekannt. Neue Transkriptionsregulatoren werden kontinuierlich identifiziert und charakterisiert^{74,75}. Insbesondere Informationen über die Regulation zahlreicher zentraler Prozesse wie der Kohlenstoffaufnahme, der Aminosäuresynthese oder der Zellteilung sind nicht vorhanden.

1.1.2 Biofilmproduktion und Zellaggregation

In der Natur bevorzugen Bakterien das Wachstum in synergistischen Gemeinschaften in Form von Biofilmen. Als Biofilm werden strukturierte Populationen von Bakterien bezeichnet, die an eine abiotische oder biotische Oberfläche (Substratum) binden und in einer eigenproduzierten extrazellulären Matrix aus Biopolymeren und Wasser eingebettet sind⁷⁶. Die Matrix besteht aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) wie extrazellulärer DNA (eDNA), Polysacchariden und Proteinen⁷⁷.

Biofilme sind äußerst komplexe Gebilde, die u. a. netzartig wasserführende Kanäle für den konvektiven Transport von Nährstoffen besitzen⁷⁸. Die Entwicklung und Reifung des Biofilms erfolgt in fünf Phasen: (1) Adhäsion planktonischer Bakterienzellen an das Substratum, (2) EPS-Produktion und folglich irreversible Bindung an das Substratum, (3) Entwicklung der Biofilmstruktur, (4) Reifung der Biofilmstruktur, (5) Lösen einzelner Bakterienzellen aus dem Biofilm, um weitere Substrata zu erschließen⁷⁹.

Die Regulation der Biofilmproduktion ist von zahlreichen Faktoren abhängig und wurde zunächst mit dem QS-System in Verbindung gebracht, da QS-negative Stämme von *P. aeruginosa* im Gegensatz zu einem wildtypischen Stamm flache und undifferenzierte Biofilme bilden⁸⁰. In den vergangenen Jahren mehrten sich allerdings die Hinweise, dass die Biofilmproduktion wesentlich komplexer ist. Zahlreiche Faktoren wie die Rhamnolipidproduktion, die bakterielle Beweglichkeit, die Eisenverfügbarkeit und die zuckerbindenden Lectinen LecA und LecB beeinflussen die Biofilmproduktion⁸¹⁻⁸⁴. Zudem wird die Biofilmproduktion von Zwei-

Komponentensystemen reguliert und ist von gewissen Umweltbedingungen wie der verfügbaren Kohlenstoffquelle abhängig^{85,86}.

Bakterien, die in Biofilmen leben, profitieren von diesem Lebensstil und unterscheiden sich physiologisch stark von planktonisch lebenden Bakterien der gleichen Art. Die extrazelluläre Matrix bewahrt die Mikroorganismen vor schädlichen Umwelteinflüssen, der Ablösung vom Substratum und vor Bedrohungen in Form anderer Organismen, Bioziden, Antibiotika, Desinfektionsmitteln sowie dem menschlichen Immunsystem^{76,87-89}. Aufgrund der Bildung von Biofilmen auf kontaminierten medizinischen Instrumenten, Kontaktlinsen und in der Lunge von CF-Patienten stellt diese erhöhte Resistenz der Bakterien ein enormes industrielles sowie medizinisches Problem dar⁹⁰⁻⁹³.

Neben der Existenz in oberflächengebundenen Biofilmen präferieren Bakterien in ihrer natürlichen Umgebung ebenso die Bildung von Zellaggregaten^{79,94}. Auch die in Aggregaten akkumulierenden Bakterien sind von einer EPS-Matrix umschlossen^{94,95}. Diese biofilmähnliche Lebensweise vermittelt ähnliche Vorteile wie das Wachstum in Biofilmen, z. B. die Wechselwirkung der Bakterien untereinander und eine erhöhte Resistenz gegenüber Bioziden. Es wurde bereits demonstriert, dass die Zellaggregation als Stressantwort auf toxische Substanzen stattfindet^{96,97}. Die Faktoren, die eine Aggregation der Bakterien ermöglichen, sind weitestgehend unbekannt, aber wahrscheinlich sind es ähnliche Faktoren, die auch an der Biofilmproduktion beteiligt sind⁹⁸.

1.1.3 Rhamnolipide

Rhamnolipide (RL) sind Tenside mikrobiellen Ursprungs, die erstmals im extrazellulären Raum von *P. aeruginosa* identifiziert wurden⁹⁹. Tenside sind amphiphile Moleküle, die in der Lage sind, die Oberflächenspannung zwischen Flüssigkeiten, einer Flüssigkeit und einem Gas oder einer Flüssigkeit und einem Feststoff zu reduzieren.

Rhamnolipide sind eine Gruppe anionischer mikrobieller Glykolipide, die aus L-Rhamnose und β -Hydroxycarbonsäuren bestehen (Abb. 1.2). Das Monosaccharid L-Rhamnose bildet den hydrophilen Teil des Moleküls und ist β -glycosidisch mit dem hydrophoben Teil des Moleküls, der β -Hydroxycarbonsäure, verknüpft. Die Rhamnolipide von *P. aeruginosa* werden in die beiden Spezies Mono-Rhamnolipide (Mono-RL) und Di-Rhamnolipide (Di-RL) eingeordnet. Mono-RL bestehen aus einem Molekül L-Rhamnose, das an eine β -Hydroxycarbonsäuren oder zwei veresterte β -Hydroxycarbonsäuren gebunden ist. In der Regel ist die Rhamnose an zwei veresterte β -Hydroxycarbonsäuren gebunden, die das Dimer 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)alkanoat

(HAA) bilden^{100,101}. Di-RL bestehen aus zwei Molekülen L-Rhamnose von denen ein Molekül ebenfalls an eine oder zwei veresterte β -Hydroxycarbonsäuren gebunden sind^{102,103}. Die Veresterung der β -Hydroxycarbonsäuren sowie die Bindung dieser an die L-Rhamnose erfolgt über die 3-Hydroxygruppe der Carbonsäure, sodass die Rhamnolipide aufgrund der endständigen Carboxygruppe zu den anionischen Tensiden zählen. Bei *P. aeruginosa* besitzen die β -Hydroxycarbonsäuren meist eine Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen (C_{10}). Es wurden auch variierende Kettenlängen ($C_8 - C_{14}$) identifiziert, die weiterhin einfach oder zweifach ungesättigt auftreten können^{104,105}.

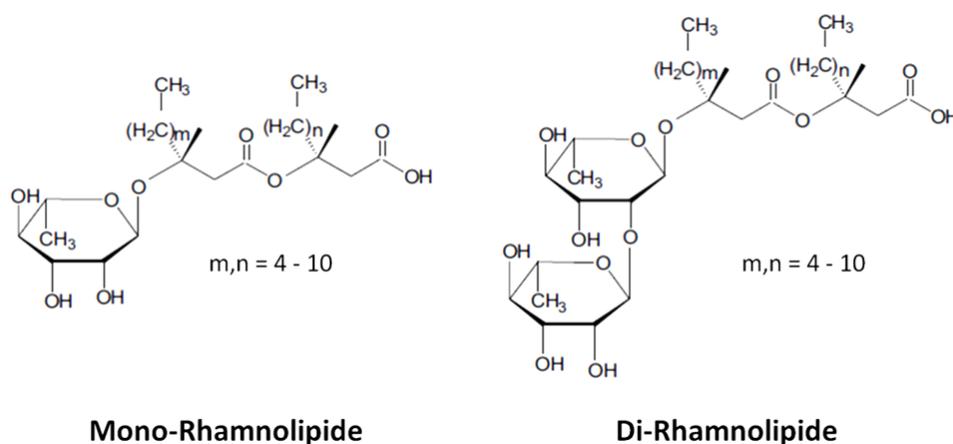


Abb. 1.2 Struktur der Mono- und Di-Rhamnolipide aus *P. aeruginosa*. Das dargestellte Mono-RL besteht aus einem Molekül L-Rhamnose und zwei veresterten β -Hydroxycarbonsäuren. Das Di-RL besteht ebenfalls aus zwei veresterten β -Hydroxycarbonsäuren, aber zwei Molekülen L-Rhamnose (nach Soberon-Chavez *et al.*¹⁰⁶).

Die Synthese der Mono-RL erfolgt über die Aktivität des Rhamnosyltransferase I Enzymkomplex (RhIAB)¹⁰⁷. Die Acyltransferase RhIA katalysiert die Veresterung von zwei β -Hydroxycarbonsäuren zu HAA^{100,101}. RhIB katalysiert im Anschluss die β -glycosidische Bindung von einem Molekül dTDP (Desoxythymidindiphosphat)-L-Rhamnose mit der 3-Hydroxygruppe des HAA. Das dTDP wird bei dieser Reaktion abgespalten^{100,107}. Die Synthese der Di-Rhamnolipide erfolgt über die Aktivität der Rhamnosyltransferase II (RhIC). RhIC katalysiert die glycosidische Bindung von einem Mono-RL und einer weiteren dTDP-L-Rhamnose, ebenfalls unter Abspaltung des dTDP¹⁰⁸. Die Synthese der Rhamnolipide findet im Cytoplasma statt. RhIA und RhIC sind periphere Membranproteine, während RhIB ein integrales Protein der inneren Membran ist¹⁰⁸.

Die Rhamnolipidproduktion findet am Übergang zur stationären Wachstumsphase statt und wird direkt über den QS-Regulator RhIR reguliert^{109,110}. Der Transkriptionsregulator RhIR induziert die *rhIAB*-Genexpression, wenn dieser an den Autoinduktor C4-HSL gebunden ist bzw. reprimiert die Genexpression, wenn diese Bindung nicht vorliegt¹¹⁰. Die Genexpression von *rhIC* wird ebenfalls

über RhIR reguliert¹⁰⁸. Die Rhamnolipidsynthese wird weiterhin über zahlreiche weitere transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen direkt oder indirekt reguliert¹⁰⁹.

Physiologisch sind die Rhamnolipide u. a. an der Biofilmproduktion und der Beweglichkeit, insbesondere dem Schwärmen, beteiligt^{100,111,112}. Zudem begünstigen sie die Aufnahme von hydrophoben Substraten, besitzen antibiotische Wirkung und sie zählen zu den Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*^{41,113}.

1.1.4 Die Beweglichkeit von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa ist in der Lage, drei verschiedene Arten der Bewegung in Abhängigkeit der Oberflächenviskosität auszubilden. Diese drei Bewegungsformen werden als Schwimmen, Schwärmen und *twitching motility* bezeichnet. Für die Ausbildung der verschiedenen Bewegungsformen nutzt *P. aeruginosa* die vorhandenen Zellanhänge. Auf fluiden Oberflächen wird die Schwimmbewegung durch eine rotierende Bewegung (Propellerbewegung) der Flagelle erzeugt¹¹⁴. Auf soliden Oberflächen wird die *twitching motility* ausgebildet, die auf der Streckung und Retraktion der Typ IV-Pili beruht und eine flagellenunabhängige Bewegung darstellt¹¹⁵⁻¹¹⁷. Die Schwärmbewegung ist eine multizelluläre Bewegung, die auf semisoliden Oberflächen ausgebildet wird und sowohl von der Flagelle als auch den Typ IV-Pili abhängig ist^{118,119}. Schwärmende *P. aeruginosa*-Zellen können die Anzahl polarer Flagellen erhöhen¹²⁰.

Da es sich bei dem Schwärmen um eine Bewegung von Zellgruppen handelt, wird diese Bewegung über das QS-System reguliert¹¹⁸. Die Schwärmbewegung wird zusätzlich durch die Rhamnolipidproduktion beeinflusst. Es wurde demonstriert, dass schwärmende Zellen von Di-RL angezogen werden, HHAs die Ausbildung typischer Schwärmbewegungen inhibieren und Mono-RL als Benetzungsmittel die Oberflächenspannung reduzieren¹²¹.

Die Beweglichkeit von *P. aeruginosa*, insbesondere die *twitching motility*, ist an der quantitativen und qualitativen Biofilmproduktion beteiligt. Mit der Flagelle können planktonische Zellen an das Substratum binden und sich mithilfe der Typ IV-Pili daran entlang bewegen. Durch diese Bewegung können Mikrokolonien gebildet werden, die Ausgangspunkt der Biofilmproduktion sind^{94,122}.

Die Fähigkeit der Bewegung hat für Bakterien diverse Vorteile wie die Erschließung neuer Umgebungen, das Erreichen von Nährstoffen, die Vermeidung toxischer Substanzen in der Umgebung sowie das Erreichen und die Infektion potenzieller Wirte¹²³. Sowohl die Flagelle als

auch die Typ IV-Pili sind bedeutende Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*, die an der Infektion und Verbreitung innerhalb der Lunge und von Brandwunden beteiligt sind¹²⁴⁻¹²⁶.

1.1.5 Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen

P. aeruginosa präferiert aerobe Bedingungen mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor für den Energiestoffwechsel. Als fakultativ anaerober Organismus ist *P. aeruginosa* auch in der Lage, unter anaeroben Bedingungen zu gedeihen. Diese Fähigkeit ist von großer Bedeutung, da *P. aeruginosa* in natürlichen Habitaten meist in Biofilmen lebt, in denen sowohl aerobe als auch anaerobe Areale existieren^{94,127,128}. Anaerobe Bedingungen treten weiterhin bei einer Reihe von *P. aeruginosa* Infektionen wie bei Wund- und Atemwegsinfektionen auf^{129,130}. *P. aeruginosa* kolonisiert bevorzugt den sekretierten, zähflüssigen Mukus in den Bronchien von CF-Patienten, verbraucht dort den verfügbaren Sauerstoff und generiert auf diese Weise lokale Hypoxien¹²⁸. Der Mukus in der Lunge der CF-Patienten ist reich an Nitrat und Nitrit und begünstigt somit das anaerobe Wachstum von *P. aeruginosa*¹³¹.

Die Denitrifikation (Nitratatmung) ermöglicht *P. aeruginosa* das Wachstum bei anaeroben Bedingungen unter Verwendung von Nitrat, Nitrit und Distickstoffmonoxid als terminale Elektronenakzeptoren. Die vier Reduktasen Nitrat-, Nitrit-, Stickstoffmonoxid- und Distickstoffmonoxid-Reduktase reduzieren Nitrat (NO_3^-) über vier sukzessive Schritte zu molekularem Stickstoff (N_2)¹³². Die Gene, die für die Reduktasen kodieren, sind in den vier Operons *nar* (NarGHI; Nitratreduktase), *nir* (NirS; Nitritreduktase), *nor* (NorCB; Stickstoffmonoxidreduktase) und *nos* (NosZ; Distickstoffmonoxidreduktase) organisiert¹³³⁻¹³⁶ (Abb. 1.3). Die Nitratreduktase und die Stickstoffmonoxidreduktase sind in der cytoplasmatischen Membran lokalisiert, die Nitritreduktase und die Distickstoffmonoxidreduktase sind periplasmatische Proteine^{137,138}.

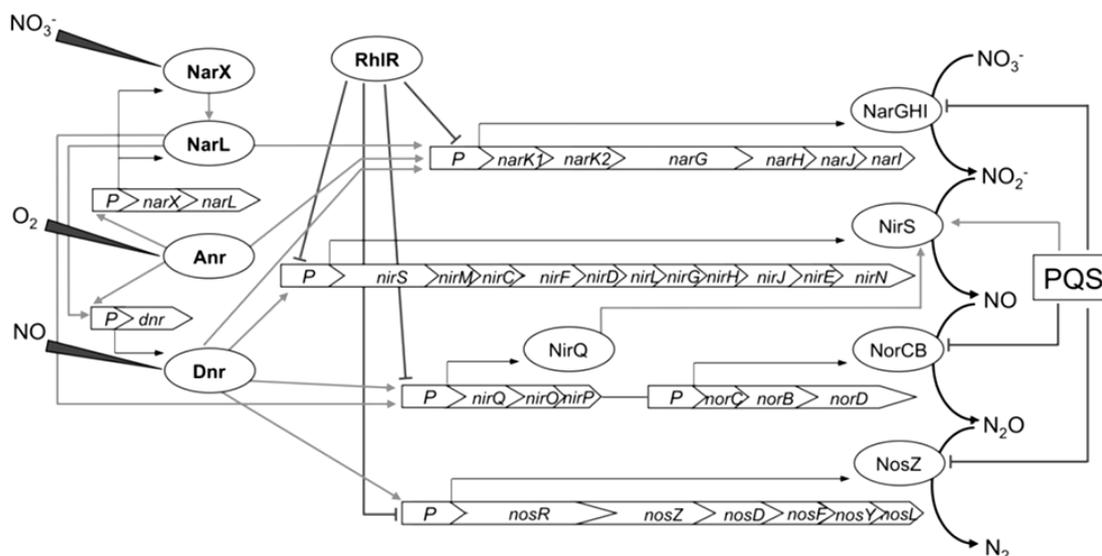


Abb. 1.3 Schematische Übersicht über die Gene und Proteine der Denitrifikation sowie der Denitrifikationsregulation. Die vier Reduktasen NarGHI, NirS, NorCB und NosZ katalysieren die Reduktion von Nitrat (NO_3^-) zu elementarem Stickstoff (N_2). An der Regulation der Denitrifikation ist einerseits das QS-System mittels RhIR und PQS sowie die Regulatoren NarX, NarL, Anr und Dnr beteiligt. NarX registriert die Nitratkonzentration und bildet mit NarL ein Zwei-Komponentensystem. Der Redoxregulator Anr registriert den Sauerstoffpartialdruck und der Redoxregulator Dnr registriert die Stickstoffmonoxidkonzentration (nach Schobert & Jahn¹³⁸).

Auch die Denitrifikation wird in *P. aeruginosa* komplex reguliert¹³⁸. Der Redoxregulator Anr ist der Hauptregulator dieses Netzwerkes und fungiert als Sensor für den Sauerstoffpartialdruck. Anr bildet ein Homodimer mit jeweils einem Eisen-Schwefel-Cluster ($[\text{4Fe-4S}]^{2+}$). In Gegenwart von Sauerstoff wird dieses Cluster zerstört und der Regulator inaktiviert¹³⁷. In Abwesenheit von Sauerstoff ist Anr aktiv und induziert die Expression des *nar*-Operons sowie *narXL* und *dnr*. Die beiden Proteine NarX und NarL bilden ein Zwei-Komponentensystem. NarX ist das Sensorprotein, das auf die vorhandene Nitratkonzentration reagiert und den Antwortregulator NarL aktiviert¹³⁹. Dieser aktiviert wiederum die Genexpression des *nar*-Operons, das für die Nitratreduktase kodiert¹⁴⁰. Zudem reguliert NarL die Genexpression von *dnr* und *nirQ*¹⁴⁰. Der Redoxregulator *Dnr* aktiviert in Abhängigkeit von der Stickstoffmonoxidkonzentration die Expression der *nir*-, *nar*- und *nos*-Operons¹⁴¹. Die beiden aktiven Regulatoren Dnr und NarL induzieren die Genexpression des *nirQ* Gens, dessen Genprodukt vermutlich an der posttranslationalen Reifung der Nitritreduktase NirS beteiligt ist¹⁴². Zusätzlich wird die Denitrifikation durch das QS-System beeinflusst. Über einen direkten oder indirekten Mechanismus reprimiert der Transkriptionsregulator RhIR die Expression der Operons¹⁴³. Der Autoinduktor PQS beeinflusst vermutlich direkt die Aktivität aller vier Reduktasen¹⁴⁴.

1.1.6 Das Siderophor Pyoverdin

Eisen (Fe) ist ein essenzielles Element für nahezu alle Lebewesen. Eisen ist ein wichtiger Cofaktor zahlreicher Enzyme mit Eisen-Schwefel-Clustern¹⁴⁵. Die Verfügbarkeit von Eisen stellt für Mikroorganismen ein Problem dar, da freies Eisen in aquatischen Habitaten in geringer Konzentration und in terrestrischen Habitaten meist in unlöslicher Form vorliegt¹⁴⁶. Um Eisen dennoch verfügbar zu machen, sekretieren Mikroorganismen hochaffine Siderophore. Diese Siderophore sind Eisenkomplexbildner, die spezifisch Fe^{3+} -Ionen in der Umgebung komplexieren und anschließend von den Mikroorganismen über spezifische TonB-abhängige äußere Membranrezeptoren aufgenommen werden¹⁴⁷. Siderophore werden ferner von Hefen, Pilzen und zahlreichen Pflanzen sekretiert¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Der Mechanismus der Pyoverdinsekretion ist bislang unbekannt.

P. aeruginosa sekretiert das gelbgrün-fluoreszierende Siderophor Pyoverdin (Pvd)¹⁵¹. Die Struktur der Pyoverdine ist zwischen verschiedenen Spezies und sogar innerhalb einer Spezies äußerst variabel¹⁵². Die Pyoverdine der Spezies *Pseudomonas* bestehen aus drei Komponenten: (1) Einem Chromophor, (2) einer Acylseitenkette, die aus einer Dicarbonsäure oder einem Monoamid bestehen kann, sowie (3) einem variablen Peptid, das N-terminal an die Carboxygruppe gebunden ist und aus 6 - 12 Aminosäuren besteht. Die Peptidketten können D-konfigurierte und nicht-proteinogene Aminosäuren enthalten und werden ebenso wie das Chromophor mittels nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen synthetisiert^{152,153}. Der Chromophor und das Peptid stellen jeweils eine zweizählige Koordinationsstelle für Fe^{3+} zur Verfügung, die eine Fe^{3+} -Komplexierung in einer Stöchiometrie von 1:1 ermöglichen¹⁵⁴.

In Pseudomonaden und vielen anderen Bakterien ist Fur (*ferric uptake regulator*) der übergeordnete Regulator der Eisenaufnahme, der die Expression zahlreicher ECF-Sigmafaktoren in Abhängigkeit der Eisenverfügbarkeit reguliert¹⁵⁵. Zu diesen ECF-Sigmafaktoren gehört u. a. PvdS. Die Bindung des Fe^{3+} -Pvd-Komplexes an den Membranrezeptor FpvA initiiert eine Signalweiterleitung von FpvA auf das periplasmatische Protein FpvR, das die cytoplasmatische Membran durchspannt (Abb. 1.4). FpvR ist ein Anti-Sigmafaktor, der die Aktivität von PvdS inhibiert. Durch die Signalweiterleitung wird PvdS aktiviert, das wiederum die Expression der Pyoverdinsynthese-Gene induziert^{156,157}.

Für die Eisenaufnahme mittels der sekretierten Pyoverdine bindet der Fe^{3+} -Pvd-Komplex an den spezifischen äußeren Membranrezeptor FpvA, der den Transport des Komplexes in das Periplasma ermöglicht. Dort wird das Fe^{3+} aus dem Pyoverdin vermutlich durch die Reduktion zu Fe^{2+} entlassen und das Fe^{2+} -Ion bindet an ein periplasmatisches Bindeprotein^{158,159}. Das freie

Pyoverdine wird für einen erneuten Zyklus regeneriert und das periplasmatische Bindeprotein transportiert das Fe^{2+} -Ion voraussichtlich zu einem ABC-Importer, der das Fe^{2+} -Ion unter Energieverbrauch in das Cytoplasma transportiert¹⁵⁹.

Pyoverdine fungieren weiterhin als Signalmolekül, da die Genexpression verschiedener Virulenzfaktoren in Abhängigkeit von der Pyoverdineproduktion induziert wird. Der ECF-Sigmafaktor PvdS, der durch die Bindung des Fe^{3+} -Pvd-Komplex aktiviert wird, induziert zudem die Expression der Gene potenter Virulenzfaktoren. Diese Virulenzfaktoren sind ToxA sowie die beiden Proteasen alkalische Protease (AprA) und Protease IV (PIV)¹⁶⁰⁻¹⁶³. Zusätzlich werden die Pyoverdine selbst auch als Virulenzfaktoren betrachtet. Eisen ist für den Wirt ebenfalls ein essenzieller Cofaktor. Durch die limitierte Verfügbarkeit entsteht somit bei einer *P. aeruginosa* Infektion ein Konkurrenzkampf um das verfügbare Eisen^{160,164}.

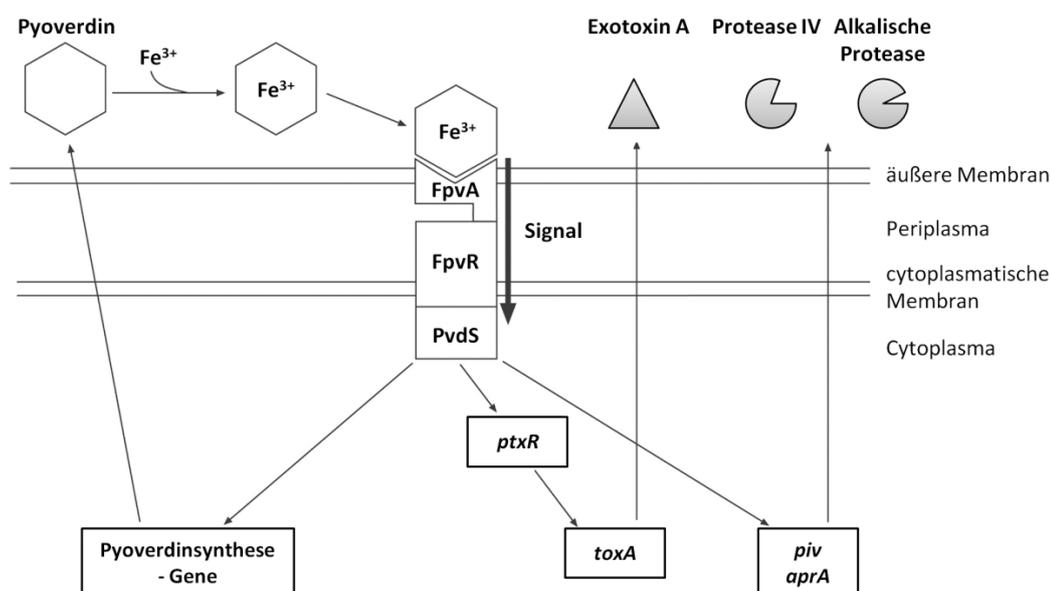


Abb. 1.4 Schematische Übersicht des Pyoverdine-Signalwegs. Das sekretierte Pyoverdine komplexiert Eisen (Fe^{3+}) in der Umgebung und bindet anschließend den Membranrezeptor FpvA. Es wird ein Signal auf den Anti-Sigmafaktor FpvR, der die Aktivität von PvdS bis dahin inhibiert, übertragen. Der ECF-Sigmafaktor PvdS wird aktiv und aktiviert durch die Bindung der RNA-Polymerase die Expression der Pyoverdinsynthese-Gene sowie der Protease-kodierenden Gene *piv* und *aprA*. Außerdem wird die Expression des *ptxR*-Gens induziert, das für den Transkriptionsregulator des *toxA*-Gens kodiert (modifiziert nach Lamont *et al.*¹⁶⁰).

1.2 Die Bedeutung der Proteasen

Proteasen, die auch als Proteinasen, Peptidasen oder proteolytische Enzyme bezeichnet werden, sind eine äußerst vielseitige Enzymklasse, die der dritten Klasse der EC-Systematik (*enzyme commission*) zugeordnet werden, den Hydrolasen. Innerhalb dieser Klasse bilden Proteasen (Peptid-Hydrolasen) die Unterklasse EC 3.4. Im Allgemeinen katalysieren Hydrolasen die

Bindungsspaltung eines Substrates durch die Addition von Wasser. Proteasen hydrolysieren die Peptidbindungen von Proteinen oder Polypeptiden und generieren auf diese Weise Peptide oder Aminosäuren. Sie sind ubiquitär in allen lebenden Organismen verbreitet und ca. 2 % des Genoms jedes Organismus kodiert für Proteasen¹⁶⁵.

Für die Klassifizierung der Proteasen wurde ein hierarchisches Klassifizierungssystem etabliert, das diese aufgrund von Homologien in Familien und Clans einordnet^{165,166}. Die MEROPS-Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk>) stellt eine Fülle an Informationen über mehr als 4400 verschiedene Proteasen und weiterhin über Proteaseinhibitoren sowie Proteasesubstrate zur Verfügung. Proteasen werden aufgrund des Katalysemechanismus in die Familien Serin (S), Cystein (C), Threonin (T), Asparaginsäure (A), Glutaminsäure (G), Metallo (M), Asparagin (N), Gemischt (P) und Unbekannt (U) eingeordnet. Die Proteasefamilien werden weiterhin fortlaufend nummeriert (z. B. S8) und bei signifikanten Unterschieden innerhalb einer Familie nochmals unterteilt (z. B. S8A und S8B). Homologe Proteasefamilien mit evolutionärer Verwandtschaft werden wiederum in Clans zusammengefasst. Die Bezeichnung jedes Clans richtet sich nach dem Katalysemechanismus (z. B. S für Serin) und einem weiteren fortlaufenden Buchstaben (z. B. SB).

Allen Proteasen ist gemein, dass sie einen vergleichbaren Mechanismus im nucleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff einer Peptidbindung besitzen¹⁶⁷. Für die Generierung der nucleophilen Eigenschaften nutzen Serin- und Threoninproteasen eine Hydroxygruppe als katalytisches Nucleophil bzw. eine Thiolgruppe bei Cysteinproteasen. Bei Asparaginsäure-, Metallo- und vermutlich auch bei Glutaminsäureproteasen übernimmt diese Funktion ein aktiviertes Wassermolekül^{168,169}. Die kovalente Peptidbindung wird durch einen säure-/basekatalysierten Prozess gespalten.

Innerhalb der Proteasen werden Endo- und Exopeptidasen unterschieden. Endopeptidasen hydrolysieren interne Peptidbindungen. Zu den Endopeptidasen gehören z. B. Proteasen, die für die Hydrolyse von Signalpeptiden verantwortlich sind¹⁷⁰. Durch die Aktivität von Endopeptidasen werden neue N- und C-Termini generiert, die wiederum von Exopeptidasen als Substrate genutzt werden können. Exopeptidasen benötigen eine zugängliche N-terminale Aminogruppe, eine C-terminale Carboxygruppe oder beides, um proteolytisch aktiv zu werden. Sie hydrolysieren Peptidbindungen, die maximal drei Aminosäuren von einem der Termini entfernt sind.

Die Aktivität von Proteasen wird strikt reguliert, da unkontrollierte Proteaseaktivität für jeden Organismus eine große Gefahr darstellt. Mechanismen zur Regulation der Proteaseaktivität sind die Kontrolle der Protease-Genexpression und Protease-Sekretion, die Inhibierung der Proteaseaktivität durch natürlich vorkommende Proteaseinhibitoren sowie die gezielte

Aktivierung von Proteasen¹⁷¹. Die Mehrheit der Proteasen wird als Zymogen, eine inaktive Proform der Protease, synthetisiert. Häufig besitzen Zymogene ein N-terminales Propeptid, das die proteolytische Aktivität durch sterische Hinderung des aktiven Zentrums inhibiert. Die Aktivierung der Protease erfolgt an deren Wirkungsort durch gezielte Proteolyse des Propeptides. Diese gezielte Proteolyse eines Proteinteils wird als limitierte Proteolyse (Prozessierung) bezeichnet. Einige Propeptide sind zudem an der Stabilität und Proteinfaltung beteiligt¹⁷².

Aus wissenschaftlicher Sicht sind Proteasen äußerst interessant, da wahrscheinlich keine andere Enzymklasse an einer so großen Zahl essenzieller physiologischer Prozesse beteiligt ist. Proteasen katalysieren weitestgehend irreversible Prozesse. Dazu zählen u. a. Proteinaktivierungen, die Degradation fehlgefalteter Proteine (Proteinqualitätskontrolle), die Apoptose, die Koagulation und die Fibrinolyse¹⁷³⁻¹⁷⁷. Aus industrieller Sicht sind insbesondere mikrobielle Proteasen interessant. Diese sind die bedeutendsten hydrolytischen Enzyme und finden Anwendung in den industriellen Bereichen Lebensmittel, Pharmazie sowie Leder-, Abwasser- und Abfallaufbereitung¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Der größte Markt für Proteasen ist die Reinigungs- und Waschmittelindustrie. Dort zersetzen sie proteinhaltige Verunreinigungen wie Milch, Ei, Blut und Gras¹⁸¹. Serinproteasen sind wegen ihrer Stabilität und Aktivität in einem Bereich von pH 7 - 11 die wichtigsten alkalischen Proteasen¹⁷⁸. Klassische Proteasen für die Reinigungs- und Waschmittelindustrie sind sekretierte Subtilisin-ähnliche Serinproteasen (Subtilasen) der *Bacillus*-Species aufgrund ihrer besonders geeigneten Eigenschaften bei alkalischen Bedingungen und einer relativ geringen Spezifität¹⁸¹.

1.2.1 Serinproteasen

Über ein Drittel aller bekannten Proteasen sind Serinproteasen, die ubiquitär in Eukaryoten, Prokaryoten, Archaea sowie Viren verbreitet sind¹⁶⁵. Serinproteasen, die der Klasse EC 3.4.21 angehören, werden in der MEROPS-Datenbank in 53 Familien und 13 Clans eingeordnet. Die Mehrheit der Serinproteasen sind Endopeptidasen¹⁸². Intensiv studierte Vertreter sind z. B. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase oder Thrombin. Serinproteasen sind an verschiedenen Prozessen wie der Verdauung, der Immunabwehr, der Signaltransduktionen, der Fibrinolyse und der Reproduktion beteiligt¹⁸³⁻¹⁸⁷.

Klassischerweise besitzen Serinproteasen eine katalytische Triade bestehend aus Histidin, Serin und Asparaginsäure (Abb. 1.5). Diese drei Aminosäuren sind über Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft. Serin repräsentiert dabei die nucleophile Aminosäure, die den Carbonylkohlenstoff

der Peptidbindung attackiert^{188,189}. Den nucleophilen Charakter erhält das Serin durch die Deprotonierung der Hydroxygruppe durch das Histidin. Die Asparaginsäure begünstigt die Protonenaufnahme durch elektrostatische Effekte und stützt die räumliche Orientierung des Histidins¹⁹⁰.

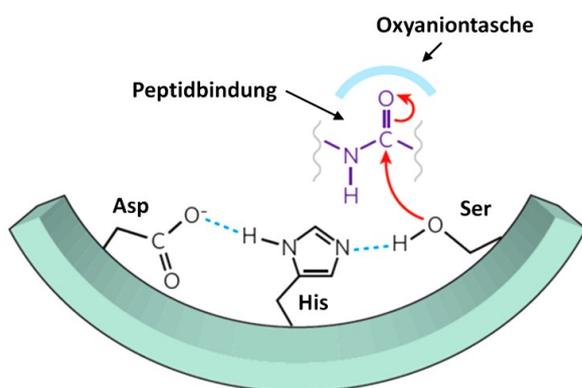


Abb. 1.5 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von Serinproteasen. Es ist das aktive Zentrum von Serinproteasen mit den Aminosäuren Asp, His und Ser der katalytischen Triade und die Peptidbindung eines Substrates dargestellt. Die blauen Linien repräsentieren Wasserstoffbrückenbindungen. Die roten Pfeile veranschaulichen die Bewegung von Elektronenpaaren. Die nucleophile Aminosäure Serin attackiert den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung. Durch diesen Angriff entsteht eine negative Ladung am Sauerstoffatom der Carbonylgruppe. Die negative Ladung wird durch die Oxyaniontasche stabilisiert (modifiziert nach Erez *et al.*¹⁹¹). Asp = Asparaginsäure, His = Histidin, Ser = Serin.

Diese besonders erfolgreiche Art der katalytischen Triade entwickelte sich in mindestens vier verschiedenen Serinproteasefamilien mit unterschiedlichem evolutionären Ursprung (Trypsin, Subtilisin, ClpP, Prolylendopeptidase)¹⁸². Viele Serinproteasen weisen Variationen der katalytischen Triade auf, indem z. B. die Asparaginsäure durch ein zweites Histidin ersetzt wird oder nur eine katalytische Diade mit Lysin bzw. Histidin und Serin existiert¹⁹².

Bei der Hydrolyse durch Serinproteasen beginnt die Reaktion mit dem nucleophilen Angriff der Hydroxygruppe des Serins der katalytischen Triade auf den Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung eines Substrates (Abb. 1.5). Hierbei wird ein instabiles tetraedrisches Intermediat gebildet, das eine negative Ladung am Sauerstoffatom der Carbonylgruppe besitzt. Diese Ladung wird durch die Oxyaniontasche, die aus NH-Gruppen von Aminosäureresten der Protease geformt wird, stabilisiert^{193,194}. Das Intermediat zerfällt, die Peptidbindung wird gespalten und ein Acyl-Enzym entsteht unter Freilassung einer Aminogruppe, die durch ein Wassermolekül ersetzt wird. Das Wassermolekül greift anschließend die Carbonylgruppe des Acyl-Enzyms an und gleichzeitig entfernt das Histidin ein Proton des Wassermoleküls. Dadurch entsteht erneut ein instabiles tetraedrisches Intermediat mit einer negativen Ladung, das durch die Oxyaniontasche stabilisiert wird. Das Intermediat zerfällt, ein Carbonsäureprodukt wird entlassen und anschließend ist die freie Protease in der Lage, einen neuen Katalysezyklus durchzuführen.

1.2.2 Subtilisin-ähnliche Serinproteasen (Subtilasen)

Subtilasen, die auch als Subtilisin-ähnliche Serinproteasen bezeichnet werden, repräsentieren die zweitgrößte Familie der Serinproteasen. Namensgebend ist das Subtilisin aus *Bacillus subtilis*¹⁹⁵. Über 200 verschiedene Vertreter dieser Klasse sind aktuell bekannt und es werden kontinuierlich neue Mitglieder identifiziert^{165,196}. Subtilasen sind ubiquitär in Eukaryoten, Prokaryoten, Archaea und Viren verbreitet¹⁹⁷.

In der MEROPS-Datenbank werden die Subtilasen dem Clan SB der Serinproteasen zugeordnet. Zu diesem Clan zählen die beiden Familien S53 (Sedolisine) und S8 (Subtilisine). Proteasen, die Homologien zu Subtilisin aufweisen, werden in der Familie S8 zusammengefasst. Diese Familie wird weiterhin in die beiden Unterfamilien S8A und S8B aufgeteilt, mit den ursprünglichen Vertretern Subtilisin Carlsberg aus *Bacillus licheniformis* für S8A und Kexin aus *Saccharomyces cerevisiae* für S8B. Bis zu der Bestimmung der Aminosäuresequenz und Struktur von Subtilisin wurde vermutet, dass alle Serinproteasen homolog zu Chymotrypsin wären^{198,199}. Tatsächlich haben diese beiden Familien jedoch einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung. Subtilasen besitzen ebenso wie Chymotrypsin eine katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin, die allerdings in einer geänderten Reihenfolge auftreten. Im Gegensatz zu der Reihenfolge H-D-S bei Chymotrypsin treten diese bei Subtilasen in der Reihenfolge D-H-S auf. Zudem weisen Subtilasen eine andere Tertiärstruktur auf^{166,200}. Subtilisin besitzt eine α/β -Konformation mit sieben parallelen β -Faltblättern, umgeben von neun α -Helices mit zwei zusätzlichen antiparallelen β -Faltblättern am C-Terminus^{196,201}.

Die Subtilasen können aufgrund der Zusammensetzung der katalytischen Triade weiterhin in verschiedene Familien differenziert werden¹⁹⁰. Die klassischen Mitglieder der Familie S8 werden wie bereits beschrieben der D-H-S Familie zugeordnet. Diese Familie umfasst die Mehrheit der bekannten Subtilasen. Es existieren allerdings auch Subtilasen innerhalb der Familie S8 mit den alternativen katalytischen Triaden E-D-S und E-H-S¹⁹⁰.

Seit der Verwendung von Subtilisin Carlsberg als erste bakterielle Protease in einem Waschmittel besteht ein enormes Interesse an der Charakterisierung dieser Serinproteasen¹⁸⁰. Infolgedessen zählen Subtilasen zu den am intensivsten studierten proteolytischen Enzymen überhaupt. Die überwiegende Mehrheit der Subtilasen sind Endopeptidasen, die bei neutralen bis leicht basischen pH-Werten aktiv sind¹⁶⁵. Viele Subtilasen sind außerdem thermostabil. Häufig wird die Thermostabilität durch Calcium-Bindestellen in der Struktur begünstigt²⁰¹. Innerhalb der Subtilase-Familie existiert eine große Strukturdiversität. Einige Mitglieder sind Mosaikproteine und können N- oder C-terminale Aminosäuresequenzen besitzen, die keinerlei Homologie zu

bekanntesten Proteinen aufweisen^{196,200}. Die Vertreter der Subtilasen werden als Präproenzyme produziert (Multidomänenstruktur). Sie besitzen i.d.R. eine Signalsequenz für die Translokation der Subtilase über eine Membran, ein Propeptid für die Reifung der Protease und eine katalytische Proteasedomäne^{196,197}. Das Propeptid fungiert als intramolekulares Chaperon und wirkt zudem als Inhibitor der Proteaseaktivität²⁰². Die Aktivierung von Subtilasen wurde anhand von Pro-Subtilisin eingehend studiert. Zunächst findet die Faltung der Protease durch die Chaperon-Funktion des Propeptides statt^{203,204}. Anschließend folgt die autokatalytische Spaltung der Peptidbindung zwischen dem Propeptid und der Proteasedomäne, die zu einer strukturellen Reorganisation führt^{203,205}. Das Propeptid bleibt nicht-kovalent gebunden und bildet einen Propeptid-Subtilisin-Komplex²⁰³. Zuletzt wird das nicht-kovalent gebundene und inhibitorisch wirkende Propeptid degradiert und somit die Protease aktiviert²⁰⁶.

Die biologische Funktion der Subtilasen ist für den jeweiligen Organismus von großer Bedeutung. Subtilisin-ähnliche Proprotein-Convertasen sind eine Familie Calcium-abhängiger Serinproteasen in Wirbeltieren, die für die Prozessierung sowie Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Peptidhormonen verantwortlich sind. Störungen der Aktivität von Proprotein-Convertasen können zur Ausbildung zahlreicher humaner Krankheiten wie Arteriosklerose, Adipositas, Krebs, Alzheimer oder Diabetes führen²⁰⁷. Subtilasen sind weiterhin direkt oder indirekt an der Virulenz von Erregern beteiligt und somit ein interessantes Ziel für therapeutische Wirkstoffe. Zu diesen Subtilasen zählen z. B. die Subtilase PfSUB1, die maßgeblich zur Invasion des Malariaparasiten *Plasmodium spp.* in Erythrozyten beiträgt oder die humane regulatorische Subtilase SKI-1/S1P, die am Lebenszyklus des Hepatitis C Virus beteiligt ist^{208,209}. Des Weiteren werden bakterielle Subtilasen häufig in die Umgebung sekretiert, um dort Nährstoffe verfügbar zu machen oder als Virulenzfaktor das Eindringen in einen Wirt zu ermöglichen²¹⁰. Neben einer extrazellulären Lokalisierung können Subtilasen auch in die Zellwand grampositiver Bakterien integriert werden oder intrazellulär lokalisiert sein²¹¹. Intrazellulär kommt ihnen eine wichtige Funktion in Reifungsprozessen durch die Prozessierung diverser Proteine zu¹⁹⁰.

1.2.3 Proteolyse als Regulationsmechanismus in Gram-negativen Bakterien

Die transkriptionelle Regulation der Genexpression stellt den Hauptmechanismus der Zelle dar, um die bakterielle Physiologie zu steuern. Innerhalb dieser Regulationsnetzwerke sind intrazelluläre Proteasen durch die gezielte Aktivierung, Inaktivierung und Degradation verschiedenartiger Proteine in der Lage, regulatorische Kaskaden zu steuern^{212,213}. Diese

Regulation über Proteolyse ist für die Zelle energieaufwendiger als die transkriptionelle Regulation. Allerdings besteht ein bedeutender Vorteil dieser Regulation darin, dass die Proteasen bereits als synthetisierte Proteine in der Zelle vorliegen und innerhalb sehr kurzer Zeit auf auftretende Stimuli reagieren können²¹⁴.

In Gram-negativen Bakterien wurden bislang fünf cytoplasmatische ATP-abhängige Proteasen identifiziert, die hauptsächlich an der regulatorischen Proteolyse beteiligt sind. Zu diesen zählen die Proteasekomplexe ClpYQ (auch HslUV), ClpAP und ClpXP, die aus einer ATPase- und einer Proteaseuntereinheit bestehen, sowie die Serinproteasen Lon und die membrangebundene Metalloprotease FtsH, die beide Domänen in einem Molekül beinhalten²¹³. Das aktive Zentrum der ATP-abhängigen Proteasen befindet sich im Inneren des Moleküls in einer proteolytischen Kammer²¹⁵. Die Degradation von Substraten erfolgt über die Bindung des Substrates an die ATPase-Domäne, den ATP-abhängigen Transport in die proteolytische Kammer zum aktiven Zentrum und die Entfaltung des Substrates mit anschließender ATP-unabhängiger Spaltung^{213,214}. Regulatorische Proteasen sind zum einen gemeinsam mit Chaperonen an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt. Sind Bakterien Stressoren wie oxidativem Stress oder hohen Temperaturen ausgesetzt, treten vermehrt fehlgefaltete Proteine auf, die mit weiteren Proteinen interagieren und Proteinaggregate bilden. Diese werden durch Chaperone renaturiert oder durch Proteasen degradiert^{214,216}. Zum anderen degradieren regulatorische Proteasen diverse Zielproteine, um physiologische Prozesse zu steuern. Zu diesen Zielproteinen gehören u. a. Transkriptionsregulatoren^{214,217}, Enzyme der Lipopolysaccharidsynthese²¹⁸, instabile Sigmafaktoren²¹⁹ sowie Anti-Sigmafaktoren²²⁰. Weiterhin sind regulatorische Proteasen für einen Mechanismus der extracytoplasmatischen Stressantwort, der regulierten Intramembranproteolyse, verantwortlich. Als Reaktion auf erhöhte Mengen denaturierter extracytoplasmatischer Proteine erfolgt die Spaltung eines Transmembranproteins, die wiederum eine Signalweiterleitung initiiert²²¹. Infolgedessen wird die Genexpression periplasmatischer Chaperone und Proteasen induziert²²².

Diese Fähigkeit Proteinaktivitäten sowie Proteininteraktionen innerhalb komplexer Regulationsnetzwerke steuern zu können, macht Proteasen zu einflussreichen posttranslationalen Regulatoren²²³. Bislang stammt der Großteil an Informationen über die regulatorischen intrazellulären Proteasen allerdings aus *Escherichia coli*.

1.3 Die Bedeutung der *P. aeruginosa*-Proteasen

P. aeruginosa verfügt über eine Vielzahl extrazellulärer und intrazellulärer Proteasen. Für *P. aeruginosa* PAO1 werden in der MEROPS-Datenbank 233 Proteasen aufgeführt. Das entspricht ca. 4 % des Genoms. Damit besitzt das Genom von *P. aeruginosa* doppelt so viele Proteasekodierende Gene wie andere Organismen im Durchschnitt¹⁶⁵. Die sekretierten Proteasen sind äußerst potente Virulenzfaktoren, die während des Infektionsprozesses mit dem Wirt interagieren⁴². Die am besten charakterisierten Proteasen von *P. aeruginosa* sind die extrazellulären Proteasen Elastase A (LasA), Elastase B (LasB), alkalische Protease (AprA) sowie die Protease IV (PIV).

Bei den beiden Elastasen LasA und LasB handelt es sich um zinkabhängige Metalloproteasen. Die extrazelluläre Protease LasB, der eine Schlüsselrolle in der Pathogenität von *P. aeruginosa* zugesprochen wird, gilt als Prototyp der sekretierten Virulenzfaktoren. LasB ist durch die Degradation von Biopolymeren wie Elastin und Kollagen in der Lage, Gewebeschädigungen herbeizuführen²²⁴. Elastin ist ein wichtiger Bestandteil der Blutgefäße sowie des Binde- und Lungengewebes. Die Aktivität von LasB führt zu einer direkten Schädigung der Endothelzellen von Gefäßwänden und somit zu Blutungen²²⁵. Weiterhin degradiert LasB zahlreiche Substrate wie Surfactantproteine²²⁶, Zytokine^{227,228} sowie die Immunglobuline IgG und IgA^{229,230}. Die beiden Elastasen LasB und LasA wirken synergistisch, denn LasA kann die Aktivität von anderen elastolytischen Enzymen wie LasB steigern und trägt auf diese Weise zum pathogenen Potenzial bei^{231,232}. LasA ist nicht nur eine elastolytische, sondern auch eine staphylolytische Protease. Als staphylolytische Protease ist LasA in der Lage, konkurrierende Staphylokokken, z. B. bei der Kolonisierung der Lunge von CF-Patienten, durch die Hydrolyse des Pentaglycins, einem Bestandteil des Peptidoglykans, zu lysieren²³³. Eine weitere extrazelluläre Metalloprotease von *P. aeruginosa* ist die alkalische Protease AprA, die ein ähnliches Substratspektrum wie LasB besitzt^{227,228,234}. Zusätzlich degradiert die alkalische Protease Kollagen und Laminin, eine wichtige Komponente der Basallamina²²⁴.

Die Protease IV ist eine extrazelluläre Serinprotease aus der Chymotrypsin-Familie, die vermutlich den bedeutendsten Virulenzfaktor aller extrazellulären Proteasen darstellt²³⁵. Zahlreiche bedeutende Proteine des Wirtes wie Fibrinogen und Plasminogen, die an der Wundheilung bzw. der Auflösung von Blutgerinnseln beteiligt sind, sowie Proteine des Immunsystems wie IgG und Bestandteile des Komplementsystems werden durch PIV degradiert und inaktiviert²³⁶. Ebenso wie LasB degradiert PIV die Surfactantproteine der Lungenoberfläche

und ist aufgrund dieser Aktivitäten an der Auslösung akuter Lungenschädigungen beteiligt²³⁶. Zudem ist PIV ein Auslöser der *Pseudomonas*-Keratitis (Hornhautentzündung)²³⁵.

Die Genexpression der Protease-kodierenden Gene wird hauptsächlich über das QS-System reguliert. Die Genexpression von *aprA*, *lasA* und *lasB* stehen unter der Kontrolle des QS-Systems²³⁷⁻²³⁹. Zudem wird die Genexpression von *aprA* durch den ECF-Sigmafaktor PvdS reguliert, der ebenfalls die *piv*-Genexpression reguliert^{162,163} (Abb. 1.4).

Neben diesen intensiv studierten Proteasen werden kontinuierlich neue sekretierte Proteasen identifiziert und charakterisiert, die an der Virulenz von *P. aeruginosa* beteiligt sind. Zu diesen zählen die Proteasen PASP (*Pseudomonas aeruginosa* small protease)^{240,241}, LepA (*large exoprotease*)^{242,243} und IMPa (*immunomodulating metalloprotease of P. aeruginosa*)²⁴⁴. Weiterhin wurde das Autotransporterprotein EprS charakterisiert, das eine Subtilisin-ähnliche Serinprotease als Passagierdomäne besitzt, die in den extrazellulären Raum sekretiert wird und dann vermutlich als Virulenzfaktor fungiert²⁴⁵.

Über die intrazellulären Proteasen von *P. aeruginosa* stehen im Gegensatz zu den extrazellulären Proteasen weniger Informationen zur Verfügung. In den vergangenen Jahren wurden diese vermehrt untersucht. Intrazelluläre Proteasen von *P. aeruginosa* fungieren häufig als Regulatoren und haben dadurch großen Einfluss auf die Physiologie des Bakteriums. Eine dieser Proteasen ist die ATP-abhängige Serinprotease Lon, die wahrscheinlich wie das *E. coli*-Homolog an der Degradation fehlgefalteter Proteine im Cytoplasma beteiligt ist und zudem einen Einfluss auf die Beweglichkeit, die Biofilmproduktion sowie die Antibiotikaresistenz hat^{212,246-248}. Zudem wurde in verschiedenen Virulenzmodellen demonstriert, dass die Lon-Protease essenziell für die Ausbildung der vollständigen Pathogenität von *P. aeruginosa* ist²⁴⁶. Ein weiterer Vertreter intrazellulärer Proteasen ist die Lon-ähnliche Protease AsrA, die eine Schlüsselrolle in der zellulären Hitzestress-Antwort besitzt²⁴⁹. Kürzlich wurde der Einfluss weiterer intrazellulärer Proteasen auf die Physiologie von *P. aeruginosa* untersucht. Die Protease Pfpl sowie ClpS und ClpP sind an der Schwärmbewegung, der Biofilmproduktion und der Resistenz gegenüber Antibiotika beteiligt^{250,251}. Der ATP-abhängige Serinproteasekomplex ClpXP reguliert in *P. aeruginosa* zudem die Alginate-Synthese²⁵².

Die Charakterisierung des Einflusses intrazellulärer Proteasen auf die Antibiotikaresistenz, Beweglichkeit und Biofilmproduktion verdeutlicht, dass Proteasen innerhalb des komplexen Regulationsnetzwerkes von *P. aeruginosa* bedeutende regulatorische Funktionen übernehmen.

1.4 Zielsetzung

P. aeruginosa ist ein ubiquitär verbreitetes, äußerst vielseitiges Bakterium, das als fakultativ pathogenes Bakterium eine Vielzahl von Infektionen bei immunsupprimierten Personen hervorrufen kann. Eine der bedeutendsten Eigenschaften von *P. aeruginosa* ist die Fähigkeit der schnellen Anpassung an diverse Stress- und Umweltbedingungen. Diese Anpassungsfähigkeit ist unter anderem auf eines der größten bakteriellen Regulationsnetzwerke zurückzuführen. Aus heutiger Sicht sind Proteasen neben ihrer degradierenden Funktion ein bedeutender Bestandteil regulatorischer Prozesse.

Nach ersten Arbeiten zur Charakterisierung der Subtilase SprP wurde ersichtlich, dass sich eine *sprP*-defiziente Mutante phänotypisch sehr stark vom *P. aeruginosa*-Wildtyp unterscheidet. Diese Erkenntnis führte zum Gegenstand der vorliegenden Arbeit, deren Ziele die umfassende biochemische Charakterisierung der Subtilase SprP und die systematische Analyse ihrer physiologischen Funktion in *P. aeruginosa* sind.

Die zur Zielerreichung geplante methodische Vorgehensweise lässt sich wie folgt beschreiben: Durch Homologievergleiche soll zunächst die Primärsequenz des Proteins im Hinblick auf strukturelle Eigenschaften *in silico* analysiert und homologe Proteine in anderen Organismen identifiziert werden. Für die biochemische Charakterisierung des Enzyms ist die rekombinante Produktion von SprP notwendig. Daher sollen homologe und heterologe Expressionsstudien durchgeführt werden, um ein Expressionssystem zu identifizieren, das die funktionale Produktion von SprP im präparativen Maßstab gewährleistet. Die Charakterisierung soll anschließend mit gereinigtem SprP erfolgen. Im Fokus sollen dabei das Temperatur- und pH-Optimum, die Wirkung von Proteaseinhibitoren sowie mögliche posttranslationale Modifikationen (Prozessierung) stehen. Mithilfe einer Peptidbibliothek soll das Substratspektrum von SprP eingegrenzt werden. Des Weiteren soll anhand verschiedener konstruierter SprP-Varianten die vorhergesagte Multidomänenstruktur und die katalytische Triade der Subtilase SprP untersucht werden.

Eine umfassende Charakterisierung des *sprP*-defizienten Stammes und der detaillierte Vergleich mit dem *P. aeruginosa*-Wildtyp soll Aufschluss über die physiologische Bedeutung von SprP geben. Dazu sollen neben *sprP*-Expressionsstudien auch potenzielle Unterschiede in Wachstumsverhalten, Biofilmbildung und Sekundärmetabolitenproduktion untersucht werden. Darüber hinaus sollen systembiologische Ansätze in Betracht gezogen werden, um eine potenziell globale physiologische und regulatorische Funktion der Subtilase SprP für *P. aeruginosa* zu demonstrieren.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel wurden von den beschriebenen Firmen bezogen. Der Reinheitsgrad richtete sich dabei nach den entsprechenden Anwendungen. Die Verbrauchsmittel und Lösungen für RNA-Isolierung, reverse Transkription und *real-time* PCR wurden als RNase-frei erworben. Spezielle Verbrauchsmittel sowie Geräte, die nicht dem Laborstandard entsprechen, werden bei der Erläuterung der jeweiligen Methoden angegeben.

2.1 Bakterienstämme

Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Quelle / Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan ²⁵³ , Grant <i>et al.</i> ²⁵⁴
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dem</i> (λ <i>Its857 ind1</i> <i>Sam7 nin5 lavUV5-T7gene1</i>)	Studier & Moffatt ²⁵⁵
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Ec294:: [RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] Tp ^r , Sm ^r , tra ⁺ <i>recA, pro, res</i>	Simon <i>et al.</i> ²⁵⁶
<i>Escherichia coli</i> C43(DE3)	BL21(DE3)-Derivat mit mindestens einer weiteren unbekanntem Mutation	Miroux & Walker ²⁵⁷
<i>Escherichia coli</i> JM109(DE3)	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺),</i> <i>relA1, supE44, λ⁻, Δ(lac-proAB), [F['], traD36,</i> <i>proAB, lac^qZΔM15], IDE3</i>	Promega
NEB Express Competent <i>E. coli</i>	<i>fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-</i> <i>73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--</i> <i>Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs
<i>Burkholderia glumae</i> PGT7 <i>lacI</i>	<i>lipAB:pSUPlacI^q P_{lacUV5} T7 RNA polymerase gene</i> (<i>gene1</i>)	Beselin ²⁵⁸
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440T7	<i>gal</i> Gm ^r (DE3)	Knops ²⁵⁹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp PAO1	Holloway <i>et al.</i> ²⁶⁰ , Quelle D. Haas (Lausanne, Schweiz)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PABST7.1	Δ (3/4 <i>lipA</i> 1/3 <i>lipH</i>) <i>miniD-180</i> (<i>tetA tetR lacIq PlacUV5-T7 gene1</i>)	Jaeger <i>et al.</i> ¹⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Δ <i>sprP</i>	Δ <i>sprP</i> :: Ω Gm ^r	Pelzer ²⁶¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Δ <i>pa1241</i>	Δ <i>pa1241</i> ::Gm ^r	Pünder ²⁶²
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Δ <i>hexR</i>	Δ <i>hexR</i> :: Ω Gm ^r	Diese Arbeit

Die Bezeichnungen der Genotypen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli*²⁶³ und für *P. aeruginosa*²⁶⁴.

2.2 Plasmide

Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Plasmide.

Plasmide für <i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz / Quelle
pSUP202	pBR325, Ap ^r Cm ^r Tc ^r mob	Simon <i>et al.</i> ²⁵⁶
Plasmide mit weitem Wirtsbereich	Genotyp	Referenz / Quelle
pBBR1MCS	Cm ^r mob <i>lacZα</i> P _{lac} P _{T7}	Kovach <i>et al.</i> ²⁶⁵
pBBR22b	<i>lacZα</i> Cm ^r rep mob (MCS: pET22b)	Rosenau & Jaeger ²⁶⁶
pBSL142	pBluescript-Derivat, MCS, ColE1 Ap ^r Gm ^r	Alexeyev <i>et al.</i> ²⁶⁷
pWKR202	Cm ^r , Km ^r , Gm ^r	Drepper <i>et al.</i> ²⁶⁸
pTZ110	Ap ^r , promotorloses <i>lacZ</i> -Gen	Schweizer & Chuanchuen ²⁶⁹
pSU-HlyA1	Ap ^r	Schwarz <i>et al.</i> ²⁷⁰
pK184-HlyBD	Km ^r	Bakkes <i>et al.</i> ²⁷¹

Die Plasmide aus Tab. 2.2 wurden verwendet, um rekombinante Plasmide zu konstruieren. Diese sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tab. 2.3 Übersicht über die rekombinanten Plasmide.

Plasmide für die Genexpression	Genotyp	Referenz / Quelle
pBBR <i>sprP</i>	<i>sprP</i> -Gen in pBBR1MCS <i>Plac</i> -Ktr. (1,794 kb PCR-Produkt)	Serci ²⁷²
pBBR <i>sprPE262A</i>	<i>sprP</i> E262A in pBBR1MCS <i>Plac</i> -Ktr. (<i>QuikChange</i> [®] PCR P30+P31; Matrize pBBR <i>sprP</i>)	Diese Arbeit
pBBR <i>sprPH299A</i>	<i>sprP</i> H299A in pBBR1MCS <i>Plac</i> -Ktr. (1,794 kb PCR-Produkt P32+P33; Matrize pBBR <i>sprP</i>)	Diese Arbeit
pBBR <i>sprPS499A</i>	<i>sprP</i> S499A in pBBR1MCS <i>Plac</i> -Ktr. (1,794 kb PCR-Produkt P34+P35; Matrize pBBR <i>sprP</i>)	Diese Arbeit
pBBR <i>sss8</i> (hier: pBBR <i>sprPΔduf</i>)	Signalsequenz und Peptidase S8-Domäne in pBBR1MCS <i>Plac</i> -Ktr. (1,095 kb PCR-Produkt P13+P16)	Reimann ²⁷³
pBBR <i>ssduf</i> (hier: <i>sprPΔs8</i>)	Signalsequenz und DUF in pBBR1MCS <i>Plac</i> -Ktr. (0,789 kb PCR-Produkt P13+P14)	Reimann ²⁷³
pBBR <i>hexR</i>	<i>hexR</i> -Gen in pBBR1MCS <i>Plac</i> -Ktr. (0,924 kb PCR-Produkt P11+P12)	Diese Arbeit
pBR <i>sprP</i>	<i>sprP</i> -Gen in pBBR22b PT7-Ktr. (1,785 kb PCR-Produkt)	Pelzer ²⁶¹

Tab. 2.3 Fortsetzung.

pBR <i>sprPS499A</i>	<i>sprP</i> S499A in pBBR22b PT7-Ktr. (1,794 kb PCR-Produkt P34+P35; Matrize pBR <i>sprP</i>)	Diese Arbeit
pBR <i>sprPΔduf</i>	Signalsequenz und Peptidase S8-Domäne in pBBR22b PT7-Ktr. (1,085 kb PCR-Produkt P14+P16; Matrize pBBR <i>sss8</i>)	Diese Arbeit
pBR <i>sprPΔs8</i>	Signalsequenz und DUF in pBBR22b PT7-Ktr. (0,779 kb PCR-Produkt P14+P15; Matrize pBBR <i>ssduf</i>)	Diese Arbeit
pSU-SprPminLS	<i>sprP</i> -Gen in pSU-HlyA1 (1,737 kb PCR-Produkt P18+P19)	Schwarz <i>et al.</i> ²⁷⁰
pSU-SprPE262AminLS	<i>sprP</i> E262A in pSU-minLS (P30+P31; Matrize pSU-SprPminLS)	Diese Arbeit
pSU-SprPH299AminLS	<i>sprP</i> H299A in pSU-minLS (P32+P33; Matrize pSU-SprPminLS)	Diese Arbeit
pSU-SprPS499AminLS	<i>sprP</i> S499A in pSU-minLS (P34+P35; Matrize pSU-SprPminLS)	Diese Arbeit
pSU-SprPΔDUFminLS	<i>sprPΔduf</i> in pSU-minLS (P20+P21; Matrize pSU-SprPminLS)	Diese Arbeit
pSU-SprPΔS8minLS	<i>sprPΔs8</i> in pSU-minLS (P22+P23; Matrize pSU-SprPminLS)	Diese Arbeit
Plasmide mit <i>lacZ</i>-Fusion	Genotyp	Referenz / Quelle
pTZ110 <i>sprP</i>	Promotor des <i>sprP</i> -Gens in pTZ110 (0,556 kb PCR-Produkt)	Serci ²⁷²
pTZ110 <i>pa1241</i>	Promotor des <i>pa1241</i> -Gens in pTZ110 (0,798 kb PCR-Produkt P1+P2)	Diese Arbeit
Plasmide zur Konstruktion von Deletions- / Insertionsmutanten	Genotyp	Referenz / Quelle
pSUP <i>pa1241</i> updw	Bereich stromaufwärts von <i>pa1241</i> (0,800 kb PCR-Produkt P3+P4) und Bereich stromabwärts von <i>pa1241</i> (0,803 kb PCR-Produkt P5+P6) in pSUP202	Diese Arbeit
pSUP <i>hexR</i> updw	Bereich stromaufwärts von <i>hexR</i> (0,800 kb PCR-Produkt P7+P8) und Bereich stromabwärts von <i>hexR</i> (0,803 kb PCR-Produkt P9+P10) in pSUP202	Diese Arbeit
pSUP <i>hexR</i> upGmdw	Ω-Gm ^r aus pBSL142 in pSUP <i>hexR</i> updw (1,6 kb <i>Mlu</i> I DNA-Fragment)	Diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) in lyophilisierter Form bezogen. Diese wurden mit dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt.

Tab. 2.4 Oligonukleotide für die Konstruktion rekombinanter Plasmide. Dargestellt sind alle Oligonukleotide (nummeriert) mit der entsprechenden Bezeichnung, der Nukleotidsequenz mit hervorgehobener Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen (REN) und dem Verwendungszweck der Oligonukleotide.

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	REN	Verwendung
P1	pTZpa1241_up	AAA AAG CTT GCA CCG CCA GCG GCG CGG CCC	HindIII	pTZ110pa1241
P2	pTZpa1241_dw	TTT CTC GAG GGA AGG TTC CTG CTC TCG ATC AAA GGC G	XhoI	pTZ110pa1241
P3	pa1241_EcoRI_up	AAG AAT TCC ACC GCC AGC GGC GCG GCC	EcoRI	pSUPpa1241updw
P4	pa1241_MluI_dw	AAA ACG CGT GGA AGG TTC CTG CTC TCG ATC AAA GGC	MluI	pSUPpa1241updw
P5	pa1241_MluI_up	AAA ACG CGT CCT GCG CCC GCC TTC AAC CTG AA	MluI	pSUPpa1241updw
P6	pa1241_PstI_dw	AAA CTG CAG GGT AAT AGT TCA CCG CGT CCA TGA AAC G	PstI	pSUPpa1241updw
P7	hexR_NcoI_up	AAC CAT GGG AGA TGT GGT TCT GGT TCC A	NcoI	pSUPhexRupdw
P8	hexR_MluI_dw	TTT ACG CGT CCG GGT TCC TCG TGT TCT GT	MluI	pSUPhexRupdw
P9	hexR_MluI_up	TTT ACG CGT CCG GGT TCC TCG TGT TCT GT	MluI	pSUPhexRupdw
P10	hexR_PvuI_dw	TTT CGA TCG TGG GTA CGC TTC CAA CGT CG	PvuI	pSUPhexRupdw
P11	hexR_HindIII_up	AAA AGC TTC GCC GCC GCC GGC CCT TC	HindIII	pBBRhexR
P12	hexR_BamHI_dw	TTG GAT CCT CAG TTG TCC TCG TCG AGG GGA TAG	BamHI	pBBRhexR
P13	PA1242_HindIII_up	CCG AAG CTT CCG GAA GCC GAG TCC ATG CCG CTG CGC CGT GCC GT	HindIII	pBBR1ssduf, pBBR1sss8
P14	sprP_NdeI_up	AAA CAT ATG CCG CTG CGC CGT GCC GTT TTC GCC ATC C	NdeI	pBRsprP Δ s8, pBRsprP Δ duf
P15	ExpDUF_HindIII_dw	TAT AAG CTT TCA CGG GCG GGT CTC CAG CGG	HindIII	pBRsprP Δ s8, pBBR1ssduf
P16	sprP_BamHI_dw	AAG GAT CCT CAG CGC ACG CGC TCG CGG	BamHI	pBRsprP Δ duf, pBBR1sss8
P17	pSUHlyA1_lin _XaHis_for	ATT GAT GGC CGT CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGA AAT TCT CTT GCA AAA AAT GTA TTA	-	pSU-SprPminLS
P18	SprPminLS_fw	AGA GGT AAT TAA ATG GCC GAA ACA CCC CTG	-	pSU-SprPminLS

Tab. 2.4 Fortsetzung.

P19	SprP_XaHis_rev	GTG ACG GCC ATC AAT GCG CAC GCG CTC	-	pSU-SprPminLS
P20	SprP_ΔDUF_fw	GTG CGC ATC GGG GTG ATC GAG CGC GAC	-	pSU-SprPΔDUFminLS
P21	pSU HlyA1_lin_rev	CAT TTA ATT ACC TCT TAA CCA GTT AAT G	-	pSU-SprPΔDUFminLS
P22	SprP_Xasite_fw	ATT GAT GGC CGT CAC CAC CAC C	-	pSU-SprPΔS8minLS
P23	SprP_ΔS8_rev	CGG GCG GGT CTC CAG CGG CGC C	-	pSU-SprPΔS8minLS

Tab. 2.5 Oligonukleotide für die DNA-Affinitätschromatographie. Dargestellt sind die biotinylierten und nicht-biotinylierten Oligonukleotide, die für die DNA-Affinitätschromatographie verwendet wurden, mit der Nukleotidsequenz und die DNA-Bereiche, die durch ihre Verwendung amplifiziert wurden.

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Verwendung
P24	Biot_pa2141_up	BIO -GCA CCG CCA GCG GCG CGG CC	Promotorbereich von <i>pa1241</i>
P25	Biot_pa1241_dw	GGA AGG TTC CTG CTC TCG ATC AAA GGC GTT	Promotorbereich von <i>pa1241</i>
P26	Biot_sprP_up	BIO -GCG CCT GCG GCT TGA CCA AGG CCT C	Promotorbereich von <i>sprP</i>
P27	Biot_sprP_dw	GGA CTC GGC TTC CGG AAC GGG GAC C	Promotorbereich von <i>sprP</i>
P28	Biot_sprPInt._up	BIO -CCG CTG CGC CGT GCC GTT TTC GC	Internes DNA- Fragment von <i>sprP</i>
P29	Biot_sprPInt._dw	AAC GGC GGG ATC GCG CCG ACC AC	Internes DNA Fragment von <i>sprP</i>

Tab. 2.6 Oligonukleotide für QuikChange® PCR. Dargestellt sind die Oligonukleotide mit der entsprechenden Bezeichnung, der Nukleotidsequenz und dem Verwendungszweck. Das Basentriplett, das die gewünschte Mutation inseriert, ist hervorgehoben.

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Verwendung
P30	<i>sprP_Glu_QC1</i>	ATC GGG GTG ATC GCG CGC GAC GTC GAC	pBBR <i>sprPE262A</i> , pSU- minLS_ <i>sprPE262A</i>
P31	<i>sprP_Glu_QC2</i>	GTC GAC GTC GCG CGC GAT CAC CCC GAT	pBBR <i>sprPE262A</i> , pSU- minLS_ <i>sprPE262A</i>
P32	<i>sprP_His_QC1</i>	CGT CCC GAC AAC GCG GGT TCG ACG GTC	pBBR <i>sprPH299A</i> , pSU- minLS_ <i>sprPH299A</i>
P33	<i>sprP_His_QC2</i>	GAC CGT CGA ACC CGC GTT GTC GGG ACG	pBBR <i>sprPH299A</i> , pSU- minLS_ <i>sprPH299A</i>
P34	<i>sprP_Ser_QC1</i>	CAC TGC GGC ACC GCG TAT GCC ACG CCG	pBBR <i>sprPS499A</i> , pSU- minLS_ <i>sprPS499A</i>
P35	<i>sprP_Ser_QC2</i>	CGG CGT GGC ATA CGC GGT GCC GCA GTG	pBBR <i>sprPS499A</i> , pSU- minLS_ <i>sprPS499A</i>

Tab. 2.7 Oligonukleotide für reverse Transkriptionen und *real-time* PCR. Dargestellt sind die Oligonukleotide mit der entsprechenden Bezeichnung, der Nukleotidsequenz und Gen-Spezifität.

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Spezifität
P36	RT_ <i>pa1241</i> _up	TCT ACC ACC ACT ACC CGA AC	Gen <i>pa1241</i>
P37	RT_ <i>pa1241</i> _dw	CTG TCG TCC TGG AAC AAC C	Gen <i>pa1241</i>
P38	RT_ <i>pa1241/sprP</i> _up	GCT ATA TCG ATG GCG TCA	Ende <i>pa1241</i> /Anfang <i>sprP</i> (Intergen)
P39	RT_ <i>pa1241/sprP</i> _dw	AAA AGG ATG GCG AAA ACG	Ende <i>pa1241</i> /Anfang <i>sprP</i> (Intergen)
P40	RT_ <i>sprP</i> _up	AGA ACA TGG ATG GCC TGA C	Gen <i>sprP</i>
P41	RT_ <i>sprP</i> _dw	CGC AAC TGG TAG AGG TTC AA	Gen <i>sprP</i>
P42	RT_ <i>nark1</i> _up	ATC ACC ATG CTG TTC ACC TT	Gen <i>nark1</i>
P43	RT_ <i>nark1</i> _dw	GAG AGG AAG AAC AGG CAC AC	Gen <i>nark1</i>
P44	RT_ <i>nirS</i> _up	GCT GTT CAT CAA GAC CCA TC	Gen <i>nirS</i>
P45	RT_ <i>nirS</i> _dw	GAG GTT CTT CAG GTC GAA CA	Gen <i>nirS</i>
P46	RT_ <i>nosZ</i> _up	GCC TAT ACC ACG CTG TTC AT	Gen <i>nosZ</i>
P47	RT_ <i>nosZ</i> _dw	TAC TGC ACG TCG AGT TTC TG	Gen <i>nosZ</i>
P48	RT_ <i>hexR</i> _up	AAG TTC TTC CGC TTC AAC CT	Gen <i>hexR</i>
P49	RT_ <i>hexR</i> _dw	GAA ATC ACC ACG AAC AGG TC	Gen <i>hexR</i>
P50	RT_ <i>rpoD</i> _up	CAG CTC GAC AAG GCC AAG AA	Gen <i>rpoD</i>
P51	RT_ <i>rpoD</i> -dw	CCA GCT TGA TCG GCA TGA AC	Gen <i>rpoD</i>

2.4 Kultivierung von Bakterien

2.4.1 Nährmedien

Alle Nähr- und Testmedien wurden mit A. dest angesetzt und, wenn nicht anders angegeben, für 20 min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (Membranfilter: 0,2 µm Porengröße) und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60 °C zugesetzt. Für die Herstellung von Festmedien wurde dem Flüssigmedium, wenn nicht anders angegeben, 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

LB-Flüssigmedium²⁷⁴:

10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,2

2 x YT-Flüssigmedium²⁷⁴:

16 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,2

Eine 1 M CaCl₂ Stammlösung wurde sterilfiltriert und dem Medium einzeln zugesetzt.

M9-Minimalmedium²⁷⁴:

Lösung I: 40 g/l Glukose

Lösung II: 20 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

Lösung III: 2 g/l CaCl₂ x 2H₂O

Lösung IV: 70 g/l Na₂Cl x 2H₂O, 30 g/l KH₂PO₄, 5 g/l NaCl, 10 g/l NH₄Cl

Die Lösungen I - IV wurden getrennt voneinander autoklaviert und daraufhin im folgenden Verhältnis zu einer Gebrauchslösung zusammengeführt: 10 % (v/v) Lösung I, 1 % (v/v) Lösung II, 1 % (v/v) Lösung III, 10 % (v/v) Lösung IV, 78 % (v/v) autoklaviertes A. dest.

M9-Minimalmedium für Schwimmagar:

1 Volumen M9-Minimalmedium (> 60 °C) wurde das 0,15-fache Volumen einer autoklavierten 2 % (w/v) Agarose-Lösung in A. dest. (> 60 °C) zugesetzt.

M9-Minimalmedium für Schwärmagar²⁷⁵:

1,07 g/l NH₄Cl, 2,14 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2,99 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l NaCl, 0,25 g/l MgSO₄, 0,15 g/l CaCl₂ x 2H₂O, 1,98 g/l Glukose, 5 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Select Agar, pH 7

2.4.2 Antibiotika

Verschiedene Antibiotika wurden verwendet, um auf plasmid- und/oder genomkodierte Resistenzen zu selektionieren. Die Antibiotika wurden in A. dest. bzw. in 70 % Ethanol (Tetracyclin und Chloramphenicol) angesetzt und vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (Membranfilter: 0,2 µm Porengröße). Den Medien wurden die entsprechenden Antibiotika, in den in Tab. 2.8 angegebenen Endkonzentrationen, zugesetzt.

Tab. 2.8 Endkonzentrationen der Antibiotika für verschieden Stämme.

Antibiotikum	Endkonzentration (µg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>	<i>B. glumae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicillin (Ap)	100	-	-	-
Carbenicillin (Cb)	-	600	150	600
Chloramphenicol (Cm)	50	150	200	300
Gentamicin (Gm)	10	25	10	30
Tetracyclin (Tc)	10	50	40	100
Kanamycin (Km)	30	25	50	-

2.4.3 Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C für *E. coli* und *P. aeruginosa* bzw. bei 30 °C für *P. putida* und *B. glumae* in LB-Medium (2.4.1).

Übernachtskulturen wurden für mindestens 16 h inkubiert. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas auf einem Reagenzglas-Rotator (neoLab GmbH, Heidelberg) angezogen (160 UpM), während größere Kulturen im Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH) bei 150 UpM bebrütet wurden. Das Kulturvolumen nahm dabei maximal 1/10 des Gefäßvolumens ein. Vorkulturen wurden entweder mit Einzelkolonien von Stamm- bzw. Transformationsplatten oder mit 1/500 Volumen aus einer Gefrierkultur (2.5) inokuliert. Hauptkulturen wurden mit einer ü.N. Kultur auf eine Zelldichte inokuliert, die einer O.D._{580 nm} = 0,1 entsprach. Wenn nicht anders angegeben wurden *P. aeruginosa* Hauptkulturen immer bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,3 - 2,5 entsprach, kultiviert und anschließend die jeweiligen Experimente durchgeführt. Bei dieser Zelldichte ist die Promotoraktivität des *sprP* Gens maximal²⁶¹. Die Zelldichte von Kulturen wurde in einem Spektralphotometer (Genesys 6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 580 \text{ nm}$ gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt (1 ml Messvolumen, 1 cm Schichtdicke). Die Zellaggregate von Kulturen, die starke Zellaggregation aufwiesen, wurden vor Bestimmung der Zelldichte durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen der Kultur mit einer Pipette vollständig homogenisiert. Stämme mit plasmid- und genomkodierten Antibiotikaresistenzen wurden unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (2.4.2). Bei Experimenten zur Untersuchung bakterieller Phänotypen wurde bei den entsprechenden Hauptkulturen auf die Verwendung von Antibiotika verzichtet.

2.4.4 Anaerobe Kultivierung von Bakterien

Mit LB-Medium gefüllte Erlenmeyerkolben wurden durch Gummistopfen (VWR International GmbH, Langenfeld) dicht verschlossen und durch ein Septum mit Stickstoff begast (1 min Stickstoffzufuhr pro 1 ml Medium). Das Inokulieren der anaeroben Flüssigkulturen erfolgte daraufhin ebenfalls durch das Septum mit einer Spritze. Für die anaerobe Kultivierung wurde LB-Medium (2.4.1) mit 50 mM KNO₃ verwendet.

2.4.5 Kultivierung in Überexpressionskulturen

Für die Ausbeute großer Proteinmengen wurde das T7-Expressionssystem verwendet. Bei dem T7-Expressionssystem stehen rekombinanten Zielgene unter der Transkriptionskontrolle eines Promotors aus dem Bakteriophagen T7^{255,276}. Die Expressionsstämme für dieses System tragen eine Kopie des T7-RNA-Polymerase-Strukturgens im Chromosom integriert, das unter der Kontrolle eines induzierbaren *lac*-Promotors steht. Es wurde verschiedene Expressionsstämme verwendet (Tab. 2.1). *E. coli*-Stamm JM109(DE3) besitzt zusätzlich zu einer chromosomalen *lacI*^q regulierten T7-RNA-Polymerase ein weiteres *lacI*^q Gen auf einem extrachromosomalen F-Plasmid. Diese zusätzliche Genkopie führt zu einer erhöhten *lac*-Repressor-Konzentration und somit zu einer gesteigerten Repression der Transkription. Zudem ist *E. coli* JM109(DE3) für die *lac*-Permease (*lacY*) defizient, die den Transport des Induktors in die Zelle ermöglicht. Somit ist die Aufnahme des Induktors ausschließlich von seiner extrazellulären Konzentration abhängig. *E. coli* C43(DE3) ist ein *E. coli* BL21(DE3)-Derivat und zeichnet sich durch eine hohe Toleranz gegenüber der Expression toxischer Gene aus²⁷⁷. Für die homologe *sprP* Genexpression wurde der Stamm *P. aeruginosa* PABST7.1 verwendet, der im Genom eine *lacUV5/lacI*^q regulierte T7-RNA-Polymerase trägt. *P. putida* KT2440T7 erwies sich für die Proteinsynthese einiger Zielproteine im Vergleich zu *E. coli* als besser²⁵⁹. *B. glumae* PGT7*lacI* verfügt über eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *lacUV5* Promotors²⁷⁸. Zur Überexpression der in verschiedenen Plasmiden klonierten Gene in *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* JM109(DE3), *E. coli* C43(DE3) und *P. aeruginosa* PABST7.1 wurden die Zellen bei 37 °C bzw. *P. putida* KT2440T7 und *B. glumae* PGT7*lacI* bei 30 °C unter Selektionsdruck in LB-Medium (2.4.1)

bis zu einer Zelldichte, die einer O.D. $_{580\text{ nm}} = 0,6$ entsprach, bebrütet. Es erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM (1 M Stammlösung in A. dest.) für *E. coli* und *B. glumae* PGT7*lacI* sowie 1,2 mM IPTG für *P. putida* und *P. aeruginosa*. Unter Standardbedingungen erfolgte eine Inkubation von 2 h nach Induktion. Die anschließende Analyse der Proteinzusammensetzung erfolgte mittels SDS-PAGE (2.32).

2.4.6 Kultivierung in Überexpressionskulturen für die Sekretion mittels HlyA T1SS

Für die Überexpression der in pSU-HlyA1 (2.2) und pK184-HlyBD (2.2) klonierten Gene in *NEB Express Competent E. coli* wurden die Zellen in 100 ml 2 x YT-Medium (2.4.1) bei 37 °C unter Selektionsdruck bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D. $_{580\text{ nm}} = 0,6$ entsprach, bebrütet. Es erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM (1 M Stammlösung in A. dest.). Die Überexpressionskulturen wurden 6 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation (30 min, 10000 UpM, 4 °C) sedimentiert. Der Kulturüberstand (2.25) wurde abgenommen und für die Proteinreinigung (2.28) verwendet.

2.5 Konservierung von Bakterien

Die Konservierung der Bakterienstämme erfolgte über Gefrierkulturen. Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurden 1,8 ml einer Kultur mit 135 µl DMSO (7,5 % (v/v)) versetzt und bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

2.6 Qualitative Messung der Zellaggregation

Zur Visualisierung der von verschiedenen Stämmen produzierten interzellulären Aggregaten, wurden die Stämme bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D. $_{580\text{ nm}} = 2,3 - 2,5$ entsprach, kultiviert und dann vollständig in Petrischalen überführt. Für die Untersuchungen mit Natrium-Nitroprussid (SNP; Sigma-Aldrich GmbH, Seelze) wurde dieses dem LB-Medium (2.4.1) vor dem Inokulieren in verschiedenen Endkonzentrationen zugesetzt. Die Zellaggregate wurden vor einem dunklen Hintergrund mit einer Kamera dokumentiert.

2.7 Qualitative und quantitative Messung des Biofilms

Die Messung der Biofilmbildung fand in 24-well Mikrotiterplatten mit LB-Medium (2.4.1) statt. Aus einer Vorkultur (2.4.3) heraus wurde jedes well mit einer Zelldichte entsprechend einer O.D. $_{580\text{ nm}} = 0,1$ inokuliert (1 ml Kulturvolumen). Die Mikrotiterplatte wurde 16 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden ebenfalls wells nur mit 1 ml LB-Medium (2.4.1) angesetzt. Nach der Inkubation wurde die Zelldichte (O.D. $_{580\text{ nm}}$) bestimmt. Die Kulturen wurden anschließend mit 200 µl einer 1 % (w/v) Kristallviolett-Lösung gefärbt. Die Mikrotiterplatten wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die einzelnen wells wurden mehrfach mit 2 ml A. dest. gewaschen, um planktonische Zellen zu entfernen. Die Dokumentation des am Rand der wells gebildeten Biofilms erfolgte mit einer Kamera. Für die quantitative Messung der Biofilme wurde dieser mit 99,8 % Ethanol bei RT unter leichtem Schütteln gelöst. Diese Lösung wurde daraufhin in Küvetten überführt und die Absorption bei $\lambda = 590\text{ nm}$ mit einem Spektralphotometer (Genesys 6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt.

2.8 Plattentests zur Analyse der Beweglichkeit von *P. aeruginosa*

Es wurden drei verschiedenen Plattentests durchgeführt, um die Beweglichkeit von verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen zu untersuchen. Die Dokumentation der Plattentests erfolgte mit der Videodokumentationsanlage *Imaging System Stella 3200* (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt).

2.8.1 Schwärmen

Es wurden Schwärmagarplatten mit einer Agarkonzentration von 0,5 % (w/v) hergestellt (2.4.1), die in geöffnetem Zustand 30 min bei einem kontinuierlichen Luftstrom getrocknet wurden. Anschließend wurden die Platten mittig mit 5 µl einer ü.N. Kultur (2.4.3) beimpft, deren Zelldichte mit LB-Medium (2.4.1) entsprechend einer O.D._{580 nm} = 3 eingestellt wurde. Die Inkubation der Schwärmagarplatten erfolgte für 16 h bei 37 °C.

2.8.2 Schwimmen

Es wurden Schwimmagarplatten (2.4.1) mit 0,3 % (w/v) Agar hergestellt und diese in geöffnetem Zustand 30 min bei kontinuierlichem Luftstrom getrocknet. Diese wurden in der Mitte mit 5 µl einer ü.N. Kultur (2.4.3), deren Zelldichte zuvor mit LB-Medium (2.4.1) auf O.D._{580 nm} = 3 eingestellt wurde, beimpft. Die Inkubation der Schwimmagarplatten erfolgte 16 h bei 37 °C.

2.8.3 *Twitching motility*

Es wurden ca. 3 mm dünne LB-Agarplatten (2.4.1) gegossen und einzelne Bakterienkolonien mit einem Zahnstocher überimpft. Dabei wurde der Zahnstocher durch den Agar bis auf den Grund der Petrischale gestochen. Die Platten wurden 16 h bei 37 °C und anschließend für 1 bis maximal 2 Tage bei RT inkubiert.

DNA Techniken

2.9 Nukleinsäureextraktion

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte mit dem *innuPREP Plasmid Mini-Kit* (Analytik Jena AG, Jena) nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Die Extraktion beruht auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly²⁷⁹. Die chromosomale DNA von *P. aeruginosa* wurde mit dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN AG, Hilden) extrahiert.

2.10 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der extrahierten DNA (2.9) wurde mit dem *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen GmbH, Darmstadt) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer bestimmt.

2.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse und präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen²⁷⁴. In Abhängigkeit von der Größe wurde die zu analysierende DNA in Agarosegelen mit einer Agarosekonzentration von 0,8 - 2 % (w/v) elektrophoretisch getrennt. Die Gelelektrophorese fand in Elektrophoresepuffer statt. Als DNA-Molekulargewichtsstandard wurde für große DNA-Fragmente die *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* und für kleine DNA-Fragmente die *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot) verwendet. Vor der Auftragung auf das Agarosegel wurden die Proben mit 0,2 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Die Geldokumentation wurde mit dem *Eagle Eye II Imaging System* (Stratagene GmbH, Heidelberg) durchgeführt.

Elektrophoresepuffer:

TBE Puffer (0,5 x): 45 mM Tris-Base, 45 mM Borat, 1 mM Na₂-EDTA, pH 8,3

DNA-Molekulargewichtsstandard:

GeneRuler 1 kb DNA Ladder: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp

GeneRuler 100 bp DNA Ladder: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp

DNA-Probenpuffer:

100 mM Na₂-EDTA, 43 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

2.12 Rekombination von DNA *in vitro*

Die enzymatische Restriktion von DNA durch Typ II-Restriktionsendonukleasen²⁸⁰, die Modifikation von DNA-Enden durch T4 Polynukleotidkinase und die Ligation von DNA-Fragmenten durch T4 DNA Ligase wurde nach Standard-Methoden²⁷⁴ sowie nach Angaben des Enzym-Herstellers (Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot) durchgeführt. Die Erzeugung des Expressionsplasmids pSU-SprPminLS erfolgt mittels *In-Fusion® HD Cloning Kit* (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) nach Herstellerangaben. Das Plasmid pSU-HlyA1 (Tab. 2.2) wurde mit den Oligonukleotiden P17 und P21 (Tab. 2.4) per PCR amplifiziert. Dadurch entstand ein linearisiertes Plasmid. Die Matrizen-DNA wurde mittels *DpnI*-Verdau entfernt. Das *sprP*-Gen wurde mit den Oligonukleotiden P18 und P19 amplifiziert. Die entstehenden 15 bp langen 5'-Überhänge, die zu dem linearisierten pSU-HlyA1 komplementär sind, ermöglichten die Fusion des PCR-Produkts mit pSU-HlyA1.

2.13 Transformation von Bakterienzellen

2.13.1 Herstellung chemisch transformationskompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach Mülhardt²⁸¹ durchgeführt. Eine 200 ml Hauptkultur wurde mit einer *E. coli* ü.N. Kultur auf eine Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 0,05 entsprach, inokuliert und bis zu dem Erreichen einer O.D._{580 nm} = 0,6 bei 37 °C und 150 UpM bebrütet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (30 min, 4000 UpM, 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wurde in 100 ml TFB I-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 4000 UpM, 4 °C) wurden die sedimentierten Zellen in 16 ml TFB II-Lösung resuspendiert und zu je 200 µl aliquotiert. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

TFB I-Lösung:

100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin

TFB II-Lösung:

75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 15 % (v/v) Glycerin

2.13.2 Transformation chemisch transformationskompetenter Zellen

Die Transformation chemisch transformationskompetenter Zellen erfolgte durch den sog. Hitzeschock nach Hanahan²⁵³. Die transformationskompetenten Zellen wurden mit 5 - 50 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte der Hitzeschock (3 min, 42 °C) mit anschließender Zugabe von 700 µl LB-Medium (2.4.1). Die phänische Expression erfolgte, in Abhängigkeit von der plasmidkodierten Antibiotikumresistenz, 1 - 3 h bei 37 °C für *E. coli* bzw. 30 °C für *P. putida*. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 15000 UpM, RT) sedimentiert und in verschiedenen Verdünnungen (1×10^0 bis 1×10^{-4}) auf Selektivagar (2.4.1) ausplattiert. Die Agar-Platten wurden für 16 h bebrütet.

2.14 Elektroporation von Bakterien**2.14.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen**

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen nach Choi *et al.*²⁸² wurden 100 ml einer ü.N. Kultur verwendet. Die Zellen wurden durch vierfache Zentrifugation (30 min, 4000 UpM, 4 °C) sedimentiert und nach jedem dieser Zentrifugationsschritte in sinkenden Volumina (100 ml, 50 ml, 25 ml, 1,5 ml) 300 mM Saccharose-Lösung resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde die 1,5 ml Zellsuspension mit 0,5 ml Glycerin versetzt. Diese wurde zu je 150 µl aliquotiert und die Zellen bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.14.2 Transformation elektrokompetenter Zellen

Die elektrokompetenten Zellen wurden mit einer Ligation (2.12) oder 5 - 50 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette (*my-Budget* 2 mm-Küvette; Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld) überführt. Für die Elektroporation wurde der *MicroPulser™* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit dem Programm Ec2 (2,5 kV) verwendet. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium (2.4.1) hinzugegeben. Die phänische Expression erfolgte, in Abhängigkeit von der plasmidkodierten Antibiotikumresistenz, 1 - 3 h bei 37 °C für *E. coli* bzw. 30 °C für *P. putida*. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 15000 UpM, RT) sedimentiert und in verschiedenen Verdünnungen (1×10^0 bis 1×10^{-4}) auf Selektivagar (2.4.1) ausplattiert. Die Agar-Platten wurden für 16 h bebrütet.

2.15 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Für den konjugativen Transfer von mobilisierbaren Plasmiden nach *P. aeruginosa* wurde die Methode des *biparentalen mating* verwendet. Der als Donorstamm verwendete *E. coli*-Stamm S17-1 (2.1) trägt die *tra*-Gene des RP4-Plasmids²⁵⁶ stabil im Genom integriert. Der Donorstamm wurde mit einer ü.N. Kultur so inokuliert, dass die Zelldichte einer O.D._{580 nm} = 0,1 entsprach. Diese Kultur wurde bei 37 °C unter entsprechendem Selektionsdruck bebrütet bis sie die

logarithmische Wachstumsphase erreichte (O.D. $_{580\text{ nm}} = 0,5 - 0,8$). Der Rezipientenstamm wurde 1 h vor Konjugationsbeginn bei 43 °C inkubiert, um sein Restriktions- und Modifikationssystem zu inaktivieren²⁸³. Daraufhin wurden 5 ml des Donorstammes in einem EPG durch Zentrifugation (2 min, 8000 UpM, RT) sedimentiert und die sedimentierten Zellen in 1 ml LB-Medium (2.4.1) aufgenommen, um das im Medium enthaltene Antibiotikum zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation (2 min, 8000 UpM, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 500 µl des Rezipientenstammes wurde erneut zentrifugiert (2 min, 8000 UpM, RT), die sedimentierten Zellen im Rücklauf resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte (2.4.1) aufgebracht. Nach einer Inkubation von 4 - 5 h bei 37 °C wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium (2.4.1) überführt und in den Verdünnungen $10^0 - 10^{-4}$ auf entsprechendem Selektivagar (2.4.2) ausplattiert. Zur Kontraselektion des *E. coli*-Donorstammes wurde zusätzlich 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy AG, Basel, CH) verwendet.

2.16 Konstruktion von Deletionsmutanten

Alle im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Deletionsmutanten und Insertion-/Deletionsmutanten von *P. aeruginosa* verfügen über *in frame*-Mutationen mit einer vollständigen Deletion eines definierten Gens. Die Mutanten wurden durch homologe Rekombination unter Verwendung des mobilisierbaren Suizidplasmids pSUP202 (Tab. 2.2) nach Tielker *et al.*⁸¹ erzeugt.

Zur Erzeugung der Stämme wurden zunächst Mutageneseplasmide konstruiert, die auf dem mobilisierbaren Suizidplasmid pSUP202 basieren. Es wurden mit geeigneten Oligonukleotiden (Tab. 2.4) Standard-PCRs (2.17) durchgeführt, um den stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiche (ca. 800 bp) der zu deletierenden Gene zu amplifizieren. Diese Bereiche wurden durch geeignete *in vitro* DNA-Rekombination (2.12) in das Suizidplasmid pSUP202 kloniert. Daraus gehen die pSUPupdw Plasmide hervor. Zur Konstruktion von Insertion-/Deletionsmutanten wurde durch die Hydrolyse von pBSL142 (Tab. 2.2) mit der Restriktionsendonuklease *MluI* ein ca. 1600 bp großes Fragment verfügbar gemacht, das eine Ω -Gm^r-Kassette beinhaltet. Dieses wurde zwischen den stromaufwärts- und stromabwärts-Bereichen des pSUPupdw kloniert. Daraus gehen die pSUPupGmdw Plasmide hervor. Eine Ausnahme stellt die Konstruktion des Plasmids zur Erzeugung des Stammes *P. aeruginosa* $\Delta pa1241$ (Tab. 2.1) dar. Da sich *pa1241* und *sprP* (*pa1242*) möglicherweise in einem bicistronischen Operon befinden, konnte keine Ω -Gm^r-Kassette zur Konstruktion des pSUPupGmdw verwendet werden. Diese Kassette würde durch Transkriptionsstopps die Transkription der stromabwärts befindlichen Gene ebenfalls hemmen. Aus diesem Grund wurde die Gm^r-Kassette aus dem Plasmid pWKR202 (Tab. 2.2) verwendet, die keine transkriptionsterminierenden Sequenzen beinhaltet. Durch die Hydrolyse von pWKR202 mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI wurde ein 2600 bp großes DNA-Fragment verfügbar gemacht, das die Gm^r-Kassette beinhaltet²⁶². Da das pSUPupdw Plasmid stets über die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *MluI* verfügt, wurde das Plasmid nach *MluI* Hydrolyse und die Fragment-Enden der Gm^r-Kassette mittels T4-DNA-Polymerase (2.12) inkubiert, um *blunt ends* zu erzeugen. Anschließend wurde die Gm^r-Kassette mit der T4-Ligase in das Plasmid ligiert. Die Orientierung der Kassette wurde überprüft, da diese, im Gegensatz zu den Ω -Gm^r-Kassetten, nur einen Transkriptionsstart besitzt. Zur Erzeugung der Deletions-/Insertionsmutanten wurde der *E. coli*-Stamm S17-1 (Tab. 2.1) mit den Mutageneseplasmiden pSUPupGmdw transformiert. Durch Konjugation (2.15) wurden die Plasmide nach *P. aeruginosa* PAO1 transferiert. Wenn homologe Rekombination stattgefunden hat, konnten Transkonjuganten identifiziert werden, die auf Selektivagarplatten (2.4.1; 2.4.2) mit dem Antibiotikum Gentamicin sowie dem zur Kontraselektion von *E. coli* S17-1 verwendeten Irgasan wachsen konnten. Anschließend konnte durch paralleles Überimpfen von Einzelkolonien auf Selektivagar mit und ohne Tetracyclin die Präsenz des pSUP202-Plasmidanteils im Chromosom untersucht werden. Sollte das der Fall sein, hat nur das erste Rekombinationsereignis

stattgefunden und das Plasmid konnte in das Chromosom integrieren. Um das zweite Rekombinationsereignis zu begünstigen, wurden die Transkonjuganten Stress ausgesetzt, indem diese für 4 Stunden bei 43 °C bebrütet wurden, um das RecA Protein zu aktivieren²⁸⁴. Durch paralleles Überimpfen von Einzelkolonien auf Selektivagar mit Tetracyclin und Selektivagar mit Gentamicin (2.4.1; 2.4.2) konnte daraufhin auf den Verlust des Vektoranteils im Chromosom untersucht werden.

2.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.17.1 Standard-PCR

Die PCR wurde nach Saiki *et al.*²⁸⁵ mit dem *Mastercycler Gradient* (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt, um DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Die PCR-Reaktionsansätze wurden in einem Gesamt-Volumen von 50 µl angesetzt. Diese setzten sich zusammen aus: 10 - 50 ng Matrizen-DNA, 200 µM dNTPs, 50 pmol jedes Oligonukleotids, 2,5 U *Phusion® DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA), 5 µl des mitgelieferten Polymerase GC-Puffers und 1 M Betain. Die PCR wurde wie in (Tab. 2.9) dargestellt durchgeführt:

Tab. 2.9 Bedingungen der Standard-PCR.

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer	
1	Initiale Denaturierung	98 °C	10 min	
5 x	2	Denaturierung	98 °C	
	3	Anlagerung	Oligonukleotid-spezifisch (55 - 70 °C)	30 sec
	4	Elongation	72 °C	Produktabhängig (0,5 - 2 min)
5	Elongation	72 °C	10 min	

2.17.2 Touchdown PCR

Die *touchdown* PCR (Don *et al.*²⁸⁶, modifiziert) unterscheidet sich von der Standard-PCR (2.17.1) durch Variation der Anlagerungstemperaturen während der PCR. Die *touchdown* PCR beginnt mit einer Anlagerungstemperatur, die 15 °C höher ist als die berechnete Anlagerungstemperatur der verwendeten Oligonukleotide. Während der ersten 20 Zyklen wurde die Anlagerungstemperatur pro Zyklus um 0,5 °C gesenkt. Daraufhin folgten 10 Zyklen mit der berechneten Anlagerungstemperatur der verwendeten Oligonukleotide (Tab. 2.7). Die Verwendung der *touchdown* PCR reduziert die Wahrscheinlichkeit für Fehlanlagerungen der Oligonukleotide und unterstützt damit die spezifische Amplifikation des Zielproduktes.

2.17.3 Ortsspezifische Mutagenese durch *QuikChange®* PCR

Das Einbringen zielgerichteter Mutationen erfolgte unter Verwendung der in Tab. 2.6 aufgeführten Oligonukleotide. Wie bei Edelheit *et al.*²⁸⁷ beschrieben, wurden zunächst zwei PCR-Reaktionsansätze in einem Volumen von 25 µl angesetzt, die erst nach 5 getrennten PCR-Zyklen vereinigt wurden. Die einzelnen Ansätze setzten sich wie folgt zusammen: 10 - 50 ng Matrizen-DNA, 200 µM dNTPs, 50 pmol nur eines Oligonukleotids, 2,5 U *Phusion® DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA), 2,5 µl des mitgelieferten Polymerase GC-Puffers und 1 M Betain. Die PCR wurde wie in Tab. 2.10 beschrieben durchgeführt. Nach der

PCR wurde dem kompletten Ansatz 1 μ l *DpnI* zugesetzt und ü.N. bei RT inkubiert. Die erfolgreiche Amplifikation der Plasmid-DNA konnte an dieser Stelle durch Agarose-Gelelektrophorese (2.11) kontrolliert werden. Die Restriktion durch *DpnI* wurde gestoppt (20 min, 80 °C) und das PCR-Produkt gereinigt (2.17.5). Elektrokompente *E. coli* DH5a-Zellen (2.14.1) wurden mit 2 μ l der mutagenisierten DNA transformiert (2.14.2) und anschließend auf Selektivagar ausplattiert.

Tab. 2.10 Bedingungen der *QuikChange*® PCR.

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	98 °C	10 min
5 x	2	Denaturierung	98 °C
	3	Anlagerung Oligonukleotid-spezifisch (55 - 70 °C)	30 sec
	4	Elongation	72 °C Produktabhängig (0,5 - 2 min)
5	Elongation	72 °C	7 min
Vereinigung der einzelnen PCR-Reaktionsansätze			
18 x	6	Denaturierung	98 °C
	7	Anlagerung Oligonukleotid-spezifisch (55 - 70 °C)	30 sec
	8	Elongation	72 °C Produktabhängig (0,5 - 2 min)
9	Finale Elongation	72 °C	7 min

2.17.4 Real-time PCR

Die Quantifizierung von synthetisierter cDNA (2.22) erfolgte mittels *real-time* PCR. Es wurde der *Power SYBR*® *Master Mix* (Invitrogen GmbH, Darmstadt) nach Herstellerangaben verwendet. In den Reaktionsansatz (20 μ l) wurden 100 ng cDNA eingesetzt. Die für die *real-time* PCR verwendeten Oligonukleotidstarmoleküle (Tab. 2.7) wurden mithilfe der Software *Primer3Plus*²⁸⁸ bestimmt. Basierend auf folgenden Daten wurden die Oligonukleotide definiert:

Produktlänge:	100 - 150 bp	
Oligonukleotidlänge:	18 - 22 bp	(optimal: 20 bp)
GC-Gehalt:	40 - 60 %	(optimal: 50 %)
Schmelztemperatur der Oligon.:	55 - 60 °C	(optimal: 57 °C)
Schmelztemperatur des Produkts:	65 - 85 °C	(optimal: 75 °C)

Die *real-time* PCRs wurden in dem *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®, Darmstadt) durchgeführt.

2.17.4.1 Relative Quantifizierung

Für die Analyse relativer Expressionsunterschiede wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode nach Livak & Schmittgen²⁸⁹ verwendet. Mit der *real-time* PCR wird die Fluoreszenz der amplifizierten DNA Moleküle über den Einbau des *SYBR*® Farbstoffs ermittelt. Der Ct (*cycle threshold*) - Wert ist als der Zyklus der PCR definiert, bei dem die exponentielle Zunahme der Fluoreszenz erstmals über den Hintergrundwert ansteigt. Der Ct-Wert wurde von der Software *Sequence Detection System SDS3.2* (Applied Biosystems®, Darmstadt) ermittelt.

Bei der Methode der relativen Quantifizierung wird die Expression der Gene von Interesse (GOI) auf das *rpoD*-Gen, ein nicht reguliertes *housekeeping*-Gen, bezogen. Die ermittelten Ct-Werte der GOI wurden zunächst mit dem Ct-Wert für *rpoD* normiert. Nach dieser Normierung wurden von den normierten Δ Ct-Werten des zu untersuchenden Stammes die entsprechenden normierten Δ Ct-Werte des Kontrollstammes subtrahiert. Daraus ergibt sich für jedes untersuchte Gen ein $\Delta\Delta$ Ct-Wert (Formel 1). Mit den berechneten $\Delta\Delta$ Ct-Werten kann anschließend der relative Expressionsunterschied (Änderungsrate) berechnet werden (Formel 2).

$$\text{Formel 1: } \Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{GOI}} - \text{Ct}_{\text{rpoD}})_{\text{Stamm}} - (\text{Ct}_{\text{GOI}} - \text{Ct}_{\text{rpoD}})_{\text{Kontrollstamm}}$$

$$\text{Formel 2: } \text{Änderungsrate} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

2.17.4.2 Absolute Quantifizierung

Bei der absoluten Quantifizierung mittels *real-time* PCR wird die Anzahl der Transkripte einer mRNA über den Vergleich mit einer Standardgerade ermittelt²⁹⁰. Mit den Oligonukleotiden für die *real-time* PCR (Tab. 2.7) wurden Standard-PCR Reaktionen mit der genomischen DNA (2.9) von *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt, um die GOI zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (2.17.5) und deren Konzentration bestimmt (2.10). Es wurde daraufhin eine Verdünnungsreihe der amplifizierten DNA hergestellt und eine *real-time* PCR durchgeführt (2.17.4). Es wurden Standardgeraden erstellt, indem die Ct-Werte der *real-time* PCR gegen die Anzahl Transkripte aufgetragen wurde. Nach der reversen Transkription (2.22) und anschließender *real-time* PCR (2.17.4) einer RNA-Probe aus *P. aeruginosa* kann über den Vergleich der Ct-Werte mit den Standardgeraden die Anzahl Transkripte der GOI in der RNA-Probe bestimmt werden.

2.17.5 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Ansätze wurden zunächst durch Agarose-Gelelektrophorese (2.11) analysiert. Waren unspezifische Nebenprodukte aus der PCR-Reaktion hervorgegangen, wurde das Zielfragment aus dem Agarosegel extrahiert²⁹¹. Ohne Nebenprodukte wurde die DNA unmittelbar aus dem PCR-Reaktionsgemischen gereinigt. In beiden Fällen erfolgte die Reinigung mit dem *innuPREP DOUBLEpure Kit* (Analytik Jena AG, Jena) nach Anleitung des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer.

2.18 Sequenzierung von DNA

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

2.19 DNA-Affinitätschromatographie

2.19.1 Immobilisierung biotinylierter DNA-Fragmente

Die Methode der DNA-Affinitätschromatographie wurde von Gabrielsen *et al.*²⁹² beschrieben. Das hier verwendete Protokoll basiert auf dem modifizierten Protokoll von Jungwirth *et al.*²⁹³.

Die stromaufwärts-Bereiche (Promotorbereiche) ausgewählter Gene wurden mittels Standard-PCR (2.17) unter Verwendung von Biotin-markierten Oligonukleotiden (Tab. 2.5) amplifiziert. Als Kontrolle für unspezifisch DNA-bindende Proteine wurde weiterhin ein DNA-Bereich amplifiziert, der innerhalb eines Gens liegt. Diese biotinylierte DNA wurde an Streptavidin-umhüllte magnetische *beads* (*M-PVA SAV2*) der Firma PerkinElmer chemagen Technologie GmbH (Baesweiler) gekoppelt. Diese Kopplung ist möglich, da die Bindung von Streptavidin und Biotin zu den stärksten nichtkovalenten biologischen Bindungen gehört. 50 µl der magnetischen *beads* wurden in ein EPG überführt, mit einem *Single Tube Magnet* (QIAGEN AG, Hilden) separiert und dreimal mit 1 ml 1 x DNA-Bindepuffer gewaschen. 20 µg der amplifizierten DNA wurden mit 1 Volumen 2 x DNA-Bindepuffer versetzt und in das EPG mit den gewaschenen magnetischen *beads* überführt. Das Probenvolumen wurde mit 1 x DNA-Bindepuffer auf 1 ml Gesamt-Volumen aufgefüllt. Die Inkubation des DNA/*bead*-Gemisches erfolgte ü.N. bei 4 °C auf einem Rotator (neoLab GmbH, Heidelberg). Anschließend wurden die magnetischen *beads* mit der gekoppelten DNA separiert und dreimal mit 1 ml 1 x DNA-Bindepuffer gewaschen. Daraufhin folgten zwei weitere Waschschrte mit 1 ml Protein-Bindepuffer.

2 x DNA-Bindepuffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl

Protein-Bindepuffer:

20 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Triton X100, 10 % (v/v) Glycerin, 100 mM NaCl

Nach dem Autoklavieren des Puffers wurden weiterhin zugegeben:

1 mM DTT, 1 Tablette *SigmaFAST™ Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze) für 100 ml Protein-Bindepuffer

2.19.2 Anreicherung DNA-bindender Proteine

P. aeruginosa wurde bis zu einer Zelldichte, die einer O.D. $_{580\text{ nm}} = 2,5$ entspricht, kultiviert (2.4.3), die Zellen mittels Zentrifugation (30 min, 4000 UpM, RT) sedimentiert und entsprechend einer Zelldichte, die einer O.D. $_{580\text{ nm}} = 20$ entspricht, in Protein-Bindepuffer (2.19.1) aufgenommen. Es wurde das GZE (2.24) dieser Zellsuspension hergestellt. 4 ml dieses GZE wurden zu den DNA-gekoppelten magnetischen *beads* gegeben und der gesamte Reaktionsansatz 75 min bei RT auf einem Rotator (neoLab GmbH, Heidelberg) inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde separiert und mit 5 ml Protein-Bindepuffer gewaschen. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit 1 ml Protein-Bindepuffer. Für die Elution der an die DNA-gebundenen Proteine wurde dem Reaktionsansatz dreimal 50 µl Elutionspuffer zugegeben und die Elutionsfraktionen vereinigt. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (2.32).

Elutionspuffer:

Protein-Bindepuffer (2.19.1) mit 1 M NaCl

RNA Techniken

2.20 Isolierung bakterieller Gesamt-RNA

Die Isolierung bakterieller Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Handbook 06/2001) mit dem *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN AG, Hilden). Es wurden Aliquots (max. 1×10^9 Zellen) der Bakterienkultur in der entsprechenden Wachstumsphase geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bei der Isolierung der RNA aus *P. aeruginosa* wurden die sedimentierten Zellen, abweichend von dem Standardprotokoll, in $100 \mu\text{l}$ lysozymhaltigem TE-Puffer (40 mg Lysozym/ml) resuspendiert und 3 - 5 min bei RT inkubiert. TE-Puffer und A. dest. wurden vor der Verwendung nach Herstellerangaben mit 0,1 % (v/v) DEPC (AppliChem GmbH, Darmstadt) behandelt, um RNAsen zu inhibieren²⁹⁴. Nach erfolgter RNA Isolierung wurde ein DNA-Verdau mit der *Ambion® DNase I (RNase-free)* (Invitrogen GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Die Inkubationszeit für den DNA-Verdau betrug, abweichend von dem Standardprotokoll, 1 h. Eine Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C .

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.21 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde für Transkriptomanalysen (2.23) mit dem *UV-Vis Spectrophotometer Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt. Wenn die isolierte RNA für *real-time* PCR Reaktionen verwendet wurde, wurde die Konzentration mit dem *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen GmbH, Darmstadt) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer bestimmt.

2.22 Reverse Transkription von RNA

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA in cDNA erfolgte mit dem *SuperScript® VILO™ Master Mix* (Invitrogen GmbH, Darmstadt). Ausgehend von $2 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA (2.20) erfolgte die cDNA Synthese nach Herstellerangaben. Die cDNA wurde anschließend für die *real-time* PCR (2.17.4) verwendet. Die spezifische cDNA Synthese ausgewählter Gene erfolgte ausgehend von $1 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA (2.20), die durch reverse Transkription mit den in Tab. 2.7 angegebenen Oligonukleotiden und mithilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Invitrogen GmbH, Darmstadt) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNA wurde anschließend als Matrize in eine *touchdown* PCR (2.17.2) eingesetzt.

2.23 Transkriptomanalyse (DNA-Chip-Technologie)

2.23.1 DNA-Chip-Design

Für globale Genexpressionsanalysen wurden in dieser Arbeit 4-plex DNA-Chips mit spezifischen 60mer-Oligonukleotiden verwendet ($4 \times 44\text{K}$, Agilent Technologies Inc., Waldbronn). Geeignete spezifische Oligonukleotide wurden mit der Agilent-Software eArray bestimmt (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>). Für *P. aeruginosa* PAO1 wurden die 60mer-Oligonukleotide auf Grundlage der Genom-Annotation und Gensequenzen der NCBI-Accession-

Nummer NC_002516 innerhalb jedes Gens bestimmt. Zusätzlich wurde ein spezifisches 60mer-Oligonukleotide innerhalb der 200 bp-Sequenz vor dem Translationsstart (stromaufwärts) jedes Gens mit eArray bestimmt. Auf diese Weise wurden 5636 spezifische Oligonukleotide für die Gene und 5649 spezifische Oligonukleotide für die 200-bp-Region stromaufwärts eines Gens erhalten.

2.23.2 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Die Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA wurde wie von Polen *et al.*²⁹⁵ beschrieben durchgeführt. Die Synthese erfolgte durch Umschreiben von 25 µg Gesamt-RNA (2.20) mit Zufalls-Hexamer-Oligonukleotiden unter Verwendung der fluoreszierenden Nukleotid-Analoga Cy3-dUTP und Cy5-dUTP (GE Healthcare GmbH, Freiburg). Der Reaktionsansatz bestand aus 3 µl Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP (1 mM), 3 µl DTT (100 mM), 6 µl des 5x *first strand Buffers* (Invitrogen GmbH, Darmstadt), 0,6 µl dNTP-Mix (jeweils 25 mM dATP, dCTP, dGTP und 10 mM dTTP) und 2 µl der reversen Transkriptase *SuperScript® II* (Invitrogen GmbH, Darmstadt). Nach der Synthese (2 h, 42 °C) wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0,1 N NaOH gestoppt und die RNA hydrolysiert (10 min, 70 °C). Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 10 µl 0,1 N HCl neutralisiert. Die cDNA wurde durch dreimaliges Waschen mit A. dest. von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt und durch Zentrifugieren über *Microcon YM-30* Membranen (Merck KGaA, Darmstadt) eingengt. Die gereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden der zu vergleichenden RNA-Proben wurden vereinigt und unmittelbar für die Hybridisierung verwendet.

2.23.3 DNA-Chip-Hybridisierung

Die Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden der zu vergleichenden RNA-Proben wurden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte 17 h bei 65 °C unter Verwendung des *Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent Technologies Inc., Waldbronn) nach Herstellerangaben. Für die Hybridisierung wurde der Hybridisierungsofen *PerfectBlot* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Nach der Hybridisierung wurden die DNA-Chips mit dem *Wash Buffer Kit* (Agilent Technologies Inc., Waldbronn) nach Herstellerangaben gereinigt, um Probenlösung und unspezifisch gebundene cDNA zu entfernen.

2.23.4 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von DNA-Chips

Die Bestimmung des relativen mRNA-Spiegels der einzelnen Gene erfolgte durch Messung der einzelnen *spot*-Fluoreszenzen bei 532 nm (Cy3-dUTP) und bei 635 nm (Cy5-dUTP) mit einer Auflösung von 5 µm pro Bildpixel mit dem *GenePix 4000B Laser Scanner* und der *GenePix 6.0 Software* (Molecular Devices GmbH, Biberach). Das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz ist ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel der verglichenen RNA-Proben²⁹⁶. Die Scan-Bilder wurden für die nachfolgende Datenanalyse im TIFF-Format digital gespeichert.

2.23.5 Datenanalyse

Die quantitative Analyse der TIFF-Bilddateien wurde mit der *GenePix Pro 7.0 Software* (Molecular Devices GmbH, Biberach) durchgeführt und die Ergebnisse als GPR-Datei gespeichert. Die GPR-Dateien wurde unter Verwendung der *BioConductor* (<http://www.bioconductor.org>) Software-Pakete *limma* und *marray* prozessiert, um die numerischen Werte der relativen RNA-Spiegel (Ratio of Medians, GenePix Pro-Software) zu berechnen und zu normalisieren (Lowess-Normalisierung)²⁹⁷. Zur Datenspeicherung und für weitere Analysen wurden die prozessierten Daten mit den numerischen Werten der normalisierten relativen mRNA-Spiegel (Ratio of

Medians) sowie die experimentellen Informationen nach MIAME²⁹⁸ in der *DNA microarray database*²⁹⁹ des Instituts für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1) des Forschungszentrums Jülich gespeichert. Die Bestimmung des relativen mRNA-Spiegels wurde in 5 unabhängigen Experimenten durchgeführt (biologische Replikate). Für die Identifizierung differenziell exprimierter Gene wurden die Daten der *spots* (Gene) berücksichtigt, die bei der Bildauswertung von der Software automatisch erkannt wurden (Flags ≥ 0) und ein Signal/Rausch-Verhältnis ≥ 3 für Cy5 (F635Median/B635Median, GenePix Pro) oder Cy3 (F532Median/B532Median, GenePix Pro) aufwies. *p*-Werte wurden für jedes Gen mit dem t-Test durch Vergleich der Streuung der normalisierten und logarithmierten Einzelwerte des Gens in den Replikaten mit der Streuung der normalisierten und logarithmierten Werte von allen auswertbaren Genen in den Replikaten berechnet (TTEST-Tabellenfunktion, Microsoft Excel). Gene mit *p*-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant verändert angesehen.

Proteinbiochemische Techniken

2.24 Zellaufschluss zur Proteinisolierung

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten (GZE) wurden sedimentierte Zellen vor dem Zellaufschluss in Tris-HCl Puffer aufgenommen. Zellsuspensionen mit einem Volumen von bis zu 1 ml wurden durch Ultraschall lysiert. Die Zellsuspension wurde während des Zellaufschlusses gekühlt. Es wurde der *Sonifier*[®] 250 (BRANSON Ultraschall, Dietzenbach) mit *MS72 Sonotrode* bei 25 % Power und 5 x 10 % Zyklen (zweimal 2 min) verwendet.

Tris-HCl Puffer:

200 mM Tris-HCl, pH 8

2.25 Gewinnung von Kulturüberständen

Kulturüberstände wurden stets durch Zentrifugation gewonnen. Die Geschwindigkeit der Zentrifugation kann je nach Anwendung variieren und ist bei den entsprechenden Methoden im Detail beschrieben. Zellfreie Überstände wurden durch Filtration mit Membranfiltern (0,2 μm Porengröße) erzeugt.

2.26 Präzipitation von Proteinen durch Trichloressigsäure

Für die Präzipitation von Proteinen (modifiziert nach Peterson³⁰⁰) wurden diese mit 10 % einer 1 % (w/v) NaDOC-Lösung versetzt, intensiv gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Der Probe wurden daraufhin 10 % einer 70 % (w/v) TCA-Lösung hinzugegeben. Nach intensivem Mischen folgte eine Inkubation von 10 min auf Eis. Daraufhin wurde die Probe 30 min bei 15000 UpM (4 °C) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 500 μl 80 % (v/v) Aceton (gelagert bei -20 °C) gewaschen und 20 min bei 15000 (4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in reduzierendem Probenpuffer (2.32) aufgenommen. Vor der Analyse mittels SDS-PAGE (2.32) wurde die Probe 10 min bei 99 °C erhitzt. Sollten verbliebene TCA-Reste einen Farbumschlag des Bromphenolblau von blau nach gelb hervorrufen, wurde der pH-Wert mit 0,5 μl 1 M NaOH korrigiert.

2.27 Löslichkeitsanalyse von Proteinen

Überexpressionskulturen (2.4.5) wurden nach erfolgter Genexpression durch Zentrifugation (5 min, 15000 UpM, RT) sedimentiert. Daraufhin wurden die sedimentierten Zellen entsprechend einer O.D._{580 nm} = 10 resuspendiert und die Zellsuspension aufgeschlossen (2.24). Zur Beseitigung der Zelltrümmer wurden diese durch niedertourige Zentrifugation (3 min, 3000 UpM, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Proteinfractionen getrennt. Um zu analysieren, ob Proteine in der unlöslichen Fraktion (als Präzipitat) oder in der löslichen Fraktion (in Lösung) vorlagen, wurden die zu untersuchenden Proben zentrifugiert (30 min, 15000 UpM, 4 °C). Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde vorsichtig von dem Sediment (unlösliche Fraktion) getrennt und die Proteinzusammensetzung beider Fraktionen mittels SDS-PAGE (2.32) untersucht.

2.28 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)

Zielproteine, die mit einem Histidin-tag (2 - 10 Histidine, meist 6) fusioniert wurden, können mittels IMAC gereinigt werden. Das Prinzip der IMAC nach Hochuli *et al.*³⁰¹ beruht auf der Interaktion divalenter Kationen (z. B. Ni²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺), die an einer Matrix immobilisiert vorliegen, mit den Imidazolringen der Histidine des Zielproteins. Als Chelatgruppe wird häufig Nitrilo-3-Essigsäure (NTA) verwendet. NTA kann vier der sechs Bindungsstellen eines Ni²⁺-Ions belegen, wodurch dieses stabil an die NTA-Matrix gebunden wird. Als Eluent wurde Imidazol verwendet, das gebundene Zielproteine von der Matrix verdrängt.

Auf dem Prinzip der IMAC beruht auch die sog. *batch*-Reinigung. Bei der *batch*-Reinigung wird eine Lösung, die das Zielprotein beinhaltet, mit der Ni-NTA Agarose inkubiert. Das Zielprotein bindet dabei an die Ni-NTA Agarose. Die *batch*-Reinigung begünstigt die Bindung von Zielproteinen an die Matrix, die in geringer Konzentration vorliegen oder einen schwer zugänglichen Histidin-tag besitzen.

Für die Reinigung der Protease SprP und den verschiedenen SprP Varianten wurde der Überstand einer Überexpressionskultur (2.4.6) verwendet. Unter Verwendung der Zentrifugationsfilter *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units* mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa (Merck KGaA, Darmstadt) wurden 100 ml Überstand durch Zentrifugation (4000 UpM, 4 °C) auf 1 ml eingengt und daraufhin dreimal mit 10 ml Inkubationspuffer gewaschen. 5 ml dieser Proteinlösung wurden in eine Chromatographie-Tropfsäule mit 1 ml Ni-NTA Agarose (QIAGEN AG, Hilden) überführt. Die Säule wurde daraufhin verschlossen und 3 h bei 4 °C permanent leicht geschwenkt. Die nachfolgenden Waschschrte und die Elution wurden ebenfalls bei 4 °C durchgeführt. Der Komplex aus Ni-NTA Agarose und gebundener Protease wurde mit 10 ml Waschpuffer 1 und 10 ml Waschpuffer 2 gewaschen, um unspezifisch gebundenen Proteine zu verdrängen. Abschließend wurde die Protease mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Unter Verwendung der Zentrifugationsfilter *Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units* mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa (Merck KGaA, Darmstadt) wurden die 5 ml der Elution durch Zentrifugation (4000 UpM, 4 °C) auf 0,5 ml eingengt und daraufhin dreimal mit 4 ml Puffer (200 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 8 bei 8 °C) gewaschen. Das finale Volumen betrug 1 ml.

Inkubationspuffer:

10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 8 (4 °C)

Waschpuffer 1:

10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)

Waschpuffer 2:

10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 30 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)

Elutionspuffer:

10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 250 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)

2.29 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen von Gesamtzellextrakten (GZE) wurden mit dem *2-D-Quant Kit* (GE Healthcare GmbH, Freiburg) bestimmt. Die Proteinkonzentration von gereinigten Proteinen wurde mit dem *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen GmbH, Darmstadt) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer bestimmt.

2.30 Proteaselagerung

Die gereinigte Protease SprP wurde für Zeiträume von bis zu 2 Wochen in Tris-Puffer (200 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 8, 8 °C) bei 8 °C gelagert. Für Lagerungen über diesen Zeitraum hinaus wurde die Proteaselösung mit 0,25-fache Volumen *Protein Stabilizing Cocktail* (Pierce, Rockford, USA) versetzt und bei -20 °C gelagert.

2.31 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC; *high performance liquid chromatography*) handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, das genutzt werden kann, um Substanzen zusammen mit einem Laufmittel (mobile Phase) und einer Chromatographiesäule (stationäre Phase) voneinander zu separieren, quantifizieren und identifizieren.

Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes der Proteinefragmente, die durch autokatalytische Prozessierung der Protease SprP entstehen, wurde hier eine HPLC-basierte Größenausschlusschromatographie (HPLC-SEC) eingesetzt. Die Trennung der Proteinefragmente erfolgte an einer der Säule *Biosep-SEC S2000* in der Dimension 300 x 7.8 mm (Phenomenex Ltd., Aschaffenburg) sowie einer HPLC-Anlage *LC-10Ai* (Shimadzu, Duisburg) gekoppelt mit einem Photodiodenarray Detektor (*SPD-M10Avp*) und einem Fraktionssammler (*FRC-10A*). Das System wurde vor dem Probenauftrag mit Equilibrierungspuffer eingestellt. Die Kalibrierung des Systems erfolgte durch Einsatz von kommerziell erhältlichen Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht, die in Equilibrierungspuffer gelöst wurden: Thyroglobulin (670 kDa), BSA (67 kDa), Albumin (45 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa) und Uridin (0,2 kDa). Die Berechnung des K_{AV} (Verteilungskoeffizient) der einzelnen Proteine erfolgte nach folgender Formel:

Formel 3:
$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_e :	Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins
V_t :	Gesamtvolumen der Säule (Uridin)
V_0 :	Ausschlussvolumen der Säule (Thyroglobulin)

Die resultierende Standardgerade (Abb. 3.12) wird durch Auftragung der K_{AV} -Werte des jeweiligen Standardproteins gegen den Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichtes ($\log_{10} M_R$) gebildet. Der Vergleich der K_{AV} -Werte mit der Geradengleichung der Standardgerade ermöglicht die Berechnung des apparenten Molekulargewichtes für das Protein bzw. das Proteingemisch in der Probe. Hier wurden 0,1 mg der aktiven Protease SprP mit den Zentrifugationsfiltern *Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units* (Merck KGaA, Darmstadt) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa auf ein Volumen von 200 μ l eingengt und mit Equilibrierungspuffer (Verhältnis 1:1000) versetzt. Es wurden 100 μ l der eingengten Probe auf die Säule aufgetragen und in verschiedene Größenbereiche (Abb. 3.11 A und B) aufgetrennt, dabei wurden 500 μ l Fraktionen gesammelt und nachfolgend analysiert (Abb. 3.11 C). In zwei unabhängigen Aufarbeitungen der Protease SprP konnte ein apparentes Molekulargewicht der Proteinfragmente bestimmt werden. Zum Vergleich wurden Chromatogramme bei 220 nm (Peptidbindungen) und bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) aufgenommen. Für die Identifizierung der aktiven SprP Variante wurde anschließend die Proteaseaktivität verschiedener Fraktionen analysiert (Abb. 3.11 C).

Equilibrierungspuffer:

200 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,5

2.32 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben nach Laemmli³⁰² erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Durch Komplexbildung der Proteine mit SDS wird die Eigenladung der Proteine durch die negative Ladung des SDS überdeckt. So werden die Proteine während der Elektrophorese aufgrund ihres Masse/Ladungsverhältnisses nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit getrennt. Die Proteine wurden in einem Sammelgel fokussiert (15 min, 100 V) und anschließend in einem Trenngel nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit aufgetrennt (60 min, 150 V). Die Proben wurden vor der Auftragung auf das Gel mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 99 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde in der vertikalen Gelapparatur *Mini-Transfer-Blot Cell* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Die Proteine wurden durch ü.N. Färbung mit Coomassie Brilliant Blue Färbelösung gefärbt^{303,304}, anschließend mehrfach mit A. dest. gewaschen und mit der Videodokumentationsanlage *Imaging System Stella 3200* (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt) dokumentiert. Das Molekulargewicht der Proteine wurde über einen Protein-Molekulargewichtsstandard bestimmt.

Probenpuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 350 mM DTT, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau

Sammelgel (5 %):

0,83 ml Acrylamid, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2,77 ml A. dest., 50 μ l 10 % (w/v) SDS, 50 μ l 10 % (w/v) APS, 10 μ l TEMED

Trenngel (12 %):

4 ml Acrylamid, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 3,35 ml A. dest., 100 μ l 10 % (w/v) SDS, 100 μ l 10 % (w/v) APS, 10 μ l TEMED

Molekulargewichtsstandard:

3 μ l *PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot)
Bandengröße in kDa: 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250

Elektrophorese-Laufpuffer:

25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,8

Färbelösung:

10 % (w/v) Ammoniumsulfat, 0,12 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 1,2 % (v/v) Phosphorsäure, 20 % (v/v) MeOH

2.33 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gele)**2.33.1 Probenvorbereitung**

Die zweidimensionale Gelelektrophorese³⁰⁵⁻³⁰⁷ wurde verwendet, um das extrazelluläre Sekretom und das zelluläre Proteom von *P. aeruginosa* zu analysieren. Die *P. aeruginosa*-Stämme wurden bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,5 entspricht, kultiviert und die Zellen durch Zentrifugation (30 min, 13000 UpM, 4 °C) sedimentiert. Für die Analyse des Sekretoms wurden die Überstände sterilfiltriert (2.25) und die Proteine mittels TCA präzipitiert. Für die TCA-Präzipitation wurde der Überstand mit 1 Volumen 40 % (w/v) TCA versetzt und ü.N. bei -20 °C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden zentrifugiert (20 min, 13000 UpM, 4 °C) und dreimal mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Proteine in Rehydrierungspuffer aufgenommen. Für die Analyse des zellulären Proteoms wurden die sedimentierten Zellen in Resuspendierungspuffer aufgenommen. Der Zellaufschluss der Zellsuspension wurde mittels Ultraschall (2.24, dreimal 3 min) durchgeführt und anschließend die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 4000 UpM, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die enthaltenen Proteine wie oben beschrieben präzipitiert. Die Konzentration der Proteine wurde ermittelt (2.29).

Rehydrierungspuffer:

7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 1 % (v/v) IPG Puffer (GE Healthcare GmbH, Freiburg), 0,1 % (v/v) Bromphenolblau, 15 mM DTT

Resuspendierungspuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8

2.33.2 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Für die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld, mit einem immobilisierten pH-Gradienten³⁰⁸, wurden die fertigen Gelstreifen *SERVA IPG BlueStrips* (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) verwendet. Es wurden Gelstreifen mit einer Länge von 24 cm und einem pH-Wert von pH 4 - 7 verwendet. Für die Beladung der Gelstreifen wurden 450 μ l der Proteinlösung (2.33.1) mit 400 μ g Protein in einem *Strip Holder* (GE Healthcare GmbH, Freiburg) vorgelegt und der Gelstreifen luftblasenfrei auf den Flüssigkeitsfilm aufgelegt. Anschließend wurden die Gelstreifen mit *Cover Fluid* (GE Healthcare GmbH, Freiburg) überschichtet und für 16 h inkubiert. Die isoelektrische Fokussierung wurde in dem System *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare GmbH, Freiburg) durchgeführt.

Tab. 2.11 Einstellungen für die isoelektrische Fokussierung.

Schritt	Methode	Spannung (V)	Zeit (Vh)	Dauer (h)
1	Step & Hold	100	300	3
2	Step & Hold	300	900	3
3	Gradient	1000	6000	6
4	Gradient	10000	15000	1,5
5	Step & Hold	10000	60000	6
6	Step & Hold	100	1000	10

2.33.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2. Dimension)

Die Trennung in der zweiten Dimension nach elektrophoretischer Beweglichkeit erfolgte mittels SDS-PAGE (2.32). Die Gelstreifen aus der isoelektrischen Fokussierung wurden auf den oberen Rand eines 24 cm breiten 12 % Polyacrylamidgels (2.32) gelegt und mit einer 2 % (w/v) Agaroselösung luftblasenfrei fixiert. Die SDS-PAGE der 24 cm breiten Gele erfolgte in der Gelapparatur *Ruby 600 SE* (GE Healthcare GmbH, Freiburg) bei einer Spannung von 75 Volt. Die Gelelektrophorese erfolgte über 20 h.

Anschließend wurden die Proteine durch 30 min Inkubation mit Proteinfixierungspuffer im Gel fixiert und daraufhin mit Coomassie Brilliant Blue (2.32) gefärbt. Zuletzt wurden die Polyacrylamidgele mehrere Tage in A. dest. inkubiert, um die Hintergrundfärbung zu beseitigen.

Proteinfixierungspuffer:

10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Ethanol, 50 % A. dest.

2.33.4 Datenanalyse

Die 2D-Gele wurden mit dem *Typhoon Trio* (GE Healthcare GmbH, Freiburg) dokumentiert. Für die Datenanalyse wurde die Software *Delta2D* (DECODON GmbH, Greifswald) verwendet. Für die Datenanalyse wurden die Bilder der biologischen Triplikate jedes Stammes gemittelt und dann das Bild der gemittelten Triplikate eines Stammes mit dem Bild der gemittelten Triplikate eines anderen Stammes übereinander gelegt. Es folgte die automatische und manuelle Anpassung aller Protein-*spots*. Für die Auswertung wurden alle Protein-*spots* betrachtet, die einen Mengenunterschied von ≥ 2 und einen p -Wert $\leq 0,05$ aufwiesen. Diese Protein-*spots* wurden für die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS (2.34) vorbereitet.

2.34 MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

2.34.1 Tryptischer Verdau von Proteinen (in-Gel)

Proteinbanden wurden aus SDS-Gelelektrophoren mit einem Skalpell ausgeschnitten und in *Protein LoBind Tubes* (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Anschließend wurden die Proteine im Gel mit der Protease Trypsin verdaut³⁰⁹. Die Coomassie Brilliant Blue-gefärbten Gelstücke wurden durch dreimaliges Waschen mit 350 μ l 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat unter permanentem Schütteln in einem Thermomixer bei 1200 UpM vollständig entfärbt. Die Lösung zum Entfärben wurde vorsichtig abgenommen und die entfärbten Gelstücke anschließend für 20 min in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden in 6 μ l 3 mM Tris-HCl, pH 8,8, mit Trypsin (20 ng/ μ l Endkonzentration) rehydratisiert und ü.N. bei RT inkubiert. Die zu Peptidfragmenten degradierten Proteine wurden in zwei Schritten aus dem Gel eluiert. Nach

Zugabe von 2 μl A. dest. wurde das Gelstück 15 min im Ultraschallbad *Sonorex* (BANDELIN electronic, Berlin) inkubiert und daraufhin der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues EPG überführt. Dann wurden 5 μl 30 % (v/v) Acetonitril mit 1 % (v/v) Trifluoressigsäure hinzugegeben, erneut 15 min im Ultraschallbad inkubiert und dieser Überstand mit dem zuvor abgenommenen Überstand vereinigt. Die Proben wurden direkt analysiert oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.34.2 Bestimmung der Peptidmassen

Für die Messung wurde 1 μl der eluierten Peptidlösung auf die PAC96 (*Prespotted Anchor Chip*)-Platte der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen) aufgetragen. Es wurde eine HCCA-Matrix verwendet. Die Peptidlösung wurde 3 min auf der HCCA-Matrix inkubiert. Daraufhin wurden 7 μl einer 0,1 M Ammoniumphosphatlösung in 0,2 % Trifluoressigsäure hinzugegeben und diese Lösung für 5 sec inkubiert. Abschließend wurde die Lösung vollständig von der Matrix entfernt. Die Identifizierung der Peptide erfolgte mittels Peptidmassen-*fingerprint*-Analyse^{309,310}. Für die Bestimmung der Peptidmassen wurde das Ultraflex III (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) verwendet.

2.35 Enzymaktivitätstests

2.35.1 Proteaseaktivität: Zymographie

Die Zymographie basiert auf einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einem Substrat, das mit der Polyacrylamid-Matrix kopolymerisiert vorliegt. Es wurden die Casein-Gele *Novex*® 4 - 16 % *Zymogram Blue Casein Gel* (Invitrogen GmbH, Darmstadt) nach Herstellerangaben verwendet. Eine Proteaselösung wurde 1:1 mit dem Probenpuffer *Novex*® *Tris-Glycine SDS Sample Buffer* versetzt. Dieser ist durch das enthaltene SDS denaturierend, aber durch das Fehlen reduzierender Agenzien nicht reduzierend. Die Probe wurde vor der Beladung der Zymogram-Gele nicht erhitzt, aber für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte die Elektrophorese (125 V, 90 min, 30 mA) mit dem Lauffpuffer *Novex*® *Tris-Glycine SDS Running Buffer* in den Elektrophoresekammern *XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System* (Invitrogen GmbH, Darmstadt). Anschließend wurden die Proteine im Gel mit dem Puffer *Novex*® *Zymogram Renaturing Buffer* 30 min bei RT durch das Entfernen des denaturierenden SDS über ein nicht-ionisches Detergens, renaturiert. Daraufhin wurde das Gel zunächst 30 min bei RT in dem Puffer *Novex*® *Zymogram Developing Buffer* äquilibriert. Nach diesen 30 min wurde der Puffer erneuert und das Gel für 16 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Proteaseaktivität wird durch die Degradation des blau-markierten Caseins als weiße Banden sichtbar. Die Dokumentation der Zymogram-Gele erfolgte mit der Videodokumentationsanlage *Imaging System Stella 3200* (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt).

Molekulargewichtsstandard:

7 μl *Precision Plus Protein™ Dual Color Standard* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Bandengröße in kDa: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250

2.35.2 Proteaseaktivität: Resorufin-markiertes Casein

Für die Bestimmung der Proteaseaktivität wurde Resorufin-markiertes Casein als Substrat verwendet^{311,312} (Roche GmbH, Mannheim). Durch die Proteaseaktivität gehen aus dem Casein

Resorufin-markierte Peptide hervor, die im Gegensatz zu Casein durch die Zugabe von TCA nicht präzipitiert werden können. Die Konzentration der entstandenen Peptide im Überstand ist äquivalent zu der vorhandenen Proteaseaktivität. Für die Bestimmung der Proteaseaktivität von SprP wurde stets eine Proteinmenge von 3 µg verwendet. Die Proteaselösung wurde mit 50 µl Substratlösung versetzt und mit Inkubationspuffer auf 200 µl aufgefüllt. Für den Blindwert wurden 50 µl Substratlösung mit 150 µl Reaktionspuffer versetzt. Die Ansätze wurden für 2 h bei 40 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 480 µl Stopplösung und starkem Schütteln gestoppt. Anschließend wurden die Reaktionen 10 min bei 37 °C inkubiert. Das präzipitierte Casein wurde 5 min bei 15000 UpM sedimentiert. 400 µl des resultierenden Überstandes wurden abgenommen und zu 600 µl Testpuffer gegeben. Die Absorption wurde mit dem Spektralphotometer (Genesys 6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 574 \text{ nm}$ bestimmt. Die Proteaseaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Formel 4:} \quad \text{Aktivität} = \frac{\frac{\text{Abs.}_{574\text{nm}}}{\epsilon \times d} \times V \times V_F}{t \times P_m} \quad \left(\frac{\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}} \right)$$

Abs. 574_{nm}: Absorption bei $\lambda = 574 \text{ nm}$

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von Resorufin ($66\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d: Schichtdicke der Küvette (in cm)

V: Volumen des Messansatzes ($1 \times 10^{-3} \text{ l}$)

t: Zeitraum der Reaktion (in min)

P_m: Proteinmenge in der Probe (in mg)

V_F: Verdünnungsfaktor durch Zugabe von Stopp- und Testreagenz (5)

Substratlösung:

4 mg/ml Resorufin-markiertes Casein markiert in A. dest.

Reaktionspuffer:

200 mM Tris-HCl Puffer, 5 mM CaCl₂, pH 8 (40 °C)

Stopplösung:

5 % (w/v) Trichloressigsäure in A. dest.

Testpuffer:

0,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8

2.35.2.1 Temperaturabhängige Proteaseaktivität

Für die Bestimmung der temperaturabhängigen Proteaseaktivität wurde der Reaktionspuffer verwendet. Aufgrund der temperaturabhängigen pH-Werte des Tris-Puffersystems wurden die Reaktionspuffer erwärmt bzw. gekühlt und bei der gewünschten Temperatur mit dem *pH-Sensor SE 101 N* (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin) auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Die Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgte wie in 2.35.2 beschrieben.

Reaktionspuffer:

200 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 8 (4 - 70 °C)

2.35.2.2 pH-Wert-abhängige Proteaseaktivität

Für die Bestimmung der pH-Wert-abhängigen Proteaseaktivität wurde ein Puffersystem bestehend aus Phosphorsäure, Essigsäure und Borsäure verwendet³¹³. Die Puffer wurden bei 40 °C mit NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Unmittelbar vor der Bestimmung der Proteaseaktivität wurde die Protease SprP im Verhältnis 1:20 mit A. dest. verdünnt und mit den Zentrifugationsfilter *Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units* mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Merck KGaA, Darmstadt) eingeeengt. Die Proteinmenge wurde erneut bestimmt (2.29) und die Bestimmung der Aktivität wie in 2.35.2 beschrieben durchgeführt.

2.35.2.3 Bestimmung der Aktivität von Proteaseinhibitoren

Für die Analyse der Aktivität von Proteaseinhibitoren auf die proteolytische Aktivität wurden Inhibitoren genutzt, die verschiedene Proteasefamilien inhibieren können. Die Proteaseinhibitoren wurden nach Herstellerangaben verwendet (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze). Die Protease SprP wurde mit den Proteaseinhibitoren, in den angegebenen Endkonzentrationen (Tab. 2.12), in einem Gesamt-Volumen von 50 µl versetzt. Diese Reaktionsansätze wurden 1 h bei 4 °C inkubiert und daraufhin wurde ein Aktivitätstest (2.35.2) durchgeführt, um die Restaktivität zu bestimmen.

Tab. 2.12 Übersicht der verwendeten Proteaseinhibitoren. Dargestellt sind die verwendeten Proteaseinhibitoren mit der jeweiligen Spezifität und die in den Aktivitätstests verwendeten Endkonzentration. PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid, AEBSF = 4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylfluorid, TPCK = N-Tosyl-L-phenylalanylchloromethan, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, E-64 = N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid, Pepstatin A = Isovaleryl-L-val-L-val-statinyl-L-ala-statin

Inhibitor	Spezifität	Endkonzentration (mM)
PMSF	Serinproteasen	2
AEBSF	Serinproteasen	2
TPCK	Serinprotease	2
EDTA	Metalloproteasen	7
E-64	Cysteinproteasen	0,1
Pepstatin A	Asparaginsäureproteasen	0,1

2.35.3 Proteaseaktivität: Analyse einer Peptidbibliothek

Für die schnelle Identifizierung von Proteasesubstraten wurden die 96-well Platten *PepSets™ REPLI*³¹⁴ der Firma Mimotopes (Melbourne, Australien) verwendet. In 6 Platten mit 512 wells befinden sich 3375 Peptide in einer Konzentration von 5 nmol. Dabei wurden Peptide mit ähnlicher Sequenz zu Mischungen, bestehend aus maximal 8 Peptiden, vereinigt. Die Peptide besitzen einen variierenden Tripeptid-Kern, der von der Aminosäure Glycin umgeben ist. An den beiden terminalen Enden der Peptide befindet sich ein FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) - Paar^{315,316} bestehend aus dem Donor-Fluorophor MCA (7-Methoxycoumarin-4-Acetyl) und dem Akzeptor- Fluorophor DPA (3-(2,4-Dinitrophenyl)-L-2,3 diaminopropionsäure). Zusätzlich befinden sich am C-Terminus der Sequenz zwei Lysine, die eine gesteigerte Löslichkeit von Peptiden mit einem hydrophoben Kern gewährleisten. Die Peptide haben folgende Struktur:



Werden der Donor-Fluorophor und der Akzeptor-Fluorophor durch die Spaltung des Tripeptid-Kerns räumlich voneinander getrennt, kann die Energie des Donor-Fluorophors nicht weiter auf

den Akzeptor-Fluorophor übertragen werden und es entsteht eine messbares Fluoreszenz-Signal bei definierter Wellenlänge.

Die Identifizierung von Proteasesubstraten wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Peptide wurden zunächst durch Zugabe von 5 µl 50 % (v/v) Acetonitril in A. dest. und leichtem Schütteln (5 min) gelöst. Anschließend wurden 45 µl des Reaktionspuffers hinzugegeben und die Platte erneut 5 min leicht geschüttelt. Es wurde die Hintergrundfluoreszenz (Exzitation λ_{320} /Emission λ_{420}) der gelösten Peptide mit dem Fluoreszenzphotometer *Infinite® M1000 PRO* (Tecan Group AG, Männedorf, CH) gemessen. Daraufhin wurden 50 µl einer Proteasestammlösung hinzugegeben und die Fluoreszenz (Exzitation λ_{320} /Emission λ_{420}) alle 2 min über ein Zeitintervall von 1 h bei 37 °C gemessen. Zusätzlich wurden die Platten verschlossen, bei 37 °C inkubiert und Endpunktmessungen vorgenommen (zwischen 2 - 24 h). Die Reaktion wurde durch Lagerung bei -80 °C gestoppt.

Reaktionspuffer:

200 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 8 (37 °C)

2.35.4 β -Galaktosidaseaktivität: ONPG-Test

Das *E. coli lacZ*-Gen kodiert für das Enzym β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase ist in der Lage das farblose Substrat ONPG (*o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) zu Galaktose und dem gelben Farbstoff *o*-Nitrophenol zu hydrolysieren. Die Stärke des Umschlags von farblos nach gelb kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 420$ nm photometrisch bestimmt werden und ist ein Maß für die β -Galaktosidase Aktivität. Wie von Miller³¹⁷ beschrieben, kann diese β -Galaktosidaseaktivität verwendet werden, um die Expression einer *lacZ*-Reportergenfusion indirekt zu quantifizieren.

Für die Probenentnahme wurden *P. aeruginosa*-Vorkulturen hergestellt und die Hauptkulturen (2.4.3) auf eine Zelldichte entsprechend einer O.D. _{580 nm} = 0,1 inokuliert. Zeitabhängig wurden der Hauptkultur Proben entnommen (400 µl), die Zelldichte bestimmt (O.D. _{580 nm}) und die Proben bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität wurden die Bakterien mit 25 µl Chloroform und 25 µl Aufschlusspuffer lysiert. Die Proben wurden 10 sec stark gemischt und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut stark gemischt und 400 µl Substratlösung hinzugegeben. Die Proben wurden bei RT inkubiert bis eine deutliche Gelbfärbung auftrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µl Stopp-Puffer gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin für 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und in eine Küvette überführt. Die Absorption wurde gegen einen Leerwert (400 µl LB-Medium, 400 µl Substratlösung, 400 µl Stopp-Puffer) bei $\lambda = 420$ nm im Spektralphotometer (Genesys 6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt.

4 x Z-Puffer:

21,36 g/l Na₂HPO₄, 11,04 g/l NaH₂PO₄, 1,49 g/l KCl, 0,49 g/l MgSO₄

Zellaufschlusspuffer:

3 ml 4 x Z-Puffer, 42 µl β -Mercaptoethanol, 22,5 µl 20 % (w/v) SDS-Lösung

Substratlösung:

42 mg ONPG, 735 µl β -Mercaptoethanol, 13,13 ml 4 x Z-Puffer *ad* 50 ml A. dest.

Stopp-Puffer:

5,3 g Na₂CO₃ *ad* 50 ml A. dest.

Die β -Galaktosidaseaktivität in Miller Units wurde nach der Formel berechnet:

$$\text{Formel 5: Aktivität} = \frac{\text{Abs.}_{420 \text{ nm}}}{\text{O.D.}_{580 \text{ nm}}} \times \frac{V_{\text{ges}} \times 1000}{V_{\text{Probe}} \times t} \text{ (Miller Units)}$$

V_{ges} : Volumen des gesamten Ansatzes

V_{Probe} : Volumen der Probe

t : Zeitraum der Reaktion (min)

2.36 Nachweis von Rhamnolipiden

2.36.1 Extraktion von Rhamnolipiden

Für die Extraktion der Rhamnolipide aus *P. aeruginosa* wurden die Stämme bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D. $_{580 \text{ nm}} = 2,5$ entspricht, kultiviert und durch Zentrifugation (5 min, 15000 UpM, RT) sedimentiert. Für die Extraktion der Rhamnolipide wurden die Überstände (2.25) der Kulturen verwendet. Für eine Analyse mittels Dünnschichtchromatographie wurden die Rhamnolipide aus 1000 μl Überstand extrahiert. Für die Analyse mittels Orcinol-Test wurden 700 μl Kulturüberstand verwendet. Die Überstände wurden zweimal mit 500 μl Ethylacetat für die Analyse mittels Dünnschichtchromatographie bzw. dreimal mit 500 μl Ethylacetat für die Analyse mittels Orcinol-Test versetzt. Die entstehenden Extraktphasen (obere Phasen) wurden jeweils abgenommen, vereinigt und das Lösungsmittel in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) vollständig evaporiert.

2.36.2 Quantifizierung von Rhamnolipiden

Für die Quantifizierung der Rhamnolipide wurde der Orcinol-Test verwendet^{318,319}. Bei dem Orcinol-Test handelt es sich um eine photometrische Methode. Die extrahierten Rhamnolipide (2.36.1) wurden in 100 μl A. dest. gelöst und mit 100 μl einer 1,6 % (w/v) Orcinol-Lösung sowie 800 μl einer 60 % (v/v) H_2SO_4 versetzt. Die Proben wurden 30 min bei 80 °C und 1000 UpM inkubiert. Als Blindwert wurde eine Probe mit 100 μl A. dest. an Stelle der extrahierten Rhamnolipide verwendet. Sobald die Temperatur der Proben auf RT abgekühlt war, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge $\lambda = 421 \text{ nm}$ bestimmt. Die Quantifizierung der Rhamnolipide erfolgte anhand einer Standardreihe mit Rhamnolipiden bekannter Konzentration (*JBR425*; Jeneil Biosurfactant Co., LCC, Saukville, USA). Die Rhamnolipidkonzentration der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme wurde anhand dieser Standardgerade bestimmt. Die Angabe der Konzentration ist pro Milliliter Kulturüberstand definiert und wurde mit der Zelldichte der Kulturen normiert, um Wachstumsunterschiede zu berücksichtigen.

2.36.3 Dünnschichtchromatographie

Für die qualitative Analyse wurden die extrahierten Rhamnolipide (2.36.1) mittels Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert³²⁰. Die extrahierten Rhamnolipide wurden in 10 μl Ethanol (99,8 %) gelöst. Die gelösten Rhamnolipide wurden vollständig in einer Linie auf den unteren Rand einer *ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄* DC-Platte (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) mit einem Abstand von 1 cm zum Rand der Platte aufgetragen. Der Abstand zwischen den Proben betrug 1,5 cm. Zusätzlich wurden 10 μl des Rhamnolipid-Standards (*JBR425*; Jeneil

Biosurfactant Co., LCC, Saukville, USA) mit einer Konzentration von 1 g/L auf die DC-Platte aufgetragen. Die präparierte DC-Platte wurde in eine mit Laufmittel gefüllte (1 cm hoch) konditionierte Chromatographie-Kammer gestellt. Die Auftrennung erfolgte bis sich die Laufmittelfront 1 cm vor dem Plattenrand befand (ca. 25 min). Nachdem das Laufmittel verdampft war, wurde die DC-Platte mit dem Detektionsreagenz unter Verwendung des *TLC Sprayers* (Camag, Berlin) gleichmäßig besprüht. Anschließend wurde die DC-Platte zur Visualisierung der Rhamnolipide mit einem Heißluftfön getrocknet. Die Rhamnolipide werden als bräunliche Banden sichtbar. Die Dokumentation der DC-Platte erfolgte mit einem Scanner.

Laufmittel:

Chloroform, Methanol, Essigsäure (v/v/v) im Verhältnis 65:15:2

Detektionsreagenz:

0,15 g Orcinol, 8,4 ml 60 % (v/v) H₂SO₄, 42 ml A. dest.

2.37 Qualitative und quantitative Messung der Pyoverdine

Für die Messung der Pyoverdine in *P. aeruginosa*-Überständen wurden die entsprechenden Stämme bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,3 - 2,5 entsprach, kultiviert und zellfreie Überstände (2.25) hergestellt. Die Produktion der Pyoverdine ist qualitativ an einer Grünfärbung des Überstandes von *P. aeruginosa* zu erkennen. Zudem fluoreszieren Pyoverdine aufgrund ihrer Struktur bei Anregung mit UV Licht ($\lambda = 325 \text{ nm}$). Die Konzentration der Pyoverdine kann photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 403 \text{ nm}$ quantifiziert werden¹³. Der Extinktionskoeffizient des Pyoverdins bei $\lambda = 403$ beträgt $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ³²¹. Mit dem Extinktionskoeffizient kann die Stoffmengenkonzentration berechnet werden. Die Pyoverdinkonzentration wurde auf die Zelldichte bezogen.

2.38 Computerprogramme und Datenbanken

DNA-Sequenzinformationen von *P. aeruginosa* wurden von der Datenbank *Pseudomonas Genome Database* bezogen^{15,16}. Informationen zu Proteasen und deren Klassifizierung stammen von der *MEROPS Peptide Database*¹⁶⁵. Informationen zu Subtilase-Sequenzinformationen wurden von der *Prokaryote Subtilase Database*¹⁹⁰ bezogen. Klonierungsstrategien und das Überprüfen von Oligonukleotidsequenzen wurde mit der Software *Clone Manager Professional 9* (Scientific and Educational Software) durchgeführt. Die Oligonukleotide für die *real-time* PCR wurden mithilfe der Software *Primer3Plus*²⁸⁸ definiert. Protein-Homologievergleiche wurden mit dem *blastp* Algorithmus des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) unter Verwendung der Datenbank *non-redundant protein sequences nr* durchgeführt^{322,323}. Die Identifizierung konservierter Domänen in Proteinen erfolgte mittels *CDD: Conserved Domain Database*³²⁴. Die Vorhersage von Signalsequenzen erfolgte mit dem *SignalP 4.1 Server*³²⁵. Die Vorhersage von Protein-Lokalisierungen wurde mit *PSORTb 3.0*³²⁶ durchgeführt. Proteinstrukturen wurden mit *Phyre*^{2 327} modelliert. Für die Visualisierung der Strukturen wurde *UCSF Chimera* verwendet³²⁸. Sequenzlogos wurden mit *WebLogo 3* erstellt^{329,330}. Für die Erstellung von Grafiken wurde u. a. *ChemDraw Ultra 7.0* verwendet. Die verwendeten Programme für die Datenanalyse der Transkriptomdaten und der 2D-Gele sind in den entsprechenden Kapiteln ausführlich beschrieben (2.23; 2.33). In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mithilfe eines Scanners, verschiedenen Videodokumentationsanlagen sowie einer digitalen Kamera aufgenommen und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Es wurden keine inhaltlichen Änderungen an diesen Aufnahmen vorgenommen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der Charakterisierung des Autotransporterproteins SprS (EprS) aus *P. aeruginosa* wurde aufgrund von Homologievergleichen das durch den ORF *pa1242* kodierte Protein identifiziert²⁷². Das Protein besitzt eine Peptidase S8-Domäne, die charakteristisch für Subtilasen ist. Bislang ist PA1242 als hypothetisches Protein in der *Pseudomonas*-Datenbank annotiert¹⁶. Wegen der Homologie von PA1242 zu Subtilasen wurde das Gen als *sprP* und das durch dieses Gen kodierte Protein als SprP (Subtilisin-ähnliche Protease P) bezeichnet. Im Verlauf der initialen Charakterisierung eines *sprP*-defizienten Stammes konnten erste Ergebnisse erzielt werden, die der Subtilase SprP eindeutig eine bedeutende physiologische Funktion in *P. aeruginosa* zuweist²⁶¹.

Auf diese initialen Befunde aufbauend sollte in vorliegender Arbeit die Subtilase SprP systematisch untersucht werden. Durch die Bestimmung biochemischer Eigenschaften von SprP sollte erstmals ein Vertreter der Subtilasen charakterisiert werden, der fast ausschließlich in Pseudomonaden existiert. Des Weiteren sollte am Beispiel von SprP systematisch untersucht werden, inwiefern Proteasen auf das komplexe Regulationsnetzwerk von *P. aeruginosa* Einfluss nehmen können. Zur Identifizierung zellulärer Prozesse, die in *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von SprP reguliert werden, sollten systembiologische Ansätze wie Proteomik und Transkriptomik verwendet werden. Pleiotrope Effekte der *sprP*-Deletion sollten anhand physiologischer Untersuchungen identifiziert und charakterisiert werden.

3.1 Identifizierung der Multidomänenstruktur von SprP

Es wurden unterschiedliche *in silico* Analysen unter Verwendung verschiedener Datenbanken und Vorhersagealgorithmen (2.38) durchgeführt. Auf diese Weise wurden Informationen über das Gen sowie das Protein SprP zusammengestellt, die für die anschließende Charakterisierung verwendet wurden.

3.1.1 SprP zeigt Homologie zur Familie der E-H-S Subtilasen

Im Genom von *P. aeruginosa* PAO1 befinden sich zwei potenzielle Subtilasen. Zum einen das Protein PA1242 (SprP) mit einer Identität von 29 % und zum anderen das Protein PA3535 (EprS) mit einer Identität von 27 % zu Subtilisin Carlsberg. Diese Proteine wurden auf etwaige konservierte Domänen untersucht (2.38). In der Aminosäuresequenz von EprS wurden eine

Autotransporterdomäne sowie eine Peptidase S8/S53-Domäne identifiziert (2.38). Proteine mit einer Peptidase S8/S53-Domäne sind dem Clan SB der Serinproteasen zugehörig¹⁶⁵. Die Proteaseaktivität von EprS und die Sekretion der Proteasedomäne in den extrazellulären Raum durch die Aktivität der Autotransporterdomäne wurde von Kida *et al.*²⁴⁵ demonstriert.

In der Aminosäuresequenz von SprP konnte ebenfalls eine Peptidase S8/S53-Domäne mit einer vorhergesagten Länge von 276 AS identifiziert werden. Die *MEROPS* Datenbank (2.38) ordnet dieses Protein der Peptidase S8-Familie der Serinproteasen (Subtilasen) zu. Klassischerweise besitzen Subtilasen eine konservierte katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin¹⁹⁰. Für SprP wird allerdings eine katalytische Triade bestehend aus Glutaminsäure (Position 262), Histidin (Position 299) und Serin (Position 499) durch die Datenbank *Prokaryote Subtilase Database* (2.38) vorhergesagt. Somit wird SprP der E-H-S Familie der Subtilasen zugeordnet. In Ergänzung zu der Peptidase S8-Domäne konnte für SprP mittels *SignalP 4.1* (2.38) eine 21 AS lange N-terminale Typ I-Signalsequenz (MPLRRAVFAILFASLGSPVA) identifiziert werden. Zwischen dieser N-terminalen Signalsequenz und der C-terminalen Peptidase S8-Domäne befindet sich eine weitere Domäne mit einer Länge von 234 AS, die keinerlei Homologie zu charakterisierten Proteinen oder Proteindomänen aufweist. Aus diesem Grund wurde diese Domäne als Domäne unbekannter Funktion (DUF) benannt. Weiterhin befindet sich ein 59 AS langer nicht-konservierter Bereich am C-Terminus des Proteins, der an die Peptidase S8-Domäne anschließt. Insgesamt besteht SprP aus 590 AS und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 64,9 kDa (Abb. 3.1). Bezüglich der Lokalisierung des Proteins in *P. aeruginosa*, konnte das Protein PA1242 in der Arbeit von Blonder *et al.*³³¹ mittels LC-MS/MS in den isolierten Membranen von *P. aeruginosa* identifiziert werden.

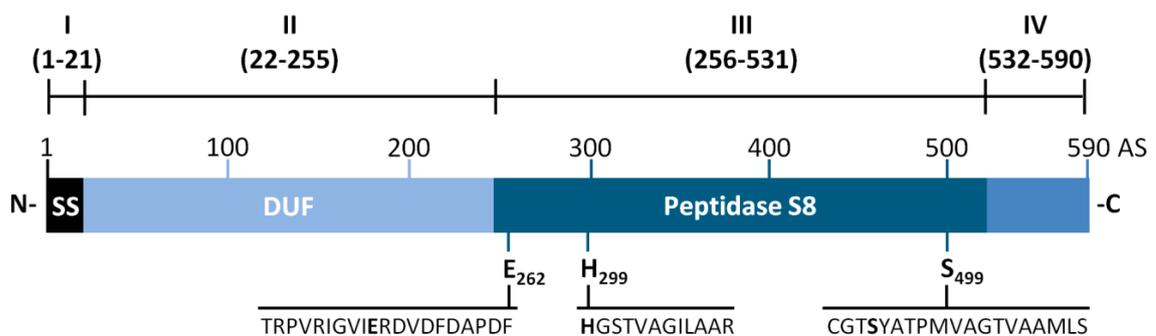


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der identifizierten Domänen in der Aminosäuresequenz von SprP. Das Volllängenprotein kann in vier Bereiche gegliedert werden: eine N-terminale Signalsequenz (I), einen weiteren Bereich unbekannter Funktion (II), eine Peptidase S8-Domäne (III) mit einem daran anschließenden C-terminalen nicht-konservierten Bereich (IV). Die Aminosäuren Glutaminsäure (262), Histidin (299) und Serin (499) der vorhergesagten katalytischen Triade sind fett gedruckt und mit den umliegenden Aminosäuren dargestellt. SS = Signalsequenz, DUF = Domäne unbekannter Funktion, N = NH₂, C = COOH, AS = Aminosäure.

Mit dem Protein-Modellierungsprogramm *Phyre*² (2.38) wurde ein Strukturhomologiemodell von SprP erstellt (Abb. 3.2). Die Aminosäuresequenz des SprP-Volllängenproteins wurde als Matrize verwendet. Es konnten 79 % des Proteins (AS 125 - 590) mit einer Genauigkeit von > 90 % modelliert werden. Insbesondere die Struktur des C-Terminus mit der Peptidase S8-Domäne wurde aufgrund der Homologie innerhalb der Familie der Subtilasen zuverlässig vorhergesagt. Die Signalsequenz (AS 1 - 21) konnte ebenfalls mit hoher Genauigkeit modelliert werden. Innerhalb der DUF nimmt die Genauigkeit des SprP-Modells stark ab. Die Strukturvorhersage für die Aminosäuren 22 - 124 ist sehr gering, sodass das Modell in diesem Bereich unstrukturierte Bereiche aufweist.

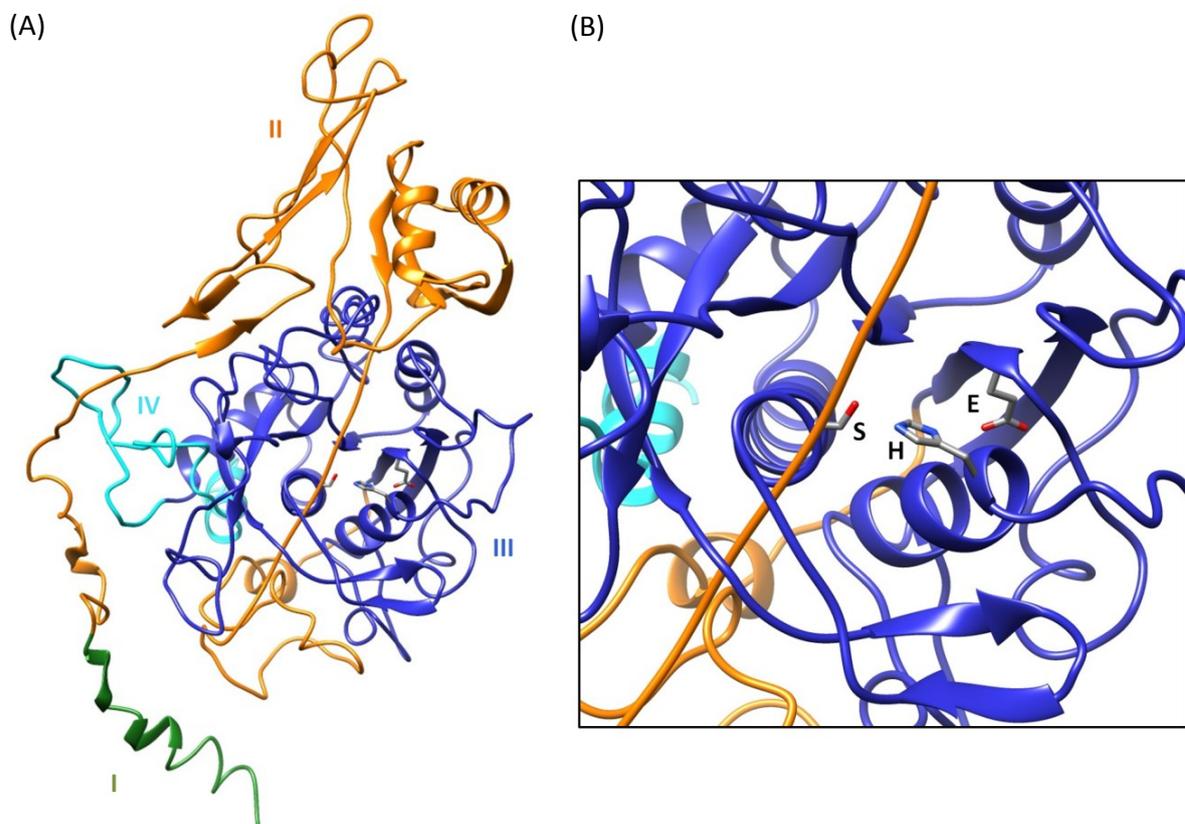


Abb. 3.2 Strukturhomologiemodell von SprP. (A) Das 3D-Strukturhomologiemodell wurde basierend auf der Aminosäuresequenz von SprP generiert. Die einzelnen Domänen von SprP sind farblich hervorgehoben. Die Signalsequenz (I) ist in Grün dargestellt, die DUF (II) in Orange, die Peptidase S8-Domäne in Blau (III) und der anschließende C-terminalen Bereich (IV) in Hellblau. Die Aminosäuren der vorhergesagten katalytischen Triade sind in der *stick*-Darstellung abgebildet. (B) Das aktive Zentrum mit der vorhergesagten katalytischen Triade bestehend aus Glutaminsäure (E), Histidin (H) und Serin (S) ist vergrößert dargestellt. Die Struktur wurde mithilfe von *Phyre*² modelliert³²⁷. Für die Visualisierung der Struktur wurde *UCSF Chimera* verwendet³²⁸.

3.1.2 Homologe Proteine stammen nahezu ausschließlich aus der Gattung *Pseudomonas*

Innerhalb der DUF des SprP-Proteins konnten keine konservierten Bereiche identifiziert werden (3.1.1). Um Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion dieser Domäne schließen zu können, wurden zunächst Proteine identifiziert, die ebenfalls eine solche DUF besitzen. Die Suche nach diesen Proteinen erfolgte mit dem *Standard-Protein BLAST* des *NCBI* (2.38). Als Matrize diente nur die Aminosäuresequenz der identifizierten DUF (Abb. 3.1). Mit der verwendeten Datenbank konnten 69 homologe Proteine identifiziert werden, die eine Identität > 40 % und eine Sequenzabdeckung von > 80 % besitzen (Tab. 8.1). Bei den identifizierten Proteinen handelt es sich ausschließlich um vorhergesagte Subtilisin-ähnliche Proteasen oder hypothetische Proteine. Keines dieser Proteine wurde bislang genauer charakterisiert. Interessanterweise stammen die identifizierten Proteine bis auf drei Ausnahmen ausschließlich aus der Gattung *Pseudomonas*. Neben *P. aeruginosa* wurden die DUF-homologen Proteine in den Arten *P. alcaliphila*, *P. mendocina*, *P. fluorescens*, *P. brassicacearum*, *P. poae*, *P. putida*, *P. fulva*, *P. viridiflava* und *P. stutzeri* identifiziert. Die drei Ausnahmen stellen *Halomonas* sp. HAL1, *Halomonas boliviensis* LC1 und *Halomonas zhanjiangensis* dar. Weiterhin wurde eine Suche nach SprP-homologen Proteinen unter identischen Bedingungen mit der Aminosäuresequenz des SprP-Volllängenproteins durchgeführt. Das Ergebnis dieser Suche unterschied sich im Bezug auf die identifizierten Proteine nicht von der Suche mit der DUF als Ausgangssequenz. Bedingt durch die vorhandene DUF, die fast ausschließlich in Pseudomonaden existiert, sind auch homologe Proteine zu dem SprP-Volllängenprotein in eben diesen Bakterienstämmen zu identifizieren. Durch die Homologie innerhalb der Subtilase-Familie wurden bei der Suche mit der SprP-Sequenz zusätzlich zahlreiche Subtilasen aus anderen Organismen identifiziert, die jedoch ausschließlich Homologie zu der Peptidase S8-Domäne aufweisen.

Das Protein SprP besitzt eine Peptidase S8-Domäne, die charakteristisch für Subtilasen ist, sowie eine lange Domäne unbekannter Funktion (DUF), die keinerlei Homologie zu bekannten Proteindomänen aufweist. Proteine, die ebenfalls diese DUF besitzen, sind hypothetische Proteine bzw. Subtilisin-ähnliche Proteasen und existieren fast ausschließlich in der Gattung *Pseudomonas*.

3.2 Homologe und heterologe T7-Überexpression von *sprP* führt zur Bildung von *inclusion bodies*

Für die biochemische Charakterisierung des Proteins SprP ist es erforderlich, dass dieses in gereinigter Form zur Verfügung steht. Für die Reinigung von SprP muss das Protein zunächst in ausreichender Menge produziert werden. Hierzu wurde das T7-Expressionssystem verwendet, das in der Lage ist, große Transkriptmengen von Zielgenen zu erzeugen, die wiederum hohe Proteinausbeuten ermöglichen (2.4.5). Es wurde bereits demonstriert, dass die T7-basierte Überexpression von *sprP* in *E. coli* BL21(DE3) unter Standard-Expressionsbedingungen ausschließlich zur Bildung von *inclusion bodies* führt²⁶¹. Diese *inclusion bodies* sind komplexe Aggregate rekombinanter Proteine, die häufig als Stressantwort gebildet werden. Aus diesem Grund wurden für die Expressionsstudien neben *E. coli* BL21(DE3) eine Reihe heterologer Expressionsstämme sowie ein homologer Expressionsstamm verwendet. Es wurden die Stämme *E. coli* JM109(DE3), *E. coli* C43(DE3), *P. aeruginosa* PABST7.1, *P. putida* KT2440T7 und *Burkholderia glumae* PGT7*lacI* verwendet (Tab. 2.1; 2.4.5). Die Expressionsstämme wurden mit dem Überexpressionsvektor pBR*sprP* (Tab. 2.3) und dem Leervektor pBBR22b (Tab. 2.2) als Negativkontrolle transformiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580 nm} = 0,6) durch Zugabe des Induktors IPTG (2.4.5). Die Expressionszeit betrug für alle Expressionsstämme zwei Stunden nach der Induktion, außer für *E. coli* C43(DE3). Die Expressionszeit für *E. coli* C43(DE3) betrug sechs Stunden. Die Expressionsstudie in *B. glumae* T7*lacI* wurde im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt²⁷⁸. Nach der erfolgten Genexpression wurde eine Löslichkeitsanalyse (2.27) der Proteine durchgeführt und diese mittels SDS-PAGE (2.32) analysiert (Abb. 3.3).

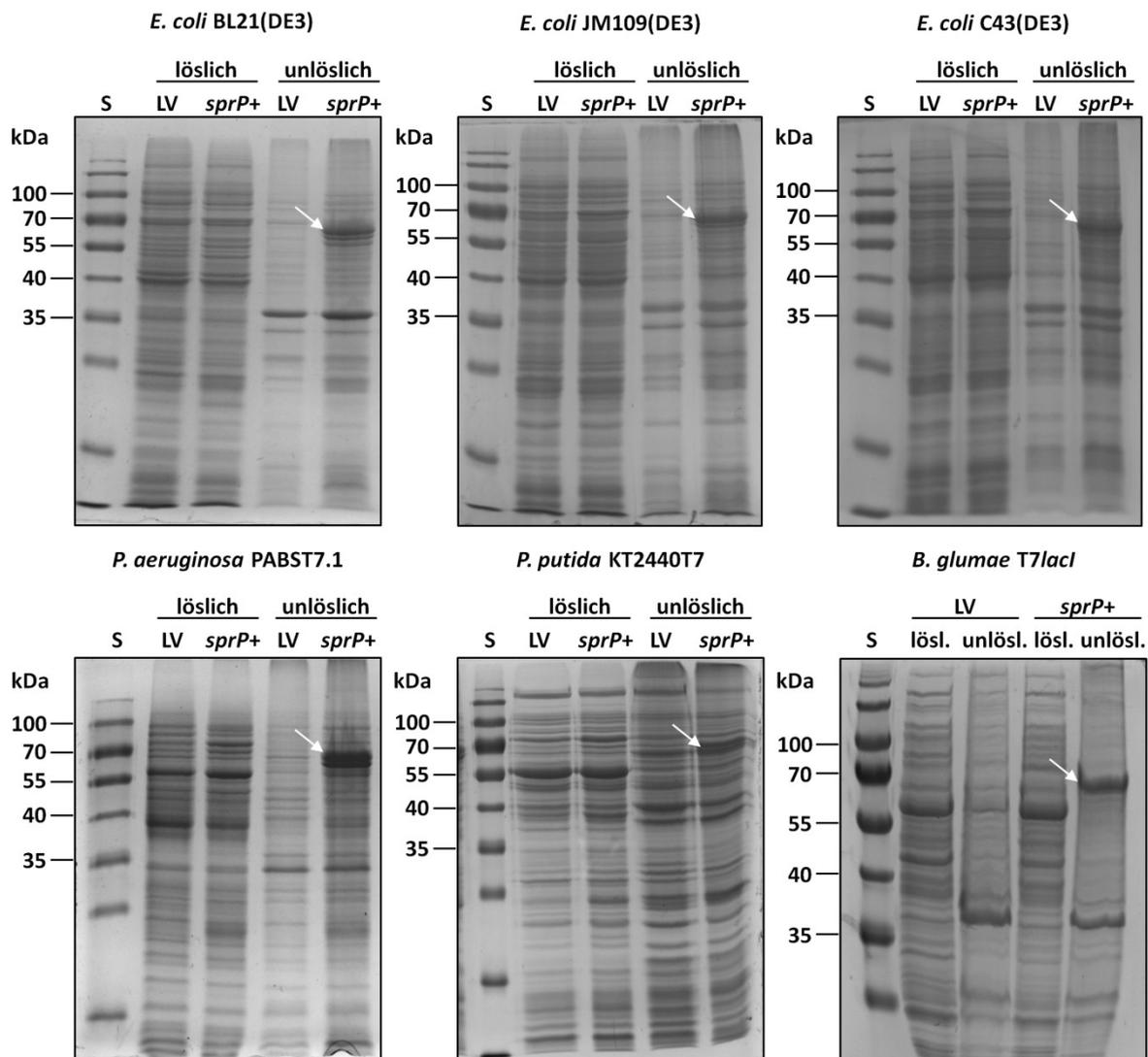


Abb. 3.3 SDS-PAGE-Analyse der T7-abhängigen Überexpression von *sprP* in diversen Expressionsstämmen. Dargestellt sind die Protein-Löslichkeitsanalysen nach der Expression von *sprP* in einem homologen Expressionsstamm und in heterologen Expressionsstämmen. Es wurden die löslichen und unlöslichen Proteinfractionen entsprechend einer $O.D._{580\text{ nm}} = 0,1$ mittels SDS-PAGE (12 %) analysiert. Die zusätzliche Proteinbande ist durch einen weißen Pfeil hervorgehoben. S = Standard (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*), LV = Leervektor pBBR22b, *sprP+* = pBR*sprP* (P_{T7}).

Die SDS-PAGE-Analyse zeigt, dass in allen verwendeten Stämmen eine zusätzliche Proteinbande auf einer Höhe von ca. 65 kDa in der Überexpressionskultur zu erkennen ist (weiße Pfeile), die dem Molekulargewicht von SprP entspricht. Diese Proteinbande konnte mittels MALDI-TOF-MS (2.34) als SprP identifiziert werden. Detektierbare Mengen SprP kommen ausschließlich in der unlöslichen Proteinfraction vor. Weiterhin wurde deutlich, dass die Menge des rekombinanten Proteins deutlich variiert. In den *E. coli*-Stämmen und in *P. putida* KT2440T7 war die Menge des Proteins deutlich geringer als in *B. glumae* T7*lacI* und im homologen Expressionsstamm *P. aeruginosa* PABST7.1. Parallel zu den diversen *sprP*-Expressionen wurde *E. coli* BL21(DE3) mit den Überexpressionsvektoren pBR*sprP* Δ s8 und pBR*sprP* Δ duf transformiert

(Tab. 2.3). Diese Plasmide tragen die Gene, die für die einzelnen SprP-Domänen kodieren. Die Bedingungen der Expression entsprachen den Bedingungen der oben beschriebenen *sprP*-Expression in *E. coli* BL21(DE3). Anschließend wurde ebenfalls eine Löslichkeitsanalyse (2.27) der Proteine durchgeführt und diese mittels SDS-PAGE (2.32) analysiert (Abb. 3.4).

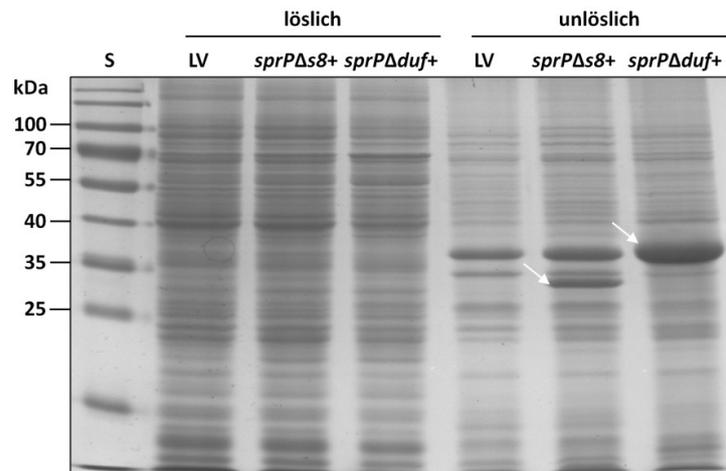


Abb. 3.4 SDS-PAGE-Analyse der T7-abhängigen Überexpression von *sprPΔduf* und *sprPΔs8* in *E. coli* BL21(DE3). Es sind die Protein-Löslichkeitsanalysen nach der Expression von *sprPΔs8* und *sprPΔduf* in *E. coli* BL21(DE3) dargestellt. Es wurden die löslichen und unlöslichen Proteinfraktionen entsprechend einer $O.D._{580\text{ nm}} = 0,1$ mittels SDS-PAGE (12 %) analysiert. Die zusätzliche Proteinbande bzw. die Proteinbande mit stärkerer Intensität als in der Kontrolle ist durch einen weißen Pfeil hervorgehoben. S = Standard (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*), LV = Leervektor pBBR22b, *sprPΔs8*+ = pBR*sprPΔs8* (P_{T7}), *sprPΔduf* = pBR*sprPΔduf* (P_{T7}).

Es ist eine zusätzliche Proteinbande auf einer Höhe von ca. 28 kDa nach der Expression von *sprPΔs8* zu erkennen (weißer Pfeil). Außerdem wurde eine Proteinbande mit wesentlich stärkerer Intensität im Vergleich zu der Kontrolle (LV) auf einer Höhe von ca. 38 kDa nach der Expression von *sprPΔduf* sichtbar (weißer Pfeil). Diese Proteinbanden entsprechen den theoretischen Molekulargewichten der SprP-Domänen und konnten ausschließlich in der unlöslichen Proteinfraktion identifiziert werden. Des Weiteren wurde durch die Verwendung des Expressionsvektors pBR*sprPS499A* (Tab. 2.3) das Gen für eine SprP-Variante exprimiert, bei der das vorhergesagte Serin der katalytischen Triade gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Auch bei dieser Expression wurde ausschließlich eine zusätzliche Proteinbande in der unlöslichen Proteinfraktion sichtbar (ohne Abbildung).

Durch die Variation definierter Parameter der Überexpression ist es möglich, die Bildung der *inclusion bodies* rekombinanter Proteine zu reduzieren³³². Um eine SprP-Produktion in löslicher Form zu erreichen, wurden zahlreiche Parameter der Überexpression gezielt variiert. Es wurden die Temperatur (15 °C - 37 °C), das Kulturvolumen (10 ml - 500 ml), die Expressionszeit (0,5 h -

6 h) sowie die IPTG-Endkonzentration für die Induktion (0,05 mM - 1,2 mM) variiert und anschließend eine Löslichkeitsanalyse (2.27) der Proteine durchgeführt. Zusätzlich wurde das Gen *sprP* zellfrei mit dem CECF (*Continuous Exchange Cell Free*)³³³-Verfahren in Kooperation mit Dr. Frank Bernhard (Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main) exprimiert. Keine der aufgeführten Parameteränderungen führte zu der Synthese von SprP in einer löslichen Form (ohne Abbildung). Sobald rekombinantes SprP mittels SDS-PAGE-Analyse (2.32) nachweisbar war, lag dieses ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* vor.

Die Genexpression von *sprP*, *sprPΔduf* und *sprPΔs8* führte zur Bildung von *inclusion bodies*. Trotz der Verwendung verschiedener Expressionsstämme und diverser Expressionsbedingungen resultierte die Expression von *sprP* stets in der Bildung dieser *inclusion bodies*.

3.3 Die Konstruktion eines SprP-Fusionsproteins ermöglicht die Sekretion über das HlyA Typ I-Sekretionssystem in *E. coli*

Gram-negative Bakterien verwenden Typ I-Sekretionssysteme (T1SS) zum einstufigen Transport von Proteinen über beide Membranen ohne periplasmatische Intermediate. Eines dieser T1SS kommt in uropathogenen *E. coli*-Stämmen vor und wird für den Transport des Proteins Hämolyysin A (HlyA) verwendet³³⁴. Das HlyA T1SS besteht aus dem Protein TolC in der äußeren Membran, dem ABC (*ATP binding cassette*)-Transporter HlyB in der inneren Membran und dem Membranfusionsprotein HlyD, das diese beiden Proteine während des Transportvorgangs verbindet^{335,336}. In Abwesenheit des Transportsubstrates HlyA liegt in der Cytoplasmamembran ein Komplex aus HlyB und HlyD vor, wohingegen TolC erst durch eine Interaktion zwischen HlyB/D und HlyA rekrutiert wird. Hierfür besitzt HlyA mehrere Interaktionsstellen sowohl für HlyB als auch HlyD³³⁷⁻³³⁹. Nachdem der gesamte T1SS-Komplex gebildet wurde, findet der Transport von HlyA statt. Die Energie für diesen Transport stammt vermutlich aus der Hydrolyse von ATP durch HlyB. Nach dem Transport dissoziiert TolC von HlyB/D und ein Transportzyklus wurde durchlaufen.

3.3.1 Sekretion des SprP-Fusionsproteins in löslicher und aktiver Form

Mit den bisher verwendeten Expressionssystemen konnte SprP nicht in löslicher Form produziert werden (3.2). Aus diesem Grund wurde ein Expressionssystem verwendet, das die Sekretion rekombinanter Proteine über das HlyA T1SS in den extrazellulären Raum von *E. coli* ermöglicht²⁷⁰. Die Sekretion rekombinanter Proteine hat gegenüber der cytoplasmatischen Proteinsynthese einige Vorteile. Im extrazellulären Raum befinden sich z. B. keine großen Mengen an Proteasen und rekombinante Proteine liegen räumlich weiter voneinander getrennt vor.

Um dieses System für die heterologe Produktion von SprP verwenden zu können, wurde SprP mit HlyA1 fusioniert, einem C-terminalen Fragment von HlyA, das effizient als Sekretionssignal fungiert. Eine schematische Übersicht des konstruierten SprP-Fusionsproteins ist in Abb. 3.5 dargestellt.

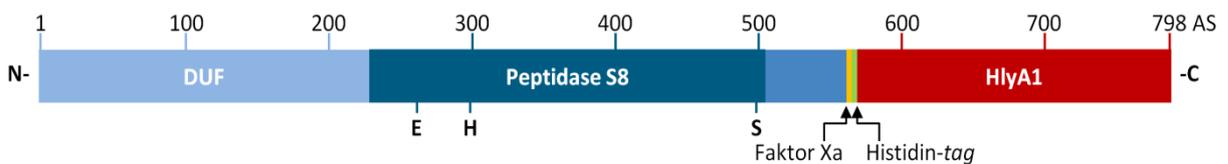


Abb. 3.5 Schematische Darstellung des konstruierten SprP-Fusionsproteins für die Proteinsekretion mit dem HlyA T1SS in *E. coli*. Dargestellt sind die verschiedenen Domänen des SprP-Fusionsproteins. Die ursprüngliche N-terminale Signalsequenz von SprP wurde deletiert und durch ein Methionin ersetzt. Weiterhin besteht das Fusionsprotein aus SprP (Blau) und HlyA1 (Rot). Zusätzlich wurde ein Histidin-tag (Grün) für die Proteinreinigung und eine Faktor Xa Erkennungssequenz (Gelb) für die Abtrennung des Sekretionssignals sowie des Histidin-tags eingefügt. Das Fusionsprotein besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 88 kDa. DUF = Domäne unbekannter Funktion, N = NH₂, C = COOH, AS = Aminosäure.

Für einen effizienten Transport des Fusionsproteins muss HlyA1 am C-Terminus lokalisiert sein. Dadurch wird die notwendige Interaktion zwischen dem Sekretionssignal mit HlyB gewährleistet. Die N-terminale Signalsequenz von SprP wurde deletiert und durch ein Methionin ersetzt. Auf diese Weise ist ein Transport ausschließlich mit dem HlyA T1SS sichergestellt. Zudem wurde ein interner Histidin-tag bestehend aus sechs Histidinen inseriert, der die Reinigung der Protease nach erfolgter Sekretion mittels IMAC (2.28) ermöglicht. Da das Sekretionssignal im Verlauf des Transportes über das T1SS nicht proteolytisch abgespalten wird, wurde eine Erkennungssequenz für die Serinprotease Faktor Xa eingefügt. Faktor Xa hydrolysiert sehr spezifisch die Aminosäuresequenz Ile-Glu/Asp-Gly-Arg[↓] und kann verwendet werden, um HlyA1 und den Histidin-tag nach erfolgter Proteinreinigung zu entfernen. Das SprP-Fusionsprotein besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 88 kDa.

Für die *sprP-hlyA1*-Expression mit anschließender Sekretion des Fusionsproteins wurde der Expressionsstamm *NEB Express Competent E. coli* verwendet (Tab. 2.1). Dieser Expressionsstamm wurde mit den beiden Plasmiden pK184-HlyBD und pSU-SprPminLS (Tab. 2.2; Tab. 2.3) transformiert (2.13.2). Das Plasmid pK184-HlyBD trägt die Gene *hlyB* und *hlyD*, die für die Proteine des T1SS kodieren. TolC wird in *E. coli* in ausreichender Menge konstitutiv synthetisiert und wurde aus diesem Grund nicht zusätzlich produziert. Das Plasmid pSU-SprPminLS trägt das Gen, das für das SprP-Fusionsprotein kodiert (Abb. 3.5). Die Gene für das T1SS und das SprP-Fusionsprotein werden in *E. coli* simultan exprimiert. Als Negativkontrolle wurde der Expressionsstamm zudem mit den Plasmiden pSU-HlyA1 und pK184-HlyBD (Tab. 2.2) transformiert (2.13.2). Dieser Stamm exprimiert die Gene für das T1SS und das Gen für HlyA1 ohne die Fusion mit SprP. Die Negativkontrolle und der Expressionsstamm wurden in 2 x YT-Medium (2.4.1) unter Selektionsdruck (Tab. 2.8) kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580 nm} = 0,6) durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert (2.4.6). Nach einer Expressionszeit von sechs Stunden wurden die Überstände beider Kulturen aufbereitet (2.4.6). Der Überstand wurde im Verhältnis 1:50 eingeeengt (2.4.6) und anschließend die Proteaseaktivität von 50 µl des Überstandes mit Resorufin-markiertem Casein analysiert (2.35.2). In dem Kulturüberstand der Negativkontrolle konnte keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Der Kulturüberstand der Expressionskultur, der über das SprP-Fusionsprotein verfügt, weist hingegen deutliche Proteaseaktivität auf.

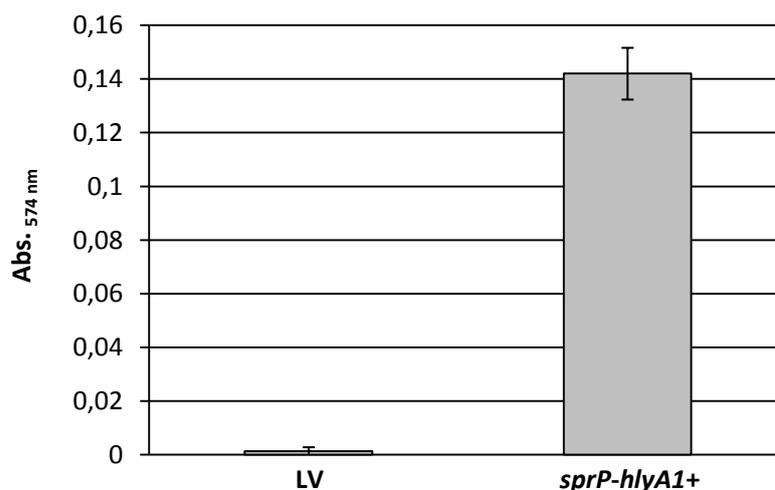


Abb. 3.6 Proteaseaktivität im Überstand von *E. coli* nach der Expression von *sprP-hlyA1*. Die proteolytische Aktivität im Überstand nach einer *sprP-hlyA1*-Expression in *E. coli* und einer entsprechenden Kontrolle mit dem Leervektor wurde mittels Resorufin-markiertem Casein als Substrat analysiert. Die Hydrolyse des Substrates wurde durch die Messung der Absorption bei $\lambda = 574$ nm bestimmt. Das Diagramm bildet die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung ab. LV = pSU-HlyA1 und pK184-HlyBD, *sprP-hlyA1+* = pSU-SprPminLS und pK184-HlyBD.

3.3.2 Etablierung einer Methode für die Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem *E. coli*-Überstand

Nachdem gezeigt wurde, dass *E. coli* keine wirtseigene Protease sekretiert und dass das SprP-Fusionsprotein in einer aktiven Form in *E. coli* sekretiert werden kann (Abb. 3.6), wurde ein Protokoll für die Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem Überstand etabliert (2.28). Das SprP-Fusionsprotein verfügt über einen Histidin-*tag*, der aufgrund der internen Lokalisierung vermutlich schwer zugänglich ist. Aus diesem Grund wurde der Überstand, der das SprP-Fusionsprotein enthält, eine definierte Zeit mit Ni-NTA Agarose inkubiert, damit die Proteine mit dem schwer zugänglichen Affinitäts-*tag* ausreichend Zeit haben, an das Ni-NTA zu binden (*batch*-Verfahren). Der Überstand einer Expressionskultur konnte jedoch nicht unmittelbar verwendet werden, da die Inkubation der Ni-NTA Agarose mit dem Überstand dazu führte, dass die Ni²⁺-Ionen aus dem Komplexbildner NTA gelöst wurden. Außerdem konnte kein Phosphatpuffer, der zu den gängigen Puffersystemen für Reinigungen mittels Ni-NTA Agarose zählt, für die Reinigung verwendet werden, da alle Medien und Puffer für die Verwendung des T1SS stets 5 mM CaCl₂ enthalten. Die Ca²⁺-Ionen erhöhen die Sekretionseffizienz des HlyA T1SS. Dieses präzipitiert jedoch in wasserhaltigen Puffersystemen zusammen mit Phosphat als unlösliches Calciumphosphat (Ca₃(PO₄)₂). Nachdem verschiedene Puffersysteme getestet wurden, zeigte sich, dass ein Tris-HCl Puffersystem in Kombination mit der *batch*-Reinigung geeignet ist, das SprP-Fusionsprotein aus dem *E. coli*-Überstand zu reinigen (2.28).

Der Expressionsstamm, der über die beiden Plasmide pK184-HlyBD und pSU-SprPminLS (Tab. 2.2; Tab. 2.3) verfügt, wurde in 2 x YT-Medium (2.4.1) unter Selektionsdruck (Tab. 2.8) kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase (O.D. _{580 nm} = 0,6) durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert (2.4.6). Nach einer Expressionszeit von sechs Stunden wurde der Überstand der Kultur gewonnen (2.4.6). Es folgte die Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem *E. coli*-Überstand (2.28). Verschiedene Fraktionen der Reinigung wurden aufgefangen und anschließend mittels SDS-PAGE (2.32) analysiert (Abb. 3.7).

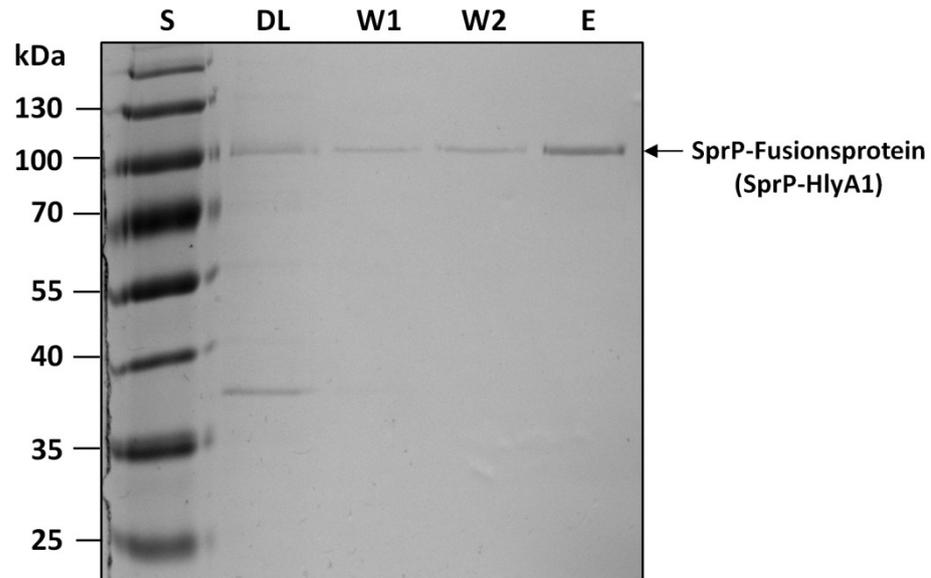


Abb. 3.7 SDS-PAGE-Analyse einer Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem *E. coli*-Überstand. 10 μ l der verschiedenen Fraktionen einer Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem *E. coli*-Überstand wurden mittels SDS-PAGE (12 %) analysiert. Das SprP-Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von ca. 88 kDa. Dargestellt sind Proben des Durchlaufes, des ersten Waschschruttes mit 20 mM Imidazol-haltigem Tris-HCl Puffer, des zweiten Waschschruttes mit 30 mM Imidazol-haltigem Tris-HCl Puffer und der Elution mit 250 mM Imidazol-haltigem Tris-HCl Puffer. S = Standard (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*), DL = Durchlauf, W1 = Waschfraktion 1, W2 = Waschfraktion 2, E = Elution.

Die Analyse der Proben des Durchlaufes verdeutlichte, dass gewisse Mengen des SprP-Fusionsproteins, trotz der Inkubation der Proteinlösung mit der Ni-NTA Agarose, nicht an die Ni-NTA Agarose binden. Zusätzlich sind weitere unspezifische Proteine zu erkennen, die ebenfalls nicht an die Ni-NTA Agarose binden können. Die dominante Bande mit einem Molekulargewicht von 37 kDa konnte mittels MALDI-TOF-MS (2.34) als das äußere Membranprotein OmpF aus *E. coli* identifiziert werden. Die Analyse der Proben der beiden Waschschruttes verdeutlichte, dass die Bindung von SprP an die Ni-NTA Agarose nicht sehr stark ist, da sich das SprP-Fusionsprotein teilweise in den Waschfraktionen befand. In diesen Fraktionen waren weiterhin leichte Verunreinigungen durch unspezifisch bindende Proteine vorhanden. In der Probe der Elution befand sich letztendlich nur noch eine dominante Proteinbande, die dem Molekulargewicht des SprP-Fusionsproteins entspricht, ohne Verunreinigungen durch weitere Proteine. Die Konzentration des gereinigten Proteins wurde ermittelt (2.29). Mit dieser Reinigungsmethode konnte das SprP-Fusionsprotein in einer Konzentration von ca. 6 mg/l gereinigt werden.

3.4 SprP wird durch autokatalytische Prozessierung aktiviert

Die Mitglieder der Subtilase-Familie werden meist als Zymogene (inaktive Vorläuferenzyme) produziert. Die Aktivierung der Subtilase erfolgt gezielt durch die autokatalytische Prozessierung des Propeptides³⁴⁰. Auf diese Weise wird die Aktivierung der Protease strikt reguliert. Nachfolgend wurde untersucht, ob SprP als Zymogen (Vorläufer-SprP) produziert wird.

3.4.1 SprP wird als Zymogen produziert

Die Analyse der Proteaseaktivität des SprP-Fusionsproteins erfolgte unmittelbar nach dessen Reinigung aus dem *E. coli*-Überstand mit Resorufin-markiertem Casein (2.35.2). Es konnte keine proteolytische Aktivität von SprP nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Da bei Subtilasen meist die autokatalytische Prozessierung zur Aktivierung der Protease notwendig ist, wurde das gereinigte SprP-Fusionsprotein mehrere Tage bei niedriger Temperatur (8 °C) inkubiert und die proteolytische Aktivität nach sechs und zehn Tagen erneut bestimmt. Die Analyse zeigte, dass die Aktivität von SprP innerhalb der ersten sechs Tage ausgebildet wird und im Verlauf der Zeit steigt, sodass nach zehn Tagen deutliche Proteaseaktivität messbar ist (Abb. 3.8). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass das SprP-Fusionsprotein zunächst inaktiv vorliegt. Mit Bezug auf diese Inaktivität wird das inaktive SprP-Fusionsprotein nachfolgend als Vorläufer-SprP bezeichnet.

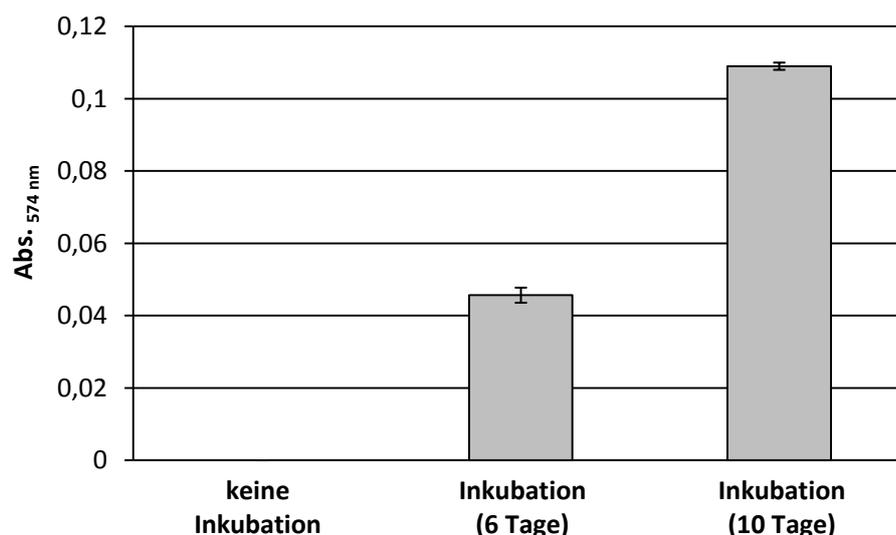


Abb. 3.8 Zunahme der proteolytischen Aktivität von SprP im Verlauf der Inkubation bei 8 °C. Dargestellt ist die Proteaseaktivität des SprP-Fusionsproteins direkt nach der Proteasereinigung (keine Inkubation), nach sechs Tagen und nach zehn Tagen Inkubation bei 8 °C. Als Substrat wurde Resorufin-markiertes Casein verwendet. Die Hydrolyse des Substrates wurde durch die Messung der Absorption bei $\lambda = 574$ nm bestimmt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar.

Parallel zu der Analyse der Aktivierung des SprP-Fusionsproteins (Abb. 3.8) wurde untersucht, ob aktives SprP in der Lage ist, das Vorläufer-SprP zu aktivieren (Abb. 3.9). Es wurde die Proteaseaktivität (2.35.2) von bereits aktivem SprP (dunkelgraue Säule), dessen Aktivität nicht weiter anstieg, und von Vorläufer-SprP unmittelbar nach der Reinigung analysiert. Das inaktive Vorläufer-SprP wurde mit aktivem SprP im Verhältnis 1:3 gemischt und anschließend die Proteaseaktivität bestimmt (Inkubation 0 Tage). Diese betrug wie erwartet 1/3 der Aktivität des aktiven SprP. Dieses Gemisch aus aktiver und inaktiver Protease wurde bei 8 °C inkubiert und die Proteaseaktivität nach sechs und zehn Tagen bestimmt. Es wurde erneut gezeigt, dass die proteolytische Aktivität von SprP im Verlauf der Inkubation zunimmt. Nach zehn Tagen konnte eine Absorption $\lambda_{574 \text{ nm}} = 0,263$ bestimmt werden. Abzüglich der gemessenen Aktivität zu Beginn (Inkubation 0 Tage), die durch die bereits aktive Protease zustande kam, lag eine Nettoaktivität von $\lambda_{574 \text{ nm}} = 0,173$ vor. Die Aktivität von SprP, ohne vorheriges Mischen mit aktiver Protease wurde parallel gemessen und lag nach zehn Tagen bei $\lambda_{574 \text{ nm}} = 0,109$ (Abb. 3.8). Somit konnte durch das Mischen von aktivem SprP und Vorläufer-SprP im Verhältnis 1:3, nach einer Inkubation von zehn Tagen bei 8 °C, eine Steigerung der Aktivität um 59 % erzielt werden.

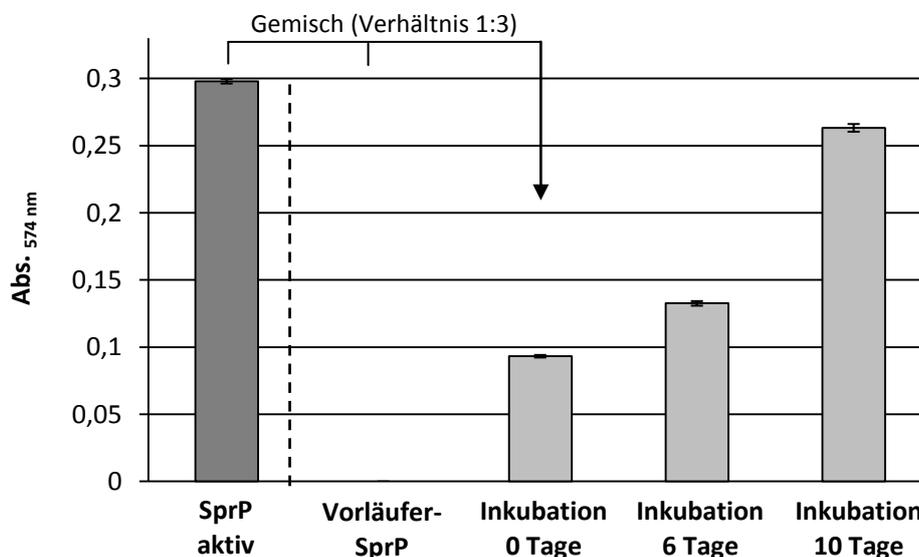


Abb. 3.9 Induktion der Aktivierung des Vorläufer-SprP durch aktives SprP. Dargestellt ist die Proteaseaktivität von bereits bei 8 °C gelagerter, aktiver Subtilase SprP (dunkelgraue Säule) und die proteolytische Aktivität von Vorläufer-SprP direkt nach der Reinigung. Zudem wurde die vorhandene Proteaseaktivität nach Mischen von aktivem SprP mit inaktivem Vorläufer-SprP im Verhältnis 1:3 bestimmt (Inkubation 0 Tage). Die Proteaseaktivität wurde erneut nach sechs bzw. zehn Tagen Lagerung bei 8 °C bestimmt. Die Hydrolyse des Substrates wurde durch die Messung der Absorption bei $\lambda = 574 \text{ nm}$ ermittelt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar.

Die Ergebnisse der Aktivitätstests (Abb. 3.8; Abb. 3.9) lassen vermuten, dass im Zuge der Aktivierung von SprP autokatalytische Prozessierung stattfindet und SprP somit in zwei verschiedenen Zuständen existiert. Zum einen als unprozessiertes, inaktives Vorläufer-SprP und zum anderen als prozessiertes, aktives SprP. Aus diesem Grund wurde eine Probe des aktiven SprP mittels TCA-Präzipitation (2.26) präzipitiert und in 10 % des Ausgangsvolumens aufgenommen, um auch geringe Proteinmengen mittels SDS-PAGE (2.32) visualisieren zu können (Abb. 3.10).

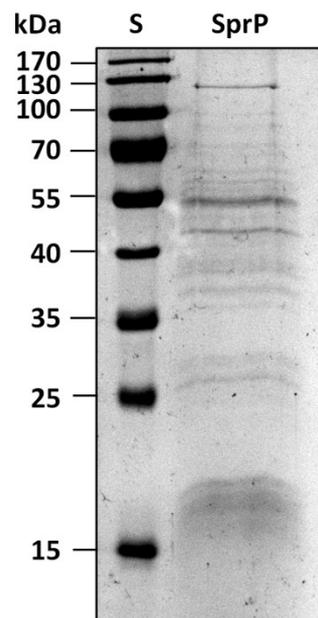


Abb. 3.10 SDS-PAGE-Analyse der durch autokatalytische Prozessierung entstehenden Proteinfragmente. Aktive Subtilase SprP wurde durch TCA-Präzipitation gefällt und in 10 % des Ausgangsvolumens aufgenommen. 10 μ l dieser konzentrierten Proteinlösung wurden mittels SDS-PAGE (12 %) analysiert. S = Standard (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*).

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass die definierte Proteinbande des SprP-Fusionsproteins aus der Reinigung auf der Höhe von ca. 88 kDa (Abb. 3.7) zu zahlreichen Proteinfragmenten prozessiert wurde. Es ist auch eine Proteinbande zu erkennen, die ein Molekulargewicht besitzt, das größer als 88 kDa ist. Aufgrund des Auftretens zahlreicher Proteinfragmente ist es nicht möglich, die aktive SprP-Variante anhand der SDS-PAGE-Analyse zu identifizieren.

3.4.2 Aktives SprP besitzt ein Molekulargewicht von 26 kDa

Die Identifizierung des apparenten Molekulargewichtes des aktiven SprP erfolgte über eine Kombination aus Größenausschlusschromatographie mittels HPLC (HPLC-SEC; 2.31) und einem anschließenden Aktivitätstest (2.35.2). Es wurden 0,1 mg der aktiven Subtilase SprP auf ein Volumen von 200 μ l eingeeengt. 100 μ l dieser eingeeengten Probe wurden auf die HPLC-Chromatographiesäule aufgetragen und die zahlreichen Proteinfragmente durch Größenausschluss separiert. Es wurden Chromatogramme bei 220 nm (Nachweis von Peptidbindungen) und bei 280 nm (Nachweis von aromatischen Aminosäuren) aufgenommen und Fraktionen mit einem Volumen von 500 μ l gesammelt.

In beiden Chromatogrammen ist ein starker Hintergrund zu erkennen, der durch die große Anzahl von Proteinfragmenten zustande kommt (Abb. 3.11 A, B). Trotz des starken Hintergrundes können zwei dominierende Signale identifiziert werden. Diese Signale befinden sich bei 5,57 Minuten (in Fraktion 1) und bei 8,89 Minuten (in Fraktion 7). Zusätzlich wurde die Fraktion 3 (6,75 Minuten) weiterhin analysiert, deren Signal deutlich, aber wesentlich schwächer und undefinierter ausgeprägt ist. Signale, die bei einer Retentionszeit von zehn Minuten oder später auftraten, wurden außer Acht gelassen, da das apparente Molekulargewicht dieser Proteine kleiner als 3 kDa ist. Nach der Größenausschlusschromatographie wurde unmittelbar die Proteaseaktivität (2.35.2) der Fraktionen 1, 3 und 7 bestimmt (Abb. 3.11 C). Es konnte ausschließlich in der Fraktion 7 Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Somit befindet sich das aktive SprP in dieser Fraktion.

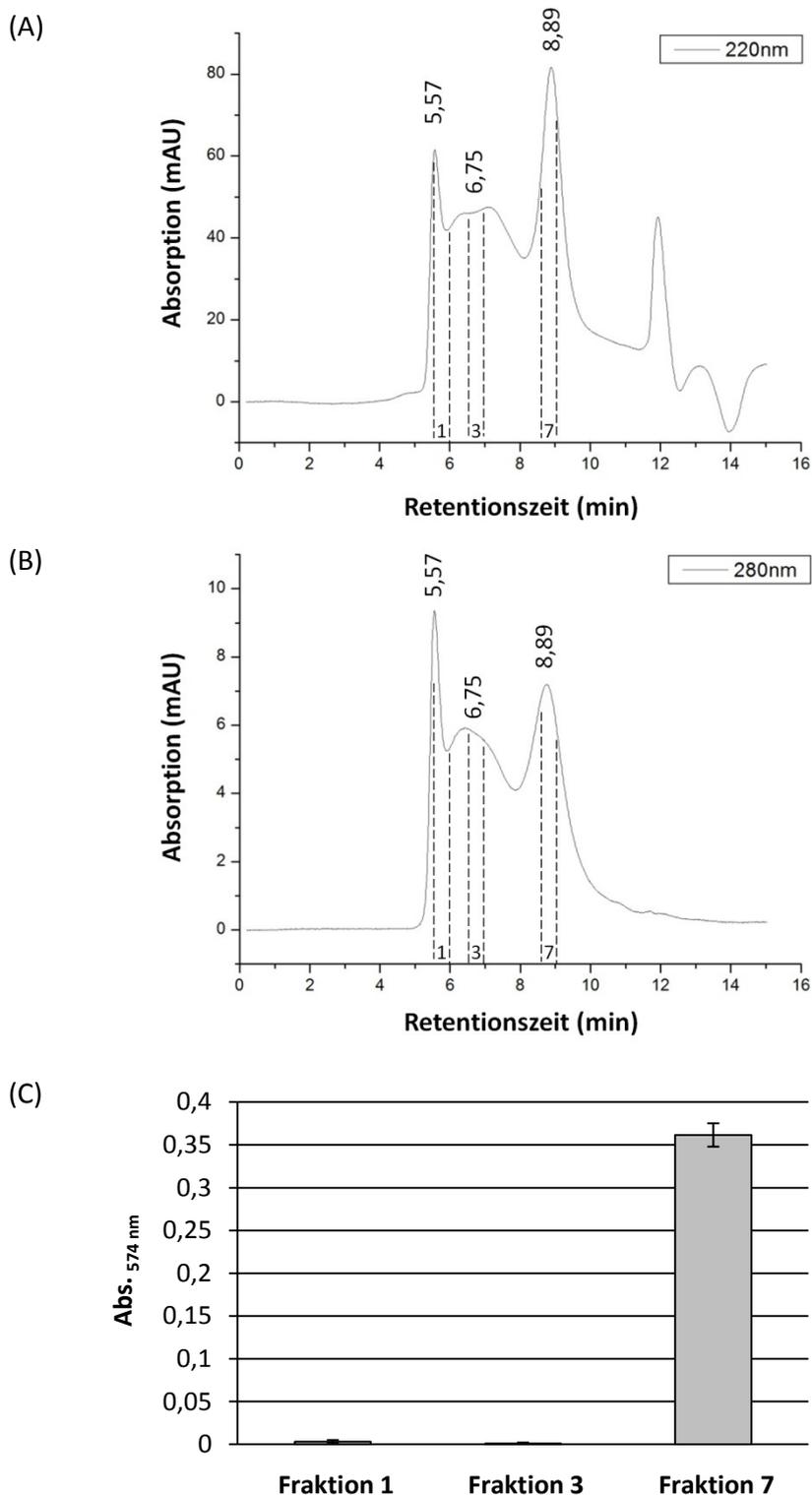


Abb. 3.11 Identifizierung des aktiven SprP mittels Größenausschlusschromatographie. Die durch autokatalytische Prozessierung von gereinigter Subtilase SprP entstehenden Proteinfragmente wurden mittels Größenausschlusschromatographie separiert. Die Chromatogramme wurden bei (A) 220 nm und (B) 280 nm aufgenommen. (C) Analyse der proteolytischen Aktivität der Fraktionen 1, 3 und 7. Als Substrat wurde Resorufin-markiertes Casein verwendet. Die Hydrolyse des Substrates wurde durch Messung der Absorption bei $\lambda = 574$ nm bestimmt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar. AU = *arbitrary unit*.

Nachdem demonstriert wurde, dass sich das aktive SprP in der Fraktion 7 befindet, wurde das apparente Molekulargewicht des Proteins über die ermittelte Retentionszeit und eine Standardgerade bestimmt (2.31). Diese Standardgerade wurde durch den Einsatz von kommerziell erhältlichen Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht durch Auftragen der K_{AV} -Werte (Formel 3) des jeweiligen Standardproteins gegen den Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichtes ($\log_{10} M_R$) erstellt (Abb. 3.12). Die Berechnung des K_{AV} -Wertes von SprP erfolgte aus der ermittelten Retentionszeit von 8,89 Minuten. Der Vergleich des K_{AV} -Wertes von SprP mit der Gleichung der Standardgerade ermöglicht die Berechnung des apparenten Molekulargewichtes. Auf diese Weise konnte für SprP ein apparentes Molekulargewicht von ca. 26 kDa definiert werden.

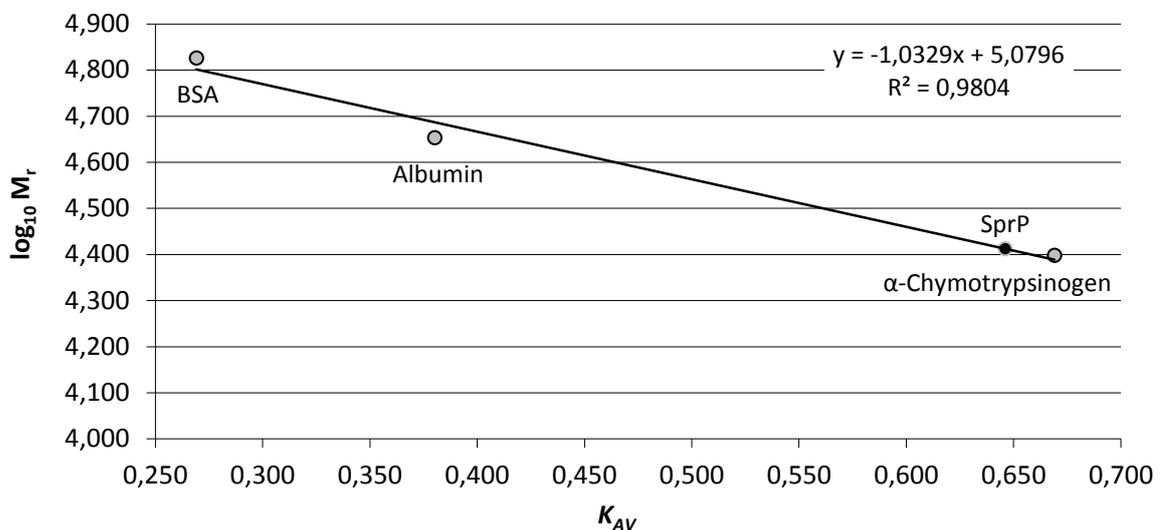


Abb. 3.12 Standardgerade für die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes des aktiven SprP. Die Proteine BSA (67 kDa), Albumin (45 kDa) und α -Chymotrypsinogen (25 kDa), deren Molekulargewichte bekannt sind, wurden in Elutionsmittel gelöst und die Retentionszeiten dieser Proteine bestimmt. Nach Auftragen der K_{AV} -Werte gegen das logarithmierte Molekulargewicht (\log_{10}) der Proteine wurde anhand der Retentionszeit des aktiven SprP der K_{AV} -Wert für SprP ermittelt und in das Diagramm eingetragen (schwarzer Datenpunkt). Das apparente Molekulargewicht wurde mit ca. 26 kDa bestimmt.

Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes des aktiven SprP wurde zudem mittels Zymographie (2.35.1) durchgeführt. Die Zymographie basiert auf der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einem Substrat, das mit der Polyacrylamid-Matrix kopolymerisiert vorliegt. Da durch die vorherigen Aktivitätstests bereits gezeigt werden konnte, dass Casein ein geeignetes Substrat für SprP darstellt, wurden Zymogram-Gele verwendet, die 0,1 % Casein (blau-markiert) als Substrat tragen.

1 μg des aktiven SprP wurde mit einem Probenpuffer versetzt, der durch das enthaltene SDS die Denaturierung des Proteins bewirkt. Im Gegensatz zu der Standard-SDS-PAGE (2.32) besitzt dieser Probenpuffer jedoch keine reduzierenden Reagenzien und die Proteinprobe wird vor der Beladung der Zymogram-Gele nicht erhitzt. Auf diese Weise ist es möglich, die Proteine, die durch Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, durch das Entfernen des SDS im Gel zu renaturieren. Nach der Renaturierung wurde das Zymogram-Gel für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Verlauf dieser Inkubation degradiert die aktive Protease das Substrat in dem Gel. Die Proteaseaktivität wird durch die Degradation des Caseins als weiße Bande sichtbar (Abb. 3.13).

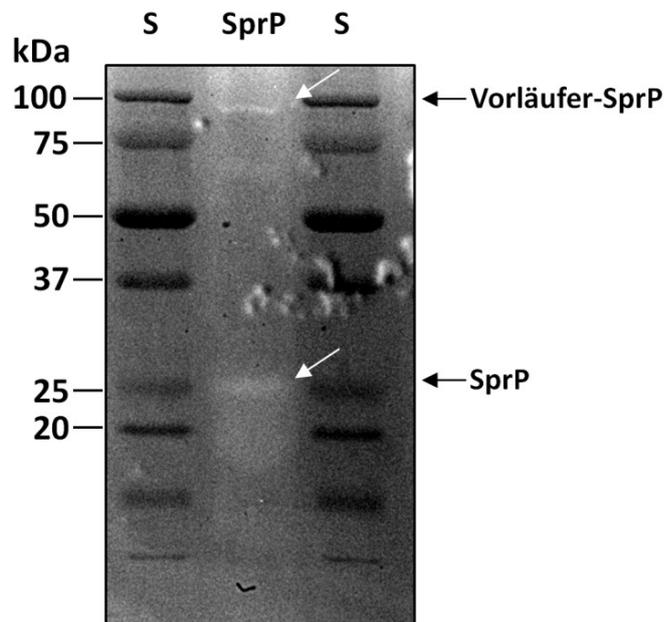


Abb. 3.13 Identifizierung des aktiven SprP mittels Zymographie. Dargestellt ist die Zymographie von 1 μg SprP mit einem Casein-Zymogram-Gel (0,1 % blau-markiertes Casein als Substrat). Die Dokumentation des Gels erfolgte nach 16 Stunden Inkubation bei 37 °C. Die Degradation des Caseins tritt an zwei definierten Stellen auf (weiße Pfeile). Zum einen auf Höhe des Vorläufer-SprP und zum anderen auf Höhe des prozessierten SprP. S = Standard (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standard*).

Proteaseaktivität wird in dem Zymogram-Gel an zwei definierten Stellen sichtbar (weiße Pfeile). Auf Höhe des unprozessierten Vorläufer-SprP (88 kDa) ist eine definierte weiße Bande sichtbar, die sich von dem dunklen Hintergrund absetzt. Weiterhin befindet sich eine weitere Bande stärkerer Intensität auf einer Höhe von ca. 26 kDa.

Es wurde ein SprP-Fusionsprotein (SprP-HlyA1) konstruiert, das über das HlyA T1SS in löslicher Form in den Überstand von *E. coli* sekretiert werden konnte. Nach der erfolgreichen Reinigung des Proteins wurde demonstriert, dass SprP als Zymogen (Vorläufer-SprP) produziert und durch autokatalytische Prozessierung aktiviert wird. Weiterhin konnte inaktives Vorläufer-SprP durch bereits aktives SprP aktiviert werden. Das aktive SprP hat ein apparentes Molekulargewicht von ca. 26 kDa.

3.5 Die Aktivität von SprP ist abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert

Die biochemische Charakterisierung der Subtilase SprP ist von großer Bedeutung, da die Analyse verschiedener Eigenschaften Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zulassen kann. Bislang sind die Eigenschaften der Subtilase und die Funktion in *P. aeruginosa* gänzlich unbekannt. Für die biochemische Charakterisierung von SprP wurde Resorufin-markiertes Casein als Substrat verwendet (2.35.2). Zunächst wurde das gereinigte Fusionsprotein wie in 3.4.1 beschrieben bis zum Erreichen einer Aktivität von ca. 100 nmol/(min x mg) inkubiert und die zeitabhängige Substratumsetzung von 3 µg SprP bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C analysiert (Abb. 3.14).

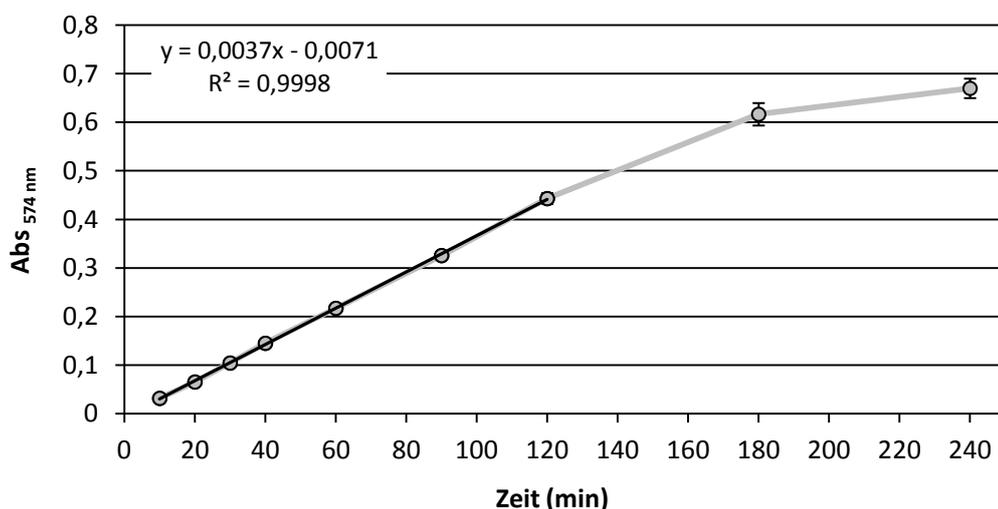


Abb. 3.14 Zeitaufgelöste Hydrolyse von Resorufin-markiertem Casein durch SprP. Die Hydrolyse von Resorufin-markiertem Casein durch SprP wurde über einen Zeitraum von vier Stunden analysiert. Die Regressionsgerade wurde in den linearen Bereich der Kurve eingetragen und die dazugehörige Geradengleichung sowie das Bestimmtheitsmaß sind dargestellt. Die Hydrolyse des Substrates wurde durch Messung der Absorption bei $\lambda = 574$ nm bestimmt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar.

Innerhalb der ersten 120 Minuten der Reaktion weist die Substratumsetzung einen linearen Kurvenverlauf auf. Die Regressionsgerade und das Bestimmtheitsmaß des linearen Bereiches wurden in das Diagramm eingetragen. Nach 120 Minuten konnte eine Aktivität von 93,2 nmol/(min x mg) bestimmt werden (Formel 4). Nach 180 bzw. 240 Minuten nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich ab und die ermittelten Aktivitäten liegen außerhalb des linearen Bereiches. Anhand dieses Aktivitätstests wurden die Bedingungen für die weiteren Analysen definiert. Die Bestimmung verschiedener Eigenschaften der Subtilase SprP wurden nach einer Reaktionszeit von 120 Minuten ermittelt.

3.5.1 SprP besitzt ein Temperaturoptimum von 50 °C

Die Bestimmung der Temperatur, bei der SprP die höchste proteolytische Aktivität aufweist, ist ein wichtiger Parameter der biochemischen Charakterisierung. Die Analyse der SprP-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur (2.35.2.1) wurde im Bereich von 4 °C - 70 °C analysiert (Abb. 3.15).

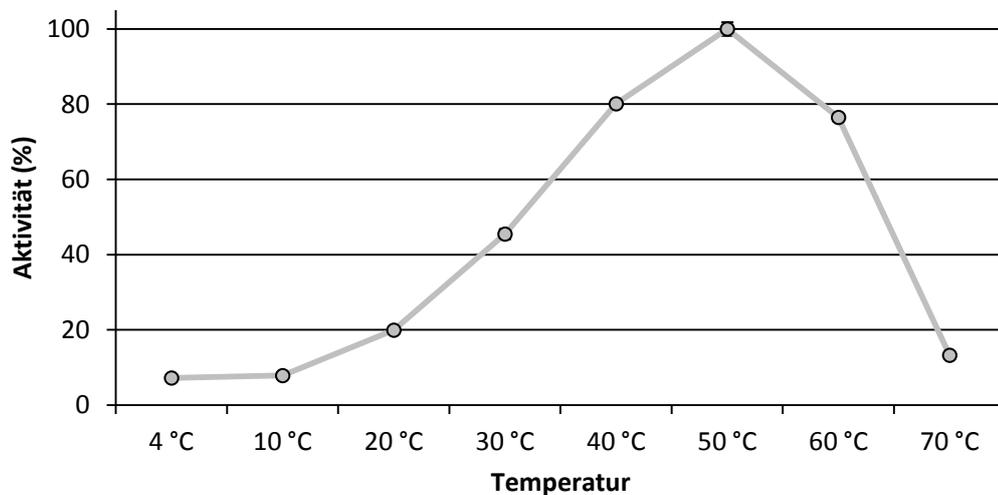


Abb. 3.15 Temperaturabhängige Aktivität von SprP. Die proteolytische Aktivität von SprP wurde bei den dargestellten Temperaturen bestimmt. Eine Aktivität von 100 % entspricht einer Aktivität von 110,4 nmol/(min x mg). Als Substrat wurde Resorufin-markiertes Casein verwendet. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar.

Der Aktivitätstest verdeutlichte, dass SprP insbesondere im Temperaturbereich von 40 °C - 60 °C hohe Aktivitäten aufweist, mit einem Temperaturoptimum von 50 °C. Bei 50 °C wurde eine Aktivität von 110,4 nmol/(min x mg) ermittelt. Im Vergleich zu dem Temperaturoptimum besitzt SprP bei einer Temperatur von 40 °C eine Aktivität von 80,1 % bzw. eine Aktivität von 76,5 % bei 60 °C. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 70 °C führte zu einer drastischen Reduzierung

der SprP-Aktivität (13,3 %). Bei niedrigen Temperaturen von 4 °C - 10 °C konnten nur geringe Aktivitäten ermittelt werden.

3.5.2 SprP besitzt ein pH-Wert-Optimum von 7 - 8

Der Einfluss des pH-Wertes (2.35.2.2) auf die proteolytische Aktivität von SprP wurde im Bereich von pH 6 bis pH 11 untersucht (Abb. 3.16). Die Messung unterhalb eines pH-Wertes von 6 war aufgrund des Präzipitierens des Substrats nicht möglich.

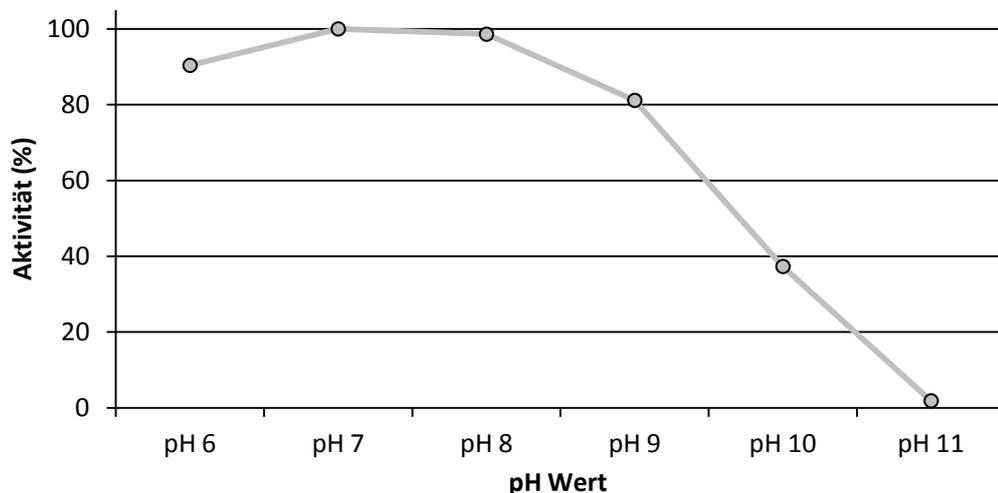


Abb. 3.16 pH-Wert-abhängige Aktivität von SprP. Die proteolytische Aktivität von SprP wurde bei den dargestellten pH-Werten bestimmt. Eine Aktivität von 100 % entspricht dabei 90,4 nmol/(min x mg). Als Substrat wurde Resorufin-markiertes Casein verwendet. Das Diagramm bildet die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung ab.

Für SprP konnte die höchste Aktivität mit 90,4 nmol/(min x mg) bei einem pH-Wert von 7 ermittelt werden. Im Vergleich zu dem pH-Wert-Optimum ist die Aktivität bei einem pH-Wert von 8 mit 98,6 % nur unwesentlich geringer. Weiterhin zeigt SprP hohe Aktivität bei einem pH-Wert von 6 mit 90,4 %. Die Aktivität sinkt deutlich im basischen Bereich. Bei einem pH-Wert von 9 liegt die Aktivität im Vergleich zu dem pH-Wert-Optimum noch bei 81,2 %, sinkt dann deutlich bis bei einem pH-Wert von 11 keine signifikante Aktivität mehr messbar ist.

3.6 Serinproteaseinhibitoren reduzieren die Aktivität von SprP

Proteasen werden aufgrund ihres Katalysemechanismus in verschiedene Klassen eingeordnet. Die Identifizierung des Katalysemechanismus unbekannter Proteasen erfolgt meist über den Einsatz spezifischer Proteaseinhibitoren. Für die Klassifizierung von SprP wurden zahlreiche

irreversibel-bindende Proteaseinhibitoren mit unterschiedlichen Spezifitäten verwendet (2.35.2.3). PMSF ist ein Serinproteaseinhibitor, der Serinproteasen durch Sulfonierung der Hydroxygruppe des Serins der katalytischen Triade inhibiert³⁴¹. AEBSF ist ebenfalls ein Serinproteaseinhibitor, der ein ähnliches Wirkungsspektrum wie PMSF besitzt³⁴². Dieser zeichnet sich jedoch durch eine höhere Löslichkeit und Stabilität in wasserhaltigen Puffern aus³⁴³. TPCK inhibiert Serinproteasen durch irreversible Bindung des Histidins im aktiven Zentrum^{344,345}. EDTA kann als Komplexbildner durch die Bindung der Ionen aus dem aktiven Zentrum als Inhibitor für ionenabhängige Metalloproteasen fungieren³⁴⁶. E-64 ist durch die Bindung der Thiolgruppe im aktiven Zentrum ein irreversibler Cysteinproteaseinhibitor^{116,347}. Pepstatin A ist ein spezifischer Asparaginsäureproteaseinhibitor³⁴⁸.

Für die Analyse der inhibitorischen Wirkung der verschiedenen Proteaseinhibitoren auf die Aktivität von SprP wurde die Protease für eine Stunde bei 4 °C mit den Proteaseinhibitoren inkubiert (2.35.2.3). Als Kontrolle wurde SprP ohne Proteaseinhibitor ebenso eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Aktivitätstest durchgeführt (2.35.2), um die SprP-Restaktivität zu analysieren (Abb. 3.17).

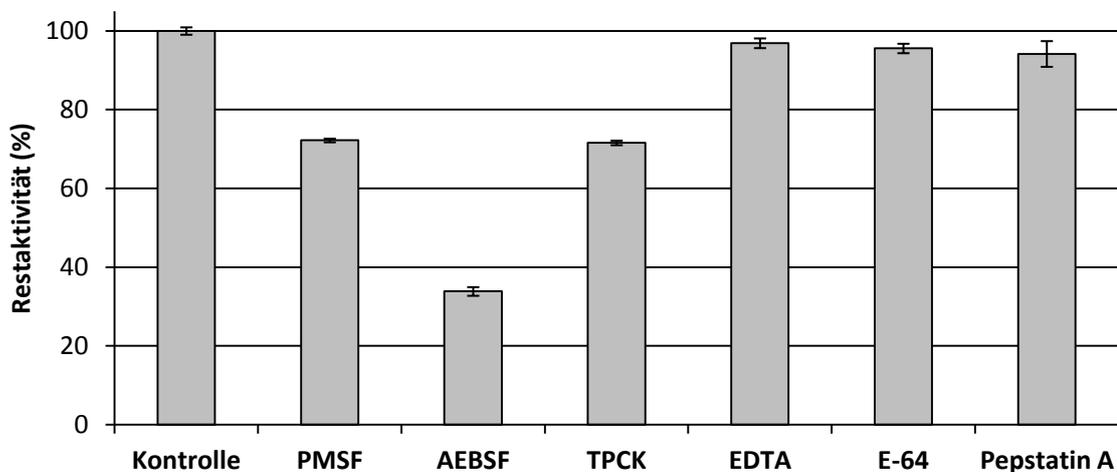


Abb. 3.17 Inhibitorische Wirkung verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Aktivität von SprP. Dargestellt ist die proteolytische Restaktivität von SprP nach der Inkubation mit diversen Proteaseinhibitoren, die unterschiedliche Spezifitäten besitzen. Serinproteasen können durch PMSF, AEBSF und TPCK gehemmt werden. Metalloproteasen können durch EDTA, Cysteinproteasen durch E-64 und Asparaginsäureproteasen durch Pepstatin A gehemmt werden. Eine Aktivität von 100 % entspricht dabei 90,3 nmol/(min x mg). Als Substrat wurde Resorufin-markiertes Casein verwendet. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar. Kontrolle = ohne Inhibitor, PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid, AEBSF = 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid, TPCK = N-Tosyl-L-phenylalanylchloromethan, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, E-64 = N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid, Pepstatin A = Isovaleryl-L-val-L-val-statinyl-L-ala-statin.

Die Kontrolle, ohne Inkubation mit einem Proteaseinhibitor, wurde als 100 % definiert. Es wurde eine SprP-Aktivität von 90,3 nmol/(min x mg) bestimmt. Die proteolytische Aktivität von SprP konnte nur durch die Verwendung von Serinproteaseinhibitoren deutlich reduziert werden. Insbesondere AEBSF konnte als potenter Inhibitor identifiziert werden, da die Aktivität von SprP durch die Inkubation mit AEBSF um 66,1 % gesenkt wurde. PMSF und TPCK wirken ebenfalls inhibierend, senken die proteolytische Aktivität von SprP allerdings nur um 27,8 % bzw. 28,4 %. Die übrigen Proteaseinhibitoren sind nicht in der Lage, die Proteaseaktivität von SprP deutlich zu reduzieren.

3.7 SprP präferiert die Spaltung basischer und hydrophober Peptide

Für die Identifizierung von geeigneten Proteasesubstraten für SprP wurde eine kommerzielle Peptidbibliothek bestehend aus 3375 Peptiden verwendet (2.35.3). Peptide ähnlicher Sequenz sind dabei in 96-*well* Platten zu Peptidmischungen (*pools*) vereinigt. Diese Peptidmischungen bestehen maximal aus 8 Peptiden. Auf diese Weise kann die große Menge von 3375 Peptiden auf 512 *wells* reduziert werden. Die Peptide besitzen einen variierenden Tripeptid-Kern und ein FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer)-Paar bestehend aus dem Fluoreszenz-Donor MCA und dem Fluoreszenz-Akzeptor DPA an den terminalen Enden. Befindet sich das FRET-Paar in räumlicher Nähe zueinander, unterbindet der Akzeptor die Fluoreszenz des Donors. Wird der Tripeptid-Kern von SprP hydrolysiert, werden der Fluoreszenz-Donor und der Fluoreszenz-Akzeptor getrennt und es entsteht nach der Exzitation bei $\lambda = 320$ nm eine messbare Emission bei $\lambda = 420$ nm.

Vor der Messung der Peptidplatten wurde die Aktivität von SprP mit Resorufin-markiertem Casein bestimmt (2.35.2). Die SprP-Aktivität betrug 81,2 nmol/(min x mg). Für die Messung der Peptidplatten wurde SprP in einer Endkonzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{well}$ eingesetzt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte alle zwei Minuten über ein Zeitintervall von einer Stunde bei 37 °C. Innerhalb dieses Zeitintervalls konnte keine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals identifiziert werden. Die 96-*well* Platten wurden verschlossen und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde eine Endpunktmessung zur Bestimmung der Fluoreszenz aller Proben durchgeführt. Es konnten 27 *wells* mit einer Fluoreszenz ≥ 20000 AU identifiziert werden (ohne Abbildung). In einer anschließenden Messung wurden diese 27 *wells* nochmals analysiert (2.35.3). Da bei der ersten Messung nur geringe SprP-Aktivität messbar war, wurde für diese Messung SprP in einer Endkonzentration von 4 $\mu\text{g}/\text{well}$ eingesetzt und die Verstärkung des Fluoreszenzphotometers erhöht (von 100 auf 110). Vor der Messung der

Peptide wurde erneut die Aktivität von SprP mit Resorufin-markiertem Casein bestimmt (2.35.2). Die SprP-Aktivität betrug 86,2 nmol/(min x mg). Die Fluoreszenzmessung erfolgte alle zwei Minuten über ein Zeitintervall von einer Stunde bei 37 °C sowie nach 180 und 240 Minuten. Die Messung und die Analyse der Peptidmischung mit den Tripeptid-Kernen PKS/PKT/PRS/PRT ist exemplarisch in Abb. 3.18 dargestellt.

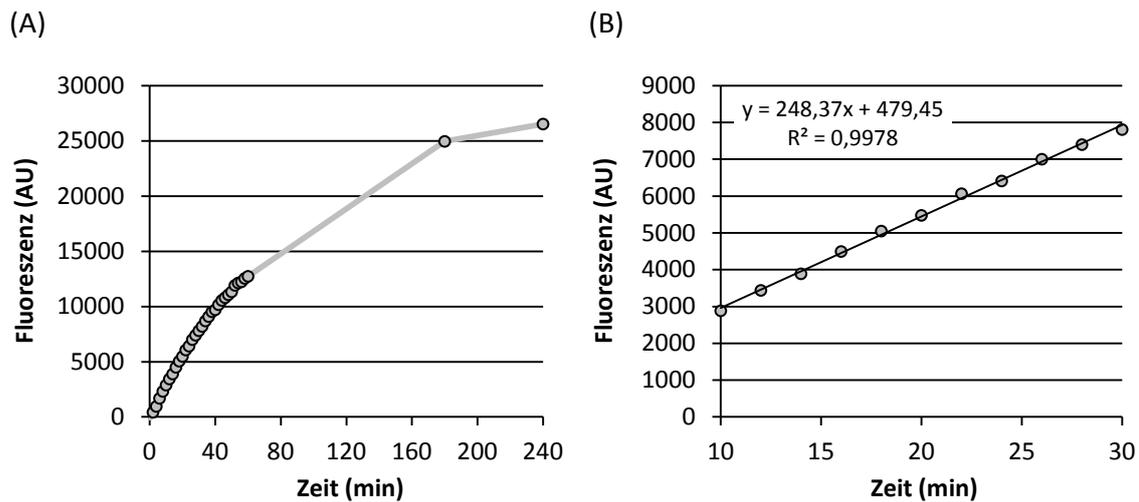


Abb. 3.18 Fluoreszenzmessung einer Peptidmischung und Bestimmung der Fluoreszenzzunahme pro Minute. (A) Die Fluoreszenz der Peptidmischung mit den Peptiden PKS/PKT/PRS/PRT wurde alle zwei Minuten über ein Intervall von einer Stunde ermittelt (Exzitation $\lambda_{320\text{ nm}}$ /Emission $\lambda_{420\text{ nm}}$). Zusätzlich wurde die Fluoreszenz nach 180 und 240 Minuten bestimmt. (B) Darstellung des linearen Bereiches der Fluoreszenzmessung im Zeitintervall 10 - 30 Minuten. Die Funktionsgleichung der Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß sind im Diagramm dargestellt. Die Fluoreszenz ist in AU angegeben. AU = *arbitrary unit*.

Es war eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz innerhalb der ersten 60 Minuten zu erkennen (Abb. 3.18 A). Die Kurve zeigt einen linearen Verlauf im Zeitintervall 10 - 30 Minuten. Daraufhin sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit und nach 180 bzw. 240 Minuten ist eine Sättigung zu erkennen. Der lineare Bereich der Kurve wurde gesondert betrachtet (Abb. 3.18 B). Die Funktion der Regressionsgerade und das Bestimmtheitsmaß sind in das Diagramm eingetragen. Die Fluoreszenzzunahme pro Minute ergibt sich aus der Steigung der Geradengleichung (248,37 AU/min).

Die exemplarisch dargestellte Analyse (Abb. 3.18) wurde mit allen analysierten Peptidmischungen durchgeführt. Die Peptidmischungen, die mit einer Geschwindigkeit von ≥ 200 AU/min hydrolysiert wurden, sind in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.19). Die Hydrolyse jeder Peptidmischung durch die Protease SprP ist als Säulendiagramm dargestellt. Die Einheit der SprP-Aktivität ist Fluoreszenzzunahme pro Minute (AU/min). Unterhalb des

Säulendiagramms sind die Tripeptid-Kerne dargestellt, die in der entsprechenden Peptidmischung vorhanden sind.

Von ursprünglich 512 Peptidmischungen (3375 Peptide) konnten die 17 dargestellten Peptidmischungen (124 Peptide) identifiziert werden, die offensichtlich besonders geeignete Substrate für SprP darstellen. Die höchste Aktivität mit 343,55 AU/min konnte für die Peptidmischung bestehend aus den Tripeptiden RRV/RRA/RKV/RKA/KRV/KRA/KKV/KKA bestimmt werden.

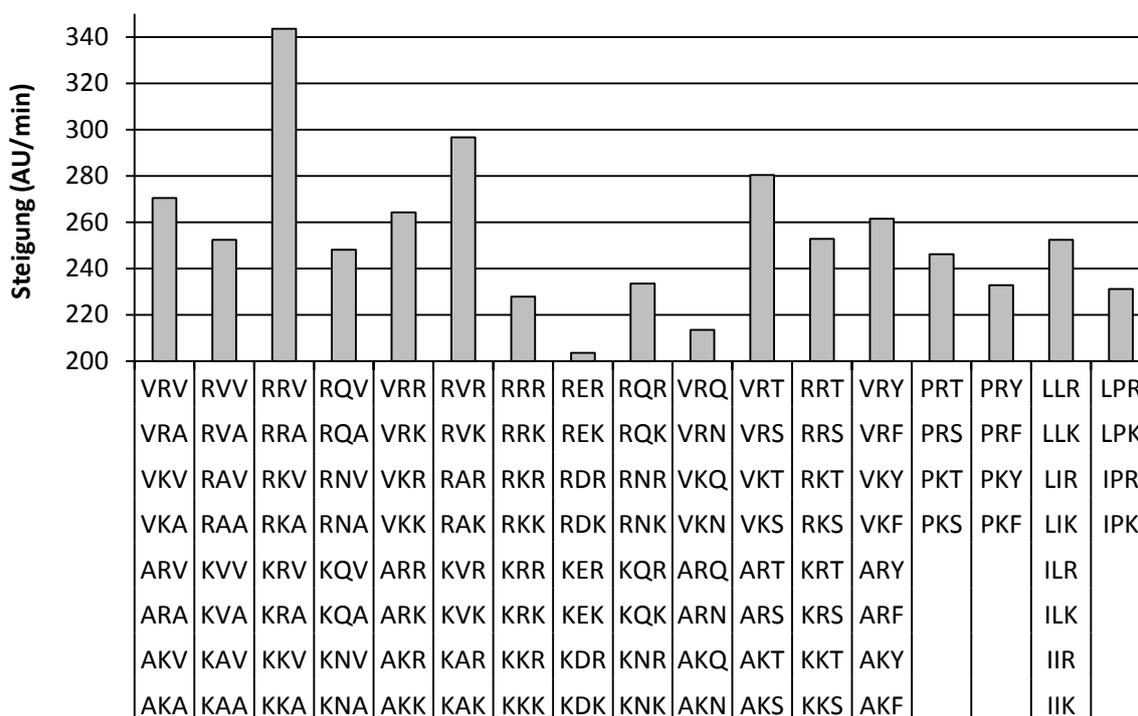


Abb. 3.19 Identifizierung von SprP-Substraten. Es wurden 17 Peptidmischungen identifiziert, die von SprP besonders effektiv umgesetzt werden ($\text{AU}/\text{min} \geq 200$). Die entsprechenden Aktivitäten in Fluoreszenzzunahme pro Minute (AU/min) sind im Säulendiagramm dargestellt. Die einzelnen Peptide der jeweiligen Peptidmischung sind unterhalb des Säulendiagramms abgebildet. Die höchste SprP-Aktivität konnte für die Peptidmischung RRV/RRA/RKV/RKA/KRV/KRA/KKV/KKA mit 343,55 AU/min bestimmt werden.

Die Aminosäuresequenzen der Tripeptide aller 17 Peptidmischungen wurden verwendet, um ein Sequenzlogo (2.38) zu erstellen (Abb. 3.20). Diese Darstellung vereinfacht die Identifizierung besonders häufig auftretender Aminosäuren innerhalb der Tripeptide, die von SprP hydrolysiert wurden.

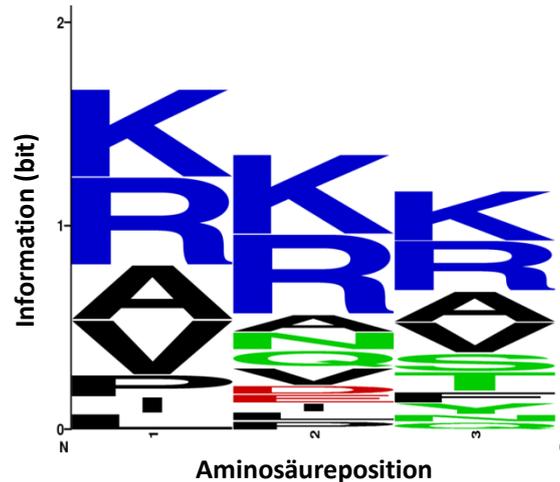


Abb. 3.20 Sequenzlogo der Tripeptide der identifizierten Peptidmischungen. Es sind die Aminosäurepositionen innerhalb der Tripeptide und der Informationsgehalt dieser Position (in bit) abgebildet. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Höhe der Buchstaben entspricht dabei der Häufigkeit des Auftretens an der jeweiligen Position. Blau = basische Seitenkette, Schwarz = unpolare Seitenkette, Grün = ungeladene polare Seitenkette, Rot = saure Seitenkette.

Es ist zu erkennen, dass an allen drei Positionen die beiden basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) mit der größten Häufigkeit auftreten. Weiterhin kommen die beiden hydrophoben Aminosäuren Alanin (A) und Valin (V) ebenfalls an allen drei Positionen vor. Insbesondere an Position 1 und 3 treten diese vermehrt auf. Diese vier Aminosäuren sind die dominierenden Aminosäuren. An Position 1 sind weiterhin mit geringerer Häufigkeit Prolin (P), Isoleucin (I) und Leucin (L) vorhanden. Die Position 2 erscheint aufgrund des Auftretens von Asparagin (N), Glutamin (Q), Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E), Isoleucin (I), Leucin (L) und Prolin (P) variabler zu sein. An Position 3 folgen auf die vier dominierenden Aminosäuren Serin (S), Threonin (T), Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Asparagin (N) und Glutamin (Q).

SprP besitzt ein Temperaturoptimum von 50 °C sowie ein pH-Wert-Optimum von 7 - 8. Die Aktivität von SprP konnte ausschließlich durch spezifische Serinprotease-inhibitoren reduziert werden. Die Analyse einer Peptidbibliothek machte deutlich, dass SprP eine Präferenz für die Hydrolyse basischer und hydrophober Peptide besitzt.

3.8 SprP gehört zu der Familie der E-H-S Subtilasen

Die *Prokaryote Subtilase Database* (2.38) ordnet SprP aufgrund der vorhergesagten katalytischen Triade aus Glutaminsäure (Position 262), Histidin (Position 299) und Serin (Position 299) der E-H-S Familie der Subtilasen zu (3.1.1). Um diese Vorhersage experimentell zu verifizieren, wurden auf Basis des Plasmids pSU-SprPminLS drei weitere Plasmide erzeugt (Tab. 2.3). Mittels *QuikChange*[®] PCR (2.17.3) und geeigneter Oligonukleotide (Tab. 2.6) wurden die drei Aminosäuren Glutaminsäure (E), Histidin (H) und Serin (S) der vorhergesagten katalytischen Triade jeweils durch die Aminosäure Alanin (A) ersetzt. Daraus entstehen die SprP-Varianten SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP (FP = Fusionsprotein). Diese SprP-Varianten sind ebenso wie das SprP-Fusionsprotein mit HlyA1 fusioniert.

Der Expressionsstamm *NEB Express Competent E. coli* wurde jeweils mit einem dieser Plasmide und dem Plasmid pK184-HlyBD (Tab. 2.2) für das T1SS transformiert (2.13.2). Die Expressionsstämme wurden in 2 x YT-Medium (2.4.1) unter Selektionsdruck (Tab. 2.8) kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,6$) durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert (2.4.6). Nach einer Expressionszeit von sechs Stunden wurde der Überstand der Kulturen gewonnen (2.4.6) und die drei SprP-Varianten gereinigt (2.28). Proben der Elutionsfraktionen der drei Reinigungen wurden mittels SDS-PAGE (2.32) analysiert (Abb. 3.21 A).

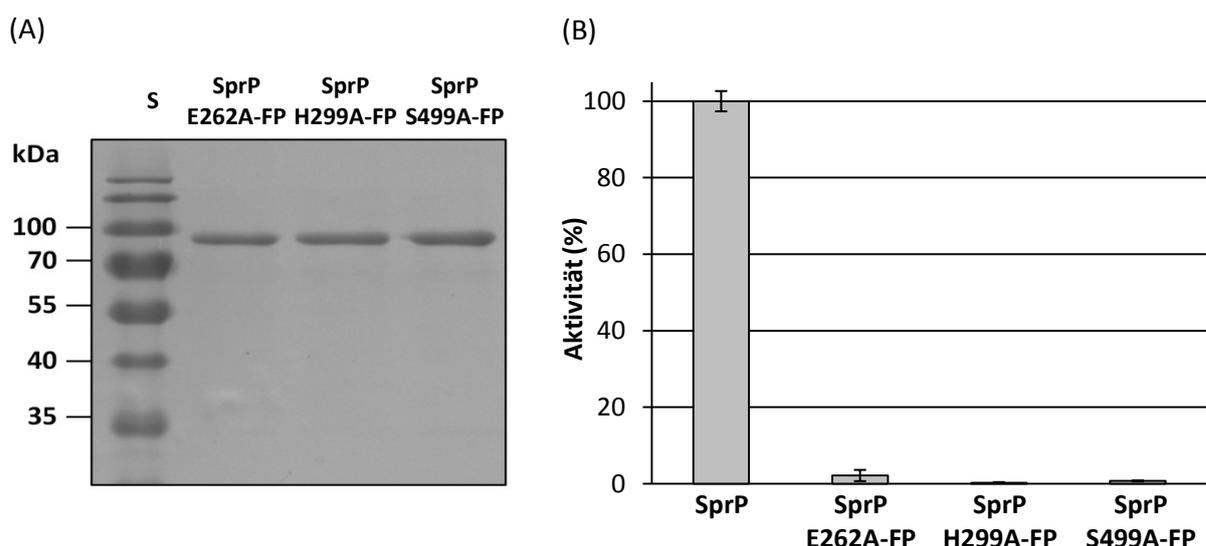


Abb. 3.21 SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP sowie die Analyse der proteolytischen Aktivität. (A) 10 μ l einer Reinigung von SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP wurden mittels SDS-PAGE (12 %) analysiert. Die SprP-Varianten haben ein Molekulargewicht von ca. 88 kDa. S = Standard (*PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder*). (B) Dargestellt ist die Proteaseaktivität von SprP und den SprP-Varianten. Eine Aktivität von 100 % entspricht dabei 93,6 nmol/(min x mg). Als Substrat wurde Resorufin-markiertes Casein verwendet. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar. FP = Fusionsprotein.

Die drei SprP-Varianten SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP konnten erfolgreich und ohne Kontaminationen durch weitere Proteine gereinigt werden. Um die Proteaseaktivität von SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP im Vergleich zu SprP analysieren zu können, wurde das SprP-Fusionsprotein parallel zu den SprP-Varianten unter identischen Bedingungen gereinigt. Das SprP-Fusionsprotein und die drei SprP-Varianten wurden bei 8 °C inkubiert bis für SprP signifikante Aktivität nachgewiesen werden konnte (2.35.2). Sobald SprP diese Aktivität erreichte, wurde die proteolytische Aktivität aller SprP-Varianten parallel analysiert (Abb. 3.21 B). Für SprP wurde eine proteolytische Aktivität von 93,6 nmol/(min x mg) ermittelt und diese Aktivität wurde als 100 % definiert. Für die drei SprP-Varianten SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP konnte keine Proteaseaktivität ermittelt werden.

3.9 Teildeletionen des SprP-Proteins führen zur Inaktivierung

In der Aminosäuresequenz von SprP wurden vier Domänen identifiziert (Abb. 3.1). In dieser Multidomänenstruktur des Proteins fällt besonders die lange DUF auf, die keinerlei Homologie zu bekannten Proteinen aufweist (3.1.2). Durch die Konstruktion verschiedener Teildeletionen wurde untersucht, ob die DUF für die Aktivierung von SprP notwendig ist.

Ausgehend von dem Plasmid pSU-SprPminLS (Tab. 2.3) wurden die beiden Plasmide pSU-SprPΔS8minLS und pSU-SprPΔDUFminLS konstruiert (Tab. 2.3). Mittels *QuikChange*[®] PCR (2.17.3) und geeigneter Oligonukleotide (Tab. 2.4) wurde bei pSU-SprPΔS8minLS der Genbereich des *sprP*-Gens, der für die Peptidase S8-Domäne und den C-terminalen nicht-konservierten Bereich kodiert, deletiert. Bei pSU-SprPΔDUFminLS wurde der Genbereich des *sprP*-Gens, der für die DUF kodiert, deletiert. Diese Deletionsvarianten sind ebenso wie das SprP-Fusionsprotein mit HlyA1 fusioniert. SprPΔS8-FP besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 51 kDa und SprPΔDUF-FP ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 62 kDa.

Für die Überexpression wurde der Expressionsstamm *NEB Express Competent E. coli* jeweils mit einem dieser Plasmide sowie mit dem Plasmid pK184-HlyBD (Tab. 2.2), das die Gene für das T1SS kodiert, transformiert (2.13.2). Die Expressionsstämme wurden in 2 x YT-Medium (2.4.1) unter Selektionsdruck (Tab. 2.8) kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase (O.D._{580 nm} = 0,6) durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert (2.4.6). Nach sechs Stunden Expressionszeit wurde der Überstand der Kulturen aufbereitet (2.4.6) und die beiden SprP-Deletionsvarianten gereinigt (2.28). Proben der Elutionsfraktionen der Reinigungen wurden mittels SDS-PAGE (2.32) analysiert (Abb. 3.22 A).

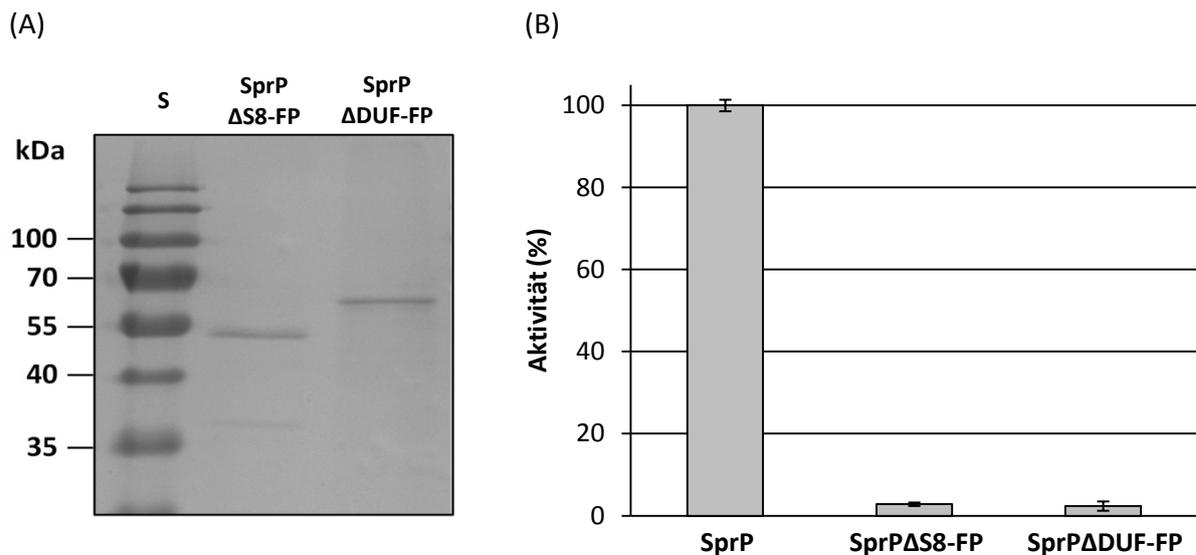


Abb. 3.22 SDS-PAGE-Analyse der Reinigung der SprP-Deletionsvarianten SprPΔS8-FP und SprPΔDUF-FP sowie Analyse der proteolytischen Aktivität. (A) 10 μ l der Reinigung von SprPΔS8-FP und SprPΔDUF-FP wurden mittels SDS-PAGE (12 %) analysiert. Diese Deletionsvarianten des SprP-Fusionsproteins haben ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 51 kDa für SprPΔS8-FP bzw. von ca. 62 kDa für SprPΔDUF-FP. S = Standard (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*). (B) Dargestellt ist die Proteaseaktivität von SprP und der beiden SprP-Deletionsvarianten. Eine Aktivität von 100 % entspricht dabei 81,01 nmol/(min x mg). Als Substrat wurde Resorufin-markiertes Casein verwendet. Das Diagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar. FP = Fusionsprotein.

Die beiden SprP-Varianten SprPΔS8-FP und SprPΔDUF-FP konnten erfolgreich gereinigt werden. Bei der Reinigung von SprPΔS8-FP trat eine Kontamination auf Höhe von ca. 37 kDa auf, die erneut mittels MALDI-TOF-MS (2.34) als das äußere Membranprotein OmpF aus *E. coli* identifiziert werden konnte. In der Elutionsfraktion von SprPΔDUF-FP waren keine starken Kontaminationen vorhanden.

Das SprP-Fusionsprotein wurde erneut parallel zu den beiden SprP-Deletionsvarianten unter identischen Bedingungen gereinigt und wie in Kapitel 3.8 beschrieben inkubiert, um die Proteaseaktivität von SprPΔS8-FP und SprPΔDUF-FP im Vergleich zu SprP analysieren zu können. Anschließend wurde die proteolytische Aktivität (2.35.2) parallel untersucht (Abb. 3.22 B). Für SprP wurde eine Aktivität von 81,01 nmol/(min x mg) ermittelt und diese Aktivität wurde als 100 % definiert. Die beiden SprP-Deletionsvarianten wiesen mit 2,8 % für SprPΔS8-FP bzw. 2,4 % für SprPΔDUF-FP im Vergleich zu SprP keine signifikante Proteaseaktivität auf.

Die SprP-Varianten SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP sind proteolytisch inaktiv. Die Klassifizierung von SprP als E-H-S Subtilase konnte somit experimentell verifiziert werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die SprP-Deletionsvarianten SprPΔS8-FP und SprPΔDUF-FP ebenfalls proteolytisch inaktiv sind.

3.10 Identifizierung regulatorischer Faktoren der *sprP*-Genexpression

Für die Charakterisierung der physiologischen Funktion von SprP wurde zunächst die Lokalisierung des *sprP*-Gens im Genom von *P. aeruginosa* betrachtet. Das *sprP*-Gen hat eine Länge von 1773 bp. Stromaufwärts von *sprP* befindet sich in gleicher Orientierung das Gen *pa1241* mit einer Länge von 561 bp. Zwischen den beiden Genen *pa1241* und *sprP* befindet sich eine kurze Intergen-Region von 79 bp (Abb. 3.23). In der *Pseudomonas*-Datenbank wird für den Locus *pa1241-sprP* mit Bezug auf die Datenbank *DOOR (Database for prokaryotic Operons)* ein 2412 bp langes Operon vorhergesagt^{16,349}. Das Protein PA1241 ist in der *Pseudomonas*-Datenbank als potenzieller Transkriptionsregulator der TetR-Familie annotiert.

Für ein besseres Verständnis von *sprP* und dessen Regulation wurde zunächst die transkriptionelle Organisation des Locus im Verlauf einer Masterarbeit, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde, analysiert²⁷³. Die Gesamt-RNA verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme wurde isoliert und DNA-Kontaminationen durch die Hydrolyse mit DNase entfernt (2.20). 1 µg dieser RNA wurde anschließend als Matrize für eine reverse Transkription (2.22) mit Gen-spezifischen Oligonukleotiden (P37, P39 und P41; Tab. 2.7) verwendet. Mittels reverser Transkription wurden die Transkripte A (*pa1241*), B (Intergen-Region) und C (*sprP*) in cDNA transkribiert. Anschließend wurde die synthetisierte cDNA mit einer *touchdown* PCR (2.17.2), unter Verwendung der Oligonukleotide P36 - P41, amplifiziert (Abb. 3.23).

In *P. aeruginosa* Δ*sprP* konnte ausschließlich das PCR-Produkt A (homolog zu *pa1241*) erzeugt werden. In *P. aeruginosa* Δ*pa1241* konnte nur das PCR-Produkt C (homolog zu *sprP*) generiert werden. In *P. aeruginosa* PAO1 konnten hingegen alle drei PCR-Produkte A, B (homolog zur Intergen-Region) und C erzeugt werden. In den Kontrollreaktionen (ohne reverse Transkription) konnten keine PCR-Produkte generiert werden. Somit lagen keine DNA-Kontaminationen in der RNA-Isolierung vor. Als Positivkontrolle wurde aus der genomischen DNA von *P. aeruginosa* (2.9) mit geeigneten Oligonukleotiden (Tab. 2.4) ein DNA-Fragment mittels PCR (2.17.1) amplifiziert, das den untersuchten Locus vollständig beinhaltet. Dieses DNA-Fragment wurde ebenfalls als Matrize für die *touchdown* PCR (2.17.2) unter identischen Bedingungen eingesetzt. Der

Größenvergleich zeigte, dass die PCR-Produkte aus beiden Experimenten identisch sind. Die Amplifikation der Produkte A, B und C ist nur möglich, wenn entweder eine mRNA, bestehend aus den Genen *pa1241* und *sprP* sowie der Intergen-Region, existiert oder zwei mRNAs existieren, wobei eine dieser mRNAs die Intergen-Region beinhaltet. Nur unter diesen Umständen sind die Bindestellen aller verwendeten Oligonukleotide vorhanden, damit deren Hybridisierung möglich ist.

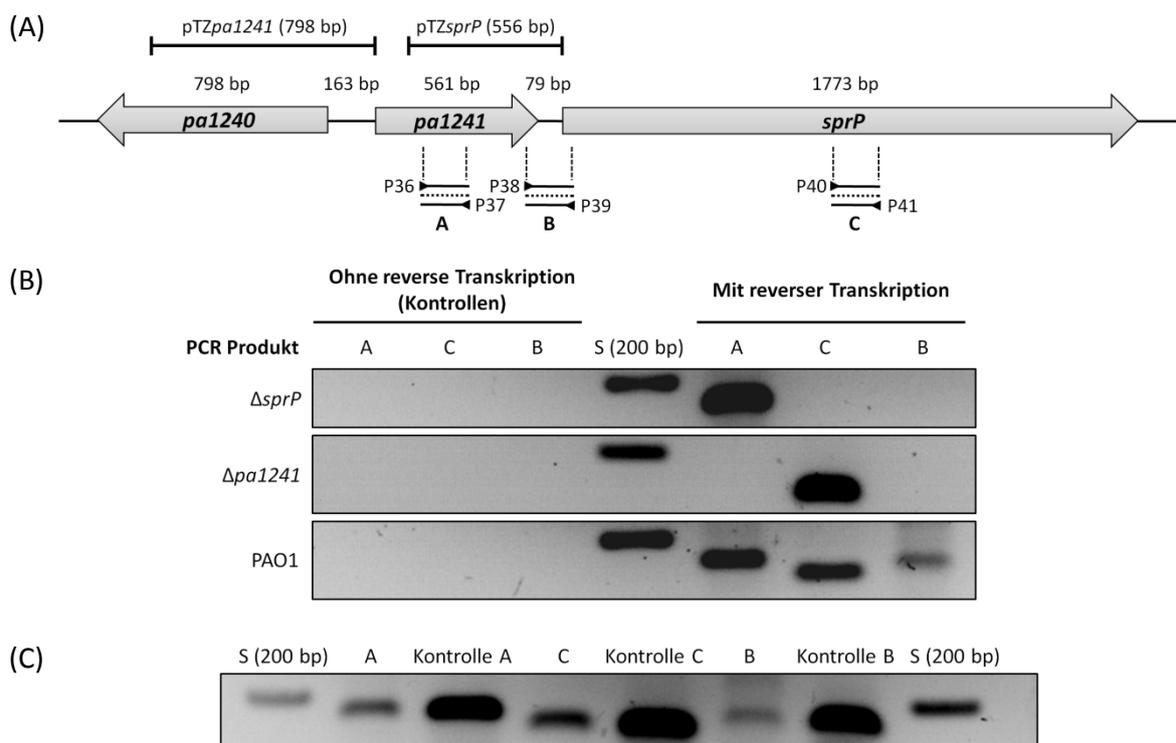


Abb. 3.23 Übersicht über die reverse Transkription mit anschließender PCR zum Nachweis von *pa1241* und *sprP*-Transkripten. (A) Schematische Darstellung der Gene *pa1240*, *pa1241* und *sprP* sowie der Intergen-Regionen mit der entsprechenden Länge (in bp) im Genom von *P. aeruginosa* PAO1. Die darüber dargestellten DNA-Bereiche wurden für die Klonierung der Plasmide pTZ*pa1241* und pTZ*sprP* verwendet. (B) Auf der linken Seite des Agarosegels sind die PCR-Produkte der Ansätze ohne reverse Transkription aufgetragen (Kontrollen). Auf der rechten Seite des Agarosegels sind die PCR-Produkte der Ansätze mit reverser Transkription aufgetragen. (C) Agarosegel der Positivkontrollen (modifiziert nach Reimann²⁷³). bp = Basenpaare, S = Größenstandard (200 bp Bande des Standards *GeneRuler 100 bp DNA Ladder*), A, B, C = spezifische PCR-Produkte.

In der Arbeit von Pelzer²⁶¹ wurde demonstriert, dass ein Promotor stromaufwärts von *sprP* vorhanden ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Bachelorarbeit betreut, in der u. a. potenzielle Auswirkungen der *pa1241*-Deletion auf die *sprP*-Promotoraktivität untersucht wurden²⁶². Die Promotoraktivität von *pa1241* und *sprP* wurde über transkriptionelle Reporterfusionen, die episomal vorlagen, bestimmt. Die stromaufwärts-Bereiche der Gene *pa1241* bzw. *sprP*, die den jeweiligen putativen Promotor P_{pa1241} bzw. P_{sprP} beinhalten

(Abb. 3.23 A), wurden mittels PCR (2.17) amplifiziert und stromaufwärts vor das promotorlose *lacZ*-Gen des pTZ110-Vektors (Tab. 2.2) kloniert, um die Fusionsvektoren pTZ*pa1241* und pTZ*sprP* zu erzeugen (Tab. 2.3). Es wurde ein ONPG-Test durchgeführt, um die Promotoraktivität zu quantifizieren (2.35.4). Die Quantifizierung erfolgt dabei indirekt über die Aktivität der *lacZ*-kodierte β -Galaktosidase. Als Maß für die Promotoraktivität wurden Miller Units bestimmt (Formel 5). Um die Stärke und den zeitabhängigen Verlauf der Promotoraktivität von *pa1241* und *sprP* zu analysieren, wurde die Promotoraktivität der beiden Gene in *P. aeruginosa* PAO1 und zudem die Promotoraktivität von *sprP* in *P. aeruginosa* $\Delta pa1241$ betrachtet (Abb. 3.24).

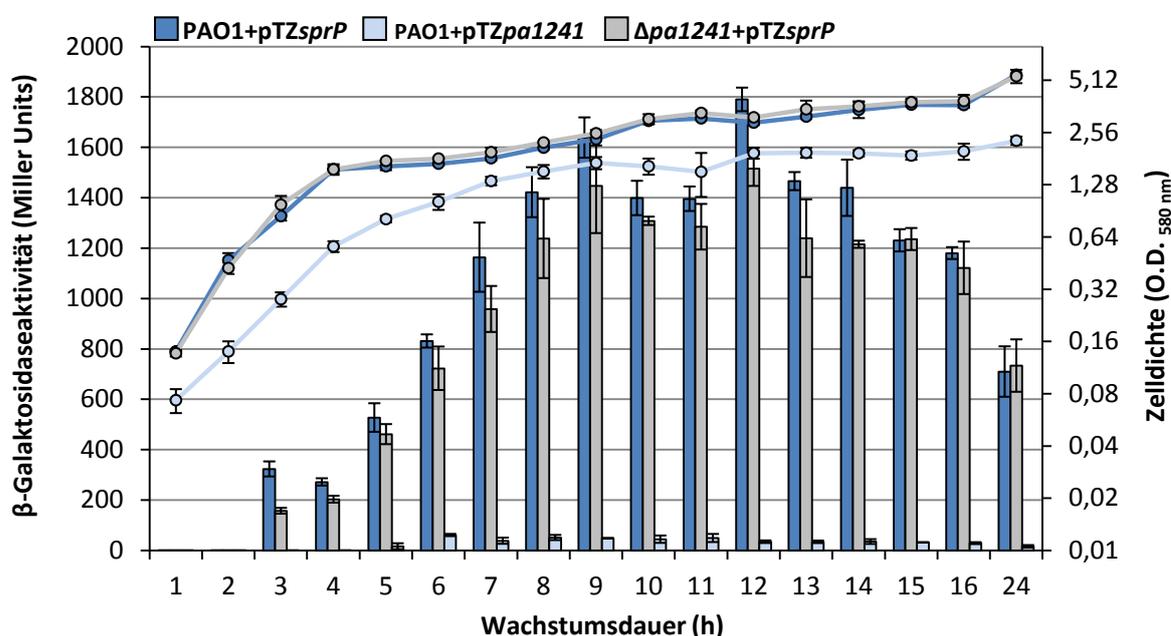


Abb. 3.24 Promotoraktivität der beiden Gene *sprP* und *pa1241* in *P. aeruginosa* PAO1 sowie des Gens *sprP* in *P. aeruginosa* $\Delta pa1241$. Die dargestellten Miller Units (Säulendiagramm) sind die Messwerte der transkriptionellen Reporterfusion abzüglich der Hintergrundaktivität des Leervektors pTZ110 (linke Ordinate). Die Promotoraktivität von *sprP* (Blau) erreicht in *P. aeruginosa* PAO1 ein Maximum von 1789 Miller Units und in *P. aeruginosa* $\Delta pa1241$ (Grau) ein Maximum von 1515 Miller Units. Die Promotoraktivität von *pa1241* (Hellblau) erreicht ein Maximum von 61 Miller Units. Die Wachstumskurven (Liniendarstellung) wurden parallel zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität bestimmt (rechte Ordinate). Die Zelldichte und die β -Galaktosidaseaktivität wurden in biologischer Dreifachbestimmung ermittelt. Die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung sind dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechenden Standardabweichungen (modifiziert nach Pünder²⁶²).

Die Aktivität des *sprP*-Promotors stieg mit zunehmender Kultivierungsdauer. Eine starke Promotoraktivität wurde im Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase erreicht. Im Bereich von 9 - 12 Stunden der Kultivierung entsprach die erreichte Zelldichte von *P. aeruginosa* einer $O.D._{580\text{ nm}} = 2,3 - 2,9$. Die Promotoraktivität von *sprP* erreichte ein absolutes Maximum nach 12 Stunden mit einer Aktivität von 1789 Miller Units. Die Aktivität des *pa1241*-

Promotors lag insgesamt deutlich unterhalb der Promotoraktivität des *sprP*-Gens. Das Maximum der Expression wurde nach sechs Stunden mit 61 Miller Units ermittelt. Im Bereich von 5 - 15 Stunden der Kultivierung blieb die Aktivität konstant auf diesem geringen Niveau. Die Promotoraktivität von *sprP* in *P. aeruginosa* $\Delta pa1241$ stieg mit zunehmender Wachstumsdauer bis zum Erreichen eines Maximums im Bereich von 9 - 12 Stunden der Kultivierung. Das absolute Maximum der Aktivität wird nach 12 Stunden mit 1515 Miller Units erreicht. Im Rahmen der Standardabweichungen wurden keine signifikanten Unterschiede der *sprP*-Promotoraktivität im Vergleich von *P. aeruginosa* PAO1 zu *P. aeruginosa* $\Delta pa1241$ deutlich.

Die Daten veranschaulichen, dass der *sprP*-Promotor besonders im Übergang zur stationären Wachstumsphase aktiv ist und diese Promotoraktivität stets höher ist als die des *pa1241*-Gens. Die vergleichende Analyse der Promotoraktivität von *sprP* in *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta pa1241$ zeigte weiterhin, dass die Deletion von *pa1241* keinen Einfluss auf die Promotoraktivität des *sprP*-Gens hat.

3.10.1 HexR ist ein potenzieller Transkriptionsregulator der Genexpression

Die Identifizierung von Transkriptionsregulatoren der Genexpression von *pa1241* bzw. *sprP* erfolgte mittels DNA-Affinitätschromatographie (2.19). Die stromaufwärts-Bereiche der Gene *pa1241* und *sprP* wurden mittels Standard-PCR (2.17) unter Verwendung von Biotin-markierten Oligonukleotiden (Tab. 2.5) amplifiziert. Diese DNA-Bereiche entsprechen den Promotorbereichen, die auch für die *lacZ*-Fusionsvektoren verwendet wurden (Abb. 3.23 A). Als Kontrolle zur Identifizierung von unspezifisch DNA-bindenden Proteinen wurde ein interner DNA-Bereich innerhalb des *sprP*-Gens amplifiziert. Für die DNA-Affinitätschromatographie wurden 20 µg der biotinylierten DNA an Streptavidin-umhüllte magnetische *beads* gekoppelt (2.19.1). Es wurden Gesamtzellextrakte (2.24) einer *P. aeruginosa* PAO1-Hauptkultur mit einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,3 - 2,5 entspricht, hergestellt (2.4.3). Die DNA-gekoppelten magnetischen *beads* wurden anschließend mit 4 ml des Gesamtzellextraktes für 75 Minuten inkubiert. Zusätzlich zu den Promotorbereichen von *pa1241* und *sprP* sowie des internen DNA-Fragments, wurden magnetische *beads*, die nicht an DNA gekoppelt wurden, mit dem Gesamtzellextrakt inkubiert. Während dieser Inkubation konnten DNA-bindende Proteine aus dem Gesamtzellextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 an die drei verschiedenen DNA-Fragmente binden. Nach der Inkubation wurden Proteine, die nicht an DNA binden können, durch mehrere Waschschriffe entfernt. Die Elution der DNA-gebundenen Proteine erfolgte über die hohe Salzkonzentration des Elutionspuffers. Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte mittels SDS-

PAGE (2.32). Für eine bessere Separation der eluierten Proteine wurden 13 cm lange SDS-Gele (12 %) verwendet (Abb. 3.25).

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass zahlreiche Proteine in der Lage sind, die magnetischen *beads*, die nicht an DNA gekoppelt wurden, zu binden. Diese Kontrolle wurde durchgeführt, um Proteine zu identifizieren, die unspezifisch an die Oberfläche der magnetischen *beads* binden können. Weiterhin wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die an das interne DNA-Fragment des *sprP*-Gens binden. Diese Kontrolle wurde durchgeführt, um Proteine zu identifizieren, die unspezifisch DNA binden, ohne dass ein Promotor vorhanden ist. Die Elutionsfraktionen der Proben P_{pa1241} und P_{sprP} wurden im Vergleich zu den beiden Kontrollreaktionen analysiert. In der Elutionsfraktion von P_{pa1241} konnte eine zusätzliche Proteinbande identifiziert werden, die in beiden Kontrollreaktionen nicht zu finden ist (weißer Pfeil). Dieses Protein konnte mittels MALDI-TOF-MS (2.34) als PA3184 (HexR) identifiziert werden. In der Elutionsfraktion von P_{sprP} konnten im Vergleich zu den beiden Kontrollreaktionen, keine zusätzlichen Proteinbanden identifiziert werden.

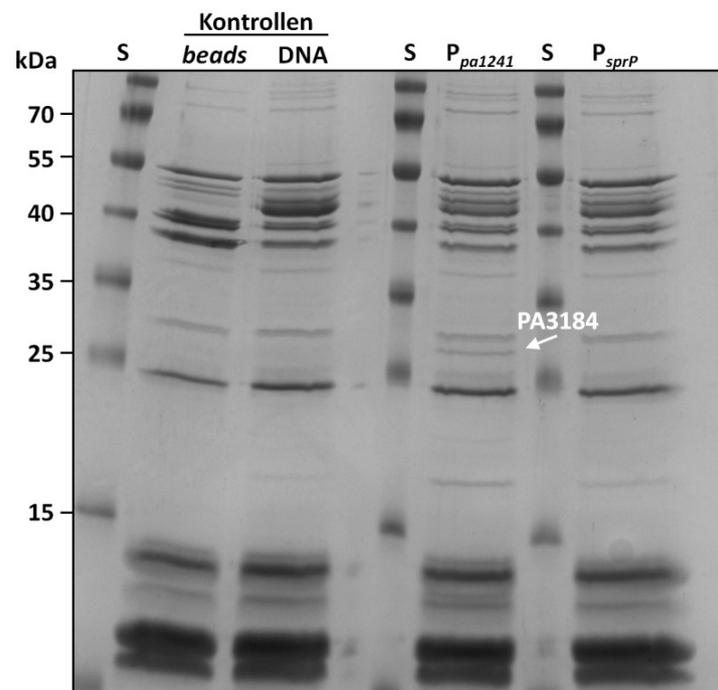


Abb. 3.25 SDS-PAGE-Analyse der mittels DNA-Affinitätschromatographie isolierten DNA-bindenden Proteine. Es sind die DNA-bindenden Proteine dargestellt, die an die Promotorbereiche von *pa1241* (P_{pa1241}) und *sprP* (P_{sprP}) sowie an ein internes DNA-Fragment binden (Kontrolle). Außerdem wurden Proteine identifiziert, die an magnetischen *beads* binden, obwohl an diese keine DNA gekoppelt wurde (Kontrolle). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (12 %) analysiert. Im Vergleich zu den beiden Kontrollen wurde ein zusätzliches Protein sichtbar, das spezifisch an den Promotorbereich P_{pa1241} bindet (weißer Pfeil). Dieses Protein wurde mittels MALDI-TOF-MS als PA3184 (HexR) identifiziert. S = Standard (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*).

Nach der Identifizierung des HexR-Proteins als DNA-bindendes Protein des *pa1241*-Promotors und somit potenzieller Transkriptionsregulator wurde dessen regulatorischer Einfluss intensiver untersucht. HexR ist ein Transkriptionsregulator des zentralen Kohlenhydratmetabolismus³⁵⁰, der die Expression aller Gene des *hex*-Regulons durch die Bindung der stromaufwärts-Bereiche dieser Gene reprimiert. Untersuchungen in *Pseudomonas* zeigten, dass zwei HexR-Monomere innerhalb des Promotorbereiches die pseudopalindromische Sequenz 5'-TTGTN_{7,8}ACAA-3' binden³⁵⁰. Da die HexR-Bindesequenz bekannt ist, wurde der Promotorbereich von *pa1241* auf die Präsenz dieser Bindesequenz untersucht (Abb. 3.26). Die Intergen-Region zwischen *pa1241* und *pa1240* beträgt 163 bp. Stromaufwärts des *pa1241*-Gens innerhalb dieser Intergen-Region konnte anhand der bekannten Bindesequenz eine Bindestelle für HexR identifiziert werden.



Abb. 3.26 Identifizierung einer HexR-Bindestelle in der Intergen-Region von *pa1240* und *pa1241*. Es ist die Intergen-Region (schwarz) von *pa1240* und *pa1241* von 5' nach 3' dargestellt mit einem Ausschnitt der Gene *pa1240* (Grün) und *pa1241* (Blau). Das Startcodon beider Gene und die Orientierung der Gene sind mit einem darüberstehenden Pfeil hervorgehoben. Die in Rot dargestellten Basen sind die hier identifizierten Basen der HexR-Bindestelle basierend auf der konservierten Sequenz für die HexR-Bindestelle (Orange) in *P. putida* beschrieben von Daddaoua *et al.*³⁵⁰.

Nach der Identifizierung des HexR-Transkriptionsregulators mittels DNA-Affinitätschromatographie (Abb. 3.25) und der HexR-Bindestelle im Promotorbereich von *pa1241* (Abb. 3.26), wurde untersucht, ob eine Regulation durch HexR *in vivo* nachweisbar ist. Zunächst wurde das *hexR*-Gen mittels PCR (2.17.1) unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide (Tab. 2.4) amplifiziert und in den Expressionsvektor pBBR1MCS (Tab. 2.2) kloniert. In dem daraus resultierenden Plasmid pBBR*hexR* (Tab. 2.3) steht das *hexR*-Gen unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors. Durch Konjugation (2.15) wurden der Leervektor (LV) pBBR1MCS und der konstruierte Expressionsvektor pBBR*hexR* (*hexR*+) nach *P. aeruginosa* PAO1

transferiert. Zudem wurde über homologe Rekombination (2.16) ein *hexR*-defizienter Stamm von *P. aeruginosa* erzeugt (Tab. 2.1).

Zur Analyse des regulatorischen Einflusses von HexR wurden Expressionsunterschiede nach der Isolierung von Gesamt-RNA (2.20) mittels reverser Transkription (2.22) mit anschließender *real-time* PCR (2.17.4) bestimmt. Da bei der DNA-Affinitätschromatographie die Orientierung des DNA-Fragments nicht berücksichtigt wird und die beiden Gene entgegengesetzt orientiert sind (Abb. 3.26), könnte HexR sowohl für *pa1240* als auch für *pa1241* als Transkriptionsregulator fungieren. Die Transkriptmengen der Gene *pa1240*, *pa1241*, *sprP* und *hexR* wurden zum einen in *P. aeruginosa* $\Delta hexR$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 und zum anderen in *P. aeruginosa* *hexR*⁺ im Vergleich zu *P. aeruginosa* LV analysiert. Für die Gene *pa1240*, *pa1241* und *sprP* konnten in beiden Experimenten im Rahmen der Standardabweichungen keine signifikanten Änderungen bezüglich der jeweiligen Genexpression identifiziert werden (ohne Abbildung).

Häufig können bereits geringfügige quantitative Unterschiede von Transkriptionsregulatoren einen Einfluss auf die Genregulation haben. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Stämme im Hinblick auf phänotypische Änderungen untersucht, obwohl auf Transkriptebene im Rahmen der Standardabweichungen keine signifikanten Änderungen messbar waren. Es wurden Hauptkulturen der verschiedenen Stämme in Schüttelkolben kultiviert (2.4.3). Der Stamm *P. aeruginosa* *hexR*⁺ wies im Vergleich zu *P. aeruginosa* LV deutliche Zellaggregation auf. Zur Visualisierung dieser Zellaggregate wurden die Kulturen in Petrischalen überführt und die Kultur nach einer Inkubation von 15 Minuten vorsichtig abgenommen. Die gebildeten Zellaggregate hafteten dadurch an der Polystyrol-Oberfläche der Petrischale (Abb. 3.27). Auf diese Weise wurden zahlreiche Zellaggregate sichtbar, die in dieser Qualität und Quantität bei *P. aeruginosa* LV nicht zu identifizieren waren. Somit führte die Überexpression des *hexR*-Gens in *P. aeruginosa* zur verstärkten Bildung von Zellaggregaten. Dieser Effekt der Zellaggregation, in stärkerer Weise, wurde ebenfalls bei *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ beobachtet (Abb. 3.29).

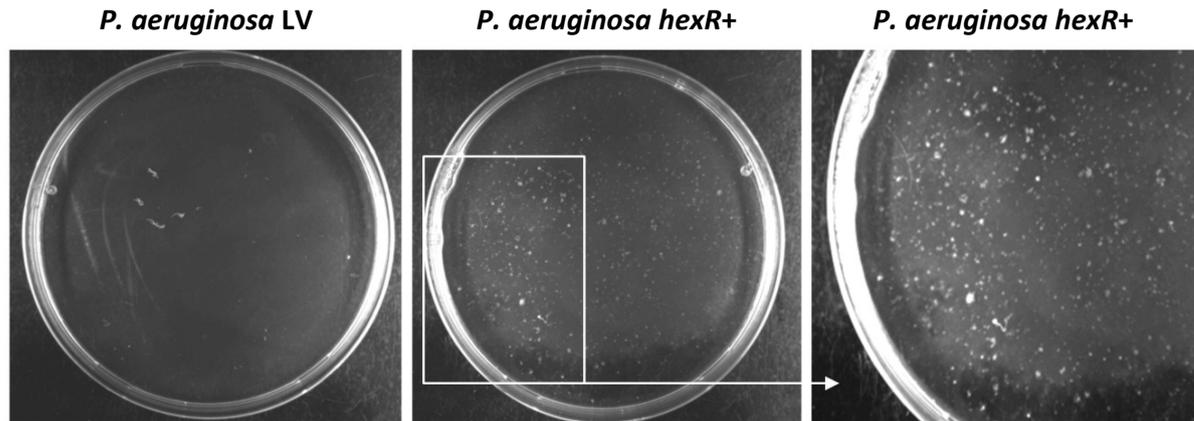


Abb. 3.27 Visualisierung der Zellaggregation in Flüssigkulturen hervorgerufen durch die Überexpression des *hexR*-Gens. Hauptkulturen von *P. aeruginosa* LV und *P. aeruginosa hexR+* wurden in Flüssigkulturen kultiviert. Zur Visualisierung der Zellaggregation wurden die Flüssigkulturen in Petrischalen überführt. Die Kulturen wurden nach kurzer Inkubation (15 Minuten) wieder abgenommen und die Aggregatbildung am Boden der Petrischale dokumentiert. Die Zellaggregation ist zudem vergrößert dargestellt. LV = Leervektor pBBR1MCS, *hexR+* = pBBR*hexR*.

3.10.2 Die Promotoraktivität von *sprP* ist hitzeinduziert

P. aeruginosa weist starkes Zellwachstum in einem Temperaturbereich von 25 - 42 °C auf³⁵¹. Die Kultivierung von *P. aeruginosa* findet unter Standardbedingungen bei 37 °C statt. Die biochemische Charakterisierung der Subtilase SprP demonstrierte, dass SprP in einem Temperaturbereich von 40 - 60 °C besonders aktiv ist. Das Temperaturoptimum für die Proteaseaktivität von SprP liegt bei 50 °C (Abb. 3.15). Aufgrund dieser großen Aktivität bei hohen Temperaturen wurde untersucht, ob die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von *P. aeruginosa* auf 43 °C Auswirkungen auf die Aktivität des *sprP*-Promotors hat. Der Stamm *P. aeruginosa* PAO1 mit dem Fusionsvektor pTZ*sprP* (Tab. 2.3) sowie mit dem Leervektor pTZ110 (Tab. 2.2) wurde parallel bei 37 °C und bei 43 °C kultiviert. Es wurde erneut ein ONPG-Test (2.35.4) durchgeführt, um die Aktivität des *sprP*-Promotors in *P. aeruginosa* PAO1 bei diesen Temperaturen zu quantifizieren (Abb. 3.28).

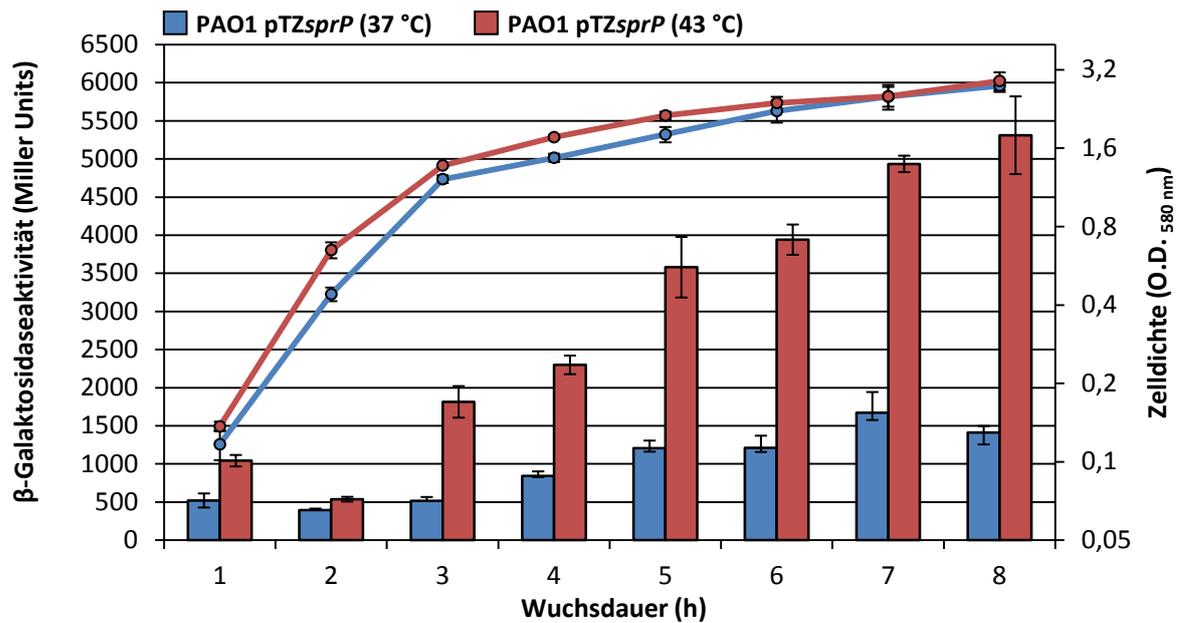


Abb. 3.28 Promotoraktivität von *sprP* in *P. aeruginosa* PAO1 bei 37 °C und 43 °C. *P. aeruginosa* wurde bei 37 und 43 °C kultiviert und die Promotoraktivität von *sprP* mittels ONPG Test analysiert. Die dargestellten Miller Units (Säulendiagramm) sind die Messwerte der episomalen Transkriptionsfusion abzüglich der Hintergrundaktivität des Leervektors pTZ110 (linke Ordinate). Die Wachstumskurven (Liniendarstellung) wurden parallel zur Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität bestimmt (rechte Ordinate). Die Zelldichte und die β-Galaktosidaseaktivität wurden in biologischer Dreifachbestimmung analysiert. Die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung sind dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechenden Standardabweichungen.

Bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C stieg die *sprP*-Promotoraktivität mit zunehmender Wuchsdauer bis zum Erreichen eines Maximums nach sieben Stunden an. Die Promotoraktivität lag nach sieben Stunden bei 1672 Miller. Die Promotoraktivität von *sprP* bei einer Kultivierungstemperatur von 43 °C ist über den betrachteten Zeitraum stets deutlich erhöht. Nach acht Stunden Inkubation bei 43 °C wurde eine Aktivität von 5310 Miller Units bestimmt. Im Vergleich zu der Promotoraktivität bei 37 °C liegt zu diesem Zeitpunkt eine Steigerung der Promotoraktivität um 376 % vor. Somit konnte gezeigt werden, dass die *sprP*-Promotoraktivität bei 43 °C induziert wird.

Die Promotoraktivität von *sprP* steigt im Laufe der Kultivierung und erreicht ein Maximum im Übergang zur stationären Wachstumsphase. Die Aktivität des *pa1241*-Promotors ist während der gesamten Wachstumsphase konstant auf einem geringen Niveau. Der Transkriptionsregulator HexR bindet den Promotorbereich von *pa1241* und führt bei Überexpression zur Zellaggregation von *P. aeruginosa*. Die Promotoraktivität von *sprP* wird bei einer Kultivierungstemperatur von 43 °C stark induziert.

3.11 Die *sprP*-Deletion verursacht pleiotrope Effekte in *P. aeruginosa*

Proteasen sind häufig an essenziellen regulatorischen Prozessen beteiligt und können auf diese Weise großen Einfluss auf die Physiologie eines Bakteriums nehmen²¹². Die physiologische Funktion von SprP wurde anhand eines *sprP*-defizienten Stammes von *P. aeruginosa* untersucht (Tab. 2.1). Alle Untersuchungen wurden mit dem Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* $\Delta sprP$, der komplementierten Deletionsmutante *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (*sprP*+) und der entsprechenden Leervektorkontrolle *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) durchgeführt. Für die Komplementation wurde der auf dem Leervektor pBBR1MCS (Tab. 2.2) basierende Überexpressionsvektor pBBR*sprP* (Tab. 2.3) verwendet. In diesem Teil der Arbeit lag der Fokus insbesondere auf dem Wachstumsverhalten, der Biofilmproduktion und der Beweglichkeit von *P. aeruginosa*.

3.11.1 *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ bildet starke Zellaggregate

Nach der Konstruktion von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ ²⁶¹ konnte eine drastische Änderung des Wachstumsverhaltens beobachtet werden. Aus einer Vorkultur heraus wurden Hauptkulturen der *P. aeruginosa*-Stämme auf eine Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 0,1 entspricht, inokuliert (2.4.3). Während der gesamten Kultivierung in Flüssigkulturen konnte die Bildung von Zellaggregaten beobachtet werden. Diese sind bereits bei niedriger Zelldichte in hoher Zahl mit dem Auge erkennbar und nehmen im Verlauf der Kultivierung an Größe zu. Die größten Zellaggregate wurden bei Zelldichten, die einer O.D._{580 nm} = 2 - 3 entsprechen, sichtbar. Für die Visualisierung der Zellaggregation wurden die Kulturen bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,3 - 2,5 entspricht, im Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurden die verschiedenen Kulturen in Petrischalen überführt und die Zellaggregate gegen einen dunklen Hintergrund dokumentiert (Abb. 3.29). Im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 waren deutliche Zellaggregate in den Kulturen *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) sichtbar. Das Einbringen des Leervektors pBBR1MCS zeigte keinerlei Auswirkungen auf den untersuchten Phänotypen. Ebenso wie *P. aeruginosa* PAO1 zeigte der komplementierte Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (*sprP*+) homogenes Wachstum. Die Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ konnte somit durch die Expression des wildtypischen *sprP*-Gens mit dem Überexpressionsvektor pBBR*sprP* erfolgreich herbeigeführt werden.

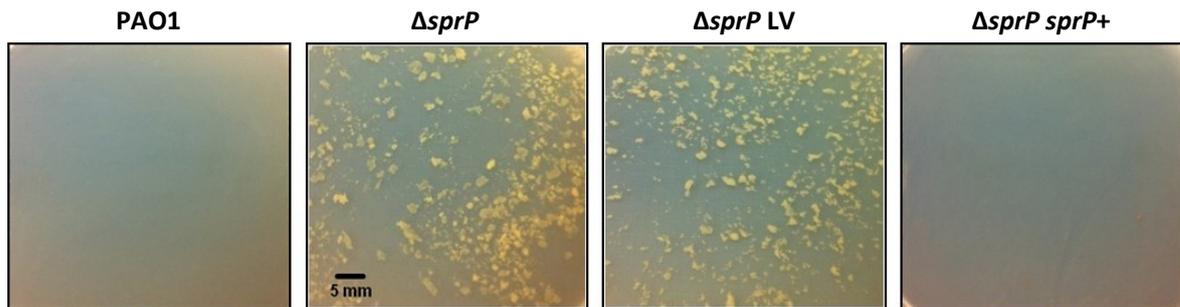


Abb. 3.29 Zellaggregation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ in Flüssigkulturen. Verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme wurden hinsichtlich der Bildung von Zellaggregaten während des Wachstums in Schüttelkolben untersucht. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,3 - 2,5 entspricht, kultiviert. Zur Visualisierung der Aggregatbildung wurden die Flüssigkulturen in Petrischalen überführt und die Aggregatbildung dokumentiert. LV = pBBR1MCS, *sprP+* = Komplementation mit pBBR*sprP*.

Die mikroskopische Betrachtung veranschaulicht die Akkumulation vieler Bakterienzellen zu einem Zellaggregat in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (Abb. 3.30). Bei diesen Zellaggregaten handelt es sich um Populationen zahlreicher Bakterien, die aneinander haften. In Abb. 3.30 ist eines der Aggregate mit kleinem Durchmesser abgebildet. In *P. aeruginosa* PAO1 sind hingegen nur einzelne Bakterienzellen zu erkennen.

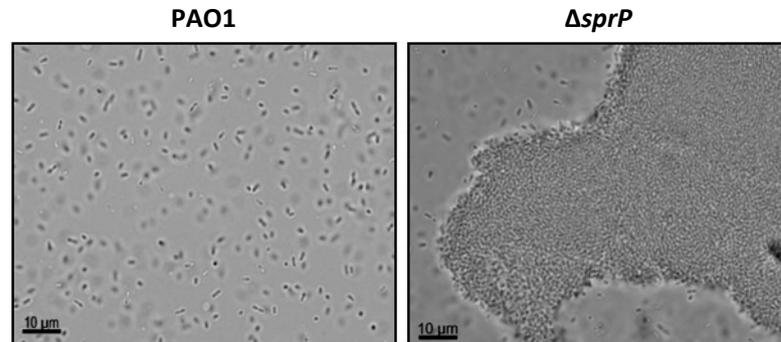


Abb. 3.30 Mikroskopische Betrachtung von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Die mikroskopischen Aufnahmen von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ wurden bei identischer Zelldichte zur Visualisierung der Zellaggregation aufgenommen.

3.11.2 *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ produziert verstärkt Biofilme

Die starke Zellaggregation während des Wachstums in Flüssigkulturen (3.11.1) war Anlass, die Biofilmproduktion von *P. aeruginosa* zu analysieren. Es wird vermutet, dass die selben Mechanismen, die für die Bildung von Zellaggregaten verantwortlich sind ebenfalls zur Biofilmproduktion beitragen^{95,352}.

Für die Quantifizierung der Biofilmproduktion wurden Hauptkulturen der *P. aeruginosa*-Stämme in Mikrotiterplatten kultiviert. Die Hauptkulturen wurden entsprechend einer $O.D._{580\text{ nm}} = 0,1$ inokuliert und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Zelldichte ($O.D._{580\text{ nm}}$) der verschiedenen Stämme bestimmt. Zunächst wurde anhand der Biofilme am Rand der *wells* qualitativ nachgewiesen, dass *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ deutlich mehr Biofilm an der Polystyrol-Oberfläche der Mikrotiterplatte bildete als *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. 3.31 A). *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) produzierte ebenfalls mehr Biofilm als *P. aeruginosa* PAO1. Der komplementierte Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ ($sprP+$) bildete hingegen wesentlich weniger Biofilm als *P. aeruginosa* $\Delta sprP$.

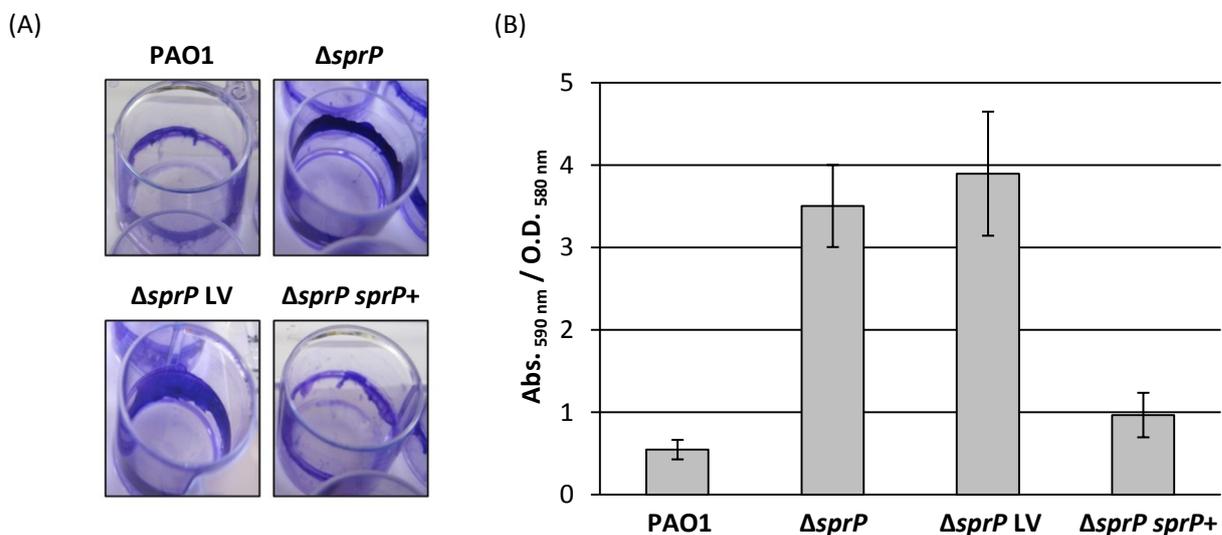


Abb. 3.31 Qualitativer und quantitativer Nachweis der Biofilmproduktion von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. (A) Für die Messung wurden die Kulturen 16 Stunden bei 37 °C inkubiert und der produzierte Biofilm an der Polystyrol-Oberfläche mit Kristallviolett gefärbt. (B) Der Biofilm wurde von der Polystyrol-Oberfläche gelöst und die Absorption bei $\lambda = 590\text{ nm}$ gemessen und mit der Zelldichte ($O.D._{580\text{ nm}}$) normiert. Die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung sind dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechenden Standardabweichungen. LV = pBBR1MCS, $sprP+$ = Komplementation mit pBBR $sprP$.

Für die quantitative Analyse der Biofilmproduktion wurden die Biofilme von den Oberflächen gelöst (2.7) und die Menge des gefärbten Biofilms ($Abs._{590\text{ nm}}$) mit der Zelldichte ($O.D._{580\text{ nm}}$) normiert. Im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 konnte für *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ eine 6,4-fache Erhöhung der Biofilmproduktion nachgewiesen werden (Abb. 3.31 B). Durch die Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit dem plasmidkodierten $sprP$ -Gen konnte die verstärkte Biofilmproduktion reduziert werden. Das Einbringen des Leervektors in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ zeigte hingegen keine Auswirkungen auf die Biofilmproduktion.

3.11.3 *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ ist unbeweglich

P. aeruginosa ist befähigt, drei verschiedene Arten der Bewegung auszuführen. Die Aktivität der Flagelle ermöglicht eine Schwimmbewegung von *P. aeruginosa* in fluiden Umgebungen³⁵³. Zudem ist *P. aeruginosa* in der Lage, sich auf soliden Oberflächen zu bewegen. Diese *twitching motility* beruht auf der Streckung und Retraktion der Typ IV-Pili¹¹⁶. Beide Oberflächenstrukturen, Flagelle und Typ IV-Pili, ermöglichen die Schwämbewegung entlang semisolider Oberflächen¹¹⁸. Nachdem bereits ein Effekt der *sprP*-Deletion auf das Wachstumsverhalten (3.11.1) und die Biofilmproduktion (3.11.2) nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden die Beweglichkeit von *P. aeruginosa* analysiert.

Für die Untersuchung der drei Bewegungsformen von *P. aeruginosa* wurden verschiedene Plattentests (2.8) durchgeführt. Die Untersuchung des Schwimmverhaltens erfolgte mittels Weichagarplatten, die durch eine niedrige Agarkonzentration eine fluide Oberfläche besitzen (2.8.2). Die Untersuchung des Schwärmverhaltens wurde anhand von Schwärmagar analysiert, der durch eine semisolide Oberfläche das Schwärmen der Bakterienzellen ermöglicht (2.8.1). Die verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme wurden mittig auf diese Agarplatten aufgetragen. Die *twitching motility* wurde anhand von 3 mm dünnen LB-Agarplatten untersucht (2.8.3). Eine *P. aeruginosa*-Einzelkolonie wurde durch den Agar hindurch auf den Boden der Petrischale gestochen. Die *twitching motility* wird an der soliden Oberfläche der Petrischale, unter Nutzung der Nährstoffe aus dem LB-Agar, ausgebildet. Nach der Auftragung der *P. aeruginosa*-Stämme auf die verschiedenen Agarplatten wurden diese 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Platten zur Analyse der *twitching motility* wurden weitere 1 - 2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die ausgebildete Beweglichkeit auf den Platten dokumentiert (Abb. 3.32).

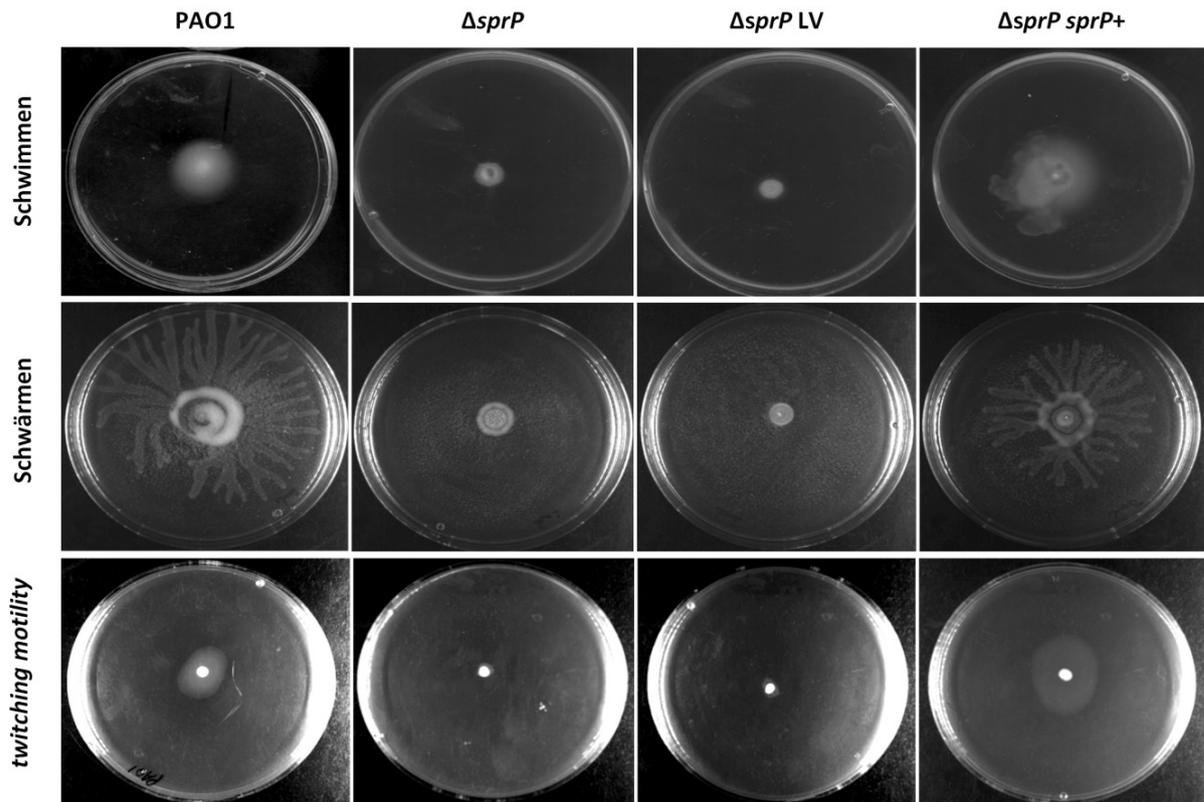


Abb. 3.32 Plattentests zur Analyse der Bewegungsformen von *P. aeruginosa*. Die drei Bewegungsformen Schwärmen, Schwimmen und die *twitching motility* von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ wurden anhand verschiedener Plattentests untersucht. Die Schwimmbewegung und die *twitching motility* wurden durch eine trübe Zone um die aufgetragene Bakterienkultur sichtbar. Die Schwärbewegung wurde durch die Ausbildung dendritischer Strukturen um die aufgetragene Bakterienkultur sichtbar (modifiziert nach Pelzer²⁶¹). LV = pBBR1MCS, *sprP+* = Komplementation mit pBBR*sprP*.

Die Schwimmbewegung zeichnet sich durch eine trübe Zone um die aufgetragenen *P. aeruginosa* Zellen aus. Bei *P. aeruginosa* PAO1 ist diese Schwimmbewegung deutlich erkennbar. Die beiden Stämme *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) sind nicht mehr fähig, diese Schwimmbewegung auszubilden. Der komplementierte Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (*sprP+*) ist weitestgehend wieder in der Lage, die Schwimmbewegung auszubilden. Ein ähnliches Verhalten der verschiedenen Stämme konnte bezüglich des Schwärmverhaltens analysiert werden. Kennzeichnend für die Schwärbewegung ist die Ausbildung dendritischer Strukturen, die bei *P. aeruginosa* PAO1 sowie bei dem komplementierten Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (*sprP+*) zu erkennen waren. Die Deletionsmutante *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und die Leervektorkontrolle *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) hatten die Fähigkeit des Schwärmens verloren. Zuletzt wurde die *twitching motility* untersucht, die ebenfalls durch eine trübe Zone um die entstandene Bakterienkolonie zu identifizieren ist. Diese trübe Zone war bei *P. aeruginosa* vorhanden, bei den beiden Stämmen *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) war diese extrem reduziert. Ebenso wie die Schwimm- und Schwärbewegung konnte die *twitching motility* durch die

Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit dem Überexpressionsvektor pBBR*sprP* wieder hergestellt werden.

3.12 Die SprP-Aktivität ist Voraussetzung für die Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$

Bisher wurden alle analysierten Phänotypen erfolgreich durch die plasmidkodierte Expression des wildtypischen *sprP*-Gens komplementiert (3.11). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die plasmidkodierte Genexpression von SprP-Varianten die Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ herbeiführen kann. Die Komplementationsstudien wurden durchgeführt, um zu analysieren, ob die enzymatische Aktivität von SprP oder eine Domäne des Proteins wie die DUF die Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ erfolgreich herbeiführen kann. Es wurde bereits demonstriert, dass die konstruierten SprP-Varianten SprPE262A-FP, SprPH299A-FP, SprPS499A-FP, SprP Δ DUF-FP und SprP Δ S8-FP enzymatisch inaktiv sind (3.8; 3.9).

Ausgehend von dem Überexpressionsvektor pBBR*sprP* (Tab. 2.3) wurden mit geeigneten Oligonukleotiden (Tab. 2.6) mittels *QuikChange*[®] PCR (2.17.3) die verschiedenen Varianten für die Komplementationsstudien erzeugt. Die Komplementationsfähigkeit wurde exemplarisch im Hinblick auf die Zellaggregation (2.6) und die Biofilmproduktion analysiert (2.7).

Die qualitative Analyse der Zellaggregation der verschiedenen *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ wurde wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben durchgeführt, indem die Zellaggregation der Kulturen in Petrischalen gegen einen dunklen Hintergrund dokumentiert wurde (Abb. 3.33). Die qualitative Analyse zeigte, dass die Expression der verschiedenen *sprP*-Varianten nicht zur Komplementation des auftretenden Phänotyps führen. Ausschließlich die Expression des wildtypischen *sprP*-Gens führte die Komplementation herbei. Es konnte allerdings ein Unterschied in der Qualität der produzierten Zellaggregate beobachtet werden. So produzierte der Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit dem Plasmid pBBR*sprPS499A* wesentlich größere Zellaggregate im Vergleich zu den übrigen *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ -Stämmen. Die Zellaggregate von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit dem Plasmid pBBR*sprPS499A* zeigten die größte Ähnlichkeit zu *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Der Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit dem Plasmid pBBR*sprPE262A* bildete ebenfalls größere Aggregate. Im Kontrast dazu bildeten die *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ -Stämme mit den Plasmiden pBBR*sprPH299A*, pBBR*sprP Δ duf* und pBBR*sprP Δ s8* wesentlich kleinere Aggregate in größerer Zahl.

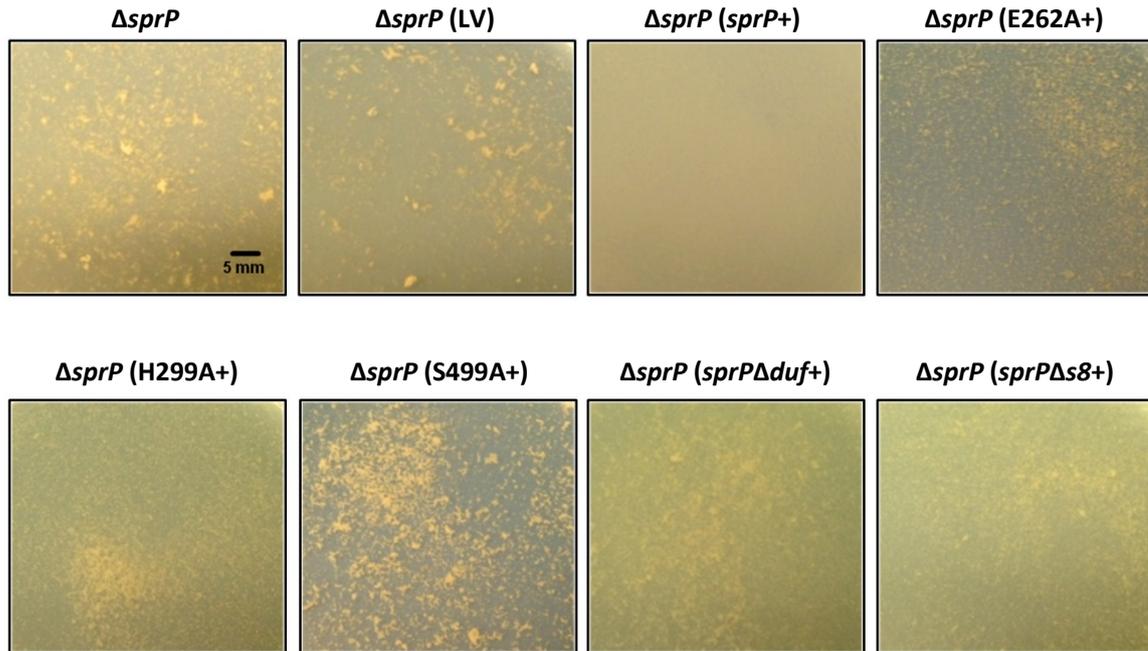


Abb. 3.33 Zellaggregation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ nach der Expression verschiedener *sprP*-Varianten. Verschiedene *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ -Hauptkulturen wurden im Hinblick auf die Zellaggregation während des Wachstums in Schüttelkolben untersucht. Zur Visualisierung der Aggregatbildung wurden die Flüssigkulturen in Petrischalen überführt und die Aggregatbildung dokumentiert. LV = pBBR1MCS, *sprP+* = Komplementation mit pBBR*sprP*, E262A+ = Expression mit pBBR*sprPE262A*, H299A+ = Expression mit pBBR*sprPH299A*, S499A+ = Expression mit pBBR*sprPS499A*, *sprP* $\Delta duf+$ = Expression mit pBBR*sprP* Δduf , *sprP* $\Delta s8+$ = Expression mit pBBR*sprP* $\Delta s8$.

Die Quantifizierung des Biofilms der verschiedenen *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ -Stämme erfolgte wie bereits in Kapitel 3.11.2 beschrieben. Die Messung der Biofilmproduktion ergab, dass alle getesteten *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ -Stämme im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 eine erhöhte Biofilmproduktion aufwiesen (Abb. 3.34). Die Stärke der Biofilmproduktion unterschied sich jedoch deutlich voneinander. *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) zeigten eine 4 - 5-fache Erhöhung der Biofilmproduktion und befinden sich somit in der Größenordnung, die für diese Stämme bereits analysiert wurde (3.11.2). Die Stämme *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit den Plasmiden pBBR*sprPE262A*, pBBR*sprP* $\Delta s8$ und pBBR*sprP* Δduf wiesen eine erhöhte Biofilmproduktion um den Faktor 3,8 - 4,5 auf. Für die beiden Stämme *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit dem Plasmid pBBR*sprPH299A* bzw. pBBR*sprPS499A* konnte eine extreme Erhöhung der Biofilmproduktion um den Faktor 110 bzw. 106 bestimmt werden. Die Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit dem Plasmid pBBR*sprP* wurde erneut erfolgreich herbeigeführt.

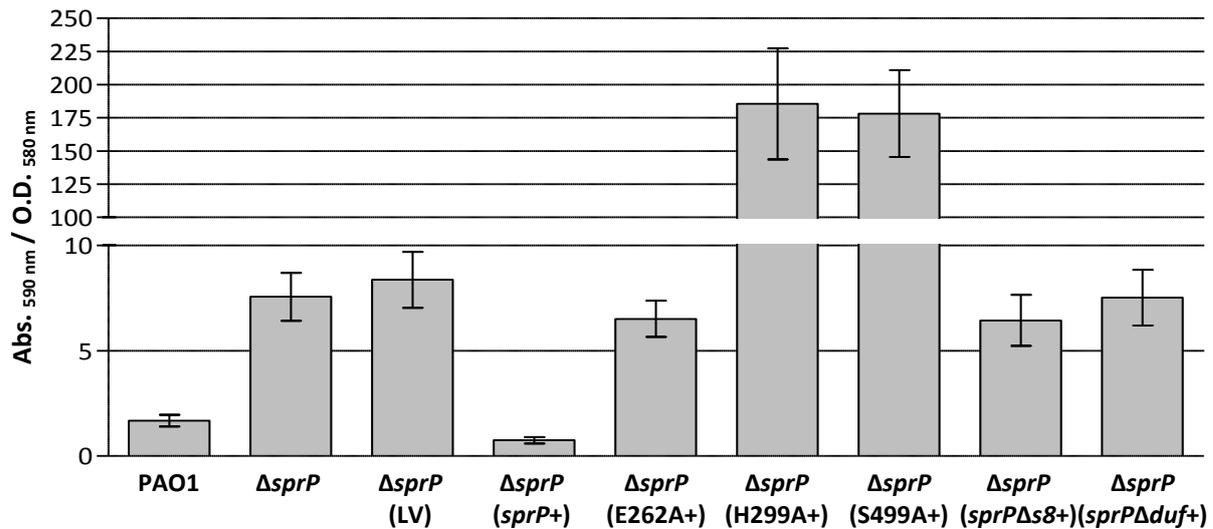


Abb. 3.34 Biofilmproduktion von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ nach der Expression verschiedener *sprP*-Varianten. Es wurde die Biofilmproduktion der verschiedenen Stämme nach 16 Stunden Inkubation mit dem Kristallviolett-Test quantifiziert (Abs. 590 nm) und mit der Zelldichte (O.D. 580 nm) normiert. Es sind die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechenden Standardabweichungen. LV = pBBR1MCS, *sprP*⁺ = Komplementation mit pBBR*sprP*, E262A⁺ = Expression mit pBBR*sprPE262A*, H299A⁺ = Expression mit pBBR*sprPH299A*, S499A⁺ = Expression mit pBBR*sprPS499A*, *sprP* Δduf ⁺ = Expression mit pBBR*sprP* Δduf , *sprP* $\Delta s8$ ⁺ = Expression mit pBBR*sprP* $\Delta s8$.

Die Deletion des *sprP*-Gens führte zu der Ausbildung starker Zellaggregate in Flüssigkulturen, zu einer erhöhten Biofilmproduktion und zu dem Verlust der Beweglichkeit von *P. aeruginosa*. Die plasmidkodierte Expression des wildtypischen *sprP*-Gens komplementierte die phänotypischen Änderungen von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Die Expression von Genen, die für proteolytisch inaktive SprP-Varianten und einzelne Domänen von SprP kodieren, konnten die Komplementation hingegen nicht herbeiführen.

3.13 Die *sprP*-Deletion führt zu zahlreichen Änderungen im Proteom von *P. aeruginosa*

Die Deletion des *sprP*-Gens in *P. aeruginosa* hat deutliche Auswirkungen auf die Phänotypen dieses Stammes. Es konnte bereits demonstriert werden, dass das Wachstumsverhalten (3.11.1), die Biofilmproduktion (3.11.2) und die Beweglichkeit (3.11.3) von *P. aeruginosa* Δ *sprP* im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 deutliche Änderungen aufweisen. Diese Phänotypen sind äußerst komplex und zahlreiche Gene sowie Proteine sind in *P. aeruginosa* an der Regulation dieser Phänotypen beteiligt^{118,354}. Nachfolgend wurden systembiologische Methoden verwendet, um die Beteiligung von SprP innerhalb dieser komplexen Regulation zu analysieren und somit die physiologische Funktion zu charakterisieren.

Zunächst wurde eine Proteomanalyse von *P. aeruginosa* Δ *sprP* im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt. Es wurden Hauptkulturen von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* Δ *sprP* bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,3 - 2,5 entspricht, kultiviert (2.4.3). Die Analyse des intrazellulären Proteoms und des extrazellulären Sekretoms dieser Stämme erfolgte mittels zweidimensionaler (2D) Gelelektrophorese (2.33). Anschließend wurden die 2D-Gele einer biologischen Dreifachbestimmung gemittelt und die gemittelten Triplikate von *P. aeruginosa* PAO1 im Vergleich zu den gemittelten Triplikaten von *P. aeruginosa* Δ *sprP* analysiert. Für die Auswertung wurden alle Proteine mit einer Änderung der relativen Proteinmenge von ≥ 2 und einem *p*-Wert $\leq 0,05$ ausgewählt. Unter diesen Voraussetzungen wurden 124 Proteine im intrazellulären Proteom und 205 Proteine im extrazellulären Sekretom identifiziert. Aus dieser Gesamtheit konnten ca. 100 Proteine aus den Gelen isoliert werden. Letztendlich konnten 32 verschiedene intrazelluläre Proteine (Abb. 3.35) und 16 verschiedene extrazelluläre Proteine (Abb. 3.36) mittels MALDI-TOF-MS (2.34) eindeutig identifiziert werden.

3.13.1 Quantitative Änderungen von Proteinen des Kohlenhydratmetabolismus

Zunächst wurden die intrazellulären Proteine von *P. aeruginosa* Δ *sprP* im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 analysiert. Dazu zählen die Proteine des Cytoplasma, des Periplasma und der beiden Membranen. Es konnten 32 verschiedene Proteine mittels MALDI-TOF-MS (2.34) eindeutig identifiziert werden (Tab. 8.2). Diese wurden in das fusionierte 2D-Gel bestehend aus allen sechs vorhandenen 2D-Gelen (dreimal *P. aeruginosa* PAO1 und dreimal *P. aeruginosa* Δ *sprP*) eingetragen (Abb. 3.35). Es wurde ein starker Kontrast für eine verbesserte Visualisierung auch kleiner *spots* eingestellt. Aus diesem Grund scheinen einige Protein-*spots* zu überlagern.

Für die Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF-MS (2.34) wurden nur Protein-*spots* verwendet, die klar definiert und von umliegenden *spots* abgegrenzt vorlagen.

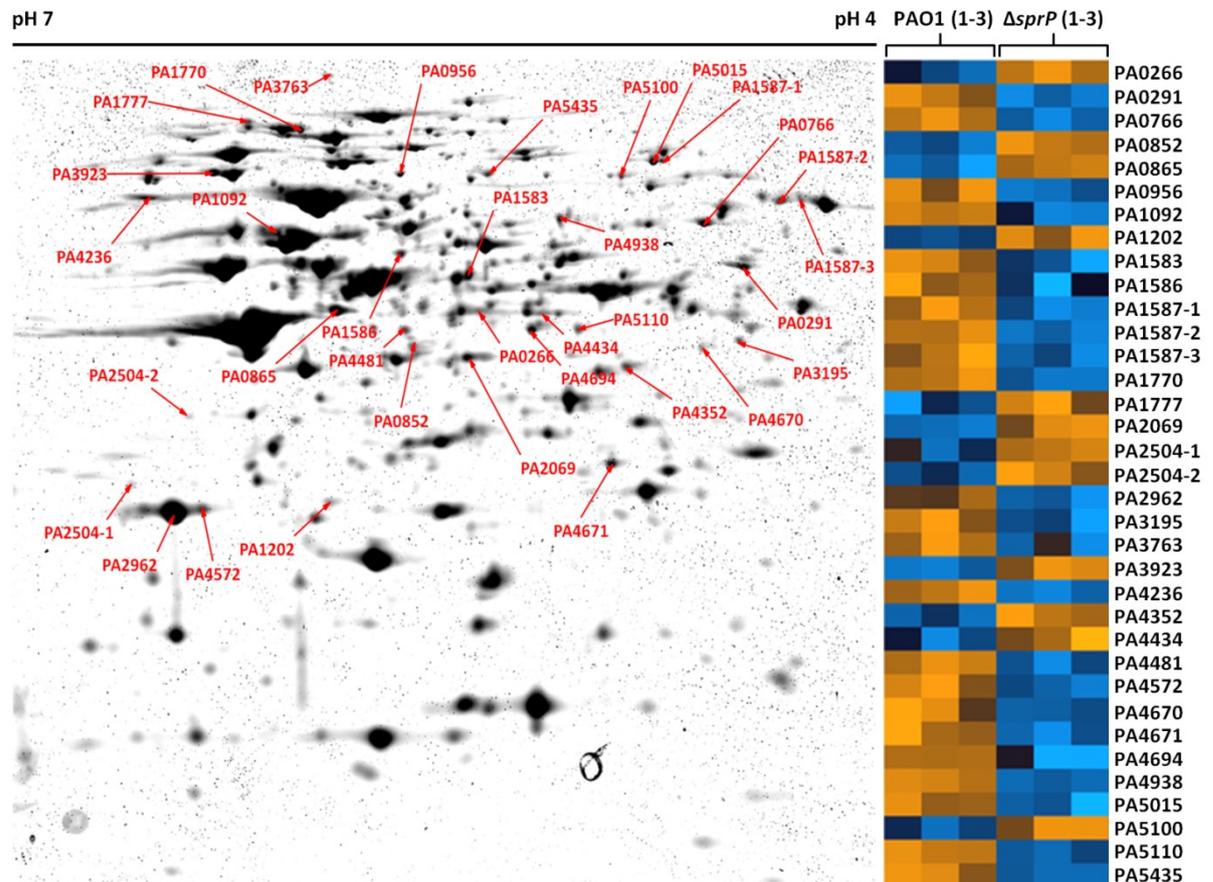


Abb. 3.35 2D-Gel des intrazellulären Proteoms und Darstellung der identifizierten Proteine mit Änderungen der relativen Proteinmenge. Es ist das 2D-Gel bestehend aus der biologischen Dreifachbestimmung von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ als fusioniertes Bild dargestellt (links). Es sind die Proteine (PA-Nummer) mit signifikanten Änderungen im Vergleich von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ zu *P. aeruginosa* PAO1 mit einem roten Pfeil markiert. Die entsprechenden Proteine wurden mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Die *heatmap* (rechts) veranschaulicht die Quantität jedes identifizierten Proteins in jedem der sechs analysierten 2D-Gele. Die blaue Färbung repräsentiert Proteine mit geringer Quantität, die orange Färbung repräsentiert Proteine mit hoher Quantität. Je heller die Färbung ist, desto größer bzw. geringer ist die Menge des jeweiligen Proteins.

Zu den Proteinen, die für die weiteren Untersuchungen und die Diskussion der Ergebnisse von Bedeutung sind, zählen u.a. die sechs Proteine PA1583 (Succinatdehydrogenase SdhA), PA1586 (Dihydrolipoyl-Transsuccinylase SucB), PA1770 (Phosphoenolpyruvat-Synthase PpsA), PA3195 (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapA), PA5015 (Pyruvatdehydrogenase AceE) und PA5110 (Fructose-1,6-bisphosphatase Fbp), die Teil des zentralen Kohlenhydratmetabolismus sind. Diese Proteine treten in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit verringerten relativen Proteinnengen auf. Weiterhin wurde das äußere Membranprotein PA1777 (OprF) mit einer erhöhten relativen Proteinmenge identifiziert, dem eine wichtige Funktion während des anaeroben Wachstums von

P. aeruginosa zukommt¹²⁷. Zudem wurde das Protein PA1092 (FliC), das als Flagellin ein bedeutender Bestandteil des Flagellums ist, mit verringerter relativer Proteinmenge identifiziert.

3.13.2 Quantitative Änderungen zahlreicher extrazellulärer Proteasen

Nach der Analyse des intrazellulären Proteoms wurden ebenfalls die extrazellulären Proteine von *P. aeruginosa* PAO1 im Vergleich zu *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ analysiert. Es konnten 16 verschiedene Proteine mittels MALDI-TOF-MS (2.34) identifiziert werden (Tab. 8.3). Die Auswertung der 2D-Gele sowie die Identifizierung der Proteine erfolgte identisch zu der Auswertung des intrazellulären Proteoms (3.13.1). Die identifizierten Proteine wurden in ein fusioniertes 2D-Gel eingetragen (Abb. 3.36).

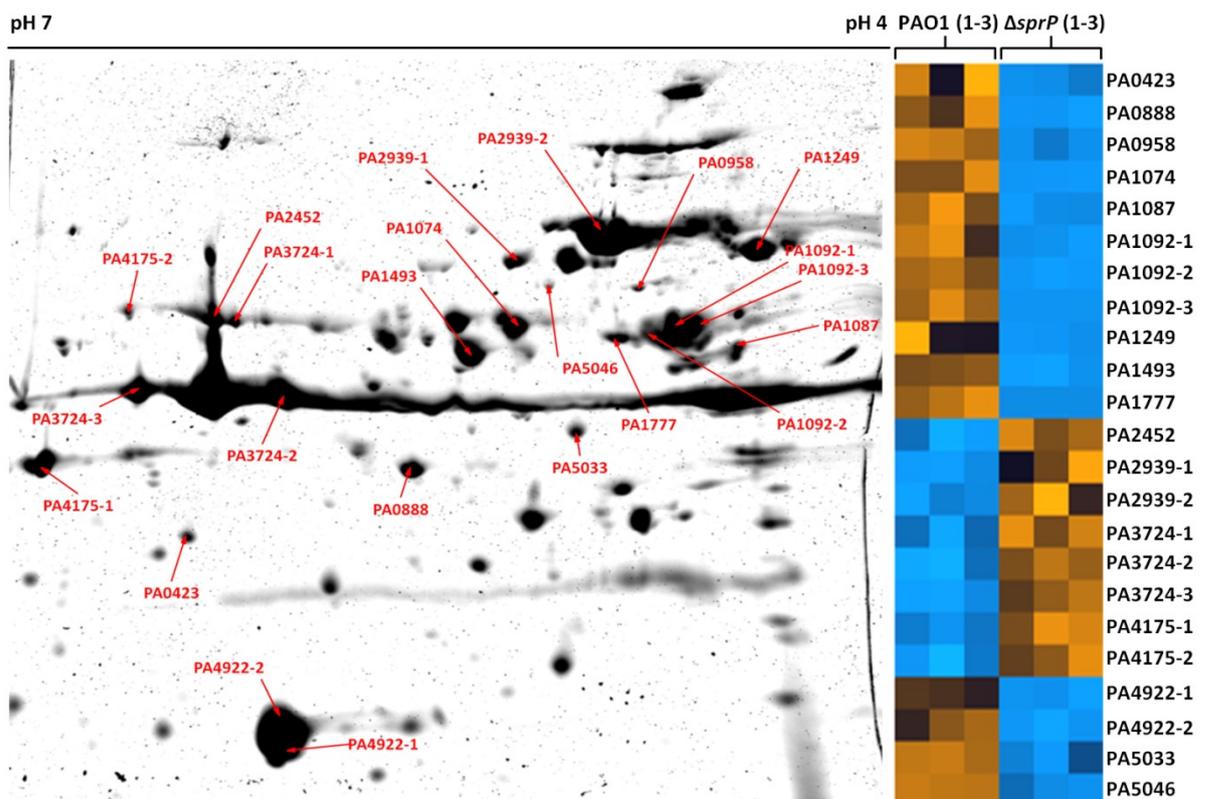


Abb. 3.36 2D-Gel des extrazellulären Sekretoms und Darstellung der identifizierten Proteine mit Änderungen der relativen Proteinmenge. Es ist ein fusioniertes 2D-Gel bestehend aus der biologischen Dreifachbestimmung von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ dargestellt (links). Die Proteine mit signifikanten Änderungen im Vergleich von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ zu *P. aeruginosa* PAO1 sind mit einem roten Pfeil und der entsprechenden PA-Nummer markiert. Die markierten Proteine wurden mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Die *heatmap* (rechts) veranschaulicht die Quantität jedes identifizierten Proteins innerhalb der sechs analysierten 2D-Gele. Die blaue Färbung repräsentiert Proteine mit geringer Quantität, die orange Färbung repräsentiert Proteine mit hoher Quantität. Je heller die Färbung ist, desto größer bzw. geringer ist die Menge des jeweiligen Proteins.

Unter den identifizierten Proteinen befinden sich u.a. zahlreiche Proteasen, die in *P. aeruginosa* bedeutende Virulenzfaktoren darstellen. Die Metalloprotease LasB (PA3724), die Serinprotease PIV (PA4175) und Protease PaAP (PA2939) wurden in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit erhöhter relativer Proteinmenge detektiert. Die Protease PASP (PA0423) und die alkalische Protease AprA (PA1249) wurden hingegen mit verringerter relativer Proteinmenge identifiziert.

Wie auch schon bei den intrazellulären Proteinen, wurde das äußere Membranprotein OprF identifiziert. Im Kulturüberstand wurde OprF mit verringerter relativer Proteinmenge identifiziert. Das Flagellenprotein FliC, das ebenfalls im intrazellulären Proteom identifiziert wurde, trat zudem mehrfach mit verringerter relativer Proteinmenge im extrazellulären Sekretom auf. Des Weiteren wurde das Protein PA1087 (FlgL) mit verringerter relativer Proteinmenge detektiert, das ebenfalls ein Bestandteil des Flagellums ist.

3.14 Die *sprP*-Deletion führt zu zahlreichen Änderungen im Transkriptom von *P. aeruginosa*

In Ergänzung zu der Proteomanalyse wurde das Transkriptom von *P. aeruginosa* untersucht. Aufgrund der hohen Sensitivität der DNA-Chip-Technology ist diese Methode besonders geeignet, um Auswirkungen der *sprP*-Deletion zu analysieren und weitere Effekte zu identifizieren, die auf eine Funktion des Proteins schließen lassen. Ausgewählte physiologische Auswirkungen durch Änderungen des relativen mRNA-Spiegels wurden anschließend mit entsprechenden physiologische Untersuchungen charakterisiert.

Für die Transkriptomanalyse wurden Hauptkulturen der beiden Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit einer Zelldichte, die einer $O.D._{580\text{ nm}} = 2,3 - 2,5$ entspricht, verwendet (2.4.3). Die Gesamt-RNA dieser Kulturen wurde isoliert (2.20) und 25 μg der isolierten Gesamt-RNA jedes Stammes für die Transkriptomanalyse eingesetzt (2.23). Es wurden ausschließlich die Gene mit einer Änderung des relativen mRNA-Spiegels von ≥ 2 sowie einem *p*-Wert von $\leq 0,05$ in mindestens drei unabhängigen Experimenten betrachtet. Unter diesen Bedingungen konnten 102 Gene identifiziert werden, die in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 einen verringerten relativen mRNA-Spiegel aufweisen (Tab. 8.4). Weiterhin wurden 116 Gene identifiziert, die in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 einen erhöhten relativen mRNA-Spiegel aufweisen (Tab. 8.5).

Aufgrund der großen Zahl von insgesamt 218 Genen mit Änderungen des relativen mRNA-Spiegels wurden zunächst die Genprodukte dieser Gene nach deren Funktion klassifiziert. Für die phylogenetische Klassifizierung wurden die COG (*Clusters of Orthologous Groups*)-Gruppen

verwendet, die prokaryotische Proteine nach ihrer Funktion in Gruppen einordnen^{355,356}. Die Zuordnung der Proteine in die verschiedenen COG-Gruppen wurde der *Pseudomonas* Datenbank entnommen¹⁶. Proteine, deren Funktion so spezifisch ist, dass diese keiner übergeordneten Gruppe zugeordnet werden konnten, wurden in der Gruppe „Spez.“ (Spezifisch) zusammengefasst (Abb. 3.37).

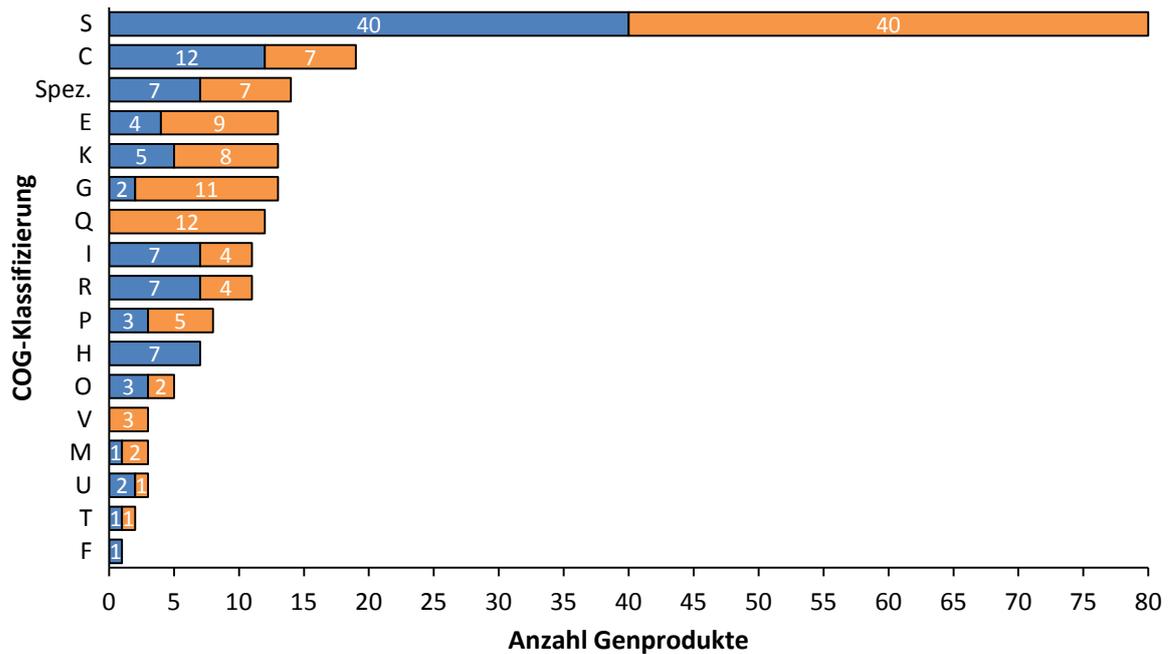


Abb. 3.37 COG-Klassifizierung aller Genprodukte, deren Gene veränderte relative mRNA-Spiegel aufweisen. Die Genprodukte aller Gene mit veränderten relativen mRNA-Spiegeln wurden nach deren Funktion in COG-Gruppen klassifiziert. Es sind alle Genprodukte dargestellt, deren kodierende Gene einen erhöhten relativen mRNA-Spiegel (Orange) bzw. einen verringerten relativen mRNA-Spiegel (Blau) aufweisen. Die Anzahl der Genprodukte ist innerhalb jeder Gruppe dargestellt. Die Klassifizierung erfolgt in die Gruppen: **C** = Energieproduktion und Umwandlung; **E** = Aminosäuretransport und Metabolismus; **F** = Nukleotidtransport und Metabolismus; **G** = Kohlenhydrattransport und Metabolismus; **H** = Koenzymtransport und Metabolismus; **I** = Lipidtransport und Metabolismus; **K** = Transkription; **M** = Zellwand/Membran/Hülle Biogenese; **O** = Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperone; **P** = Anorganischer Ionentransport und Metabolismus; **Q** = Sekundärmetabolite Biosynthese, Transport und Katabolismus; **R** = Allgemeine Funktion; **S** = Funktion unbekannt; **T** = Signalweiterleitung; **U** = Intrazellulärer Transport, Sekretion, Vesikeltransport; **V** = Abwehrmechanismen; Spez.: Genprodukte, die keiner übergeordneten Gruppe zugeordnet werden können.

Bei den Genen mit verringertem relativen mRNA-Spiegel befinden sich die Genprodukte PA4153, PA3328, PA1609 (FabB), PA0176 (Aer2), PA4525 (PilA) und PA5360 (PhoB) in der Gruppe „Spezifisch“. Bei den Genen mit erhöhtem relativen mRNA-Spiegel befinden sich die Genprodukte PA2158, PA5106, PA3478 (RhIB), PA2514 (AntC), PA2509 (CatB), PA2512 (AntA) und PA2388 (FpvR) in dieser Gruppe.

Insgesamt konnten die Genprodukte in 16 verschiedene COG-Gruppen für Prokaryoten eingeordnet werden. Die Funktion der meisten kodierten Proteine, mit jeweils 40 Vertretern, ist unbekannt (Gruppe S). Auf diese große Gruppe von Genprodukten mit unbekannter Funktion folgen zahlreiche Gruppen, deren Vertreter an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt sind. Diese Vielseitigkeit der identifizierten Effekte verdeutlicht, dass SprP in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert ist. Im Folgenden werden ausgewählte Gene mit veränderten relativen mRNA-Spiegeln und die physiologischen Konsequenzen dieser Änderungen genauer betrachtet.

3.14.1 Gene mit verringertem relativen mRNA-Spiegel beeinflussen die Denitrifikation von *P. aeruginosa*

Insgesamt konnten 102 Gene identifiziert werden, die in *P. aeruginosa* Δ sprP im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 einen verringerten relativen mRNA-Spiegel aufweisen (Tab. 8.4). Ausgewählte Gene, die für die nachfolgenden Untersuchungen und die Diskussion von Bedeutung sind, werden in Tab. 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1 Ausgewählte Gene mit verringerten relativen mRNA-Spiegeln in *P. aeruginosa* Δ sprP. Es sind die Gene dargestellt, deren Änderungsrate ≥ 2 , der *p*-Wert $\leq 0,05$ und die Änderung in mindestens drei biologischen Replikaten messbar war. Die Annotationen wurden aus der *Pseudomonas* Datenbank übernommen.

PA Nummer	Name	Änderungsrate	Produktname
PA0509	<i>nirN</i>	2,83	mutmaßliches <i>c</i> -Typ Cytochrom
PA0511	<i>nirJ</i>	2,11	Häm <i>d</i> ₁ -Biosynthese Protein NirJ
PA0514	<i>nirL</i>	2,45	Häm <i>d</i> ₁ -Biosynthese Protein NirL
PA0516	<i>nirF</i>	3,92	Häm <i>d</i> ₁ -Biosynthese Protein NirF
PA0519	<i>nirS</i>	5,00	Nitritreduktase NirS
PA3392	<i>nosZ</i>	14,53	Distickstoffmonoxidreduktase NosZ
PA3393	<i>nosD</i>	4,49	NosD Protein
PA3873	<i>narJ</i>	5,81	Nitratreduktase, delta Kette
PA3874	<i>narH</i>	3,51	Nitratreduktase, beta Kette
PA3875	<i>narG</i>	7,17	Nitratreduktase, alpha Kette
PA3876	<i>narK2</i>	5,93	Nitrit Extrusion Protein 2
PA3877	<i>narK1</i>	21,33	Nitrit Extrusion Protein 1
PA3912	-	5,74	konserviertes hypothetisches Protein
PA3913	-	6,44	mutmaßliche Protease
PA4525	<i>pilA</i>	2,53	Typ IV Fimbrien Vorläufer PilA

Von allen Genen mit einem verringerten relativen mRNA-Spiegel in *P. aeruginosa* Δ sprP wurde der größte Unterschied für das Gen *narK1* mit einer 21,3-fachen Änderung bestimmt. Das Gen *narK1* ist Teil des *nar*-Operons, das für die Nitratreduktase kodiert (Abb. 1.3). Die übrigen Gene

dieses Operons *narK2*, *narG*, *narH* und *narJ* wiesen ebenfalls einen verringerten relativen mRNA-Spiegel auf. Die Nitratreduktase ist Teil der Denitrifikation, die *P. aeruginosa* unter hypoxischen und anaeroben Bedingungen zur Energiegewinnung nutzen kann¹³⁸. Es wurden zudem weitere Gene der Denitrifikation identifiziert, die einen verringerten relativen mRNA-Spiegel in *P. aeruginosa* Δ *sprP* aufweisen. Zu diesen zählen die Gene *nirF*, *nirJ*, *nirL*, *nirN* und *nirS*, die Teil des *nir*-Operons sind, das für die Nitritreduktase kodiert, sowie die Gene *nosD* und *nosZ* des *nos*-Operons, das für die Distickstoffmonoxidreduktase kodiert (Abb. 1.3). Neben diesen Genen der Denitrifikation, wurden zwei weitere Gene mit verringerten relativen mRNA-Spiegeln identifiziert, die ebenfalls für das Wachstum unter anaeroben Bedingungen essenziell sind. Dabei handelt es sich um das Gen *pa3912*, das für ein hypothetisches Protein kodiert, und das Gen *pa3913*, das für eine mutmaßliche Protease kodiert³⁵⁷. Außerdem wurde das Gen *pilA* mit verringertem relativen mRNA-Spiegel identifiziert, das für das Typ IV-Pili Strukturprotein PilA kodiert.

3.14.1.1 Die Gene der Denitrifikation werden unter aeroben Bedingungen transkribiert

Die vergleichende Transkriptomanalyse zeigte, dass zahlreiche Gene der Denitrifikation einen verringerten relativen mRNA-Spiegel in *P. aeruginosa* Δ *sprP* aufweisen (3.14.1). Für die Transkriptomanalyse wurden Kulturen von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* Δ *sprP* verwendet, die unter aeroben Bedingungen in Schüttelkolben bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer $O.D._{580\text{ nm}} = 2,3 - 2,5$ entspricht, kultiviert wurden (2.4.3). Da die Gene der Denitrifikation in *P. aeruginosa* Δ *sprP* stark verringerte relative mRNA-Spiegel aufweisen, mussten diese Gene in *P. aeruginosa* PAO1 exprimiert worden sein, obwohl aerobe Bedingungen vorlagen. Aus diesem Grund wurden zunächst die Transkripte ausgewählter Gene der Denitrifikation in *P. aeruginosa* unter aeroben Bedingungen quantifiziert.

Die beiden Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* Δ *sprP* wurden unter den Bedingungen, die auch für die Transkriptomanalyse vorlagen, kultiviert (3.14). Die Stärke der Transkription ausgewählter Gene der Denitrifikation wurde unter diesen Bedingungen nach der Isolierung der Gesamt-RNA (2.20) mittels reverser Transkription (2.22) mit anschließender *real-time* PCR (2.17.4) quantifiziert. Für die Analyse wurde aus jedem betroffenen Operon der Denitrifikation das Gen mit der größten Änderung des relativen mRNA-Spiegels ausgewählt. Diese Gene sind *narK1*, *nirS* und *nosZ* (Tab. 3.1). Mit spezifischen Oligonukleotiden (Tab. 2.7) wurde zunächst die relative Quantifizierung (2.17.4.1) der Gene im Vergleich von *P. aeruginosa* Δ *sprP* zu *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt.

Die drei untersuchten Gene *nark1*, *nirS* und *nosZ* wiesen in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ signifikant geringere Transkriptmengen auf (Abb. 3.38 A). Diese deutlich verringerte Transkription wurde aufgrund der Transkriptomanalyse erwartet. Die Transkriptmenge des Gens *nark1* war in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ um den Faktor 31,7 geringer als in *P. aeruginosa* PAO1. Die Transkriptmenge des Gens *nirS* war um den Faktor 9,2 verringert und die des Gens *nosZ* um den Faktor 6,5.

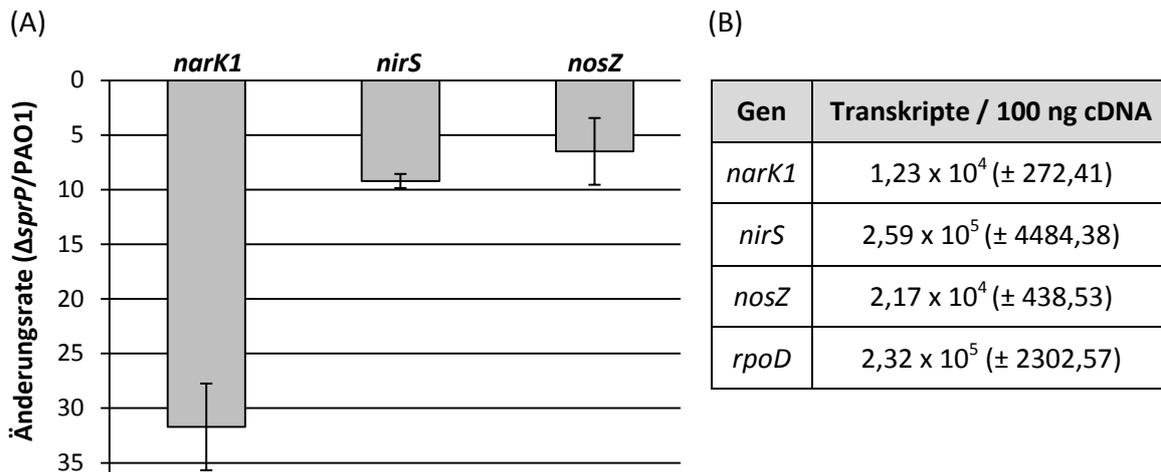


Abb. 3.38 Quantifizierung der *nark1*-, *nirS*- und *nosZ*-Transkription mittels *real-time* PCR. (A) Es sind die relativen Transkriptmengen der Gene *nark1*, *nirS* und *nosZ* von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Änderungsrate aufgetragen (x-fache Änderung). (B) Absolute Quantifizierung der Transkripte ausgewählter Gene in *P. aeruginosa* PAO1 unter aeroben Bedingungen bei Kultivierung in Schüttelkolben. Es sind die Transkripte der Gene *nark1*, *nirS*, *nosZ* und *rpoD* in 100 ng cDNA dargestellt. Die dargestellten Daten wurden aus biologischen Dreifachbestimmungen erhoben und die dazugehörigen Standardabweichungen sind dargestellt.

Weiterhin wurden in *P. aeruginosa* PAO1 die absoluten Transkripte der ausgewählten Gene unter aeroben Bedingungen bestimmt. Für diese Analyse wurde zunächst die Gesamt-RNA (2.20) von *P. aeruginosa* PAO1 isoliert. Anschließend wurde die reverse Transkription (2.22) der Gesamt-RNA durchgeführt und 100 ng der synthetisierten cDNA in eine *real-time* PCR (2.17.4) eingesetzt. Unter Verwendung geeigneter Standardgeraden konnte die Anzahl der Transkripte bestimmt werden (2.17.4.2). Als Referenz wurde ebenfalls die Transkripte des *housekeeping* Gens *rpoD* bestimmt.

Für das Gen *rpoD* konnten in 100 ng cDNA $2,32 \times 10^5$ Transkripte des Gens nachgewiesen werden (Abb. 3.38 B). Die Transkripte der Gene *nark1*, *nirS* und *nosZ* befinden sich in einer ähnlichen Größenordnung. Die größte Anzahl Transkripte konnte mit $2,59 \times 10^5$ Transkripte/100 ng cDNA für das Gen *nirS* bestimmt werden. Für die Gene *nark1* bzw. *nosZ* wurden $1,23 \times 10^4$ bzw. $2,17 \times 10^4$ Transkripte in 100 ng cDNA bestimmt. Diese Analyse verdeutlicht, dass die

untersuchten Gene in *P. aeruginosa* PAO1 bereits unter aeroben Bedingungen transkribiert werden.

3.14.1.2 *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ besitzt ein Wachstumsdefizit unter anaeroben Bedingungen

Nachdem sowohl die Transkriptomanalyse (3.14.1) als auch die Quantifizierung ausgewählter Gene der Denitrifikation (3.14.1.1) zeigte, dass die entsprechenden Gene deutlich verringert transkribiert werden, wurde untersucht, ob unter anaeroben Bedingungen tatsächlich ein Wachstumsdefizit messbar ist.

Die *P. aeruginosa*-Stämme wurden parallel unter aeroben (2.4.3) und anaeroben Bedingungen (2.4.4) kultiviert. Die Zelldichte der verschiedenen Stämme wurde nach drei, sechs und acht Stunden bestimmt (O.D. _{580 nm}). Über den Quotienten aus der Zelldichte unter aeroben und anaeroben Bedingungen (O.D. _{580 nm} aerob/O.D. _{580 nm} anaerob) wurde das Wachstumsdefizit unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen bestimmt.

Der größten Unterschiede konnten nach sechs Stunden Kultivierung bestimmt werden (Abb. 3.39). Für *P. aeruginosa* PAO1 wurde unter anaeroben Bedingungen ein um den Faktor 2,5 schlechteres Wachstum als unter aeroben Bedingungen bestimmt. *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ wies mit einem Faktor von 3,8 ein noch deutlicheres Wachstumsdefizit auf. Somit ist das Wachstum von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ unter anaeroben Bedingungen um den Faktor 1,3 geringer als das Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1. Der Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) zeigte im Vergleich zum *sprP*-defizienten Stamm ein geringfügig größeres Wachstumsdefizit. Durch die Komplementation mit dem Überexpressionsplasmid pBBR*sprP* konnte das Wachstumsdefizit reduziert werden.

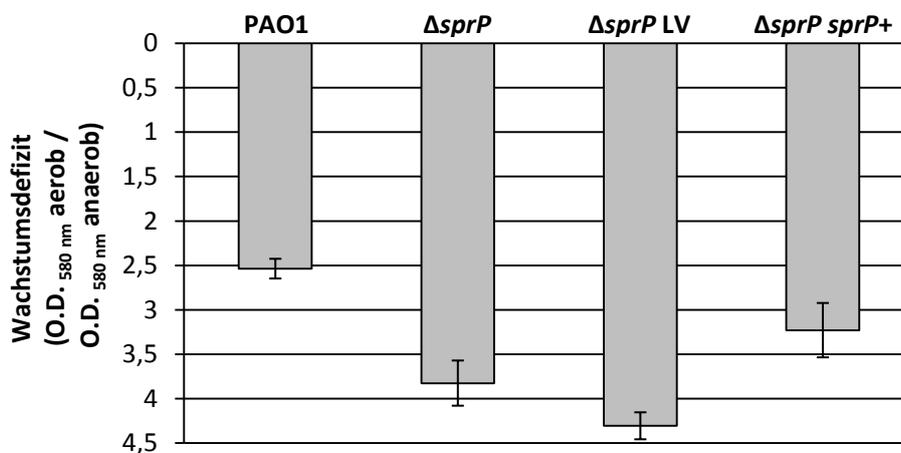


Abb. 3.39 Wachstumsdefizit von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen. Die verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme wurden sechs Stunden unter aeroben und anaeroben Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Zelldichte (O.D. _{580 nm}) der Kulturen bestimmt und der Quotient der Zelldichte unter beiden Bedingungen gebildet (aerobes Wachstum/anaerobes Wachstum). LV = pBBR1MCS, *sprP*+= Komplementation mit pBBR*sprP*.

3.14.1.3 Stickstoffmonoxid komplementiert die Zellaggregation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$

Ein Nebenprodukt der Denitrifikation ist Stickstoffmonoxid (NO; Abb. 1.3). Da vier der fünf Operons der Denitrifikation durch die Deletion von *sprP* betroffen sind und zahlreiche Gene dieses Prozesses einen verringerten relativen mRNA-Spiegel aufwiesen, wurde vermutet, dass die NO-Konzentration in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ ebenfalls reduziert ist. NO ist ein wichtiges Signalmolekül in *P. aeruginosa*, das u.a. an der Aggregat- und Biofilmauflösung beteiligt ist³⁵⁸. Im Folgenden wurde der NO-Donor Natrium-Nitroprussid (SNP) verwendet und untersucht, ob durch die Zugabe von SNP die Zellaggregate in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ aufgelöst werden können.

Eine Hauptkultur von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (2.4.3) wurde zum einen ohne Zugabe von SNP (Kontrolle) und zum anderen mit Zugabe von SNP in verschiedenen Konzentrationen bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,3 - 2,5 entspricht, kultiviert. Es wurden SNP-Endkonzentrationen von 50 μ M - 5 mM verwendet. Für geringe SNP-Endkonzentrationen konnte kein Effekt beobachtet werden. Der Zusatz von SNP in Konzentrationen oberhalb von 2 mM führte zum Sterben der Kulturen, da SNP hochkonzentriert toxisch ist³⁵⁹ (ohne Abbildung). SNP wurde in einer Endkonzentration von 2 mM als effektiv identifiziert. Für die Visualisierung der Zellaggregation wurden die Kulturen erneut in Petrischalen überführt (Abb. 3.40). Es ist zu erkennen, dass *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ die charakteristische Aggregatbildung aufwies. Die Zugabe von 2 mM SNP führte hingegen zu einer drastischen Reduzierung dieser Aggregatbildung. Es waren nur noch einige kleine Aggregate zu erkennen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Aggregatbildung von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ durch die Zugabe von SNP komplementiert werden kann.

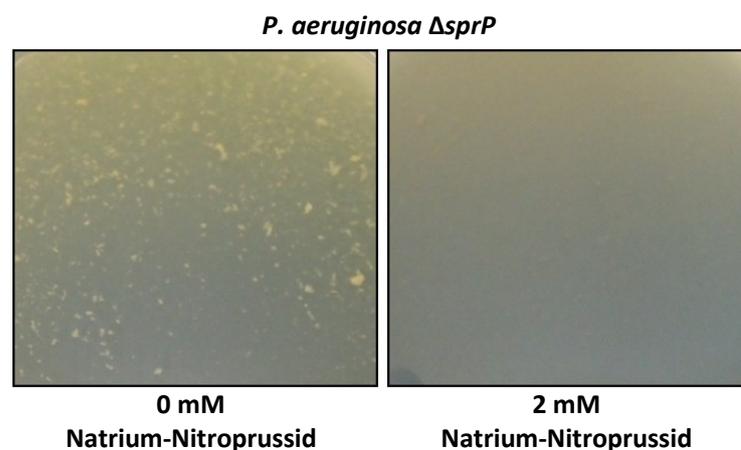


Abb. 3.40 Zellaggregation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ in LB-Medium mit und ohne Zugabe von Natrium-Nitroprussid. *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ -Hauptkulturen wurde in LB-Medium und LB-Medium mit 2 mM Natrium-Nitroprussid in Flüssigkulturen kultiviert. Zur Visualisierung der Zellaggregation wurden die Flüssigkulturen in Petrischalen überführt und die Aggregatbildung dokumentiert.

3.14.2 Gene mit erhöhtem relativen mRNA-Spiegel beeinflussen die Synthese von Sekundärmetaboliten

Es konnte für 116 Gene ein erhöhter relativer mRNA-Spiegel in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 nachgewiesen werden (Tab. 8.5). Von diesen 116 Genen sind ausgewählte Gene, die für die nachfolgenden Untersuchungen und die Diskussion von Bedeutung sind, in Tab. 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2 Ausgewählte Gene mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Es sind die Gene dargestellt, deren Änderungsrate ≥ 2 , der *p*-Wert $\leq 0,05$ und die Änderung in mindestens drei biologischen Replikaten messbar war. Die Annotationen wurden aus der *Pseudomonas* Datenbank übernommen.

PA Nummer	Name	Änderungsrate	Produktname
PA0169	<i>siaD</i>	2,07	Diguanylatzyklase SiaD
PA2386	<i>pvdA</i>	7,03	L-Ornithin N5-Oxygenase
PA2388	<i>fpvR</i>	2,02	FpvR
PA2394	<i>pvdN</i>	4,98	PvdN
PA2395	<i>pvdO</i>	4,25	PvdO
PA2398	<i>fpvA</i>	2,44	Ferripyoverdin Rezeptor
PA2403	-	2,00	hypothetisches Protein
PA2404	-	2,53	hypothetisches Protein
PA2405	-	2,30	hypothetisches Protein
PA2413	<i>pvdH</i>	2,09	L-2,4-Diaminobutyrat:2-Ketoglutarat 4-Aminotransferase, PvdH
PA2424	<i>pvdL</i>	2,77	PvdL
PA2426	<i>pvdS</i>	2,08	Sigmafaktor PvdS
PA2507	<i>catA</i>	16,83	Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase
PA2508	<i>catC</i>	20,04	Muconolacton-Deltaisomerase
PA2509	<i>catB</i>	9,98	Muconat-Cycloisomerase I
PA2511	<i>antR</i>	3,89	mutmaßlicher Transkriptionsregulator
PA2512	<i>antA</i>	44,76	Anthranilsäure-Dioxygenase, große Untereinheit
PA2513	<i>antB</i>	32,89	Anthranilsäure-Dioxygenase, kleine Untereinheit
PA2514	<i>antC</i>	27,55	Anthranilsäure-Dioxygenase-Reduktase
PA3478	<i>rhlB</i>	2,32	Rhamnosyltransferase B
PA3479	<i>rhlA</i>	2,32	Rhamnosyltransferase A
PA3622	<i>rpoS</i>	2,12	Sigmafaktor RpoS
PA4624	<i>cdrB</i>	4,06	cyclisches di-Guanosinmonophosphat reguliertes Zwei-Partner-Sekretionssystem, CdrB
PA4625	<i>cdrA</i>	3,27	cyclisches di-Guanosinmonophosphat reguliertes Zwei-Partner-Sekretionssystem, CdrA

Die größte Erhöhung des relativen mRNA-Spiegels wurde für das Gen *antA* nachgewiesen. Dieses Gen ist Teil des *antABC*-Operons. Die beiden Gene *antB* und *antC* des Operons wiesen ebenfalls erhöhte relative mRNA-Spiegel auf. Die Genprodukte des *antABC*-Operons sind Teil der Anthranilsäuredegradation in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa*^{360,361}. Die

Gene des *catBCA*-Operons sowie *antR* sind ebenfalls Bestandteil der Anthranilsäuredegradation³⁶² und von der *sprP*-Deletion betroffen.

Weiterhin konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die an der Pyoverdinsynthese und an der Regulation der Pyoverdinsynthese beteiligt sind. Zu diesen Genen gehören *fpvA*, *fpvR* und *pvdS* sowie die Pyoverdinsynthese-Gene *pvdA*, *pvdN*, *pvdO*, *pvdL* und *pvdH* (Abb. 1.4). Weiterhin wurden die Gene *pa2403*, *pa2404* und *pa2405* mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln identifiziert, die ebenfalls Teil des Pyoverdin-Locus sind. Diese Gene gehören zu dem *pa2403-10* Gen-Cluster, das für ein putatives ABC-Transportsystem sowie weitere putative cytoplasmatische Membranproteine kodiert^{153,363}.

Ebenfalls ein erhöhter relativer mRNA-Spiegel wurde für die Gene *rhIA* und *rhIB* bestimmt, die in einem Operon organisiert vorliegen. Diese Gene kodieren für die beiden Untereinheiten des Rhamnosyltransferase I Enzymkomplexes (RhIAB), der an der Synthese der Rhamnolipide beteiligt ist³⁶⁴. Die Expression des Gens *rpoS*, das für den Sigmafaktor RpoS kodiert, wurde ebenfalls mit einem erhöhtem relativen mRNA-Spiegel identifiziert. RpoS ist u. a. an der Regulation des *rhIAB*-Operons beteiligt^{109,110}.

Des Weiteren wurde das Gen *siaD*, das für die Diguanylatzyklase SiaD kodiert, und das *cdrAB*-Operon, das für ein Zwei-Partner-Sekretionssystem kodiert, mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln identifiziert. Die Diguanylatzyklase SiaD ist an der Synthese des sekundären Botenstoffes cyclisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) beteiligt³⁶⁵ und möglicherweise gemeinsam mit der Expression von *cdrAB* an Zellaggregation von *P. aeruginosa* in Flüssigkulturen beteiligt³⁶⁶.

3.14.2.1 *P. aeruginosa* Δ *sprP* weist eine erhöhte Rhamnolipidproduktion auf

Die Transkriptomanalyse zeigte, dass die beiden Gene *rhIA* und *rhIB* in *P. aeruginosa* Δ *sprP* einen erhöhten relativen mRNA-Spiegel aufweisen (Tab. 3.2). Nachfolgend wurde untersucht, ob dieser in *P. aeruginosa* Δ *sprP* zu einer verstärkten Rhamnolipidproduktion führt.

Für die Untersuchung der Rhamnolipide aus *P. aeruginosa* wurden entsprechende Hauptkulturen mit einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} = 2,3 - 2,5 entspricht, verwendet und anschließend die Rhamnolipide aus den Kulturüberständen extrahiert (2.36.1). Die Quantifizierung der extrahierten Rhamnolipide wurde mittels Orcinol-Test durchgeführt (2.36.2). Das Reaktionsprodukt des Orcinols und der Rhamnose kann bei der Wellenlänge $\lambda = 421$ nm bestimmt werden. Die Quantifizierung der Rhamnolipide in den verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen erfolgte anhand einer Standardreihe mit gereinigten Rhamnolipiden bekannter Konzentration (Abb. 3.41).

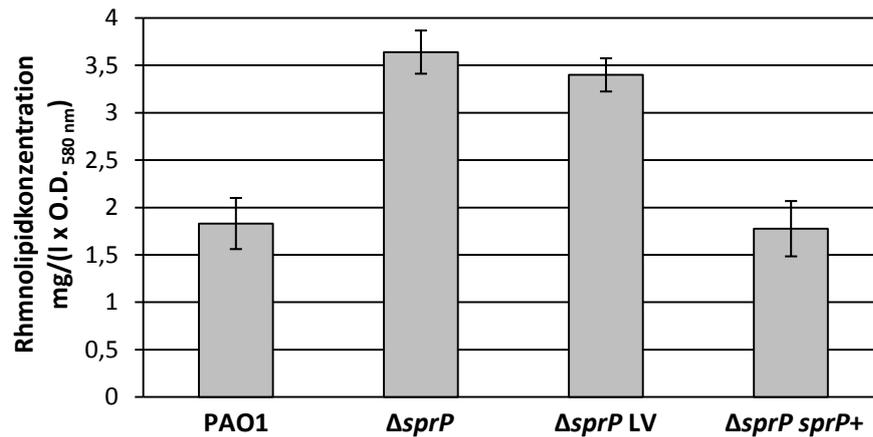


Abb. 3.41 Quantifizierung der Rhamnolipide mittels Orcinol-Test. Für die quantitative Analyse der extrahierten Rhamnolipide wurden diese mittels Orcinol-Test analysiert. Es wurde die Absorption bei einer Wellenlänge $\lambda = 421$ nm bestimmt. Die Konzentration der Rhamnolipide wurde über den Vergleich mit einer Standardgeraden ermittelt und mit der Zelldichte der Kulturen ($O.D._{580\text{ nm}}$) normiert. Die höchste Rhamnolipidkonzentration weist *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit $3,6 \text{ mg}/(\text{l} \times O.D._{580\text{ nm}})$ auf. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken stellen die dazugehörigen Standardabweichungen dar. LV = pBBR1MCS, *sprP+* = Komplementation mit pBBR*sprP*.

Die höchste Rhamnolipidkonzentration konnte für *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit $3,6 \text{ mg}/(\text{l} \times O.D._{580\text{ nm}})$ bestimmt werden. Für *P. aeruginosa* PAO1 wurde eine Rhamnolipidkonzentration von $1,8 \text{ mg}/(\text{l} \times O.D._{580\text{ nm}})$ ermittelt. Somit ist diese Konzentration um den Faktor 2 geringer als in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Die Leervektorkontrolle wies eine etwas geringere Rhamnolipidkonzentration auf, verhält sich im Rahmen der Standardabweichungen aber wie der *sprP*-defiziente Stamm. Die Komplementation mit dem Überexpressionsvektor pBBR*sprP* konnte erfolgreich herbeigeführt werden.

Für den qualitativen Nachweis der Mono- und Di-Rhamnolipide wurden $10 \mu\text{l}$ der extrahierten Rhamnolipide mittels Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert (2.36.3). Anhand eines Rhamnolipid-Standards, der gereinigte Mono- und Di-Rhamnolipide beinhaltet, wurden die entsprechenden Rhamnolipid-Spezies der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme nachgewiesen (Abb. 3.42).

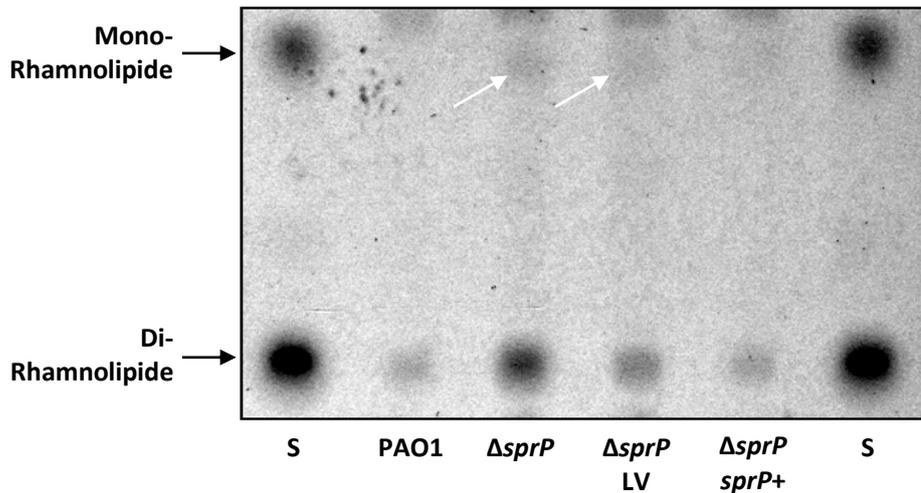


Abb. 3.42 Dünnschichtchromatographie zur Darstellung der Rhamnolipid-Spezies aus *P. aeruginosa*. Für die qualitative Analyse der Mono- und Di-Rhamnolipide von *P. aeruginosa* und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ wurden 10 μ l der extrahierten Rhamnolipide mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Mono-Rhamnolipide aus *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ LV sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Der Standard enthält beide Rhamnolipid-Spezies. S = Standard, LV = pBBR1MCS, *sprP+* = Komplementation mit pBBR*sprP*.

Im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 und dem komplementierten Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (*sprP+*) konnten bei *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und der Leervektorkontrolle intensivere Di-Rhamnolipid-spots nachgewiesen werden. Weiterhin konnten schwache Mono-Rhamnolipid-spots in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) nachgewiesen werden, die in *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (*sprP+*) nicht identifiziert werden konnten.

3.14.2.2 *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ weist eine erhöhte Pyoverdininproduktion auf

Für zahlreiche Gene der Pyoverdininproduktion wurde mittels Transkriptomanalyse ein erhöhter relativer mRNA-Spiegel nachgewiesen (Tab. 3.2). Nachfolgend wurde untersucht, ob dieser erhöhte relative mRNA-Spiegel physiologische Auswirkungen auf die Pyoverdininproduktion hat. Für die Messung der Pyoverdine in den *P. aeruginosa*-Überständen wurden zellfreie Überstände (2.25) von Hauptkulturen mit einer Zelldichte, die einer $O.D._{580\text{nm}} = 2,3 - 2,5$ entspricht, hergestellt (2.4.3). Anhand der starken Grünfärbung der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ und der Leervektorkontrolle wurde die verstärkte Pyoverdininproduktion bereits deutlich (Abb. 3.43 A). Die Kulturüberstände von *P. aeruginosa* PAO1 und dem komplementierten Stamm wiesen hingegen eine durch das LB-Medium entstehende Gelbfärbung auf. Pyoverdine fluoreszieren aufgrund ihrer Struktur bei Anregung mit UV Licht. Die Kulturüberstände der verschiedenen Stämme wurden im Verhältnis 1:1 mit A.dest. verdünnt und in eine Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Pyoverdine bei Anregung mit UV-Licht dokumentiert (Abb. 3.43 A). Es wurde besonders starke Fluoreszenz bei

P. aeruginosa $\Delta sprP$ und der entsprechenden Leervektorkontrolle erkennbar. Die Fluoreszenz von *P. aeruginosa* PAO1 und dem komplementierten Stamm war wesentlich geringer. Die beiden qualitativen Betrachtungen zeigten, dass die Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ durch die *sprP*-Expression möglich ist.

Die Quantifizierung der Pyoverdine im Überstand von *P. aeruginosa* wurde anschließend photometrisch durchgeführt (2.37). Die höchste Pyoverdinkonzentration mit $7,6 \mu\text{mol}/(\text{l} \times \text{O.D.}_{580 \text{ nm}})$ konnte für *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ bestimmt werden (Abb. 3.43 B). Im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 wies der *sprP*-defiziente Stamm somit eine 5,1-fach erhöhte Pyoverdinkonzentration auf. Für *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (LV) konnte ebenfalls eine erhöhte Pyoverdinkonzentration nachgewiesen werden, die etwas geringer war als die Konzentration von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Die Komplementation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit dem Überexpressionsvektor pBBR*sprP* reduzierte die Pyoverdinkonzentration deutlich.

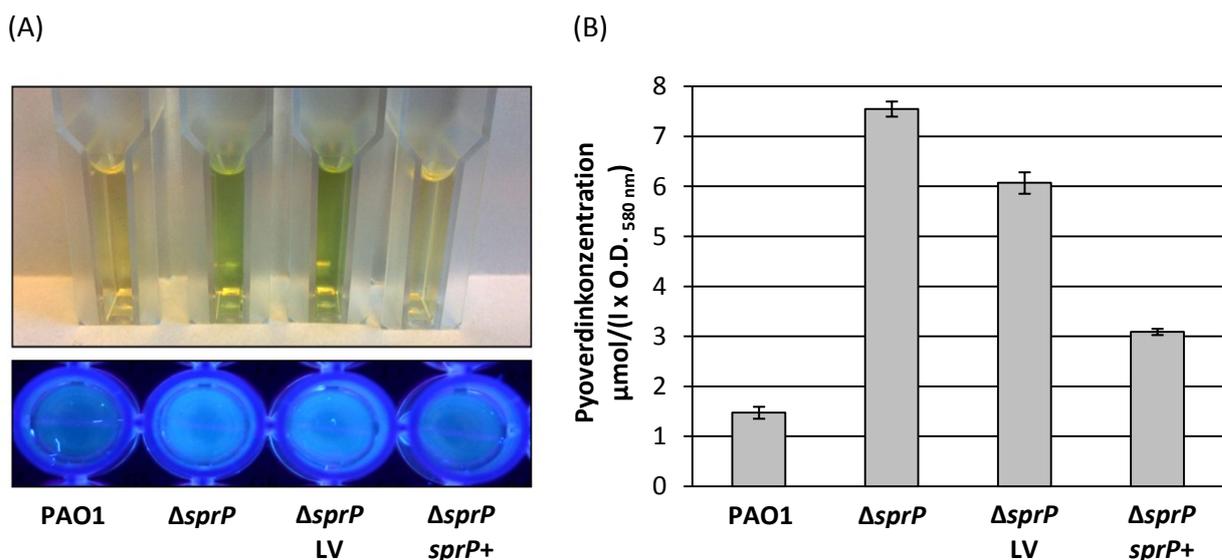


Abb. 3.43 Qualitative und quantitative Analyse der Pyoverdine verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme. (A) Die Pyoverdin-bedingte Grünfärbung der zellfreien Überstände wurde in Küvetten dokumentiert. Für die qualitative Analyse wurden zudem 50 μl des zellfreien Überstandes im Verhältnis von 1:1 mit A. dest. versetzt und die Fluoreszenz in einer Mikrotiterplatte bei Bestrahlung mit UV-Licht dokumentiert. (B) Für die quantitative Analyse der Pyoverdine wurde deren Absorption im zellfreien Überstand der Kulturen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 403 \text{ nm}$ bestimmt, die Stoffmengenkonzentration berechnet und mit der Zelldichte ($\text{O.D.}_{580 \text{ nm}}$) normiert. Der Stamm *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ besitzt mit $7,6 \mu\text{mol}/(\text{l} \times \text{O.D.}_{580 \text{ nm}})$ die höchste Pyoverdinkonzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken stellen die dazugehörigen Standardabweichungen dar. LV = pBBR1MCS, *sprP*+ = Komplementation mit pBBR*sprP*.

Mittels Proteomanalyse konnten 32 intrazelluläre und 16 extrazelluläre Proteine mit veränderten relativen Proteinmengen in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ identifiziert werden. Darunter sind u. a. sechs Proteine des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels und fünf sekretierte Proteasen. Die Transkriptomanalyse zeigte, dass die Deletion des *sprP*-Gens einen veränderten relativen mRNA-Spiegel von 218 Genen zur Folge hat. Ausgewählte physiologische Untersuchungen demonstrierten, dass durch die *sprP*-Deletion die Fähigkeit zum anaeroben Wachstum reduziert ist und Rhamnolipide sowie Pyoverdine verstärkt produziert werden.

4 Diskussion

P. aeruginosa ist ein ubiquitäres, äußerst vielseitiges Bakterium, das aufgrund seines Potenzials zur Produktion von Enzymen und Metaboliten sowie seiner humanpathogenen Eigenschaften von übergeordnetem Interesse ist. Für die industrielle Biotechnologie ist *P. aeruginosa* u. a. wegen der sekretierten Lipase als potenziellem Biokatalysator und den sekretierten Rhamnolipiden, die hervorragende Eigenschaften als Biotenside besitzen, interessant^{17,20-22}. Aus medizinischer Sicht ist *P. aeruginosa* ein bedrohlicher Erreger, der insbesondere für die Infektion des respiratorischen Traktes verantwortlich ist und gegen zahlreiche antimikrobielle Maßnahmen resistent ist oder Resistenzen entwickeln kann^{28,31,32}. Infolgedessen besteht ein enormes wissenschaftliches, ökonomisches und medizinisches Interesse, die molekularen Eigenschaften dieses Erregers verstehen zu wollen. *P. aeruginosa* besitzt eine Vielzahl intrazellulärer und extrazellulärer Proteasen. Insbesondere die hohe Zahl sekretierter Proteasen, die bedeutende Virulenzfaktoren des Bakteriums darstellen, wurden intensiv studiert⁴². In den vergangenen Jahren wurde der Einfluss bekannter intrazellulärer Proteasen auf die Physiologie von *P. aeruginosa* deutlich²⁵⁰.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der Subtilase SprP aus *P. aeruginosa*, die bislang weitestgehend unerforscht ist. Auch SprP-ähnliche Subtilasen, die fast ausschließlich in Pseudomonaden existieren, wurden bislang nicht näher untersucht und werden am Beispiel von SprP hier erstmals charakterisiert. Das Augenmerk lag zunächst auf der rekombinanten Produktion von SprP und der anschließenden Bestimmung biochemischer Eigenschaften. Des Weiteren lag der Fokus auf der funktionellen Charakterisierung der Subtilase in *P. aeruginosa*. Pleiotrope Effekte durch die Deletion von *sprP* wurden umfassend untersucht und auf diese Weise erstmals systematisch der Einfluss einer Protease auf das Regulationsnetzwerk von *P. aeruginosa* demonstriert.

4.1 Produktion, Reinigung und Prozessierung der Subtilase SprP

Subtilasen weisen in der Regel eine Multidomänenstruktur auf. Diese setzt sich meist aus der katalytischen Domäne, einem Propeptid und eventuell weiteren Domänen zusammen^{190,196}. In der Aminosäuresequenz von SprP konnten durch Homologievergleiche vier verschiedene Domänen identifiziert werden (Abb. 3.1). Es wurde eine Peptidase S8-Domäne identifiziert, die am C-Terminus lokalisiert und charakteristisch für Subtilasen ist. Aufgrund dieser Domäne wird SprP in der MEROPS-Datenbank der Peptidase S8-Familie, im Clan SB der Serinproteasen,

zugeordnet¹⁶⁵. Auch die Suche nach SprP-homologen Proteinen unter Berücksichtigung von Sekundärstrukturelementen mittels *Phyre*² zeigte, dass SprP die größte Homologie zu Subtilasen aufweist. Anhand dieser Homologie war es möglich, eine 3D-Strukturvorhersage der Peptidase S8-Domäne zu erstellen (Abb. 3.2).

Innerhalb der SprP-Sequenz wurden weiterhin eine DUF und ein nicht-konservierter Bereich am C-Terminus des Proteins identifiziert, die keinerlei Homologien zu bekannten Proteinsequenzen oder Proteindomänen aufweisen. Auffällig ist insbesondere die Größe der DUF mit über 200 AS. Homologievergleiche zeigten, dass dieser Bereich signifikante Homologien zu hypothetischen Proteinen und putativen Subtilasen aufweist, die fast ausschließlich aus der Gattung *Pseudomonas* stammen (3.1.2). Zu diesen Organismen zählen *P. alcaliphila*, *P. mendocina*, *P. fluorescens*, *P. brassicacearum*, *P. poae*, *P. putida*, *P. fulva*, *P. viridiflava* und *P. stutzeri*. Die drei einzigen Ausnahmen stellen hypothetische Proteine und putative Subtilasen aus der Gattung *Halomonas* dar. Diese Bakterienstämme werden ebenso wie *Pseudomonas* der Klasse der γ -*Proteobacteria* zugeordnet. In der weiteren Systematik wird *Halomonas* der Ordnung *Oceanospirillales* sowie der Familie der *Halomonadaceae* zugewiesen und unterscheidet sich somit von *Pseudomonas*. Bakterien der Gattung *Halomonas* sind halophile Bakterien, die fähig sind, bei Salzkonzentrationen von 0 - 30 % NaCl zu leben³⁶⁷. Weiterhin sind diese in der Lage, bei pH-Werten von 5 - 11 und Temperaturen von 0 - 45 °C zu existieren³⁶⁸. Zudem sind die Bakterien durch eine peritriche Begeißelung beweglich³⁶⁹, sie können mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor anaerob wachsen³⁷⁰ und einige Vertreter der Gattung *Halomonas* zeigen humanpathogenes Potenzial³⁷¹. Diese vielseitigen Bakterien besitzen somit einige physiologische Gemeinsamkeiten mit *P. aeruginosa*. Die Homologievergleiche lassen vermuten, dass der DUF eine spezifische Funktion für Proteasen der Subtilase-Familie zukommt. Weiterhin könnten diese Proteine, wegen der weiten Verbreitung innerhalb der Gattung *Pseudomonas*, besondere Relevanz für Pseudomonaden haben. Eine potenzielle Funktion konnte der DUF aufgrund der Sequenzvergleiche nicht zugeordnet werden. Es ist allerdings bekannt, dass Subtilasen meist ein Propeptid besitzen, das als intramolekulares Chaperon fungiert³⁷². Vermutlich kommt der DUF eine solche Funktion als intramolekulares Chaperon zu. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Domäne wie ein klassisches Propeptid im Zuge der SprP-Prozessierung abgespalten wird (Abb. 4.1) und ihre Deletion zur Inaktivierung von SprP führt (Abb. 3.22).

Am N-Terminus der Aminosäuresequenz von SprP wurde eine Typ I-Signalsequenz identifiziert, die in den meisten Fällen von der Signal-Peptidase I bei dem Transport über die cytoplasmatische Membran abgespalten wird. In einigen Fällen wird die Signalsequenz nicht abgespalten und fungiert somit als Membrananker für innere Membranproteine³⁷³. Für SprP

wird weder eine außerordentliche Hydrophobizität noch offensichtliche Transmembrandomänen vorhergesagt, dennoch wurde das durch den ORF *pa1242* (*sprP*) kodierte Protein in der Arbeit von Blonder *et al.*³³¹ mittels LC-MS/MS in den isolierten Membranen von *P. aeruginosa* identifiziert. Nach dem Transport von SprP über die cytoplasmatische Membran liegt das Protein vermutlich als peripheres Membranprotein assoziiert mit der cytoplasmatischen Membran vor. Die Signalsequenz wird für das aktive SprP voraussichtlich nicht als Membrananker fungieren, da durch die Prozessierung von SprP die DUF und damit auch die Signalsequenz abgespalten wird (Abb. 4.1). Aus diesem Grund kann es sich bei SprP voraussichtlich nur um ein peripheres Membranprotein handeln. In dieser Arbeit wurde versucht, die Lokalisierung von SprP mit synthetisierten SprP-spezifischen Antikörpern aufzuklären. Erste Experimente stimmen mit den Ergebnissen der Lokalisierung innerhalb der Membranen von *P. aeruginosa* überein (ohne Abbildung).

Für die Charakterisierung der Subtilase SprP ist es erforderlich, dass SprP in ausreichenden Mengen in aktiver Form zur Verfügung steht. Im Verlauf der homologen und heterologen Expressionsstudien von *sprP* wurde eine hohe Präferenz für die Bildung von *inclusion bodies* nachgewiesen (Abb. 3.3), die häufig bei der rekombinanten Produktion von Membranproteinen auftritt²⁵⁷. Als Expressionsstämme wurden die Stämme *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* JM109(DE3), *E. coli* C43(DE3), *P. aeruginosa* PABST7.1, *P. putida* KT2440T7 und *B. glumae* PGT7*lacI* verwendet. Nach erfolgter Überexpression von *sprP* zeigte die Löslichkeitsanalyse der Proteine, dass produziertes SprP, sobald dieses mittels SDS-PAGE-Analyse nachweisbar war, unter allen getesteten Bedingungen in unlöslichen *inclusion bodies* akkumulierte. Auch die zellfreie *sprP*-Expression mit dem CECF-Verfahren³³³ führte zur Bildung von *inclusion bodies* (Kooperation mit Dr. Frank Bernhard, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main; ohne Abbildung). *Inclusion bodies* sind komplexe Aggregate rekombinanter Proteine, die häufig als Stressantwort auf eine starke Genexpression durch ein Ungleichgewicht von Proteinaggregation und Proteinsolubilisierung gebildet werden^{374,375}. Bislang konnte nicht geklärt werden, ob die Bildung der *inclusion bodies* passiv, durch die Interaktion hydrophober Proteinbereiche des rekombinanten Proteins, oder aktiv, durch *inclusion body*-fördernde Mechanismen des Expressionsstammes, gebildet werden³⁷⁶. Die Produktion heterologer Proteasen stellt für bakterielle Zellen generell ein großes Risiko dar, da unkontrollierte Proteaseaktivität zum Zelltod führen kann^{377,378}. Daher ist es denkbar, dass die SprP-Produktion in löslicher Form und in größeren Mengen aktiv unterbunden wird. Allerdings akkumuliert SprP auch unter zellfreien Bedingungen in *inclusion bodies*. Dieses Ergebnis deutet an, dass vermutlich hydrophobe

Domänen oder Bereiche innerhalb des Proteins an weitere synthetisierte SprP-Proteine binden und auf diese Weise Proteinaggregate gebildet werden. Des Weiteren führte auch die Expression einzelner Bereiche des Gens, die für SprP Δ DUF bzw. SprP Δ S8 kodieren (Abb. 3.4) und die Expression des Gens, das für SprPS499A kodiert (ohne Abbildung) in *E. coli* BL21(DE3) zur Bildung von *inclusion bodies*. Da diese SprP-Varianten nachweislich proteolytisch inaktiv sind (Abb. 3.21; Abb. 3.22), stützen diese Ergebnisse die Vermutung, dass die Bildung der *inclusion bodies* aufgrund der Protein-Eigenschaften entstehen, unabhängig von der Proteaseaktivität.

Um die SprP-Produktion in einem löslichen und stabilen Zustand dennoch zu erzielen, wurde ein neuartiges Expressionssystem verwendet, das die diskutierten Ursachen für die Bildung von *inclusion bodies* vermeiden kann. Bei diesem Expressionssystem wird SprP mithilfe des HlyA T1SS aus dem Produzenten in den Kulturüberstand sekretiert²⁷⁰. Damit SprP als Substrat für das T1SS verwendet werden kann, wurde SprP mit HlyA1 fusioniert (Abb. 3.5). Bei simultaner Expression der Gene für dieses SprP-Fusionsprotein und der Gene für den Transportkomplex ermöglicht das System den einstufigen Transport des Fusionsproteins über beide Membranen in den Überstand von *E. coli*. Dieses System hat den entscheidenden Vorteil, dass transportierte Fusionsproteine unmittelbar aus dem intrazellulären Raum in den extrazellulären Raum transportiert werden. Hier unterliegen diese anders als im Zellinneren keiner räumlichen Begrenzung, ein Umstand, der die Bildung von *inclusion bodies* verhindert und eine Faltung in eine lösliche, stabile Konformation offensichtlich begünstigt. Außerdem besteht für die Zelle nicht die Gefahr der unkontrollierten intrazellulären Proteaseaktivität durch SprP. Diese Vorteile ermöglichten es schließlich, SprP erstmals in löslicher und aktiver Form zu produzieren (Abb. 3.6).

Das sekretierte SprP-Fusionsprotein wurde anschließend aus dem *E. coli*-Überstand isoliert. Dieses verfügt über einen internen Histidin-*tag*, der aufgrund der räumlichen Proteinstruktur möglicherweise schlechter zugänglich ist als terminale Fusionen. Aus diesem Grund wurde eine *batch*-Reinigung verwendet, die schließlich die erfolgreiche Reinigung des sekretierten SprP-Fusionsproteins ermöglichte (Abb. 3.7). Die Bindung des Fusionsproteins an die Ni-NTA Agarose war wie vermutet nicht sehr effektiv, da sich ebenfalls gewisse Mengen des SprP-Fusionsproteins in den Fraktionen des Durchlaufes und der beiden Waschschriffe befanden. Dennoch konnte das SprP-Fusionsprotein mit den hier optimierten Expressionsbedingungen und der etablierten Reinigungsmethode in einer Konzentration von ca. 6 mg/l gereinigt werden. Die erzielte Konzentration liegt oberhalb der Konzentration von 1 mg/l für eine Variante des Proteins IFABP (intestinales Fettsäure-bindendes Protein), das mit dem Vorgängersystem des hier verwendeten HlyA T1SS gereinigt werden konnte³⁷⁹.

Neben dem SprP-Fusionsprotein wurde zudem das *E. coli*-Protein OmpF im Kulturüberstand einiger Expressionskulturen identifiziert (Abb. 3.7; Abb. 3.22). OmpF ist ein Porin der äußeren Membran, das kein Bestandteil des eingebrachten T1SS darstellt. Dieses Porin ist für die passive Aufnahme hydrophiler Moleküle zuständig und wird bei hohen Zelldichten von *E. coli* auch in den Überstand sekretiert³⁸⁰. Die erreichten Zelldichten der Expressionskulturen sind offenbar ausreichend, um die Sekretion des OmpF-Proteins zu induzieren. Das sekretierte OmpF konnte durch das etablierte Protokoll für die Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem *E. coli*-Überstand zuverlässig entfernt werden.

Nach der erfolgreichen Reinigung des SprP-Fusionsproteins aus dem Überstand von *E. coli* wurde die proteolytische Aktivität des Proteins analysiert (Abb. 3.8). Interessanterweise konnte für das SprP-Fusionsprotein unmittelbar nach der Reinigung keine Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Proteine, die über das T1SS sekretiert werden, erreichen den extrazellulären Raum vermutlich in einer ungefalteten Form^{379,381}. Da Subtilasen zudem als Zymogene synthetisiert werden, wurde vermutet, dass zunächst die Reifung des SprP-Fusionsproteins durch die Faltung und die Prozessierung stattfinden muss, um diese zu aktivieren. Da die autokatalytische Prozessierung von Subtilasen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stattfinden kann^{340,372}, wurde das SprP-Fusionsprotein mehrere Tage bei 8 °C inkubiert. Es konnte eine Zunahme der Aktivität im Verlauf dieser Inkubation nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Demzufolge ist die Aktivierung der Subtilase SprP *in vitro* möglich. Im Folgenden wird das SprP-Fusionsprotein, also die inaktive Vorstufe der Subtilase SprP, als Vorläufer-SprP und das aktive Enzym als SprP bezeichnet.

Parallel zu dieser Untersuchung wurde analysiert, ob die Aktivierung des Vorläufer-SprP durch bereits aktive Subtilase SprP induziert werden kann. Es wurde Vorläufer-SprP mit aktivem SprP, dessen eigene Aktivität nicht weiter anstieg, gemischt. Das Gemisch wurde erneut bei 8 °C inkubiert und die Proteaseaktivität dieses Ansatzes an mehreren Tagen bestimmt (Abb. 3.9). Erneut konnte eine Zunahme der Proteaseaktivität mit steigender Inkubationszeit beobachtet werden. Nach einer Inkubation von zehn Tagen wurde durch das Mischen von Vorläufer-SprP und SprP im Vergleich zu der Aktivierung des Vorläufer-SprP alleine (Abb. 3.8) eine Aktivitätssteigerung von ca. 59 % erzielt. Somit induziert bereits aktives SprP die Aktivierung des Vorläufer-SprP.

Dass die Zunahme der SprP-Aktivität ein Resultat der SprP-Prozessierung ist, konnte mittels SDS-PAGE-Analyse einer aktiven SprP-Probe nachgewiesen werden. Das SDS-Gel zeigte zahlreiche Proteinfragmente verschiedenen Molekulargewichtes, u. a. auch ein Protein, dessen Molekulargewicht größer ist als das Vorläufer-SprP (Abb. 3.10). Dabei handelt es sich vermutlich um eine Verunreinigung, die bei der Proteinreinigung aufgetreten ist und erst durch das

Konzentrieren der Proteine mittels TCA-Präzipitation auf dem SDS-Gel sichtbar wurde. Der Vergleich dieser zahlreichen Proteinfragmente mit der einzelnen Proteinbande des Vorläufer-SprP unmittelbar nach der Reinigung (Abb. 3.7) veranschaulicht deutlich, dass die Prozessierung des Vorläufer-SprP stattfindet.

Insgesamt demonstrieren diese Ergebnisse zum einen, dass die Aktivierung des Vorläufer-SprP mittels autokatalytischer Prozessierung stattfindet, und zum anderen, dass die Aktivierung von Vorläufer-SprP durch die Zugabe von aktivem SprP beschleunigt werden kann. Somit wurde erstmalig gezeigt, dass der klassische Aktivierungsmechanismus der Subtilasen auch bei SprP stattfindet. Dem Propeptid der Subtilasen kommt im Verlauf der Prozessierung eine bedeutende Rolle zu. Im Allgemeinen fungiert dieses als intramolekulares Chaperon und reguliert die proteolytische Aktivität, da es als Inhibitor wirken kann. Das Propeptid kann auch dann noch inhibierend wirken, wenn es nach der gezielten Proteolyse nicht mehr kovalent an das Enzym gebunden ist³⁸². Somit hängt die Geschwindigkeit der Subtilase-Aktivierung auch von der Geschwindigkeit der Protease ab, mit der diese das Propeptid degradiert. Im Fall von SprP dauert dieser Aktivierungsprozess unter den gewählten Bedingungen mehrere Tage. Das ist vergleichsweise langsam, da z. B. die Aktivierung von Subtilisin innerhalb von Minuten stattfinden kann²⁰⁶. Die Zugabe von aktivem SprP scheint genau diesen Prozess zu beschleunigen. SprP könnte dabei zwei Funktionen übernehmen. Es könnte einerseits das Propeptid des inaktiven Vorläufer-SprP abspalten oder andererseits das bereits entlassene Propeptid, das bis zu dessen Degradation als Inhibitor wirkt, degradieren. Diese Prozessierung durch typgleiche, aktive Proteasen wurde anhand von Subtilisin bereits demonstriert und wird als „*trans* Degradation“ bezeichnet²⁰⁶.

Es wurde versucht, die Aktivierung des Vorläufer-SprP zu beschleunigen. Zum einen wurde das Vorläufer-SprP bei Temperaturen von 20 °C bzw. 37 °C für verschiedene Zeiträume inkubiert. Zum anderen wurde das Vorläufer-SprP mit Faktor Xa Protease zur Abspaltung des HlyA1 über die inserierte Schnittstelle für Faktor Xa behandelt, um zu untersuchen, ob das Sekretionssignal inhibierende Wirkung besitzt. Mit diesen Ansätzen konnte die Reifung des Vorläufer-SprP jedoch nicht induziert werden (ohne Abbildung). Dass eine schnellere Aktivierung des Vorläufer-SprP theoretisch möglich sein sollte, verdeutlicht die messbare Proteaseaktivität im Überstand einer Expressionskultur (Abb. 3.6). Die Faktoren, die eine Induktion der SprP-Aktivierung herbeiführen, sind bislang unbekannt.

Die Prozessierung des Vorläufer-SprP erklärt weiterhin die messbare Proteaseaktivität im Überstand unmittelbar nach der Sekretion (Abb. 3.6) und die Inaktivität nach der Reinigung

(Abb. 3.8). Die etablierte Reinigungsmethode ermöglicht nur die Reinigung des unprozessierten Vorläufer-SprP, da die für die Aufbereitung der Kulturüberstände verwendeten Konzentratoren, aufgrund ihrer Ausschlussgröße von 50 kDa nur das Auffangen des Fusionsproteins ermöglichen. Da das reife SprP ein wesentlich geringeres Molekulargewicht besitzt (Abb. 3.12; Abb. 3.13), kann es unter diesen Bedingungen nicht aufgefangen werden. Mit dieser Erkenntnis wurde die Methode angepasst und Konzentratoren mit einer geringeren Ausschlussgröße verwendet. Auch unter diesen Bedingungen konnte nur das Vorläufer-SprP gereinigt werden. Sehr wahrscheinlich wird im Verlauf der autokatalytischen Prozessierung das HlyA1-Sekretionssignal mit dem Histidin-*tag* abgespalten. Erste Experimente mit einem HlyA1-spezifischen Antikörper bestätigten diese Vermutung (Antikörper zur Verfügung gestellt von Dr. Christian Schwarz, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; ohne Abbildung).

Dass HlyA1 nicht die einzige Domäne des Vorläufer-SprP ist, die durch die Prozessierung abgespalten wird, konnte durch die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes des aktiven SprP demonstriert werden. Die Proteinfragmente, die durch die Prozessierung des Vorläufer-SprP entstehen (Abb. 3.10), wurden mittels Größenausschlusschromatographie separiert und die dominierenden Proteinfractionen, die durch die Messung der Absorption bei 220 nm und 280 nm identifiziert wurden, hinsichtlich der Proteaseaktivität analysiert (Abb. 3.11). Über den Vergleich mit einer Standardgerade konnte das apparente Molekulargewicht des SprP mit ca. 26 kDa bestimmt werden (Abb. 3.12).

Die durchgeführte Zymographie bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 3.13). Als Substrat wurde Casein verwendet, das kopolymerisiert mit der Polyacrylamid-Matrix vorliegt. Der Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard bestätigte, dass SprP die Degradation des Caseins bei ca. 26 kDa herbeiführt. Es wurde zusätzlich zu der Proteaseaktivität bei 26 kDa auch geringe Proteaseaktivität bei ca. 88 kDa sichtbar. Das entspricht dem theoretischen Molekulargewicht des Vorläufer-SprP. Ein Vorteil der Zymographie besteht darin, dass im Allgemeinen auch die Aktivierung von Vorläufer-Enzymen (Proenzymen) identifiziert werden kann. In der analysierten SprP-Probe lagen offensichtlich noch nicht alle SprP-Moleküle als reifes SprP vor, sondern es existierte ebenfalls noch ein gewisser Anteil des Vorläufer-SprP, dessen autokatalytische Prozessierung auf diese Weise visualisiert werden konnte. Da die analysierten Proteine bei der Zymographie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, zeigt dieses Ergebnis eindeutig, dass die autokatalytische Prozessierung des Vorläufer-SprP stattfindet. Diese autokatalytische Prozessierung der Proenzyme wurde auf die gleiche Weise u. a. für Matrix-Metalloproteasen mittels Zymographie demonstriert³⁸³.

Mit diesen beiden vollständig unabhängigen Experimenten konnte somit für das prozessierte und aktive SprP ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa nachgewiesen werden. Die Mehrheit der Subtilasen besitzt ein Molekulargewicht von 18 - 90 kDa. Subtilasen, die Anwendung in der Waschmittelindustrie finden, besitzen meist ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa¹⁸¹.

Neben der bereits angesprochenen Abspaltung des HlyA1 werden folglich weitere Domänen des Vorläufer-SprP prozessiert, um das finale Molekulargewicht zu erhalten. Die Schnittstellen, an denen die Prozessierung von SprP stattfindet, sind bislang unbekannt. Als katalytische Domäne wird die Peptidase S8-Domäne mit einem theoretischen Molekulargewicht von ca. 30 kDa Teil des reifen SprP sein. Aufgrund dessen muss sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus Prozessierung stattfinden. Das Molekulargewicht des reifen SprP kann nur durch Abspaltung der DUF und des nicht-konservierten C-Terminus erreicht werden (Abb. 4.1). Es gab bereits Indizien dafür, dass der nicht-konservierte C-Terminus des SprP-Proteins abgespalten wird, da auch bei Fusionen von SprP mit einem C-terminalen Histidin-*tag* oder LecB-*tag*³⁸⁴ die Abspaltung der Affinitätstags beobachtet wurde (ohne Abbildung).

Nach der Abspaltung der DUF und des C-Terminus unterscheidet sich das theoretische Molekulargewicht dieses reifen SprP (ca. 30 kDa) von dem experimentell nachgewiesenen Molekulargewicht (ca. 26 kDa) um 4 kDa. Da die Vorhersage der identifizierten Domänen von SprP auf Homologievergleichen beruht, ist es durchaus möglich, dass die Grenzen der Peptidase S8-Domäne nicht exakt vorhergesagt wurden. Auf diese Weise könnte der Unterschied von 4 kDa zustande kommen. Im Rahmen dieser Abweichungen stimmt das theoretische Molekulargewicht der Peptidase S8-Domäne mit dem ermittelten Molekulargewicht des SprP nahezu überein, sodass das reife SprP sehr wahrscheinlich nur aus der katalytischen Domäne besteht ohne N- oder C-terminale Domänen.

4.2 Charakterisierung biochemischer Eigenschaften von SprP

Die Subtilase SprP wurde hinsichtlich verschiedener biochemischer Eigenschaften untersucht. Zunächst wurde die zeitabhängige Umsetzung des Resorufin-markierten Caseins durch SprP analysiert, um den linearen Bereich der Aktivität zu bestimmen (Abb. 3.14). Die Hydrolyse des Substrates durch 3 µg SprP verläuft mindestens in den ersten 120 Minuten der Reaktion linear. Aufgrund der Inkubationszeit von 120 Minuten für die Aktivitätstests spielt die SprP-Stabilität für die analysierten Eigenschaften wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle. Die SprP-Aktivität wurde in Abhängigkeit der Temperatur (Abb. 3.15) und des pH-Wertes analysiert (Abb. 3.16). SprP ist besonders in einem Temperaturbereich von 40 - 60 °C, mit einem Optimum bei 50 °C, sowie in

einem pH-Bereich von pH 6 - 9, mit einem Optimum zwischen pH 7 - 8, aktiv. Diese ermittelten Eigenschaften von SprP sind mit den Eigenschaften einer Mehrheit der Subtilasen vergleichbar, die ebenfalls bei neutralen bis alkalischen pH-Werten aktiv und zudem häufig thermostabil sind¹⁶⁵. Extrazelluläre, bakterielle Subtilasen, die Anwendung in der Industrie finden, zeichnen sich insbesondere durch eine hohe Aktivität und Stabilität unter basischen Bedingungen aus^{178,181}.

Bislang konnte SprP ausschließlich auf Grundlage von Homologievergleichen den Subtilasen, die zu den Serinproteasen zählen, zugeordnet werden. Für die experimentelle Identifizierung des Katalysemechanismus und die Zuordnung von SprP zu einer Proteasefamilie wurden Proteaseinhibitoren verwendet, die spezifisch die Aktivität der Mitglieder einer Proteasefamilie inhibieren. Diese Klassifizierung von SprP als Serinprotease konnte durch die Analyse bestätigt werden, da ausschließlich Serinproteaseinhibitoren in der Lage sind, die Aktivität von SprP deutlich zu reduzieren (Abb. 3.17). Zu den effektiven Inhibitoren zählen PMSF, AEBSF und TPCK. Die beiden erstgenannten führen bei Serinproteasen zur Sulfonierung der Hydroxygruppe des aktiven Serins und inhibieren auf diese Weise die Aktivität von Serinproteasen³⁴⁵. TPCK ist ein Substrat-Analoga von Chymotrypsin und inhibiert Serinproteasen durch die irreversible Bindung des Histidins im aktiven Zentrum³⁴⁴. Die größte inhibitorische Aktivität zeigte AEBSF, das wasserlöslich und stabil in wasserhaltigen Puffersystemen ist^{341,342}. Das ist ein bedeutender Vorteil gegenüber PMSF, das ein ähnliches Wirkungsspektrum besitzt, aber in wasserhaltigen Puffersystemen instabiler ist³⁴³. Aus diesem Grund besitzt PMSF bei den hier durchgeführten Aktivitätstests eine geringere inhibitorische Wirkung auf die SprP-Aktivität als AEBSF.

Viele Subtilasen benötigen Calcium als Kofaktor, da dieses die Stabilität der Proteasen begünstigen kann³⁸⁵. Für die Analyse, ob Calcium ein Kofaktor von SprP ist, wurde der Komplexbildner EDTA verwendet, der stabile 1:1 Chelatkomplexe mit mindestens zweiwertigen Kationen bildet. Aufgrund dieser Fähigkeit ist EDTA in der Lage, Calcium-abhängige Proteasen zu inhibieren³⁸⁶. Häufig wird EDTA zudem als Inhibitor für ionenabhängige Metalloproteasen verwendet, da es die Ionen des aktiven Zentrums komplexiert. EDTA zeigte allerdings keine signifikante inhibitorische Wirkung auf die Aktivität von SprP und demzufolge benötigt SprP kein Calcium für die Ausbildung der maximalen Aktivität. Ebenso waren der Cysteinproteaseinhibitor E-64 und der Asparaginsäureproteaseinhibitor Pepstatin A nicht in der Lage, SprP zu inhibieren. Mit diesen Ergebnissen konnte erstmals experimentell bestätigt werden, dass SprP zur Klasse der Serinproteasen gehört. Zudem wurde deutlich, dass neben Serin auch Histidin Teil der katalytischen Triade ist.

Die Datenbank *Prokaryote Subtilase Database* ordnet SprP aufgrund der vorhergesagten katalytischen Triade, bestehend aus Glutaminsäure (E₂₆₂), Histidin (H₂₉₉) und Serin (S₄₉₉), der E-H-S Familie der Subtilasen zu (Abb. 3.1). Diese Vorhersage beruht auf Homologievergleichen mit anderen Subtilasen¹⁹⁰. Die räumliche Nähe dieser Aminosäuren zueinander wurde anhand des 3D-Strukturhomologiemodells von SprP ersichtlich (Abb. 3.2). Die Familie der E-H-S Subtilasen ist vergleichsweise klein und unterscheidet sich von der Mehrheit der Subtilasen mit einer katalytischen Triade bestehend aus D-H-S durch einen einfachen Austausch der Asparaginsäure gegen Glutaminsäure¹⁹⁰. Sehr wahrscheinlich übernimmt die Glutaminsäure die Funktion der Asparaginsäure in der Stabilisierung des Histidins. Es wird vermutet, dass dieser Austausch möglicherweise zu einer geänderten Spezifität der E-H-S Subtilasen führt, da der Austausch in einer Strukturänderung des aktiven Zentrums resultiert^{190,196}. Weiterhin zeigt sich diese Familie ebenso wie SprP mit der DUF und dem C-terminalen nicht-konservierten Bereich sehr variabel bezüglich Sequenzhomologien und Sequenzlängen¹⁹⁰.

Die Inhibitionsstudien demonstrierten bereits, dass Serinproteaseinhibitoren, die das aktive Serin und das Histidin blockieren, zu einer Reduktion der SprP-Aktivität führen (Abb. 3.17). Für die endgültige Klärung wurden drei Varianten des SprP-Fusionsproteins konstruiert, die ebenfalls über das HlyA T1SS erfolgreich sekretiert werden konnten und gereinigt wurden (Abb. 3.21). Für die drei SprP-Varianten SprPE262A-FP, SprPH299A-FP und SprPS499A-FP (FP = Fusionsprotein) konnte keine Proteaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Somit wurde erstmals experimentell gezeigt, dass die drei vorhergesagten Aminosäuren tatsächlich essenziell für die Aktivität von SprP sind. Zusammen mit der auf Homologievergleichen basierenden Vorhersage und der räumlichen Nähe dieser Aminosäuren zueinander (Abb. 3.2) kann davon ausgegangen werden, dass diese Aminosäuren die katalytische Triade von SprP bilden.

Neben der katalytischen Triade ist die DUF eine weitere Besonderheit von SprP, da diese keinerlei Homologie zu Domänen anderer charakterisierter Enzyme aufweist und fast ausschließlich in Pseudomonaden existiert (Abb. 3.1; 3.1.2). Da die DUF im Zuge der Prozessierung abgespalten wird, um das Molekulargewicht von 26 kDa zu erhalten, verhält sich diese Domäne wie ein klassisches Propeptid. Das ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die DUF als Propeptid fungieren könnte oder ein Propeptid beinhaltet, das diese Funktion übernimmt. Für die Analyse der DUF-Funktion wurden basierend auf den Homologievergleichen (Abb. 3.1) zwei Deletionsvarianten des SprP-Fusionsproteins konstruiert. Auf diese Weise entstanden die SprP-Varianten SprPΔDUF-FP und SprPΔS8-FP. Diese wurden ebenfalls über das beschriebene HlyA T1SS sekretiert, gereinigt und die Proteaseaktivität bestimmt. Die beiden Deletionsvarianten

SprP Δ DUF-FP und SprP Δ S8-FP wiesen keine Proteaseaktivität auf (Abb. 3.22). Die Inaktivität von SprP Δ S8-FP wurde erwartet, da in dieser Variante die katalytische Proteasedomäne deletiert wurde. Unter der Voraussetzung, dass die N-terminale Grenze der Peptidase S8-Domäne so gewählt wurde, dass die verbleibende Peptidase S8-Domäne aktiv sein kann, zeigt die Inaktivität des SprP Δ DUF-FP, dass die DUF an der Ausbildung der Proteaseaktivität von SprP beteiligt ist. In diesem Fall kann der DUF eine Funktion als Chaperon zugesprochen werden. Für die detaillierte Klärung der Funktion der DUF müssen allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden, aber diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass die DUF für die Aktivität von SprP essenziell ist. Ferner ist nicht auszuschließen, dass der DUF in *P. aeruginosa* eine weitere Funktion zukommt, denn im Vergleich zu anderen Subtilasen wie Subtilisin Carlsberg, mit einem Propeptid aus 75 AS¹⁶⁵, oder Subtilase CDF aus *Thermoactinomyces* sp., mit einem Propeptid aus 94 AS³⁸⁷, ist diese Domäne in SprP mit über 200 AS besonders lang.

Für die initiale Charakterisierung von SprP wurde mit Casein ein typisches Proteasesubstrat verwendet. Neben Casein wurde bei Pelzer²⁶¹ gezeigt, dass auch das Substrat *N*-Succinyl-AAPF-*p*-Nitroanilid³⁸⁸ hydrolysiert wird. Für die Analyse des Substratspektrums von SprP wurde eine kommerzielle Peptidbibliothek aus 3375 Peptiden verwendet, die in 512 Peptidmischungen vorlagen. Diese wurden mit SprP inkubiert und die Hydrolyse der Peptide jeder Peptidmischung analysiert (Abb. 3.18). Auf diese Weise wurden 17 Peptidmischungen identifiziert (124 Peptide), die besonders geeignete Substrate für SprP darstellen (Abb. 3.19). Die Peptidmischung, deren Peptide von SprP am effektivsten hydrolysiert wurden, besteht aus den Tripeptiden RRV/RRA/RKV/RKA/KRV/KRA/KKV/KKA. Da ähnliche Peptide in jeweils einer Peptidmischung zusammengefasst sind, wird bei Betrachtung aller Peptide, die von SprP hydrolysiert wurden, eine klare Präferenz für hydrophobe und basische Aminosäuren ersichtlich (Abb. 3.20). Auch das Substrat *N*-Succinyl-AAPF-*p*-Nitroanilid besitzt aufgrund der zweimal enthaltenen Aminosäure Alanin einen hydrophoben Teil, sodass die Spaltung dieses Substrates durch SprP sehr wahrscheinlich dort stattfindet. Diese Präferenz für hydrophobe und basische Aminosäuren tritt bei den meisten Mitgliedern der Peptidase S8-Familie auf¹⁶⁵. Zu den Subtilasen mit einer eindeutigen Präferenz für die basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) zählen z. B. Furin und Kexin¹⁶⁵. Hydrophobe Aminosäuren werden ebenfalls häufig in den Schnittstellen von Subtilasen identifiziert wie bei Subtilisin Carlsberg und Subtilisin DY aus *B. subtilis*, allerdings seltener als die basischen Aminosäuren¹⁶⁵. Gegenstand künftiger Arbeiten wird die Identifizierung des Tripeptides sein, das von SprP am effektivsten hydrolysiert wird sowie die Identifizierung der exakten Schnittstelle innerhalb dieses Peptides. Für diese Analyse werden die

acht Peptide der besten Peptidmischung synthetisiert und nach der Inkubation mit SprP werden die Hydrolyseprodukte mittels LC-MS identifiziert und quantifiziert.

Auf Grundlage der Ergebnisse für die Spaltung basischer und hydrophober Peptide wurde die Aminosäuresequenz des SprP-Fusionsproteins hinsichtlich potenzieller Prozessierungsstellen untersucht. Möglicherweise könnte die Aminosäuresequenz RRVRAR am N-Terminus der Peptidase S8-Domäne als Erkennungssequenz für die Prozessierung des Propeptides dienen. Am C-Terminus könnte die Spaltung an der Aminosäuresequenz LLRRSA erfolgen. Das daraus resultierende reife SprP besäße dann ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 30 kDa.

Die Erkenntnisse aus der Charakterisierung der gereinigten Subtilase SprP sind in folgendem Modell zusammengefasst (Abb. 4.1):

SprP-Fusionsprotein (Vorläufer-SprP)

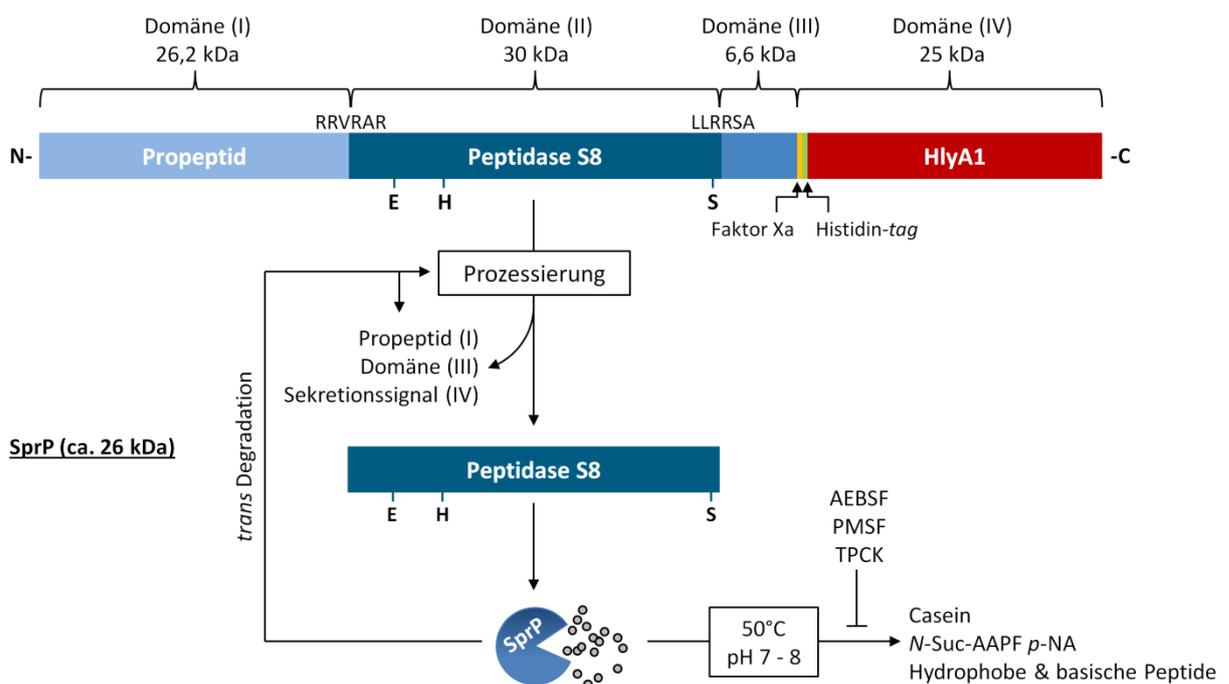


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Prozessierung und der Eigenschaften der Subtilase SprP. Dargestellt ist ein Modell des Reifungsprozesses und der Eigenschaften von SprP basierend auf den experimentellen Daten. Das aktive SprP besitzt ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa. Das Vorläufer-SprP hat insgesamt ein Molekulargewicht von ca. 88 kDa. Die Aktivierung der Protease erfolgt über autokatalytische Prozessierung, sodass unter Spaltung der Domänen (I), (III) und (IV) eine aktive Subtilase SprP mit einem Molekulargewicht von ca. 26 kDa entsteht. Potenzielle Schnittstellen der Prozessierung könnten RRVRAR (N-Terminus) und LLRRSA (C-Terminus) darstellen. SprP ist in der Lage, den Aktivierungsprozess des Vorläufer-SprP durch Abspaltung oder die Degradation des potenziell inhibitorischen Propeptides zu induzieren (*trans* Degradation). Weiterhin besitzt SprP ein Temperaturoptimum von 50 °C und ein pH-Wert-Optimum von 7 - 8. Als Substrat nutzt SprP Casein, N-Suc-AAPF p-NA²⁶¹ sowie Peptide mit hydrophoben und basischen Aminosäuren. Die Serinproteaseinhibitoren AEBSF, PMSF und TPCK sind in der Lage, die Aktivität von SprP zu reduzieren. AS = Aminosäure, N = NH₂, C = COOH.

4.3 Untersuchungen zur Regulation der *sprP*-Expression

Neben der biochemischen Charakterisierung der Subtilase SprP stand die Untersuchung der physiologischen Funktion im Mittelpunkt der Arbeit. Die Funktion von SprP in *P. aeruginosa* ist bislang gänzlich unbekannt. Bisher wurde lediglich anhand von *P. aeruginosa* QS-Mutanten nachgewiesen, dass das Gen *pa1242*, das für SprP kodiert, Teil des QS-Regulons und die Expression wahrscheinlich von RhlR abhängig ist³⁸⁹. Da das Las-System hierarchisch über dem Rhl-System steht (Abb. 1.1), ist auch ein funktionelles Las-System für die *sprP*-Expression essenziell^{389,390}.

Stromaufwärts des *sprP*-Gens befindet sich in einer Entfernung von 79 bp das Gen *pa1241*, das in gleicher Orientierung vorliegt (Abb. 3.23). Das Gen *pa1241* kodiert für einen mutmaßlichen Transkriptionsregulator der TetR-Familie mit einer HTH (*Helix-Turn-Helix*)-DNA-Bindedomäne¹⁶. Die bereits charakterisierten Mitglieder der TetR-Familie sind Repressoren und kontrollieren die Expression von Genen, deren Genprodukte an katabolen Reaktionen, der Antibiotikaresistenz, der Biosynthese von Antibiotika, osmotischem Stress und der Pathogenität beteiligt sind³⁹¹. Die *Pseudomonas*-Datenbank sagt für den Locus *pa1241-sprP* mit Bezug auf die Datenbank *DOOR* (*Database for prokaryotic Operons*) ein 2412 bp langes Operon voraus^{16,349}.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Intergen-Region zwischen *pa1241* und *sprP* transkribiert wird und der 5'-Bereich von *sprP* sowie der 3'-Bereich von *pa1241* Teil dieses Transkripts sind (Abb. 3.23). Trotz dieser Indizien, die für die Lokalisierung der beiden Gene in einem Operon sprechen, wurde mittels transkriptioneller Reporterfusionen demonstriert, dass die Gene *pa1241* und *sprP* jeweils einen eigenen Promotor besitzen (Abb. 3.24). Zum einen P_{pa1241} , der stromaufwärts des *pa1241*-Gens lokalisiert ist, und zum anderen P_{sprP} , der stromaufwärts des *sprP*-Gens lokalisiert ist.

Es gibt zwei mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen. Da eine mRNA nachgewiesen wurde, die den Bereich zwischen *pa1241* und *sprP* umfasst, könnte der Promotor P_{sprP} innerhalb des Gens *pa1241* liegen und somit wäre die Intergen-Region als 5' untranslatierter Bereich Teil der *sprP*-mRNA (Abb. 4.2). Sollten die Gene hingegen in einem Operon lokalisiert sein, ist die Transkription zweier mRNA-Spezies möglich. Dann würde der Promotor P_{pa1241} die konstitutive Synthese der bicistronischen mRNA bestehend aus *pa1241-sprP* ermöglichen. Der Promotor P_{sprP} , der dann als interner Promotor fungiert, würde hingegen die zusätzliche Expression des *sprP*-Gens unabhängig von der Promotoraktivität von P_{pa1241} ermöglichen (Abb. 4.2). Diese Art der Regulation wurde bereits bei *P. aeruginosa* und anderen Organismen beschrieben. Interne Promotoren ermöglichen die koordinierte Expression bestimmter Gene in Abhängigkeit von der

physiologischen Notwendigkeit. Das Alginate-Biosynthese-Operon in *P. aeruginosa* besteht aus 12 Genen und wird durch den stromaufwärts-lokaliserten Promotor P_{algD} sowie durch zwei interne Promotoren P_{algG} und P_{algI} reguliert³⁹². Die Messung einer transkriptionellen Reporterfusion demonstrierte, dass die Promotoraktivität von P_{algI} stärker und die Promotoraktivität von P_{algG} schwächer ist als die entsprechende Aktivität von P_{algD} . Die Präsenz interner Promotoren wurde weiterhin bei dem *gal*-Operon in *Streptomyces lividans*³⁹³ und dem Operon *orf1-cry* in *Bacillus thuringiensis* demonstriert³⁹⁴.

Aufgrund der potenziellen Operonstruktur und der vorhergesagten Transkriptionsregulatorfunktion wurde untersucht, ob PA1241 als Regulator der *sprP*-Expression fungiert. Es konnte gezeigt werden, dass die genomische Deletion des Gens *pa1241* keine direkte Auswirkung auf die Promotoraktivität von *sprP* hat, die episomal mittels transkriptioneller Reporterfusion bestimmt wurde (Abb. 3.24). Somit hat PA1241 keinen direkten regulatorischen Einfluss auf die Promotoraktivität von *sprP*²⁶². Für die weitere Charakterisierung der Regulation der Genexpression wurden die Promotorbereiche beider Gene verwendet, um DNA-bindende Regulatoren mittels DNA-Affinitätschromatographie zu identifizieren. Die DNA-Affinitätschromatographie ist eine geeignete Methode, um bisher unbekannte Regulatoren unter definierten Bedingungen zu identifizieren³⁹⁵. Auf diese Weise konnte der DNA-bindende Regulator HexR identifiziert werden, der spezifisch an den Promotorbereich von *pa1241* bindet (Abb. 3.25). Unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen konnten keine Regulatoren identifiziert werden, die an den Promotorbereich von *sprP* binden. Die Bindung von HexR an den Promotor P_{pa1241} ist bislang unbekannt und wird hier zum ersten Mal beschrieben. Bislang umfasst das bekannte Hex-Regulon in *P. aeruginosa* neun Gene, die in vier Operons lokalisiert sind^{396,397}.

HexR ist ein Transkriptionsregulator des zentralen Kohlenhydratmetabolismus, der in *Pseudomonas* die Expression aller Gene des Hex-Regulons durch die Bindung der stromaufwärts-Bereiche dieser Gene reprimiert³⁵⁰. In *Pseudomonas* binden zwei HexR-Monomere den Operator des Zielgens an der pseudopalindromischen Sequenz 5'-TTGTN₇₋₈ACAA-3'^{350,397}. Diese HexR-Bindestelle konnte innerhalb des Promotorbereiches stromaufwärts des Gens *pa1241* identifiziert werden (Abb. 3.26). Die Präsenz dieser Bindestelle stromaufwärts von *pa1241* stützt somit die Identifizierung von HexR als Bindepartner des Promotors von *pa1241*.

Bei der DNA-Affinitätschromatographie wird ein DNA-Doppelstrang des Promotorbereiches für die Identifizierung von Regulatoren verwendet und somit wird die 5'→3' Orientierung nicht berücksichtigt. Da sich die HexR-Bindestelle in der Intergen-Region von *pa1240* und *pa1241* befindet und diese beiden Gene im Genom entgegengesetzt orientiert sind, könnte die Intergen-

Region regulatorische Elemente für beide Gene beinhalten und damit HexR sowohl für *pa1240* als auch für *pa1241* und möglicherweise *pa1241-sprP* als Transkriptionsregulator fungieren (Abb. 3.26). Das Gen *pa1240* kodiert für eine mutmaßliche Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase, die wahrscheinlich am Lipid-Metabolismus beteiligt ist¹⁶.

Hinsichtlich der Transkription konnten für die Gene *pa1240*, *pa1241* und *sprP* in einem *hexR*-defizienten Stamm sowie nach einer *hexR*-Überexpression unter den gewählten Bedingungen und dem gewählten Zeitpunkt der Analyse keine signifikanten Änderungen identifiziert werden (ohne Abbildung). Bei der Analyse der Transkriptmengen wird allerdings stets nur ein Zeitpunkt betrachtet. Möglicherweise ist der regulatorische Einfluss von HexR unter den gewählten Bedingungen so gering, dass dieser erst als Summe geringer Einflüsse nach einer gewissen Zeit sichtbar wird. Aus diesem Grund wurde die Kultivierung einer *hexR*-Überexpressionskultur über mehrere Stunden verfolgt. Im Verlauf der Kultivierung wurde durch die Überexpression des *hexR*-Gens die Zellaggregation von *P. aeruginosa* ausgelöst (Abb. 3.27). Dieser Phänotyp ähnelt sehr deutlich der Zellaggregation, die durch die *sprP*-Deletion hervorgerufen wird (Abb. 3.29). Die Zellaggregation, die durch die *hexR*-Überexpression induziert wird, ist schwächer ausgeprägt als bei *P. aeruginosa* Δ *sprP*, aber deutlich nachweisbar. Das Auslösen dieses Phänotypen ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Gene *pa1241* und *sprP* in einem Operon lokalisiert sind. Da HexR-Transkriptionsregulatoren in *Pseudomonas* reprimierend wirken, führt die verstärkte Synthese dieses Repressors vermutlich zur erhöhten Bindung an den *pa1241*-Promotor und auf diese Weise zu einer Repression der Expression von *pa1241-sprP* (Abb. 4.2). Durch die Reduktion der *sprP*-Expression ähnelt dieser Zustand in einer abgeschwächten Form dem Zustand der *sprP*-Deletion und verursacht somit einen der typischen Phänotypen von *P. aeruginosa* Δ *sprP*. Zudem kann dieser Phänotyp nicht durch die Reduktion der Genexpression von *pa1241* ausgelöst werden, da die Deletion von *pa1241* nicht zur Zellaggregation führt²⁶². Vermutlich ist die Repression der Genexpression schwächer als die Deletion des Gens und deswegen ist der beobachtete Phänotyp nicht so stark ausgebildet wie in *P. aeruginosa* Δ *sprP*. Zudem ist die Produktion eines Regulators nicht unbedingt ausreichend, um einen regulatorischen Effekt zu induzieren. Auch diese synthetisierten Regulatorproteine sind wiederum von zellulären Bestandteilen wie der Präsenz von Effektormolekülen abhängig. HexR besitzt eine SIS (*sugar isomerase*)-Domäne, die das Effektormolekül KDPG (2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat) bindet^{350,398}. KDPG wird im Verlauf des Entner-Doudoroff-Weges gebildet, den *P. aeruginosa* für die Metabolisierung von Glukose verwendet³⁹⁹⁻⁴⁰¹. Die Bindung des Effektormoleküls KDPG induziert die Freilassung des Repressors HexR von den entsprechenden Zielgenen^{350,402}. Möglicherweise reduzieren Glukoserückstände im LB-Medium, die aus dem Hefeextrakt

stammen, die Effizienz der HexR-Bindung. Da die Bindung von HexR unter den gewählten Bedingungen allerdings mittels DNA-Affinitätschromatographie demonstriert wurde, ist davon auszugehen, dass dieser potenzielle Effekt gering ist.

Die Hypothese, dass *sprP* Teil des HexR-Regulons ist, wurde weiterhin durch die Ergebnisse der Proteomanalyse unterstützt. Bei der Analyse der intrazellulären Proteine fielen insbesondere sechs Proteine mit verringerter relativer Proteinmenge auf, die Bestandteil des zentralen Kohlenhydratmetabolismus von *P. aeruginosa* sind (Abb. 3.35). Dazu zählen die Fructose-1,6-bisphosphatase Fbp, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapA, die Phosphoenolpyruvat-Synthase PpsA, die Pyruvatdehydrogenase AceE, die Succinatdehydrogenase SdhA und die Dihydrolipoyl-Transsuccinylase SucB. Interessanterweise ist GapA Teil des HexR-Regulons in *P. aeruginosa* und die Gene, die für PpsA sowie AceE kodieren, verfügen über eine stromaufwärts-lokalisierte vorhergesagte HexR-Bindestelle^{396,397}. Zur endgültigen Klärung eines direkten oder indirekten Zusammenhangs zwischen dem HexR-Regulon und der Expression von *pa1241* und/oder *sprP* sind weitere Untersuchungen notwendig.

Zusätzlich zu der identifizierten HexR-Bindestelle wurde eine Bindestelle für Anr 10 bp stromaufwärts von *pa1241* vorhergesagt³⁵⁹. Anr ist ein bedeutender Bestandteil der Denitrifikation in *P. aeruginosa* (Abb. 1.3). Der Redoxregulator Anr ist ein DNA-bindender Transkriptionsregulator, der als Sensor des Sauerstoffpartialdrucks fungiert und in *P. aeruginosa* meist ein positiver Regulator der Genexpression ist³⁵⁹. Die Anr-Bindestellen sind bei den meisten Genen des Anr-Regulons 60 - 100 bp stromaufwärts der Startcodons lokalisiert³⁵⁹. Somit ist die Position der Anr-Bindestelle stromaufwärts von *pa1241* unüblich. Anr-Bindestellen mit geringem Abstand zum Startcodon wurden als potenziell reprimierende Anr-Bindestellen diskutiert³⁵⁹. Da die Deletion von *sprP* einen starken Einfluss auf die Denitrifikation von *P. aeruginosa* hat (Abb. 3.38; Abb. 3.39), könnte dieser Bindestelle große Bedeutung zukommen.

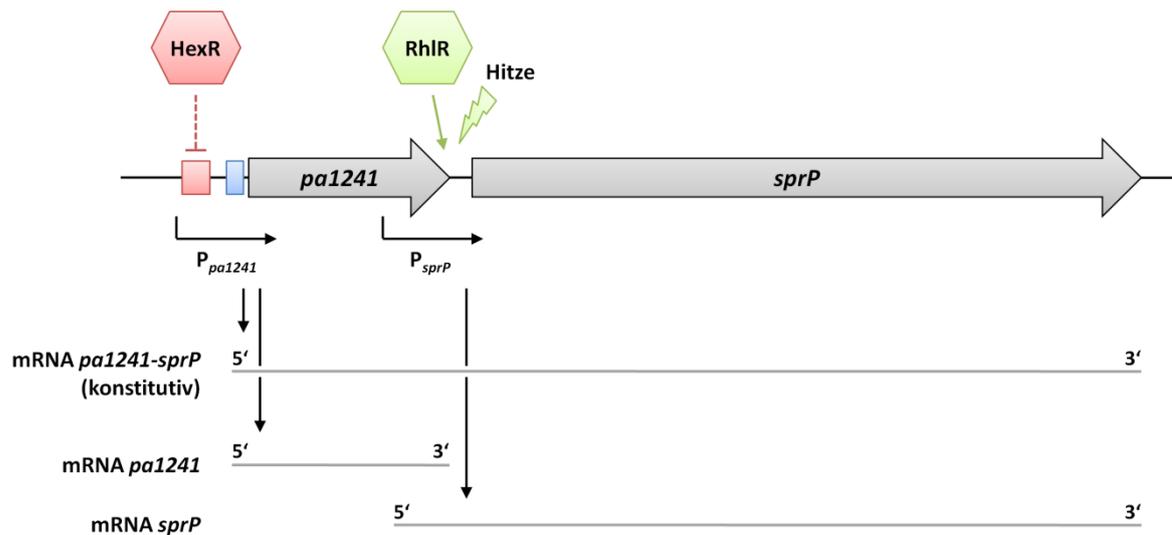


Abb. 4.2 Modell der Expression und Regulation von *pa1241* und *sprP*. Dargestellt sind die Gene *pa1241* und *sprP* mit den jeweiligen putativen Promotoren P_{pa1241} und P_{sprP} sowie den potenziell resultierenden mRNA-Spezies. Stromaufwärts von *pa1241* befindet sich eine HexR-Bindestelle (Rot) für den Transkriptionsregulator HexR und eine vorhergesagte Anr-Bindestelle (Blau) nach Trunk *et al.*³⁵⁹. Der Regulator RhIR wirkt positiv auf die Genexpression von *sprP* (nach Rasmussen *et al.*³⁸⁹ und Skindersoe *et al.*³⁹⁰). Weiterhin wird die Promotoraktivität von *sprP* durch Hitze induziert. Grün = Induktion, Rot = Repression.

Neben DNA-bindenden Transkriptionsregulatoren wie HexR oder Anr wurde aufgrund der Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung untersucht, ob die Erhöhung der Kultivierungstemperatur einen Einfluss auf die *sprP*-Promotoraktivität hat. SprP ist insbesondere bei Temperaturen aktiv, die wesentlich höher sind als das Temperaturoptimum für das Wachstum von *P. aeruginosa*. Die größte Aktivität besitzt SprP bei 50 °C. Bei Temperaturen von 40 °C und 60 °C zeigte SprP bezogen auf das Temperaturoptimum eine Aktivität von ca. 80 % bzw. 77 % (Abb. 3.15). Durch die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 37 °C auf 43 °C konnte die Promotoraktivität von *sprP* in *P. aeruginosa* in der Tat um ca. 380 % gesteigert werden (Abb. 3.28). Gene, deren Expression als Reaktion auf Stresszustände wie erhöhte Temperaturen induziert werden, gehören meist zu den Hitzeschock-Genen. Die Kultivierung von *E. coli* bei 42 °C induziert z. B. die Expression von über 30 Hitzeschock-Genen⁴⁰³. Darunter befinden sich verschiedene Chaperone und Proteasen, die an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind, indem sie missgefaltete Proteine reparieren oder degradieren. Irreversibel denaturierte Proteine dienen häufig als Substrate für Proteasen^{212,404}.

Die Präferenz von SprP für die Spaltung basischer und hydrophober Aminosäuren (Abb. 3.20) ist eine weitere Gemeinsamkeit von SprP mit Proteasen der Proteinqualitätskontrolle. Das Präsentieren hydrophober und basischer Aminosäuren, insbesondere am N-Terminus von missgefalteten Proteinen, dient als Signal zur Degradation dieser Proteine. In Prokaryoten katalysieren meist ATP-abhängige Proteasen den Abbau dieser Proteine⁴⁰⁵. Ein Beispiel für eine

ATP-unabhängige Protease ist die Serinprotease DegP aus *E. coli*, die im Periplasma lokalisiert ist und an der extracytoplasmatischen Proteinqualitätskontrolle beteiligt ist. DegP ist in *E. coli* die wichtigste Protease, die für die Degradation missgefalteter Proteine in der Zellhülle verantwortlich ist⁴⁰⁶. Bei niedrigen Temperaturen wird davon ausgegangen, dass DegP zusätzlich eine Chaperon-Funktion besitzt^{407,408}. Die Genexpression von *degP* wird durch verschiedene Stresszustände wie z. B. erhöhte Temperaturen induziert^{409,410}. Außerdem zeigt die Protease bei Temperaturen oberhalb von 40 °C hohe Aktivität, eine wichtige Eigenschaft für diese Art Proteasen⁴⁰⁸.

Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften von SprP mit Proteasen, die an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind, kommt SprP möglicherweise eine solche Funktion in *P. aeruginosa* zu. Auch die COG-Klassifizierung weist SprP der Gruppe von Proteinen zu, deren Mitglieder an der Proteinfaltung (Chaperone), posttranslationalen Modifikation und dem Proteinumsatz beteiligt sind^{355,356}. Die an der Proteinqualitätskontrolle beteiligten Chaperone und Proteasen werden auch unter Bedingungen, die für die Zelle keinen Stress bedeuten, synthetisiert und sind ebenfalls unter diesen Umständen für die Proteinhomöostase verantwortlich⁴¹¹. Dass SprP an zahlreichen zellulären Prozessen Anteil hat und diese durch die Proteaseaktivität maßgeblich beeinflusst werden, wurde in dieser Arbeit erstmalig demonstriert. Nachfolgend wird der Einfluss der *sprP*-Deletion auf die Physiologie von *P. aeruginosa* dargestellt und diskutiert.

4.4 Physiologische Konsequenzen der *sprP*-Deletion

P. aeruginosa Δ *sprP* unterscheidet sich phänotypisch stark von *P. aeruginosa* PAO1. Das wurde zunächst durch die starke Zellaggregation während der Flüssigkultivierung deutlich (Abb. 3.29; Abb. 3.30). Zudem führt die Deletion des Subtilase-Gens zu einer erhöhten Biofilmproduktion (Abb. 3.31) und zu einer vollständigen Unbeweglichkeit (Abb. 3.32). Die Änderung dieser Phänotypen sind deutliche Hinweise dafür, dass SprP eine bedeutende Funktion in *P. aeruginosa* zukommt. Aufgrund dieser drastischen Effekte wurden mit der Proteomik und Transkriptomik zwei systembiologische Analysemethoden verwendet, um die globalen Auswirkungen der *sprP*-Deletion zu analysieren.

Im Vergleich von *P. aeruginosa* Δ *sprP* zu *P. aeruginosa* PAO1 konnten mittels 2D-Gelelektrophorese 124 Proteine im intrazellulären Proteom und 205 Proteine im extrazellulären Sekretom mit veränderten relativen Proteinmengen identifiziert werden. Aus dieser Gesamtheit konnten ca. 100 Proteine aus den Gelen isoliert werden. Letztendlich wurden 32 verschiedene

intrazelluläre Proteine (Abb. 3.35) und 16 verschiedene extrazelluläre Proteine (Abb. 3.36) eindeutig identifiziert. Bei den zellulären Proteinen waren insbesondere die Proteine des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von Interesse, die teilweise Bestandteil des HexR-Regulons sind und im Zusammenhang mit der Identifizierung des Transkriptionsregulators HexR bereits diskutiert wurden (vgl. 4.3).

Zu den sekretierten Proteinen mit veränderten relativen Proteinmengen zählen u. a. die fünf bedeutenden Proteasen PaAP, LasB, PASP, AprA sowie PIV (Abb. 3.36). Die Proteasen LasB, PIV und PaAP wurden auf den 2D-Gelen mehrfach identifiziert. Sehr wahrscheinlich führen posttranslationale Modifikationen wie limitierte Proteolyse zu diesem Erscheinungsbild. Die Prozessierung der beiden Proteasen LasB und PIV zur Aktivierung dieser Proteasen ist bekannt und erklärt das mehrfache Auftreten⁴². Mit Ausnahme der Protease PaAP, deren Beteiligung an der Virulenz von *P. aeruginosa* nicht sicher ist, handelt es sich bei allen identifizierten Proteasen um äußerst potente Virulenzfaktoren^{42,244}. Die Protease LasB wurde mit erhöhter relativer Proteinmenge in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ identifiziert. Der Grund für diese erhöhte Proteinmenge liegt an einer Erhöhung der *lasB*-Expression in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ ²⁶¹. Die Protease PASP wurde mit verringerter relativer Proteinmenge und die Aminopeptidase PaAP, die durch das Gen *pa2939* kodiert wird, mit erhöhter relativer Proteinmenge identifiziert. Im Gegensatz zu den übrigen Proteasen handelt es sich bei PaAP um eine Exopeptidase, die möglicherweise an Infektionsprozessen sowie an der Generierung kleiner Peptide und freier Aminosäuren für die Aufnahme durch *P. aeruginosa* beteiligt ist⁴¹². Weiterhin wurden die Proteasen AprA mit verringerter relativer Proteinmenge und die PIV mit erhöhter relativer Proteinmenge im Überstand identifiziert. Diese quantitativen Änderungen stehen im Zusammenhang mit der Regulation der Pyoverdininproduktion (Abb. 4.4). Der aktivierte ECF-Sigmafaktor PvdS induziert durch die Interaktion mit der RNA-Polymerase die Genexpression dieser beiden Proteasen direkt oder indirekt. Infolgedessen wird PIV vermehrt sekretiert. Entgegen den Erwartungen wurde AprA mit verringerter relativer Proteinmenge nachgewiesen. In diesem Fall besteht offensichtlich kein direkter Zusammenhang von erhöhter *pvdS*-Genexpression und erhöhter AprA-Sekretion.

Die Transkriptomanalyse demonstrierte, dass die Deletion des *sprP*-Gens einen verringerten relativen mRNA-Spiegel von 116 Genen (Tab. 8.4) und einen erhöhten relativen mRNA-Spiegel von 102 Genen (Tab. 8.5) zur Folge hat. Obwohl auch die mRNA-Stabilität Änderungen der relativen mRNA-Spiegel hervorrufen kann, ist die Hauptursache für die analysierten Änderungen sehr wahrscheinlich eine differenzielle Genexpression, sodass nachfolgend von Änderungen der

Genexpression gesprochen wird. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zeigten zum einen, dass die *sprP*-Deletion die Expression einer großen Anzahl Gene beeinflusst und zum anderen, dass die Genprodukte der betroffenen Gene viele verschiedenartige Funktionen in *P. aeruginosa* besitzen (Abb. 3.37). Diese sind u. a. an der Energieproduktion und Umwandlung, dem Aminosäuretransport und Metabolismus sowie der Transkription beteiligt. Der Großteil der differenziell exprimierten Gene kodiert für Proteine mit unbekannter Funktion.

Ein Grund für die große Anzahl differenziell exprimierter Gene ist vermutlich die differenzielle Expression von mindestens 12 Genen, die für regulatorische Proteine kodieren. Zu diesen gehören sieben mutmaßliche Transkriptionsregulatoren (PA0048, PA0513, PA0515, PA0535, PA0839, PA4659, AnrR), ein Antwortregulator eines Zweikomponenten-Systems (PhoB), der Sigmafaktor RpoS, ein vorhergesagter ECF-Sigmafaktor der σ^{70} -Familie (PA1351) sowie die beiden ECF-Sigmafaktoren PvdS und Fpvl. Diese regulatorisch wirkenden Proteine kontrollieren wiederum die Genexpression der jeweiligen Regulons. Die Änderung der Genexpression eines Gens, das für einen Regulator kodiert, resultiert allerdings nicht zwangsläufig in Expressionsunterschieden aller im Regulon befindlichen Gene. Das wird z. B. anhand des RpoS-Regulons ersichtlich, das über 700 Gene umfasst⁴¹³. Eine erhöhte *rpoS*-Expression in *P. aeruginosa* Δ *sprP* führt nicht zu Expressionsänderungen des gesamten RpoS-Regulons.

Die größte Änderung aller differenziell exprimierter Gene wurde für das Operon *antABC* nachgewiesen (Tab. 3.2). Die Genprodukte des *antABC*-Operons sind Teil der Anthranilsäuredegradation in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa*³⁶⁰. Über die Funktion der Genprodukte von *antABC* und *catBCA*, deren Expression in *P. aeruginosa* Δ *sprP* erhöht ist (Tab. 3.2), werden Citratzyklus-Intermediate generiert^{360,361}. Anthranilsäure dient weiterhin als Vorstufe der PQS-Synthese sowie der Tryptophansynthese^{66,360,414}. SprP greift vermutlich übergeordnet in die Anthranilsäuredegradation ein, da das Gen für den direkten Regulator AnrR, der die Expression von *antA* induziert³⁶², ebenfalls verstärkt exprimiert wird (Tab. 3.2). Die Regulation des Anthranilsäuremetabolismus ist insgesamt äußerst komplex und viele Faktoren wie die Wachstumsphase, die QS-Regulatoren LasR und RhIR und die direkten Regulatoren PqsR und AnrR sind daran beteiligt³⁶⁰. Der dargestellte Einfluss von SprP auf die Regulation der Anthranilsäuredegradation macht SprP zu einem interessanten Zielprotein für das weitere Verständnis des Anthranilsäuremetabolismus in *P. aeruginosa*.

Viele Effekte, die aus der *sprP*-Deletion hervorgehen, stellen äußerst interessante Forschungsansätze für die weitere Charakterisierung von *P. aeruginosa* dar. Aufgrund der zahlreichen und vielschichtigen Effekte durch die Deletion von *sprP* bestätigen die Ergebnisse der

Proteomik und insbesondere der Transkriptomik insgesamt die Vermutung, dass es sich bei SprP um eine Protease mit regulatorischer Funktion handelt. Im Folgenden stehen die Effekte im Mittelpunkt, mithilfe derer bereits analysierte phänotypische Änderungen erklärt werden können sowie die Effekte, die ausgewählte Regulations- und Synthese-Prozesse umfassend betreffen.

Verstärkte Zellaggregation und Biofilmproduktion sowie Verlust der Beweglichkeit

P. aeruginosa präferiert in der Natur das Wachstum in Form von Biofilmen, da die Matrix-eingebetteten Mikroorganismen vor einer Reihe schädlicher Umwelteinflüsse geschützt sind. Der Biofilm schützt die darin lebenden Bakterien u. a. effektiv vor dem Immunsystem, vor antimikrobiellen Substanzen und trägt somit zur Pathogenität von *P. aeruginosa* bei^{76,87,89}. Die Bildung von Zellaggregaten ist eine Biofilm-ähnliche Lebensweise, die vergleichbare Vorteile vermittelt^{96,97}.

Eine der markantesten phänotypischen Änderungen von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 ist die starke Zellaggregation während der gesamten Wachstumsphase (Abb. 3.29; Abb. 3.30). Auch in artifiziellen Umgebungen wie der Kultivierung in Flüssigkulturen wurde die Präferenz für die Bildung dieser Zellaggregate bei *P. aeruginosa* beschrieben⁹⁵. Diese sind mit einer maximalen Größe von 600 μm allerdings wesentlich kleiner als die produzierten Aggregate von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Es handelt sich also um eine atypische Zellaggregation, die aus der *sprP*-Deletion resultiert. Durch die Adhäsion der Zellaggregate an Oberflächen tragen diese maßgeblich zu der Biofilmproduktion bei, die in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ um den Faktor 6,4 erhöht ist (Abb. 3.31).

Die Hauptursache für die starke Zellaggregation und die Biofilmproduktion liegt wahrscheinlich in der reduzierten Konzentration des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO). NO ist ein Nebenprodukt der Denitrifikation, das als diffusionsfähiges Signalmolekül für verschiedene biologische Prozesse fungiert⁴¹⁵ und in der Lage ist, die Biofilmauflösung zu induzieren^{358,416}. Aufgrund der verringerten Expression der Gene, die für die Nitrat- und Nitritreduktase kodieren, wurde vermutet, dass die NO-Konzentration in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ reduziert ist und somit die Fähigkeit dieses bedeutenden Signalmoleküls zur Biofilmauflösung eingeschränkt ist (Abb. 4.3). Diese Vermutung konnte dadurch belegt werden, dass die Zugabe des NO-Donors SNP zu einer Flüssigkultur von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ die Zellaggregation drastisch reduzierte (Abb. 3.40). Eine schwache Zellaggregation konnte allerdings weiterhin beobachtet werden, sodass zusätzliche Faktoren an der Ausbildung dieses Phänotyps beteiligt sind.

Das Signalmolekül NO wird wiederum mit dem sekundären Botenstoff c-di-GMP in Verbindung gebracht⁴¹⁶. Die Zugabe von NO zu planktonischen und in Biofilm-lebenden *P. aeruginosa*-Zellen reduziert die intrazelluläre c-di-GMP Konzentration. Dem sekundären Botenstoff c-di-GMP kommt eine essenzielle Rolle in der Regulation des Übergangs von Sessilität und Motilität zu. Hohe Konzentrationen des c-di-GMP inhibieren die bakterielle Beweglichkeit und induzieren die Biofilmproduktion⁴¹⁷⁻⁴¹⁹. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die NO-induzierte Biofilmauflösung über ein c-di-GMP-abhängiges Regulationsnetzwerk erfolgt⁴¹⁶. Die Diguanylatzyklase SiaD ist an der Synthese von c-di-GMP beteiligt^{365,417}. Die erhöhte Genexpression von *siaD* in *P. aeruginosa* Δ *sprP* resultiert somit wahrscheinlich in einer erhöhten Konzentration des c-di-GMP. Das begünstigt wiederum die sessile Lebensweise.

Weiterhin ist die erhöhte Expression des *cdrAB*-Operons entscheidend an der Ausbildung der Zellaggregate beteiligt (Tab. 3.2). Die Genexpression des *cdrA*-Gens wird u. a. durch das Effektormolekül c-di-GMP induziert³⁶⁶, sodass die Induktion der Genexpression möglicherweise über c-di-GMP erfolgt. CdrA ist ein wichtiger Bestandteil der EPS und fördert durch die Vernetzung mit Polysacchariden die Stabilität des Biofilms^{366,420}. Die Überexpression dieses Operons induziert eine starke Zellaggregation von *P. aeruginosa* in Flüssigkulturen sowie die Biofilmproduktion auf Oberflächen³⁶⁶. Aus diesem Grund ist die erhöhte Expression von *cdrAB* ebenfalls eine Ursache der Zellaggregation und des stark ausgeprägten Biofilms.

Ebenso wie SprP sind intrazelluläre regulatorische Proteasen von *P. aeruginosa* in der Lage, Einfluss auf die Biofilmproduktion nehmen zu können²⁵⁰. *P. aeruginosa*-Stämme, die eine Mutation in den Protease-kodierenden Genen *pfpl*, *clpS*, *clpP* und *lon* besitzen, weisen eine Reduzierung der Biofilmproduktion auf^{247,250}. Diesbezüglich unterscheidet sich also die Deletion von *sprP* im Vergleich zu der Deletion dieser bekannten Proteasen. Ähnlich wie *P. aeruginosa* Δ *sprP* weisen *P. aeruginosa*-Stämme, die Mutationen in den Protease-kodierenden Genen *pfpl*, *clpS*, *clpP* und *lon* besitzen, deutliche Reduzierungen oder Verluste der Bewegungsformen Schwimmen, Schwärmen und *twitching* auf^{247,250}. Bezüglich der Bewegung sind somit große Ähnlichkeiten von SprP zu den bekannten regulatorischen Proteasen aus *P. aeruginosa* vorhanden. Trotz des Verlustes der Beweglichkeit, produziert *P. aeruginosa* Δ *sprP* deutlich mehr Biofilm (Abb. 3.32). Diese inverse Beziehung von Biofilmproduktion und Beweglichkeit in *P. aeruginosa* Δ *sprP* kommt vermutlich dadurch zustande, dass die zahlreichen Zellaggregate an Oberflächen binden und somit deutlich zur Biofilmproduktion beitragen.

Bewegliche Bakterien sind in der Lage, auf Umweltbedingungen zu reagieren, indem sie neue Umgebungen erschließen, toxischen Substanzen entfliehen oder nährstoffreiche Umgebungen

erreichen können. Die Beweglichkeit ist ebenso wie die Biofilmproduktion an der Pathogenität von *P. aeruginosa* beteiligt, da diese u. a. die Verbreitung innerhalb eines infizierten Wirtes ermöglicht^{124,125,421}.

P. aeruginosa $\Delta sprP$ ist nicht mehr fähig, die Bewegungsformen Schwimmen, Schwärmen und *twitching* auszubilden (Abb. 3.32). Vermutlich tragen die Signalmoleküle NO und c-di-GMP dazu bei, dass *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ unbeweglich ist. Verringerte NO-Konzentrationen und erhöhte Konzentrationen des c-di-GMP inhibieren die bakterielle Beweglichkeit^{417,422}. Insbesondere die Schwärmbewegung ist von der Konzentration dieser Moleküle abhängig.

Zudem wurde mittels Proteomik und Transkriptomik gezeigt, dass sowohl die Typ IV-Pili als auch die Flagelle durch die *sprP*-Deletion beeinflusst werden. Diese Zellanhänge nutzt *P. aeruginosa* für die verschiedenen Bewegungsformen^{114,115,118}. Die Expression des *pilA*-Gens, das für das PilA-Untereinheiten der filamentösen Typ IV-Pili kodiert, ist in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ verringert (Tab. 3.1). Ein *pilA*-defizienter Stamm von *P. aeruginosa* ist nicht in der Lage, die *twitching motility* auszubilden und auch das Schwärmverhalten wurde als reduziert beschrieben^{118,119}. Weiterhin wurde demonstriert, dass *P. aeruginosa* $\Delta pilA$ in der Lage ist, Oberflächen unter Bildung starker Zellaggregate zu kolonisieren⁴²³. Somit fördert die verringerte Expression des *pilA*-Gens in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ ebenso die Zellaggregation.

Darüber hinaus wurde das Protein FliC, das ein Bestandteil des Flagellums darstellt⁴²⁴, sowohl im intrazellulären Proteom als auch im extrazellulären Sekretom mit verringerter relativer Proteinmenge identifiziert (Abb. 3.35; Abb. 3.36). FliC wurde im intrazellulären Proteom und im extrazellulären Sekretom identifiziert, da FliC einerseits ein Bestandteil der zellassozierten Flagelle ist und sich andererseits in großen Mengen in den sekretierten äußeren Membranvesikeln von *P. aeruginosa* befindet⁴²⁵. Ein *fliC*-defizienter *P. aeruginosa*-Stamm ist nicht in der Lage, die Flagelle zu synthetisieren und verliert die Fähigkeit des Schwimmens und Schwärmens^{118,119}. Zudem wurde für das Protein FlgL eine verringerte relative Proteinmenge in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ nachgewiesen (Abb. 3.36), das ein Bestandteil des Hakens ist, der das Filament der Flagelle mit dem Motorkomplex verbindet¹¹⁴. Die Deletion des *flgI*-Gens führt in *P. aeruginosa* ebenfalls zum Verlust der Schwärmbewegung⁴²⁶.

Die Beweglichkeit, die Zellaggregation und die Biofilmproduktion sind in *P. aeruginosa* eng miteinander verknüpft. *P. aeruginosa*-Stämme, die eine reduzierte Beweglichkeit besitzen, produzieren Biofilme mit starken Zellaggregaten^{84,427}. Insbesondere der Verlust der Typ IV-Pili führt zur Produktion starker und unstrukturierter Biofilme⁴²⁸. Somit ist auch der Verlust der Beweglichkeit wahrscheinlich an der Ausbildung der Zellaggregate und des starken Biofilms beteiligt.

Nachdem gezeigt wurde, dass das Fehlen von SprP die Ursache phänotypischer Änderungen ist, wurde untersucht, ob diese Änderungen in Folge der fehlenden SprP-Aktivität hervorgerufen werden oder ob der Verlust des Proteins bzw. einer Proteindomäne für die analysierten Effekte verantwortlich sind. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die plasmidvermittelte *sprP*-Expression die Komplementation der analysierten Phänotypen erfolgreich herbeiführt, wurden auf die gleiche Weise verschiedene Überexpressionsvektoren erzeugt. Die Plasmide, die für die SprP-Varianten SprPE262A, SprPH299A, SprPS499A sowie die beiden Varianten mit Deletionsvarianten SprP Δ DUF und SprP Δ S8 kodieren, wurden in *P. aeruginosa* Δ *sprP* eingebracht und deren Fähigkeit zur Komplementation analysiert. Diese SprP-Varianten sind alle proteolytisch inaktiv (Abb. 3.21; Abb. 3.22). Exemplarisch wurde die Komplementation der Zellaggregation qualitativ und des Biofilms quantitativ untersucht (Abb. 3.33; Abb. 3.34). Dabei wurde deutlich, dass ausschließlich die Expression des wildtypischen *sprP*-Gens die Komplementation von *P. aeruginosa* Δ *sprP* erfolgreich herbeiführen kann. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der Verlust der Proteaseaktivität von SprP und nicht das Fehlen des Proteins die Ursache für die phänotypischen Änderungen von *P. aeruginosa* ist. Weiterhin wurde deutlich, dass qualitative Unterschiede der Zellaggregation im Vergleich der verschiedenen Stämme untereinander und zu *P. aeruginosa* Δ *sprP* auftreten (Abb. 3.33). Auch die Biofilmproduktion dieser Stämme unterschied sich voneinander (Abb. 3.34). Die Komplementationsstämme mit den SprP-Varianten SprPH299A und SprPS499A produzierten deutlich mehr Biofilm als *P. aeruginosa* Δ *sprP*. Die übrigen Komplementationsstämme wiesen im Vergleich zu *P. aeruginosa* Δ *sprP* im Rahmen der Standardabweichungen die gleiche Biofilmproduktion auf.

Eine Ursache für die Unterschiede zwischen den verschiedenen Komplementationsstämmen ist die Erzeugung eines Stresszustandes durch die Expression der inaktiven Varianten, der durch die Synthese des aktiven SprP nicht entsteht. Möglicherweise kontrolliert aktives SprP auch die eigene synthetisierte Proteinmenge über Proteolyse. Dieser Stresszustand könnte qualitative Änderungen der Zellaggregation hervorrufen. Gleiches gilt für die beiden Varianten SprP Δ DUF und SprP Δ S8. Zudem könnte bei diesen Varianten eine inkorrekte Lokalisierung einen Stresszustand erzeugen. Beide Domänen des SprP-Proteins, die DUF und die Peptidase S8-Domäne, wurden an die natürliche Signalsequenz des SprP-Proteins fusioniert. Insbesondere bei der Komplementation mit SprP Δ DUF ist ungewiss, ob der erfolgreiche Transport über die cytoplasmatische Membran erfolgen kann.

Beeinträchtigung des anaeroben Wachstums (Denitrifikation)

In Abwesenheit von Sauerstoff und der Gegenwart von Nitrat oder Nitrit ist der fakultativ anaerobe Organismus *P. aeruginosa* in der Lage, mittels Denitrifikation zu wachsen¹³². Diese Fähigkeit ermöglicht es *P. aeruginosa*, erfolgreich den nitrat- und nitritreichen zähflüssigen, überwiegend anaeroben Mukus in den Bronchien von CF-Patienten zu kolonisieren^{128,429}.

Die Denitrifikation gehört zu den zellulären Prozessen, die von der *sprP*-Deletion stark betroffen sind, da eine große Anzahl der Gene in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ verringert exprimiert werden (Tab. 3.1). Die an der Denitrifikation beteiligten Gene sind in fünf Operons lokalisiert. Die Expression von drei dieser fünf Operons wird durch die *sprP*-Deletion negativ beeinflusst (Abb. 4.3). Zu den betroffenen Genen gehören die Gene *narK1*, *narK2*, *narJ*, *narH* und *narG* des *nar*-Operons, die Gene *nirN*, *nirJ*, *nirL*, *nirF* und *nirS* des *nir*-Operons sowie die Gene *nosZ* und *nosD* des *nos*-Operons. Das *nar*-Operon kodiert für die Nitratreduktase (NarGHI) und Transportproteine (NarK1K2)^{140,430}. NarJ ist an dem Aufbau der Nitratreduktase beteiligt¹³². Das *nir*-Operon kodiert für die Nitritreduktase (NirS), für potenzielle Elektronendonoren (*nirMC*) und für Enzyme, die essenziell für die Biosynthese des NirS-Kofaktors Häm d_1 sind (*nirFDLGHJE*)⁴³¹⁻⁴³³. NirN ist möglicherweise an der Übertragung von Häm d_1 auf NirS beteiligt⁴³². Das *nos*-Operon kodiert für die Distickstoffmonoxidreduktase (NosZ), einen Regulator der Reduktaseaktivität (NosR) und die Enzyme, die vermutlich an der Biogenese der Cu_z-Zentren der Distickstoffmonoxidreduktase beteiligt sind (NosDFY)^{434,435}. Die Funktion von NosL ist nicht bekannt.

Im Verlauf der Denitrifikation wird Nitrat über vier sukzessive Schritte zu molekularem Stickstoff reduziert. Durch die Aktivität der Nitrat- und Nitritreduktase entsteht das Signalmolekül NO, dessen Funktion bereits im Zusammenhang mit der Zellaggregation und der Biofilmproduktion diskutiert wurde. Die reaktive Stickstoffspezies NO wirkt bei hohen Konzentrationen toxisch und da eine Akkumulation dieses Stoffes infolgedessen vermieden werden muss, wird die Expression der Gene der *nir*-, *nor*- und *nos*-Operons vor der des *nar*-Operons induziert³⁵⁹.

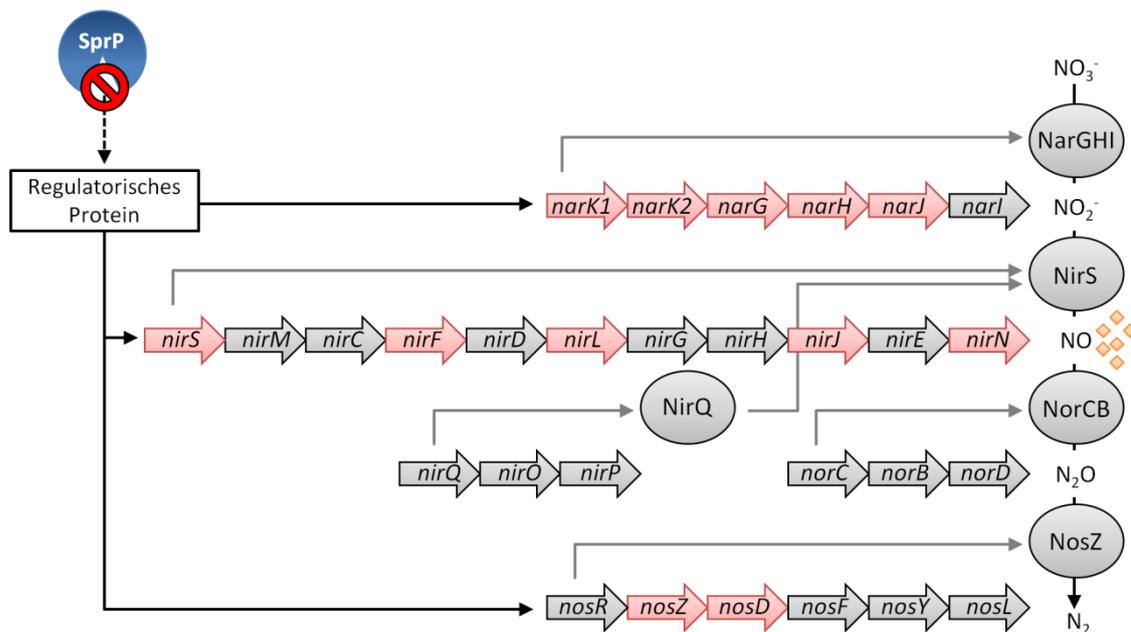


Abb. 4.3 Modell der Denitrifikation in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Dargestellt sind die fünf Operons, die an der Denitrifikation beteiligt sind. Über ein unbekanntes Signal hat das Fehlen von SprP einen direkten oder indirekten Einfluss auf ein regulatorisch wirkendes Protein. Das resultiert in der verringerten Expression der in Rot dargestellten Gene. Diese Gene kodieren u. a. für die vier Reduktasen der Denitrifikation. Die verringerte Expression beeinträchtigt die Fähigkeit von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$, unter anaeroben Bedingungen wachsen zu können und verursacht vermutlich eine reduzierte Konzentration des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO). Die Funktion von NO als Signalmolekül ist in Orange illustriert (modifiziert nach Schobert & Jahn¹³⁸). Schwarze Linie = direkter Zusammenhang, unterbrochene schwarze Linie = direkter oder indirekter Zusammenhang, graue Linie = aus dem Operon resultierendes Protein, Rot = verringerte Expression.

Für die vergleichende Transkriptomanalyse wurden die Stämme in Flüssigkulturen (Erlenmeyerkolben) unter aeroben Bedingungen kultiviert. Nach der Identifizierung der verringerten Expression der Gene für die Denitrifikation wurde mittels quantitativer *real-time* PCR näher untersucht, wie stark die Gene der Denitrifikation während der aeroben Kultivierung exprimiert werden. Die Analyse ausgewählter Gene der Denitrifikation bestätigte zunächst, dass die Gene *narK1* (31,7 x), *nirS* (9,2 x) sowie *nosZ* (6,5 x) in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 verringert exprimiert werden (Abb. 3.38 A). Während vergleichende Analysen nur relative Mengen darstellen können, wurden zudem absolute Transkripte der ausgewählten Gene bestimmt (Abb. 3.38 B). Schließlich ist nicht ausgeschlossen, dass Gene des anaeroben Wachstums unter aeroben Bedingungen so gering exprimiert werden, dass selbst signifikante Änderungen der relativen Transkriptmengen bezogen auf die reale Konzentration der Transkripte keinen Einfluss auf den Phänotypen haben. Die Anzahl der Transkripte von *narK1*, *nirS* und *nosZ* befindet sich in einem ähnlichen Größenbereich wie die Transkriptzahlen des konstitutiv exprimierten *housekeeping*-Gens *rpoD* ($2,32 \times 10^5$ Transkripte/100 ng RNA). Somit wurde demonstriert, dass die Gene der Denitrifikation auch bei aeroben Kultivierung

exprimiert werden. Das liegt zum einen daran, dass während der Flüssigkultivierung in Erlenmeyerkolben Sauerstofflimitationen auftreten, da trotz des Schüttelns bei schnellwachsenden Kulturen nicht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht⁴³⁶. Zum anderen ist bekannt, dass *P. aeruginosa* auch in Gegenwart von Sauerstoff die Denitrifikation zur Energiegewinnung nutzen kann⁴³⁷.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurde untersucht, ob *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 ein Wachstumsdefizit unter anaeroben Bedingungen aufweist. Es konnte der aufgestellten Hypothese entsprechend demonstriert werden, dass *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ unter anaeroben Bedingungen um den Faktor 1,3 schlechter wachsen kann als *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. 3.39). Dieses Wachstumsdefizit verdeutlicht, dass die Denitrifikation durch die *sprP*-Deletion nicht vollständig zum Erliegen kommt, da das Wachstum unter anaeroben Bedingungen weiterhin möglich ist. Die Deletion essenzieller Gene der Denitrifikation führt hingegen zu einem vollständigen Verlust der Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen wachsen zu können³⁵⁷.

Interessanterweise ist die Genexpression aller bisher bekannter Regulatoren der Denitrifikation RhIR, NarX, NarL, Anr und Dnr (Abb. 1.3) durch die *sprP*-Deletion nicht beeinflusst. Dennoch ist die Expression der von diesen Regulatoren kontrollierten Operons betroffen. Als regulatorische Protease wird SprP auf Proteinebene aktiv, indem SprP z. B. Transkriptionsfaktoren, Sigmafaktoren oder andere Enzyme degradiert, sodass der regulatorische Effekt auf Transkriptionsebene nicht zwingend nachweisbar sein muss. Möglicherweise könnten aber auch weitere bislang unbekannte Regulatoren an der Genexpression beteiligt sein, die zu den analysierten Effekten führen.

Die Beteiligung von SprP am anaeroben Wachstum von *P. aeruginosa* konnte hier erstmals demonstriert werden. Dadurch gewinnt die vorhergesagte Bindestelle des Anr-Regulators stromaufwärts von *pa1241* an Bedeutung (Abb. 4.2). Sollte Anr tatsächlich mit dieser Bindestelle *in vivo* interagieren, würde die *sprP*-Expression im Falle der gemeinsamen Transkription mit *pa1241* direkt über den Hauptregulator der Denitrifikation reguliert werden.

Ein weiteres Protein, das mit der Denitrifikation in Verbindung gebracht und in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ differenziell produziert wird, ist das äußere Membranporin OprF. Neben der Lokalisierung in der äußeren Membran ist dieses Protein außerdem eines der häufigsten Proteine innerhalb der sekretierten Membranvesikel⁴²⁵. OprF ist ein wichtiger zellulärer Bestandteil für das optimale Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen und essenziell für das Wachstum in anaeroben Biofilmen^{127,438}. Vermutlich fungiert OprF als Permease für die Nitrat- und/oder Nitrit-Aufnahme, die wiederum für die Denitrifikation benötigt werden^{127,429}.

Außerdem wurde demonstriert, dass die Nitritreduktase NirS in einem *oprF*-defizienten Stamm nicht funktionell ist¹²⁷. OprF wurde im intrazellulären Proteom mit erhöhter und im extrazellulären Sekretom mit verringerter Proteinmenge identifiziert (Abb. 3.35; Abb. 3.36). Möglicherweise reagiert *P. aeruginosa* Δ *sprP* auf die verringerte Expression der Gene der Denitrifikation mit einem gesteigerten Einbau von OprF in die äußere Membran und einer verringerten Entlassung des Proteins in den Überstand, um ausreichend Nitrat und/oder Nitrit für die Zelle verfügbar machen zu können. Die exakte Funktion von OprF im Bezug auf die Denitrifikation ist allerdings nicht geklärt.

Die Bedeutung von SprP für das anaerobe Wachstum im Allgemeinen wird durch den Einfluss auf die *pa3912*- und *pa3913*-Expression deutlich (Tab. 3.1). Diese Gene werden in *P. aeruginosa* Δ *sprP* verringert exprimiert. Das Gen *pa3912* kodiert für ein hypothetisches Protein und *pa3913* kodiert für eine potenzielle Protease¹⁶. Die Deletion dieser Gene führt zum Verlust der Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen wachsen zu können³⁵⁷ und somit trägt die verringerte Genexpression in *P. aeruginosa* Δ *sprP* wahrscheinlich ebenfalls zu dem Wachstumsdefizit unter anaeroben Bedingungen bei.

Verstärkte Sekundärmetabolitsynthese: Rhamnolipide und Pyoverdine

Für die weitere Charakterisierung des *sprP*-defizienten *P. aeruginosa*-Stammes wurde die Produktion der Biotenside untersucht, da diese mit der Beweglichkeit und der Biofilmproduktion in Verbindung stehen. Die bekanntesten Biotenside von *P. aeruginosa* sind die Rhamnolipide (RL). Diese fördern die Ausbildung einer strukturierten Biofilmarchitektur und die Schwärmbewegung, da sie in der Lage sind, die Oberflächenspannung zwischen den Bakterien und der semisoliden Oberfläche zu reduzieren^{100,111,112}.

Die Gene der Rhamnolipidsynthese werden durch zwei Operons kodiert. Das Operon *rhIAB* kodiert für den Rhamnosyltransferase I Enzymkomplex RhIAB, der für die Synthese der Mono-RL verantwortlich ist. RhIA katalysiert die Veresterung von zwei β -Hydroxycarbonsäuren zu HAA^{100,439}. RhIB katalysiert anschließend die β -glycosidische Bindung von einem Molekül dTDP-L-Rhamnose mit der 3-Hydroxygruppe der HAA unter Abspaltung des dTDP^{100,107}. Die Synthese der Di-RL erfolgt anschließend über die Aktivität von RhIC, das die glycosidische Bindung von einem Mono-RL und einem Molekül dTDP-L-Rhamnose unter Abspaltung des dTDP katalysiert¹⁰⁸. Das Gen *rhIC* ist zusammen mit dem Gen *pa1131* in einem Operon lokalisiert. Die Funktion des Proteins PA1131 ist unbekannt, aber es wird vermutlich an der Sekretion der Rhamnolipide beteiligt sein¹⁰⁸.

Die Rhamnolipidproduktion steht unter der direkten Kontrolle des QS-Systems, denn RhIR aktiviert die Expression von *rhIAB*⁴⁴⁰. Für die Produktion der Rhamnolipide ist die Regulation der *rhIAB*-Expression die entscheidende Stelle. Genau dieses Operon wird in *P. aeruginosa* Δ *sprP* verstärkt exprimiert (Tab. 3.2). Zahlreiche weitere Faktoren sind an der transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation beteiligt. Ein weiterer positiver Regulator des *rhIAB*-Operons ist der Sigmafaktor RpoS, der die Genexpression vermutlich indirekt reguliert^{109,110}. RpoS wird in der spätexponentiellen- bzw. stationären Wachstumsphase und unter diversen Stressbedingungen aktiv⁴⁴¹. Die Genexpression von *rpoS* ist in *P. aeruginosa* Δ *sprP* um den Faktor 2,1 erhöht (Tab. 3.2). Diese erhöhte Expression führt sehr wahrscheinlich zu der erhöhten Expression des Operons *rhIAB* in *P. aeruginosa* Δ *sprP* und somit zu der verstärkten Rhamnolipidsynthese. Die Quantifizierung der Rhamnolipide ergab, dass die Konzentration in *P. aeruginosa* Δ *sprP* im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 um den Faktor 2 erhöht ist (Abb. 3.41). Da nur die Gene *rhIAB*, aber nicht die Gene *rhIC-pa1131* verstärkt exprimiert werden, wurde erwartet, dass die Menge an Mono-RL in *P. aeruginosa* Δ *sprP* erhöht ist. Dies konnte mittels Dünnschichtchromatografie bestätigt werden (Abb. 3.42). Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* PAO1, der keine nachweisbaren Mono-RL produzierte, waren in *P. aeruginosa* Δ *sprP* geringe Mengen der Mono-RL nachweisbar. Es konnte allerdings auch eine deutlich erhöhte Menge der Di-RL nachgewiesen werden. Sehr wahrscheinlich ist die Mono-RL-Konzentration in *P. aeruginosa* für die Produktion der Di-RL limitierend und durch die verstärkte Synthese der Mono-RL in *P. aeruginosa* Δ *sprP* ist das vorhandene RhIC in der Lage, die Synthese der Di-RL verstärkt zu katalysieren.

P. aeruginosa-Stämme, die keine Rhamnolipide produzieren sind außerstande die Schwärmbewegung auszubilden¹¹⁸. Trotz der positiven Wirkung der Rhamnolipide auf das Schwärmverhalten, ist die gesteigerte Rhamnolipidproduktion in *P. aeruginosa* Δ *sprP* nicht fähig, die Beweglichkeit des *sprP*-defizienten Stammes zu fördern. Demzufolge sind die Verluste der Beweglichkeit auf andere Ursachen zurückzuführen wie z. B. der bereits oben diskutierten beeinflussten Funktionalität der Zellanhänge.

Die Pyoverdininproduktion ist ein weiterer zellulärer Prozess, der durch die *sprP*-Deletion stark betroffen ist (Tab. 3.2). Das für die Namensgebung von *P. aeruginosa* verantwortliche gelbgrün-fluoreszierende Siderophor wird sekretiert und dient der Sicherung des Eisenhaushaltes^{13,151}. Pyoverdine besitzen eine hohe Affinität für Fe³⁺-Ionen und sind in der Lage, diese zu komplexieren. Die Komplexe werden anschließend von *P. aeruginosa* über spezifische äußere Membranrezeptoren aufgenommen¹⁴⁷. Die Verfügbarkeit von Eisen ist für Bakterien von großer Bedeutung, da zahlreiche Enzyme mit Eisen-Schwefel-Clustern auf diese Ionen angewiesen

sind¹⁴⁵. Neben der Komplexbildung von Eisen fungieren Pyoverdine auch als Signalmoleküle, da sie die Expression der eigenen und weiterer Gene durch die Induktion einer Signalkaskade steuern¹⁶⁰. Da Pyoverdine die Genexpression von mindestens drei Virulenzfaktoren induzieren und während einer Infektion mit dem Wirt um das verfügbare Eisen konkurrieren, werden diese als Virulenzfaktoren betrachtet¹⁶¹⁻¹⁶⁴.

Die intensivere Grünfärbung von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 während der Kultivierung deutete eine erhöhte Pyoverdinproduktion an. Aufgrund dieser Beobachtung und der erhöhten Genexpression zahlreicher Gene der Pyoverdinproduktion wurde der zellfreie Überstand von *P. aeruginosa* im Hinblick auf die sekretierten Pyoverdine untersucht. Die starke Grünfärbung und die Fluoreszenz des Überstands bei Bestrahlung mit UV-Licht waren deutliche Hinweise auf die verstärkte Produktion und Sekretion von Pyoverdinen in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ (Abb. 3.43 A). Die Quantifizierung der im Überstand befindlichen Pyoverdine demonstrierte daraufhin, dass die Pyoverdinkonzentration in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 um den Faktor 5,1 erhöht ist (Abb. 3.43 B).

Der Ursprung der erhöhten Pyoverdinproduktion liegt sehr wahrscheinlich in der erhöhten Expression der Gene, die für die beiden ECF-Sigmafaktoren PvdS und Fpvl kodieren (Abb. 4.4). Die Bindung dieser ECF-Sigmafaktoren an die RNA-Polymerase induziert die Expression spezifischer Gene. Fpvl induziert die Expression des Gens *fpvA*, das für den Pyoverdin-Membranrezeptor kodiert^{155,442,443}. PvdS induziert die Expression aller Gene, deren Produkte an der Pyoverdinsynthese beteiligt sind⁴⁴⁴. Zu den Pyoverdinsynthese-Genen mit erhöhter Expression gehören *pvdA*, *pvdN*, *pvdO*, *pvdL* und *pvdH* (Tab. 3.2). PvdA ist an der Bildung der Peptidkette des Pyoverdins beteiligt⁴⁴⁵. Die Funktion von PvdN und PvdO ist unbekannt, aber sie sind essenziell für die Pyoverdinproduktion, da deren Verlust die Synthese verhindert¹⁵⁷. Die Aminotransferase PvdH produziert die für die Pyoverdinsynthese notwendige L-2,4-Diaminobuttersäure⁴⁴⁶. Die nicht-ribosomale Peptid-Synthetase PvdL ist an der Synthese des Pyoverdin-Chromophors beteiligt⁴⁴⁷. Insgesamt führen diese Änderungen der Genexpression essenzieller Gene zu der erhöhten Pyoverdinproduktion, die in den Überständen von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ nachgewiesen werden konnte. Das sekretierte Pyoverdin bindet nach der Eisenkomplexbildung an den äußeren TonB-abhängigen Membranrezeptor FpvA. Dieser interagiert mit dem Anti-Sigmafaktor FpvR im Periplasma, dessen Genexpression in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ ebenfalls erhöht ist und der die Aktivität der beiden ECF-Sigmafaktoren PvdS und Fpvl inhibiert⁴⁴². Durch die Bindung des Pyoverdins wird ein Signal auf die cytoplasmatische Domäne des FpvR übertragen und die beiden ECF-Sigmafaktoren werden infolgedessen aktiviert^{160,442}.

Trotz der erhöhten Expression des *fpvR*-Gens, dessen Genprodukt zur Inhibierung der PvdS-Aktivität führt, findet eine erhöhte Pyoverdinproduktion statt. Es wird vermutet, dass ein stöchiometrisches Verhältnis der an der Signalkaskade beteiligten Sigmafaktoren vorliegen muss⁴⁴². Aus diesem Grund kann trotz der Überproduktion des Anti-Sigmafaktors wegen eines Ungleichgewichtes des Anti-Sigmafaktors und der ECF-Sigmafaktoren, insgesamt die Expression der Pyoverdinsynthese-Gene induziert werden.

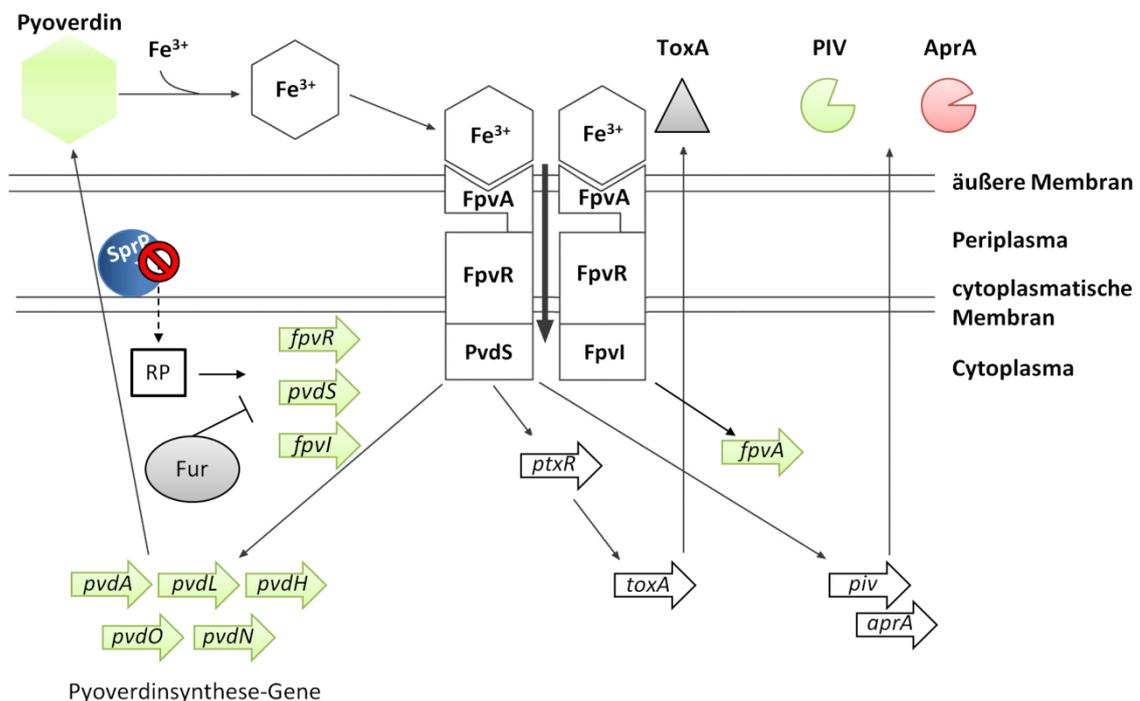


Abb. 4.4 Modell der Pyoverdinproduktion in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Dargestellt ist das Modell der Pyoverdinproduktion in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ mit der Signalkaskade über FpvA, FpvR und PvdS/FpvI sowie ausgewählte Gene, die über diese Signalkaskade reguliert werden. Das Fehlen von SprP beeinflusst über einen direkten oder indirekten Mechanismus die Aktivität eines regulatorisch wirkenden Proteins. Das führt zu einer erhöhten Expression der Gene, die für die ECF-Sigmafaktoren PvdS und FpvI kodieren. Infolgedessen wird die Genexpression von *fpvA* und der Pyoverdinsynthese-Gene, deren Induktion zu einer verstärkten Pyoverdinproduktion führt, induziert. Der Hauptregulator der Eisenaufnahme Fur, der u. a. die Expression von *fpvR*, *pvdS* und *fpvI* reguliert, ist ebenfalls dargestellt. In Abhängigkeit von PvdS wird direkt oder indirekt die Genexpression von *toxA*, *piv* und *aprA* reguliert. PIV wurde mit erhöhter und AprA mit verringerter relativer Proteinmenge in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ identifiziert (modifiziert nach Beare *et al.*⁴⁴² und Lamont *et al.*¹⁶⁰). RP = regulatorisches Protein, Grün = erhöhte Expression, erhöhte relative Protein- oder Pyoverdinmenge, Rot = verringerte relative Proteinmenge, Linie = direkter Zusammenhang, unterbrochene Linie = direkter oder indirekter Zusammenhang.

Die Pyoverdinproduktion wird in *P. aeruginosa* über den übergeordneten Transkriptionsregulator der Eisenaufnahme Fur reguliert. Die negative Regulation des Fur-Regulons geschieht direkt oder indirekt über die Repression der Genexpression von ECF-Sigmafaktoren wie z. B. PvdS oder anderen Transkriptionsregulatoren¹⁵⁵. Fur benötigt

intrazelluläre Fe^{2+} -Ionen als Kofaktor, um aktiv zu sein. Bei niedrigen intrazellulären Eisenkonzentrationen ist Fur inaktiv und die Expression der Fur-regulierten Gene findet statt^{444,448}. In *P. aeruginosa* existieren vermutlich 11 ECF-Sigmafaktoren, die Fur-reguliert sind⁴⁴⁹. In *P. aeruginosa* ΔsprP werden nur die beiden ECF-Sigmafaktoren *pvdS* und *fpvI* sowie der Anti-Sigmafaktor *fpvR* differenziell exprimiert, sodass der regulatorische Einfluss von SprP in der Ebene zwischen Fur und PvdS/Fpvl/FpvR stattfinden sollte.

Anders als lange Zeit angenommen ist Fur nicht der einzige Regulator der Genexpression von *pvdS*. Die Transkriptionsregulatoren MvaT und CysB binden ebenfalls an den Promotor von *pvdS* und zumindest für den Transkriptionsregulator CysB wurde eine positive Regulation der *pvdS*-Expression nachgewiesen³⁹⁵. Außerdem wird die PvdS-Konzentration über Proteolyse reguliert⁴⁵⁰. Bei Bedingungen, die keine Pyoverdinsynthese erfordert, bindet der cytoplasmatische Teil des FpvR den ECF-Sigmafaktor PvdS und macht PvdS dadurch anfällig für die Degradation durch Proteolyse⁴⁵⁰. Auf diese Weise wird die Expression der Pyoverdinsynthese-Gene unterbunden. Diese Erkenntnisse zeigen, dass auf dieser Regulationsebene weitere Faktoren an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Vermutlich greift SprP auf dieser Regulationsebene durch die Prozessierung von regulatorischen Proteinen in die Regulation ein (Abb. 4.4).

Der Einfluss der *sprP*-Deletion auf die Pyoverdinproduktion wird weiterhin dadurch deutlich, dass die Gene *pa2403*, *pa2404* und *pa2405* in *P. aeruginosa* ΔsprP verstärkt exprimiert werden, die ebenfalls Teil des Pyoverdin-Locus sind^{153,363}. Diese Gene gehören zu dem *pa2403-10* Gen-Cluster, das für ein putatives ABC-Transportsystem sowie weitere putative cytoplasmatische Membranproteine kodiert. Dieses Gen-Cluster wird über die drei ECF-Sigmafaktoren PA0149, PA2050 und PvdS reguliert^{152,153,363}. Die Ursache für die erhöhte Genexpression in *P. aeruginosa* ΔsprP liegt sehr wahrscheinlich ebenfalls an der erhöhten *pvdS*-Expression. Die Art der Beteiligung der Genprodukte des *pa2403-10* Gen-Clusters an der Pyoverdinproduktion ist allerdings bislang unbekannt⁴⁵¹.

Auf Grundlage der hier erzielten Erkenntnisse zur physiologischen Charakterisierung werden die zellulären Prozesse, die in Abhängigkeit von SprP reguliert werden, in einem Modell zusammengefasst:

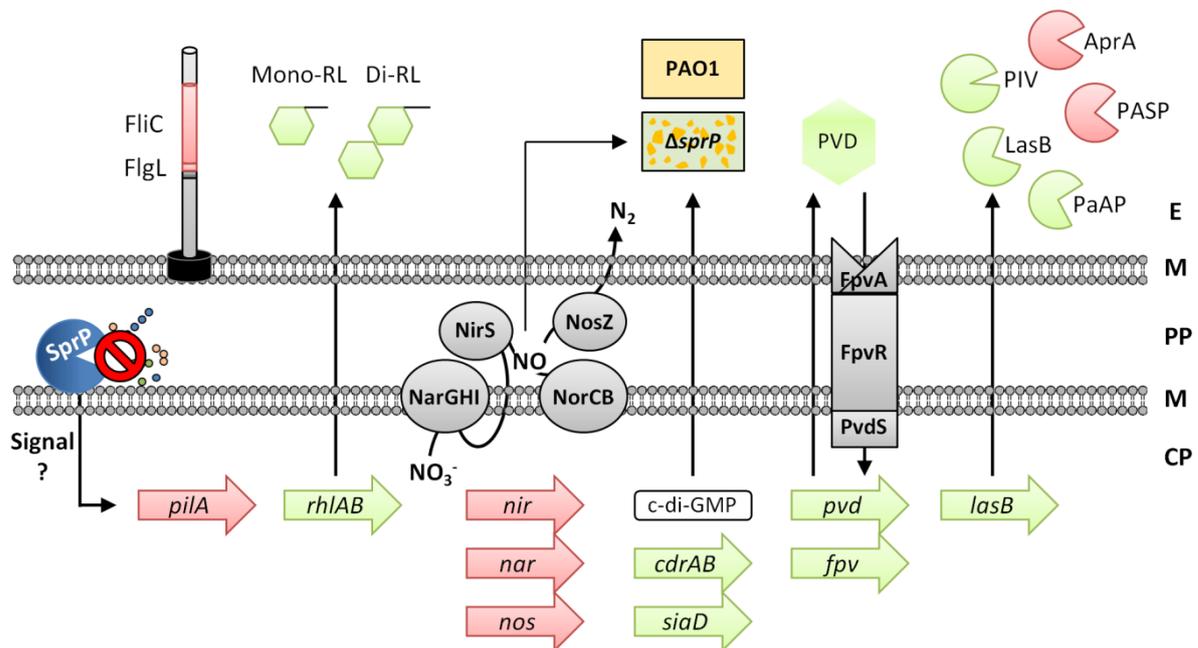


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der Auswirkungen der *sprP*-Deletion in *P. aeruginosa*. Dargestellt sind ausgewählte Gene, Proteine und Sekundärmetabolite, die in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ quantitative Änderungen aufweisen. SprP ist sehr wahrscheinlich ein extracytoplasmatisches, peripheres Membranprotein. Das Signal, das durch das Fehlen von SprP zur differentiellen Genexpression der dargestellten Gene und zur differentiellen Synthese der dargestellten Proteine führt, ist bislang unbekannt. Die verringerte Genexpression von *pilA* sowie die geringere Menge FlhC und FlgL (Flagellenbestandteile) beeinflussen die Beweglichkeit von *P. aeruginosa* negativ. Die erhöhte Genexpression von *rhIAB* resultiert in einer verstärkten Produktion von Mono- und Di-Rhamnolipiden. Die verringerte Expression zahlreicher *nir*-, *nar*- und *nos*-Gene reduziert die Fähigkeit von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$, unter anaeroben Bedingungen wachsen zu können. Diese verringerte Genexpression resultiert sehr wahrscheinlich in einer geringeren Synthese der Reduktasen NarGHI, NirS und NosZ, durch deren Aktivität u. a. das Signalmolekül NO gebildet wird. Die geringere Konzentration dieses Signalmoleküls begünstigt die Zellaggregation und somit die sessile Lebensweise. Die erhöhte Expression von *cdrAB* und *siaD* fördert vermutlich über einen c-di-GMP regulierten Mechanismus die Zellaggregation von *P. aeruginosa* $\Delta sprP$. Die Induktion der Genexpression zahlreicher *pvd*- und *fpv*-Gene verursacht eine verstärkte Produktion der Pyoverdine, die zu einer intensiven Grünfärbung der *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ -Kulturen führt. Eine erhöhte *lasB*-Expression²⁶¹ resultiert in einer verstärkten Produktion von LasB. Neben LasB werden die Proteasen PaAP sowie PIV verstärkt sekretiert und AprA sowie PASP verringert sekretiert. Grün = erhöhte Menge in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$, Rot = verringerte Menge in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$, RL = Rhamnolipide, PVD = Pyoverdin, E = extrazellulär, M = Membran, PP = Periplasma, CP = Cytoplasma.

Die physiologische Charakterisierung der Subtilase SprP aus *P. aeruginosa* veranschaulicht erstmals, dass SprP an der Kontrolle zahlreicher Phänotypen und zellulärer Prozesse beteiligt ist. Insbesondere die Transkriptomanalyse zeigte, dass die Deletion von *sprP* einen weitreichenden Einfluss hat, da das Fehlen von *sprP* die differentielle Genexpression von 218 Genen zur Folge

hat. Dieser starke regulatorische Einfluss einer Protease auf die Expression vieler Gene ist vergleichbar mit den Transkriptomanalysen von klassischen regulatorischen Proteasen, die zelluläre Prozesse regulieren und an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind⁴⁵². Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass SprP besonders bei hohen Temperaturen aktiv ist, eine Präferenz für die Hydrolyse basischer sowie hydrophober Peptide besitzt und die *sprP*-Promotoraktivität hitzeinduziert ist. Auch diese Eigenschaften sind für Proteasen bekannt, die an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind^{403,453}. Insgesamt kann auf Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse der Subtilase SprP eine Funktion als regulatorischer Protease zugeteilt werden, die sehr wahrscheinlich auch an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt ist.

Der Nachweis und die Charakterisierung der pleiotropen Funktionen der Subtilase SprP als neues, wichtiges Mitglied im komplexen Regulationsnetzwerk von *P. aeruginosa* ist die essenzielle Erkenntnis dieser Arbeit. Darüber hinaus wurden durch diese Arbeit zahlreiche zukünftige Fragestellungen der *P. aeruginosa*-Forschung erarbeitet. In diesem Zusammenhang ist z. B. die Frage von Interesse, mithilfe welcher Signale SprP die Genexpression der gezeigten Prozesse beeinflusst. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen jedoch auch anwendungsbezogenes Potenzial. So stellt aus medizinischer Sicht die Expression von *sprP* ein potenzielles Target in der Bekämpfung von *P. aeruginosa* dar. Die Manipulation regulatorischer Proteasen durch spezifische Wirkstoffe, die zu einer unkontrollierten Aktivierung und somit schädigenden Aktivität der Proteasen führt, ist ein vielversprechender Ansatz für die Bekämpfung bakterieller Erreger^{454,455}. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *sprP* zu einer signifikanten Erhöhung der Produktion von Sekundärmetaboliten führt, was aus biotechnologischer Sicht bedeutsam sein könnte.

5 Zusammenfassung

Das ubiquitäre und äußerst vielseitige Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist aufgrund seiner humanpathogenen Eigenschaften sowie seines Potenzials zur Produktion von Enzymen und Metaboliten von übergeordnetem wissenschaftlichen Interesse. Zur Pathogenität des Bakteriums tragen die Produktion zahlreicher Virulenzfaktoren, die schnelle Anpassung an diverse Umweltbedingungen und die hohe intrinsische Resistenz gegenüber Antibiotika bei. Diese Eigenschaften werden über eines der komplexesten bekannten bakteriellen Regulationsnetzwerke vermittelt. Die Regulation zellulärer Prozesse findet jedoch nicht ausschließlich über die Regulation der Genexpression statt, sondern auch auf Proteinebene über eine Protease-vermittelte Regulation. Bakterielle Proteasen übernehmen dabei häufig Schlüsselrollen, indem sie u. a. missgefaltete Proteine degradieren und die Konzentration von Chaperonen, Transkriptionsregulatoren sowie Sigmafaktoren kontrollieren.

Die Protease SprP ist ein neuer, sehr ungewöhnlicher Protease-Vertreter, deren umfassende Charakterisierung im Mittelpunkt dieser Arbeit stand. Anhand detaillierter *in silico* Analysen konnte das modular aufgebaute Enzym einer neuen Subtilase-Familie zugeordnet werden, die im Wesentlichen nur in Pseudomonaden zu finden ist. Diese Familie zeichnet sich insbesondere durch eine große N-terminale Domäne unbekannter Funktion (DUF) aus, für deren Funktion als Propeptid zur autokatalytischen Aktivierung der Protease, hier erste Hinweise erzielt werden konnten. SprP ließ sich nicht durch konventionelle Expressionsmethoden funktional darstellen. Die lösliche und aktive Produktion konnte nur mithilfe eines neuartigen *E. coli* Typ I-Sekretionssystems auch im präparativen Maßstab erfolgreich durchgeführt werden. Darüber hinaus gelang auch eine Optimierung der Reinigungsmethode mittels Affinitätschromatographie. Durch *in vitro* Experimente mit gereinigtem Protein konnte erstmals die autokatalytische Prozessierung nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht des aktiven SprP-Enzyms wurde nach Größenausschlusschromatographie mit ca. 26 kDa bestimmt.

Die biochemische Analyse ergab, dass die optimale enzymatische Aktivität von SprP *in vitro* bei einer Temperatur von 50 °C sowie einem pH-Wert von 7 - 8 erreicht wird. Durch Inhibitionsstudien und Analyse von in dieser Arbeit rational erzeugten SprP-Varianten konnte gezeigt werden, dass SprP eine Serinprotease ist und zu der selteneren E-H-S Familie der Subtilasen gehört. Zur Erstbeschreibung der Spezifität von SprP wurde eine Peptidbibliothek verwendet und das Substratspektrum auf Peptide eingegrenzt, deren Erkennungssequenzen basische und hydrophobe Aminosäuren aufweisen.

Umfangreiche *sprP*-Expressionsstudien demonstrierten, dass die Promotoraktivität von *sprP* als Reaktion auf Temperaturstress induziert wird. SprP ist somit ein Bestandteil der Stressantwort von *P. aeruginosa*.

Der Vergleich der Eigenschaften eines *sprP*-defizienten Stammes mit einem *P. aeruginosa* Wildtyp war die Grundlage dafür, SprP eine globale physiologische Rolle zuzuweisen. Durch systembiologische Proteom- und Transkriptomanalysen konnte die übergeordnete physiologische Funktion von SprP eindrucksvoll untermauert werden. Allein durch Transkriptomanalysen konnte erstmals gezeigt werden, dass die *sprP*-Deletion die differenzielle Expression von 218 Genen zur Folge hat.

Die umfassende Analyse weiterer pleiotroper Auswirkungen der *sprP*-Deletion machte die Funktion der Subtilase SprP in *P. aeruginosa* deutlich. Die Deletion des Subtilase-Gens führt (I) zu einer starken Zellaggregation von *P. aeruginosa* während der Flüssigkultivierung, (II) zu einer erhöhten Biofilmproduktion, (III) zu dem Verlust der Beweglichkeit, (IV) zu einem reduzierten Wachstum unter anaeroben Bedingungen, (V) zu einer erhöhten Rhamnolipidproduktion sowie (VI) zu einer erhöhten Pyoverdininproduktion.

Die systematischen Untersuchungen der Subtilase SprP veranschaulichen hier erstmalig, dass dieser Protease eine bedeutende Funktion innerhalb des komplexen Regulationsnetzwerkes von *P. aeruginosa* zukommt. Als regulatorische Protease stellt SprP ein neues bedeutendes Mitglied dieses Netzwerkes dar, das in *P. aeruginosa* und vermutlich auch in anderen Pseudomonaden an der Kontrolle diverser zentraler zellulärer Prozesse beteiligt ist.

6 Summary

The ubiquitous and versatile bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is of great scientific interest due to its pathogenicity and the capability to produce enzymes and metabolites. The pathogenicity is largely caused by the production of an arsenal of virulence factors, a rapid adaptation to several environments and a high intrinsic level of antibiotic resistance. These properties are regulated by one of the most complex bacterial regulatory networks known. The regulation of cellular processes is carried out not only on gene expression level but also on protein level by regulatory proteases. Bacterial proteases often play key roles in this process for instance by degradation of misfolded proteins and controlling the concentration of chaperones, transcriptional regulators and also sigma factors.

The protease SprP is a novel, uncommon representative of proteases whose extensive characterization is the main focus of this work. By the means of detailed *in silico* analysis, it was possible to assign this modular structured enzyme to a family of novel subtilases that is found primarily in pseudomonads. This newly identified family is characterized by a large N-terminal domain of unknown function (DUF). It was possible to obtain reasonable indications that this domain possibly functions as propeptide for autocatalytic activation of the protease. The functional production of SprP could not be attained using conventional expression systems. The soluble and active production on a preparative scale has been achieved by means of a novel *E. coli* type I secretion system. Furthermore, the purification was optimized by employing affinity chromatography. *In vitro* experiments with the purified protein demonstrated the autocatalytic processing for the first time. The molecular weight of the active SprP enzyme was determined after size exclusion chromatographic analysis as approximately 26 kDa.

The biochemical analysis showed that the optimal *in vitro* enzyme activity of SprP is reached at a temperature of 50 °C and pH values between 7 - 8. Inhibitor studies and the analysis of rational designed SprP variants revealed that SprP belongs to the serine proteases and to the less common E-H-S family of subtilases. For an initial description of the SprP specificity, a peptide library was used and the substrate specificity was found to be for peptides whose recognition sequence is composed of basic and hydrophobic amino acids.

Extensive *sprP* expression studies demonstrated that the promoter activity of *sprP* is induced as reaction to temperature stress. Consequently, SprP is part of the stress response of *P. aeruginosa*.

The comparative analysis of a *sprP* mutant strain with a *P. aeruginosa* wild type formed the basis for the investigation of the global physiological role of SprP. By means of systems biology approaches like proteome and transcriptome analyses, the idea of a general physiological function of SprP was strongly supported. The transcriptome analysis alone demonstrated that the deletion of *sprP* results in the altered expression of 218 genes.

The extensive analysis of further pleiotropic consequences of the *sprP* deletion clearly illustrated the function of the subtilase SprP in *P. aeruginosa*. The deletion of the subtilase encoding gene resulted in (I) a strong cell aggregation of *P. aeruginosa* during growth in liquid cultures, (II) an increased biofilm production, (III) the loss of motility, (IV) a reduced growth under anaerobic conditions, (V) an increased production of rhamnolipids as well as (VI) an increased production of pyoverdines.

For the first time, the systematic investigation of the subtilase SprP illustrated that this protease plays a critical role within the complex regulatory network of *P. aeruginosa*. As a regulatory protease, SprP represents a new and important network member that is responsible for the control of several central cellular processes in *P. aeruginosa* and probably in other pseudomonads as well.

7 Literatur

1. **Migula, W. (1900).** System der Bakterien, Vol. 2. Gustav Fischer, Jena.
2. **Olsen, G.J., Woese, C.R. & Overbeek, R. (1994).** The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* **176**, 1-6.
3. **Madigan, M.T. & Martinko, J.M. (2006).** Brock Biology of microorganisms, 11th edn. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
4. **Palleroni, N.J. (1986).** Taxonomy of the Pseudomonads. In: Sokatch, J.R. (ed.), The bacteria, Vol X: The biology of *Pseudomonas*, Academic Press, Inc., Orlando, pp. 3-20.
5. **Costerton, J.W. & Anwar, H. (1994).** *Pseudomonas aeruginosa*: the microbe and the pathogen. In: Baltch, A.L. & Smith, R.P. (eds.), *Pseudomonas aeruginosa* infections and treatment. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-20.
6. **Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.K. & Vitanza-jack, V.B. (1974).** Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* **28**, 987-991.
7. **Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., dos Santos, V.M. & Wittmann, C. (2012).** Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 2279-2290.
8. **Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983).** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* **5**, 279-313.
9. **Hirano, S.S. & Upper, C.D. (2000).** Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 624-653.
10. **Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H. & Oyaizu, H. (2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1563-1589.
11. **Frank, L.H. & Demoss, R.D. (1959).** On the biosynthesis of pyocyanine. *J Bacteriol* **77**, 776-782.
12. **Palleroni, N.J. (1993).** *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 231-251.
13. **Meyer, J.M. & Abdallah, M.A. (1978).** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J Gen Microbiol* **107**, 319-328.
14. **Hardalo, C. & Edberg, S.C. (1997).** *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol* **23**, 47-75.
15. **Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S. & Olson, M.V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
16. **Winsor, G.L., Lam, D.K.W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., Hancock, R.E.W. & Brinkman, F.S.L. (2011).** *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res* **39**, 596-600.
17. **Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Zonta, A. & Reetz, M.T. (1997).** Bacterial lipases for biotechnological applications. *J Mol Catal B Enzym* **3**, 3-12.
18. **Jaeger, K.E. & Reetz, M.T. (2000).** Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 68-73.
19. **Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. & Reetz, M.T. (1999).** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**, 315-351.
20. **Jaeger, K.E., Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K. & Reetz, M.T. (1996).** Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**, 99-105.
21. **Maier, R.M. & Soberon-Chavez, G. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 625-633.
22. **Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T.T., Wenk, P., Hemmerich, J., Muller, C., Wichmann, R., Kupper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., Hausmann, R., Syldatk, C., Rosenau, F. & Blank, L.M. (2011).** Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Cell Fact* **10**, 80.

23. **Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M.W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C.L. & Tompkins, R.G. (2000).** Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8815-8821.
24. **Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G. & Ausubel, F.M. (1995).** Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**, 1899-1902.
25. **Driscoll, J.A., Brody, S.L. & Kollef, M.H. (2007).** The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**, 351-368.
26. **Bendiak, G.N. & Ratjen, F. (2009).** The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* **30**, 587-595.
27. **Williams, B.J., Dehnhostel, J. & Blackwell, T.S. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* **15**, 1037-1056.
28. **Gellatly, S.L. & Hancock, R.E. (2013).** *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* **67**, 159-173.
29. **Chastre, J. & Fagon, J.Y. (2002).** Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 867-903.
30. **Fujitani, S., Sun, H.Y., Yu, V.L. & Weingarten, J.A. (2011).** Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest* **139**, 909-919.
31. **Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B. & Gibson, R.L. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **34**, 91-100.
32. **Elkin, S. & Geddes, D. (2003).** Pseudomonal infection in cystic fibrosis: the battle continues. *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**, 609-618.
33. **Wu, D.C., Chan, W.W., Metelitsa, A.I., Fiorillo, L. & Lin, A.N. (2011).** *Pseudomonas* skin infection: clinical features, epidemiology, and management. *Am J Clin Dermatol* **12**, 157-169.
34. **Rezaei, E., Safari, H., Naderinasab, M. & Aliakbarian, H. (2011).** Common pathogens in burn wound and changes in their drug sensitivity. *Burns* **37**, 805-807.
35. **van Delden, C. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: how should we treat them? *Int J Antimicrob Agents* **30**, 71-75.
36. **Fluit, A.C., Schmitz, F.J. & Verhoef, J. (2001).** Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**, 188-191.
37. **Altöparlak, U., Erol, S., Akcay, M.N., Celebi, F. & Kadanali, A. (2004).** The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. *Burns* **30**, 660-664.
38. **Huang, C.R., Lu, C.H., Chuang, Y.C., Tsai, N.W., Chang, C.C., Chen, S.F., Wang, H.C., Chien, C.C. & Chang, W.N. (2007).** Adult *Pseudomonas aeruginosa* meningitis: high incidence of underlying medical and/or postneurosurgical conditions and high mortality rate. *Jpn J Infect Dis* **60**, 397-399.
39. **Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C.N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R.S., Montgomery, P., White, J.R., Godfrey, P.A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J.E. & Lory, S. (2008).** Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3100-3105.
40. **Sadikot, R.T., Blackwell, T.S., Christman, J.W. & Prince, A.S. (2005).** Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 1209-1223.
41. **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.
42. **Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F. & Wilhelm, S. (2010).** Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mendez-Vilas, A. (ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Vol. 1. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 383-395.
43. **Jaeger, K.-E., Kinscher, D.A., König, B. & König, W. (1992).** Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemistry and potential role as a virulence factor. In: Høiby, N., Pedersen, S.S. (eds.), Cystic fibrosis, basic and clinical research. Elsevier, Amsterdam, pp. 113-119.
44. **Mewe, M., Tielker, D., Schonberg, R., Schachner, M., Jaeger, K.E. & Schumacher, U. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *J Laryngol Otol* **119**, 595-599.

45. **Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., Miller, S.I., Ramsey, B.W., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., Burns, J.L., Kaul, R. & Olson, M.V. (2006).** Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8487-8492.
46. **Hogardt, M. & Heesemann, J. (2010).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**, 557-562.
47. **Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V.J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D.I. & Bycroft, B.W. (2000).** Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 667-680.
48. **Van Delden, C. & Iglewski, B.H. (1998).** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**, 551-560.
49. **Strateva, T. & Yordanov, D. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* **58**, 1133-1148.
50. **Schweizer, H.P. (2003).** Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2**, 48-62.
51. **Breidenstein, E.B., de la Fuente-Nunez, C. & Hancock, R.E. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* **19**, 419-426.
52. **Fernandez, L., Breidenstein, E.B. & Hancock, R.E. (2011).** Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat* **14**, 1-21.
53. **Payne, D.J. (2008).** Microbiology. Desperately seeking new antibiotics. *Science* **321**, 1644-1645.
54. **Fothergill, J.L., Winstanley, C. & James, C.E. (2012).** Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**, 219-235.
55. **Maeda, T., Garcia-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., Garcia, L.R., Tomas, M. & Wood, T.K. (2012).** Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *ISME J* **6**, 493-501.
56. **Hwang, I.Y., Tan, M.H., Koh, E., Ho, C.L., Poh, C.L. & Chang, M.W. (2013).** Reprogramming Microbes to Be Pathogen-Seeking Killers. *ACS Synth Biol*, [Epub ahead of print].
57. **Fuqua, C., Parsek, M.R. & Greenberg, E.P. (2001).** Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**, 439-468.
58. **Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. & Salmond, G.P. (2001).** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 365-404.
59. **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.
60. **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.
61. **Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. & Greenberg, E.P. (1995).** A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1490-1494.
62. **Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996).** A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**, 1137-1146.
63. **Welch, M., Mikkelsen, H., Swatton, J.E., Smith, D., Thomas, G.L., Glansdorp, F.G. & Spring, D.R. (2005).** Cell-cell communication in Gram-negative bacteria. *Mol Biosyst* **1**, 196-202.
64. **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.
65. **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.
66. **Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G. & Rahme, L.G. (2004).** Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1339-1344.
67. **Wade, D.S., Calfee, M.W., Rocha, E.R., Ling, E.A., Engstrom, E., Coleman, J.P. & Pesci, E.C. (2005).** Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 4372-4380.
68. **Schuster, M. & Greenberg, E.P. (2006).** A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* **296**, 73-81.

69. Galan-Vasquez, E., Luna, B. & Martinez-Antonio, A. (2011). The Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Inform Exp* **1**, 3.
70. Potvin, E., Sanschagrín, F. & Levesque, R.C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 38-55.
71. Tanaka, K. & Takahashi, H. (1991). Cloning and analysis of the gene (*rpoDA*) for the principal sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **1089**, 113-119.
72. Wosten, M.M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 127-150.
73. Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V. & Foglino, M. (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**, 498-504.
74. Longo, F., Rampioni, G., Bondi, R., Imperi, F., Fimia, G.M., Visca, P., Zennaro, E. & Leoni, L. (2013). A New Transcriptional Repressor of the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Receptor Gene *lasR*. *PLoS One* **8**, e69554.
75. Tipton, K.A., Coleman, J.P. & Pesci, E.C. (2013). QapR (PA5506) represses an operon that negatively affects the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **195**, 3433-3441.
76. Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
77. Wei, Q. & Ma, L.Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* **14**, 20983-21005.
78. de Beer, D., Stoodley, P. & Lewandowski, Z. (1994). Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng* **44**, 636-641.
79. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187-209.
80. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. & Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.
81. Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F. & Jaeger, K.E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**, 1313-1323.
82. Lequette, Y. & Greenberg, E.P. (2005). Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**, 37-44.
83. 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.
84. Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M. & Parsek, M.R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**, 1264-1277.
85. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**, 1511-1524.
86. Mikkelsen, H., Sivaneson, M. & Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **13**, 1666-1681.
87. Wirthlin, M.R., Marshall, G.W., Jr. & Rowland, R.W. (2003). Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines. *J Periodontol* **74**, 1595-1609.
88. De Kievit, T.R. (2009). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* **11**, 279-288.
89. Saitou, K., Furuhashi, K., Kawakami, Y. & Fukuyama, M. (2009). Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Sci* **14**, 65-68.
90. McLaughlin-Borlace, L., Stapleton, F., Matheson, M. & Dart, J.K. (1998). Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *J Appl Microbiol* **84**, 827-838.
91. Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-193.
92. Lam, J., Chan, R., Lam, K. & Costerton, J.W. (1980). Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* **28**, 546-556.
93. Mulcahy, L.R., Isabella, V.M. & Lewis, K. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microb Ecol*, 1-12.
94. Flemming, H.-C. & Wingender, J. (2001). Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biol Unserer Zeit* **31**, 169-180.

95. **Schleheck, D., Barraud, N., Klebensberger, J., Webb, J.S., McDougald, D., Rice, S.A. & Kjelleberg, S. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch cultures and disperses upon starvation. *PLoS One* **4**, e5513.
96. **Klebensberger, J., Rui, O., Fritz, E., Schink, B. & Philipp, B. (2006).** Cell aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 as an energy-dependent stress response during growth with sodium dodecyl sulfate. *Arch Microbiol* **185**, 417-427.
97. **Klebensberger, J., Lautenschlager, K., Bressler, D., Wingender, J. & Philipp, B. (2007).** Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy. *Environ Microbiol* **9**, 2247-2259.
98. **Bossier, P. & Verstraete, W. (1996).** Triggers for microbial aggregation in activated sludge? *Appl Microbiol Biotechnol* **45**, 1-6.
99. **Jarvis, F.G. & Johnson, M.J. (1949).** A glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* **71**, 4124-4126.
100. **Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003).** *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**, 2005-2013.
101. **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.
102. **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* **24**, 855-859.
103. **Sydatk, 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.
104. **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.
105. **Abdel-Mawgoud, A.M., Lepine, F. & Deziel, E. (2010).** Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1323-1336.
106. **Soberon-Chavez, G., Lepine, F. & Deziel, E. (2005).** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 718-725.
107. **Ochsner, U.A., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994).** Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* **269**, 19787-19795.
108. **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.
109. **Reis, R.S., Pereira, A.G., Neves, B.C. & Freire, D.M. (2011).** Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Bioresour Technol* **102**, 6377-6384.
110. **Medina, G., Juarez, K. & Soberon-Chavez, G. (2003).** The *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone. *J Bacteriol* **185**, 377-380.
111. **Davey, M.E., Caiazza, N.C. & O'Toole, G.A. (2003).** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**, 1027-1036.
112. **Caiazza, N.C., Shanks, R.M. & O'Toole, G.A. (2005).** Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 7351-7361.
113. **Arino, S., Marchal, R. & Vandecasteele, J.P. (1998).** Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J Appl Microbiol* **84**, 769-776.
114. **Macnab, R.M. (2003).** How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**, 77-100.
115. **Bradley, D.E. (1980).** A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26**, 146-154.
116. **Merz, A.J., So, M. & Sheetz, M.P. (2000).** Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**, 98-102.

117. Skerker, J.M. & Berg, H.C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6901-6904.
118. Köhler, 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.
119. Rashid, M.H. & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4885-4890.
120. Suzuki, T. & Iino, T. (1980). Isolation and characterization of multiflagellate mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **143**, 1471-1479.
121. Tremblay, J., Richardson, A.P., Lepine, F. & Deziel, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol* **9**, 2622-2630.
122. Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**, 289-314.
123. Ottemann, K.M. & Miller, J.F. (1997). Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* **24**, 1109-1117.
124. Drake, D. & Montie, T.C. (1988). Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **134**, 43-52.
125. Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. & Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* **66**, 43-51.
126. Tang, H., Kays, M. & Prince, A. (1995). Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun* **63**, 1278-1285.
127. Yoon, S.S., Hennigan, R.F., Hilliard, G.M., Ochsner, U.A., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Allen, H.L., DeKievit, T.R., Gardner, P.R., Schwab, U., Rowe, J.J., Iglewski, B.H., McDermott, T.R., Mason, R.P., Wozniak, D.J., Hancock, R.E., Parsek, M.R., Noah, T.L., Boucher, R.C. & Hassett, D.J. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* **3**, 593-603.
128. Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J.R., Randell, S., Boucher, R.C. & Doring, G. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **109**, 317-325.
129. Mousa, H.A. (1997). Aerobic, anaerobic and fungal burn wound infections. *J Hosp Infect* **37**, 317-323.
130. Brook, I. (2007). The role of anaerobic bacteria in upper respiratory tract and other head and neck infections. *Curr Infect Dis Rep* **9**, 208-217.
131. Jones, K.L., Hegab, A.H., Hillman, B.C., Simpson, K.L., Jinkins, P.A., Grisham, M.B., Owens, M.W., Sato, E. & Robbins, R.A. (2000). Elevation of nitrotyrosine and nitrate concentrations in cystic fibrosis sputum. *Pediatr Pulmonol* **30**, 79-85.
132. Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 533-616.
133. Sias, S.R., Stouthamer, A.H. & Ingraham, J.L. (1980). The assimilatory and dissimilatory nitrate reductases of *Pseudomonas aeruginosa* are encoded by different genes. *J Gen Microbiol* **118**, 229-234.
134. Silvestrini, M.C., Galeotti, C.L., Gervais, M., Schinina, E., Barra, D., Bossa, F. & Brunori, M. (1989). Nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: sequence of the gene and the protein. *FEBS Lett* **254**, 33-38.
135. Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1995). The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **1261**, 279-284.
136. Arai, H., Mizutani, M. & Igarashi, Y. (2003). Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**, 29-36.
137. Yoon, S.S., Karabulut, A.C., Lipscomb, J.D., Hennigan, R.F., Lyman, S.V., Groce, S.L., Herr, A.B., Howell, M.L., Kiley, P.J., Schurr, M.J., Gaston, B., Choi, K.H., Schweizer, H.P. & Hassett, D.J. (2007). Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration. *EMBO J* **26**, 3662-3672.
138. Schobert, M. & Jahn, D. (2010). Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**, 549-556.
139. Härtig, E., Schiek, U., Vollack, K.U. & Zumft, W.G. (1999). Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 3658-3665.
140. Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M. & Jahn, D. (2007). The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol* **189**, 4310-4314.

141. Giardina, G., Rinaldo, S., Johnson, K.A., Di Matteo, A., Brunori, M. & Cutruzzola, F. (2008). NO sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the transcriptional regulator DNR. *J Mol Biol* **378**, 1002-1015.
142. Hayashi, N.R., Arai, H., Kodama, T. & Igarashi, Y. (1998). The *nirQ* gene, which is required for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa*, can activate the RubisCO from *Pseudomonas hydrogothermophila*. *Biochim Biophys Acta* **1381**, 347-350.
143. Toyofuku, M., Nomura, N., Fujii, T., Takaya, N., Maseda, H., Sawada, I., Nakajima, T. & Uchiyama, H. (2007). Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **189**, 4969-4972.
144. Toyofuku, M., Nomura, N., Kuno, E., Tashiro, Y., Nakajima, T. & Uchiyama, H. (2008). Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**, 7947-7956.
145. Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.
146. Schröder, I., Johnson, E. & de Vries, S. (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 427-447.
147. Neilands, J.B. (1981). Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* **50**, 715-731.
148. Lesuisse, E., Blaiseau, P.L., Dancis, A. & Camadro, J.M. (2001). Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **147**, 289-298.
149. Romheld, V. & Marschner, H. (1986). Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol* **80**, 175-180.
150. Haas, H. (2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 316-330.
151. Meyer, J.M. & Hornsperger, J.M. (1978). Role of pyoverdine_{pf}, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport. *J Gen Microbiol* **107**, 329-331.
152. Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I.L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **15**, 22-30.
153. Ravel, J. & Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* **11**, 195-200.
154. 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.
155. Cornelis, P., Matthijs, S. & Van Oeffelen, L. (2009). Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **22**, 15-22.
156. 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.
157. Lamont, I.L. & Martin, L.W. (2003). Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**, 833-842.
158. Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G.L., Graumann, P.L. & Schalk, I.J. (2007). Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. *J Biol Chem* **282**, 2987-2995.
159. Cornelis, P. (2008). Unexpected interaction of a siderophore with aluminum and its receptor. *J Bacteriol* **190**, 6541-6543.
160. 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.
161. Ochsner, U.A., Johnson, Z., Lamont, I.L., Cunliffe, H.E. & Vasil, M.L. (1996). Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated *pvdS* gene encoding an alternative sigma factor. *Mol Microbiol* **21**, 1019-1028.
162. 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.
163. 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.
164. Britigan, B.E., Rasmussen, G.T., Olakanmi, O. & Cox, C.D. (2000). Iron acquisition from *Pseudomonas aeruginosa* siderophores by human phagocytes: an additional mechanism of host defense through iron sequestration? *Infect Immun* **68**, 1271-1275.
165. Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **40**, 343-350.
166. Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290** (Pt 1), 205-218.

167. **Polgar, L. (1989).** Mechanisms of protease action. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 87-122.
168. **Menard, R. & Storer, A.C. (1992).** Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**, 393-400.
169. **Fujinaga, M., Cherney, M.M., Oyama, H., Oda, K. & James, M.N. (2004).** The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3364-3369.
170. **Tuteja, R. (2005).** Type I signal peptidase: an overview. *Arch Biochem Biophys* **441**, 107-111.
171. **Bode, W. & Huber, R. (2000).** Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 241-252.
172. **Khan, A.R. & James, M.N. (1998).** Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* **7**, 815-836.
173. **Davie, E.W., Fujikawa, K. & Kisiel, W. (1991).** The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**, 10363-10370.
174. **Shi, Y. (2002).** Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**, 459-470.
175. **Coughlin, S.R. (2005).** Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* **3**, 1800-1814.
176. **Cesarman-Maus, G. & Hajjar, K.A. (2005).** Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* **129**, 307-321.
177. **Goldberg, A.L. (2003).** Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895-899.
178. **Gupta, R., Beg, Q.K. & Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 15-32.
179. **Craik, C.S., Page, M.J. & Madison, E.L. (2011).** Proteases as therapeutics. *Biochem J* **435**, 1-16.
180. **Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T. & Ito, S. (2007).** Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J Biosci Bioeng* **103**, 501-508.
181. **Maurer, K.H. (2004).** Detergent proteases. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 330-334.
182. **Page, M.J. & Di Cera, E. (2008).** Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1220-1236.
183. **LeMosy, E.K., Hong, C.C. & Hashimoto, C. (1999).** Signal transduction by a protease cascade. *Trends Cell Biol* **9**, 102-107.
184. **Collen, D. & Lijnen, H.R. (1986).** The fibrinolytic system in man. *Crit Rev Oncol Hematol* **4**, 249-301.
185. **Sim, R.B. & Laich, A. (2000).** Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* **28**, 545-550.
186. **Barros, C., Crosby, J.A. & Moreno, R.D. (1996).** Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biol Int* **20**, 33-39.
187. **Neurath, H. (1984).** Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350-357.
188. **Blow, D.M., Birktoft, J.J. & Hartley, B.S. (1969).** Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**, 337-340.
189. **Stroud, R.M. (1974).** A family of protein-cutting proteins. *Sci Am* **231**, 74-88.
190. **Siezen, R.J., Renckens, B. & Boekhorst, J. (2007).** Evolution of prokaryotic subtilases: genome-wide analysis reveals novel subfamilies with different catalytic residues. *Proteins* **67**, 681-694.
191. **Erez, E., Fass, D. & Bibi, E. (2009).** How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **459**, 371-378.
192. **Polgar, L. (2005).** The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2161-2172.
193. **Robertus, J.D., Kraut, J., Alden, R.A. & Birktoft, J.J. (1972).** Subtilisin; a stereochemical mechanism involving transition-state stabilization. *Biochemistry* **11**, 4293-4303.
194. **Hedstrom, L. (2002).** Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* **102**, 4501-4524.
195. **Ottesen, M. & Svendsen, I. (1970).** The subtilisins. In: Perlmann, G.E. & Lorand, L. (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 19, Academic Press, Inc., New York, pp. 199-215
196. **Siezen, R.J. & Leunissen, J.A. (1997).** Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci* **6**, 501-523.
197. **Siezen, R.J., de Vos, W.M., Leunissen, J.A. & Dijkstra, B.W. (1991).** Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng* **4**, 719-737.
198. **Smith, E.L., Markland, F.S., Kasper, C.B., DeLange, R.J., Landon, M. & Evans, W.H. (1966).** The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg. *J Biol Chem* **241**, 5974-5976.
199. **Wright, C.S., Alden, R.A. & Kraut, J. (1969).** Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angstrom resolution. *Nature* **221**, 235-242.

200. **Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1994).** Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* **244**, 19-61.
201. **Graycar, T.P., Bott, R.R., Power, S.D. & Estell, D.A. (2013).** Chapter 693 - Subtilisins. In: Rawlings, N. D. & Salvesen (eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, Inc., London, pp. 3148-3155.
202. **Li, Y., Hu, Z., Jordan, F. & Inouye, M. (1995).** Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J Biol Chem* **270**, 25127-25132.
203. **Shinde, U. & Inouye, M. (1995).** Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: characterization of the structural changes in pro-subtilisin E coincident with autoprocessing. *J Mol Biol* **252**, 25-30.
204. **Zhu, X.L., Ohta, Y., Jordan, F. & Inouye, M. (1989).** Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* **339**, 483-484.
205. **Shinde, U. & Inouye, M. (1995).** Folding mediated by an intramolecular chaperone: autoprocessing pathway of the precursor resolved via a substrate assisted catalysis mechanism. *J Mol Biol* **247**, 390-395.
206. **Yabuta, Y., Takagi, H., Inouye, M. & Shinde, U. (2001).** Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin. *J Biol Chem* **276**, 44427-44434.
207. **Bontemps, Y., Scamuffa, N., Calvo, F. & Khatib, A.M. (2007).** Potential opportunity in the development of new therapeutic agents based on endogenous and exogenous inhibitors of the proprotein convertases. *Med Res Rev* **27**, 631-648.
208. **Olmstead, A.D., Knecht, W., Lazarov, I., Dixit, S.B. & Jean, F. (2012).** Human subtilase SKI-1/S1P is a master regulator of the HCV Lifecycle and a potential host cell target for developing indirect-acting antiviral agents. *PLoS Pathog* **8**, e1002468.
209. **Koussis, K., Withers-Martinez, C., Yeoh, S., Child, M., Hackett, F., Knuepfer, E., Juliano, L., Woehlbier, U., Bujard, H. & Blackman, M.J. (2009).** A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *Embo J* **28**, 725-735.
210. **Cheng, Q., Stafslie, D., Purushothaman, S.S. & Cleary, P. (2002).** The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect Immun* **70**, 2408-2413.
211. **Janulczyk, R. & Rasmussen, M. (2001).** Improved pattern for genome-based screening identifies novel cell wall-attached proteins in gram-positive bacteria. *Infect Immun* **69**, 4019-4026.
212. **Gottesman, S. (1996).** Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**, 465-506.
213. **Gottesman, S. (2003).** Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 565-587.
214. **Gur, E., Biran, D. & Ron, E.Z. (2011).** Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria-how and when? *Nat Rev Microbiol* **9**, 839-848.
215. **Sousa, M.C., Trame, C.B., Tsuruta, H., Wilbanks, S.M., Reddy, V.S. & McKay, D.B. (2000).** Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell* **103**, 633-643.
216. **Rosen, R., Biran, D., Gur, E., Becher, D., Hecker, M. & Ron, E.Z. (2002).** Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases. *FEMS Microbiol Lett* **207**, 9-12.
217. **Neher, S.B., Flynn, J.M., Sauer, R.T. & Baker, T.A. (2003).** Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev* **17**, 1084-1089.
218. **Fuhrer, F., Muller, A., Baumann, H., Langklotz, S., Kutscher, B. & Narberhaus, F. (2007).** Sequence and length recognition of the C-terminal turnover element of LpxC, a soluble substrate of the membrane-bound FtsH protease. *J Mol Biol* **372**, 485-496.
219. **Hengge, R. & Bukau, B. (2003).** Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. *Mol Microbiol* **49**, 1451-1462.
220. **Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M. & Gross, C.A. (1999).** The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev* **13**, 2449-2461.
221. **Alba, B.M., Leeds, J.A., Onufryk, C., Lu, C.Z. & Gross, C.A. (2002).** DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev* **16**, 2156-2168.
222. **Dartigalongue, C., Missiakas, D. & Raina, S. (2001).** Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* **276**, 20866-20875.
223. **Ehrmann, M. & Clausen, T. (2004).** Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet* **38**, 709-724.
224. **Heck, L.W., Morihara, K., McRae, W.B. & Miller, E.J. (1986).** Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* **51**, 115-118.

225. Komori, Y., Nonogaki, T. & Nikai, T. (2001). Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). *Toxicon* **39**, 1327-1332.
226. Mariencheck, W.I., Alcorn, J.F., Palmer, S.M. & Wright, J.R. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 528-537.
227. Horvat, R.T., Clabaugh, M., Duval-Jobe, C. & Parmely, M.J. (1989). Inactivation of human gamma interferon by *Pseudomonas aeruginosa* proteases: elastase augments the effects of alkaline protease despite the presence of alpha 2-macroglobulin. *Infect Immun* **57**, 1668-1674.
228. Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R. & Zhou, W.W. (1990). Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **58**, 3009-3014.
229. Fick, R.B., Jr., Baltimore, R.S., Squier, S.U. & Reynolds, H.Y. (1985). IgG proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Infect Dis* **151**, 589-598.
230. Heck, L.W., Alarcon, P.G., Kulhavy, R.M., Morihara, K., Russell, M.W. & Mestecky, J.F. (1990). Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Immunol* **144**, 2253-2257.
231. Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W.R., Rosenbloom, J. & Ohman, D.E. (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J Biol Chem* **272**, 9884-9889.
232. Galloway, D.R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol* **5**, 2315-2321.
233. Kessler, E., Safrin, M., Olson, J.C. & Ohman, D.E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J Biol Chem* **268**, 7503-7508.
234. Matheson, N.R., Potempa, J. & Travis, J. (2006). Interaction of a novel form of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease (aeruginolysin) with interleukin-6 and interleukin-8. *Biol Chem* **387**, 911-915.
235. Engel, L.S., Hill, J.M., Moreau, J.M., Green, L.C., Hobden, J.A. & O'Callaghan, R.J. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 662-665.
236. Malloy, J.L., Veldhuizen, R.A., Thibodeaux, B.A., O'Callaghan, R.J. & Wright, J.R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, 409-418.
237. 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.
238. Toder, D.S., Gambello, M.J. & Iglewski, B.H. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol Microbiol* **5**, 2003-2010.
239. 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.
240. Marquart, M.E., Caballero, A.R., Chomnawang, M., Thibodeaux, B.A., Twining, S.S. & O'Callaghan, R.J. (2005). Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3761-3768.
241. Tang, A., Caballero, A.R., Marquart, M.E. & O'Callaghan, R.J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* small protease (PASP), a keratitis virulence factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 2821-2828.
242. Kida, Y., Shimizu, T. & Kuwano, K. (2011). Cooperation between LepA and PlcH contributes to the *in vivo* virulence and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect Immun* **79**, 211-219.
243. Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T. & Kuwano, K. (2008). A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol* **10**, 1491-1504.
244. Bardoel, B.W., Hartsink, D., Vughs, M.M., de Haas, C.J., van Strijp, J.A. & van Kessel, K.P. (2012). Identification of an immunomodulating metalloprotease of *Pseudomonas aeruginosa* (IMP_a). *Cell Microbiol* **14**, 902-913.
245. Kida, Y., Taira, J., Yamamoto, T., Higashimoto, Y. & Kuwano, K. (2013). EprS, an autotransporter protein of *Pseudomonas aeruginosa*, possessing serine protease activity induces inflammatory responses through protease-activated receptors. *Cell Microbiol* **15**, 1168-1181.
246. Breidenstein, E.B., Janot, L., Strehmel, J., Fernandez, L., Taylor, P.K., Kukavica-Ibrulj, I., Gellatly, S.L., Levesque, R.C., Overhage, J. & Hancock, R.E. (2012). The Lon protease is essential for full virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **7**, e49123.

247. **Marr, A.K., Overhage, J., Bains, M. & Hancock, R.E. (2007).** The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiology* **153**, 474-482.
248. **Brazas, M.D., Breidenstein, E.B., Overhage, J. & Hancock, R.E. (2007).** Role of *lon*, an ATP-dependent protease homolog, in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4276-4283.
249. **Kindrachuk, K.N., Fernandez, L., Bains, M. & Hancock, R.E. (2011).** Involvement of an ATP-dependent protease, PA0779/AsrA, in inducing heat shock in response to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1874-1882.
250. **Fernandez, L., Breidenstein, E.B., Song, D. & Hancock, R.E. (2012).** Role of intracellular proteases in the antibiotic resistance, motility, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1128-1132.
251. **Rodriguez-Rojas, A. & Blazquez, J. (2009).** The *Pseudomonas aeruginosa* *pfpl* gene plays an antimutator role and provides general stress protection. *J Bacteriol* **191**, 844-850.
252. **Qiu, D., Eisinger, V.M., Head, N.E., Pier, G.B. & Yu, H.D. (2008).** ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **154**, 2119-2130.
253. **Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
254. **Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4645-4649.
255. **Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
256. **Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983).** A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotechnol* **1**, 784-791.
257. **Miroux, B. & Walker, J.E. (1996).** Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289-298.
258. **Beselin, A. (2005).** Optimization of lipase production in *Burkholderia glumae*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
259. **Knops, K. (2009).** Eignung von Autotransportern zum Oberflächendisplay in Gram-negativen Bakterien. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
260. **Holloway, B.W., Krishnapillai, V. & Morgan, A.F. (1979).** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**, 73-102.
261. **Pelzer, A. (2009).** Regulation eines proteolytischen Netzwerkes in *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
262. **Pünder, K. (2011).** Regulation des Proteasegens *sprP* in *Pseudomonas aeruginosa*. Bachelorarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
263. **Bachmann, B.J. (1983).** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiol Rev* **47**, 180-230.
264. **Holloway, B.W. & Matsumoto, H. (1984).** *Pseudomonas aeruginosa*. In: O'Brien, S.J. (ed.), Genetic maps 1984, Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 194-197.
265. **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.
266. **Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2004).** Overexpression and secretion of biocatalysts. In: Svendsen, A. (ed.), Enzyme functionality: design, engineering and screening. Marcel Dekker, Inc., New York.
267. **Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N. & Croughan, T.P. (1995).** Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**, 63-67.
268. **Drepper, T., Gross, S., Yakunin, A.F., Hallenbeck, P.C., Masepohl, B. & Klipp, W. (2003).** Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **149**, 2203-2212.
269. **Schweizer, H.P. & Chuanchuen, R. (2001).** Small broad-host-range *lacZ* operon fusion vector with low background activity. *Biotechniques* **31**, 1258-1262.
270. **Schwarz, C., Schmitt, L. & Smits, S.H.J. (2013).** Agents and methods for the expression and secretion of peptides and proteins. Patent WO2013057312. Publiziert: 24 April 2013.
271. **Bakkes, P.J., Jenewein, S., Smits, S.H., Holland, I.B. & Schmitt, L. (2010).** The rate of folding dictates substrate secretion by the *Escherichia coli* hemolysin type 1 secretion system. *J Biol Chem* **285**, 40573-40580.

272. **Serci, S. (2010).** Charakterisierung der Autotransporter-Protease SprS aus *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
273. **Reimann, S. (2012).** Charakterisierung der beiden Domänen der Protease SprP aus *Pseudomonas aeruginosa*. Masterarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
274. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
275. **Tremblay, J. & Deziel, E. (2008).** Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microbiol* **48**, 509-515.
276. **Tabor, S. & Richardson, C.C. (1985).** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1074-1078.
277. **Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. & Vuillard, L. (2004).** The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* **37**, 203-206.
278. **Hahn, R. (2012).** Etablierung und Optimierung von *Burkholderia glumae* als Modellorganismus in Fermentation und Expression. Masterarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
279. **Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
280. **Smith, H.O. & Birnstiel, M.L. (1976).** A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res* **3**, 2387-2398.
281. **Mülhardt, C. (2009).** Herstellen kompetenter Zellen und Transformation. In: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 151-156.
282. **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.
283. **Ianenko, A.S., Gorbunova, S.A. & Krylov, V.N. (1983).** Changes in the nature of the cell growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO from the conjugative introduction of plasmid RP4. *Genetika* **19**, 1387-1389.
284. **Kato, R. & Kuramitsu, S. (1999).** Characterization of thermostable RecA protein and analysis of its interaction with single-stranded DNA. *Eur J Biochem* **259**, 592-601.
285. **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.
286. **Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. & Mattick, J.S. (1991).** 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**, 4008.
287. **Edelheit, O., Hanukoglu, A. & Hanukoglu, I. (2009).** Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol.* **9**, 61.
288. **Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. & Leunissen, J.A. (2007).** Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**, 71-74.
289. **Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* **25**, 402-408.
290. **Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I. & Williams, P.M. (1999).** Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem* **270**, 41-49.
291. **Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-619.
292. **Gabrielsen, O.S., Hornes, E., Korsnes, L., Ruet, A. & Oyen, T.B. (1989).** Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor tau--a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor. *Nucleic Acids Res* **17**, 6253-6267.
293. **Jungwirth, B., Emer, D., Brune, I., Hansmeier, N., Puhler, A., Eikmanns, B.J. & Tauch, A. (2008).** Triple transcriptional control of the resuscitation promoting factor 2 (*rpf2*) gene of *Corynebacterium glutamicum* by the regulators of acetate metabolism RamA and RamB and the cAMP-dependent regulator GlxR. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 190-197.
294. **Summers, W.C. (1970).** A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethyl pyrocarbonate. *Anal Biochem* **33**, 459-463.

295. **Polen, T., Schluesener, D., Poetsch, A., Bott, M. & Wendisch, V.F. (2007).** Characterization of citrate utilization in *Corynebacterium glutamicum* by transcriptome and proteome analysis. *FEMS Microbiol Lett* **273**, 109-119.
296. **Shalon, D., Smith, S.J. & Brown, P.O. (1996).** A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* **6**, 639-645.
297. **Hanke, T., Noh, K., Noack, S., Polen, T., Bringer, S., Sahm, H., Wiechert, W. & Bott, M. (2013).** Combined fluxomics and transcriptomics analysis of glucose catabolism via a partially cyclic pentose phosphate pathway in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Appl Environ Microbiol* **79**, 2336-2348.
298. **Brazma, A. (2009).** Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) – Successes, Failures, Challenges. *ScientificWorldJournal* **9**, 420-423.
299. **Polen, T. & Wendisch, V.F. (2004).** Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl Biochem Biotechnol* **118**, 215-232.
300. **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.
301. **Hochuli, E., Dobeli, H. & Schacher, A. (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **411**, 177-184.
302. **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
303. **Merril, C.R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**, 477-488.
304. **Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988).** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
305. **Klose, J. (1975).** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243.
306. **Klose, J. & Kobalz, U. (1995).** Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**, 1034-1059.
307. **O'Farrell, P.H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-4021.
308. **Westermeier, R., Postel, W., Weser, J. & Gorg, A. (1983).** High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *J Biochem Biophys Methods* **8**, 321-330.
309. **Fountoulakis, M. & Langen, H. (1997).** Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* **250**, 153-156.
310. **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.
311. **Twining, S.S. (1984).** Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal Biochem* **143**, 30-34.
312. **Schickaneder, E., Hösel, W., Eltz, H.v.d. & Geuß, U. (1988).** Casein-resorufon, a new substrate for a highly sensitive protease assay. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **330**, 360.
313. **Britton, H.T.S. & Robinson, R.A. (1931).** Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J Chem Soc*, 1456-1462.
314. **Thomas, D.A., Francis, P., Smith, C., Ratcliffe, S., Ede, N.J., Kay, C., Wayne, G., Martin, S.L., Moore, K., Amour, A. & Hooper, N.M. (2006).** A broad-spectrum fluorescence-based peptide library for the rapid identification of protease substrates. *Proteomics* **6**, 2112-2120.
315. **Förster, T. (1948).** Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* **437**, 55-75.
316. **Stryer, L. (1978).** Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**, 819-846.
317. **Miller, J.H. (1972).** Assay of β -Galactosidase. In: Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 352-355.
318. **Ochsner, U.A. (1993).** Genetics and biochemistry of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactant synthesis. Dissertation. ETH Zürich, Schweiz.
319. **Chandrasekaran, E.V. & Bemiller, J.N. (1980).** Constituent analyses of glycosaminoglycans. In: Whistler, R. L. (ed.), Methods in Carbohydrate Chemistry. Academic Press, Inc., New York, pp. 89-96

320. Koch, A.K., Kappeli, O., Fiechter, A. & Reiser, J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol* **173**, 4212-4219.
321. Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A.Z. & Abdallah, M.A. (1994). Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdinin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* **33**, 6391-6402.
322. 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.
323. Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schaffer, A.A. & Yu, Y.K. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J* **272**, 5101-5109.
324. Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. & Bryant, S.H. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**, 225-259.
325. Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**, 785-786.
326. Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster, L.J. & Brinkman, F.S. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26**, 1608-1615.
327. Kelley, L.A. & Sternberg, M.J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**, 363-371.
328. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.
329. Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M. & Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188-1190.
330. Schneider, T.D. & Stephens, R.M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* **18**, 6097-6100.
331. Blonder, J., Goshe, M.B., Xiao, W., Camp, D.G., 2nd, Wingerd, M., Davis, R.W. & Smith, R.D. (2004). Global analysis of the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **3**, 434-444.
332. Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.A. & Stahl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* **35**, 91-105.
333. Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2007). Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc* **2**, 2945-2957.
334. Welch, R.A., Dellinger, E.P., Minshew, B. & Falkow, S. (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature* **294**, 665-667.
335. Holland, I.B., Schmitt, L. & Young, J. (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**, 29-39.
336. Lenders, M.H., Reimann, S., Smits, S.H. & Schmitt, L. (2013). Molecular insights into Type I secretion systems. *Biol Chem* **394**, 1371-1384.
337. Benabdelhak, H., Kiontke, S., Horn, C., Ernst, R., Blight, M.A., Holland, I.B. & Schmitt, L. (2003). A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A. *J Mol Biol* **327**, 1169-1179.
338. Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. & Koronakis, V. (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J* **17**, 6487-6496.
339. Lecher, J., Schwarz, C.K., Stoldt, M., Smits, S.H., Willbold, D. & Schmitt, L. (2012). An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Structure* **20**, 1778-1787.
340. Ikemura, H. & Inouye, M. (1988). *In vitro* processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**, 12959-12563.
341. Fahrney, D.E. & Gold, A.M. (1963). Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, α -Chymotrypsin, and Trypsin. *J Am Chem Soc* **85**, 997-1000.
342. Mintz, G. (1993). An irreversible serine protease inhibitor. *Biopharm* **6**, 34-38.

343. **Lively, M.O. & Powers, J.C. (1978).** Specificity and reactivity of human granulocyte elastase and cathepsin G, porcine pancreatic elastase, bovine chymotrypsin and trypsin toward inhibition with sulfonyl fluorides. *Biochim Biophys Acta* **525**, 171-179.
344. **Schoellmann, G. & Shaw, E. (1963).** Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry* **2**, 252-255.
345. **Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, O.D. & James, K.E. (2002).** Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* **102**, 4639-4750.
346. **Auld, D.S. (1995).** Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases. *Methods Enzymol* **248**, 228-242.
347. **Varughese, K.I., Ahmed, F.R., Carey, P.R., Hasnain, S., Huber, C.P. & Storer, A.C. (1989).** Crystal structure of a papain-E-64 complex. *Biochemistry* **28**, 1330-1332.
348. **Marciniszyn, J., Jr., Hartsuck, J.A. & Tang, J. (1976).** Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *J Biol Chem* **251**, 7088-7094.
349. **Mao, F., Dam, P., Chou, J., Olman, V. & Xu, Y. (2009).** DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res* **37**, 459-463.
350. **Daddaoua, A., Krell, T. & Ramos, J.-L. (2009).** Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. *J Biol Chem* **284**, 21360-21368.
351. **Tsuji, A., Kaneko, Y., Takahashi, K., Ogawa, M. & Goto, S. (1982).** The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. *Microbiol Immunol* **26**, 15-24.
352. **Spormann, A.M. (2008).** Physiology of microbes in biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 17-36.
353. **Henrichsen, J. (1972).** Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**, 478-503.
354. **Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S.J. & Tolker-Nielsen, T. (2010).** An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 253-268.
355. **Tatusov, R.L., Koonin, E.V. & Lipman, D.J. (1997).** A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631-637.
356. **Kristensen, D.M., Kannan, L., Coleman, M.K., Wolf, Y.I., Sorokin, A., Koonin, E.V. & Mushegian, A. (2010).** A low-polynomial algorithm for assembling clusters of orthologous groups from intergenomic symmetric best matches. *Bioinformatics* **26**, 1481-1487.
357. **Filiatrault, M.J., Picardo, K.F., Ngai, H., Passador, L. & Iglewski, B.H. (2006).** Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infect Immun* **74**, 4237-4245.
358. **Barraud, N., Hassett, D.J., Hwang, S.H., Rice, S.A., Kjelleberg, S. & Webb, J.S. (2006).** Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 7344-7353.
359. **Trunk, K., Benkert, B., Quack, N., Munch, R., Scheer, M., Garbe, J., Jansch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., Jahn, M., Schobert, M. & Jahn, D. (2010).** Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol* **12**, 1719-1733.
360. **Choi, Y., Park, H.Y., Park, S.J., Park, S.J., Kim, S.K., Ha, C., Im, S.J. & Lee, J.H. (2011).** Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cells* **32**, 57-65.
361. **Oglesby, A.G., Farrow, J.M., 3rd, Lee, J.H., Tomaras, A.P., Greenberg, E.P., Pesci, E.C. & Vasil, M.L. (2008).** The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *J Biol Chem* **283**, 15558-15567.
362. **Kim, S.K., Im, S.J., Yeom, D.H. & Lee, J.H. (2012).** Anr-mediated bidirectional activation of *antA* and *antR*, anthranilate degradative genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **505**, 146-152.
363. **Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandebroucke-Grauls, C.M., Ratledge, C. & Bitter, W. (2008).** Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* **67**, 458-472.
364. **Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994).** Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**, 2044-2054.
365. **Klebensberger, J., Birkenmaier, A., Geffers, R., Kjelleberg, S. & Philipp, B. (2009).** SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **11**, 3073-3086.

366. Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J. & Parsek, M.R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* **75**, 827-842.
367. Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**, 2.
368. Quillaguaman, J., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., Alvarez, M.T. & Delgado, O. (2004). *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 721-725.
369. Lee, J.C., Jeon, C.O., Lim, J.M., Lee, S.M., Lee, J.M., Song, S.M., Park, D.J., Li, W.J. & Kim, C.J. (2005). *Halomonas taeanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2027-2032.
370. Argandona, M., Martinez-Checa, F., Llamas, I., Arco, Y., Quesada, E. & del Moral, A. (2006). A membrane-bound nitrate reductase encoded by the *narGHJ* operon is responsible for anaerobic respiration in *Halomonas maura*. *Extremophiles* **10**, 411-419.
371. Stevens, D.A., Hamilton, J.R., Johnson, N., Kim, K.K. & Lee, J.S. (2009). *Halomonas*, a newly recognized human pathogen causing infections and contamination in a dialysis center: three new species. *Medicine* **88**, 244-249.
372. Ikemura, H., Takagi, H. & Inouye, M. (1987). Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**, 7859-7864.
373. von Heijne, G. (1988). Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim Biophys Acta* **947**, 307-333.
374. van den Berg, B., Ellis, R.J. & Dobson, C.M. (1999). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J* **18**, 6927-6933.
375. Sorensen, H.P. & Mortensen, K.K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **115**, 113-128.
376. Villaverde, A. & Carrio, M.M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* **25**, 1385-1395.
377. Goff, S.A. & Goldberg, A.L. (1987). An increased content of protease La, the *lon* gene product, increases protein degradation and blocks growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**, 4508-4515.
378. Christensen, S.K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K. & Van Melderen, L. (2004). Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the *yefM-yoeB* toxin-antitoxin system. *Mol Microbiol* **51**, 1705-1717.
379. Schwarz, C.K., Landsberg, C.D., Lenders, M.H., Smits, S.H. & Schmitt, L. (2012). Using an *E. coli* Type 1 secretion system to secrete the mammalian, intracellular protein IFABP in its active form. *J Biotechnol* **159**, 155-161.
380. Jeong, K.J. & Lee, S.Y. (2002). Excretion of human beta-endorphin into culture medium by using outer membrane protein F as a fusion partner in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4979-4985.
381. Andersen, C., Koronakis, E., Bokma, E., Eswaran, J., Humphreys, D., Hughes, C. & Koronakis, V. (2002). Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11103-11108.
382. Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A. & Roques, B.P. (1999). The prosequence of thermolysin acts as an intramolecular chaperone when expressed *in trans* with the mature sequence in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **285**, 1911-1915.
383. Snoek-van Beurden, P.A. & Von den Hoff, J.W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* **38**, 73-83.
384. Tielker, D., Rosenau, F., Bartels, K.M., Rosenbaum, T. & Jaeger, K.E. (2006). Lectin-based affinity tag for one-step protein purification. *Biotechniques* **41**, 327-332.
385. Alexander, P.A., Ruan, B. & Bryan, P.N. (2001). Cation-dependent stability of subtilisin. *Biochemistry* **40**, 10634-10639.
386. Tsai, H.M. (1996). Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* **87**, 4235-4244.
387. Cheng, G., Zhao, P., Tang, X.F. & Tang, B. (2009). Identification and characterization of a novel spore-associated subtilase from *Thermoactinomyces* sp. CDF. *Microbiology* **155**, 3661-3672.
388. DelMar, E.G., Largman, C., Brodrick, J.W. & Geokas, M.C. (1979). A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* **99**, 316-320.
389. Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O., Andersen, J.B., Koch, B., Larsen, T.O., Hentzer, M., Eberl, L., Hoiby, N. & Givskov, M. (2005). Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* **151**, 1325-1340.

390. Skindersoe, M.E., Alhede, M., Phipps, R., Yang, L., Jensen, P.O., Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Tolker-Nielsen, T., Hoiby, N. & Givskov, M. (2008). Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3648-3663.
391. Ramos, J.L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. & Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 326-356.
392. Paletta, J.L. & Ohman, D.E. (2012). Evidence for two promoters internal to the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol* **65**, 770-775.
393. Fornwald, J.A., Schmidt, F.J., Adams, C.W., Rosenberg, M. & Brawner, M.E. (1987). Two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of the *Streptomyces lividans* galactose operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2130-2134.
394. Du, L., Qiu, L., Peng, Q., Lereclus, D., Zhang, J., Song, F. & Huang, D. (2012). Identification of the promoter in the intergenic region between *orf1* and *cry8Ea1* controlled by sigma H factor. *Appl Environ Microbiol* **78**, 4164-4168.
395. Imperi, F., Tiburzi, F., Fimia, G.M. & Visca, P. (2010). Transcriptional control of the *pvdS* iron starvation sigma factor gene by the master regulator of sulfur metabolism CysB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **12**, 1630-1642.
396. Leyn, S.A., Li, X., Zheng, Q., Novichkov, P.S., Reed, S., Romine, M.F., Fredrickson, J.K., Yang, C., Osterman, A.L. & Rodionov, D.A. (2011). Control of proteobacterial central carbon metabolism by the HexR transcriptional regulator: a case study in *Shewanella oneidensis*. *J Biol Chem* **286**, 35782-35794.
397. Novichkov, P.S., Laikova, O.N., Novichkova, E.S., Gelfand, M.S., Arkin, A.P., Dubchak, I. & Rodionov, D.A. (2010). RegPrecise: a database of curated genomic inferences of transcriptional regulatory interactions in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **38**, 111-118.
398. Bateman, A. (1999). The SIS domain: a phosphosugar-binding domain. *Trends Biochem Sci* **24**, 94-95.
399. Hager, P.W., Calfee, M.W. & Phibbs, P.V. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* *devB/SOL* homolog, *pgl*, is a member of the hex regulon and encodes 6-phosphogluconolactonase. *J Bacteriol* **182**, 3934-3941.
400. Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev* **9**, 1-27.
401. Lessie, T.G. & Phibbs, P.V., Jr. (1984). Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu Rev Microbiol* **38**, 359-388.
402. Kim, J., Jeon, C.O. & Park, W. (2008). Dual regulation of *zwf-1* by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in *Pseudomonas putida*. *Microbiology* **154**, 3905-3916.
403. Yura, T. (1996). Regulation and conservation of the heat-shock transcription factor sigma32. *Genes Cells* **1**, 277-284.
404. Sauer, R.T., Bolon, D.N., Burton, B.M., Burton, R.E., Flynn, J.M., Grant, R.A., Hersch, G.L., Joshi, S.A., Kenniston, J.A., Levchenko, I., Neher, S.B., Oakes, E.S., Siddiqui, S.M., Wah, D.A. & Baker, T.A. (2004). Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **119**, 9-18.
405. Mogk, A., Schmidt, R. & Bukau, B. (2007). The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol* **17**, 165-172.
406. Clausen, T., Southan, C. & Ehrmann, M. (2002). The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* **10**, 443-455.
407. Skorko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A., Narkiewicz, J. & Lipinska, B. (2008). The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures. *Microbiology* **154**, 3649-3658.
408. Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339-347.
409. Lipinska, B., Sharma, S. & Georgopoulos, C. (1988). Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* **16**, 10053-10067.
410. Connolly, L., De Las Penas, A., Alba, B.M. & Gross, C.A. (1997). The response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is controlled by partially overlapping pathways. *Genes Dev* **11**, 2012-2021.
411. Wickner, S., Maurizi, M.R. & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
412. Cahan, R., Axelrad, I., Safrin, M., Ohman, D.E. & Kessler, E. (2001). A secreted aminopeptidase of *Pseudomonas aeruginosa*. Identification, primary structure, and relationship to other aminopeptidases. *J Biol Chem* **276**, 43645-43652.

413. Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S. & Greenberg, E.P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**, 973-985.
414. Gallagher, L.A., McKnight, S.L., Kuznetsova, M.S., Pesci, E.C. & Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**, 6472-6480.
415. Brecht, D.S. & Snyder, S.H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **63**, 175-195.
416. Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J.S., Hassett, D.J., Rice, S.A. & Kjelleberg, S. (2009). Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol* **191**, 7333-7342.
417. Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 263-273.
418. Hickman, J.W., Tifrea, D.F. & Harwood, C.S. (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14422-14427.
419. Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nitz, M. & Romling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**, 1123-1134.
420. Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K. & Eberl, L. (2012). Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res* **11**, 4906-4915.
421. Sato, H., Okinaga, K. & Saito, H. (1988). Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection. *Microbiol Immunol* **32**, 131-139.
422. de la Fuente-Nunez, C., Reffuveille, F., Fairfull-Smith, K.E. & Hancock, R.E. (2013). Effect of Nitroxides on Swarming Motility and Biofilm Formation, Multicellular Behaviors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 4877-4881.
423. Burrows, L.L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol* **66**, 493-520.
424. Brimer, C.D. & Montie, T.C. (1998). Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *J Bacteriol* **180**, 3209-3217.
425. Choi, D.S., Kim, D.K., Choi, S.J., Lee, J., Choi, J.P., Rho, S., Park, S.H., Kim, Y.K., Hwang, D. & Gho, Y.S. (2011). Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* **11**, 3424-3429.
426. Overhage, J., Lewenza, S., Marr, A.K. & Hancock, R.E. (2007). Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-*lux* mutant library. *J Bacteriol* **189**, 2164-2169.
427. 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.
428. Chiang, P. & Burrows, L.L. (2003). Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**, 2374-2378.
429. Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S.V., Rowe, J.J., Yoon, S.S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., Hwang, S.H., McDermott, T.R. & Ochsner, U.A. (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1425-1443.
430. Sharma, V., Noriega, C.E. & Rowe, J.J. (2006). Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **72**, 695-701.
431. Kawasaki, S., Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1995). Sequencing and characterization of the downstream region of the genes encoding nitrite reductase and cytochrome c-551 (*nirSM*) from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the gene necessary for biosynthesis of heme d1. *Gene* **167**, 87-91.
432. Zajicek, R.S., Bali, S., Arnold, S., Brindley, A.A., Warren, M.J. & Ferguson, S.J. (2009). *d(1)* haem biogenesis - assessing the roles of three *nir* gene products. *FEBS J* **276**, 6399-6411.
433. Hasegawa, N., Arai, H. & Igarashi, Y. (2001). Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the *nir* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 1223-1230.
434. Zumft, W.G. & Kroneck, P.M. (2007). Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Adv Microb Physiol* **52**, 107-227.

435. **Cuyppers, H., Viebrock-Sambale, A. & Zumft, W.G. (1992).** NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* **174**, 5332-5339.
436. **Vasala, A., Panula, J., Bollok, M., Illmann, L., Halsig, C. & Neubauer, P. (2006).** A new wireless system for decentralised measurement of physiological parameters from shake flasks. *Microb Cell Fact* **5**, 8.
437. **Chen, F., Xia, Q. & Ju, L.K. (2006).** Competition between oxygen and nitrate respirations in continuous culture of *Pseudomonas aeruginosa* performing aerobic denitrification. *Biotechnol Bioeng* **93**, 1069-1078.
438. **Hoboth, C., Hoffmann, R., Eichner, A., Henke, C., Schmoldt, S., Imhof, A., Heesemann, J. & Hogardt, M. (2009).** Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **200**, 118-130.
439. **Cabrera-Valladares, N., Richardson, A.P., Olvera, C., Trevino, L.G., Deziel, E., Lepine, F. & Soberon-Chavez, G. (2006).** Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoxyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 187-194.
440. **Medina, G., Juarez, K., Valderrama, B. & Soberon-Chavez, G. (2003).** Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J Bacteriol* **185**, 5976-5983.
441. **Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M. & Venturi, V. (2003).** Role of GacA, LasI, RhlI, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor *rpoS*/RpoS in *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* **180**, 264-271.
442. **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.
443. **Redly, G.A. & Poole, K. (2005).** FpvR 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.
444. **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.
445. **Visca, P., Ciervo, A. & Orsi, N. (1994).** Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**, 1128-1140.
446. **Vandenende, C.S., Vlasschaert, M. & Seah, S.Y. (2004).** Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **186**, 5596-5602.
447. **Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.P., Koedam, N., Budzikiewicz, H., Fernandez, D.U., Schafer, M., Ravel, J. & Cornelis, P. (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.
448. **Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999).** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**, 6223-6229.
449. **Cornelis, P. (2010).** Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1637-1645.
450. **Spencer, M.R., Beare, P.A. & Lamont, I.L. (2008).** Role of cell surface signaling in proteolysis of an alternative sigma factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**, 4865-4869.
451. **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.
452. **Michel, A., Agerer, F., Hauck, C.R., Herrmann, M., Ullrich, J., Hacker, J. & Ohlsen, K. (2006).** Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. *J Bacteriol* **188**, 5783-5796.
453. **Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G. & Van Melderen, L. (2006).** Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res Microbiol* **157**, 701-713.
454. **Brotz-Oesterhelt, H., Beyer, D., Kroll, H.P., Endermann, R., Ladel, C., Schroeder, W., Hinzen, B., Raddatz, S., Paulsen, H., Henninger, K., Bandow, J.E., Sahl, H.G. & Labischinski, H. (2005).** Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat Med* **11**, 1082-1087.

455. **Sass, P., Josten, M., Famulla, K., Schiffer, G., Sahl, H.G., Hamoen, L. & Brotz-Oesterhelt, H. (2011).** Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17474-17479.

8 Anhang

Tab. 8.1 Übersicht über DUF-homologe Proteine. Dargestellt sind die Proteine, die Homologie zu der DUF des SprP-Proteins aufweisen mit der entsprechenden NCBI-Kennung und den identischen und positiven Aminosäuren in Prozent (%). Die homologen Proteine stammen ausschließlich aus den folgenden Proteinklassen: A = Hypothetisches Protein; B = Peptidase S8/S53, subtilisin, kexin, sedolisin; C = Peptidase, S8 and S53 Familie; D = Subtilisin-ähnliche Serinprotease (Annotationen nach NCBI Datenbank).

Protein	Referenzprotein (NCBI)	Identität (%)	Positiv (%)	Bakterienstämme
A	WP_003106938	100,0	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA21_ST175, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 138244
A	YP_792003	100,0	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. 2_1_26, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CI27, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 152504
A	WP_010793935	100,0	100,0	<i>Pseudomonas</i> sp. P179
A	NP_249933	100,0	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M18, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCGM2.S1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DK2, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 39016, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MPAO1/P1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MPAO1/P2, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PADK2_CF510, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO579
A	YP_002441653	100,0	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A	WP_003145364	100,0	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E2
B	WP_017001746	100,0	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A	WP_003162288	100,0	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18A
B	YP_008131791	99,6	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RP73, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A	YP_007710632	99,6	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B136-33, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A	WP_003082530	99,6	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3719, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA45, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAK
A	WP_003122210	99,6	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14886
A	WP_004348737	99,6	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2192
A	WP_003133583	99,6	99,6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888
B	WP_019372006	99,6	99,6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A	WP_003119601	99,1	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIG1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25324, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> str. Stone 130
A	WP_003159825	99,1	100,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCMG1179
A	WP_016263765	99,1	99,6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSH-10
A	YP_001349506	93,6	96,6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A	WP_015648405	80,8	80,8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> VRFPA02
B	WP_017677587	72,6	85,5	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>
B	YP_001187141	71,8	83,3	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp, <i>Pseudomonas mendocina</i>
B	YP_004379482	71,4	83,8	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01, <i>Pseudomonas mendocina</i>
B	WP_003245145	71,4	82,9	<i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> DLHK
B	WP_017361484	70,9	84,2	<i>Pseudomonas mendocina</i>
B	WP_017519188	70,1	82,1	<i>Pseudomonas</i> sp. TX1
C	WP_003180983	68,8	79,5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> Q2-87
A	YP_004353856	67,5	79,1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421, <i>Pseudomonas brassicacearum</i>
C	WP_003201262	67,5	79,1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96
B	WP_018602210	67,5	79,1	<i>Pseudomonas</i> sp. CFI68
D	YP_005208554	67,1	79,5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113, <i>Pseudomonas fluorescens</i>
D	YP_007398050	65,4	76,9	<i>Pseudomonas poae</i> RE*1-1-14, <i>Pseudomonas poae</i>
B	YP_001749037	65,4	79,1	<i>Pseudomonas putida</i> W619, <i>Pseudomonas putida</i>
D	WP_003239050	65,0	76,1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> BRIP34879
A	WP_003175150	64,5	76,5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> WH6
B	WP_017527795	62,8	78,2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
B	YP_008096345	62,4	75,6	<i>Pseudomonas putida</i> H8234, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas putida</i> H8234

Tab. 8.1 Fortsetzung

B	WP_019470494	62,0	75,6	<i>Pseudomonas</i> sp. S13.1.2
B	YP_001267091	62,0	75,6	<i>Pseudomonas putida</i> F1, <i>Pseudomonas putida</i>
B	WP_020191996	62,0	75,2	<i>Pseudomonas putida</i>
A	YP_006388545	62,0	75,2	<i>Pseudomonas putida</i> ND6, <i>Pseudomonas putida</i>
A	YP_008112678	62,0	75,2	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164, <i>Pseudomonas putida</i>
C	YP_005929608	61,5	75,6	<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1, <i>Pseudomonas putida</i>
B	WP_019750872	61,5	75,2	<i>Pseudomonas putida</i>
A	NP_746232	61,5	74,4	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440, <i>Pseudomonas putida</i>
B	WP_019438093	61,1	75,2	<i>Pseudomonas putida</i>
A	WP_004576938	60,7	74,8	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas putida</i> TRO1
A	YP_006535629	60,7	74,8	<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E, <i>Pseudomonas putida</i>
A	WP_003251410	60,7	74,8	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas putida</i> LS46
B	WP_019341152	59,0	73,5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
A	WP_007111425	59,0	72,2	<i>Halomonas boliviensis</i> , <i>Halomonas boliviensis</i> LC1
B	WP_008957796	58,5	75,6	<i>Halomonas</i> sp. HAL1
A	WP_010489997	58,1	76,1	<i>Pseudomonas</i> sp. S9
C	YP_004475049	58,1	76,1	<i>Pseudomonas fulva</i> 12-X, <i>Pseudomonas fulva</i>
D	YP_007241061	57,3	70,9	<i>Pseudomonas stutzeri</i> RCH2, <i>Pseudomonas stutzeri</i>
D	WP_003285635	56,8	72,2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 14405 = CCUG 16156
B	WP_018917943	56,4	72,2	<i>Halomonas zhanjiangensis</i>
D	YP_006457200	56,0	70,9	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 29243, <i>Pseudomonas stutzeri</i>
A	WP_004882352	56,0	73,5	<i>Pseudomonas viridiflava</i> , <i>Pseudomonas viridiflava</i> UASWS0038
D	WP_003301237	55,6	69,7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> NF13
D	WP_008570080	55,6	67,9	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1
D	WP_020307358	55,1	66,7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> B1SMN1
D	YP_005938111	55,1	66,2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166, <i>Pseudomonas stutzeri</i>
D	YP_004713742	55,1	66,7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 = LMG 11199, <i>Pseudomonas stutzeri</i>
B	WP_019407225	54,7	66,7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
B	WP_017244637	54,7	66,7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
D	YP_001171975	54,3	66,2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, <i>Pseudomonas stutzeri</i>
D	YP_006523490	54,3	73,5	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 10701, <i>Pseudomonas stutzeri</i>
D	WP_003295708	53,4	70,5	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> KOS6

```

MAETPLRLERLERCGDLLASERQEWCLRVRLGAGLPRLLLDGRELPATALRREGDGLRLRL
DRRGHASGPLWLEQGGRSSNPVWLTNGSHVLAAGPDEVAKNMDGLTTYVDLVSLLEENHD
GRREAERLADKYGARVVGAI PPLNLYQLRLPARDLVQRDALVLRIGSETSVDAVVVEESAPE
KGEETEAAARRPVDPKSDSDDEWAANRFMDAVNYQRVRARQAPLETRPVIRGVIERDVFDF
APDFADYLGPKAPARTCLYARDAERPDPNHGSTVAGILAAARWDQGGNSGFLRGLDRASQGF
EVIVERNSDAGITANVAASVNLVEDGVRVLNWSWGIHRVGARDVDGDEVDSLVRSGIAMSGY
EELLEEFFLWLRKEHPDVLVNSAGNGSSYSGTDEYRLPSSFEVTEQLLVVGGHQRSERQGLA
VDDPAYAVKRSTSNVDMRVDVTAAACTHASTLERDARGEVHCGTSYATPMVAGTVAAMLSLN
PRLRPEEIRMLLRRSAMTIGGDYDFEPADAEDLTAPILPSERGYRLDHRDVGRSARLDMQKA
LDLAVKSRERVRIDGRHHHHHGNLAKNVLFGGKNDKLYGSEGADLLDGGEGDDLKGGY
GNDIYRYLSGYGHHIIDDGGKEDKLSLADIDFRDVAFKREGNDLIMYKAEGNVLSIGHKNG
ITFRNWFEEKESGDISNHQIEQIFDKSGRIITPDSLKKALEYQQRNNKASYVYGNDALAYGSQ
GDLNPLINEISKIISAAGSFDVKEERTAASLLQLSGNASDFS YGRNSITLTTSA

```

Abb. 8.1 Aminosäuresequenz des SprP-Fusionsproteins für die Sekretion über das HlyA T1SS in *E. coli*. Dargestellt sind die verschiedenen Domänen in der Aminosäuresequenz des SprP-Fusionsproteins. Die ursprüngliche Signalsequenz von SprP wurde deletiert und durch ein Methionin ersetzt (Schwarz). Weiterhin besteht das Fusionsprotein aus SprP (Blau) und HlyA1 (Rot). Zudem wurde eine Histidin-tag (Grün) für die Proteinreinigung und eine Faktor Xa Erkennungssequenz (Orange) für die Abspaltung von HlyA1 sowie des Histidin-tags eingefügt. Das Fusionsprotein besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 88 kDa.

Tab. 8.2 Übersicht über die intrazellulären Proteine mit veränderten relativen Proteinmengen. Es sind die Proteine dargestellt, deren Änderungsrate ≥ 2 , der p -Wert $\leq 0,05$ und die Änderung in drei biologischen Replikaten messbar war. Die Pfeile beschreiben eine erhöhte relative Proteinmenge (\uparrow) bzw. eine verringerte relative Proteinmenge (\downarrow) in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1. Die Annotationen wurden aus der *Pseudomonas* Datenbank übernommen.

PA Nummer	Gen Name	Änderungsrate ($\Delta sprP$ / PAO1)		Annotation
PA0266	<i>gabT</i>	2,19	\uparrow	4-aminobutyrate aminotransferase
PA0291	<i>oprE</i>	2,95	\downarrow	anaerobically-induced outer membrane porin OprE precursor
PA0766	<i>mucD</i>	2,55	\downarrow	serine protease MucD precursor
PA0852	<i>cbpD</i>	3,04	\uparrow	chitin-binding protein CbpD precursor
PA0865	<i>hpd</i>	2,37	\uparrow	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
PA0956	<i>proS</i>	2,48	\downarrow	prolyl-tRNA synthetase
PA1092	<i>fliC</i>	2,08	\downarrow	flagellin type B
PA1202		2,31	\uparrow	probable hydrolase
PA1583	<i>sdhA</i>	2,18	\downarrow	succinate dehydrogenase (A subunit)
PA1586	<i>sucB</i>	2,40	\downarrow	dihydrolipoamide succinyltransferase (E2 subunit)
PA1587-1	<i>lpdG</i>	4,98	\downarrow	lipoamide dehydrogenase-glc
PA1587-2	<i>lpdG</i>	2,55	\downarrow	lipoamide dehydrogenase-glc
PA1587-3	<i>lpdG</i>	2,83	\downarrow	lipoamide dehydrogenase-glc
PA1770	<i>ppsA</i>	2,07	\downarrow	phosphoenolpyruvate synthase
PA1777	<i>oprF</i>	2,97	\uparrow	Major porin and structural outer membrane porin OprF precursor
PA2069		7,43	\uparrow	probable carbamoyl transferase
PA2504-1		2,38	\uparrow	hypothetical protein
PA2504-2		2,04	\uparrow	hypothetical protein
PA2962	<i>tmk</i>	2,34	\downarrow	thymidylate kinase
PA3195	<i>gapA</i>	4,14	\downarrow	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
PA3763	<i>purL</i>	2,23	\downarrow	phosphoribosylformylglycinamide synthase
PA3923		2,48	\uparrow	hypothetical protein
PA4236	<i>katA</i>	2,58	\downarrow	catalase
PA4352		2,66	\uparrow	conserved hypothetical protein
PA4434		2,14	\uparrow	probable oxidoreductase
PA4481	<i>mreB</i>	2,14	\downarrow	rod shape-determining protein MreB
PA4572	<i>fkIB</i>	2,29	\downarrow	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkIB
PA4670	<i>prs</i>	3,33	\downarrow	ribose-phosphate pyrophosphokinase
PA4671		3,56	\downarrow	probable ribosomal protein L25
PA4694	<i>ilvC</i>	2,68	\downarrow	ketol-acid reductoisomerase
PA4938	<i>purA</i>	2,91	\downarrow	adenylosuccinate synthetase
PA5015	<i>aceE</i>	2,52	\downarrow	pyruvate dehydrogenase
PA5100	<i>hutU</i>	2,25	\uparrow	urocanase
PA5110	<i>fbp</i>	2,65	\downarrow	fructose-1,6-bisphosphatase
PA5435		4,35	\downarrow	probable transcarboxylase subunit

Tab. 8.3 Übersicht über die extrazellulären Proteine mit veränderten relativen Proteinmengen. Es sind die Proteine dargestellt, deren Änderungsrate ≥ 2 , der p -Wert $\leq 0,05$ und die Änderung in drei biologischen Replikaten messbar war. Die Pfeile beschreiben eine erhöhte relative Proteinmenge (\uparrow) bzw. eine verringerte relative Proteinmenge (\downarrow) in *P. aeruginosa* $\Delta sprP$ im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1. Die Annotationen wurden aus der *Pseudomonas* Datenbank übernommen.

PA Nummer	Gen Name	Änderungsrate ($\Delta sprP/PAO1$)		Annotation
PA0423	<i>pasP</i>	4,97	\downarrow	PASP
PA0888	<i>aotJ</i>	4,89	\downarrow	arginine/ornithine binding protein AotJ
PA0958	<i>oprD</i>	6,45	\downarrow	basic amino acid, basic peptide and imipenem outer membrane porin OprD precursor
PA1074	<i>braC</i>	4,37	\downarrow	branched-chain amino acid transport protein BraC
PA1087	<i>flgL</i>	15,54	\downarrow	flagellar hook-associated protein type 3 FlgL
PA1092-1	<i>fliC</i>	20,97	\downarrow	flagellin type B
PA1092-2	<i>fliC</i>	19,31	\downarrow	flagellin type B
PA1092-3	<i>fliC</i>	9,54	\downarrow	flagellin type B
PA1249	<i>aprA</i>	8,77	\downarrow	alkaline metalloproteinase precursor
PA1493	<i>cysP</i>	13,90	\downarrow	sulfate-binding protein of ABC transporter
PA1777	<i>oprF</i>	5,62	\downarrow	major porin and structural outer membrane porin OprF precursor
PA2452		2,58	\uparrow	hypothetical protein
PA2939-1		3,16	\uparrow	probable aminopeptidase
PA2939-2		4,45	\uparrow	probable aminopeptidase
PA3724-1	<i>lasB</i>	2,80	\uparrow	elastase LasB
PA3724-2	<i>lasB</i>	3,45	\uparrow	elastase LasB
PA3724-3	<i>lasB</i>	5,23	\uparrow	elastase LasB
PA4175-1	<i>piv</i>	2,13	\uparrow	protease IV
PA4175-2	<i>piv</i>	3,71	\uparrow	protease IV
PA4922-1	<i>azu</i>	8,03	\downarrow	azurin precursor
PA4922-2	<i>azu</i>	3,97	\downarrow	azurin precursor
PA5033		2,13	\downarrow	hypothetical protein
PA5046		3,58	\downarrow	malic enzyme

Tab. 8.4 Übersicht über alle Gene mit verringerten relativen mRNA-Spiegeln in *P. aeruginosa* Δ sprP. Es sind die Gene dargestellt, deren Änderungsrate ≥ 2 , der *p*-Wert $\leq 0,05$ und die Änderung in mindestens drei biologischen Replikaten messbar war. Die Annotationen wurden aus der *Pseudomonas* Datenbank übernommen.

PA Nummer	Name	Änderungsrate	Produktname
PA0048	-	3,60	<i>probable transcriptional regulator</i>
PA0049	-	4,56	<i>hypothetical protein</i>
PA0050	-	2,88	<i>hypothetical protein</i>
PA0070	<i>tagQ1</i>	2,37	<i>TagQ1</i>
PA0085	<i>hcp1</i>	2,45	<i>Hcp1</i>
PA0130	<i>bauC</i>	2,39	<i>3-Oxopropanoate dehydrogenase</i>
PA0131	<i>bauB</i>	2,14	<i>hypothetical protein</i>
PA0132	<i>bauA</i>	2,26	<i>Beta-alanine:pyruvate transaminase</i>
PA0176	<i>aer2</i>	2,43	<i>aerotaxis transducer Aer2</i>
PA0210	<i>mdcC</i>	2,11	<i>malonate decarboxylase delta subunit</i>
PA0263	<i>hcpC</i>	4,37	<i>secreted protein Hcp</i>
PA0291	<i>oprE</i>	3,02	<i>anaerobically-induced outer membrane porin OprE precursor</i>
PA0320	-	5,14	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA0509	<i>nirN</i>	2,83	<i>probable c-type cytochrome</i>
PA0510	-	2,41	<i>probable uroporphyrin-III c-methyltransferase</i>
PA0511	<i>nirJ</i>	2,11	<i>heme d1 biosynthesis protein NirJ</i>
PA0512	-	3,40	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA0513	-	3,24	<i>probable transcriptional regulator</i>
PA0514	<i>nirL</i>	2,45	<i>heme d1 biosynthesis protein NirL</i>
PA0515	-	3,22	<i>probable transcriptional regulator</i>
PA0516	<i>nirF</i>	3,92	<i>heme d1 biosynthesis protein NirF</i>
PA0519	<i>nirS</i>	5,00	<i>nitrite reductase precursor</i>
PA0526	-	3,92	<i>hypothetical protein</i>
PA0754	-	2,97	<i>hypothetical protein</i>
PA0755	<i>opdH</i>	3,19	<i>cis-aconitate porin OpdH</i>
PA0796	<i>prpB</i>	2,01	<i>carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase</i>
PA1070	<i>braG</i>	2,09	<i>branched-chain amino acid transport protein BraG</i>
PA1511	-	2,10	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA1512	<i>hcpA</i>	4,08	<i>secreted protein Hcp</i>
PA1609	<i>fabB</i>	2,00	<i>beta-ketoacyl-ACP synthase I</i>
PA1656	<i>hsiA2</i>	2,41	<i>HsiA2</i>
PA1657	<i>hsiB2</i>	3,28	<i>HsiB2</i>
PA1658	<i>hsiC2</i>	3,03	<i>HsiC2</i>
PA1659	<i>hsiF2</i>	2,26	<i>HsiF2</i>
PA1661	<i>hsiH2</i>	2,24	<i>HsiH2</i>
PA1662	<i>clpV2</i>	2,37	<i>ClpV2</i>
PA1663	<i>sfa2</i>	2,07	<i>Sfa2</i>
PA1666	<i>lip2</i>	2,16	<i>Lip2</i>
PA1668	<i>dotU2</i>	2,36	<i>DotU2</i>
PA1669	<i>icmF2</i>	2,31	<i>IcmF2</i>
PA1670	<i>stp1</i>	2,37	<i>serine/threonine phosphoprotein phosphatase Stp1</i>
PA1846	<i>cti</i>	2,01	<i>cis/trans isomerase</i>
PA1913	-	2,89	<i>hypothetical protein</i>
PA1914	-	2,43	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA1984	<i>exaC</i>	2,06	<i>NAD+ dependent aldehyde dehydrogenase ExaC</i>
PA2012	<i>liuD</i>	2,41	<i>methylcrotonyl-CoA carboxylase, alpha-subunit (biotin-containing)</i>
PA2013	<i>liuC</i>	2,03	<i>putative 3-methylglutaconyl-CoA hydratase</i>
PA2014	<i>liuB</i>	2,38	<i>methylcrotonyl-CoA carboxylase, beta-subunit</i>
PA2110	-	4,02	<i>hypothetical protein</i>

Tab. 8.4 Fortsetzung.

PA2111	-	3,62	<i>hypothetical protein</i>
PA2114	-	3,38	<i>probable major facilitator superfamily (MFS) transporter</i>
PA2317	-	3,45	<i>probable oxidoreductase</i>
PA2318	-	3,74	<i>hypothetical protein</i>
PA2552	-	2,00	<i>probable acyl-CoA dehydrogenase</i>
PA2729	-	2,38	<i>hypothetical protein</i>
PA3328	-	2,61	<i>probable FAD-dependent monooxygenase</i>
PA3329	-	2,23	<i>hypothetical protein</i>
PA3330	-	2,53	<i>probable short chain dehydrogenase</i>
PA3332	-	2,25	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA3333	<i>fabH2</i>	2,01	<i>3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III</i>
PA3334	-	2,44	<i>probable acyl carrier protein</i>
PA3335	-	2,76	<i>hypothetical protein</i>
PA3392	<i>nosZ</i>	14,53	<i>nitrous-oxide reductase precursor</i>
PA3393	<i>nosD</i>	4,49	<i>NosD protein</i>
PA3686	<i>adk</i>	2,15	<i>adenylate kinase</i>
PA3762	-	2,48	<i>hypothetical protein</i>
PA3820	<i>secF</i>	2,04	<i>secretion protein SecF</i>
PA3873	<i>narJ</i>	5,81	<i>respiratory nitrate reductase delta chain</i>
PA3874	<i>narH</i>	3,51	<i>respiratory nitrate reductase beta chain</i>
PA3875	<i>narG</i>	7,17	<i>respiratory nitrate reductase alpha chain</i>
PA3876	<i>narK2</i>	5,93	<i>nitrite extrusion protein 2</i>
PA3877	<i>narK1</i>	21,33	<i>nitrite extrusion protein 1</i>
PA3905	-	2,04	<i>hypothetical protein</i>
PA3906	-	2,02	<i>hypothetical protein</i>
PA3907	-	2,05	<i>hypothetical protein</i>
PA3908	-	2,05	<i>hypothetical protein</i>
PA3912	-	5,74	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA3913	-	6,44	<i>probable protease</i>
PA3914	<i>moeA1</i>	3,52	<i>molybdenum cofactor biosynthetic protein A1</i>
PA3915	<i>moaB1</i>	8,28	<i>molybdopterin biosynthetic protein B1</i>
PA3916	<i>moaE</i>	2,61	<i>molybdopterin converting factor, large subunit</i>
PA3917	<i>moaD</i>	2,35	<i>molybdopterin converting factor, small subunit</i>
PA3918	<i>moaC</i>	2,64	<i>molybdopterin biosynthetic protein C</i>
PA4022	<i>hdhA</i>	2,06	<i>hydrazone dehydrogenase, HdhA</i>
PA4063	-	2,07	<i>hypothetical protein</i>
PA4152	-	3,14	<i>probable hydrolase</i>
PA4153	-	3,61	<i>2,3-butanediol dehydrogenase</i>
PA4294	-	2,29	<i>hypothetical protein</i>
PA4333	-	2,71	<i>probable fumarase</i>
PA4489	-	2,36	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA4525	<i>pilA</i>	2,53	<i>type 4 fimbrial precursor PilA</i>
PA4659	-	3,14	<i>probable transcriptional regulator</i>
PA4683	-	2,48	<i>hypothetical protein</i>
PA4888	<i>desB</i>	2,45	<i>acyl-CoA delta-9-desaturase, DesB</i>
PA5266	-	4,28	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA5267	<i>hcpB</i>	3,88	<i>secreted protein Hcp</i>
PA5360	<i>phoB</i>	2,14	<i>two-component response regulator PhoB</i>
PA5368	<i>pstC</i>	2,26	<i>membrane protein component of ABC phosphate transporter</i>
PA5435	-	6,48	<i>probable transcarboxylase subunit</i>
PA5436	-	3,65	<i>probable biotin carboxylase subunit of a transcarboxylase</i>
PA5479	<i>gltP</i>	2,53	<i>proton-glutamate symporter</i>
PA5549	<i>glmS</i>	2,41	<i>glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase</i>

Tab. 8.5 Übersicht über alle Gene mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln in *P. aeruginosa* Δ sprP. Es sind die Gene dargestellt, deren Änderungsrate ≥ 2 , der *p*-Wert $\leq 0,05$ und die Änderung in mindestens drei biologischen Replikaten messbar war. Die Annotationen wurden aus der *Pseudomonas* Datenbank übernommen.

PA Nummer	Name	Änderungsrate	Produktname
PA0169	<i>siaD</i>	2,07	<i>SDS-induced aggregation SiaD</i>
PA0170	-	2,93	<i>hypothetical protein</i>
PA0171	-	2,65	<i>hypothetical protein</i>
PA0227	-	3,21	<i>probable CoA transferase, subunit B</i>
PA0228	<i>pcaF</i>	3,27	<i>beta-ketoadipyl CoA thiolase PcaF</i>
PA0229	<i>pcaT</i>	3,38	<i>dicarboxylic acid transporter PcaT</i>
PA0366	-	2,12	<i>probable aldehyde dehydrogenase</i>
PA0534	<i>pauB1</i>	4,73	<i>FAD-dependent oxidoreductase</i>
PA0535	-	3,12	<i>probable transcriptional regulator</i>
PA0613	-	2,30	<i>hypothetical protein</i>
PA0719	-	2,15	<i>hypothetical protein of bacteriophage Pf1</i>
PA0839	-	2,93	<i>probable transcriptional regulator</i>
PA1168	-	31,32	<i>hypothetical protein</i>
PA1169	-	19,75	<i>probable lipxygenase</i>
PA1219	-	2,01	<i>hypothetical protein</i>
PA1317	<i>cyoA</i>	9,52	<i>cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II</i>
PA1318	<i>cyoB</i>	7,63	<i>cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I</i>
PA1319	<i>cyoC</i>	4,04	<i>cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III</i>
PA1351	-	2,11	<i>probable sigma-70 factor, ECF subfamily</i>
PA1596	<i>htpG</i>	2,72	<i>heat shock protein HtpG</i>
PA1784	-	2,01	<i>hypothetical protein</i>
PA1888	-	2,02	<i>hypothetical protein</i>
PA1927	<i>metE</i>	3,20	<i>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase</i>
PA2031	-	2,17	<i>hypothetical protein</i>
PA2068	-	2,20	<i>probable major facilitator superfamily (MFS) transporter</i>
PA2137	-	2,06	<i>hypothetical protein</i>
PA2146	-	3,33	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA2156	-	2,42	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA2158	-	2,32	<i>probable alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)</i>
PA2159	-	2,43	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA2160	-	2,43	<i>probable glycosyl hydrolase</i>
PA2161	-	2,38	<i>hypothetical protein</i>
PA2162	-	2,15	<i>probable glycosyl hydrolase</i>
PA2163	-	2,07	<i>hypothetical protein</i>
PA2164	-	2,30	<i>probable glycosyl hydrolase</i>
PA2169	-	3,00	<i>hypothetical protein</i>
PA2171	-	2,29	<i>hypothetical protein</i>
PA2190	-	2,26	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA2300	<i>chiC</i>	2,03	<i>chitinase</i>
PA2386	<i>pvdA</i>	7,03	<i>L-ornithine N5-oxygenase</i>
PA2388	<i>fpvR</i>	2,02	<i>FpvR</i>
PA2393	-	2,46	<i>probable dipeptidase precursor</i>
PA2394	<i>pvdN</i>	4,98	<i>PvdN</i>
PA2395	<i>pvdO</i>	4,25	<i>PvdO</i>
PA2398	<i>fpvA</i>	2,44	<i>ferripyoverdine receptor</i>
PA2403	-	2,00	<i>hypothetical protein</i>
PA2404	-	2,53	<i>hypothetical protein</i>
PA2405	-	2,30	<i>hypothetical protein</i>
PA2412	-	3,12	<i>conserved hypothetical protein</i>

Tab. 8.5 Fortsetzung.

PA2413	<i>pvdH</i>	2,09	<i>L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase, PvdH</i>
PA2414	-	2,02	<i>L-sorbose dehydrogenase</i>
PA2424	<i>pvdL</i>	2,77	<i>PvdL</i>
PA2426	<i>pvdS</i>	2,08	<i>sigma factor PvdS</i>
PA2433	-	2,23	<i>hypothetical protein</i>
PA2440	-	2,51	<i>hypothetical protein</i>
PA2441	-	3,79	<i>hypothetical protein</i>
PA2504	-	2,12	<i>hypothetical protein</i>
PA2507	<i>catA</i>	16,83	<i>catechol 1,2-dioxygenase</i>
PA2508	<i>catC</i>	20,04	<i>muconolactone delta-isomerase</i>
PA2509	<i>catB</i>	9,98	<i>muconate cycloisomerase I</i>
PA2511	<i>antR</i>	3,89	<i>probable transcriptional regulator</i>
PA2512	<i>antA</i>	44,76	<i>anthranilate dioxygenase large subunit</i>
PA2513	<i>antB</i>	32,89	<i>anthranilate dioxygenase small subunit</i>
PA2514	<i>antC</i>	27,55	<i>anthranilate dioxygenase reductase</i>
PA2682	-	6,70	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA2700	<i>opdB</i>	2,02	<i>proline porin OpdB</i>
PA2927	-	2,18	<i>hypothetical protein</i>
PA3032	<i>snr1</i>	3,02	<i>cytochrome c Snr1</i>
PA3126	<i>ibpA</i>	2,15	<i>heat-shock protein IbpA</i>
PA3187	-	2,65	<i>probable ATP-binding component of ABC transporter</i>
PA3188	-	2,47	<i>probable permease of ABC sugar transporter</i>
PA3189	-	2,26	<i>probable permease of ABC sugar transporter</i>
PA3190	-	3,01	<i>probable binding protein component of ABC sugar transporter</i>
PA3369	-	2,34	<i>hypothetical protein</i>
PA3370	-	3,51	<i>hypothetical protein</i>
PA3371	-	3,21	<i>hypothetical protein</i>
PA3459	-	2,16	<i>probable glutamine amidotransferase</i>
PA3460	-	2,10	<i>probable acetyltransferase</i>
PA3478	<i>rhlB</i>	2,32	<i>rhamnosyltransferase chain B</i>
PA3479	<i>rhlA</i>	2,32	<i>rhamnosyltransferase chain A</i>
PA3622	<i>rpoS</i>	2,12	<i>sigma factor RpoS</i>
PA3815	<i>iscR</i>	2,62	<i>IscR</i>
PA3960	-	2,75	<i>hypothetical protein</i>
PA4078	-	2,61	<i>probable nonribosomal peptide synthetase</i>
PA4139	-	25,86	<i>hypothetical protein</i>
PA4140	-	13,13	<i>hypothetical protein</i>
PA4141	-	2,30	<i>hypothetical protein</i>
PA4142	-	2,54	<i>probable secretion protein</i>
PA4205	<i>mexG</i>	2,79	<i>hypothetical protein</i>
PA4206	<i>mexH</i>	3,82	<i>probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein precursor</i>
PA4207	<i>mexI</i>	2,21	<i>probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux transporter</i>
PA4223	-	2,20	<i>probable ATP-binding component of ABC transporter</i>
PA4225	<i>pchF</i>	2,20	<i>pyochelin synthetase</i>
PA4226	<i>pchE</i>	2,33	<i>dihydroaeruginic acid synthetase</i>
PA4228	<i>pchD</i>	4,22	<i>pyochelin biosynthesis protein PchD</i>
PA4229	<i>pchC</i>	3,03	<i>pyochelin biosynthetic protein PchC</i>
PA4230	<i>pchB</i>	3,62	<i>salicylate biosynthesis protein PchB</i>
PA4359	<i>feoA</i>	2,57	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA4377	-	2,04	<i>hypothetical protein</i>
PA4468	<i>sodM</i>	4,60	<i>superoxide dismutase</i>
PA4469	-	5,72	<i>hypothetical protein</i>
PA4570	-	2,62	<i>hypothetical protein</i>

Tab. 8.5 Fortsetzung.

PA4624	<i>cdrB</i>	4,06	<i>cyclic diguanylate-regulated TPS partner B, CdrB</i>
PA4625	<i>cdrA</i>	3,27	<i>cyclic diguanylate-regulated TPS partner A, CdrA</i>
PA4709	-	2,04	<i>probable hemin degrading factor</i>
PA4739	-	2,55	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA5056	<i>phaC1</i>	2,35	<i>poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 1</i>
PA5058	<i>phaC2</i>	2,33	<i>poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2</i>
PA5100	<i>hutU</i>	2,59	<i>urocanase</i>
PA5106	-	2,72	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA5180	-	6,09	<i>conserved hypothetical protein</i>
PA5181	-	4,86	<i>probable oxidoreductase</i>
PA5429	<i>aspA</i>	2,97	<i>aspartate ammonia-lyase</i>
PA5481	-	2,11	<i>hypothetical protein</i>
PA5506	-	2,78	<i>hypothetical protein</i>
PA5507	-	2,55	<i>hypothetical protein</i>

Curriculum Vitae

Persönliches

Alexander Pelzer
Diplom-Biologe
geboren am 08.05.1986 in Viersen
ledig

Hochschulbildung

seit 06/2010

Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich als Stipendiat des *CLIB-Graduate Cluster Industrial Biotechnology*
Thema: Biochemische und physiologische Charakterisierung der Subtilase SprP aus *Pseudomonas aeruginosa*

01/2009 – 11/2009

Diplomarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich
Thema: Regulation eines proteolytischen Netzwerkes in *Pseudomonas aeruginosa*

10/2005 – 12/2008

Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berufserfahrung

10/2012 – 12/2012

Industriepraktikum bei Roal Oy in Rajamäki, Finnland

02/2010 – 05/2010

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

seit 09/2005

Mitarbeiter der Schülerhilfe GmbH & Co. KG

Schulbildung

1996 – 2005

Gymnasium Hückelhoven, Hückelhoven
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1992 – 1996

Grundschule, Hückelhoven-Baal

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen, Darstellungen und Hilfsmittel benutzt wurden. Alle Textstellen, die sinngemäß anderen Werken oder sonstigen Quellen entnommen worden sind, sind jeweils unter genauer Angabe der Quelle als Entlehnung gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 5.11.2013

Alexander Pelzer