



**Regulation der Bildung einer extrazellulären Lipase LipA und des
Lipase-spezifischen Chaperons LipB in *Burkholderia glumae***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Andreas Knapp

aus Neuss

Düsseldorf, Februar 2014

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

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

Referent:	Prof. Dr. Karl-Erich Jäger
Korreferent:	Prof. Dr. Dieter Willbold
Tag der mündlichen Prüfung:	08.04.2014

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht und dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Es handelt sich bei allen von mir eingereichten Dissertationsschriften um in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Düsseldorf, den

(Unterschrift)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas sowie die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut für Molekulare Enzymtechnologie danken. Weiterhin bedanke ich mich für die engagierte Betreuung und Unterstützung im Laufe der letzten Jahre.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold.

Bedanken möchte ich mich auch bei den wissenschaftlichen Kooperationspartnern für die konstruktive und jederzeit freundliche Zusammenarbeit. Namentlich erwähnt seien hier besonders Frau Dr. Sonja Voget, Frau Dr. Gerhild Wachlin, Frau Dr. Rebecca Schroeter, Frau Dr. Karen Methling, Herr Philipp Gierok und Frau Nina Ullrich. Weiterhin gilt mein Dank den Kolleginnen Frau Dr. Melanie Bocker und Frau Christina Mack für die Hilfe bei der Durchführung der MALDI-TOF-MS-Analysen.

Für die Betreuung in der Anfangszeit meiner Promotion möchte ich Frau Dr. Susanne Wilhelm und Herrn Dr. Frank Rosenau danken. Susanne, besonders Dein offenes Ohr hat mir in so mancher Situation sehr geholfen.

Für die Durchsicht des Manuskripts bedanke ich mich bei Herrn Dr. Horst Funken, Herrn Dr. Alexander Pelzer und Herrn Alexander Fulton.

Den hilfsbereiten und herzlichen Mitarbeitern des gesamten Instituts und besonders in den Laboren 206 und 306 gilt mein Dank für das angenehme Arbeitsklima und die vielen Stunden, die wir in den letzten Jahren gemeinsam verbracht haben. Herrn Marko Laschinski (diesmal ohne Buchstabendreher), Frau Martina Paul und Frau Sarah Rennertz möchte ich zudem für die gute Zusammenarbeit danken. Hier seien ebenfalls Herr Dr. Horst Funken, Herr Dr. Andreas Wittgens, Herr Dr. Stephan Thies und Herr Dr. Filip Kovačić genannt.

Ein besonderer Dank gilt außerdem „meinen“ Studenten Herrn Rasmus Hahn und Herrn Alexander Bollinger, deren Arbeiten ich mit viel Freude betreut habe und die in kurzer Zeit sehr viel geleistet haben.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Pia Skoczinski für ihre aufmunternde Art und die vielen konstruktiven und netten Diskussionen. Gleiches gilt für Herrn Alexander Fulton, dem ich auch persönlich für seinen freundlichen und immer hilfsbereiten Charakter danken möchte. Beruflich wie privat bedanke ich mich bei Herrn Alexander Pelzer, der mir seit dem ersten Semester als guter Freund ans Herz gewachsen ist und ohne den Vieles doppelt so schwer und nur halb so lustig gewesen wäre.

Besonders danke ich all meinen Freunden, denen ich weniger Zeit widme, als sie verdient hätten.

Meiner Freundin Sara möchte ich persönlich und von ganzem Herzen dafür danken, dass sie nie an meinen Fähigkeiten zweifelt, dass sie mir in jeder Lebenslage zur Seite steht und dass sie immer und uneingeschränkt für mich da ist. Danke, dass Du da bist!

Besonders dankbar bin ich meiner Familie, die mir jede nur erdenkliche Art von Unterstützung gibt. Ohne Euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin und ganz sicher nicht der, der ich jetzt bin. Vielen Dank für Alles und besonders für die alltäglichen Selbstverständlichkeiten, die so selbstverständlich gar nicht sind.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Knapp, A., Voget, S., Breuer, M., Hauer, B., Daniel, R., Mueller, R., Streit, W., Jaeger, K.-E. (2014). **Production of enzymes and secondary metabolites with *Burkholderia glumae* PG1.** Manuskript zur Veröffentlichung einzureichen (nach Freigabe durch BASF SE).

Knapp, A., Bollinger, A., Funken, H., Jaeger, K.-E. (2014). **Posttranscriptional regulation of *lipAB*-operon expression in *Burkholderia glumae* PG1.** Manuskript in Vorbereitung.

Knapp, A., Voget, S., Daniel, R., Jaeger, K.-E. (2014). **Expression of the lipase gene *lipA* in *Burkholderia glumae* PG1 needs a functional type II secretion system.** Manuskript in Vorbereitung.

Funken, H., Knapp, A., Vasil, M. L., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Rosenau, F. (2011). **The lipase LipA (PA2862) but not LipC (PA4813) from *Pseudomonas aeruginosa* influences regulation of pyoverdine production and expression of the sigma factor PvdS.** *J Bacteriol* **193**(20): 5858–5860.

Posterpräsentationen im Rahmen der Promotion

Klein, C., Knapp, A., Degering, C., Leggewie, C., Jaeger, K.-E. (2013). **Different signal peptides improve lipase secretion in *Burkholderia glumae*.** Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 10.-13.03.2013, Bremen/DE. Posternummer IBP050.

Knapp, A., Hahn, R., Pelzer, A., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. (2012). **Utilization of metabolic regulation for the production of heterologous proteins in *Burkholderia glumae*.** Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 18.-21.03.2012, Tübingen/DE. Posternummer RSP052.

Knapp, A., Funken, H., Jaeger, K.-E., Wilhelm, S., Rosenau, F. (2011). **Investigation of the relationship between the sigma factor PvdS and the lipase of *Pseudomonas aeruginosa*.** Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM). 03.-06.04.2011, Karlsruhe/DE. Posternummer RGP047.

Ulrich, N., Knapp, A., Methling, K., Gierok, P., Albrecht, D., Lalk, M., Wachlin, G., Jaeger, K.-E., Hecker, M. (2011). **Proteomic analysis of *Burkholderia glumae* grown under different conditions.** ProkaGENOMICS 2001, 18.-21.09.2011, Göttingen/DE, Posternummer P33.

Teile dieser Arbeit entstanden im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojektes unter dem Förderkennzeichen 0315594A.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	VIII
1. Einleitung	1
1.1 <i>Burkholderia glumae</i>	1
1.2 Lipasen.....	2
1.2.1 Struktureller Aufbau.....	3
1.2.2 Biochemische Reaktion.....	4
1.2.3 Lipasen als industrielle Biokatalysatoren.....	6
1.3 Lipase und Foldase aus <i>B. glumae</i> PG1.....	6
1.3.1 Lipase LipA.....	6
1.3.2 Foldase LipB.....	8
1.4 Regulation der Lipase und Foldase.....	9
1.4.1 Das <i>lipAB</i> -Operon.....	9
1.4.2 Direkte Regulation des <i>lipAB</i> -Operons.....	10
1.4.3 <i>Quorum sensing</i> in <i>B. glumae</i>	11
1.5 Rhamnolipide.....	13
1.6 Sekretion.....	15
1.7 Bakterielle Expressionssysteme in der Biotechnologie.....	18
1.8 Zielsetzung.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Stämme und Plasmide.....	22
2.2 Oligonukleotide.....	25
2.3 Chemikalien und Enzyme.....	27
2.4 Arbeiten mit Bakterien.....	27
2.4.1 Nähr- und Testmedien.....	27
2.4.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	28
2.4.3 Kultivierung und Probenentnahme von <i>B. glumae</i> PG1 im Kleinfemter.....	29

2.4.4	Zellfraktionierung (Überstand und Ganzzellextrakt)	30
2.4.5	Verwendung chemisch transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Stämme.....	31
2.4.6	Elektroporation von kompetenten <i>B. glumae</i> -Stämmen.....	31
2.4.7	Plasmid-DNA-Transfer mittels biparentaler Konjugation	32
2.4.8	Erzeugung einer Tn5-Insertionsbibliothek.....	32
2.4.9	Lokalisierung der Tn5-Integration im Genom von <i>B. glumae</i> PG1.....	33
2.5	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	34
2.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.5.2	Ortsspezifische Mutagenese von DNA.....	35
2.5.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	36
2.5.4	Präparation von genomischer DNA.....	36
2.5.5	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen.....	36
2.5.6	Agarosegelelektrophorese	36
2.5.7	Reinigung von DNA.....	37
2.5.8	Modifizierung von DNA mittels Enzymen	37
2.5.9	Sequenzierung von DNA.....	37
2.5.10	Herstellung von RNase-freiem Wasser	37
2.5.11	Isolation bakterieller RNA	38
2.5.12	Degradation von DNA mittels DNasen.....	38
2.5.13	Reverse Transkription	39
2.5.14	Quantifizierende <i>real-time</i> qPCR	40
2.5.15	Berechnung der relativen Transkriptmengenänderung	40
2.5.16	Analyse des Transkriptoms	41
2.6	Arbeiten mit Proteinen	44
2.6.1	Säulenchromatographische Reinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen.....	44
2.6.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	44
2.6.3	Präzipitation von Proteinen mittels TCA.....	45
2.6.4	Identifizierung von DNA-Protein-Interaktion.....	45
2.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gele	46
2.6.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen	47
2.6.7	Bestimmung der Lipaseaktivität.....	49
2.6.8	β -Lactamase-Nachweis	50
2.6.9	Quantitative Bestimmung von Rhamnolipiden.....	50

2.6.10	Nachweis von GFPmut3 mittels Fluoreszenz	51
2.6.11	Nachweis von Fusionsproteinen mit Tetracystein- <i>tag</i>	51
2.6.12	Identifizierung einzelner Proteine mittels MALDI-TOF-MS.....	52
2.6.13	Analyse des Sekretoms.....	52
2.6.14	Analyse extrazellulärer Metabolite	54
2.7	Sonstiges	55
2.7.1	<i>In silico</i> Methoden.....	55
2.7.2	Annotation des Genoms von <i>B. glumae</i>	55
3.	Ergebnisse	56
3.1	Die systembiologische Analyse von <i>B. glumae</i> PG1 zeigt Möglichkeiten zur Optimierung der Lipaseproduktion auf.....	56
3.1.1	Generierung des Probenmaterials für die systembiologische Analyse	56
3.1.2	Olivenöl induziert die Transkription der Lipase LipA	58
3.1.3	Olivenöl wird von <i>B. glumae</i> PG1 als Kohlenstoffquelle verwertet.....	61
3.1.4	Identifizierung von Typ II-sekretierten Proteinen in <i>B. glumae</i> PG1	62
3.1.5	Gezielte Analyse des Transkriptoms im Hinblick auf die Lipaseregulation.....	63
3.1.6	<i>B. glumae</i> PG1 bildet unter Lipase-induzierenden Bedingungen Rhamnolipide.....	66
3.2	Verwendung des induzierbaren Lipasepromotors zur Produktion heterologer Proteine in <i>B. glumae</i> PG1	67
3.2.1	Expressionsstämme basierend auf <i>B. glumae</i> PG1 synthetisieren heterologe Proteine.....	67
3.2.2	Etablierung des Expressionsplasmids <i>pBlip</i>	70
3.3	Einfluss eines LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators auf das <i>lipAB</i> -Operon.....	71
3.3.1	Der Transkriptionsregulator BGL_1c34440 interagiert mit dem <i>lipAB</i> -Promotor	71
3.3.2	Eine Regulation des <i>lipAB</i> -Operons durch BGL_1c34440 ist nicht eindeutig	73
3.4	Identifizierung weiterer Proteine mit Einfluss auf die Lipaseproduktion	74
3.4.1	Erstellung einer Tn5-Insertionsbibliothek von <i>B. glumae</i> PG1	74
3.4.2	Identifizierung von Insertionsmutanten mit erhöhter Lipaseproduktion.....	75
3.4.3	Charakterisierung von Tn5-Insertionsmutanten mit erhöhter lipolytischer Aktivität	76
3.5	Das Expressionslevel von <i>gspD</i> hat einen Einfluss auf die Transkription von <i>lipAB</i>	78
3.6	Untersuchung zweier Punktmutationen im <i>lipAB</i> -Operon von <i>B. glumae</i> Lu8093	80

3.6.1	Beide Mutationen erhöhen die extrazelluläre Lipaseaktivität in <i>B. glumae</i> PG1	81
3.6.2	Die gesteigerte Lipaseaktivität ist durch eine erhöhte Produktion und Sekretion der Lipase bedingt.....	82
3.6.3	Die Mutation im Bereich des <i>lipAB</i> -Promotors erhöht die Transkriptmenge von <i>lipA</i>	84
3.6.4	Die gesteigerte Lipaseproduktion und -sekretion hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von <i>gspD</i>	86
3.7	Das <i>lipAB</i> -Operon unterliegt einer posttranskriptionellen Regulation.....	86
3.7.1	Die Transkripte von <i>lipA</i> und <i>lipB</i> werden in gleichen Mengen gebildet.....	87
3.7.2	Vorhersage zweier Degradationsbereiche im <i>lipAB</i> -Operon	89
3.8	Proteinmengenbestimmung der Lipase LipA und Foldase LipB in <i>B. glumae</i> PG1	91
3.8.1	Die extrazelluläre relative Lipaseaktivität nimmt über die Zeit stetig zu	91
3.8.2	Bei steigender Menge der extrazellulären Lipase bleibt das Niveau der intrazellulären Foldase konstant.....	93
3.8.3	Durch die Mutation im Promotor des <i>lipAB</i> -Operons erreicht die LipB-Menge ein höheres, aber trotzdem konstantes Niveau.....	95
4.	Diskussion.....	97
4.1	Analyse von <i>B. glumae</i> PG1 als Lipaseproduzent	97
4.2	Möglichkeiten zur Optimierung der Lipaseproduktion.....	101
4.3	Produktion heterologer Proteine in <i>B. glumae</i> PG1	104
4.4	Einfluss eines LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators auf die Bildung der Lipase.....	107
4.5	Die Regulation der Lipase ist Teil eines komplexen Netzwerks.....	111
4.6	Einfluss der Sekretion auf die Produktion der Lipase	114
4.7	Analyse eines optimierten <i>lipAB</i> -Operons	116
4.8	LipA-unabhängige Regulation der LipB-Produktion.....	119
5.	Zusammenfassung	128
6.	Summary	130
7.	Literaturverzeichnis	132
8.	Anhang	151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Reaktionsmechanismus der Lipase für Tricarbonsäuren.	2
Abbildung 1.2 Allgemeiner Reaktionsmechanismus der Lipase für die Hydrolyse von Carbonsäureestern.	4
Abbildung 1.3 Durch Lipase katalysierte biochemische Reaktionen.	5
Abbildung 1.4 Räumliche Struktur der Lipase LipA aus <i>B. glumae</i> PG1 in der <i>ribbon</i> -Darstellung.	7
Abbildung 1.5 Darstellung der räumlichen Struktur des Lipase-Foldase-Komplexes.	9
Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der Regulation des <i>lipAB</i> -Operons.	12
Abbildung 1.7 Chemische Struktur typischer Mono- und Di-Rhamnolipide.	13
Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des Sekretionswegs der Lipase LipA.	18
Abbildung 3.1 Zelldichte und Sauerstoffpartialdruck im Verlauf der Fermentation von <i>B. glumae</i> PG1 und <i>B. glumae</i> PG1 Δ <i>gspDEF</i> in verschiedenen Medien.	57
Abbildung 3.2 Einfluss der zugesetzten Kohlenstoffquelle auf die Lipaseproduktion von <i>B. glumae</i> PG1.	59
Abbildung 3.3 Analyse des <i>lipAB</i> -Transkripts von <i>B. glumae</i> PG1 mittels RNA-Sequenzierung.	60
Abbildung 3.4 Falschfarbenbild der extrazellulären Proteine von <i>B. glumae</i> PG1 und PG1 Δ <i>gspDEF</i>	62
Abbildung 3.5 Rhamnolipidsynthese in <i>B. glumae</i> PG1 unter Fermentationsbedingungen.	66
Abbildung 3.6 Verwendung von <i>B. glumae</i> PG1 als T7-Expressionssystem.	68
Abbildung 3.7 Das plasmidbasierte Expressionssystem p <i>Blip</i> für <i>B. glumae</i> PG1.	70
Abbildung 3.8 Identifizierung eines LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators für das <i>lipAB</i> -Operon mittels DNA-Protein-Interaktionsstudien.	72
Abbildung 3.9 Einfluss des LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators BGL_1c34440 auf die Lipaseproduktion von <i>B. glumae</i> PG1.	73
Abbildung 3.10 Berechnung der benötigten Klonzahl einer <i>B. glumae</i> PG1-Transposonbank.	74
Abbildung 3.11 Lipolytische Aktivität von Tn5-Insertionsmutanten.	75
Abbildung 3.12 Relative Lipaseaktivität in Tn5-Insertionsmutanten von <i>B. glumae</i> PG1.	76
Abbildung 3.13 Relative Änderung der Transkriptmengen in Tn5-Insertionsmutanten.	77
Abbildung 3.14 Relative Lipaseaktivitäten von <i>B. glumae</i> PG1 und <i>B. glumae</i> PG1 Δ <i>gspD</i>	78
Abbildung 3.15 Relative Änderung der Transkriptmengen in <i>B. glumae</i> PG1 und <i>B. glumae</i> PG1 Δ <i>gspD</i>	79
Abbildung 3.16 Relative Lipaseaktivitäten von <i>B. glumae</i> mit verschiedenen Lipasevarianten.	81
Abbildung 3.17 Nachweis der Lipase und Foldase in <i>B. glumae</i> mit verschiedenen <i>lipAB</i> -Varianten.	82
Abbildung 3.18 Nachweis von Zellyse in verschiedenen <i>B. glumae</i> -Stämmen mit unterschiedlichen Lipasevarianten.	83
Abbildung 3.19 Relative Änderung der Transkriptmengen in verschiedenen <i>B. glumae</i> -Stämmen mit unterschiedlichen Lipasevarianten.	85
Abbildung 3.20 Schematische Darstellung des <i>lipAB</i> -Operons und der transkriptionellen <i>gfp</i> -Fusionen.	87
Abbildung 3.21 Lipaseaktivität und GFP-Quantifizierung für Reportergenfusionen mit dem <i>lipAB</i> -Operon.	88
Abbildung 3.22 Nachweis verschiedener Fragmente des <i>lipAB</i> -Transkripts.	90

Abbildung 3.23 Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand von <i>B. glumae</i> PG1Δ <i>lipAB</i> mit einem LipB-Histidin-Fusionsprotein.....	92
Abbildung 3.24 Nachweis von LipB _{CHIS} im Ganzzellextrakt von <i>B. glumae</i> PG1Δ <i>lipAB</i> mit pBBR1-P _{WT} <i>lipAB</i> _{CHIS}	93
Abbildung 3.25 Quantifizierung der Menge von LipB _{CHIS} in <i>B. glumae</i> PG1Δ <i>lipAB</i> mit pBBR1-P _{WT} <i>lipAB</i> _{CHIS}	94
Abbildung 3.26 Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand und Nachweis von LipB _{CHIS} in <i>B. glumae</i> PG1Δ <i>lipAB</i> mit pBBR1-P _{Lu} <i>lipAB</i> _{CHIS}	96
Abbildung 4.1 Physiologischer Zusammenhang zwischen Lipase- und Rhamnolipidproduktion mit möglichen Optimierungsmöglichkeiten.	103
Abbildung 4.2 Mögliche Regulation von <i>lipAB</i> durch zwei <i>nod</i> -Boxen im Promotor.	110
Abbildung 4.3 Regulatorische Zusammenhänge der Lipaseproduktion und -sekretion.	119
Abbildung 4.4 Zusammenfassendes Schema zu den <i>lipAB</i> -Transkriptanalysen.....	122
Abbildung 4.5 Zusammenfassendes Schema der Lipaseproduktion und -sekretion in <i>B. glumae</i> PG1.	126
Abbildung 8.1 <i>Multiple cloning site</i> des Expressionsplasmids p <i>Blip</i>	152
Abbildung 8.2 Vorhergesagte mRNA-Haarnadelstruktur innerhalb des Degradationsbereichs im <i>lipAB</i> -Transkript.....	154

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Verwendete Stämme.....	22
Tabelle 2.2 Verwendete Plasmide.....	23
Tabelle 2.3 Verwendete Oligonukleotide.....	25
Tabelle 2.4 Verwendete Antibiotika.....	28
Tabelle 2.5 Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.....	34
Tabelle 2.6 PCR-Programm.....	35
Tabelle 2.7 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.....	46
Tabelle 2.8 Puffer für die Bestimmung der Lipaseaktivität.....	49
Tabelle 3.1 Bestimmung extrazellulärer Metabolite zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten von <i>B. glumae</i> PG1 in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl.....	61
Tabelle 3.2 Anzahl der Gene mit veränderter Transkriptmenge unter Lipase-induzierenden Bedingungen..	64
Tabelle 3.3 Änderung der Transkriptmenge bestimmter Gene unter Lipase-induzierenden Bedingungen. ..	65
Tabelle 8.1 Veränderte Transkriptmenge ausgewählter Gene in <i>B. glumae</i> PG1 unter Lipase-induzierenden Bedingungen.....	151
Tabelle 8.2 Gene mit putativem Einfluss auf die Lipaseproduktion.....	153

Abkürzungen

<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillatum</i> (destilliertes Wasser, vollentsalzt)
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
bsp.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
<i>cfu</i>	<i>colony forming unit(s)</i> , Koloniebildende Einheit(en)
COG	<i>clusters of orthologous groups</i> , Gruppierung orthologer Gruppen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> , und andere
g	Gramm
GZE	Ganzzellextrakt
h	<i>hour(s)</i> , Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kPA	Kilopascal
LTTR	<i>LysR-type transcriptional regulator</i> , LysR-ähnlicher Transkriptionsregulator
LV	Leervektor
M	molar (mol/l)
min	Minute(n)
ml, μ l	Milli-, Mikroliter
mM	Millimolar
MME	Minimalmedium E
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NPKM	<i>nucleotide activity per kilobase of exon model per million mapped reads</i> , Basenaktivität pro Kilobase Gentranskript pro Millionen zugeordneter Sequenzen

O.D.	optische Dichte
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i> (Reinheitsgrad für die Analyse)
PCR, qPCR	<i>(quantitative) polymerase chain reaction</i> , (quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
P_{lip} o. P_{WT}	<i>lipAB</i> -Promotor aus <i>B. glumae</i> PG1 (P_{WT} wird zur Abgrenzung von Promotor P_{Lu} aus <i>B. glumae</i> Lu8093 genutzt, falls nötig)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QS	<i>quorum sensing</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
Rel.	relativ(e)
RFU	<i>relative fluorescence unit(s)</i> , Relative Fluoreszenzeinheit(en)
RNA, mRNA	<i>(messenger) ribonucleic acid</i> , (Boten-) Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	<i>second(s)</i> , Sekunde(n)
SP	Signalpeptid
T7RP	T7-RNA-Polymerase
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T_M	<i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur
ÜK	Übernachtskultur
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
<i>xg</i>	-fache Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1 *Burkholderia glumae*

Das heute unter dem Namen *Burkholderia glumae* bekannte Bakterium wurde erstmals im Jahre 1967 beschrieben, damals noch unter der Artbezeichnung *Pseudomonas glumae* (Kurita & Tabei, 1967). Diese phänotypische Einordnung in die Gruppe der Pseudomonaden wurde 1985 mittels RNA-Hybridisierungsstudien bestätigt (De Vos *et al.*, 1985). Erst in den 90er Jahren wurden mehrere Arten, darunter auch *P. glumae*, aufgrund morphologischer, physiologischer und genotypischer Gemeinsamkeiten in die neu gebildete Gattung *Burkholderia* transferiert (Yabuuchi *et al.*, 1992, Urakami *et al.*, 1994).

B. glumae ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, polar begeißeltes β -Proteobakterium und wurde erstmals im Zusammenhang mit der Reiskornfäule in Japan beschrieben (Kurita & Tabei, 1967, Schaad *et al.*, 2001). Das Bakterium misst etwa $0,5\text{--}0,7 \times 1,5\text{--}2,5 \mu\text{m}$ und weist eine Temperaturtoleranz zwischen 11 und 40 °C auf, wobei das optimale Zellwachstum zwischen 30 und 35 °C liegt (Schaad *et al.*, 2001, Brenner *et al.*, 2005). Der Organismus wird besonders wegen dieser Anpassung an subtropische Klimazonen, dem typischen Anbauggebiet für Reispflanzen, sowie aufgrund der Klimaerwärmung als eines der gefährlichsten Reispfadogene der näheren Zukunft eingestuft (Cha *et al.*, 2001, Ham *et al.*, 2011). Nicht nur in Japan und Ostasien, sondern auch in weiten Teilen des amerikanischen Kontinents wurden in den letzten Jahren bakterienbedingte Ausfälle der Reisernte von bis zu 40 % festgestellt, an denen *B. glumae* einen dominierenden Anteil hat (Shahjahan *et al.*, 2000, Jeong *et al.*, 2003, Nandakumar *et al.*, 2007, Nandakumar *et al.*, 2009, Ham *et al.*, 2011). Zudem identifizierten Jeong *et al.* (2003) *B. glumae* auch als Erreger der Pflanzenfäule in anderen Pflanzen wie etwa Tomaten oder Sesam. *B. glumae* wurde bisher erst in einer Fallstudie als (zusätzlicher) Erreger in einem immunreprimierten Patienten beschrieben (Weinberg *et al.*, 2007). Phylogenetische Analysen zeigten zudem, dass *B. glumae* näher mit anderen phytopathogenen Vertretern der Gattung *Burkholderia*, wie etwa *B. gladioli* oder *B. plantarii*, verwandt ist als mit Stämmen des *B. cepacia*-Komplexes, dem wiederum die Tier- und Humanpathogene *B. mallei* und *B. pseudomallei* angehören (Payne *et al.*, 2005, Tayeb *et al.*, 2008).

Die Gattung *Burkholderia* weist eine hohe Diversität in ihrer Interaktion mit der Umwelt auf. Neben den pflanzenpathogenen Arten werden auch avirulente und sogar symbiontische Arten beschrieben (Parke & Gurian-Sherman, 2001, Compant *et al.*, 2008). Diese Diversität zeigt sich auch innerhalb der Art *B. glumae*, wie vergleichende Genom-Analysen (Lim *et al.*,

2009, Francis *et al.*, 2013) und physiologische Studien (Karki *et al.*, 2012) zeigen konnten. Die Mechanismen, über die *B. glumae* mit anderen Organismen interagiert, sind bisher nicht vollständig erforscht. Allerdings wurde das Toxin Toxoflavin, welches über das Zelldichte-abhängige *quorum sensing*-System reguliert wird, als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren identifiziert (Jeong *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2004, Suzuki *et al.*, 2004, Karki *et al.*, 2012). Als ebenfalls virulenzassoziiert werden Lipasen beschrieben (Ham *et al.*, 2011). Ein direkter Zusammenhang konnte bisher jedoch nur für Vertreter des *B. cepacia*-Komplexes bzw. für ein einzelnes klinisches *B. glumae*-Isolat gezeigt werden (Devescovi *et al.*, 2007, Mullen *et al.*, 2007). Aufgrund dessen wird *B. glumae* der niedrigsten Risikostufe R1 zugeordnet und kann in der industriellen Biotechnologie eingesetzt werden (Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe TRBA 466, Stand April 2012).

1.2 Lipasen

Lipasen stehen aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften als Biokatalysatoren im Fokus der weißen Biotechnologie (Jaeger *et al.*, 1999). Dies gilt auch für die Lipase LipA aus dem in dieser Arbeit untersuchten Stamm *B. glumae* PG1 (Balkenhohl *et al.*, 1997, Boekema *et al.*, 2007). Lipasen gehören der Enzymklasse E.C. 3.1.1.3 an und werden als Triacylglycerin-Hydrolasen definiert (Abbildung 1.1). Die Einordnung erfolgt in Bezug auf die natürlichen Substrate des Enzyms, wodurch auch eine Abgrenzung zu der Klasse der Esterasen (E.C. 3.1.1.1) möglich ist. Esterasen hydrolysieren Carboxylester von kurzkettigen Fettsäuren (≤ 10 Kohlenstoffe), Lipasen hingegen von langkettigen Fettsäuren mit mindestens 10 Kohlenstoffen (Chahinian *et al.*, 2002).

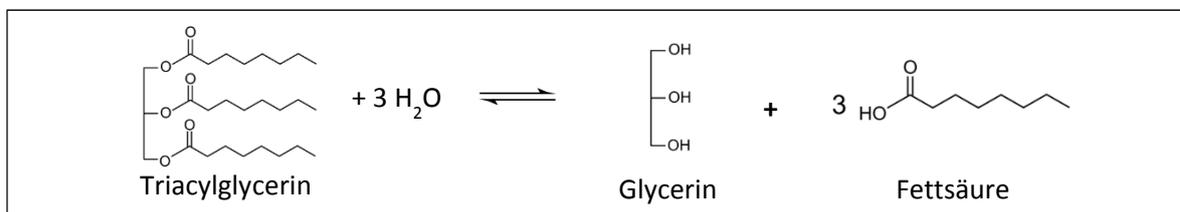


Abbildung 1.1 Reaktionsmechanismus der Lipase für Tricarbonsäuren.

Dargestellt ist die Lipase-vermittelte Hin- bzw. Rückreaktion von Triacylglycerin zu Glycerin und freien Fettsäuren (nach Jaeger & Reetz (1998)).

1.2.1 Struktureller Aufbau

Die Struktur der Lipasen entspricht der von α/β -Hydrolasen (Ollis *et al.*, 1992), die bei den hydrolytischen Enzymen der Enzymklasse 3 weit verbreitet ist (Jaeger *et al.*, 1999, Nardini & Dijkstra, 1999). Das zentrale Strukturelement der α/β -Hydrolasen besteht typischerweise aus acht β -Faltblättern und ist von α -Helices umgeben. Ebenfalls charakteristisch ist ein aktives Zentrum, in dem die Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure (oder Glutaminsäure) eine katalytische Triade ausbilden (Brady *et al.*, 1990, Winkler *et al.*, 1990). Die im aktiven Zentrum ablaufende biochemische Reaktion wird durch eine Stabilisierung des intermediären Zustands des Substrats durch die sogenannte Oxyanionentasche begünstigt, deren ein bis drei Aminosäuren über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Substrat interagieren (Cygler *et al.*, 1994, Lang *et al.*, 1998, Fischer & Pleiss, 2003). Ebenfalls weit verbreitet bei Lipasen, aber nicht zwingend vorhanden, ist eine α -helikale Struktur, welche eine Art Deckel (engl.: *lid*) über dem aktiven Zentrum ausbildet und dieses so abschirmt (Brady *et al.*, 1990, Winkler *et al.*, 1990, Ferrato *et al.*, 1997). Dieser Deckel durchläuft bei Kontakt mit der Interphase zwischen hydro- und lipophilen Lösungsmitteln eine Konformationsänderung und ermöglicht so erst den Zugang des Substrats in das aktive Zentrum der Lipase (Verger, 1997). Dieser „Interphasenaktivierung“ genannte Mechanismus bedingt einen sigmoidalen Kurvenverlauf der Reaktionskinetik, die von der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik abweicht (Brady *et al.*, 1990, Winkler *et al.*, 1990, Grochulski *et al.*, 1993, Casas-Godoy *et al.*, 2012). Neuere Studien zeigten, dass die Deckelstruktur neben der Interphasenaktivierung auch an der Enantioselektivität und Substratspezifität beteiligt sein kann (Tang *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2013). Allerdings sind ebenfalls Lipasen beschrieben, die entweder keinen Deckel (Martinez *et al.*, 1992, Lesuisse *et al.*, 1993, Eggert *et al.*, 2001) oder sogar zwei dieser Strukturelemente aufweisen (Cherukuvada *et al.*, 2005). Vor Kurzem wurde die Struktur einer Lipase aufgeklärt, deren Deckel nicht aus α -Helices, sondern aus einer Windung der Peptidkette (engl.: *loop*) besteht (Xu *et al.*, 2012). Zudem sind Lipasen bekannt, die zwar einen Deckel, aber keine Interphasenaktivierung aufweisen (Jaeger *et al.*, 1993, Uppenberg *et al.*, 1994). Zu diesen zählt auch die Lipase LipA aus *B. glumae* (Verger, 1997, Jaeger & Reetz, 1998).

1.2.2 Biochemische Reaktion

Lipasen zeichnen sich besonders durch ihre Typ-, Regio- und Enantioselektivität aus (Jaeger & Eggert, 2002, Gupta *et al.*, 2004, Casas-Godoy *et al.*, 2012). Allen gemein jedoch ist der eigentliche Reaktionsmechanismus, bei dem die Hydrolyse bzw. die Bildung eines Esters ($R\text{-COO-R}^1$) katalysiert wird (Cygler *et al.*, 1994, Jaeger & Reetz, 1998). Diese Reaktion kann in die beiden Schritte der Acylierung und Deacylierung unterteilt werden (Abbildung 1.2).

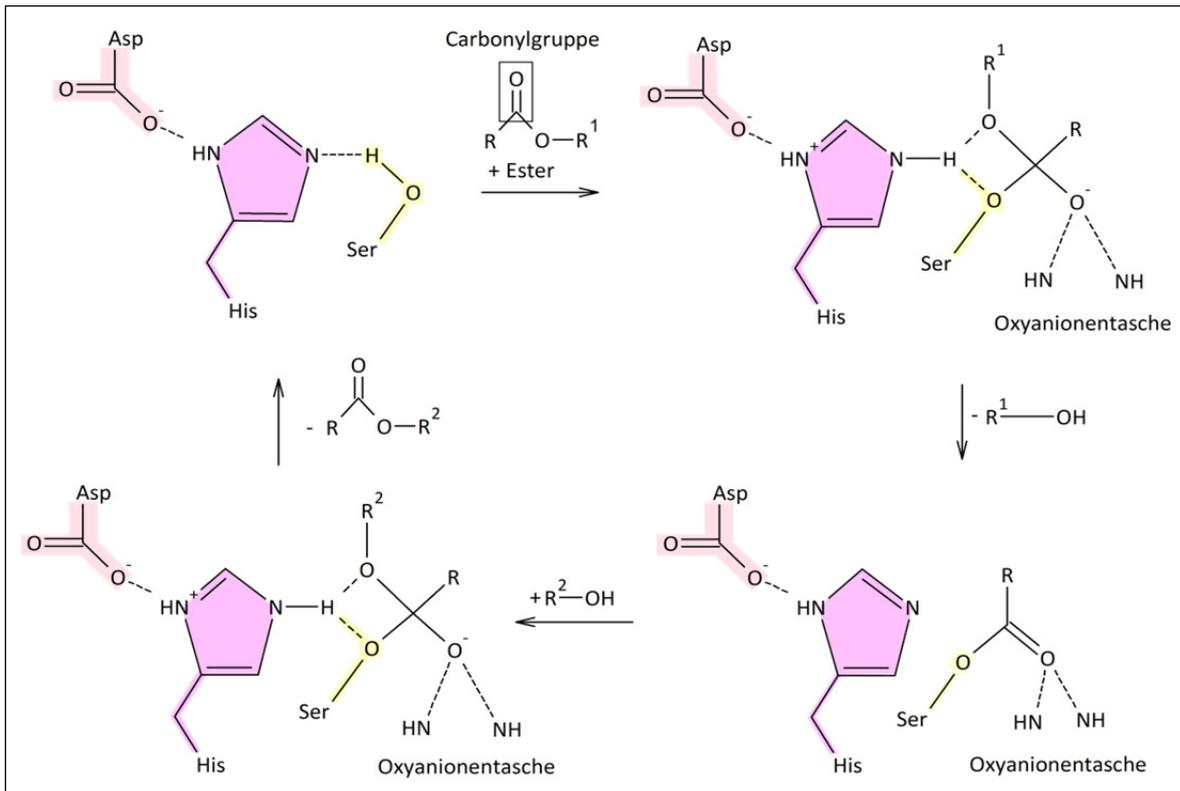


Abbildung 1.2 Allgemeiner Reaktionsmechanismus der Lipase für die Hydrolyse von Carbonsäureestern.

Dargestellt und farblich abgegrenzt sind die drei Aminosäuren der katalytischen Triade Asparaginsäure (Asp, ebenfalls Glutaminsäure möglich), Histidin (His) und Serin (Ser). Die Acylierung, durch die nach Abspaltung der Carboxylsäure der Acyl-Enzym-Komplex entsteht, wird in den drei Schritten von oben links nach unten rechts beschrieben. Der Komplex wird durch die Aminosäuren der Oxyanionentasche stabilisiert. Die Deacylierung, bei der das Enzym regeneriert und das zweite Produkt der Reaktion frei wird, wird von unten rechts nach oben links dargestellt. „R“ und „R¹“ beschreiben Kohlenwasserstoffe, während „R²“ im Falle einer klassischen Hydrolyse für Wasserstoff steht, jedoch ebenfalls Kohlenwasserstoffe beschreiben kann. Erstellt mit der *freeware*-Version von „ACD/ChemSketch v12.01“ nach Cygler *et al.* (1994), Schmid (1999), Casas-Godoy *et al.* (2012).

Bei der Acylierung wird durch den Protonentransfer von der funktionellen Gruppe des Serins über Histidin auf die Asparagin- bzw. Glutaminsäure die Hydroxylgruppe des Serins aktiviert, sodass ein nukleophiler Angriff auf die Carbonylgruppe des Esters stattfinden kann. Dabei entsteht ein tetraedrisches Intermediat, bei dem der Serin-Substrat-Komplex über Wasserstoffbrücken einerseits mit Histidin und andererseits mit den Aminosäuren der

Oxyanionentasche stabilisiert wird. Dieser Komplex wird durch Abspaltung der Carboxylsäure $R^1\text{-OH}$ vom Substrat gelöst, wobei der kovalent an das Serin gebundene Acylrest des Substrats im aktiven Zentrum verbleibt (Acyl-Enzym-Komplex). Die Regeneration des Enzyms, bei der der Acyl-Enzym-Komplex wieder gelöst wird, ist eine Deacylierung. Dabei greift ein Nukleophil mit der Struktur $R^2\text{-OH}$ (bei der Hydrolyse ist dies H_2O) den Komplex aus Serin und der Acyl-Gruppe des Substrats an, sodass erneut ein tetraedrisches Intermediat entsteht. Aus diesem gehen das Produkt der Reaktion R-COO-R^2 und das regenerierte Enzym hervor.

Das natürliche Substrat der Lipase sind Fette, also Esterverbindungen aus Glycerin und Fettsäuren. Durch die Hydrolyse dieser Ester werden einzelne Fettsäuren abgespalten. Allerdings zeichnen sich Lipasen durch ein wesentlich breiteres Reaktionsspektrum aus (siehe Abbildung 1.3): Neben der Rückreaktion zur Hydrolyse, der Veresterung (1), sind auch Umesterungen möglich, bei denen funktionelle Gruppen zwischen einem Ester und einem Donor, der ebenfalls ein Ester sein kann, ausgetauscht werden. So können etwa Amidgruppen an Ester gekoppelt werden (2) und Kohlenhydratreste mit Alkoholen (3) oder zwischen zwei Esterverbindungen (4) ausgetauscht werden (Jaeger *et al.*, 1994, Casas-Godoy *et al.*, 2012).

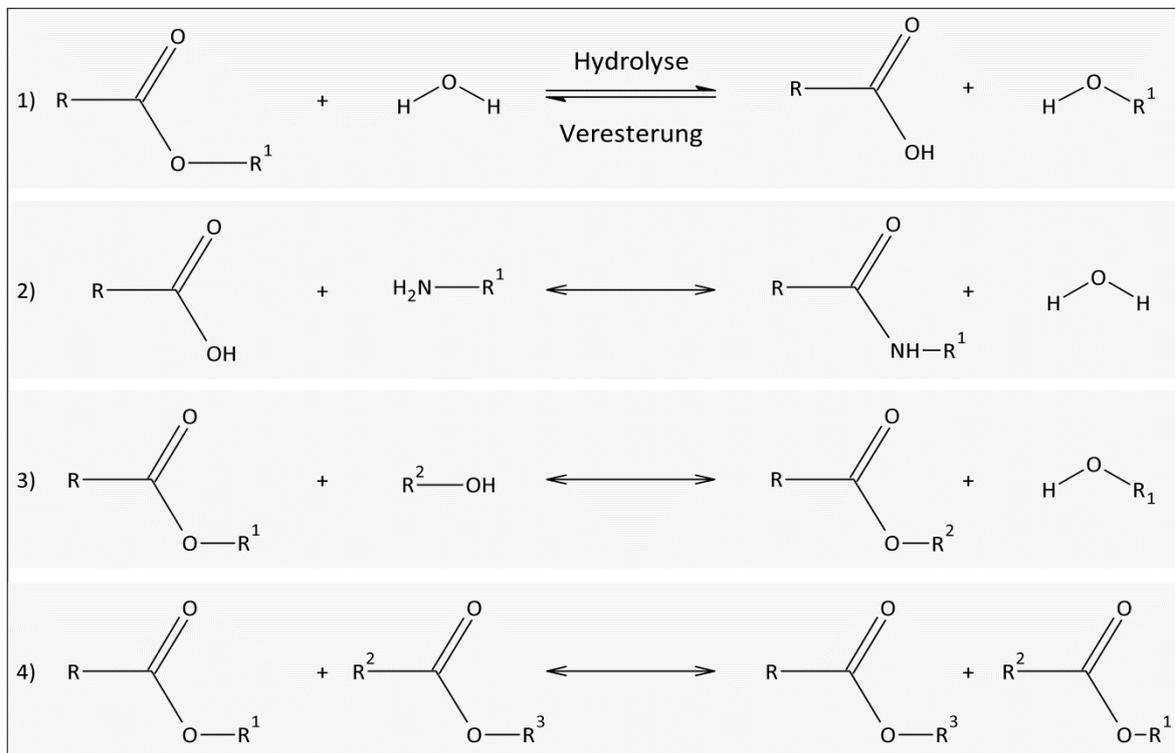


Abbildung 1.3 Durch Lipase katalysierte biochemische Reaktionen.

Dargestellt ist die Hydrolyse, welche durch die Lipase natürlicherweise katalysiert wird, und deren Rückreaktion, die Veresterung (1). Beispielhaft folgen weitere Veresterungen, welche durch Lipasen katalysiert werden können, etwa die Amidierung (2) von Estern, die Alkoholyse (3) und der Austausch zwischen zwei Estern (4). „ R^{1-3} “ beschreibt beliebige Kohlenwasserstoffe. Darstellung mit der *freeware*-Version von „ACD/ChemSketch v12.01“ nach Casas-Godoy *et al.* (2012).

1.2.3 Lipasen als industrielle Biokatalysatoren

Mikrobielle Lipasen zeichnen sich durch ihre hohe Enantioselektivität, ihre Stabilität in organischen Lösemitteln und ihr breites Substratspektrum aus, was sie als industrielle Biokatalysatoren prädestiniert (Jaeger & Reetz, 1998, Hasan *et al.*, 2006, Santambrogio *et al.*, 2013). Lipasen sind nach Proteasen und Carbohydrasen die drittgrößte Gruppe kommerziell verwendeter Enzyme (Casas-Godoy *et al.*, 2012) und finden aufgrund ihrer möglichen biochemischen Reaktionsmechanismen (siehe Abbildung 1.3) vielfältige Anwendung. Mikroorganismen sind im Vergleich zu tierischen und pflanzlichen Zellen einfacher zu kultivieren und ermöglichen so eine günstige Herstellung von Lipasen (Nagarajan, 2012).

In der Lebensmittelindustrie werden Lipasen etwa für die Ausbildung bestimmter Geschmacksstoffe in reifendem Käse verwendet (Aravindan *et al.*, 2007, Wolf *et al.*, 2009). In Reinigungsmitteln finden sie aufgrund ihres weiten Temperatur- und pH-Spektrums Verwendung und beseitigen beispielsweise Fettflecken (Hasan *et al.*, 2006). Weitere Anwendungsgebiete sind zum Beispiel die Pharma-, Leder-, Textil- und Papierindustrie sowie die Produktion von Biodiesel (Jaeger & Reetz, 1998, Jaeger *et al.*, 1999, Jaeger & Eggert, 2002, Casas-Godoy *et al.*, 2012, Stergiou *et al.*, 2013).

Der Stamm *B. glumae* Lu8093, ein von der BASF SE durch klassische Mutagenese erzeugtes Derivat von *B. glumae* PG1, produziert und sekretiert ein Vielfaches der wildtypischen Menge der Lipase LipA (Boekema *et al.*, 2007). Diese Lipase wird zur Erzeugung enantiomerenreiner Amine verwendet, die wiederum in der Pharmaindustrie Verwendung finden (Balkenhohl *et al.*, 1997).

1.3 Lipase und Foldase aus *B. glumae* PG1

1.3.1 Lipase LipA

Die Enzymklasse der Lipasen ist in acht Familien unterteilt (Arpigny & Jaeger, 1999). Die Familie I der „echten“ Lipasen unterteilt sich basierend auf Homologievergleichen in sechs Untergruppen. Die Untergruppe I.2 wird von der Lipase LipA aus *B. glumae* PG1 repräsentiert. Hauptvertreter der Untergruppe I.1 ist die Lipase LipA aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Arpigny & Jaeger, 1999, Jaeger & Eggert, 2002). Die Vertreter beider Untergruppen weisen eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf, sodass Erkenntnisse aus der Charakterisierung eines Organismus auf den anderen übertragen werden können (Frenken *et al.*, 1993b, Nardini *et al.*, 2000). Die Ähnlichkeit der beiden Organismen *B. glumae* und *P. aeruginosa* spiegelte sich bis 1985 auch im gemeinsamen Gattungsnamen wieder (siehe Abschnitt 1.1).

Charakterisiert wurde die Lipase LipA (33,1 kDa) aus *B. glumae* PG1 erstmals im Jahr 1992 und ist seitdem Gegenstand intensiver Forschung (Frenken *et al.*, 1992). Sie weist wie alle Lipasen das Strukturmotiv der α/β -Hydrolasen auf und besitzt 11 α -Helices und 9 β -Faltblätter (Ollis *et al.*, 1992, Noble *et al.*, 1993, Noble *et al.*, 1994). Noble *et al.* (1993, 1994) identifizierten die α 5-Helix als Deckel-ähnliche Struktur, die das aktive Zentrum abschirmt (Abbildung 1.4 A). Trotzdem fehlt die Interphasenaktivierung, die für Lipasen mit einem solchen Strukturelement typisch ist (Verger, 1997, Jaeger & Reetz, 1998). Charakteristisch ist weiterhin ein integrierter Ca^{2+} -Ligand, welcher durch die Aminosäuren Glutamin 291, Valin 295, Asparaginsäure 241 und 287 komplexiert wird (Noble *et al.*, 1993). Die Integration des Ca^{2+} -Ions stabilisiert das räumlich nahegelegene aktive Zentrum und ist notwendig für die Stabilität des Enzyms unter denaturierenden Bedingungen, nicht jedoch für seine Faltung und Aktivität (Invernizzi *et al.*, 2009). Dies unterscheidet die Lipase LipA aus *B. glumae* von der homologen Lipase aus *P. aeruginosa*, bei der das Ca^{2+} -Ion essenziell für die *in vitro* Faltung ist (Shibata *et al.*, 1998, El Khattabi *et al.*, 2003). Für die Stabilität der Lipase aus *B. glumae* ist zudem eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 190 und 269 verantwortlich (Noble *et al.*, 1993, Noble *et al.*, 1994, El Khattabi *et al.*, 2003). Beide Strukturelemente sind in Abbildung 1.4 B veranschaulicht.

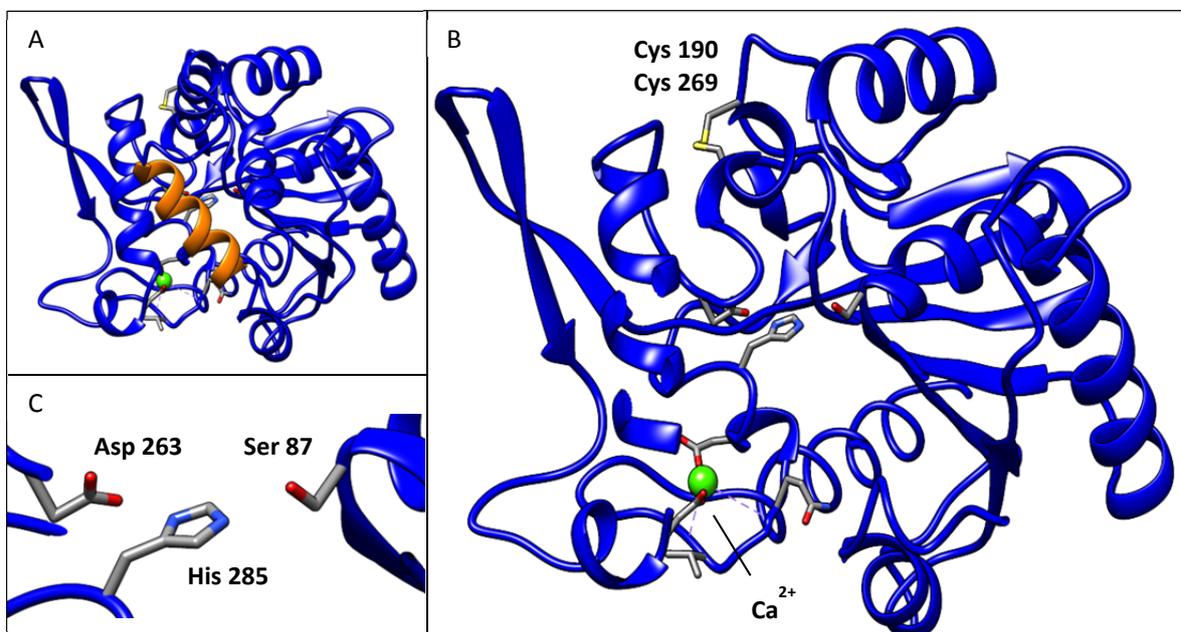


Abbildung 1.4 Räumliche Struktur der Lipase LipA aus *B. glumae* PG1 in der ribbon-Darstellung.

A: Die Lipase in geschlossener Konformation. Hier verdeckt die α 5-Helix (orange) das aktive Zentrum.
B: Querschnitt durch die Struktur der Lipase. Die α 5-Helix ist ausgeblendet. Als *sticks* dargestellt sind die Seitenketten der beiden Cysteine Cys 190 und Cys 269, die eine Disulfidbrücke ausbilden, sowie die der vier Aminosäuren Gln 291, Val 295, Asp 241 und Asp 287, welche den Ca^{2+} -Liganden komplexieren.
C: Vergrößerte Ansicht der katalytischen Triade, welche bereits in B sichtbar ist. Dargestellt sind die Seitenketten von Ser 87, Asp 263 und His 285. Strukturdaten von Noble *et al.* (1993) (PDB Code 1TAH), dargestellt mit dem Programm „USFC Chimera v1.8“ (Pettersen *et al.*, 2004).

Abbildung 1.4 C zeigt die für Serin-Hydrolasen typische katalytische Triade aus Serin 87, Asparaginsäure 263 und Histidin 285 (Noble *et al.*, 1993). Aufgrund von Homologievergleichen der Lipaseklassen I.1 und I.2 wurde den beiden Aminosäuren Leucin 17 und Arginin 61 eine Rolle in der Funktion der Oxyanionentasche zugeschrieben (Frenken *et al.*, 1992, Nardini *et al.*, 2000). Wie alle Lipasen der Klassen I.1 und I.2 wird auch die Lipase LipA aus *B. glumae* über den Typ II-Sekretionsweg in den extrazellulären Raum sekretiert (Frenken *et al.*, 1993b, Jaeger *et al.*, 1999, Goo *et al.*, 2010). Dieser Zwei-Schritt-Mechanismus transportiert die Lipase in einem ersten Schritt über die innere Membran in das Periplasma (siehe Kapitel 1.6). Dabei wird ein 39 AS langes Signalpeptid (Frenken *et al.*, 1992), welches als Erkennungssignal für den Transport dient, vom Protein abgespalten. Im Periplasma interagiert die Lipase mit einem Lipase-spezifischen Chaperon, der Foldase LipB, und erlangt so ihre aktive Konformation (Frenken *et al.*, 1993b, El Khattabi *et al.*, 2000).

1.3.2 Foldase LipB

Das Protein LipB (36,8 kDa) ist über einen N-terminalen Membrananker an der inneren Membran lokalisiert und präsentiert eine C-terminale Domäne in das Periplasma (Frenken *et al.*, 1993a, Frenken *et al.*, 1993b). Diese bildet eine klammerförmige Struktur aus (siehe Abbildung 1.5), die über eine ungewöhnlich große Fläche mit der Lipase interagiert (Pauwels *et al.*, 2005, Pauwels *et al.*, 2006).

Erst diese Interaktion verleiht der Lipase *in vivo* ihre enzymatisch aktive Konformation, die sich besonders durch ihre kinetische Stabilität von einer spontan faltenden, nah-nativen Konformation unterscheidet (Frenken *et al.*, 1993b, El Khattabi *et al.*, 2000, Pauwels *et al.*, 2012). Die Aktivierung der Lipase durch eine Foldase ist Spezies-spezifisch, so kann etwa die Foldase aus *P. aeruginosa* PAO1 nicht die Funktion der Foldase aus *B. glumae* PG1 ersetzen (El Khattabi *et al.*, 1999). *In vitro* Studien zeigten, dass die Lipase bereits im Komplex mit der Foldase enzymatisch aktiv ist, dieser Komplex jedoch aufgrund der großen Interaktionsfläche *in vitro* nicht aufgelöst wird (El Khattabi *et al.*, 2000, Pauwels *et al.*, 2006). Durch die Interaktion schützt die Foldase die Lipase vor proteolytischem Abbau und übernimmt damit eine ähnliche Funktion wie die Propeptid-Domäne der Proteasen (Pauwels *et al.*, 2012). Da die Lipase *in vivo* jedoch aus dem Periplasma über die äußere Membran sekretiert wird, nimmt man an, dass die Lipase durch die Interaktion mit Proteinen des Typ II-Sekretionssystems aus dem Komplex mit der Foldase gelöst wird (Rosenau & Jaeger, 2000, Rosenau *et al.*, 2004). Eine solche Interaktion konnte bereits für die Lipase LipA aus

P. aeruginosa gezeigt werden (Knapp, 2009, Douzi *et al.*, 2011). Aufgrund der *in vitro* nicht dissoziierenden Komplexe aus Lipase und Foldase konnte bisher nicht geklärt werden, ob eine Foldase mehr als eine Lipase aktivieren kann (Rosenau & Jaeger, 2000).

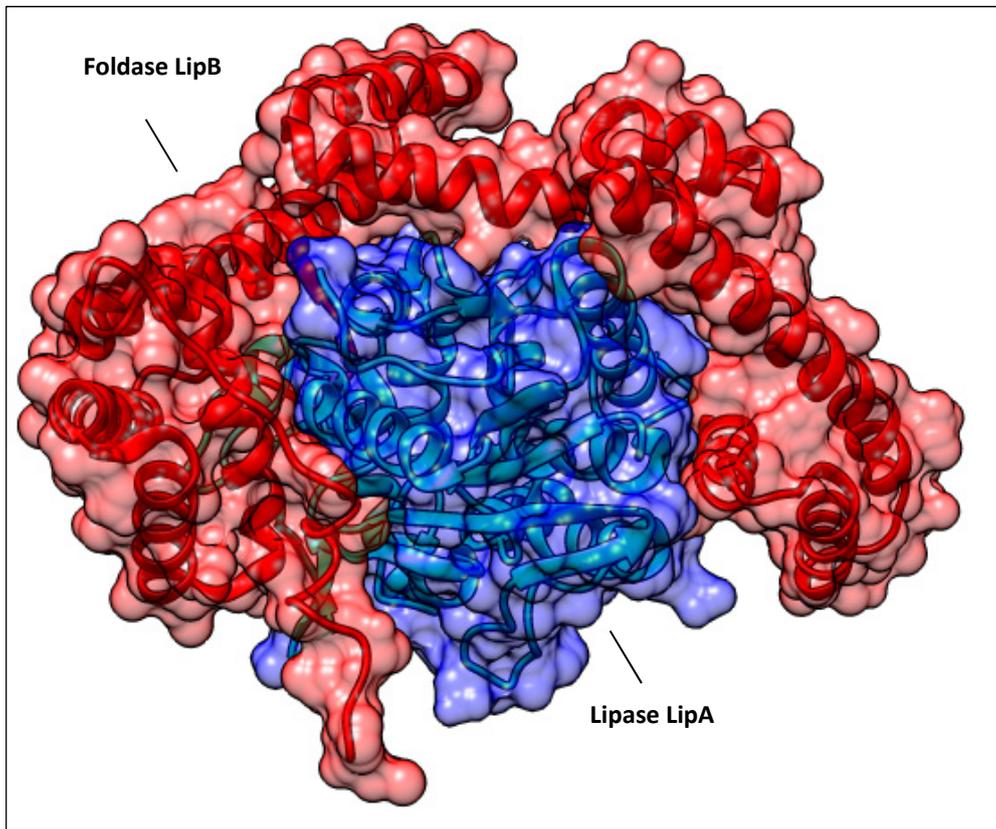


Abbildung 1.5 Darstellung der räumlichen Struktur des Lipase-Foldase-Komplexes.

Die Lipase LipA (blau) und die Foldase LipB (rot, ohne Membrananker) aus *B. glumae* PG1 sind in der *ribbon*-Darstellung abgebildet. Halbtransparent sind die ladungsbedingten Oberflächen beider Moleküle dargestellt. Strukturdaten von Pauwels *et al.* (2006) (PDB Code 2es4), dargestellt mit dem Programm „USFC Chimera v1.8“ (Pettersen *et al.*, 2004).

1.4 Regulation der Lipase und Foldase

1.4.1 Das *lipAB*-Operon

Das funktionelle Zusammenspiel von Lipase und Foldase spiegelt sich auch in der Organisation der entsprechenden Gene wieder. Die beiden Gene *lipA* und *lipB* sind zusammen in einem bicistronischen Operon lokalisiert (Frenken *et al.*, 1993a). Gene eines Operons bilden eine regulatorische Einheit, da ihre Transkription von einem gemeinsamen Promotor kontrolliert wird. Oft sind Gene auf einem Operon kodiert, die voneinander abhängig sind oder unter ähnlichen Umweltbedingungen exprimiert werden (Osbourn & Field, 2009).

Das *lipA*-Gen, welches für die Lipase LipA in *B. glumae* PG1 kodiert, umfasst 1177 bp (Frenken *et al.*, 1992). Im stromaufwärts gelegenen Bereich des *lipA*-Gens liegen zwei δ^{54} -abhängige Promotorsequenzen, welche 129–142 bzw. 90–104 bp vom Startcodon entfernt sind, sowie der 78 bp vom Startcodon entfernte Transkriptionsstart (Beselin, 2005). Überlagernd mit dem Stoppcodon des *lipA*-Gens befindet sich in gleicher Leserichtung das Startcodon des 1062 bp langen Foldase-Gens *lipB* (5'-*lipA*-TGATG-*lipB*-3'), wobei beide Gene auf einer gemeinsamen mRNA identifiziert wurden (Frenken *et al.*, 1993a). Durch die Überlagerung beider Gene unterscheidet sich das *lipAB*-Operon aus *B. glumae* PG1 von anderen Lipase-Foldase-Operons. In *P. aeruginosa* PAO1 etwa sind beide Gene des Operons durch eine 49 bp lange intergenische Region voneinander getrennt, der aufgrund von RNA-Sekundärstrukturen und repetitiven Elementen eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird (Rosenau, 2001).

1.4.2 Direkte Regulation des *lipAB*-Operons

Welche Regulatoren an der Expressionskontrolle des *lipAB*-Operons in *B. glumae* PG1 direkt beteiligt sind, ist bisher nicht bekannt. In *P. aeruginosa* konnte jedoch gezeigt werden, dass das Zwei-Komponenten-System CbrA/CbrB (auch LipQ/LipR), welches eine globale Anpassung des Organismus an vorhandene Kohlen- und Stickstoffquellen ermöglicht, ebenfalls an der Regulation des *lipAH*-Operons beteiligt ist (Rosenau & Jaeger, 2000, Nishijyo *et al.*, 2001, Rosenau, 2001, Rojo, 2010, Abdou *et al.*, 2011, Yeung *et al.*, 2011). Entsprechend dem allgemeinen Aufbau der Zwei-Komponenten-Systeme ist CbrA eine Sensor-Histidinkinase, welche nach Erkennung eines bisher unbekanntes Signals den Transkriptionsregulator CbrB durch Phosphorylierung moduliert (Hoch, 2000). CbrB vermittelt dann die Bindung von δ^{54} -RNA-Polymerasen an die entsprechenden Promotoren (Abdou *et al.*, 2011).

Für die Regulation des *lipAB*-Operons in *B. glumae* PG1 ist ein solches Zwei-Komponenten-System bisher nicht beschrieben, allerdings wurde auch hier eine Anpassung der Lipaseproduktion an vorhandene Kohlenstoffquellen beobachtet (Boekema *et al.*, 2007). In diesen Studien wurde gezeigt, dass die Produktion der Lipase LipA durch Olivenöl bzw. Tween 80 (Detergenz mit Ölsäureresten) stimuliert wird, auch wenn Saccharose als alternative Kohlenstoffquelle im Medium vorlag.

In *B. glumae* AU6208 scheint die Sekretion der Lipase durch das *quorum sensing*-System (QS) reguliert zu sein, da in einem QS-defizienten Derivat dieses Stamms keine Lipase mehr nachgewiesen werden konnte (Devescovi *et al.*, 2007). Diese Beobachtung wurde später

ebenfalls für eine QS-defiziente Variante von *B. glumae* BGR1 durch Proteomuntersuchungen beschrieben (Goo *et al.*, 2010).

1.4.3 Quorum sensing in *B. glumae*

Der Begriff des *quorum sensing* beschreibt einen interzellulären Regulationsmechanismus von Einzellern und wurde erstmals im Gram-negativen Bakterium *Vibrio fischeri* (heute *Allivibrio fischeri*) beschrieben. Dabei wird die Expression bestimmter Gene erst nach Erreichen einer gewissen Zelldichte eingeleitet (Dunlap & Kuo, 1992, Fuqua *et al.*, 1994, Urbanczyk *et al.*, 2007).

Die Zellkommunikation erfolgt dabei über ein teils Spezies-übergreifendes Signalmolekül, welches von einer Signalsynthetase intrazellulär produziert wird und durch die Zellmembranen in den extrazellulären Raum sowie in andere Zellen diffundiert (Kaplan & Greenberg, 1985, Kuo *et al.*, 1996, Schaefer *et al.*, 1996, Bassler *et al.*, 1997). In ausreichend hohen Konzentrationen aktiviert dieses Molekül einen Antwortregulator genannten Transkriptionsregulator, welcher wiederum die Expression bestimmter Gene induziert (Engebrecht & Silverman, 1987, Dunlap & Kuo, 1992). Dieser Regulationsmechanismus ist inzwischen für eine Vielzahl von Mikroorganismen beschrieben, darunter auch das ausführlich untersuchte Las-System aus *P. aeruginosa* und das Tof-System aus *B. glumae* (Gambello *et al.*, 1993, Kim *et al.*, 2004, Williams & Camara, 2009).

In *B. glumae* werden die beiden Hauptelemente des QS-Systems TofI (Signalsynthetase) und TofR (Antwortregulator) genannt. Das von TofI synthetisierte Signalmolekül ist hauptsächlich das N-Octanoyl-L-Homoserinlacton (C₈-HSL) sowie das N-Hexanoyl-L-Homoserinlacton (C₆-HSL) (Kim *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2007).

In *P. aeruginosa* wird die Expression des Lipaseoperons über das QS-System reguliert (Rosenau & Jaeger, 2000, Tielen *et al.*, 2013). Daher wird ein solcher Zusammenhang auch für *B. glumae* vermutet, auch wenn bisher nur die Sekretion der Lipase als QS-reguliert beschrieben wurde (Devescovi *et al.*, 2007, Goo *et al.*, 2010).

Das QS-System reguliert eine Vielzahl weiterer Synthesewege in *B. glumae*. Die Produktion und Sekretion des Toxins Toxoflavin etwa, welchem die beiden Gencluster *toxABCDE* und *toxFGHI* zugrundeliegen, wird unter anderem durch die Regulatoren ToxR und ToxJ stimuliert, die unter Kontrolle des QS-Systems stehen (Kim *et al.*, 2004, Suzuki *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2012). Über einen weiteren ToxR-abhängigen Transkriptionsregulator QsmR wird außerdem die Ausbildung der polaren Flagelle, der Zellbeweglichkeit durch *swimming*

und *swarming* und des Typ II-Sekretionsapparates gesteuert (Kim *et al.*, 2007, Goo *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2013, Jang *et al.*, 2014).

B. glumae PG1 produziert ähnlich wie *P. aeruginosa* Rhamnolipide (Costa *et al.*, 2011). Für *P. aeruginosa* wurde eine QS-vermittelte Induktion der Rhamnolipidsynthese-Gene *rhIAB* und *rhIC* durch den Transkriptionsregulator RhIR nachgewiesen, welcher mit der Signalsynthetase RhII homolog zum TofI/R-System aus *B. glumae* ist (Ochsner *et al.*, 1994b, Ochsner & Reiser, 1995, Rahim *et al.*, 2001, Lazdunski *et al.*, 2004, Dusane *et al.*, 2010). Abbildung 1.6 zeigt eine Übersicht der bisher bekannten regulatorischen Zusammenhänge in *B. glumae* PG1 sowie ergänzende Informationen aus *P. aeruginosa*.

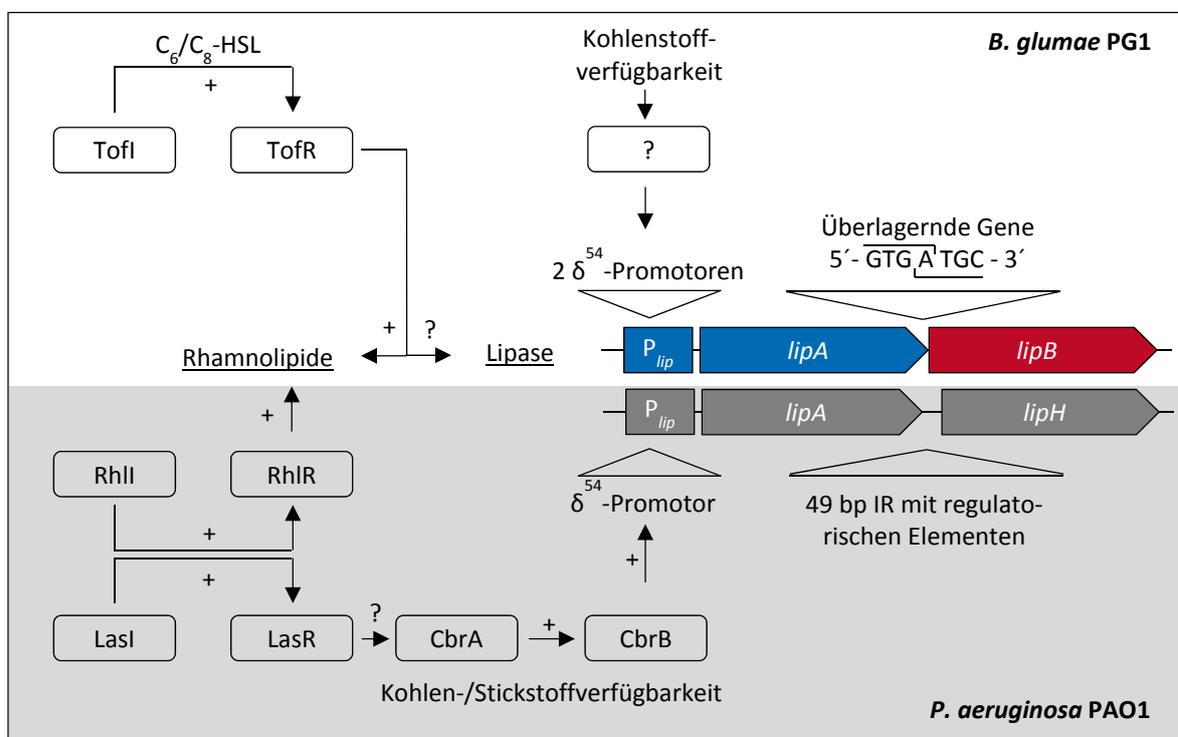


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der Regulation des *lipAB*-Operons.

Dargestellt sind bekannte regulatorische Zusammenhänge in *B. glumae* PG1 (oben) und ergänzende Informationen aus *P. aeruginosa* PAO1 (unten, grau unterlegt). Entsprechende Literatur ist im Fließtext angegeben. „+“: induzierende Wirkung. „?“: unbekannte Wirkung oder unbekannter Regulator.

Das QS-System in *B. glumae* besteht aus dem Transkriptionsregulator TofR und der Signalsynthetase TofI, welche über die Signalmoleküle C₆- bzw. C₈-HSL TofR aktiviert. *B. glumae* PG1 produziert Rhamnolipide, die wahrscheinlich über einen ähnlichen Mechanismus wie in *P. aeruginosa* PAO1 (LasI/LasR und RhII/RhIR) induziert werden. Für *P. aeruginosa* PAO1 wurde die Lipase LipA als QS-reguliert beschrieben. Für *B. glumae* PG1 ist bisher jedoch nur bekannt, dass die Lipaseregulation durch die verfügbaren Kohlenstoffquellen beeinflusst wird. Im stromaufwärts gelegenen Bereich des *lipAB*-Operons wurden zwei putative δ^{54} -abhängige Promotoren identifiziert. Für das Lipase-Foldase-Operon (*lipAH*) in *P. aeruginosa* PAO1 konnte ein aktivierender Regulator CbrB identifiziert werden, der ebenfalls an einen δ^{54} -abhängiger Promotor im Stromaufwärtsbereich des Operons bindet und Teil eines Zwei-Komponenten-Systems mit CbrA ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen LasI/LasR und CbrA/CbrB konnte bisher nicht beschrieben werden. In *B. glumae* PG1 stellt die letzte Base des *lipA*-Stoppcodons die erste Base des *lipB*-Startcodons dar, während in *P. aeruginosa* PAO1 beide Gene durch eine 49 bp lange intergenische Region (IR) mit möglichen regulatorischen Elementen getrennt sind.

1.5 Rhamnolipide

Rhamnolipide sind anionische, amphiphile Moleküle, die aus mindestens einer hydrophilen Rhamnose und hydrophoben 3-Hydroxyfettsäuren bestehen (siehe Abbildung 1.7). Sie werden hauptsächlich von den Gattungen *Pseudomonas* und *Burkholderia* gebildet und besitzen aufgrund ihrer Struktur eine emulgierende Wirkung auf Wasser-Öl-Gemische, weswegen sie auch als Biodetergenzien oder Biotenside bezeichnet werden (Soberon-Chavez *et al.*, 2005, Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Mueller *et al.*, 2012).

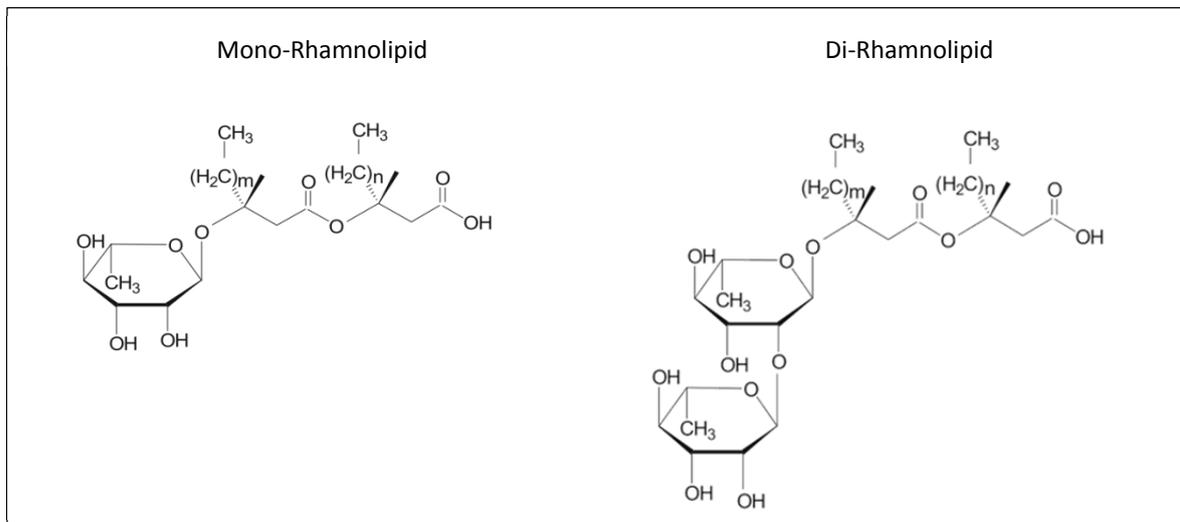


Abbildung 1.7 Chemische Struktur typischer Mono- und Di-Rhamnolipide.

Rhamnolipide bestehen aus einem Molekül (Mono-) bzw. zwei Molekülen (Di-) Rhamnose und 3-Hydroxyfettsäuren (Anzahl: 1–3, abgebildet sind 2). Die Länge der Fettsäureketten ist variabel (m , n). Strukturformel aus Soberon-Chavez *et al.* (2005).

Biotenside im Allgemeinen und Rhamnolipide im Speziellen weisen eine bessere biologische Abbaubarkeit als synthetische Tenside auf und sind zudem weniger toxisch, sodass sie eine potenzielle Alternative zu den synthetischen Tensiden etwa in der Kosmetik-, Pharma- oder Waschmittelindustrie darstellen (Poremba *et al.*, 1991, Flasz *et al.*, 1998, Banat *et al.*, 2000, Mueller *et al.*, 2012). Bisher werden Rhamnolipide erfolgreich als Fungizide eingesetzt (ZonixTM, Jeneil Biosurfactants Co., USA); die ihnen strukturell ähnlichen Sophorolipide finden in Reinigungsprodukten der Firma Ecover (Belgien) Anwendung (Nguyen & Sabatini, 2011, Mueller *et al.*, 2012). Rhamnolipide werden zudem bereits von mindestens einer Firma kommerziell vertrieben (Rhamnolipid Companies, Inc., USA). Mueller *et al.* (2012) stellten eine bis Ende 2011 nahezu exponentiell wachsende Menge von Patenten und Publikationen zu den Themen „Rhamnolipide“ und „Biotenside“ fest, was das wachsende Interesse von Forschung und Wirtschaft an diesen Stoffen verdeutlicht.

Die Anzahl (1–3) und Länge (8–16 Kohlenstoffe) der Fettsäureketten verschiedener Rhamnolipide variiert je nach Ursprungsorganismus (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Während in *P. aeruginosa* vor allem Rhamnolipide mit zwei C₁₀-Fettsäuren vorkommen (Deziel *et al.*, 1999, Raza *et al.*, 2007), zeigte Knorr (2010), dass die von *B. glumae* PG1 gebildeten Rhamnolipide hauptsächlich Di-Rhamnolipide mit zwei C₁₄-Fettsäuren sind.

Die physiologische Funktion der Rhamnolipide besteht unter anderem in der Erschließung von wasserunlöslichen Nährstoffen wie Alkanen oder Fetten (Koch *et al.*, 1991, Zhang & Miller, 1995, Beal & Betts, 2000). Die Rhamnolipidsynthese in *P. aeruginosa* PAO1 ist ausführlich beschrieben: Die Acyltransferase RhlA synthetisiert aus zwei β -Hydroxyfettsäuren das 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)alkanoat (HAA), welches in einem nächsten Schritt durch die Rhamnosyltransferase RhlB über eine β -glykosidische Bindung mit einem Molekül L-Rhamnose gekoppelt wird (Ochsner *et al.*, 1994a, Deziel *et al.*, 2003). Das so entstandene Mono-Rhamnolipid kann durch eine zweite Rhamnosyltransferase RhlC, die die Bindung einer weiteren L-Rhamnose an die bereits vorhandene Rhamnose katalysiert, zu einem Di-Rhamnolipid umgewandelt werden (Rahim *et al.*, 2001).

In *P. aeruginosa* sind die Strukturgene von RhlA und RhlB zusammen mit *rhlR*, *rhlI* und anderen Genen auf einem polycistronischen Operon kodiert, während das *rhlC*-Gen zusammen mit dem Gen eines putativen Rhamnolipidtransporters in einem separaten Cluster lokalisiert ist (Ochsner *et al.*, 1994a, Rahim *et al.*, 2001). Die Genexpression wird von dem Transkriptionsregulator RhlR im Zusammenspiel mit der Signalsynthetase RhlI und dem in Kapitel 1.4.3 beschriebenen QS-System reguliert (Ochsner *et al.*, 1994b, Lazdunski *et al.*, 2004).

Da der zurzeit wohl am besten charakterisierte Rhamnolipid-Produzent, *P. aeruginosa*, ein opportunistisch-humanpathogener Keim ist, wird intensiv nach alternativen Produktionsstämmen geforscht (Mueller *et al.*, 2012). Hier steht neben der heterologen Produktion etwa im nicht-pathogenen *Pseudomonas putida* KT2440 (Wittgens *et al.*, 2011) auch die homologe Produktion durch die Gattung *Burkholderia* im Fokus: So wurden etwa die Stämme *B. kururiensis* und *B. glumae* als potenzielle Rhamnolipid-Produzenten identifiziert (Dubeau *et al.*, 2009, Costa *et al.*, 2011, Tavares *et al.*, 2013).

1.6 Sekretion

Gram-negative Bakterien verfügen über insgesamt sechs Sekretionssysteme, die als Typ I bis Typ VI bezeichnet werden (Holland, 2010, Filloux, 2011). In Gram-positiven Bakterien wurde zudem ein weiteres System (Typ VII) beschrieben (Abdallah *et al.*, 2007, Stoop *et al.*, 2012). Die Sekretionssysteme der Gram-negativen Bakterien lassen sich in zwei Kategorien unterteilen.

Solche, die ihre Substrate direkt über beide Zellmembranen transportieren, werden als Ein-Schritt-Mechanismen bezeichnet (Typ I, III, IV und VI). Hierzu zählen beispielsweise die ABC-Transporter (Typ I-Sekretion). Diese bestehen aus einem äußeren Membranprotein, einem das Periplasma durchspannenden Protein und der namensgebenden ATP-bindenden Kasette (*ATP-binding cassette*) (Mackman *et al.*, 1985, Holland *et al.*, 2005).

Wird das Substrat in einem ersten Schritt in das Periplasma transportiert und von dort in einem zweiten Schritt über die äußere Membran in den extrazellulären Raum, spricht man von einem Zwei-Schritt-Transport (Typ II und V). Frenken *et al.* (1993b) zeigten in heterologen Expressionsstudien, dass die Sekretion der Lipase LipA aus *B. glumae* PG1 in *P. aeruginosa* PAO1 durch den Typ II-Sekretionsapparat vermittelt wird und nahmen daher an, dass die Sekretion in *B. glumae* PG1 ebenso verläuft. Neuere Studien konnten dies bestätigen, da die Lipase LipA in Typ II-sekretionsdefizienten Stämmen von *B. glumae* BGR1 und PG1 nicht sekretiert wird (Goo *et al.*, 2010, Knorr, 2010).

Im Folgenden wird der Zwei-Schritt-Transport mit Fokus auf den Typ II-Sekretionsapparat und die Sekretion der Lipase beschrieben.

Zwei-Schritt-Transport: Sekretion über die innere Membran

Der posttranslationale Transport aus dem Cytoplasma über die innere Membran erfolgt entweder über den Sec- oder den Tat-Apparat. Als Erkennungsmuster für beide Mechanismen dient ein in den chemischen Eigenschaften, nicht aber der Sequenz konserviertes N-terminales Signalpeptid mit 22–32 AS Länge (Schatz & Beckwith, 1990, Tommassen *et al.*, 1992, Tuteja, 2005, Choo *et al.*, 2009, Palmer *et al.*, 2010). Dieses Signalpeptid weist am N-Terminus eine positiv geladene N-Domäne auf, gefolgt von einer hydrophoben H-Region und einem polaren C-terminalen Bereich (Driessen & Nouwen, 2008).

Der Tat-Apparat transportiert Proteine in ihrer nativen Konformation (Berks *et al.*, 2000). Zwischen der N- und H-Region des Tat-Signalpeptids befinden sich zwei aufeinanderfolgende Arginine, die für die Namensgebung (*twin-arginine translocation*) verantwortlich sind (Berks,

1996). So können auch Proteine, deren native Konformation zum Beispiel den Einbau von Kofaktoren im Cytoplasma benötigt, in das Periplasma transportiert werden (Clark & Theg, 1997, Hynds *et al.*, 1998).

Der Sec-Apparat kann hingegen ausschließlich ungefaltete Proteine translozieren, wobei entweder posttranslational das Chaperon SecB oder cotranslational SRP (*signal-recognition particle*) an das zu sekretierende Protein bindet und die Interaktion mit dem Sec-Translocon einleitet (Kumamoto, 1989, Koch *et al.*, 1999, Beck *et al.*, 2000, Driessen, 2001). Die ATPase SecA liefert die Energie für den Transport des Proteins durch das Translocon, welches aus den Proteinen SecY, SecE und SecG besteht (Mitchell & Oliver, 1993, Manting *et al.*, 2000, Breyton *et al.*, 2002). Die positiv geladene N-Domäne des Signalpeptids vermittelt die Spezifität für den Sec-Apparat, da sie mit SecA interagiert und so den Transport initiiert (Cunningham & Wickner, 1989).

Bei Proteinen wie der über den Sec-Apparat transportierten Foldase LipB aus *B. glumae* PG1, die in der inneren Membran lokalisiert sind, fungiert die hydrophobe H-Region des Sec-Signalpeptids oft als α -helikaler Membrananker (Frenken *et al.*, 1993a). Periplasmatische oder weiter transportierte Proteine hingegen weisen in der C-Region des Signalpeptids eine Peptidase-spezifische Erkennungsstelle Ala-X-Ala auf, an der die Signalpeptidasen 1 und 2 (SP1 bzw. SP2) das Signalpeptid vom restlichen Protein abspalten (Bilgin *et al.*, 1990, Seydel *et al.*, 1999, Tuteja, 2005, De Bona *et al.*, 2012). Die SP2-spezifische Sequenz findet sich oft in Lipoproteinen, die mit Membranen assoziiert sind (Juncker *et al.*, 2003).

Die Lipase LipA aus *B. glumae* PG1 verfügt über ein ungewöhnlich langes Sec-Signalpeptid mit 39 Aminosäuren und über eine SP1-spezifische Erkennungssequenz (Frenken *et al.*, 1992). Sie wird wie die meisten bakteriellen Lipasen mittels des Sec-Apparates durch die innere Membran transportiert (Rosenau & Jaeger, 2000).

Nach Sec-vermittelter Translokation durch die innere Membran in das Periplasma und Hydrolyse des Signalpeptids bildet die Lipase eine nah-native, inaktive Konformation aus (Pauwels *et al.*, 2012). Die Interaktion der Lipase mit der Lipase-spezifischen Foldase im Periplasma vermittelt zum einen die aktive Konformation der Lipase, zum anderen wird vermutet, dass dieser Komplex ein Erkennungssignal für den Transport über die äußere Membran beinhaltet (Frenken *et al.*, 1993b, Filloux *et al.*, 1998, Rosenau & Jaeger, 2000, Voulhoux *et al.*, 2000).

Zwei-Schritt-Transport: Sekretion über die äußere Membran

Der Proteintransport über die äußere Membran durch den Typ II-Sekretionsapparat wird auch als *main terminal branch* des *general secretion pathway* bezeichnet. Der an den Zellpolen lokalisierte Apparat besteht aus 12 bis 16 verschiedenen Proteinen und durchspannt das Periplasma von der inneren bis zur äußeren Membran (Filloux, 2004, Senf *et al.*, 2008, Korotkov *et al.*, 2012). Obwohl Typ II-Sekretionssysteme in vielen Organismen sehr ähnlich aufgebaut sind, unterscheidet sich der Buchstaben-Code für homologe Gene und Proteine teils vollständig (bspw. *B. glumae*: Gsp-Cluster, *P. aeruginosa*: Xcp-Cluster). Ähnlich dem Vorschlag von A. Filloux werden für eine bessere Übersichtlichkeit die Proteine des Typ II-Systems in der Einleitung daher nach dem Muster Gsp^{Xcp} benannt (Filloux *et al.*, 1998, Filloux, 2004). Der Aufbau des Sekretionsapparats ist zusammen mit der Lipasesekretion in Abbildung 1.8 schematisch dargestellt.

Die ATPase GspE^{XcpR}, die die Energie für den Transport bereitstellt, bildet zusammen mit dem integralen Membranprotein GspF^{XcpS} und anderen Gsp-Proteinen die Basis des Apparates in der inneren Membran (Turner *et al.*, 1993, Sandkvist *et al.*, 1995, Ball *et al.*, 1999, Py *et al.*, 2001, Douzi *et al.*, 2012). In der äußeren Membran bildet ein Multimer aus GspD^{XcpQ} die Translokationspore, auch *secretin* genannt (Brok *et al.*, 1999). Das Periplasma wird von GspC^{XcpP} (Korotkov *et al.*, 2006, Login *et al.*, 2010) und einer multimeren Struktur durchspannt, die aufgrund ihrer Homologie zum Pilus des Typ IV-Systems als Pseudopilus bezeichnet wird (Nunn, 1999). Sie besteht hauptsächlich aus dem Pseudopilin GspG^{XcpT}, aber auch aus GspH^{XcpU}, GspI^{XcpV}, GspJ^{XcpW} und GspK^{XcpX} (Nunn & Lory, 1993). Die Pseudopiline werden nach dem Überschreiten der inneren Membran von der Präpilineptidase GspO^{XcpA} (identisch zu PilD des Typ IV-Systems) prozessiert und verlängern im Anschluss den Pseudopilus, der sich kolbenartig in Richtung Sekretionspore ausbildet (Bally *et al.*, 1992, Durand *et al.*, 2003, Campos *et al.*, 2010). Das Wachstum des Pilus wird von einer „Kappe“ aus GspK^{XcpX}, GspI^{XcpV} und GspJ^{XcpW} terminiert (Durand *et al.*, 2005, Korotkov & Hol, 2008). Durch Interaktion der Substrate mit GspC^{XcpP} und dem porenbildenden GspD^{XcpQ} findet möglicherweise eine Selektion für den Transport statt (Douzi *et al.*, 2011).

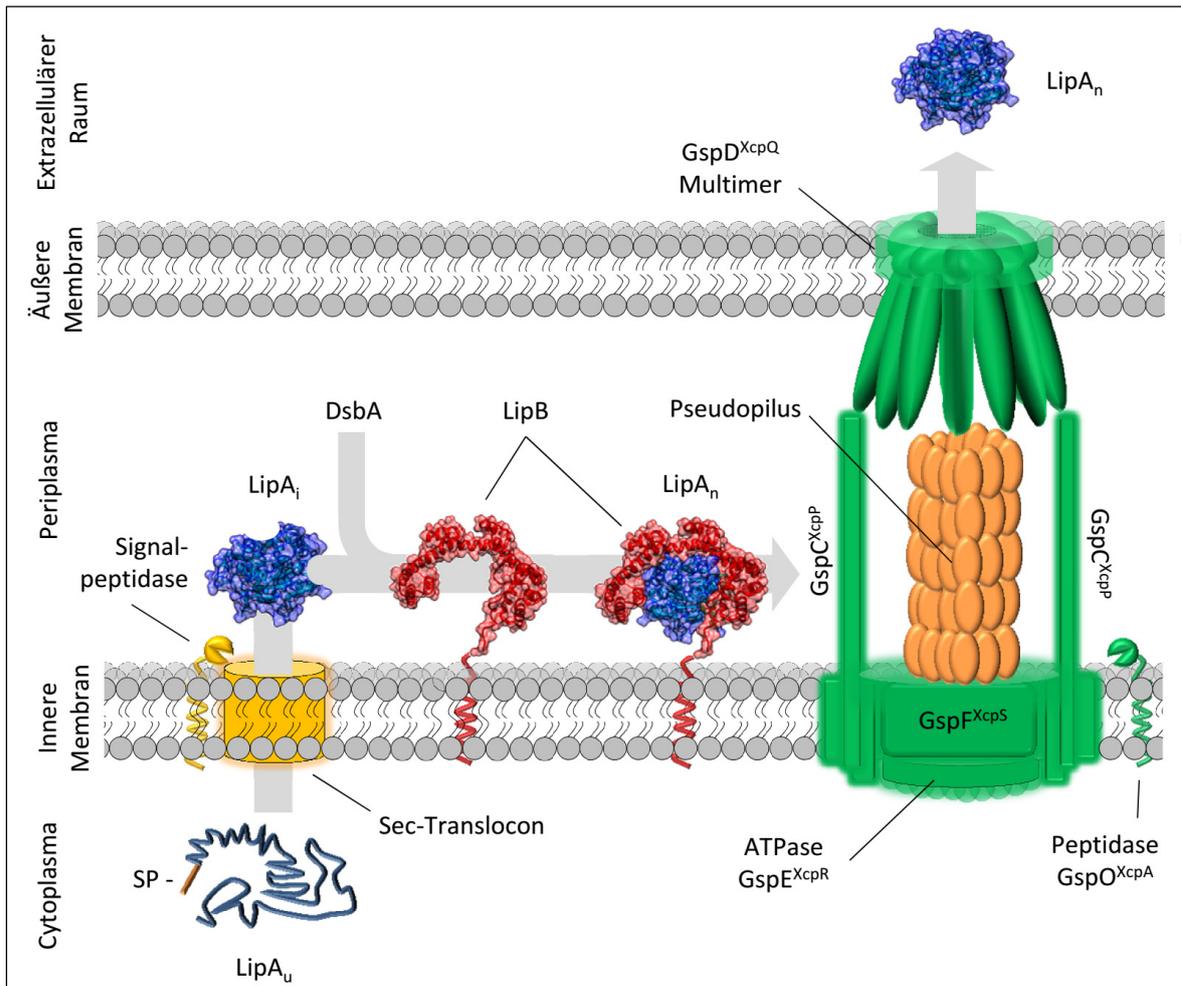


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des Sekretionswegs der Lipase LipA.

Die ungefaltete Lipase (LipA_u) mit dem N-terminalen Signalpeptid (SP) wird über das Sec-Translocon aus dem Cytoplasma in das Periplasma transportiert. Nach Abspalten des Signalpeptids durch die Signalpeptidase nimmt die Lipase eine nah-native, inaktive Konformation ein (LipA_i). Durch Interaktion mit DsbA und dem Lipase-spezifischen Chaperon LipB erlangt die Lipase ihre native Konformation (LipA_n) (Pauwels *et al.*, 2012). Anschließend wird sie über das Gsp-System in den extrazellulären Raum sekretiert. Nicht alle Gsp-Proteine sind beschriftet (siehe Fließtext). Abbildung modifiziert nach Filloux (2004).

1.7 Bakterielle Expressionssysteme in der Biotechnologie

Heutzutage finden eine Vielzahl von biotechnologisch erzeugten Chemikalien, Metaboliten, Proteinen und Enzymen in der Industrie und Medizin Verwendung (Jaeger & Eggert, 2002, Chang *et al.*, 2011, Woodley, 2013).

Generell lässt sich die Entwicklung der Biotechnologie im Hinblick auf die Etablierung von enzymatisch erzeugten Produkten in drei, sich zeitlich überlagernde Schritte gliedern (Schmid *et al.*, 2001, Schoemaker *et al.*, 2003, Bornscheuer *et al.*, 2012): Der erste Schritt, der vor über 100 Jahren begann, beschreibt den Einsatz von Biokatalysatoren (Enzyme) zur Produktion industriell genutzter Verbindungen. Beispiele hierfür sind die optimierte Verwendung von

Proteasen in der Waschmittelindustrie und die Herstellung von Antibiotika (Estell *et al.*, 1985, Bruggink *et al.*, 1998). Der zweite Schritt begann vor etwa 30 Jahren mit der Veränderung und Optimierung der verwendeten Enzyme im Hinblick auf ihre Stabilität, Selektivität und Substratspezifität (Bornscheuer *et al.*, 2012). Diese meist strukturbasierten Optimierungen wurden im dritten Schritt, der auch aktuelle Forschungen umfasst, durch die „Gerichtete Evolution“ ergänzt, die eine anwendungsoptimierte Suche nach Enzymen mit neuen, nicht-natürlichen Eigenschaften ermöglicht (Ruff *et al.*, 2013). Mit dieser Methode wurde erst kürzlich eine weitere Lipase aus einer Reihe dieser Enzyme für die Herstellung von Biodiesel optimiert (Jaeger & Eggert, 2002, Korman *et al.*, 2013, Stergiou *et al.*, 2013).

Für die Herstellung von Enzymen im Allgemeinen und Lipasen im Speziellen bieten sich besonders bakterielle Produzenten an, da sie im Gegensatz zu tierischen Zellen günstig und in großen Mengen zu kultivieren sind (Jaeger *et al.*, 1999, Saxena *et al.*, 2003). Zwar produzieren auch pflanzliche Zellen eine Vielzahl von Lipasen, allerdings sind diese meist membrangebunden, während bakterielle Lipasen oft in den extrazellulären Raum sekretiert werden; dies macht die folgende Reinigungsschritte einfach und damit kosteneffizienter (Nagarajan, 2012). Ein weiterer Vorteil von Bakterien in der Industrie ist die Vielzahl verfügbarer Expressionssysteme, die auch die Produktion heterologer bzw. genetisch veränderter Proteine und Enzyme in diesen Organismen erlauben (Terpe, 2006).

Der wohl verbreitetste Organismus in der Biotechnologie ist *Escherichia coli*, der oft für die Produktion von heterologen Proteinen genutzt wird. Für dieses Bakterium stehen eine Reihe von induzierbaren Mechanismen zur Verfügung, die eine durch IPTG-Zugabe kontrollierte Expression der Zielgene ermöglichen. Dazu zählen etwa der aus *E. coli* stammende *lac*-Promotor, der synthetisch erzeugte *tac*-Promotor oder das T7-RNA-Polymerase-System (Gronenborn, 1976, de Boer *et al.*, 1983, Studier & Moffatt, 1986). Zusätzlich existieren Systeme, in denen die Proteinbiosynthese des Zielproteins etwa durch Zugabe von anderen Induktoren wie Arabinose oder durch Änderung der Temperatur stimuliert werden kann (Elvin *et al.*, 1990, Guzman *et al.*, 1995). Allerdings zeichnet sich besonders die aus dem T7-Phagen stammende T7-RNA-Polymerase (T7RP) durch eine hohe Proteinausbeute aus (Terpe, 2006) und soll im Folgenden näher beschrieben werden.

In gängigen Expressionssystemen wie *E. coli* BL21(DE3) liegt das Gen des T7-Phagen, welches die T7RP kodiert, auf dem Genom unter Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors und das Zielgen auf einem Plasmid unter der Kontrolle eines T7-spezifischen Promotors vor (Studier &

Moffatt, 1986). Durch Zugabe des Laktose-Analogons IPTG wird die Bildung der T7RP stimuliert: Die Interaktion von IPTG mit dem Repressor des *lac*-Promotors (LacI) führt zu dessen Konformationsänderung, sodass der Repressor nicht mehr an den Promotor binden kann. Nun können bakterielle RNA-Polymerasen das T7RP-Gen transkribieren und die T7RP wird synthetisiert (Silverstone *et al.*, 1970, Davanloo *et al.*, 1984). Anschließend transkribiert die T7RP das plasmidkodierte Zielgen ausgehend vom T7-Promotor, der spezifisch für die T7RP ist und nicht von bakteriellen Polymerasen erkannt wird (Chamberlin *et al.*, 1970). Außerdem werden bakterielle Transkriptionsterminatoren von der T7RP weitestgehend nicht erkannt (McAllister *et al.*, 1981), was auch die Expression langer Gencluster ermöglicht (Arvani *et al.*, 2012).

Allerdings weist die heterologe Produktion in *E. coli* auch einige Nachteile auf. So sekretiert *E. coli* natürlicherweise nur sehr wenige Proteine in den extrazellulären Raum, bildet intrazelluläre *inclusion bodies* aus und verfügt nicht über alle Mechanismen, um heterologe Proteine korrekt zu prozessieren (Makrides, 1996, Baneyx & Mujacic, 2004, Waegeman & Soetaert, 2011). Die Expression des *lipAB*-Operons aus *B. glumae* PG1 in *E. coli* etwa führt hauptsächlich zu intrazellulär akkumulierender, inaktiver Lipase (Frenken *et al.*, 1993b).

Daher werden durch die Biotechnologie immer wieder neue Expressionssysteme erzeugt, die für die Produktion besonderer Proteine besondere Eigenschaften aufweisen. Exemplarisch seien hier die beiden sekretionsstarken Organismen *Bacillus subtilis* und *P. aeruginosa* (Jaeger *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 2010) oder der Organismus *Rhodobacter capsulatus* genannt, der aufgrund einer besonders großflächigen Membranstruktur für die Produktion von Membranproteinen geeignet ist (Katzke *et al.*, 2010). Auch für den Hefepilz *Pichia pastoris* wurde kürzlich ein funktionsfähiger Expressionsstamm auf Basis der T7RP publiziert (Hobl *et al.*, 2013).

Trotz aller innovativer Ansätze in der heterologen Proteinproduktion bieten homologe Expressionsstämme auch heute noch lohnende Alternativen für die Produktion industriell relevanter Komponenten, wie bereits für *B. glumae* und die Lipase LipA (Abschnitt 1.2.3) bzw. die Rhamnolipide (Abschnitt 1.5) beschrieben wurde.

1.8 Zielsetzung

Lipasen zählen zu den wichtigsten Enzymen der industriellen Biotechnologie. Sie zeichnen sich unter anderem durch ihre Stabilität in organischen Lösungsmitteln und eine hohe Enantioselektivität aus. Gegenstand dieser Arbeit ist die Lipase LipA aus *Burkholderia glumae* PG1. Dessen Potenzial als industrieller Lipaseproduktionsstamm wurde bereits durch das Lipase-überproduzierende Derivat *B. glumae* Lu8093 gezeigt (Boekema *et al.*, 2007).

Die Lipase LipA wird durch den Typ II-Sekretionsapparat in den extrazellulären Raum transportiert. Sie erlangt erst durch das im Periplasma lokalisierte Chaperon LipB (Lipase-spezifische Foldase) ihre aktive Konformation. Die Gene *lipA* und *lipB* sind in einem Operon organisiert und werden gemeinsam transkribiert.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit besteht in der detaillierten Analyse der Lipaseproduktion und -sekretion in *B. glumae* PG1. In diesem Zusammenhang sollen mögliche Strategien zur Optimierung der Lipaseproduktion aufgezeigt werden.

Zu diesem Zweck soll ein systembiologischer Ansatz die zellulären Abläufe in *B. glumae* PG1 während der Lipaseproduktion erfassen. In Kooperation mit Arbeitsgruppen in Greifswald und Göttingen sollen Analysen der extrazellulären Metabolite, des Sekretoms sowie des Transkriptomts durchgeführt werden. Außerdem soll auf Grundlage vorangegangener Arbeiten (Beselin, 2005) näher untersucht werden, ob *B. glumae* PG1 zur Produktion heterologer Proteine eingesetzt werden kann.

Die Regulation der Lipaseproduktion in *B. glumae* PG1 ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Daher sollen DNA-Protein-Interaktionsstudien bislang unbekannte Transkriptionsregulatoren des *lipAB*-Operons identifizieren. Zudem soll eine Insertionsmutanten-Bibliothek erstellt und durchmustert werden, um *B. glumae* PG1-Mutanten mit erhöhter Lipaseproduktion zu identifizieren. Für den industriellen Einsatz der Lipase als Biokatalysator ist die Sekretion in den extrazellulären Raum von entscheidendem Vorteil, da sie so einfach aus dem zellfreien Kulturüberstand isoliert werden kann. Mögliche Rückkopplungseffekte des Sekretionsapparates auf die Lipaseproduktion sollen in detaillierten Studien aufgeklärt werden.

Seit der Identifizierung des *lipAB*-Operons in *B. glumae* PG1 vor über 20 Jahren (Frenken *et al.*, 1993a) blieben zwei zentrale Fragen unbeantwortet, die in dieser Arbeit behandelt werden sollen: (i) Kann die im Periplasma verbleibende Foldase mehrere Lipase-Moleküle nacheinander aktivieren und (ii) existiert ein molekularer Mechanismus, der die Menge beider Proteine unabhängig voneinander reguliert und so eine Akkumulation der Foldase im Periplasma verhindert?

2. Material und Methoden

2.1 Stämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme (Tabelle 2.1) und Plasmide (Tabelle 2.2) verwendet.

Tabelle 2.1 Verwendete Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle / Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983), Grant <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>thi pro hsdR</i> ^{M+} [RP4-2-Tc ^r ::Mu:Km ^r ::Tn7, Tra ⁺ Tri ^r Str ^r]	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dem</i> (λ <i>ts857 indl</i> <i>Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1</i>)	Studier & Moffatt (1986)
<i>Burkholderia</i> <i>glumae</i> PG1	Wildtyp	Universität Utrecht
<i>B. glumae</i> Lu8093	Derivat von <i>B. glumae</i> PG1, Lipaseproduktionsstamm	BASF SE, Ludwigshafen
<i>B. glumae</i> PG1 Δ <i>lipAB</i>	<i>B. glumae</i> PG1, <i>lipAB</i> ::Gm ^R	Knorr (2010)
<i>B. glumae</i> PG1 Δ <i>gspD</i>	<i>B. glumae</i> PG1, <i>gspD</i> ::Km ^R	Isenhardt, unveröffentlicht
<i>B. glumae</i> PG1 Δ <i>gspDEF</i>	<i>B. glumae</i> PG1, <i>gspDEF</i> ::Km ^R	Isenhardt, unveröffentlicht
<i>B. glumae</i> PGT7 <i>PlacI</i>	<i>lipAB</i> ::pSU <i>PlacI</i> ^R mit P _{<i>lacUV5</i>} T7-RNA- Polymerase-Gen (<i>gene1</i>), Tc ^R	Beselin (2005)
<i>B. glumae</i> PGT7 <i>Plip</i>	<i>lipAB</i> ::pSUPT7polup/dn mit P _{<i>lip</i>} T7- RNA- Polymerase-Gen (<i>gene1</i>), Tc ^R	Isenhardt, unveröffentlicht
<i>B. glumae</i> PG1 Δ BGL_2c04170	<i>B. glumae</i> PG1, BGL_2c04170::<KAN-2> Transposon, Km ^R	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle / Referenz
<i>B. glumae</i> PG1ΔBGL_2c07240	<i>B. glumae</i> PG1, BGL_2c07240::<KAN-2> Transposon, Km ^R	Diese Arbeit
<i>B. glumae</i> PG1ΔBGL_1c34940	<i>B. glumae</i> PG1, BGL_1c34940::<KAN-2> Transposon, Km ^R	Diese Arbeit

Tabelle 2.2 Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBBR1-MCS	<i>rep, mob, lacZα, P_{lac}, P_{T7}, Cm^R</i>	Kovach <i>et al.</i> (1994)
pBR22b	Cm ^R , <i>mob, lacI^q, P_{T7}</i>	Rosenau & Jaeger (2003)
pBlip	pBBR1-MCS 4089 bp-Fragment (<i>Agel/Asel blunt end</i>) mit 385 bp synth. Fragment (<i>P_{lip}</i> aus <i>B. glumae</i> PG1, MCS modif. aus pBBR1-MCS, <i>His₆-tag, ΩGm^R-Terminator</i> aus pBSL142)	Diese Arbeit
Rekombinante Plasmide		
pBR- <i>gfpmut3</i>	pBR22b <i>XbaI/SacI</i> -Fragment mit 766 bp <i>gfpmut3</i> aus pEBP18, <i>P_{T7}</i>	Hahn (2012)
pBlip- <i>gfpmut3</i>	pBlip <i>XbaI/SacI</i> -Fragment mit 766 bp <i>gfpmut3</i> aus pEBP18, <i>P_{lip}</i>	Hahn (2012)
pBBR1- <i>lysR</i>	pBBR1-MCS <i>XbaI/HindIII</i> -Fragment mit 1109 bp BGL_1c34440 aus <i>B. glumae</i> PG1, <i>P_{lac}</i>	Bollinger (2012)
pBBR1- <i>P_{WT}lipAB</i>	pBBR1-MCS <i>XbaI/HindIII</i> -Fragment mit 2447 bp <i>lipAB</i> (Pr.: <i>lipAB</i> up/dn) aus <i>B. glumae</i> PG1, <i>P_{lip}</i> aus <i>B. glumae</i> PG1	Diese Arbeit
pBBR1- <i>P_{Lu}lipAB</i>	wie pBBR1- <i>P_{WT}lipAB</i> , mit T statt C 129 bp stromaufwärts von <i>lipA</i> -ATG (mittels <i>overlap extension</i> PCR eingefügt mit OLE 1 up/dn, <i>lipAB</i> up/dn), <i>P_{lip}</i> aus <i>B. glumae</i> Lu8093	Diese Arbeit
pBBR1- <i>P_{WT}lipA_{LuB}</i>	wie pBBR1- <i>P_{WT}lipAB</i> , mit T statt C an Position 11 von <i>lipA</i> (mittels <i>overlap extension</i> PCR eingefügt mit OLE 2 up/dn, <i>lipAB</i> up/dn), <i>P_{lip}</i> aus <i>B. glumae</i> PG1	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBBR1- P _{Lu} lipA _{Lu} B	pBBR1-MCS <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment mit 2447 bp <i>lipAB</i> (Pr.: <i>lipAB</i> up/dn) aus <i>B. glumae</i> Lu8093, P _{lip} aus <i>B. glumae</i> Lu8093	Diese Arbeit
pBR-P _{WT} gfpmut3	pBR- <i>gfp</i> mut3 <i>Bgl</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment mit 244 bp <i>lipAB</i> -Promotor P _{lip} aus <i>B. glumae</i> PG1, <i>gfp</i> mut3 ersetzt <i>lipA</i> .	Bollinger (2012)
pBR- P _{WT} lipA- gfpmut3	pBR- <i>gfp</i> mut3 <i>Bgl</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment mit 1320 bp <i>lipAB</i> -Promotor P _{lip} und <i>lipA</i> aus <i>B. glumae</i> PG1, <i>gfp</i> mut3 ersetzt <i>lipB</i> .	Bollinger (2012)
pBR-P _{Lu} gfpmut3	pBR- <i>gfp</i> mut3 <i>Bgl</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment mit 244 bp <i>lipAB</i> -Promotor P _{lip} aus <i>B. glumae</i> Lu8093, <i>gfp</i> mut3 ersetzt <i>lipA</i> .	Bollinger (2012)
pBR-P _{Lu} lipA- gfpmut3	pBR- <i>gfp</i> mut3 <i>Bgl</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment mit 1320 bp <i>lipAB</i> -Promotor P _{lip} aus <i>B. glumae</i> Lu8093, <i>lipA</i> aus <i>B. glumae</i> PG1, <i>gfp</i> mut3 ersetzt <i>lipB</i> .	Bollinger (2012)
pBBR1- gspD	pBBR1-MCS <i>Kpn</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment mit 2349 bp <i>gspD</i>	Knorr (2010)
pBBR1- P _{WT} lipAB _{CHis}	wie pBBR1-P _{WT} lipAB mit C-terminalem His ₆ -tag an <i>lipB</i> (Pr.: <i>lipAB</i> up/ <i>lipB</i> -dn-cHis)	Diese Arbeit
pBBR1- P _{Lu} lipAB _{CHis}	wie pBBR1-P _{Lu} lipAB mit C-terminalem His ₆ -tag an <i>lipB</i> (Pr.: <i>lipAB</i> up/ <i>lipB</i> -dn-cHis)	Diese Arbeit
pBBR1- P _{WT} lipAB _{cLum}	wie pBBR1-P _{WT} lipAB mit C-terminalem Tetracystein-tag an <i>lipB</i> (Pr. <i>lipAB</i> up/ <i>lipB</i> -dn-cLum)	Diese Arbeit
pBBR1- P _{WT} lipAB _{nLum}	wie pBBR1-P _{WT} lipAB mit N-terminalem Tetracystein-tag an <i>lipB</i> (mittels <i>overlap extension PCR</i> mit <i>lipAB</i> up/dn, <i>lipB</i> -Lumio-up/dn)	Diese Arbeit

2.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 2.3 Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz [5' - 3']	Eigenschaft
Klonierung		
Amp1 up	<u>B</u> -GGATCCTGCCTTGAG	509 bp-Fragment stromaufwärts des <i>lipAB</i> -Operons inklusive Promotor. B: Biotin
Amp1 dn	CACCCTGGAACGCATC	
AmpK up	<u>B</u> -GGTGC GCGAGTTCTTCGACT	469 bp-Fragment intern von <i>lipB</i> . B: Biotin.
AmpK dn	GATCTTCGTCACCGCGTCCT	
<i>lipAB</i> up	ATATATAT <u>CTAGA</u> AATTCACCGGATCGATCG	<i>Xba</i> I, stromaufwärts <i>lipAB</i> aus <i>B. glumae</i> PG1/Lu8093
<i>lipAB</i> dn	ATATATA <u>AAGCTT</u> ACCCGTTCAAGCACT	<i>Hind</i> III, stromabwärts <i>lipAB</i> aus <i>B. glumae</i> PG1/Lu8093
OLE 1 up	CGGCCGTCTGATTGTAGACAGG	Primer für <i>overlap extension</i> PCR für Promotormutation ausgehend von pBBR1-P _{WT} <i>lipAB</i>
OLE 1 dn	CCTGTCTACAATCAGACGGCCG	
OLE 2 up	CATGGTCAGATTGATGCGTTCC	Primer für <i>overlap extension</i> PCR für Promotormutation ausgehend von pBBR1-P _{WT} <i>lipAB</i>
OLE 2 dn	GGAACGCATCAATCTGACCATG	
<i>lipB</i> -dn-cHis	ATATA <u>AAGCTT</u> CTAATGATGATGATGATGATGATGACCGCCGCGCCGCG	<i>Hind</i> III, fügt C-terminalen His ₆ -tag an <i>lipB</i> an
<i>lipB</i> -dn-cLum	ATATA <u>AAGCTT</u> CTAGCAGCAGCCCGGGCAGCAACCGCCGCGCCGCG	<i>Hind</i> III, fügt C-terminalen Tetracystein-tag an <i>lipB</i> an
<i>lipB</i> -Lumio-dn	GCAGCAGCCCGGGCAGCACATCACACGCCCTGCAG	Primer für <i>overlap extension</i> PCR für Tetracystein-tag N-terminal an <i>lipB</i> ausgehend von pBBR1-P _{WT} <i>lipAB</i>
<i>lipB</i> -Lumio-up	TGTGCTGCCCGGGCTGCTGCGCGCAGGCCGATCGTC	
Nachweis-Primer		
KAN-2 FP	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	Flankieren das EZ-Tn5 TM <KAN-2> Transposon. 3'-Termini weisen vom Transposon weg.
KAN-2 RP	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	

Name	Sequenz [5' - 3']	Eigenschaft
RT- <i>lipA</i> -3'-up	AGAACGACGGGCTCGTCTCG	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipA</i> (3'-Ende), Leserichtung stromabwärts
RT- <i>lipA</i> -3'-dn	ATCACCGCGACCGGATCT	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipA</i> (3'-Ende), Leserichtung stromaufwärts
RT- <i>lipB</i> -5'-dn	CCGAAGCCACAGCACGAC	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipB</i> (5'-Ende), Leserichtung stromaufwärts
RT- <i>lipA</i> -i-up	TTCGCGAACGTGGTGGACTA	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipA</i> (intern), Leserichtung stromabwärts
RT- <i>lipA</i> -i-dn	GGTTGTAGGTGGCGGTCTGC	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipA</i> (intern), Leserichtung stromaufwärts
RT- <i>lipB</i> -i-up	GGTGCGCGAGTTCTTCGACT	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipB</i> (intern), Leserichtung stromabwärts
RT- <i>lipB</i> -i-dn	GATCTTCGTCACCGCGTCCT	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipB</i> (intern), Leserichtung stromaufwärts
<i>real-time</i> qPCR-Primer		
<i>lipA</i> up	CTATCCGGTGATCCTCGTC	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipA</i>
<i>lipA</i> dn	GAGAGATTCGCGACGTACAC	
<i>lipB</i> up	GTGGCAGACGCGCTATCAAG	<i>B. glumae</i> PG1 <i>lipB</i>
<i>lipB</i> dn	CGTGAAAGTCTGCTGCCTGAG	
<i>rpoD</i> up	GATGACGACGCAACCCAGAG	<i>B. glumae</i> PG1 <i>rpoD</i>
<i>rpoD</i> dn	GAACGCTTCCTTCAGCAGCA	
<i>lysR</i> up	TTGAAGTCGGCAGCTTCGTC	<i>B. glumae</i> PG1 BGL_1c34440
<i>lysR</i> dn	CTCGTCGAGTTCGGTCAACG	
<i>gspD</i> up	GAGGAGGCGAAGATCGTGGT	<i>B. glumae</i> PG1 <i>gspD</i>
<i>gspD</i> dn	TCCTGGCGGTCTCGAAGGTATT	
<i>gspE</i> up	GTGCAGTTCGACAAGCTGAT	<i>B. glumae</i> PG1 <i>gspE</i>
<i>gspE</i> dn	CGTCATGATGTTGGTGGTC	
<i>gspF</i> up	CRACTTCCCCGAGATCTAT	<i>B. glumae</i> PG1 <i>gspF</i>
<i>gspF</i> dn	AGCACGATCTTCTGCTTCAG	

2.3 Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und sonstigen Reagenzien wurden, falls nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen.

Antibiotika von Sigma (Deisenhofen) oder AppliChem (Darmstadt). Chemikalien für den üblichen Laborgebrauch von Fluka (Sternheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg). DNA-modifizierende Enzyme wurden von Thermo Scientific (ehemals Fermentas, Sankt Leon-Rot) bezogen. Weitere Enzyme wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die DNA- sowie Protein-Größenstandards wurden von Thermo Scientific (ehemals Fermentas, Sankt Leon-Rot) verwendet.

2.4 Arbeiten mit Bakterien

2.4.1 Nähr- und Testmedien

Sterilisation von Nährmedien

Die Sterilisation von Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren für 20 min bei 200 kPa und 121 °C. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika oder IPTG wurden sterilfiltriert (Roth-Membranfilter, Porendurchmesser 0,22 µm), bevor sie dem autoklavierten Medium (<60 °C) zugesetzt wurden.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Inhaltsstoffe wurden entweder als fertiges Pulver von Roth (Karlsruhe) bezogen oder wie folgt angesetzt: 10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

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

Zu 670 ml *A. dest.* wurden sukzessive zugegeben: 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 g Zitronensäuremonohydrat, 500 g K_2HPO_4 , 175 g $\text{NaNH}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Daraus resultieren ca. 1000 ml MME, pH 7,0. Als zusätzliche Kohlenstoffquelle diente entweder 0,5 % (w/v) Glukose, 0,35 % (w/v) Succinat oder 1 % (v/v) Olivenöl.

Festmedien

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

Tributylin-Agar, Lipase-Indikatorplatten (Kok et al., 1993)

7,5 ml Tributyrin und 0,75 g Gummi arabicum wurden auf 15 ml mit *A. dest.* aufgefüllt. Das Gemisch wurde mittels Ultraschall (3 min, 75 W, 100 %) emulgiert und zu 500 ml autoklaviertem LB-Agar gegeben. Lipolytische Aktivität ist durch klare Höfe um die Bakterienkolonien erkennbar.

2.4.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte auf LB-Agar-Platten oder in Flüssigmedium bei 37 °C. *B. glumae*-Stämme wurden auf LB- oder MME-Glukose-Agar oder in entsprechenden Flüssigmedien (2.4.1) bei 30 °C kultiviert. Zur Selektion bzw. Stabilisierung von Plasmiden wurde, falls nicht anders beschrieben, ein adäquates Antibiotikum (Tabelle 2.4) zugefügt.

Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Rotator angezogen, während größere Kulturvolumina in Erlenmeyerkolben (max. 1/5 bis 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Inkubationsschüttler bei 150 UpM inkubiert wurden.

Tabelle 2.4 Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	<i>E. coli</i> [µg/ml]	<i>B. glumae</i> [µg/ml]	Dauer phänische Expression [h]
Ampicillin	100	--	0,5
Chloramphenicol	50	200	3
Kanamycin	50	50	2
Tetracyclin	10	40	3
Gentamycin	10	10	3

Vorkulturen

Für Übernachtskulturen (ÜK) wurden 5 oder 10 ml Medium entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte oder mit 1/500 Volumen aus einer Gefrierkultur inokuliert und für mindestens 16 h inkubiert.

Hauptkulturen (Standardbedingung für Analysen)

Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine Zelldichte inokuliert, die einer O.D._{580nm} von 0,05–0,1 entsprach. Die Bestimmung der Zelldichte von Kulturen erfolgte nach geeigneter

Verdünnung in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 580 \text{ nm}$ gegen das entsprechende Medium als Referenz.

Induzierte Genexpression

Zur Überexpression von Genen, die unter der Kontrolle eines *lac*- oder *tac*-Promotors stehen, wurde dem Kulturmedium nach Erreichen einer definierten Zelldichte ($\text{O.D.}_{580\text{nm}}$ von 0,6) 0,4 mM IPTG zugegeben, soweit nicht anders angegeben.

Die Induktion der Expression von Genen unter der Kontrolle des *lip*-Promotors (Promotor des *lipAB*-Operons in *B. glumae* PG1) erfolgte durch Zugabe von 1 % (v/v) Olivenöl.

Lagerung von Bakterien

Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4 °C im Kühlschrank max. 2 Wochen gelagert. Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurden 1,8 ml stationärer ÜK und 135 μl DMSO vermischt und in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren.

2.4.3 Kultivierung und Probenentnahme von *B. glumae* PG1 im Kleinfementer

Die Kultivierung von *B. glumae* PG1 und entsprechenden Derivaten im Fermentationsmaßstab erfolgte in der Kleinfementer-Anlage Multifors der Firma Infors AG (Basel). Diese Installation ermöglicht eine strikte Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen in insgesamt vier Kultivierungsgefäßen mit einem Volumen von je maximal 1400 ml. Für die hier durchgeführten Versuche wurde das Kulturvolumen aufgrund erhöhter Schaumbildung auf 700 ml beschränkt. Auf die Zugabe von Anti-Schaum-Agenzien wurde verzichtet. Folgende Parameter wurden vom Gerät gemessen und reguliert: Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 2 M H_3PO_4 bzw. NaOH konstant bei 7,0 gehalten, die Temperatur bei 30 °C. Für eine stetige Durchmischung des Mediums wurde steril-gefilterte Luft mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 Liter/Minute zugeführt. Das Rührwerk, bestehend aus zwei übereinander angeordneten Mischeinheiten, wurde mit konstanten 300 UpM betrieben.

Das Minimalmedium E (MME, 2.4.1) wurde ohne die zusätzliche Kohlenstoffquelle direkt im Fermentationsgefäß für 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert. Etwaiger Volumenverlust wurde anschließend durch *A. dest.* ausgeglichen. Ebenfalls nach dem Autoklavieren wurden die zusätzlichen Kohlenstoffquellen hinzugefügt. Nach Anschluss des Fermentationsgefäßes an die Multifors-Anlage unter sterilen Bedingungen erfolgte die Inokulation mit *B. glumae* aus

einer 20 ml Schüttelkolben-Vorkultur auf eine $O.D._{580nm} = 0,05$ (2.4.2). Die Vorkultur entsprach in der Zusammensetzung ihres Mediums exakt der für die Fermentation vorgesehenen Komposition. Die Probenentnahme zur Bestimmung der Zelldichte erfolgte über ein Ventilsystem, welches die sterile Entnahme aus dem Fermentationsgefäß erlaubt. Zu den drei Wachstumszeitpunkten der exponentiellen, transienten bzw. stationären Phase wurde ein komplettes Fermentationsgefäß entleert und wie folgt für die weiteren Analysen aufgearbeitet.

Die Proben, aus denen später in Kooperation mit Frau Dr. Schroeter (Universität Greifswald) RNA isoliert wurde, wurden mit $\frac{1}{2}$ Volumen 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM $MgCl_2$, 20 mM NaN_3 versetzt. Das Probenvolumen entsprach $16 / O.D._{580nm}$. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (2.4.4), der Überstand verworfen und das Sediment sofort bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Isolierung der RNA aus den Fermentationsproben ist in 2.5.16 beschrieben.

Die Proben für die anschließende Analyse des Sekretoms (2.6.13) in Kooperation mit Frau Dr. Wachlin (Universität Greifswald) wurden sedimentiert (zweimal 45 ml, 2.4.4) und der Überstand entnommen. Die Überstände wurden mit $1/10$ Volumen 100 % (w/v) Trichloressigsäure (in H_2O) versetzt und über Nacht bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat für 60 min bei 5000 UpM und $4\text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Für die Analyse der extrazellulären Metabolite wurden 2 ml der Kultur sedimentiert (2.4.4) und der so erhaltene zellfreie Kulturüberstand durch einen Spritzenvorsatzfilter ($0,45\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser; Sarstedt, Nümbrecht) filtriert. Die Lagerung erfolgt bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$, das weitere Vorgehen zur Analyse der Metabolite ist in 2.6.14 beschrieben.

2.4.4 Zellfraktionierung (Überstand und Ganzzellextrakt)

Die Sedimentierung von Zellen erfolgte mittels Zentrifugation. Bei Volumen bis 2 ml erfolgte diese für 1 min bei $21.000 \times g$. Größere Volumina bis 50 ml wurden für 20 min bei $5.000 \times g$ sedimentiert. In beiden Fällen wurde, soweit notwendig, bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der zellfreie Kulturüberstand wurde entnommen und, falls nötig, sterilfiltriert (Membranfilter, $0,22\text{ }\mu\text{m}$ Porendurchmesser). Das Zellsediment wurde je nach weiterer Verwendung in entsprechendem Puffer resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Bandelin-Sonifier W250, mind. zweimal 2 min, Leistungszyklus 50 %, max. 35 % Power). Sedimente, aufgeschlossene Ganzzellextrakte und kulturfreie Überstände wurden entweder

sofort weiter verarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zellsedimente für anschließende RNA-Isolierung (2.5.11) wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.5 Verwendung chemisch transformationskompetenter *E. coli*-Stämme

Zur Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli*-Stämme (Mülhardt, 2009) wurden 200 ml Hauptkultur aus einer ÜK auf eine Zelldichte entsprechend einer $\text{O.D.}_{580\text{nm}}$ von 0,05 inokuliert. Nach Inkubation ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 UpM) und Erreichen einer $\text{O.D.}_{580\text{nm}}$ von 0,6 wurden die Zellen sedimentiert (2.4.4), in 100 ml TFB I-Lösung (100 mM RbCl, 50 mM MnCl_2 , 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl_2 , 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut sedimentiert (2.4.4) und in 16 ml TFB II-Lösung (75 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. Aliquots zu je 200 μl wurden bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot mit 10 μl Ligationsansatz (2.5.7) oder 2 μl Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock (Hanahan, 1983) erfolgte anschließend in einem Heizblock für 3 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurden 700 μl LB-Medium (2.4.1) zugegeben und der Ansatz für die Zeit der phänischen Expression (Tabelle 2.4) auf einem Rotator bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Je nach erwarteter Kolonienzahl wurden entweder 100 μl oder der gesamte Transformationsansatz (nach Sedimentation und Resuspension in 100 μl LB-Medium) auf entsprechenden Selektiv-Agar-Platten ausplattiert und üN bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.4.6 Elektroporation von kompetenten *B. glumae*-Stämmen

Zur Herstellung kompetenter *B. glumae*-Stämme für die Elektroporation wurden diese aus einer 10 ml ÜK in 200 ml vorgewärmtes LB-Medium (2.4.1) auf eine $\text{O.D.}_{580\text{nm}}$ von 0,1 inokuliert und für ca. 3 h bis zum Erreichen einer $\text{O.D.}_{580\text{nm}}$ von 0,2 kultiviert (2.4.2). Die Zellen wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert (2.4.4), in $\frac{1}{2}$ Volumen 300 mM Saccharose (in *A. dest.*, kalt) resuspendiert und erneut sedimentiert. Dieser Waschschrift wurde zwei weitere Male mit jeweils halbiertem Volumen des Waschpuffers wiederholt. Anschließend wurde das Zellsediment so in 300 mM Saccharose + 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, dass die Zelldichte einer $\text{O.D.}_{580\text{nm}}$ von 50 entsprach und zu je 50 μl aliquotiert. Die Aliquots konnten zur späteren Verwendung mehrere Wochen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Zur Elektroporation wurden, wenn nicht anders beschrieben, 5 μl Plasmid-DNA mit einem Aliquot vermischt. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm,

Biobudget, Krefeld) überführt und im „MicroPulser“ (BioRad, München) mit dem Programm EC2 (600 Ω , 2,5 kV) elektroporiert. Im Anschluss wurde der Ansatz sofort mit 1 ml 2xLB-Medium (doppelte Konzentration der in 2.4.1 beschriebenen Komponenten) versetzt. Nach Inkubation bei 30 °C auf einem Rotator entsprechend der jeweiligen phänischen Expressionszeit (Tabelle 2.4) wurden die Zellen auf Selektiv-LB-Agar-Medium ausplattiert und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.4.7 Plasmid-DNA-Transfer mittels biparentaler Konjugation

Zum Transfer von Plasmid-DNA in *B. glumae*-Stämme (Akzeptor) wurde der Stamm *E. coli* S17-1 als Donor verwendet, welcher eine Konjugationsbrücke ausbilden kann. Für eine optimale Transfektionseffizienz muss sich der Akzeptorstamm in der stationären und der Donorstamm in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

Hierzu wurde der Donorstamm, der das zu vermittelnde Plasmid bereits trägt (2.4.5), aus einer ÜK in 10 ml LB-Medium (2.4.2) inokuliert und bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert (O.D._{580nm} von 0,6–0,8). Anschließend wurden 2 ml dieser Kultur sedimentiert und der zellfreie Kulturüberstand verworfen (2.4.4). Nach Zugabe von 1 ml einer stationären *B. glumae*-Kultur wurde erneut zentrifugiert und das Zellsediment ein- bis zweimal mit 1 ml LB-Medium durch vorsichtiges Aufziehen mit der Pipette gewaschen. Das durch erneutes Zentrifugieren gewonnene Sediment wurde dann in 50 μ l LB-Medium resuspendiert und vorsichtig auf einen Membranfilter (Whatman, Dassel) getropft, welcher auf LB-Agar-Medium lag. Der Ansatz wurde (ruhig liegend, damit der Tropfen nicht auf dem Filter verläuft) für 5–6 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Filter in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, in welches 1 ml LB-Medium vorgelegt wurde. Durch kräftiges Schütteln (Vortexmischer) wurden die Zellen von dem Filter in das Medium übertragen. Hiervon wurden dann 100 μ l aus verschiedenen Verdünnungen bzw. Konzentrationen auf MME-Glukose-Agar-Platten (2.4.1) mit entsprechendem Antibiotikum (Tabelle 2.4) ausplattiert und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Eine zusätzliche Gegenselektion für *E. coli* S17-1 durch Zugabe weiterer Antibiotika war nicht nötig.

2.4.8 Erzeugung einer Tn5-Insertionsbibliothek

Zur Erzeugung einer *B. glumae* PG1-Transposonbank wurde das „EZ-Tn5TM <KAN-2>Tnp TransposomeTM Kit“ (Epicentre, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) verwendet. Darin liegt das Tn5-Transposon in einem Komplex mit einer inaktiven Transposase vor. Nach

Herstellung elektrokompetenter *B. glumae* PG1-Zellen wurden sieben Aliquots mit jeweils 1 µl der Transposon-Lösung versetzt und elektroporiert (2.4.6). Die Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml 2xLB-Medium für 3 h schüttelnd bei 30 °C inkubiert und anschließend sedimentiert (2.4.4). Das Sediment wurde in 100 µl 2xLB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Die insgesamt sieben Platten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 1 ml LB-Medium abgewaschen und Gefrierkulturen angelegt (2.4.2). Die Transformationseffizienz betrug etwa 4500 cfu/µl Transposom.

2.4.9 Lokalisierung der Tn5-Integration im Genom von *B. glumae* PG1

Für die Lokalisierung der Tn5-Insertion im Genom von *B. glumae* PG1 wurde eine modifizierte Methode der „inversen PCR“ (Lewenza *et al.*, 2005) verwendet. Dazu wurde die genomische DNA einzelner Insertionsmutanten isoliert (2.5.4) und 500 ng dieser DNA über Nacht bei 37 °C mit 1 µl der Restriktionsendonuklease *EheI* und entsprechenden Puffern in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert (2.5.8). Das Transposon selbst weist keine *EheI*-Erkennungssequenz auf, im gesamten Genom von *B. glumae* PG1 sind es 15.545 Erkennungssequenzen. Das so fragmentierte Genom wurde nach Inaktivierung des Enzyms (20 min, 65 °C) durch Zugabe von 1 µl T4-Ligase (2.5.8) und 2,3 µl T4-Ligase-Puffer sowie Inkubation für 6 h bei 22 °C ligiert. Durch die vollständige Fragmentierung und anschließende Ligation der genomischen DNA entstehen kurze, zirkuläre DNA-Moleküle, von denen einige das Tn5-Transposon beinhalten. Mit einer Standard-PCR (2.5.1) und dem Primerpaar „KAN-2 FP/RP“ (Tabelle 2.3), welches das Transposon flankiert und dessen 3'-Termini aus dem Transposon weisen, wurden eben diese DNA-Moleküle amplifiziert. Nach Reinigung der so erhaltenen PCR-Produkte (2.5.7) wurden diese, ausgehend von den oben beschriebenen Primern, sequenziert (2.5.9). Diese DNA-Sequenz entspricht, je nach verwendetem Primer, dem Bereich stromaufwärts bzw. stromabwärts der Insertion des Tn5-Transposons in das Genom von *B. glumae* PG1.

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Methode modifiziert nach Saiki *et al.* (1988). Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden bestimmte DNA-Fragmente *in vitro* selektiv angereichert. Für diese Reaktion wurde der PCR-Automat „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Neben einer Standard-PCR wurde in dieser Arbeit auch ein optimiertes Protokoll für die Amplifizierung extrem GC-reicher DNA-Sequenzen verwendet, wie sie etwa in *B. glumae* PG1 vorkommen (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5 Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Komponente	Standard <i>Pfu</i> [μ l]	GC-reich 5Prime [μ l]
Mix 1 (15 μl)		
H ₂ O	37	7,5
DMSO	3	1,0
PCR-Puffer	5,0 (<i>Pfu</i> Buffer)	1,5 (<i>Tuning Buffer</i>)
Primer 1 (5 pmol/ μ l)	1,0	2,0
Primer 2 (5 pmol/ μ l)	1,0	2,0
DNA (100 ng/ μ l)	1,0	1,0
Mix 2 (10 μl)		
H ₂ O	---	8,2
PCR-Puffer	---	1,0 (<i>Tuning Buffer</i>)
dNTP (10 mM)	1,0	0,5
Polymerase	1,0	0,3
Gesamt	50	25

Während bei der Standard-PCR alle Komponenten (inklusive der *Pfu*-Polymerase, hergestellt am Institut für Molekulare Enzymtechnologie) direkt vereint wurden, wurden für die Amplifikation von GC-reicher DNA mit dem „PCR Extender System“ (5Prime, Hamburg) zwei Mixe getrennt angesetzt. Mix 1 wurde für 30 Sek bei 99 °C inkubiert und dann erst mit Mix 2 versetzt. Der Ablauf der PCR ist Tabelle 2.6 zu entnehmen. Die Hybridisierungstemperatur war dabei abhängig von den gewählten Oligonukleotiden (Tabelle 2.3) und wurde mittels Programmen wie dem „Clone Manager“ (2.7.1) oder experimentell mittels eines

Temperaturgradienten bestimmt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden PCR-Produkts. Dabei wurde für die *Pfu*-Polymerase mit 500 bp/min gerechnet. Für das „PCR Extender System“ wurde folgende Geschwindigkeiten angenommen: 100–400 bp in 20 sec, 500–1000 bp in 45 sec, 1–5 kb in 3 min und 5–10 kb in 8 min.

Tabelle 2.6 PCR-Programm.

Schritt	Standard <i>Pfu</i>	GC-reich 5Prime
Erste Denaturierung	5 min 98 °C	5 min 98 °C
Denaturierung	30 sec 98 °C	20 sec 98 °C
Hybridisierung	20 sec x °C	10 sec x °C
Elongation	x sec 72 °C	x sec 72 °C
Finale Elongation	10 min 72 °C	10 min 72 °C



2.5.2 Ortsspezifische Mutagenese von DNA

Für die Einbringung von Sequenzen am 5'- bzw. 3'-Terminus, die von der Matrizen-DNA abweichen, wurden entsprechend synthetisierte Primer mit der gewünschten Sequenz (Tabelle 2.3) in die PCR (2.5.1) eingesetzt.

Die Einführung von bestimmten Basenaustauschen innerhalb des zu amplifizierenden PCR-Produkts geschah mit der Methode der *overlap extension* PCR (Ho *et al.*, 1989). Dabei befindet sich der gewünschte Basenaustausch auf einem Primerpaar, welches ansonsten vollständig komplementär zu jeweils einem Strang der zu amplifizierenden Matrize ist. Jeweils einer der beiden Primer wird mit dem entsprechenden, das gewünschte PCR-Produkt flankierenden Primer in einer PCR-Reaktion eingesetzt. So entstehen in zwei getrennten Reaktionen die beiden Fragmente, die zusammen das gesamte Amplikon abdecken und im Bereich des internen Primerpaars komplementär sind. Diese beiden DNA-Fragmente werden dann in einer weiteren Reaktion zusammen mit beiden flankierenden Primern eingesetzt. Die homologen Bereiche der beiden zuvor amplifizierten Fragmente können nun hybridisieren und ermöglichen so die Amplifikation des vollständigen Fragments.

2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienstämmen erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) mittels des Kits „innuPREP PlasmidMini-Kit“ (Analytik Jena, Jena) nach Herstellerangaben. Zur langfristigen Lagerung der so gewonnenen DNA wurde der mitgelieferte Tris-EDTA-Puffer verwendet. Sollte die DNA jedoch direkt weiter verwendet werden (PCR, Restriktion usw.) erfolgte die Elution in *A. dest.* oder 10 mM Tris-Puffer pH 7,0 ohne EDTA.

2.5.4 Präparation von genomischer DNA

Die Gewinnung genomischer DNA aus Bakterienzellen erfolgte mittels des Kits „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Zur Elution der DNA wurde *A. dest.* verwendet.

2.5.5 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA erfolgte mit der Gerät „Qubit 2.0“ (Invitrogen, Darmstadt) nach Herstellerangaben.

2.5.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese nach Sambrook *et al.* (1989) wurde zur Analyse von DNA-Restriktionen (2.5.8), PCR-Produkten (2.5.1), Isolierung von DNA-Fragmenten (2.5.7) und Mengenabschätzung eingesetzt. Das verwendete Gel bestand aus 1 % (w/v) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer (35,6 mM Tris-Base, 35,6 mM Borsäure, 1,0 mM EDTA) und 10 µl einer 0,5 % (v/v) Ethidiumbromid-Lösung. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Volumen des „6x DNA Loading Dye“ (Thermo Scientific, Sankt Leon-Rot) versetzt. Als DNA-Molekulargewichtsstandard wurde der „GeneRuler™ 1kb DNA ladder“ bzw. „GeneRuler 100 bp DNA ladder“ (Thermo Scientific, Sankt Leon-Rot) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern in 0,5x TBE-Puffer bei 135 V, bis die gewünschte Trennung erreicht wurde. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente diente das eingesetzte Ethidiumbromid, welches in doppelsträngige DNA interkaliert und dann, bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 254\text{--}366$ nm, sichtbares Licht emittiert ($\lambda = 590$ nm). Die Dokumentation erfolgte mit einer „Eagle-Eye II“-Kamera (Stratagene, Heidelberg).

2.5.7 Reinigung von DNA

Nach der Auftrennung von hydrolysiertes DNA (2.5.8) oder durch PCR amplifizierter Fragmente (2.5.1) mittels Agarosegelelektrophorese (2.5.6) wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und dann nach Herstellerangaben mit dem Kit „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt. PCR-Produkte, die nach Analyse mittels Agarosegelelektrophorese (2.5.6) keine Nebenprodukte aufwiesen, wurden alternativ direkt aus dem PCR-Ansatz mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

2.5.8 Modifizierung von DNA mittels Enzymen

Die in dieser Arbeit verwendeten Typ II-Restriktionsendonukleasen (Thermo Scientific, Sankt Leon-Rot) wurden nach Herstellerangaben im entsprechendem Puffer eingesetzt. Für einen hydrolytischen Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen wurde das Programm „DoubleDigest“ (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>) zur Ermittlung des optimalen Puffers verwendet.

Die Dephosphorylierung und Ligation von DNA erfolgte mittels „Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase“ bzw. „T4 DNA Ligase“ (Thermo Scientific, Sankt Leon-Rot) nach Herstellerangaben.

2.5.9 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder der Firma SequiServe (Vaterstetten) durchgeführt.

2.5.10 Herstellung von RNase-freiem Wasser

Zur Herstellung von RNase-freiem Wasser wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet. DEPC modifiziert Histidinreste in Enzymen und hemmt somit deren Aktivität. Es wurden 1000 ml *A. dest.* mit 1 ml DEPC (Applichem, Darmstadt) versetzt und über Nacht rührend inkubiert. Durch anschließendes Autoklavieren (20 min bei 200 kPa und 121 °C) wurde DEPC vollständig inaktiviert. Nach Summers (1970).

2.5.11 Isolierung bakterieller RNA

Die Isolierung bakterieller RNA erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach folgendem Protokoll. Alle Lösungen wurden, sofern nicht vom Hersteller geliefert, in RNase-freiem *A. dest.* (2.5.10) angesetzt.

Eine Zellmenge entsprechend einer $O.D._{580nm} = 1$ wurde sedimentiert (1 min, 21.000 \times g) und der Überstand restlos verworfen. Das Sediment wurde in 100 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) und 2 μ l einer 40 mg/ml Lysozym-Lösung versetzt und resuspendiert (Vortexmischer). Nach 3–5 min Inkubation bei RT wurden 350 μ l RLT Puffer (im Kit enthalten) und 3,5 μ l β -Mercaptoethanol zugegeben und erneut durchmischt. War die Zellsuspension trüb, erfolgte ein Zentrifugationsschritt (2 min, 21.000 \times g), bei dem nicht lysierte Zellen sedimentiert wurden. Der Überstand wurde weiterverwendet. Nach Zugabe von 250 μ l Ethanol (*p.a.*) wurde die Lösung mehrfach mit der Pipette durchmischt, in das mitgelieferte Spin-Säulchen pipettiert und 15 sec bei 11.000 \times g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach Zugabe von 350 μ l RW1-Puffer (im Kit enthalten), erneuter Zentrifugation für 15 sec bei 11.000 \times g und Verwerfen des Durchflusses erfolgte ein (optionaler) DNase-Verdau auf dem Säulchen (2.5.12). Danach wurde das Säulchen zweimal mit je 500 μ l RPE-Puffer (im Kit enthalten) gewaschen. Dazu wurde nach Zugabe des Puffers jeweils 15 sec bei 11.000 \times g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Filter wurde 1 min bei 21.000 \times g trocken zentrifugiert. Nach Zugabe von 44 μ l RNase-freiem *A. dest.* (2.5.10) und 1 min Inkubation bei RT erfolgte der Elutionsschritt durch Zentrifugation für 1 min bei 11.000 \times g. Die RNA wurde direkt weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im „Qubit 2.0“ (Invitrogen, Darmstadt) mit dem Reagenz „RNA Broad Range“ nach Herstellerangaben. Alternativ wurde die Nukleotidkonzentration mittels „NanoDrop 2000c“ (Eppendorf, Hamburg) über die Absorption bei 260 nm bestimmt.

2.5.12 Degradation von DNA mittels DNasen

Mit der in 2.5.11 beschriebenen Methode zur Isolation von bakterieller RNA ist es zwar möglich, RNA relativ frei von DNA zu isolieren. Allerdings ist es für Methoden wie die der *real-time* qPCR (2.5.14) nötig, dass die eingesetzte cDNA vollständig frei von Rückständen genomischer DNA oder Plasmid-DNA ist. Dazu wurden zwei verschiedenen Methoden der DNA-Degradation eingesetzt. Die erste (*on column* Verdau) findet bereits im Säulchen während der RNA-Isolation statt, während die zweite Methode (Verdau im Eluat) nach der

Elution der RNA durchgeführt wird. Zur ausreichenden Degradation von DNA in RNA-Proben wurden beide Methoden nacheinander angewendet.

On column Verdau

Für den Verdau im Säulchen während der RNA-Isolation wurde das Kit „RNase-free DNase Set“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden 10 µl der DNase mit 70 µl des mitgelieferten RDD-Puffers versetzt und auf den Filter des Säulchens gegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde 350 µl RW1-Puffer zugegeben, wie in 2.5.11 beschrieben zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und mit dem Protokoll (2.5.11) fortgefahren.

Verdau im Eluat

Die Degradation verbliebener DNA-Fragmente im Eluat der RNA-Isolation erfolgte mittels „DNA-free™ Kit“ (Ambion®, Life Technologies, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Zu den in 2.5.11 gewonnenen RNA-Proben (44 µl) wurden 5 µl 10 x DNase I Puffer und 1 µl rDNase I gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 µl rDNase I und weiteren 30 min Inkubation bei 37 °C wurden 5 µl des DNase-Inaktivierungsreagenz zugegeben, kräftig durchmischt (Vortexmischer) und 2 min bei RT inkubiert. Das sedimentierbare Inaktivierungsreagenz bindet die rDNase I, sodass nach 2 min Zentrifugation bei 10.000 \times g reine RNA im Überstand vorliegt. Dieser wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für weitere Anwendung eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

2.5.13 Reverse Transkription

Die Umschrift von RNA (2.5.11) nach erfolgter Degradation der DNA-Kontaminationen (2.5.12) erfolgte mittels „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt). Dabei können bis zu 2 µg RNA in einem 20 µl Ansatz in cDNA transkribiert werden. Die RNA, 10x RT Puffer, 25x dNTP-Mix (100 mM), reverse Transkriptase und 10x RT *random* Primer wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Der Einsatz von randomisierten Primern ermöglichte die Transkription der gesamten RNA. Als Kontrolle diente ein identischer Ansatz ohne reverse Transkriptase. Da hier keine cDNA gebildet werden kann, dürfen in anschließenden PCRs keine Produkte entstehen. Sollte dies doch der Fall sein, deutet das auf eine Kontamination der RNA-Probe mit genomischer DNA oder Plasmid-DNA hin. Die reverse Transkription erfolgte in einem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Protokoll: 10 min 25 °C, 120 min 37 °C, 5 min 85 °C, 4 °C bis Ende.

2.5.14 Quantifizierende *real-time* qPCR

Nach Schmittgen & Livak (2008). Die Methode der *real-time* qPCR stellt eine Möglichkeit dar, DNA-Mengen zu quantifizieren. Auch in cDNA transkribierte RNA (2.5.13) kann somit quantifiziert werden. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass das Produkt jeder PCR in Abhängigkeit von der eingesetzten Matrizenmenge ab einem definierten Zyklus der Reaktion exponentiell zunimmt. Je mehr Moleküle als Ausgangsmaterial für die PCR zur Verfügung stehen, desto früher ist die Verdopplung des durch die Primer definierten Amplikons messbar. Zur Echtzeit-Messung der gebildeten PCR-Produkte wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der im eingesetzten „Power SybrGreen Mastermix“ (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt) enthalten ist. Nach Interkalation des Farbstoffes in doppelsträngige DNA beginnt dieser zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz wird während der PCR im „7900HT Fast Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems) in Echtzeit gemessen und steht in Relation zur durch die PCR gebildeten Menge doppelsträngiger DNA.

Die 20 µl großen Reaktionsansätze enthielten 100 ng cDNA (2.5.13), die entsprechenden Primer (Tabelle 2.3) und den „Power SybrGreen Mastermix“. Die Komponenten wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Gleiches gilt für die Reaktionsbedingungen der PCR. Die für die Transkripte der zu untersuchenden Gene spezifischen Primer wurden mit dem kostenlosen Programm „Primer 3“ (Koressaar & Remm, 2007, Untergasser *et al.*, 2012) mit folgenden Spezifikationen ausgewählt: 100–150 bp Produktlänge, 18–30 bp Primerlänge (20 bp optimal), 63–87 °C Primer T_M (optimal: 64 °C), 40–60 % GC-Gehalt der Primer (50 % optimal), 65–85 °C Produkt T_M (optimal: 75 °C).

Als Kontrolle wurden Ansätze parallel behandelt, die keine cDNA als Matrize enthielten, um Kontaminationen der Komponenten auszuschließen.

Der PCR-Zyklus, ab dem die exponentielle Zunahme des PCR-Produktes messbar wird und einen definierten Schwellenwert überschreitet, wurde von der Software „Sequence Detection System SDS3.2“ (Applied Biosystems) anhand der erhaltenen Fluoreszenzdaten als C_T -Wert ermittelt und für die weiteren Analysen verwendet.

2.5.15 Berechnung der relativen Transkriptmengenänderung

In dieser Arbeit wird eine Methode zur relativen Quantifizierung der Transkriptmengen verwendet, die sogenannte $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Schmittgen & Livak, 2008). Dabei wird in einem ersten Schritt der ermittelte C_T -Wert (2.5.14) des untersuchten Transkripts in einem bestimmten Bakterienstamm auf den Wert eines Referenzgens bezogen, das in allen

Wachstumsstadien und unter allen Bedingungen gleich stark exprimiert wird (auch als *housekeeping gene* bekannt, in diesem Fall *rpoD*). Der so erhaltene ΔC_T -Wert eliminiert eventuelle Schwankungen in der für die *real-time* qPCR eingesetzten Transkriptmenge und kann nun zwischen verschiedenen Bakterienstämmen verglichen werden. In einem zweiten Rechenschritt werden die ΔC_T -Werte auf die entsprechenden Werte eines Referenzstamms (etwa des Wildtyps) bezogen, was als $\Delta\Delta C_T$ -Wert bezeichnet wird. Da die verrechneten C_T -Werte aus einem exponentiellen System entnommen werden (exponentielle Zunahme der Menge des Amplikons), werden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte anschließend als Exponent zur Basis 2 eingesetzt ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert). Somit erhält man die Aussage: „Die Transkriptmenge von Gen x ist in Stamm A y -fach größer als in Stamm B“.

Formell betrachtet erfolgt die Analyse der Daten wie folgt:

- 1) C_T -Wert Gen - C_T -Wert *rpoD* = ΔC_T -Wert (für jedes Gen in jedem Stamm)
- 2) ΔC_T -Wert Stamm - ΔC_T -Wert Referenzstamm = $\Delta\Delta C_T$ -Wert
- 3) $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert = x -fache Änderung der Transkriptmenge eines Gens in einen bestimmten Stamm im Vergleich zu einem anderen Stamm

Da die C_T -Werte einem exponentiellen Zahlensystem entspringen (ein C_T -Unterschied von 2 entspricht einer realen Veränderung der eingesetzten Matrizenmenge um den Faktor 2^2 , also 4), erfolgt die Berechnung der Normierung durch eine Subtraktion. Erst in Rechnung 3) erfolgt die Übertragung in ein lineares System. Die Berechnung der Standardabweichungen für die in Schritt 3) erhaltenen Zahlen wurde wie folgt durchgeführt (SD: entsprechend der Differenzbildung der Mittelwerte bis einschließlich Rechnung 2 wurde die Standardabweichung der gemittelten C_T -Werte aus methodischen und biologischen Replikaten summiert):

$$\begin{aligned} \text{Obere Abweichung:} & \quad (2^{-(\Delta\Delta CT - SD)}) - 2^{-\Delta\Delta CT} \\ \text{Untere Abweichung:} & \quad 2^{-\Delta\Delta CT} - (2^{-(\Delta\Delta CT + SD)}) \end{aligned}$$

2.5.16 Analyse des Transkriptoms

Die zur Analyse des Transkriptoms nötige Isolation der RNA in Kooperation durch Frau Dr. Schroeter (Universität Greifswald) erfolgte abweichend von der in Abschnitt 2.5.11 beschriebenen Methode.

Das Probenmaterial (2.4.3) wurde mechanisch mittels des „RiboLyser“ (ThermoFisher, Thermo Scientific, Dreieich) aufgeschlossen und die RNA durch einen „KingFisher mL“ Pipettierroboter (Thermo LabSystems, Vantaa/Finnland) unter Verwendung des „MagNA Pure LC RNA isolation Kit I“ isoliert (Jurgen *et al.*, 2005). Die so isolierte RNA wurde anschließend mit DNase („RNase-free DNase Set“, Qiagen, Hilden) behandelt und mit dem „RNA cleanup and concentration Kit“ (Norgen Biotek, Thorold/Kanada) nach Herstellerangaben gereinigt und konzentriert. Die Menge der vorliegenden RNA wurde spektrophotometrisch mit einem „Nanodrop ND-1000“ (Peqlab Biotechnologie GmbH) bestimmt. Die Qualität der RNA wurde elektrophoretisch mittels des „Bioanalyzer 2100“ (Agilent Technologies, Böblingen) überprüft. Die RNA wurde sowohl für die Analyse des Transkriptoms mittels der DNA-Chip-Technologie als auch für die RNA-Sequenzierung eingesetzt. Beide Methoden werden im Folgenden beschrieben.

a) Analyse des Transkriptoms mittels DNA-Chip-Technologie, nach Charbonnier *et al.* (2005)

Die isolierte RNA wurde nach Herstellerangaben mit dem „Two-Color RNA Spike-In Kit“ (Agilent Technologies, Böblingen) behandelt. Dabei wurden 10 µg RNA mit randomisierten Primern versetzt und für 10 min bei 70 °C mit dem Kontroll-Transkript („Spike-In“) A bzw. B inkubiert.

Für die anschließende reverse Transkription wurden zu diesem Ansatz 10 µl „5x 1st strand buffer“ (Invitrogen, Darmstadt), 5 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl dNTP Mix (je 10 mM dATP, dGTP und dTTP), 2,5 mM Cy3- oder Cy5-dCTP (GE Healthcare, Freiburg), 7 µl H₂O (Nuklease-frei, Ambion®, Life Technologies, Darmstadt) und 2 µl „Superscript II reverse transcriptase“ zugegeben, 1h bei 42 °C und anschließend 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Abbau der RNA mittels 1 µl RNase H (Invitrogen, Darmstadt) für 30 min bei RT. Die cDNA wurde dann nach Herstellerangaben mit dem „CyScribe GFX Purifikation Kit“ (GE Healthcare, Freiburg) gereinigt. Es folgte die Denaturierung von jeweils 1,5 µg Cy3- und Cy5-markierter cDNA in 100 µl H₂O für 2 min bei 95 °C.

Die Hybridisierung erfolgte mit dem „Gene Expression Hybridization Kit“ (Agilent Technologies). Dazu wurde die denaturierte cDNA mit 25 µl des „blocking agent“-Puffers und 125 µl Hybridisierungspuffer vermischt. Die Hybridisierung von 240 µl dieses Ansatzes mit dem DNA-Chip sowie die Waschschriffe erfolgten nach Herstellerangaben („Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol“, Agilent Technologies). Anschließend wurde der Chip zweimal für 30 Sekunden mit 99,5 %igem Acetonitril gewaschen.

Der DNA-Chip wurde ausgehend von den Daten beider Chromosomen von *B. glumae* PG1 (2.7.2) durch die Firma Agilent Technologies hergestellt. Die Auswertung der Chips erfolgte mit dem „Agilent scanner Type G2565CA with high resolution upgrade G2539A“ und der Software „Scan Control 8.4.1“ (beide: Agilent Technologies). Die Extraktion der Daten aus dem gescannten Chip wurde mit der „Agilent’s Feature Extraction Software“, Version 10.5.1.1 (Agilent Technologies), unter Verwendung der Standardeinstellungen durchgeführt. Mit der Software „Genedate Analyst Software solution“ (Genedate, Basel) wurden die Daten von drei biologischen Replikaten geometrisch gemittelt und auf einen Referenzwert bezogen. Die statistische Analyse erfolgte mittels „2-way ANOVA/linear model analysis“ und berücksichtigte nur solche Gene als signifikant reguliert, die mindestens dreifach induziert (Faktor 3) bzw. reprimiert (Faktor 0,333) waren und deren p-Wert $< 10^{-5}$ war.

b) Analyse des Transkriptoms mittels RNA-Sequenzierung

Die Methode der Sequenzierung einer cDNA-Bank, ausgehend von der oben isolierten RNA, wurde in Kooperation mit Frau Dr. Voget (Universität Göttingen) durchgeführt. Die jeweiligen Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben.

In einem ersten Schritt wurde die rRNA aus 5 µg RNA mittels des „Ribo-Zero Kit“ (Epicentre, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) entfernt. Verunreinigende DNA wurde mit dem „gDNA Wipeout Buffer“ (Qiagen, Hilden) entfernt. Die Fragmentierung der mRNA erfolgte mit dem „RNA Fragmentation Reagent“ (Ambion®, Life Technologies, Darmstadt). Nach Behandlung der Probe mit „Antarctic Phosphatase“ und T4 Polynukleotid-Kinase für die gleichmäßige Phosphorylierung der 5′- bzw. Dephosphorylierung der 3′-Termini erfolgte die Erstellung einer cDNA-Bank mittels des „SkriptMiner Small RNA Seq Library Preparation Kit“ (Epicentre). Dabei wurden an der mRNA an beiden Termini Adaptoren angebracht, die anschließend als Startsequenzen für die Transkription der mRNA in cDNA dienten. Die cDNA-Bank wurde dann mit einem „Illumina GAIIx“-Sequenzierer mit Einzelsequenzlängen von 75 bis 100 Basen sequenziert. Die Einzelsequenzen wurden durch das Programm „Bowtie2“ (Langmead & Salzberg, 2012) (*end-to-end* Modus) mit der Genomsequenz von *B. glumae* PG1 abgeglichen, wobei nur solche Sequenzen gezählt wurden, die mit einer einmalig im Genom vorkommenden Sequenz über ihre gesamte Länge übereinstimmen. Die Anzahl solcher Sequenzen für jeden Bereich des Genoms wurde dann mit dem Programm „TraV“ (Göttingen Genomics Laboratory) dargestellt (Wiegand *et al.*, 2013). Die Menge eines Transkripts wird durch den NPKM-Wert angegeben (*n*ucleotide activity *p*er *k*ilobase of exon model per *m*illion

mapped reads). Dieser Wert entspricht der Basenaktivität (Häufigkeit, mit der die Base an einer bestimmten Position in allen erhaltenen Sequenzen vorkommt) pro Kilobase eines bestimmten Exons pro Millionen zugeordneter Sequenzen. Dieser normierte Wert beschreibt die Anzahl aller sequenzierter Basen innerhalb eines definierten Transkripts. Die Berechnung erfolgt über die Formel (Wiegand *et al.*, 2013):

$$NPKM(n, m) = 10^9 \frac{\sum_{i=n}^m f(i)}{\sum_{i=1}^m g(i)(m - n)}$$

Dabei definiert n den Anfang und m das Ende des untersuchten Transkripts, $f(i)$ die Basenaktivität einer Base auf diesem Transkript und $g(i)$ die Summe der Basenaktivitäten der Base i auf dem positiven und negativen Strang.

2.6 Arbeiten mit Proteinen

2.6.1 Säulenchromatographische Reinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen

Für die Reinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen wurde das „Ni-NTA Superflow“-Material (Qiagen, Hilden) nach Porath & Olin (1983) und Hochuli *et al.* (1987) verwendet. Dazu wurden 3 ml des Säulenmaterials in eine Tropfsäule gegeben und – nachdem sich das Material absetzen konnte – mit 3 Säulenvolumen Lysispuffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 8,0) äquilibriert. Zellkulturen, in denen das gewünschte Protein gebildet wurde, wurden sedimentiert (2.4.4) und in Lysispuffer B auf eine O.D._{580nm} = 20 eingestellt und resuspendiert. Nach anschließendem Zellaufschluss mittels Ultraschall (2.4.4) wurde das Zellysate auf das Säulenmaterial gegeben und 15 min bei RT inkubiert.

Das Säulenmaterial wurde dann mit zweimal 10 ml Waschpuffer C (wie Lysepuffer, aber pH 6,3) von unspezifischen Proteinbindungen befreit. Die Elution der Poly-Histidin-Fusionsproteine erfolgte zuerst mit dem Elutionspuffer D (wie Lysepuffer, aber pH 5,9). Hiervon wurden zweimal 2 ml auf die Säule gegeben und 5 min bei RT inkubiert, bevor das Eluat aufgefangen wurde. Dieser Schritt wurde mit dem Elutionspuffer E (wie Lysepuffer, aber pH 4,5) wiederholt.

2.6.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben erfolgte nach Herstellerangaben im „Qubit 2.0“ (Invitrogen, Darmstadt). Alternativ wurde die Konzentration mittels „NanoDrop

2000c“ (Eppendorf, Hamburg) über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Berechnung der LipB_{CHIS}-Konzentration über die Absorption bei 280 nm erfolgte mit der zugehörigen Software (v1.4.2) mit folgenden Parametern. Molekulargewicht: 37,6534 kDa, Extinktionskoeffizient 29.575 M⁻¹ cm⁻¹.

2.6.3 Präzipitation von Proteinen mittels TCA

Modifiziert nach Peterson (1977). Die zur Präzipitation von Proteinen verwendeten Proben wurden mit 1/10 Volumen 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat (in H₂O) vermischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde 1/10 Volumen 40 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA, in H₂O) zugegeben, gut durchmischt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Sedimentierung der präzipitierten Proteine mittels Zentrifugation (30 min, 21.000 *x* g, 4 °C). Der Überstand wurde restlos verworfen und das Sediment zweimal mit 80 % (v/v) Aceton (in H₂O) gewaschen. Dazu wurde 1 Volumen Aceton vorsichtig in das Gefäß pipettiert, leicht geschwenkt, für 5 min, 21.000 *x* g, 4 °C zentrifugiert und wieder abgenommen. Diese Waschprozedur entfernt die Trichloressigsäure aus dem Proteinpräzipitat und dem Gefäß. Das Präzipitat wurde für 5 min bei RT getrocknet und dann in entsprechendem Puffer gelöst, zumeist SDS-Probenpuffer (2.6.3)

2.6.4 Identifizierung von DNA-Protein-Interaktion

Zur Identifizierung von Interaktionen zwischen Proteinen und bestimmten DNA-Abschnitten wurde der sogenannte *biotin pull-down assay* verwendet (Gabrielsen *et al.*, 1989, Jungwirth *et al.*, 2008). Hierbei wurden DNA-Fragmente mittels PCR (2.5.1) erzeugt, die am 5'-Ende biotinyliert sind. Diese Modifikation wurde über entsprechend synthetisierte Primer (Tabelle 2.3) in das Fragment eingebracht. Es wurden 20 µg gereinigtes (2.5.7) PCR-Produkt in 500 µl *A. dest.* mit 500 µl 2x DBB-Puffer versetzt (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM NaCl, pH 7,5). Zur Äquilibrierung wurden 50 µl *magnetic beads* (Streptavidin-gekoppelt, M-PVA SAV2, Chemagen, Baesweiler) mittels eines Magneten aus ihrer Lagerungslösung separiert, indem der Überstand entnommen wurde. Das Sediment wurde weitere dreimal auf diese Weise mit je 1 ml 1x DBB-Puffer gewaschen. Nach den Waschschritten wurde das vorher vorbereitete PCR-Produkt mit den separierten *magnetic beads* vermischt und der Ansatz invertierend in ÜN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die *magnetic beads*, an die nun die biotinylierte DNA gebunden hat, erneut separiert und der Überstand verworfen. Auf gleiche Weise erfolgten drei Waschschrritte mit je 1 ml 1x DBB-Puffer sowie zwei Waschschrritte mit PBB-Puffer. Dieser enthielt 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Triton X100, 10 % (v/v) Glycerin, 100 mM

NaCl, pH 8,0. Nach dem Autoklavieren wurde 1 mM DTT sowie 1 Tablette/100ml Proteasehemmer („Sigmafast™ Protease Inhibitor Tablets“, Sigma, Deisendorf) hinzugefügt. Die verwendeten Ganzzellextrakte wurden nach der Zentrifugation (2.4.4) auf eine Zelldichte entsprechend einer $O.D._{580nm} = 20$ in PBB-Puffer eingestellt und mittels Ultraschall (dreimal 10 min, 50 % Zyklus, 35 % Leistung) aufgeschlossen. Nach den Waschschritten der *magnetic beads* wurden 4 ml des vorbehandelten Ganzzellextrakts zu dem Sediment hinzugefügt und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die *magnetic beads* erneut separiert, mit 5 ml PBB-Puffer gewaschen, in 1 ml PBB-Puffer gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Separieren und Waschen mit 1 ml PBB-Puffer wurden 50 µl EB-Puffer (wie PBB-Puffer, nur mit 1000 mM NaCl) zugegeben. Durch die hohe Salzkonzentration lösen sich eventuell gebildete DNA-Protein-Komplexe. Diese Proteine liegen nach Durchmischung und Separation der *beads* anschließend im Überstand vor. Dieser Elutionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Aliquots aller Wasch- und Elutionsschritte wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht (2.6.5).

2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gele

Alle Proteinproben zur Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden mit einem 2x SDS-Probenpuffer versetzt (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau) und 10 min bei 99 °C inkubiert (Methode nach Laemmli (1970)). Durch die denaturierende Wirkung des SDS und die reduzierenden Eigenschaften des β -Mercaptoethanols bilden sich lineare Aminosäureketten, die durch die Anlagerung von SDS eine negative Ladung erhalten. Die Gele bestehen, wie in Tabelle 2.7 beschrieben, aus einem Sammel- und einem Trenngelbereich.

Tabelle 2.7 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.

Für 2 Gele	Sammelgel 5 %	Trenngel 12 %
Acrylamid (37 %)	0,83 ml	4,0 ml
Tris-HCl	1,3 ml (0,5 M, pH 6,8)	2,5 ml (1,5 M, pH 8,0)
A. dest.	2,8 ml	3,4 ml
SDS 10 % (w/v)	50 µl	100 µl
APS 10 % (w/v)	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ (BioRad, München) bei einer Spannung von 100–200 V. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific, Sankt Leon-Rot). Die Färbung der Gele nach Auftrennung der Proteine erfolgte mit „Colloidal Coomassie“ (Merril, 1990). Alternativ zu dieser unspezifischen Färbung aller Proteine im Gel erfolgte die spezifische Detektion einzelner Proteine oder Peptide wie in 2.6.6 beschrieben mit einem Western Blot.

2.6.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Immunodetektion auf PVDF-Membranen (Western Blot) nach Towbin *et al.* (1979)

Der Transfer von durch SDS-PAGE (2.6.5) aufgetrennten Proteinen erfolgte mit der Transferapparatur „Mini Trans-Blot Elektrophoretic Transfer Cell“ auf eine PVDF-Membran (beide: BioRad, München) in Dunn-Carbonat-Puffer (10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20 % (v/v) Methanol) für 15 min bei 150 mA und für weitere 30 min bei 300 mA.

Die Immunodetektion der zu untersuchenden Proteine erfolgte, je nach Protein, nach einem der folgenden Protokolle:

Für den Nachweis von LipA bzw. LipB aus *B. glumae* PG1 oder Lu8093 wurde die PVDF-Membran nach dem Transfer für 1 h bei RT in TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,2 % (v/v) Tween 20) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal 10 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem für LipA bzw. LipB spezifischen Erstantikörper (1:6.000 in TBS-T + 5 % (w/v) Magermilchpulver; Prof. Tommassen, Universität Utrecht) für 1 h bei RT. Dann wurde die Membran erneut viermal 10 min bei RT in TBS-T inkubiert, bevor der Zweitantikörper „Goat-Anti-Rabbit-HRP“ (BioRad, München) 1:5.000 verdünnt in TBS-T für 1h bei RT zugegeben wurde. Anschließend wurde die PVDF-Membran viermal 10 min in TBS-T gewaschen. Die Detektion der HRP-(Meerrettich-Peroxidase-)Aktivität erfolgte über die Visualisierung der Chemolumineszenz durch die Umsetzung des Substrats im „ECL-Kit“ (GE Healthcare, Freiburg).

Das Protein GFPmut3 wurde mittels des Erstantikörpers „Living Colors® Full-Length A.v. Polyclonal Antibody“ (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), 1:10.000 in TBS-T verdünnt, detektiert. Der Zweitantikörper und die restlichen Arbeitsschritte entsprachen der oben beschriebenen Methode.

Die T7-RNA-Polymerase wurde mit dem „T7 RNA Polymerase Monoclonal Antibody“ (Novagen, Merck, Darmstadt), 1:10.000 in TBS-T verdünnt, detektiert. Anschließend wurde als Zweitantikörper „Goat-Anti-Mouse-HRP“ (BioRad, München) 1:5.000 in TBS-T verdünnt eingesetzt.

Für den immunologischen Nachweis des Histidin-*tag* wurde das „Penta-His HRP Conjugate Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Der Antikörper wurde 1:2.000 im mitgelieferten Puffer verdünnt.

Die Detektion der Signale erfolgte mit dem Gerät „Imaging System Stella 3200“ (Raytest, Straubenhardt).

Quantifizierung mittels ELISA nach Engvall & Perlmann (1971) und Van Weemen & Schuurs (1971)

Um Poly-Histidin-Fusionsproteine in Ganzzellextrakten (2.4.4) zu quantifizieren, wurde der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet. Das Prinzip dieses Verfahrens ist dem des Western Blots ähnlich. Allerdings binden die Proteine hier nicht auf einer PVDF-Membran, sondern an speziellen Mikrotiter-Platten (Immulon® 2 HB, Nunc™, Thermo Scientific). Nach Blockierung der unspezifischen Proteinbindestellen mit Magermilchpulver erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper. Dieser bindet spezifisch an das Zielprotein und ermöglicht dessen Quantifizierung über die an ihn konjugierte Meerrettich-Peroxidase. In dieser Arbeit wurde für den ELISA der „Anti His-HRP“-Antikörper (1:5.000, Roth, Karlsruhe) bzw. das „Penta-His HRP Conjugate Kit“ (1:2.000, Qiagen, Hilden) verwendet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden sedimentiert (2.4.4) und dann so in *coating buffer* (3,03 g Na₂CO₃, 6,0 g NaHCO₃ ad 1000 ml A. dest.) resuspendiert, dass ihre O.D._{580nm} = 5 war. Hiervon wurden 100 µl in der abgedeckten Mikrotiterplatte üN bei 4 °C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde dann durch Ausschlagen der Platte über einem Tuch entfernt. Es folgten zwei Waschschrte, in denen 200 µl PBS-Puffer (1,16 g Na₂HPO₄, 0,1 g K₃PO₄, 4,0 g NaCl ad 500 ml A. dest.) zugegeben und direkt wieder durch Ausschlagen der Platte entfernt wurde. Das Abblocken freier Proteinbindestellen erfolgte üN bei 4 °C mit 200 µl PBS + 5 % (w/v) Magermilchpulver bzw. 200 µl *blocking buffer*, welcher im „Penta-His HRP Conjugate Kit“ (Qiagen, Hilden) enthalten ist. Es folgten 2 Waschschrte (siehe oben) und die Inkubation mit dem Antikörper in 100 µl PBS mit 1 % (w/v) BSA und 0,05 % (v/v) Tween 20 (bzw. in 100 µl *blocking buffer* bei Verwendung des Antikörpers von Qiagen) üN bei 4 °C. Der Antikörper wurde dann durch viermaliges Waschen (siehe oben) entfernt. Im Anschluss erfolgte die

Detektion der Meerrettich-Peroxidase-Aktivität mittels 100 µl des „1-Step™ Slow TMB-ELISA“ (Thermo Scientific, Sankt Leon-Rot) für 20 min bei 37 °C. Der Ablauf der Reaktion wurde als zeitaufgelöste Absorptionsmessung am Plattenphotometer „SpectraMax 250“ (Molecular Devices, Ismaning/München) bei $\lambda = 652 \text{ nm}$ verfolgt. Zum Abstoppen der Reaktion und zum verstärkten Visualisieren wurden 100 µl einer 2 M Schwefelsäure zugegeben. Nun konnte die Menge des umgesetzten Substrats über die Absorption bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ bestimmt werden.

2.6.7 Bestimmung der Lipaseaktivität

Die Lipaseaktivität wurde mit emulgiertem *para*-Nitrophenolpalmitat (*p*-NPP) als Substrat photometrisch bestimmt (nach Winkler & Stuckmann (1979)). Hierbei spalten Lipasen das farblose *p*-NPP in Palmitat und *p*-Nitrophenol, dessen gelbe Färbung in basischer Lösung bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ detektiert werden kann. Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten und einem Gesamtvolumen von 200 µl für 15 min bei 37 °C mit dem „SpectraMax 250“ (Molecular Devices, Ismaning/München). Das Reaktionsvolumen setzt sich aus 190 µl der Substratemulsion (Tabelle 2.8) und 10 µl entsprechend verdünnter Probe zusammen.

Tabelle 2.8 Puffer für die Bestimmung der Lipaseaktivität.

50 mM Sørensen Phosphatpuffer pH 8,0	Substratemulsion 20 ml
Lösung A: 62,8 mM Na ₂ HPO ₄	17 ml Lösung A + 1 ml Lösung B
Lösung B: 5,0 mM KH ₂ PO ₄	20 mg Gummi arabicum in Lösung A/B
	41,4 mg Natriumdesoxycholat in Lösung A/B
	6 mg <i>p</i> -NPP in 2 ml Isopropanol

Die absolute Lipaseaktivität (U/ml) und daraus die relative Lipaseaktivität (U/ml*Zelldichte) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\Delta O. D_{410\text{nm}} \times \text{Gesamtvolumen} \times \text{Verdünnung}}{\text{Schichtdicke} \times \varepsilon \times \text{Zeit} \times \text{eingesetztes Volumen}} = \frac{\text{Lipaseaktivität}}{\text{ml}} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]$$

Dabei ist $\varepsilon = 15 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, alle Volumenangaben in ml und die Schichtdicke 1 cm. Definiert ist 1 U (Unit) als die Menge Lipase, die 1 mmol *para*-Nitrophenol pro Minute freisetzt.

2.6.8 β -Lactamase-Nachweis

Mit Hilfe des intrazellulären Enzyms β -Lactamase kann eine Zellkultur auf Zellyse hin untersucht werden. Dazu wird die Aktivität dieses Enzyms in den Ganzzellextrakten und zellfreien Kulturüberständen (2.4.4) der Kultur quantifiziert. Kulturen, in denen mehrheitlich keine Zellyse auftritt, weisen auch keine β -Lactamase-Aktivität im zellfreien Kulturüberstand auf. Der Aktivitätsnachweis erfolgte durch das chromogene Substrat CENTATM (Merck Millipore, Darmstadt), welches durch eine Vielzahl von β -Lactamasen umgesetzt wird (Bebrone *et al.*, 2001). Hierzu wurden 150 μ l Substratlösung (150 μ M CENTA in 100 mM KPi-Puffer, pH 7,2) mit 10 μ l der Probe versetzt und die Absorption zeitaufgelöst bei $\lambda = 405$ nm für 1h bei 30 °C gemessen.

2.6.9 Quantitative Bestimmung von Rhamnolipiden

Die Quantifizierung von Rhamnolipiden in zellfreien Kulturüberständen (2.4.4) erfolgte mittels des sogenannten Orcinol-Tests (Chandrasekaran & Bemiller, 1980, Ochsner, 1993).

Extraktion von Rhamnolipiden aus zellfreien Kulturüberständen

500 μ l des zellfreien Kulturüberstandes wurden mit 500 μ l Essigsäureethylester versetzt und durchmischt (Vortexmischer). Nach Zentrifugation (30 sec, 21.000 \times g) ist eine deutliche Phasentrennung erkennbar, wobei sich die Rhamnolipide in der oberen, organischen Phase befinden. Diese wurde mit einer Pipette vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die verbleibende wässrige Phase erneut mit 500 μ l Essigsäureethylester versetzt. Nach erneutem Mixen und Zentrifugieren wurde die organische Phase abgenommen und mit der aus der ersten Extraktion vereint. Das organische Lösemittel wurde durch Evaporation in einer Vakuumzentrifuge entfernt. Dadurch lagerten sich die Rhamnolipide als Sediment im Reaktionsgefäß ab und wurden in 100 μ l *A. dest.* resuspendiert.

Quantifizierung von Rhamnolipiden mittels Orcinol-Test

Der Orcinol-Test erlaubt die photometrische Quantifizierung von 3-Desoxy-Hexosen (wie etwa der Rhamnose). Unter Hitzeeinwirkung entsteht in sauren Reaktionsbedingungen aus der Rhamnose-Gruppe der Rhamnolipide das Methyl-Furfural, welches mit Orcinol reagiert und so zu einer orange-braunen Färbung führt. Diese kann bei $\lambda = 421$ nm detektiert werden. Zur Quantifizierung wurde 100 μ l extrahierte Rhamnolipid-Lösung (siehe oben) mit 100 μ l Orcinol-Lösung (1,6 % (w/v) Orcinol in *A. dest.*) und 800 μ l 60%iger Schwefelsäure versetzt

und für 30 min bei 80 °C und 1.000 UpM auf einem Thermomixer inkubiert. Nach Abkühlen der Probe wurde die Absorption bei $\lambda = 421$ nm bestimmt. Als Referenz diente eine gleichbehandelte Probe mit 100 μ l *A. dest.* Zur Ermittlung einer Eichgerade, über die die Konzentration der Rhamnolipide bestimmt werden kann, wurde eine Konzentrationsreihe des Rhamnolipid-Standards (0,01 % (w/v), aus *P. aeruginosa* PAO1) angesetzt und in gleicher Weise behandelt.

2.6.10 Nachweis von GFPmut3 mittels Fluoreszenz

Die Messung der Fluoreszenzspektren erfolgte im „Cary Eclipse“-Fluoreszenzphotometer (Varian, Darmstadt) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 475$ nm und einem Emissionsspektrum von $\lambda = 500$ –550 nm in 5 nm-Schritten. Die relative Quantifizierung von GFPmut3 erfolgte durch die Verrechnung der Emissionswerte bei $\lambda = 510$ nm von GFPmut3-haltigen Proben und vergleichbaren Proben ohne GFPmut3 (Leervektorkontrolle). Zur Ermittlung der Fluoreszenz in Ganzzellextrakten (2.4.4) wurden diese auf eine $O.D._{580nm} = 1,0$ in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 eingestellt.

2.6.11 Nachweis von Fusionsproteinen mit Tetracystein-tag

Der *in vivo* Nachweis von Fusionsproteinen mit Tetracystein-tag erfolgte mit der von Senf *et al.* (2008) modifizierten Methode nach Griffin *et al.* (1998) und dem „TC-FIAsh™ In-Cell Tetracysteine Detection Kit“ (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt). Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen sedimentiert (2.4.4) und mit HEPES-Puffer (50 mM, pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurde das Sediment auf eine $O.D._{580nm} = 0,2$ mit HEPES-Puffer eingestellt. Hiervon wurden 50 μ l mit 50 μ l HEPES+-Puffer (50 mM, pH 8,0, 8 μ M FIAsh™-EDT₂, 400 μ M 1,2-Ethandithiol) gemischt und für 3 h im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen und mit dem Fluoreszenzmikroskop „Axioplan 2 imaging“ (Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 500$ nm (FIAsh™-Optimum: 508 nm) und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 527$ nm (FIAsh™-Optimum: 528 nm) betrachtet.

Zur Quantifizierung von Fusionsproteinen mit Tetracystein-tag wurde ähnlich verfahren wie oben beschrieben. Allerdings erfolgte nach dem Einstellen der Zelldichte auf eine $O.D._{580nm} = 0,2$ ein Zellaufschluss mittels Ultraschall (2.4.4). Die zwei Waschschrte nach Inkubation der Probe mit HEPES+-Puffer entfielen. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Probe im „Infinite M1000 Pro“ (Tecan, Männedorf) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 508$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 528$ nm detektiert.

2.6.12 Identifizierung einzelner Proteine mittels MALDI-TOF-MS

Die Identifizierung von Protein-Banden aus SDS-Gelen (2.6.5) erfolgte mittels der Peptidmassen-*fingerprint*-Analyse (Fountoulakis & Langen, 1997, Schaffer *et al.*, 2001). Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, zweimal für je 15 min in 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M NH_4HCO_3 gewaschen und für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurden die Gelstücke in 6 μl 3 mM Tris-HCl pH 8,8 mit 10 ng/ μl Trypsin (Promega, Mannheim) inkubiert. Die so enzymatisch gespaltenen Peptide wurden dann mit 2 μl *A. dest.* und 5 μl 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (w/v) Trifluoressigsäure für 15 min bei RT in einem Ultraschallbad aus der Gelmatrix gelöst. Die peptidhaltige Flüssigkeit wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und – falls nicht direkt weiterverwendet – bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse wurde 1 μl der Probe auf einen Spot der Platte „Prespotted AnchorChip 96“ (Bruker, Bremen) pipettiert und nach 3 min Inkubation mit 7 μl 10 mM Ammoniumphosphat in 0,2 % (w/v) Trifluoressigsäure gewaschen.

Die Messung mittels MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption/ionisation - time over flight - mass spectrometry*) der Peptidmassen erfolgte am Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1, FZ Jülich) durch Frau Dr. Brocker. Dabei wird die Matrix mit einem Laser beschossen, die einzelnen so aus der Matrix gelösten Peptide in einem ionischen Feld beschleunigt und ihre Flugzeit gemessen. Diese Zeit ist charakteristisch für die Zusammensetzung und Größe der Peptide, sodass durch einen Datenbankvergleich Rückschlüsse auf die Identität des tryptisch verdauten Proteins gezogen werden können.

2.6.13 Analyse des Sekretoms

Die für die Analyse des Sekretoms generierten Proben (2.4.3) wurden in Kooperation durch Frau Dr. Wachlin und Mitarbeiter (Universität Greifswald) wie im Folgenden beschrieben behandelt.

Die aus 45 ml zellfreiem Kulturüberstand sedimentierten Proteinpräzipitate (2.4.3) wurden 12mal in 2 ml eiskaltem Ethanol (99,8 %) resuspendiert und erneut sedimentiert (10 min, 4 °C, 21.9000 $\times g$). Anschließend wurde das Sediment in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Sediment wurde dann in 150–200 μl Harnstoff-/Thioharnstofflösung (8 M/ 2 M) aufgenommen und in 100 μl schüttelnd bei RT inkubiert. Um Reste des Olivenöls zu entfernen, wurde die Probe mit 4 Volumen Aceton (vorgekühlt bei -20 °C) überschichtet und erneut über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die Proteine wurden dann für 5 min bei 14.000 $\times g$ sedimentiert, in

0,5 ml Aceton resuspendiert und erneut sedimentiert. Das Sediment wurde in 100 µl der Harnstoff-/Thioharnstofflösung aufgenommen. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Roti®Nanoquant (Roth, Karlsruhe) nach Herstellerangaben ermittelt.

Für die Auftrennung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese wurden 100 µg der so behandelten Proteinproben für die isoelektrische Fokussierung eingesetzt. Dazu wurde die Probe mit 34 µl Rehydratisierungspuffer (bestehend aus 10% CHAPS, 3 % DTT, 5,2 % Pharmalyte™ 3–10, 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und auf 340 µl mit Harnstoff/Thioharnstofflösung aufgefüllt. Die Probe wurde 10 min bei RT geschüttelt und weitere 10 min ruhend inkubiert, bevor sie für 5 min bei 13.000 UpM zentrifugiert wurde. Der Überstand, in dem sich die rehydratisierten Proteine befanden, wurde für 16 h bei 20 °C auf dem IPG-Streifen (18 cm, pH 3–10, Serva, Heidelberg) inkubiert. Die isoelektrische Fokussierung, bei der die einzelnen Proteine des Gemisches nach ihrem isoelektrischen Punkt in der Matrix des IPG-Streifens aufgetrennt werden, geschah nach folgendem Ablauf im Gerät „IPGphor“ (GE Healthcare Life Science, Freiburg): 15 min 300 V, 15 min 600 V, 15 min 1.500 V, 30 min 3.000 V, 281 min 8.000 V.

Nach der Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte die Vorbereitung des IPG-Streifens für die Auftrennung in der zweiten Dimension. Dazu wurde der Streifen für 15 min leicht schüttelnd in Äquilibrierungspuffer A (6 M Harnstoff, 65 mM DTT) und weitere 15 min in Äquilibrierungspuffer B (6 M Harnstoff, 135 mM Iodacetamid) inkubiert. Dies reduziert die Disulfidbrücken in den Proteinen und gewährleistet so eine Auftrennung des Proteingemisches nach Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamid-Gel. Diese erfolgte im „HPE™ Flat Top Tower“-System (Serva, Heidelberg).

Anschließend wurden die Proteine im Gel durch Fluoreszenzfärbung detektiert. Die Gele wurden zur Fixierung der Proteine über Nacht in 15 % (v/v) Ethanol und 1%iger Zitronensäure inkubiert. Nach zweimaliger Inkubation der Gele für 15 min mit 0,1 M Borsäure (pH 10,5; mit NaOH eingestellt) erfolgte die Färbung durch 250 ml 0,1 M Borsäure mit 1,25 ml „Lava Purple“ (Fluorotechnics, Sydney, Australien). Dieser Farbstoff bindet reversibel an die Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin (Bell & Karuso, 2003) und wurde nach Anregung bei $\lambda = 532$ nm über die Emission bei $\lambda = 560$ nm mit einem „Typhoon“-Scanner (GE Healthcare Life Science, Freiburg) detektiert. Die Identifizierung und Quantifizierung der Signale auf dem Gel erfolgte mit der Software „Delta 2D“ (mit $p = 0,05$, Decodon, Greifswald). Erfolgreich identifizierte Signale wurden aus dem Gel extrahiert und nach folgendem Protokoll in der „Ettan Spot Handling Workstation“ (GE Healthcare Life Science, Freiburg) tryptisch verdaut.

Dem Gelstück wurden 100 µl Waschlösung (50 % CH₃CN, 50 % 50 mM NH₄HCO₃) beigefügt und für 30 min inkubiert. Nach Abnahme der Waschlösung wurde dieser Schritt zweimal wiederholt. Es folgt eine Inkubation für 10 min mit einer 75%igen Acetonitrillösung, wonach die Gelstücke für ca. 15 min bei 37 °C getrocknet wurden. Nach Zugabe von 10 µl einer Trypsinlösung (1–4 µg/ml, je nach vorher gemessener Signalstärke des Proteins im Gel) erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden die tryptisch verdauten Proteine mit 60 µl einer 0,1%igen Trifluoressigsäure-Lösung (in 50 % Acetonitril) für 30 min bei 40 °C aus dem Gelstück eluiert. Nach Abnahme der Überstände wurde dieser Elutionsschritt mit 40 µl der gleichen Lösung wiederholt und die Eluate vereint. Diese wurden für 220 min bei 40 °C getrocknet und in 2,2 µl einer 0,5%igen Trifluoressigsäure-Lösung (in 50 % Acetonitril) aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 0,4 µl mit dem gleichen Volumen einer gesättigten α-Cyano-4-Hydroxymizsäure vermischt, für 15 min inkubiert und für die Messung des Masse-/ Ladungsverhältnisses eingesetzt. Dazu wurden die Proben mit dem Gerät „4800 MALDI TOF/TOF Analyzer“ (AB Sciex, Framingham, USA) vermessen.

2.6.14 Analyse extrazellulärer Metabolite

Die Analyse der extrazellulären Metabolite wurde im Rahmen einer Kooperation von Frau Dr. Methling (Universität Greifswald) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (Liebeke *et al.*, 2009) mit einem „Bruker Avance II 600 MHz“ Spektrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten). Dazu wurden 400 µl der steriltfiltrierten Probe (2.4.3) mit 200 µl Pufferlösung (0,2 M Na₂HPO₄ in 50:50 (v/v) H₂O/D₂O-Lösung, pH 7,0, mit 1 mM 3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3-D₄]-1-propansäure, TSP) versetzt. Die Auswertung der Spektren und die Quantifizierung der Verbindungen erfolgte mit der Software „AMIX®-Viewer“, Version 3.9.7 (Bruker Biospin, Rheinstetten). Die Quantifizierung erfolgte in Bezug auf das Integral des TSP-Signals (9 Protonen).

Die Proben für den Nachweis von Ölbestandteilen (Glycerintrioleate des Olivenöls) wurden durch Extraktion von 1 ml unfiltriertem Kulturüberstand gewonnen. Der Überstand wurde für 1 min mit 600 µl CDCl₃ (enthielt 0,1 % TMS: Tetramethylsilan-D₁₂ als internen Standard) durchmischt. Nach Zentrifugation bei 4 °C für 5 min wurde die organische Phase in ein NMR-Röhrchen überführt. Die ¹H-NMR-Analyse und die Auswertung der Spektren wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte in Bezug auf das Integral des TMS-Signals (12 Protonen).

2.7 Sonstiges

2.7.1 *In silico* Methoden

Analysen von DNA- oder Aminosäuresequenzen sowie die Planung von Klonierungen wurden mit Hilfe der Software „CLONE Manager 9“ (Scientific and Educational Software, Cary/USA) durchgeführt. Für Sequenzvergleiche wurde außerdem der BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990, Camacho *et al.*, 2009) des NCBI-Servers verwendet. Eigenschaften von Proteinen wurden mit mehreren Programmen des Expasy-Servers (<http://www.expasy.org>) bestimmt. Für die Darstellung chemischer Verbindungen wurde das frei verfügbare Programm „ACD/ChemSketch“ in der Version 12.01 verwendet. 3D-Strukturen von Proteinen wurden mit „UCSF Chimera v1.8“ dargestellt (Pettersen *et al.*, 2004). Die Text- und Bildbearbeitung erfolgte mit „Microsoft Word“ bzw. „Powerpoint“. Für die graphische Darstellung von Daten wurde „Microsoft Excel“ oder „GraphPad Prism“ verwendet. Alle weiteren – für explizite Fragestellungen – genutzten Programme werden an der entsprechenden Stelle direkt im Text angeführt.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Flachbettscanners, einer Kamera oder anderen Geräten digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Während der Datenerfassung und -verarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen vorgenommen.

2.7.2 Annotation des Genoms von *B. glumae*

Die Informationen zum Genom von *B. glumae* PG1 und Lu8093 wurden freundlicherweise von Frau Dr. Voget (*Göttingen Genomics Laboratory*, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Sie umfassen die Genomsequenz, die Annotation der *open reading frames* sowie die Vorhersage der Proteinfunktion (Stand März 2012). Die Bezeichnungen von Genen, Proteinen und vorhergesagten Proteinfunktionen in dieser Arbeit entsprechen, falls nicht anders angegeben, dieser Annotation.

3. Ergebnisse

3.1 Die systembiologische Analyse von *B. glumae* PG1 zeigt Möglichkeiten zur Optimierung der Lipaseproduktion auf

Die Lipase LipA aus *B. glumae* PG1 ist in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht worden. Der Fokus dieser Studien lag meist auf dem Aufbau und der Funktion des Enzyms sowie seiner Faltung und Sekretion. Andere zelluläre Prozesse, wie etwa die Regulation der Lipaseproduktion, sind hingegen weitestgehend unerforscht. Die Charakterisierung dieser Prozesse durch systembiologische Analysen kann Möglichkeiten zur Produktionsoptimierung der biotechnologisch relevanten Lipase LipA in *B. glumae* PG1 aufzeigen.

Aus diesem Grund wurden das Transkriptom, das extrazelluläre Proteom (Sekretom) und die extrazellulären Metabolite von *B. glumae* PG1 analysiert. Dies geschah vergleichend unter Lipase-induzierenden Bedingungen sowie unter solchen, bei denen keine Lipaseproduktion stattfindet. Unter identischen Bedingungen wurde außerdem ein sekretionsdefizienter Stamm *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* untersucht.

3.1.1 Generierung des Probenmaterials für die systembiologische Analyse

Die Generierung des Probenmaterials für die systembiologischen Analysen erfolgte unter definierten Bedingungen in einer Kleinfemter-Anlage (Multifors, 2.4.3). Außerdem wurde ein definiertes Minimalmedium E (MME, 2.4.1) verwendet, um eine optimale Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Durch Zugabe verschiedener Additive kann die Lipaseproduktion von *B. glumae* PG1 reguliert werden. 1 % (v/v) Olivenöl führt bei der Kultivierung im Schüttelkolben zu einer Erhöhung der Lipaseproduktion (Beselin, 2005, Boekema *et al.*, 2007) und wurde auch hier für die Fermentationen verwendet. Eine Masterarbeit, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation betreut wurde, identifizierte Succinat in einer Endkonzentration von 0,35 % (w/v) als effektiven Repressor der Lipaseproduktion (Hahn, 2012).

Zur Kultivierung von *B. glumae* PG1 bzw. PG1 Δ *gspDEF* wurden jeweils drei Fermentationsbehälter mit je 700 ml MME mit entweder 1 % (v/v) Olivenöl oder 0,35 % (w/v) Succinat aus einer gemeinsamen Vorkultur inokuliert und wie in 2.4.3 beschrieben kultiviert. Für jeden der drei zu untersuchenden Zeitpunkte des exponentiellen, transienten bzw. stationären Wachstums wurde der Inhalt eines Fermentationsbehälters aufbereitet (2.4.3). Diese Kultivierungen wurden in biologischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Exemplarisch

hierfür stellt Abbildung 3.1 die stündlich gemessene Zelldichte sowie den relativen Sauerstoffpartialdruck dar. Ebenfalls sind die Zeitpunkte verzeichnet, zu denen die Proben für die exponentielle, transiente und stationäre Wachstumsphase entnommen wurden.

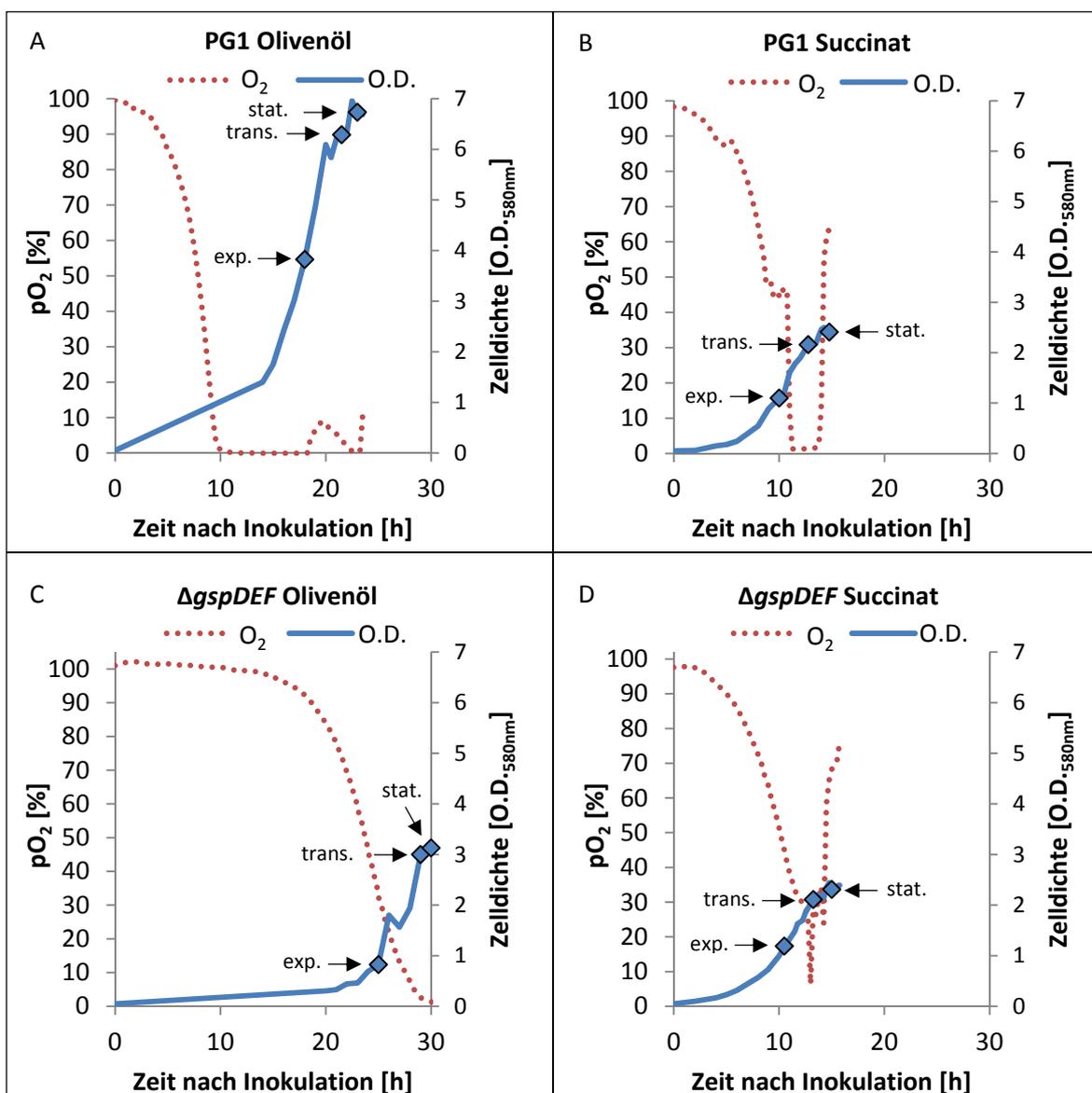


Abbildung 3.1 Zelldichte und Sauerstoffpartialdruck im Verlauf der Fermentation von *B. glumae* PG1 und *B. glumae* PG1 Δ gspDEF in verschiedenen Medien.

Aufgetragen sind die optische Dichte (rechte Ordinate, O.D.) und der Sauerstoffpartialdruck (linke Ordinate, O_2) während der Fermentationen von *B. glumae* PG1 (PG1) und *B. glumae* PG1 Δ gspDEF (Δ gspDEF) in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl (Olivenöl, A und C) bzw. 0,35 % (w/v) Succinat (Succinat, B und D). Die drei mit einer Raute markierten Punkte im Zellwachstum jeder Kultur entsprechen den Zeitpunkten der Probenentnahme für die exponentielle, transiente und stationäre Wachstumsphase (exp., trans., stat.). Das Zellwachstum wurde manuell über die optische Dichte ermittelt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde von der Multifors-Anlage protokolliert, wobei der Wert unmittelbar vor Inokulation als 100 % definiert wurde.

Bei allen Kulturen war zu beobachten, dass der Sauerstoffpartialdruck im Verlauf der Fermentation erst abnimmt und dann, beim Erreichen der stationären Wachstumsphase, wieder ansteigt. Eine Ausnahme bildet *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* in MME mit Olivenöl (Abbildung 3.1 C). Hier zeigte sich, dass der Sauerstoffpartialdruck trotz stagnierender Zelldichten für weitere 6 h bei 0 % verblieb (nicht abgebildet). Daher erfolgte in diesen Kulturen die Entnahme des Zellmaterials für die stationäre Wachstumsphase eine Stunde nach dem Abflachen des Zellwachstums in der transiente Wachstumsphase. In MME mit Succinat erreichten sowohl *B. glumae* PG1 als auch *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* die stationäre Phase nach etwa 15 h, während dies mit Olivenöl als zusätzlicher Kohlenstoffquelle erst nach 24 h (PG1) bzw. 30 h (PG1 Δ *gspDEF*) der Fall war. Dies war auf eine längere *lag*-Phase von ca. 10 h bzw. 20 h dieser Kulturen zurückzuführen.

Allerdings konnten im Medium mit Olivenöl höhere Zelldichten als im Medium mit Succinat nachgewiesen werden. Der Wildtyp erreichte hier eine Zelldichte von $O.D._{580nm} \approx 7$, während die Mutante eine maximale Zelldichte von $O.D._{580nm} \approx 3$ erreichte. In MME mit Succinat wiesen *B. glumae* PG1 und PG1 Δ *gspDEF* eine ähnliche Zelldichte auf ($O.D._{580nm} \approx 2,5$).

Die Deletion des Operons *gspDEF* hat einen negativen Einfluss auf die maximale Zelldichte von *B. glumae* im Kleinfementer beim Wachstum auf MME mit Olivenöl, nicht aber bei MME mit Succinat. Die Verwendung von Succinat als zusätzliche Kohlenstoffquelle beschleunigt im Vergleich mit Olivenöl das Wachstum von *B. glumae* PG1 und PG1 Δ *gspDEF*, ermöglicht aber nur geringere Zelldichten.

3.1.2 Olivenöl induziert die Transkription der Lipase LipA

Für *B. glumae* PG1 in MME mit Olivenöl bzw. Succinat (vgl. Abbildung 3.1 A und B) wurden gezielte Transkriptuntersuchungen des *lipAB*-Operons mittels vergleichender *real-time* qPCR durchgeführt (2.5.11 bis 2.5.15). Außerdem wurde die Lipaseaktivität in den zellfreien Kulturüberständen ermittelt (2.4.4, 2.6.7).

Die Transkriptmengen von *lipA* (Gen der Lipase) und *lipB* (Gen der Foldase) waren in der exponentiellen und transienten Wachstumsphase in Kulturen mit Olivenöl im Vergleich zu Kulturen mit Succinat um etwa das 100fache erhöht (Abbildung 3.2 A). In den zellfreien Überständen der Kulturen mit Olivenöl wurde eine relative Lipaseaktivität von etwa 0,15–0,25 U/ml \cdot $O.D._{580nm}$ gemessen (Abbildung 3.2 B). Kulturen mit Succinat wiesen keine

Lipaseaktivität im zellfreien Überstand auf. In der stationären Phase der Kultivierungen in MME mit Olivenöl war keine Erhöhung der Transkriptmenge mehr zu verzeichnen, obwohl die relative Lipaseaktivität zwischen dem transienten und stationären Messpunkt weiter zunahm.

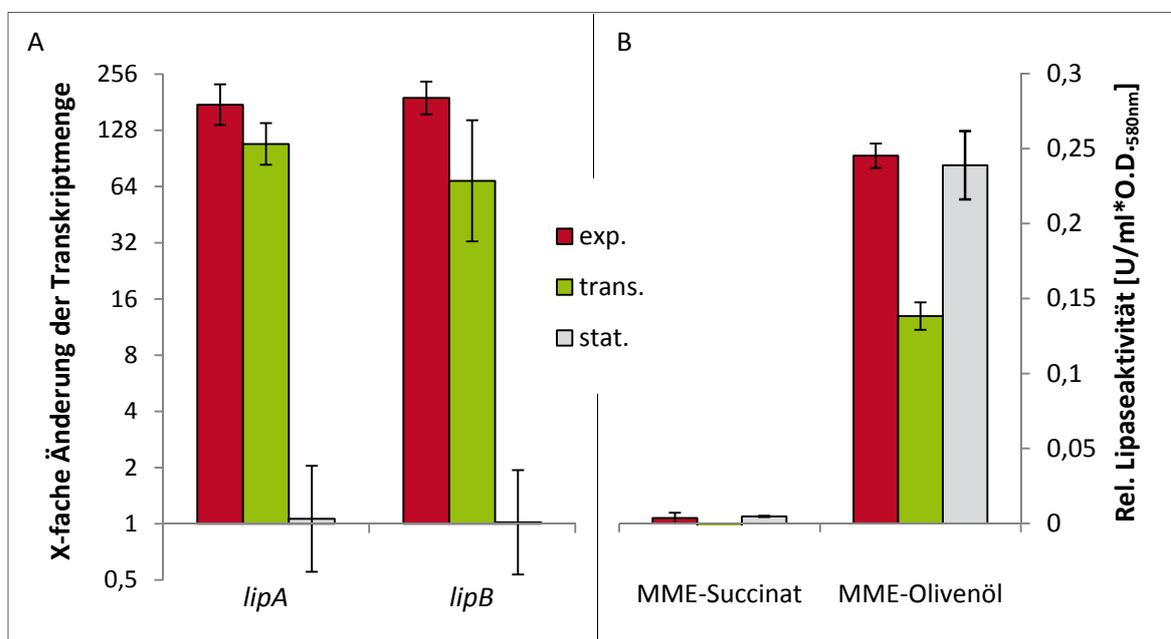


Abbildung 3.2 Einfluss der zugesetzten Kohlenstoffquelle auf die Lipaseproduktion von *B. glumae* PG1.

A: Änderung der Transkriptmengen von *lipA* und *lipB* in Kulturen in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl im Vergleich zu solchen in MME mit 0,35 % (w/v) Succinat. Aufgetragen sind die x-fachen Änderungen zu den drei definierten Zeitpunkten der exponentiellen, transienten und stationären Wachstumsphase (exp., trans., stat.). **B:** Relative Lipaseaktivität zu den gleichen Zeitpunkten im zellfreien Kulturüberstand in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl (MME-Ölivenöl) bzw. in MME mit 0,35 % (w/v) Succinat (MME-Succinat). Eine inhaltlich ähnliche Abbildung wurde bereits in einer assoziierten Masterarbeit dargestellt (Hahn, 2012). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Für die drei biologischen Replikate der exponentiellen Wachstumsphase wurde eine RNA-Sequenzierung in Kooperation mit Frau Dr. Voget (AG Prof. Dr. Daniel, Universität Göttingen) durchgeführt (2.5.16 b). Bei dieser Methode wird das gesamte Transkriptom indirekt über eine cDNA-Bank sequenziert. Anschließend werden die so erhaltenen Sequenzen mit der Genomsequenz abgeglichen und die Häufigkeit bestimmt, mit der jede einzelne Base sequenziert wurde. Diese Häufigkeit wird als Basenaktivität bezeichnet. Die Summe aller Basenaktivitäten innerhalb eines Gentranskripts, normiert auf die Summe aller erhaltenen Sequenzen, wird durch den NPKM-Wert beschrieben. Mit dem NPKM-Wert können Transkriptmengen einzelner Gene zu verschiedenen Zeitpunkten oder Bedingungen verglichen werden. Abbildung 3.3 zeigt die Basenaktivitäten des *lipAB*-Transkripts für die exponentielle Wachstumsphase von drei biologischen Replikaten in beiden Kultivierungsmedien. Kulturen in MME mit Olivenöl wiesen über das gesamte *lipAB*-Transkript

eine Basenaktivität zwischen 10^1 und 10^3 auf, wobei diese im *lipB*-Transkript tendenziell abnimmt. Für Kulturen in MME mit Succinat war hingegen nahezu kein *lipAB*-Transkript nachweisbar (Basenaktivität $<10^1$). Daraus resultierend wurde für das *lipA*-Transkript in der exponentiellen Wachstumsphase von *B. glumae* PG1 in MME mit Olivenöl 1578 ± 764 NPKM ermittelt, für das *lipB*-Transkript 407 ± 195 NPKM (Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung, ohne Abbildung). Die Werte der Transkripte für die Kultivierung in MME mit Succinat betragen 21 ± 13 NPKM (*lipA*) bzw. 8 ± 2 NPKM (*lipB*).

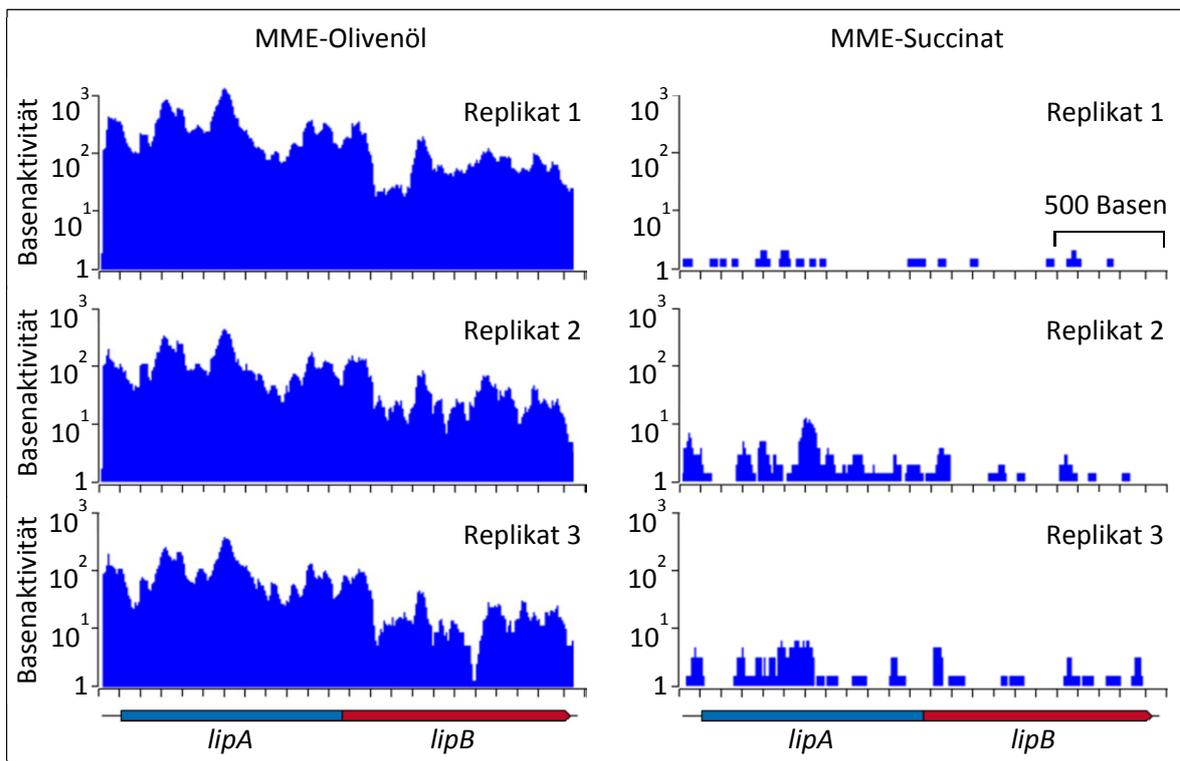


Abbildung 3.3 Analyse des *lipAB*-Transkripts von *B. glumae* PG1 mittels RNA-Sequenzierung.

Abgebildet ist die Basenaktivität für jede Base des *lipAB*-Transkripts der exponentiellen Wachstumsphase von *B. glumae* PG1 in verschiedenen Kultivierungsmedien. Diese waren MME mit 1 % (v/v) Olivenöl (MME-Olivenöl) bzw. MME mit 0,35 % (w/v) Succinat (MME-Succinat). Die Basenaktivität beschreibt die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Base des Transkripts in der Sequenzierung identifiziert wurde. Diese Häufigkeit ist logarithmisch auf der Ordinate aufgetragen. Die Abszisse zeigt maßstabsgetreu das *lipAB*-Transkript und ist in 100-Basen-Schritten skaliert. Untereinander dargestellt sind die Ergebnisse aus der Untersuchung der drei biologischen Replikate (Replikat 1–3). Der Datensatz wurde freundlicherweise von Frau Dr. Voget (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Der Zusatz von Olivenöl im Kultivierungsmedium von *B. glumae* PG1 induziert die Transkription des *lipAB*-Operons.

3.1.3 Olivenöl wird von *B. glumae* PG1 als Kohlenstoffquelle verwertet

Da Olivenöl im Medium von *B. glumae* PG1 die Transkription des *lipAB*-Operons induziert, wird das Olivenöl vermutlich durch die Lipase-vermittelte Freisetzung der darin enthaltenen Fettsäuren als Kohlenstoffquelle für *B. glumae* PG1 verfügbar gemacht. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die extrazellulären Metabolite von *B. glumae* PG1 in MME mit Olivenöl zu den drei definierten Wachstumszeitpunkten (vgl. Abbildung 3.1 A) in Kooperation mit Frau Dr. Methling (AG Prof. Dr. Lalk, Universität Greifswald) untersucht (2.6.14).

Das Olivenöl, welches zu 56–85 % aus Ölsäure-Estern besteht, sollte über die Bestimmung der Konzentration von Glycerintrioleat nachgewiesen werden, allerdings war bereits in den Überständen der exponentiellen Wachstumsphase kein Glycerintrioleat mehr detektierbar (ohne Abbildung). Die Konzentration von Glycerin nahm von ca. 30 $\mu\text{mol/l}$ vor der Inokulation auf ca. 200 $\mu\text{mol/l}$ in der exponentiellen Wachstumsphase zu und fiel dann im Verlauf der Fermentation bis zur stationären Phase auf etwa 125 $\mu\text{mol/l}$ ab (Tabelle 3.1). Auch die Konzentration kurzkettiger Fettsäurereste wie dem Butanoat, dem Salz oder Ester der Buttersäure, nahm im Medium von ca. 20 $\mu\text{mol/l}$ vor Inokulation bis zur stationären Wachstumsphase (ca. 250 $\mu\text{mol/l}$) stetig zu. Die Konzentration von Citrat, welches ein fester Bestandteil des MME ist, nahm über den Kultivierungsverlauf von ca. 12 auf 1 mmol/l stetig ab.

Tabelle 3.1 Bestimmung extrazellulärer Metabolite zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten von *B. glumae* PG1 in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl.

	vor Inokulation	exponentielle Phase	transiente Phase	stationäre Phase
Glycerin [$\mu\text{mol/l}$]	31 \pm 7	199 \pm 35	210 \pm 126	125 \pm 25
Butanoat [$\mu\text{mol/l}$]	22 \pm 2	197 \pm 23	249 \pm 24	268 \pm 23
Citrat [mmol/l]	12,263 \pm 0,397	5,148 \pm 1,847	2,187 \pm 0,266	1,356 \pm 0,08

Die Zunahme der Konzentration von Glycerin und Fettsäuren kann mit der Spaltung der im Olivenöl enthaltenen Triacylglycerine durch die Lipase LipA erklärt werden. Kulturen von *B. glumae* PG1 in MME mit Succinat (vgl. Abbildung 3.1 B) wiesen weder Glycerin noch freie Fettsäuren auf (ohne Abbildung).

Die Spaltung von Olivenöl im Medium von *B. glumae* PG1 in Glycerin und freie Fettsäuren kann durch die enzymatische Aktivität der Lipase LipA erklärt werden.

3.1.4 Identifizierung von Typ II-sekretierten Proteinen in *B. glumae* PG1

Frühere Arbeiten zeigten, dass die Lipase LipA in *B. glumae* PG1 über den Typ II-Sekretionsweg in das extrazelluläre Milieu sekretiert wird (Frenken *et al.*, 1993b, Knorr, 2010). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, welche anderen Proteine bei Lipase-induzierenden Bedingungen über den Typ II-Sekretionsweg in den extrazellulären Raum sekretiert werden. Dazu wurde *B. glumae* PG1 mit einer sekretionsdefizienten Mutante *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* verglichen. In dieser wird der Transport über den Typ II-Sekretionsweg durch das Fehlen der Pore GspD in der äußeren Membran und zweier weiterer für diese Sekretion essenzieller Proteine GspE und GspF verhindert (Knorr, 2010).

Analysiert wurde das Sekretom von *B. glumae* PG1 und *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* in der stationären Wachstumsphase unter Lipase-induzierenden Bedingungen (vgl. Abbildung 3.1 A und C). Dies geschah in Kooperation mit Frau Dr. Wachlin und Mitarbeitern (AG Prof. Dr. Hecker, Universität Greifswald) mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS (2.6.13). Abbildung 3.4 zeigt überlagernd die detektierten Proteinsignale auf den entsprechenden Gelen von *B. glumae* PG1 (grün) und *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* (rot). Proteine, die im Sekretom beider Stämme vorkommen, sind gelb dargestellt.

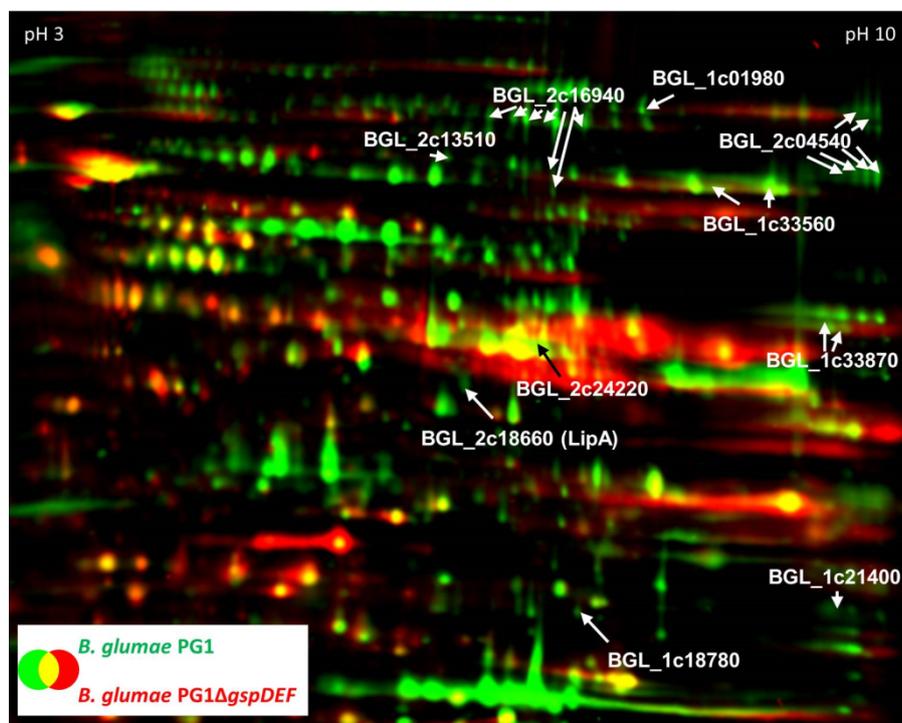


Abbildung 3.4 Falschfarbenbild der extrazellulären Proteine von *B. glumae* PG1 und PG1 Δ *gspDEF*.

Verglichen wurden die extrazellulären Proteine in der stationären Wachstumsphase in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl. Mit dem jeweiligen Gennamen sind nur solche Proteine gekennzeichnet, die als Typ II-sekretiert identifiziert wurden (siehe Fließtext). Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Wachlin (Universität Greifswald).

Insgesamt wurden in den zellfreien Kulturüberständen des Wildtypen 236 und in denen der Sekretionsmutante 261 Proteine identifiziert. Da das Sekretom nur auf die Fragestellung bezüglich Typ II-sekretierter Proteine untersucht werden sollte, wurde anschließend mit Hilfe von Strukturvorhersage-Programmen eine *in silico* Eingrenzung vorgenommen. Mit den Programmen „LipoP 1.0 Server“ (Juncker *et al.*, 2003) und „Signal-BLAST“ (Frank & Sippl, 2008) wurden C-terminale SP1-Signalpeptide vorhergesagt. Diese Vorhersagen grenzten die Anzahl der im zellfreien Kulturüberstand identifizierten Proteine auf 55 für den Wildtypen und 74 für die Mutante ein. Innerhalb dieser Vorauswahl konnten 10 Proteine identifiziert werden, die nur im Wildtypen, nicht aber in der Sekretionsmutante im extrazellulären Raum lokalisiert sind. Diese gelangen also vermutlich über den Typ II-Sekretionsweg in den extrazellulären Raum.

Zu diesen Proteinen gehörte auch die Lipase LipA (BGL_2c18660), deren Transport über diesen Sekretionsweg bereits im Vorfeld bekannt war (Frenken *et al.*, 1993b, Knorr, 2010). Des Weiteren wurden drei hypothetische Proteine (BGL_1c21400, BGL_2c13510 und BGL_1c18780), eine L-Asparaginase (BGL_2c24220), eine Protease (BGL_1c33560) sowie eine Carboxypeptidase (BGL_1c33870) identifiziert. Gleiches gilt für drei TonB-abhängige Rezeptoren (BGL_1c01980, BGL_2c16940 und BGL_2c04540).

Neben der Lipase LipA wurden neun weitere Proteine identifiziert, die unter Lipase-induzierenden Bedingungen vermutlich über den Typ II-Sekretionsweg in den extrazellulären Raum gelangen.

3.1.5 Gezielte Analyse des Transkriptoms im Hinblick auf die Lipaseregulation

Die Kultivierungen von *B. glumae* PG1 unter Lipase-induzierenden bzw. -reprimierenden Bedingungen im Kleinfemter (siehe Abbildung 3.1 A und C) dienten ebenfalls zur Analyse des Transkriptoms (2.5.16 a) in Kooperation mit Frau Dr. Schroeter (AG Prof. Dr. Schweder, Universität Greifswald). Bei der Auswertung der Daten wurde das Transkriptniveau von *B. glumae* PG1 in der exponentiellen Wachstumsphase unter Lipase-reprimierenden Bedingungen (MME mit Succinat) als Referenz gewählt. Auf diese Referenz wurden die Transkriptmengen zu den drei Wachstumsphasen unter Lipase-induzierenden Bedingungen (MME mit Olivenöl) bezogen. Als signifikant beeinflusst wurden nach statistischer Auswertung mittels linearer N-Way ANOVA ($p = 10^{-5}$) solche Gene definiert, die mindestens

dreifach stärker bzw. schwächer exprimiert wurden als in der Referenz. In der exponentiellen Wachstumsphase waren die Transkriptmengen von etwa 100 Genen signifikant verändert, in der transienten bzw. stationären Wachstumsphase die Transkriptmengen von etwa 300 Genen (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Anzahl der Gene mit veränderter Transkriptmenge unter Lipase-induzierenden Bedingungen.

Gezeigt ist die Anzahl der Gene, deren Transkript in *B. glumae* PG1 in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl im Vergleich zur Referenz (exponentielle Wachstumsphase in MME mit 0,35 % (w/v) Succinat) in der jeweiligen Wachstumsphase signifikant beeinflusst war (Schroeter, unveröffentlicht). Die statistische Auswertung erfolgte auf Grundlage dreier unabhängiger biologischer Replikate (lineare N-Way ANOVA, $p = 10^{-5}$).

	exponentielle Phase	transiente Phase	stationäre Phase
stärker exprimiert	20	76	78
schwächer exprimiert	76	220	197

Das Datenmaterial wurde gezielt in Hinsicht auf Mechanismen der Lipaseproduktion und -sekretion sowie weiterer industriell relevanter Gesichtspunkte ausgewertet. Unter Lipase-induzierenden Bedingungen waren die Transkriptmengen von *lipA* etwa 20- bis 30fach und von *lipB* etwa 10fach erhöht (Tabelle 3.3). Dies bestätigt die Beobachtungen zur Induktion des *lipAB*-Operons durch Olivenöl (Abschnitt 3.1.2). Dabei weichen die absoluten Werte bedingt durch die unterschiedlichen Methoden zwar voneinander ab, zeigen aber übereinstimmend, dass Olivenöl die *lipAB*-Transkription induziert.

Da bekannt ist, dass die Lipaseexpression in bestimmten Organismen unter Kontrolle des Zelldichte-abhängigen *quorum sensing*-Systems steht (Devescovi *et al.*, 2007), wurden die für dieses System verantwortlichen Gene gezielt analysiert. Allerdings wiesen weder *lasI* (BGL_2c03980) noch *lasR* (BGL_2c03990) bzw. *tofl* (BGL_2c09850) eine signifikante Änderung ihrer Transkriptmengen auf. Einzig das ebenfalls im Zusammenhang mit der Regulation der Rhamnolipidsynthese stehende Gen *tofR* bzw. *rhIR* (BGL_2c09870, Ochsner *et al.* (1994b)) zeigte unter Lipase-induzierenden Bedingungen ein erhöhtes Transkriptniveau. Aus diesem Grund wurden ebenfalls die für die Rhamnolipidsynthese verantwortlichen Strukturgene *rhIA*, *rhIB* und *rhIC* betrachtet (Ochsner *et al.*, 1994a, Rahim *et al.*, 2001). Sowohl *rhIB* als auch *rhIC* wiesen unter Lipase-induzierenden Bedingungen ein erhöhtes Transkriptlevel auf (Tabelle 3.3). Die Transkriptmenge von *rhIA* war unter den gewählten statistischen Bedingungen nicht signifikant erhöht.

Tabelle 3.3 Änderung der Transkriptmenge bestimmter Gene unter Lipase-induzierenden Bedingungen.

Nach statistischer Auswertung der Rohdaten aus drei unabhängigen biologischen Replikaten sind die Transkriptmengen der Gene zu mindestens einem Zeitpunkt mindestens dreifach stärker (>3) oder schwächer ($<0,333$) exprimiert (lineare N-Way ANOVA, $p = 10^{-5}$) als in der Referenz (Ref., exponentielle Wachstumsphase in MME mit 0,35 % (w/v) Succinat). Die Werte der exponentiellen (exp.), transienten (trans.) und stationären (stat.) Wachstumsphase von *B. glumae* PG1 in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl werden als die x-fache Änderung der Transkriptmenge im Vergleich zur Referenz angegeben. Gezeigt sind das geometrische Mittel und die Standardabweichung der biologischen Dreifachbestimmung. Die signifikant veränderten Werte sind mit einem „*“ markiert.

Gen	Protein	exp.	trans.	stat.	Ref.
BGL_2c18660	LipA	22,0 ± 21,0	27,6* ± 6,1	32,9* ± 21,4	1,0 ± 0,1
BGL_2c18650	LipB	6,3* ± 4,0	8,8* ± 3,2	12,9* ± 4,8	1,0 ± 0,1
BGL_2c09870	RhIR/TofR	2,7 ± 0,3	5,9* ± 0,7	5,9* ± 0,5	1,0 ± 0,2
BGL_2c07480	RhIB	1,0 ± 0,5	6,9* ± 1,2	8,2* ± 0,1	1,0 ± 0,7
BGL_2c07500	RhIC	1,0 ± 0,2	6,7* ± 0,5	6,2* ± 0,5	1,0 ± 0,2

Für *B. glumae* PG1 sind bisher keine Transkriptionsregulatoren bekannt, die einen direkten Einfluss auf das *lipAB*-Operon haben. Unter den signifikant regulierten Genen wurden insgesamt 12 identifiziert, die für Transkriptionsregulatoren kodieren, von denen jedoch keiner in einem offensichtlichen Zusammenhang mit der Lipaseproduktion steht (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Die Transkriptmenge von *gspD*, welches für die Pore des Typ II-Sekretionswegs in der äußeren Membran kodiert (Filloux *et al.*, 1998), ist nicht signifikant verändert. Auch zeigte sich keine Änderung für *qsmR*, das einen *quorum sensing*-abhängigen Regulator für die Ausbildung des Typ II-Sekretionsapparates kodiert (Goo *et al.*, 2010).

Unter Lipase-induzierenden Bedingungen ist die Transkription der Gene *rhIR*, *rhIB* und *rhIC* erhöht. Die Proteine RhIB und RhIC spielen eine Rolle in der Rhamnolipidsynthese.

3.1.6 *B. glumae* PG1 bildet unter Lipase-induzierenden Bedingungen Rhamnolipide

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass Olivenöl im Fermentationsmedium von *B. glumae* PG1 neben einem Anstieg der Lipaseproduktion auch eine erhöhte Transkription der für die Rhamnolipidsynthese nötigen Gene zur Folge hatte. Daher wurde überprüft, ob dieser transkriptionelle Einfluss auch eine erhöhte Produktion der Rhamnolipide bedingt.

Dazu wurden Rhamnolipide aus zellfreien Kulturüberständen der stationären *B. glumae* PG1-Kulturen in MME mit Olivenöl bzw. mit Succinat (vgl. Abbildung 3.1 A und B) isoliert und quantifiziert (2.6.9). *B. glumae* PG1 produzierte im Medium mit Olivenöl etwa 20 mg/l Rhamnolipide und damit deutlich mehr als im Medium mit Succinat (Abbildung 3.5). Die Quantifizierung der Rhamnolipide bestätigte somit die Beobachtung der gesteigerten Transkriptmenge der Rhamnolipidsynthese-Gene unter Lipase-induzierenden Bedingungen.

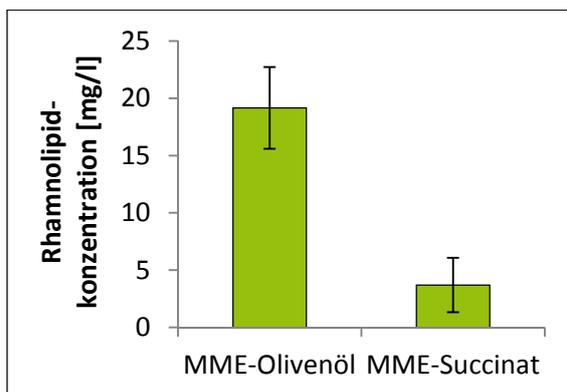


Abbildung 3.5 Rhamnolipidsynthese in *B. glumae* PG1 unter Fermentationsbedingungen.

Quantifizierung der Rhamnolipide in zellfreien Kulturüberständen von *B. glumae* PG1 in der stationären Wachstumsphase in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl bzw. 0,35 % (w/v) Succinat. Aufgetragen sind Mittelwerte einer biologischen Doppelbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Der Einsatz von Olivenöl als zusätzliche Kohlenstoffquelle in Fermentationen von *B. glumae* PG1 führt zu einer gesteigerten Produktion von Rhamnolipiden.

3.2 Verwendung des induzierbaren Lipasepromotors zur Produktion heterologer Proteine in *B. glumae* PG1

Das für die Lipase kodierende Gen *lipA* steht zusammen mit dem Gen *lipB* unter der Kontrolle eines σ^{54} -abhängigen Promotors (Beselin, 2005). In Abbildung 3.2 und 3.3 wurde gezeigt, dass die Genexpression ausgehend von diesem Lipasepromotor durch die Art der Kohlenstoffquelle inhibiert bzw. stimuliert werden kann. Damit bietet der Promotor vermutlich eine Möglichkeit zur kontrolliert induzierbaren Expression auch von heterologen Genen in *B. glumae* PG1. Dass *B. glumae* PG1 grundsätzlich zur Herstellung großer Proteinmengen eingesetzt werden kann, zeigt bereits die Nutzung des Derivats *B. glumae* Lu8093 als Lipaseproduktionsstamm in der Industrie (Balkenhohl *et al.*, 1997, Boekema *et al.*, 2007).

Die daraus resultierende Vermutung, dass *B. glumae* PG1 generell als Produktionsstamm eingesetzt werden kann, wurde daher überprüft. Dazu wurde die Produktion heterologer Proteine im Stamm *B. glumae* PGT7*Plip* untersucht. In diesem Stamm liegt die T7-RNA-Polymerase (T7RP) unter Kontrolle des *lipAB*-Promotors im Genom kodiert vor. Vergleichend dazu wurde der Stamm *B. glumae* PGT7*laci* herangezogen, in welchem das T7RP-Gen im Genom unter Kontrolle des mit IPTG induzierbaren *lac*-Promotors steht. Eine schematische Darstellung der Genotypen beider Expressionsstämme findet sich in Abbildung 3.6 A.

3.2.1 Expressionsstämme basierend auf *B. glumae* PG1 synthetisieren heterologe Proteine

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob die Stämme *B. glumae* PGT7*lip* und PGT7*laci* die T7RP unter den gegebenen Induktionsbedingungen herstellen können. Dazu wurden die Stämme *B. glumae* PGT7*Plip* und PGT7*laci* unter Standardbedingungen (2.4.2) in 20 ml LB-Medium bis zu einer O.D._{580nm} = 0,6 kultiviert und dann die Synthese der T7RP durch Zugabe des jeweiligen Induktors induziert. Bei *B. glumae* PGT7*Placi* war dies 0,4 mM IPTG, bei *B. glumae* PGT7*Plip* 1 % (v/v) Olivenöl (Endkonzentration). Nach weiteren 12 h Kultivierung wurden Proben entnommen und das Vorhandensein der T7RP mittels Western Blot und einem spezifischen Antikörper gegen die T7RP überprüft (2.6.5 und 2.6.6). Zudem wurden Proben aus identisch behandelten Kulturen entnommen, denen jedoch kein Induktor zugegeben wurde. Nur in Proben mit Induktor konnten spezifische Signale der T7RP gefunden werden (99 kDa, Abbildung 3.6 B). Somit produzieren beide Stämme ohne Zugabe des Induktors keine nachweisbare Menge dieser Polymerase. Dies ist besonders dann wichtig,

wenn die Expression der Polymerase und – daran gekoppelt – des heterologen Zielgens erst zu einem gewissen Zeitpunkt induziert werden soll. Die Synthese der T7RP kann also je nach Expressionsstamm durch IPTG bzw. Olivenöl induziert werden. Dabei wurde in *B. glumae* PGT7Plip eine größere Menge T7RP gebildet als in *B. glumae* PGT7Placl.

In einem nächsten Schritt wurde anhand des Modellproteins GFP untersucht, ob und in welchen Mengen ein heterologes Protein in beiden Expressionsstämmen hergestellt werden kann. Bei dem Protein handelt es sich um die optimierte Variante GFPmut3 des ursprünglichen GFPs (Cormack *et al.*, 1996).

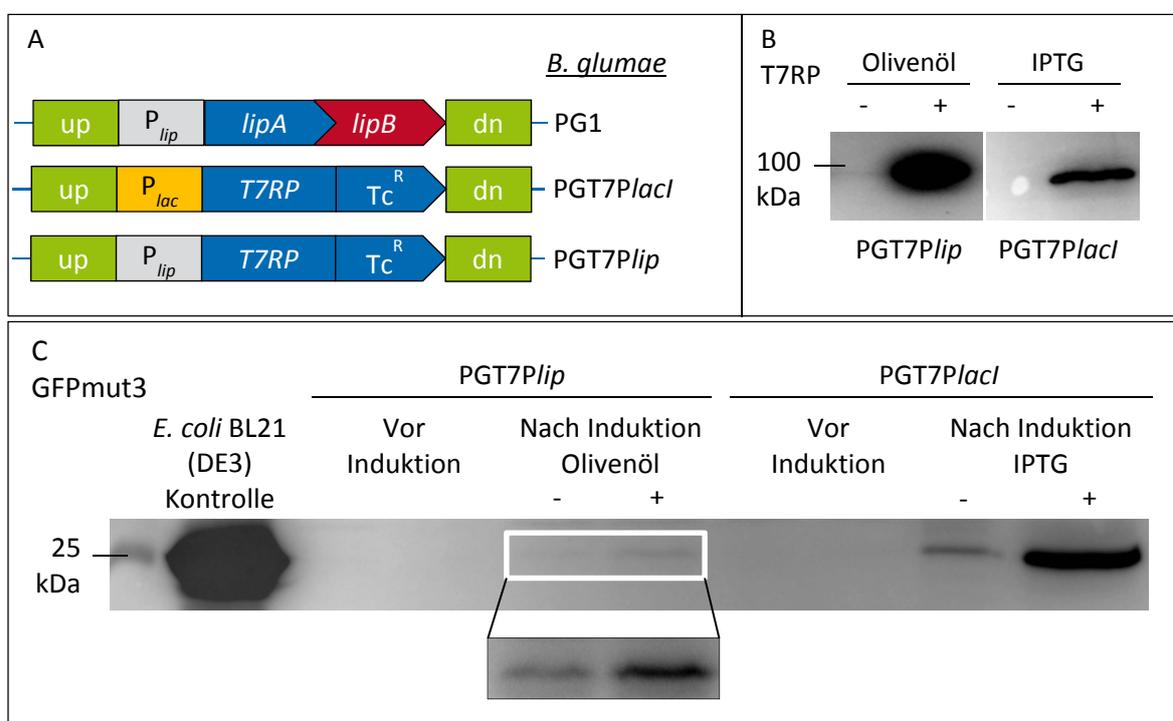


Abbildung 3.6 Verwendung von *B. glumae* PG1 als T7-Expressionssystem.

A: Schema des Genotyps der verschiedenen Derivate von *B. glumae* PG1. Dargestellt sind die homologen Bereiche stromauf- und stromabwärts von *lipAB* („up“ und „dn“), über die das *lipAB*-Operon mittels Rekombination gegen das T7-RNA-Polymerase-Gen (*T7RP*) und eine Tetracyclin-Resistenzkassette (Tc^R) unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (P_{lac}) bzw. des *lipAB*-Promotors (P_{lip}) ausgetauscht wurde. **B:** Nachweis der T7-RNA-Polymerase (T7RP, 99kDa) in beiden Stämmen mittels Western Blot und einem für die T7RP spezifischen Antikörper. Dargestellt sind Proteinproben von *B. glumae* PGT7Placl bzw. PGT7Plip 12 h nach Induktion (+) durch 0,4 mM IPTG (IPTG) bzw. 1 % (v/v) Olivenöl (Olivenöl) Endkonzentration. Als Kontrolle dienten Proben aus identisch behandelten Kulturen, denen kein Induktor zugegeben wurde (-). Aufgetragen ist die Proteinmenge aus Ganzzellextrakten entsprechend einer Zelldichte von $O.D._{580nm} = 5$. **C:** Der immunologische Nachweis von GFPmut3 (26 kDa) in *B. glumae* PGT7Placl, PGT7Plip sowie *E. coli* BL21(DE) mit pBR-*gfpmut3* erfolgte mit einem spezifischen Antikörper. Proben „Vor Induktion“ und „Nach Induktion -“ wurden nicht mit Induktor behandelt, Proben „Nach Induktion +“ mit 1 % (v/v) Olivenöl bzw. 0,4 mM IPTG (Endkonzentration). Die Probe von *E. coli* BL21(DE3) diente hier als Kontrolle, daher wurde nur die Probe 12 h nach Induktion mit 0,4 mM IPTG abgebildet. Aufgetragen sind Ganzzellextrakte mit Proteinmengen entsprechend einer Zelldichte von $O.D._{580nm} = 5$. Der weiß umrandete Ausschnitt wurde mit erhöhtem Kontrast ein zweites Mal direkt unterhalb der entsprechenden Spuren abgebildet. Eine inhaltlich ähnliche Abbildung wurde bereits in einer assoziierten Masterarbeit dargestellt (Hahn, 2012).

Dazu wurde das Gen *gfpmut3* über den Vektor pBR-*gfpmut3* in beide Stämme mittels biparentaler Konjugation eingebracht (2.4.7). Diese Stämme wurden anschließend unter Standardbedingungen (2.4.2) in je 20 ml LB-Medium kultiviert und wie oben beschrieben induziert. Anschließend wurde das intrazellulär gebildete GFPmut3 immunologisch nachgewiesen (2.6.5 und 2.6.6). Identisch behandelte Kulturen wurden parallel ohne Zugabe des Induktors als Kontrolle kultiviert und analysiert. Ebenfalls wurden Proben direkt vor Induktion entnommen. Um die Effizienz beider Expressionssysteme mit einem etablierten System vergleichen zu können, wurde das Plasmid pBR-*gfpmut3* ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht (2.4.5) und unter vergleichbaren Bedingungen exprimiert (37 °C für *E. coli* statt 30 °C).

In *B. glumae* PGT7*PlacI*-Kulturen, denen IPTG als Induktor beigefügt wurde, war eine deutlich detektierbare Menge des 26 kDa schweren GFPmut3 vorhanden (Abbildung 3.6 C). Allerdings wiesen auch Kulturen ohne Induktor (eine kleinere Menge) GFPmut3 auf. Diese Basalexpression deutet darauf hin, dass selbst nicht nachweisbare Mengen der T7RP (vgl. Abbildung 3.6 B) ausreichen, um eine detektierbare Menge des Zielproteins GFPmut3 zu erzeugen. *B. glumae* PGT7*Plip* produziert hingegen eine vergleichsweise geringe Menge GFP. Die Expression des *gfpmut3* in *E. coli* BL21(DE3) führt zu einer deutlich größeren Menge GFPmut3 als in *B. glumae* PGT7*PlacI*.

Die Verwendung eines durch Olivenöl kontrolliert induzierbaren Lipasepromotors zur gezielten Expression von heterologen Genen in *B. glumae* PGT7*Plip* mittels der T7-RNA-Polymerase ist prinzipiell möglich. Die gebildete Menge Zielprotein ist im Vergleich zu den durch IPTG induzierten Varianten von *E. coli* BL21(DE3) und *B. glumae* PGT7*PlacI* aber geringer.

3.2.2 Etablierung des Expressionsplasmids pBlip

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression eines T7RP-Gens auf dem Genom von *B. glumae* PG1 unter Kontrolle des Lipasepromotors durch Olivenöl induziert werden kann. Diese Art der Induktion hat den Vorteil, dass die Expression heterologer Zielgene erst zu dem Zeitpunkt beginnt, zu dem auch die Synthese der Lipase im Wildtypen beginnen würde. Somit sollte ein funktionierender Synthese- und Sekretionsapparat gewährleistet sein.

Daher wurde das Plasmid pBlip konstruiert, welches ebenfalls über diesen Lipasepromotor verfügt (schematisch in Abbildung 3.7 A dargestellt). Zusätzlich bietet das Plasmid die Möglichkeit, einen C-terminalen Histidin-tag an das resultierende Protein zu fusionieren. Das Plasmid-Rückgrat basiert auf dem des Vektors pBBR1-MCS (Kovach *et al.*, 1994). Die genaue Sequenz des modifizierten Bereichs ist in Abbildung 8.1 (Anhang) dargestellt.

Als Modellprotein zur Überprüfung der Funktionalität des Plasmids diente erneut GFPmut3. Die Kultivierung von *B. glumae* PG1 Δ lipAB mit pBlip-gfpmut3 bzw. einer Leervektorkontrolle erfolgte unter Standardbedingungen (2.4.2) in 20 ml MME. Da sowohl Glukose als auch Saccharose die Lipaseproduktion in *B. glumae* PG1 unterdrücken (Boekema *et al.*, 2007), wurde dem Medium entweder 0,5 % (w/v) Glukose oder Saccharose beigefügt. Nach Erreichen einer definierten Zelldichte (O.D._{580nm} = 0,6) folgte die Induktion mit 1 % (v/v) Olivenöl. Proben für den immunologischen Nachweis von GFPmut3 (2.6.5 und 2.6.6) wurden direkt vor sowie 16 h nach Induktion entnommen (siehe Abbildung 3.7 B).

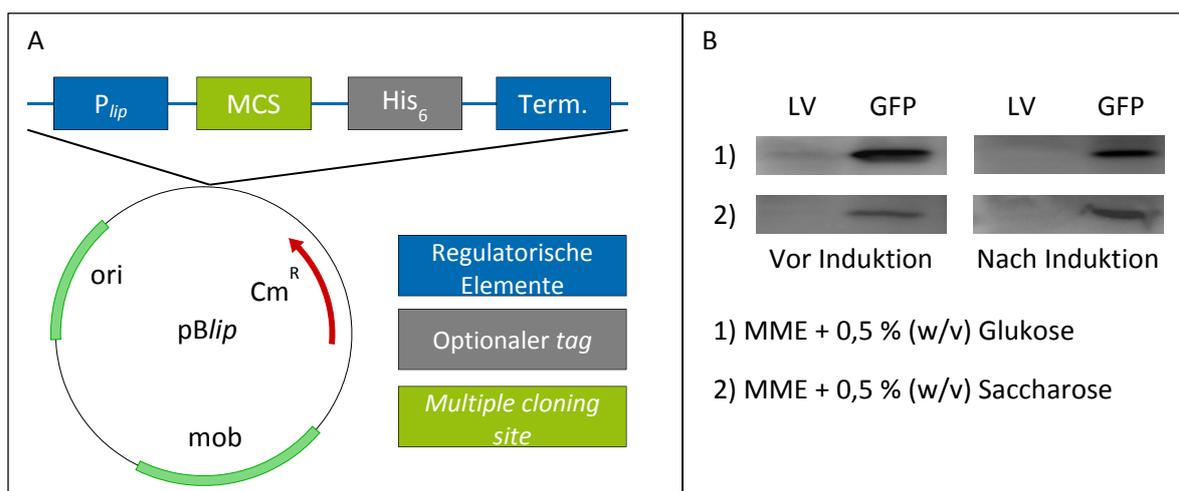


Abbildung 3.7 Das plasmidbasierte Expressionssystem pBlip für *B. glumae* PG1.

A: Schematische Darstellung des Plasmids pBlip mit *origin of replication* (*ori*), *mob*-Kassette für die Transfektion mittels Konjugation (*mob*), Chloramphenicolresistenz-Gen (*Cm^R*), *multiple cloning site* (*MCS*), Lipasepromotor aus *B. glumae* PG1 (*P_{lip}*), einem optionalen C-terminalen Histidin-tag (*His₆*) und dem Transkriptionsterminator (*Term.*) **B:** Immunologischer Nachweis von GFPmut3 mittels Western Blot in *B. glumae* PG1 Δ lipAB mit pBlip-gfpmut3. Aufgetragen sind Proteinmengen des Ganzzellextrakts entsprechend einer Zelldichte von O.D._{580nm} = 5 aus Kulturen mit Leervektor (LV) bzw. pBlip-gfpmut3 (GFP) vor und 16 h nach Induktion. Die Kultivierung erfolgte in MME mit entweder 0,5 % (w/v) Glukose oder Saccharose.

In beiden Medien konnte bereits vor der Induktion GFPmut3 nachgewiesen werden. Also können weder Glukose noch Saccharose eine Basalexpression des *gfpmut3* vor Zugabe des Induktors verhindern.

Nach Induktion der Kulturen wurde in MME mit Glukose keine Steigerung der GFPmut3-Menge beobachtet. Saccharose hingegen hemmt im Vergleich zu Glukose die Produktion von GFPmut3 effektiver, aber ebenfalls nicht vollständig. Zudem ist nach der Induktion durch Olivenöl ein etwas stärkeres GFPmut3-Signal detektierbar.

Das Expressionsplasmid *pBlip* ermöglicht die Synthese von heterologen Zielproteinen in *B. glumae* PG1. Trotz Saccharose als Repressor kann eine Basalexpression jedoch nicht vollständig verhindert werden.

3.3 Einfluss eines LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators auf das *lipAB*-Operon

Bisher beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit den zellulären Prozessen bei der Induktion der Lipaseproduktion in *B. glumae* PG1. Dabei haben verschiedene Kohlenstoffquellen einen regulatorischen Effekt. Die zugrunde liegenden molekularen Regulationsmechanismen sind jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt. So sind für *B. glumae* PG1 in der Literatur keine Transkriptionsregulatoren bekannt, die einen induzierenden bzw. reprimierenden Effekt auf das *lipAB*-Operon ausüben. Ein solcher Regulator sollte in dieser Arbeit durch DNA-Protein-Interaktionsstudien identifiziert werden.

3.3.1 Der Transkriptionsregulator BGL_1c34440 interagiert mit dem *lipAB*-Promotor

Stromaufwärts des *lipA*-Startcodons befindet sich ein ca. 150 bp langer Promotorbereich, von dem aus die Transkription des *lipAB*-Operons beginnt (Beselin, 2005). Dieser Promotor wurde in DNA-Protein-Interaktionsstudien analysiert (2.6.4). Dazu wurde ein DNA-Fragment „*Plip*“, welches den Promotor beinhaltet, mittels PCR (2.5.1) und dem Primerpaar „*Amp1 up/dn*“ (Tabelle 2.3) amplifiziert. Ein Kontrollfragment „*K*“, in dem mittels „*NNPP v2.2*“ (Reese, 2001) keine prokaryotischen Promotoren vorhergesagt wurden, wurde mit dem Primerpaar „*AmpK up/dn*“ amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden mit Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1 inkubiert. Dieses Ganzzellextrakt wurde aus Kulturen gewonnen (2.4.4), welche unter Standardbedingungen für 14 h in 20 ml MME mit entweder 1 % (v/v) Olivenöl oder 0,35 % (w/v) Succinat kultiviert wurden (2.4.2). Es folgten mehrere Waschschr

bindende Proteine entfernt wurden. Anschließend wurden die mit dem DNA-Fragment interagierenden Proteine eluiert. Solche Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.6.5). Proteinbanden, die ausschließlich in den Elutionsfraktionen von „*Plip*“, nicht aber in denen des Kontrollversuches vorhanden waren, wurden mittels MALDI-TOF-MS (2.6.12) identifiziert. In Ganzzellextrakten von *B. glumae* PG1 unter Lipase-induzierenden Bedingungen in MME mit Olivenöl konnten keine mit dem *lipAB*-Promotor interagierenden Proteine identifiziert werden (ohne Abbildung). Unter Lipase-reprimierenden Bedingungen hingegen wurde ein etwa 36 kDa schweres Protein als spezifischer Interaktionspartner des Lipasepromotors identifiziert (Abbildung 3.8). Dieses ausschließlich in der ersten Elution von „*Plip*“ vorhandene Protein wurde als LysR-ähnlicher Transkriptionsregulator (BGL_1c34440) identifiziert.

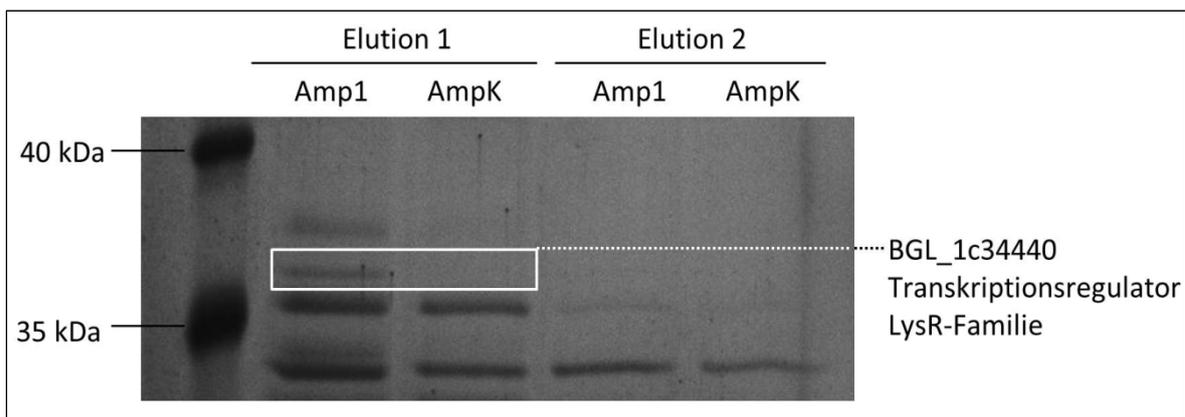


Abbildung 3.8 Identifizierung eines LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators für das *lipAB*-Operon mittels DNA-Protein-Interaktionsstudien.

Für diese Studien wurde Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1, kultiviert unter Lipase-reprimierenden Bedingungen, mit einem kurzen DNA-Fragment (*Plip*) inkubiert, welches dem Promotor des *lipAB*-Operons entspricht. In parallelen Ansätzen wurde ein DNA-Fragment (K) benutzt, welches nicht über einen vorhergesagten Promotor verfügt. Nach Auftragung der eluierten Proteingemische auf einem SDS-Gel wurden solche Proteine mittels MALDI-TOF-MS identifiziert, die ausschließlich mit dem Promotorbereich auf „*Plip*“, nicht aber mit dem Kontroll-Fragment interagierten. BGL_1c34440 wurde hierbei in zwei unabhängigen Experimenten als möglicher Interaktionspartner des Lipasepromotors identifiziert.

Da dieser Regulator in Ganzzellextrakten von *B. glumae* PG1 nachgewiesen wurde, welche unter Lipase-reprimierenden Bedingungen kultiviert wurden, hat er vermutlich einen reprimierenden Einfluss auf die Expression des *lipAB*-Operons. Ein weiteres Protein mit ca. 38 kDa konnte mittels MALDI-TOF-MS nicht eindeutig identifiziert werden.

Der LysR-ähnliche Transkriptionsregulator BL_1c34440 wurde als Interaktionspartner und möglicher Repressor des *lipAB*-Operons identifiziert.

3.3.2 Eine Regulation des *lipAB*-Operons durch BGL_1c34440 ist nicht eindeutig

Um den Einfluss des LysR-ähnlichen Regulators BGL_1c34440 auf die Lipaseproduktion zu überprüfen, wurde das entsprechende Gen unter Kontrolle des *lac*-Promotors auf dem Plasmid pBBR1-*lysR* in *B. glumae* PG1 eingebracht (2.4.7). Als Kontrolle dienten identisch behandelte Kulturen mit dem Leervektor pBBR1-MCS. Die Kulturen wurden unter Standardbedingungen in LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl für 14 Stunden kultiviert (2.4.2). Anschließend wurde die Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand gemessen (2.4.4, 2.6.7). Außerdem wurden in beiden Stämmen die Transkriptmengen von *lipA* und BGL_1c34440 (*lysR*) mittels *real-time* qPCR relativ quantifiziert (2.5.11 bis 2.5.15).

Unter den gewählten Versuchsbedingungen zeigte sich eine geringe Reduktion der Lipaseaktivität von *B. glumae* PG1 mit pBBR1-*lysR* im Vergleich zur Leervektorkontrolle von $0,122 \pm 0,003$ zu $0,105 \pm 0,007$ U/ml*O.D._{580nm} (Abbildung 3.9 A). Die Transkriptmenge von BGL_1c34440 war in *B. glumae* PG1 mit pBBR1-*lysR* im Vergleich zur Leervektorkontrolle zwar etwa achtfach erhöht, dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von *lipA* (Abbildung 3.9 B).

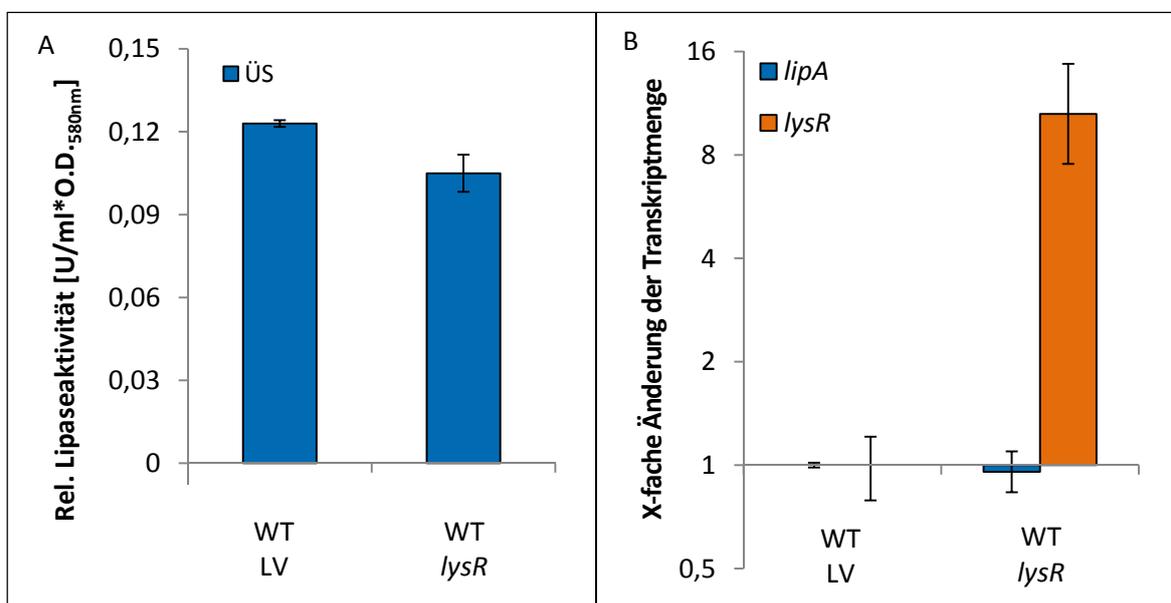


Abbildung 3.9 Einfluss des LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators BGL_1c34440 auf die Lipaseproduktion von *B. glumae* PG1.

A: Relative Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand (ÜS) von *B. glumae* PG1 (WT) mit pBBR1-MCS (LV) bzw. pBBR1-*lysR* (*lysR*) nach 14 h Kultivierung unter Standardbedingungen in LB mit 1 % (v/v) Olivenöl. **B:** Änderung der Transkriptmenge von *lipA* und BGL_1c34440 (*lysR*) in *B. glumae* PG1 (WT) mit pBBR1-*lysR* (*lysR*) im Vergleich zu *B. glumae* PG1 mit pBBR1-MCS (LV). Abgebildet sind jeweils Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Experimente wurden in einer Bachelorarbeit durchgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreut wurde (Bollinger, 2012).

Somit konnte der LysR-ähnliche Transkriptionsregulator BGL_1c34440, welcher mit dem Lipasepromotor interagiert, unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht in einen direkten regulatorischen Zusammenhang mit der Transkriptmenge von *lipA* gebracht werden.

Die plasmidbasierte Expression von BGL_1c34440 führt zu einer geringfügigen Senkung der Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand, kann den vorhergesagten reprimierenden Einfluss auf die *lipA*-Transkription aber nicht eindeutig bestätigen.

3.4 Identifizierung weiterer Proteine mit Einfluss auf die Lipaseproduktion

3.4.1 Erstellung einer Tn5-Insertionsbibliothek von *B. glumae* PG1

Zur Generierung einer Insertionsbibliothek mit einer Vielzahl von Einzelklonen, in denen jeweils ein Gen ausgeschaltet ist, kann ein Tn5-Transposon verwendet werden. Dieses mobile DNA-Fragment integriert unspezifisch in das Genom des Wirts. Dazu wird neben dem Transposon auch eine Transposase benötigt, deren Gen ebenfalls auf dem DNA-Fragment kodiert ist und die für den Einbau des Transposons in die Wirts-DNA verantwortlich ist (Goryshin & Reznikoff, 1998).

Die Erzeugung dieser Insertionsbibliothek von *B. glumae* PG1 erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen System wie in Abschnitt 2.4.8 beschrieben. Es wurden insgesamt ca. 30.000 Einzelklone generiert. Damit beinhaltet die Transposonbank mit einer Wahrscheinlichkeit von über 99 % mindestens eine Insertionsmutante zu jedem Gen im Genom von *B. glumae* PG1 (Abbildung 3.10).

P	N
10,0 %	685
50,0 %	4505
90,0 %	14966
99,0 %	29932
99,9 %	44897

Abbildung 3.10 Berechnung der benötigten Klonzahl einer *B. glumae* PG1-Transposonbank.

Die Anzahl der Gene im Genom beträgt ca. 6500 (N). Über die zweite Variable „P“ wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit der nach Generierung von N Klonen die Transposonbank mindestens eine Insertionsmutante zu jedem Gen enthält.

Die hier erzeugte Tn5-Insertionsbibliothek deckt mit einer Wahrscheinlichkeit von über 99 % das gesamte Genom von *B. glumae* PG1 ab.

3.4.2 Identifizierung von Insertionsmutanten mit erhöhter Lipaseproduktion

Die Tn5-Insertionsbibliothek von *B. glumae* PG1 wurde auf solche Insertionsmutanten hin durchmustert, die eine gesteigerte Lipaseproduktion oder -sekretion aufweisen. Dazu wurden die Mischkulturen (2.4.8, 3.4.1) auf Lipase-Indikatorplatten in geeigneten Verdünnungen ausplattiert und für 48 h inkubiert (2.4.1, 2.4.2). Das in den Indikatorplatten enthaltene Tributyrin wird durch Lipasen hydrolysiert, sodass klare Höfe um die entsprechenden Kolonien entstehen. Als Kontrolle diente der Wildtyp *B. glumae* PG1, der parallel zu den Insertionsmutanten identisch, jedoch ohne Antibiotikum, behandelt wurde. Einzelkolonien mit größerer Hofbildung sind beispielhaft in Abbildung 3.11 A dargestellt. Diese wurden zusammen mit dem Wildtypen zum direkten Vergleich auf neue Indikatorplatten ohne Antibiotikum überführt. Jede Kolonie wurde in doppelter Ausführung inokuliert. Abbildung 3.11 B zeigt exemplarisch eine solche Platte mit zwei Insertionsmutanten und dem Wildtypen nach weiteren 24 h Inkubation. Auf diese Weise wurden 59 Klone identifiziert, die, ausgehend von der Größe der gebildeten Höfe auf den Indikatorplatten, mehr Lipase produzierten als der Wildtyp. Anschließend wurden mittels inverser PCR (2.4.9) diejenigen Gene identifiziert, in welche die Insertion des Transposons stattfand. In verschiedenen Klonen wurde das gleiche Gen durch die Tn5-Integration inaktiviert. Daher konnten insgesamt 18 unterschiedliche Gene identifiziert werden, deren Inaktivierung einen induzierenden Einfluss auf die lipolytische Aktivität von *B. glumae* PG1 hat (Tabelle 8.2 im Anhang).

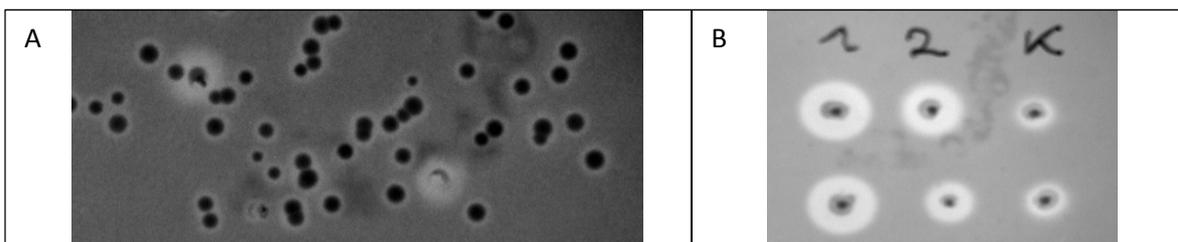


Abbildung 3.11 Lipolytische Aktivität von Tn5-Insertionsmutanten.

A: Exemplarische Darstellung eines Ausschnitts einer Lipase-Indikatorplatte mit Tn5-Insertionsmutanten von *B. glumae* PG1 nach 48 h Inkubation. Der klare Hof um eine Kolonie deutet auf das Vorhandensein aktiver Lipase hin. **B:** Kolonien, welche einen größeren Hof aufwiesen als ein parallel behandelter Wildtyp *B. glumae* PG1 (K) wurden mittels eines Zahnstochers erneut auf Lipase-Indikatorplatten überführt und für 24 h inkubiert, um die erhöhte lipolytische Aktivität zu bestätigen.

Beim Durchmustern einer Tn5-Insertionsbibliothek von *B. glumae* PG1 wurden insgesamt 18 Gene identifiziert, deren Transposon-vermittelte Inaktivierung zu einer erhöhten lipolytischen Aktivität führt.

3.4.3 Charakterisierung von Tn5-Insertionsmutanten mit erhöhter lipolytischer Aktivität

Zur Überprüfung, ob die erhöhte lipolytische Aktivität auf eine gesteigerte Lipaseproduktion zurückzuführen ist, wurden exemplarisch drei Klone mit erhöhter Aktivität näher untersucht. Dabei handelte es sich um *B. glumae* PG1 Δ BGL_2c04170, PG1 Δ BGL_2c07240 und PG1 Δ BGL_1c34940. In ersterem ist das Gen für eine nichtspezifische Serin/Threonin-Kinase inaktiviert. Der zweite Stamm weist ein inaktiviertes Gen für ein ATP-bindendes Protein auf. Im dritten Stamm ist das Gen einer Muramidase inaktiviert.

Diese Stämme wurden unter Standardbedingungen in 20 ml LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl für 14 h kultiviert (2.4.2). Anschließend wurde die Lipaseaktivität im Ganzzellextrakt und im kulturfreien Überstand bestimmt (2.4.4, 2.6.7). Als Referenz wurde *B. glumae* PG1 parallel kultiviert und analysiert.

Alle drei Mutanten wiesen im Vergleich zum Wildtypen eine etwa 20fach höhere lipolytische Aktivität im Ganzzellextrakt auf (Abbildung 3.12). Im zellfreien Kulturüberstand war ebenfalls eine 1,3- bis 2,6fach gesteigerte Aktivität feststellbar.

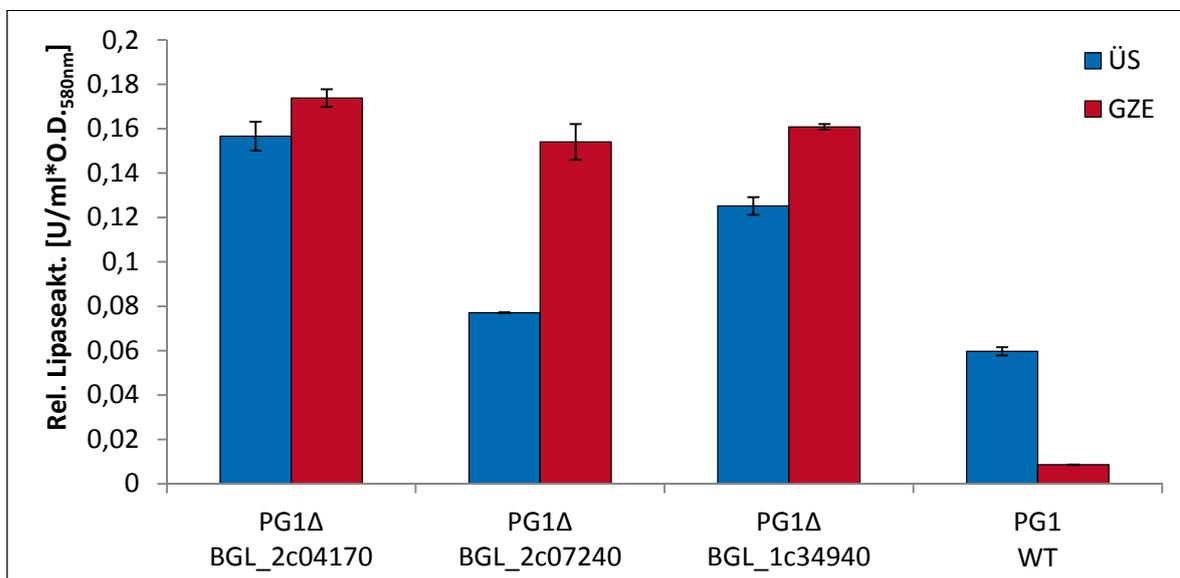


Abbildung 3.12 Relative Lipaseaktivität in Tn5-Insertionsmutanten von *B. glumae* PG1.

Aufgetragen sind die relativen Lipaseaktivitäten im zellfreien Kulturüberstand (ÜS) und im Ganzzellextrakt (GZE) nach 14 h Kultivierung unter Standardbedingungen in LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl von *B. glumae* PG1 (PG1 WT) sowie drei Tn5-Insertionsmutanten *B. glumae* PG1 Δ BGL_2c04170, PG1 Δ BGL_2c07240 und PG1 Δ BGL_1c34940 (siehe Fließtext). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die sowohl intra- als auch extrazellulär gesteigerte lipolytische Aktivität der Insertionsmutanten auf eine erhöhte Transkription des

Lipasegens zurückzuführen ist. Dazu wurden die Transkriptmengen der Lipase (*lipA*) und Foldase (*lipB*) in den oben beschriebenen Kulturen mittels *real-time* qPCR relativ quantifiziert (2.5.11 bis 2.5.15). Außerdem wurden die Transkriptmengen von drei für die Typ II-Sekretion essenziellen Genen *gspD*, *gspE* und *gspF* quantifiziert.

Alle drei Insertionsmutanten wiesen eine vier- bis achtfach erhöhte *lipA*-Transkriptmenge auf (Abbildung 3.13). Das im gleichen Operon kodierte *lipB*-Gen hingegen zeigte eine andere Tendenz. In *B. glumae* PG1ΔBGL_2c04170 und PG1ΔBGL_2c07240 war die *lipB*-Transkriptmenge vier- bzw. achtfach reduziert, in PG1ΔBGL_1c34940 war die *lipB*-Menge nahezu unverändert. Für die Gene *gspD*, *gspE* und *gspF* des Typ II-Sekretionsapparates wurde nur im Stamm *B. glumae* PG1ΔBGL_2c04170 eine zwei- bis vierfach erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zur Referenz gemessen. In den anderen Stämmen war bei keinem der *gsp*-Gene eine Änderung festzustellen.

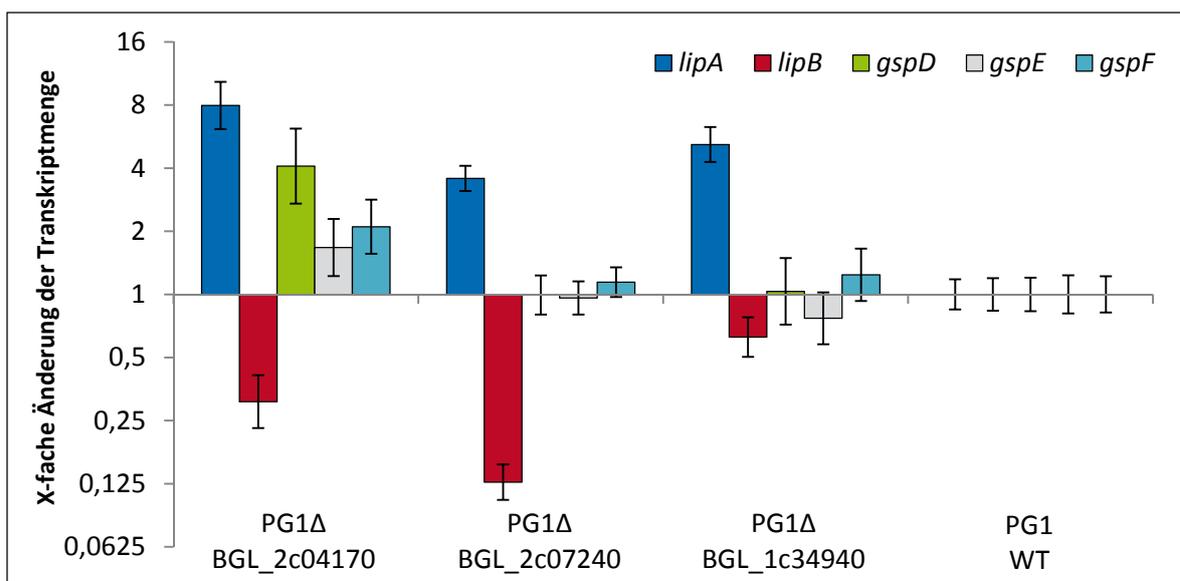


Abbildung 3.13 Relative Änderung der Transkriptmengen in Tn5-Insertionsmutanten.

Dargestellt sind die gemittelten x-fachen Änderungen der Transkriptmenge für die Gene *lipA*, *lipB*, *gspD*, *gspE* und *gspF* in den drei Tn5-Insertionsmutanten *B. glumae* PG1ΔBGL_2c04170, PG1ΔBGL_2c07240 und PG1ΔBGL_1c34940 (siehe Fließtext) im Vergleich zur Referenz *B. glumae* PG1 (PG1 WT) nach 14 h Kultivierung unter Standardbedingungen in LB mit 1 % (v/v) Olivenöl. Die Standardabweichung stellt die Messungenauigkeit aus drei methodischen Replikaten dar.

Die untersuchten Tn5-Insertionsmutanten von *B. glumae* PG1 wiesen eine gesteigerte *lipA*-Transkriptmenge und eine erhöhte lipolytische Aktivität auf. Die Transkriptmenge von *lipB* hingegen war nicht verändert. Ein Klon wies zudem eine erhöhte Transkriptmenge von Genen für den Typ II-Sekretionsapparat auf.

3.5 Das Expressionslevel von *gspD* hat einen Einfluss auf die Transkription von *lipAB*

In einer Tn5-Insertionsmutante mit verstärkter Lipaseproduktion wurde eine erhöhte *gspD*-Transkriptmenge festgestellt. Daher wurde der Zusammenhang zwischen dem Typ II-Sekretionsapparat und der Lipaseregulation nun näher untersucht. Dazu wurde eine *gspD*-defiziente Mutante *B. glumae* PG1 Δ *gspD* verwendet, in der das Gen *gspD* durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht ist. Diese Kassette liegt im Genom in der gleichen Orientierung vor wie auch *gspD*. Dadurch werden die stromabwärts im Operon lokalisierten Gene *gspE* und *gspF* weiterhin transkribiert (Knorr, 2010). Zur Analyse des Einflusses des *gspD*-Transkriptlevels auf die Lipaseproduktion wurde diese Sekretionsmutante mit *B. glumae* PG1 verglichen. In beiden Stämmen wurde *gspD* plasmidkodiert exprimiert (pBBR1-*gspD*) bzw. eine Leervektorkontrolle verwendet. Entsprechende Kulturen wurden unter Standardbedingungen in 20 ml LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl für 14 h kultiviert (2.4.2). Auf die Anwendung von Kanamycin wurde im Fall von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* verzichtet, um die Vergleichbarkeit mit dem Wildtypen zu gewährleisten. Im Anschluss an die Kultivierung wurde die Lipaseaktivität in Proben der zellfreien Kulturüberstände und der Ganzzellextrakte gemessen (2.4.4, 2.6.7). Abbildung 3.14 zeigt die relative Lipaseaktivität in den verschiedenen Kulturen.

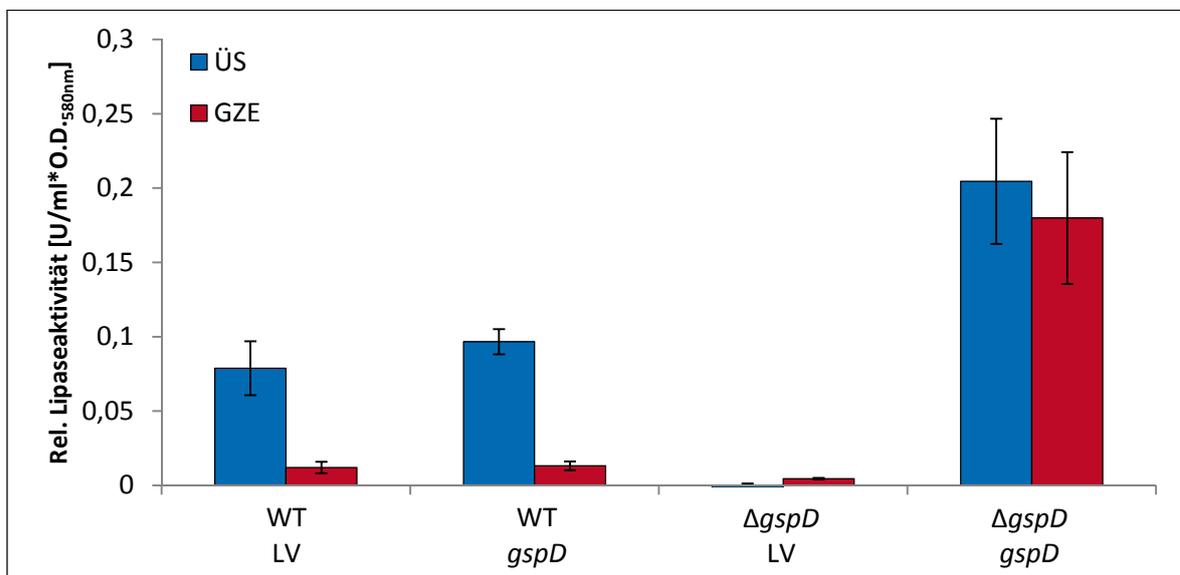


Abbildung 3.14 Relative Lipaseaktivitäten von *B. glumae* PG1 und *B. glumae* PG1 Δ *gspD*.

Dargestellt sind die Aktivitäten im zellfreien Kulturüberstand (ÜS) und im Ganzzellextrakt (GZE) von *B. glumae* PG1 (WT) und *B. glumae* PG1 Δ *gspD* (Δ *gspD*) mit pBBR1-MCS (LV) bzw. pBBR1-*gspD* (*gspD*) nach 14 h Kultivierung unter Standardbedingungen in LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl. Abgebildet sind die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Im Wildtypen führte die plasmidbasierte Expression von *gspD* zu keiner Änderung der Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand (LV: $0,08 \pm 0,02$, *gspD*: $0,10 \pm 0,01$ U/ml*O.D._{580nm}). Die Deletion von *gspD* hingegen führte zu einem Verlust der messbaren Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand und im Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* mit Leervektor. In *B. glumae* PG1 Δ *gspD* mit pBBR1-*gspD* verdoppelte sich die Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand auf etwa $0,2$ U/ml*O.D._{580nm} im Vergleich zum Wildtypen. Die Lipaseaktivität im Ganzzellextrakt dieses Stamms stieg um mehr als das 10fache auf etwa $0,18$ U/ml*O.D._{580nm} an. Es wäre zu erwarten gewesen, dass das Fehlen der Sekretionspore GspD bei gleichbleibender Lipaseproduktion zu einem Anstieg intrazellulärer Lipaseaktivität führt, da die Lipase in diesem Fall nicht mehr über die äußere Membran transportiert werden kann. Allerdings war im Ganzzellextrakt der Sekretionsmutante *B. glumae* PG1 Δ *gspD* keine Lipaseaktivität messbar. Eine mögliche Erklärung dafür ist ein regulatorischer Einfluss des defekten Sekretionswegs auf die Produktion der Lipase. Zur Untersuchung eines solchen regulatorischen Zusammenhangs wurden die Transkriptmengen von *lipA*, *lipB*, *gspD*, *gspE* und *gspF* mittels *real-time* qPCR relativ quantifiziert (2.5.11 bis 2.5.15).

Die plasmidbasierte Expression von *gspD* in *B. glumae* PG1 führte zu einer etwa achtfach höheren *gspD*-Transkriptmenge als in der Referenz *B. glumae* PG1 mit Leervektor, hatte aber nahezu keinen Einfluss auf die Transkriptmengen von *lipA* bzw. *lipB* (Abbildung 3.15).

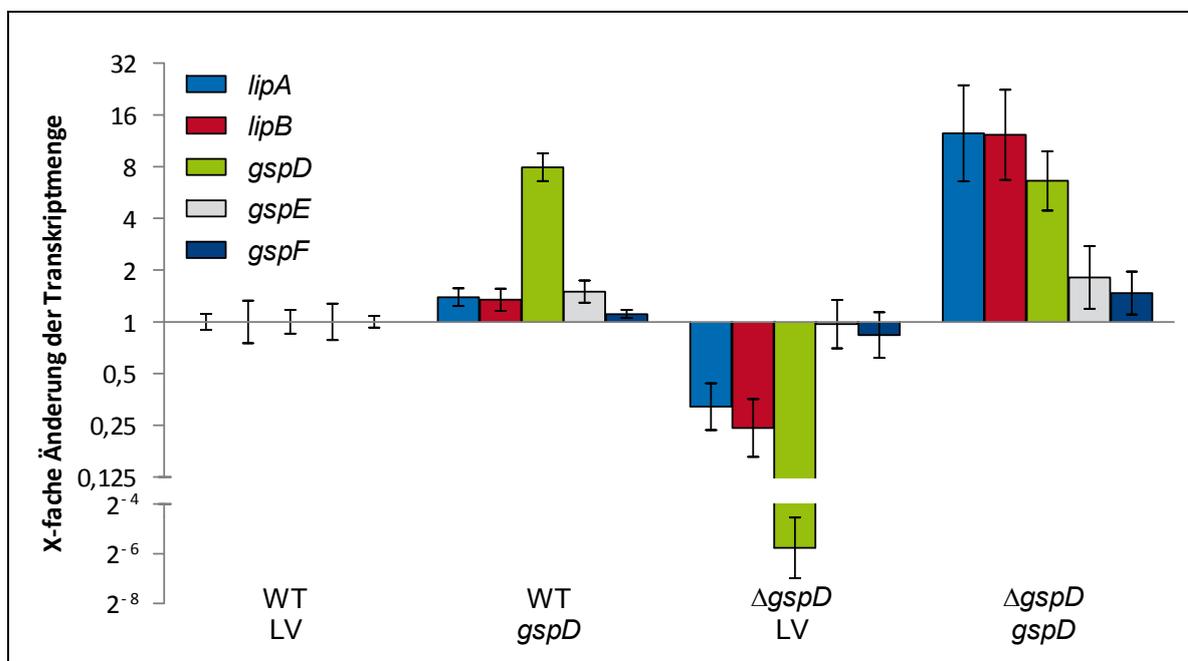


Abbildung 3.15 Relative Änderung der Transkriptmengen in *B. glumae* PG1 und *B. glumae* PG1 Δ *gspD*.

Dargestellt ist die x-fache Änderung der Transkriptmenge von *lipA*, *lipB*, *gspD*, *gspE* und *gspF* in *B. glumae* PG1 (WT) und in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* mit pBBR1MCS (LV) bzw. pBBR1-*gspD* (*gspD*) nach 14 h Kultivierung unter Standardbedingungen in LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl. Als Referenz dient *B. glumae* PG1 mit pBBR1-MCS (WT LV). Abgebildet sind die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

In der sekretionsdefizienten Mutante *B. glumae* PG1 Δ *gspD* mit Leervektor hingegen war die Transkriptmenge von *lipA* und *lipB* etwa vierfach geringer als in der Referenz. Durch die Komplementation dieser Mutante mit dem Plasmid pBBR1-*gspD* allerdings waren die Transkriptmengen von *lipA* und *lipB* etwa 12fach erhöht. Die Transkriptmengen von *gspE* und *gspF* entsprachen in der sekretionsdefizienten Mutante *B. glumae* PG1 Δ *gspD* unter Berücksichtigung der Standardabweichung dem wildtypischen Niveau.

Die Deletion von *gspD* in *B. glumae* PG1 reprimiert die Produktion der Lipase LipA. Dieser Effekt ist auf eine verminderte Transkription des *lipAB*-Operons zurückzuführen. Die plasmidbasierte Expression von *gspD* in einer solchen Mutante hingegen erhöht die Lipasemenge durch eine gesteigerte *lipAB*-Transkription.

3.6 Untersuchung zweier Punktmutationen im *lipAB*-Operon von *B. glumae* Lu8093

Der von der BASF SE verwendete Stamm *B. glumae* Lu8093 wurde durch klassische Stamm-Mutagenese ausgehend vom Wildtypen *B. glumae* PG1 hinsichtlich der Lipaseproduktion optimiert (Balkenhohl *et al.*, 1997, Boekema *et al.*, 2007). Er weist eine Reihe von Punktmutationen auf, von denen zwei Basenaustausche direkt mit dem *lipAB*-Operon assoziiert sind. Der erste Austausch befindet sich 129 bp stromaufwärts des *lipA*-Startcodons im Promotorbereich und wurde bereits in einer früheren Arbeit ersten Analysen unterzogen (Beselin, 2005). Die zweite Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin an Position 4 im Signalpeptid der Lipase.

Um die Effekte beider Mutationen zu untersuchen, wurden verschiedene Plasmide konstruiert, die alle möglichen Kombinationen beider Mutationen des *lipAB*-Operons beinhalten. Das Plasmid pBBR1-P_{WT}*lipAB* entspricht dem wildtypischen Operon aus *B. glumae* PG1 inklusive des wildtypischen Promotors. Das Plasmid pBBR1-P_{Lu}*lipAB* enthält das Operon mit der oben beschriebenen Punktmutation im *lipAB*-Promotor von *B. glumae* Lu8093. Die Variante des Operons, in dem ein Austausch im Signalpeptid von LipA vorliegt, wird als pBBR1-P_{WT}*lipA*_{Lu}*B* bezeichnet. Beide Mutationen zusammen finden sich im Plasmid pBBR1-P_{Lu}*lipA*_{Lu}*B*.

3.6.1 Beide Mutationen erhöhen die extrazelluläre Lipaseaktivität in *B. glumae* PG1

Die Operon-Varianten wurden im *lipAB*-defizienten Stamm *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* untersucht, um eine distinkte Analyse der beiden Mutationen unabhängig von den anderen Mutationen in *B. glumae* Lu8093 zu ermöglichen. Zusätzlich wurden *B. glumae* PG1, PG1 Δ *lipAB* und Lu8093 mit Leervektor unter gleichen Bedingungen untersucht. Alle Stämme mit den entsprechenden Plasmiden wurden unter Standardbedingungen in LB-Medium für 14 h kultiviert (2.4.2). Für *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den anderen Stämmen ohne die Gentamycin-Resistenz kein Gentamycin eingesetzt. Um mögliche induzierende Effekte der Mutationen auf die Bildung der Lipase genauer detektieren zu können, wurde auf eine zusätzliche Induktion der Lipaseproduktion durch Olivenöl verzichtet. Anschließend wurde die Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand und im Ganzzellextrakt (2.4.4, 2.6.7) bestimmt.

Der Lipaseproduktionsstamm *B. glumae* Lu8093 wies im Vergleich zum Wildtypen eine von 0,001 auf 0,369 U/ml*O.D._{580nm} gesteigerte Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand auf (Abbildung 3.16 A). Auch die Aktivität im Ganzzellextrakt war im Vergleich zu *B. glumae* PG1 mit 0,046 U/ml*O.D._{580nm} deutlich erhöht. Erwartungsgemäß wies *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* keine lipolytische Aktivität auf (ohne Abbildung).

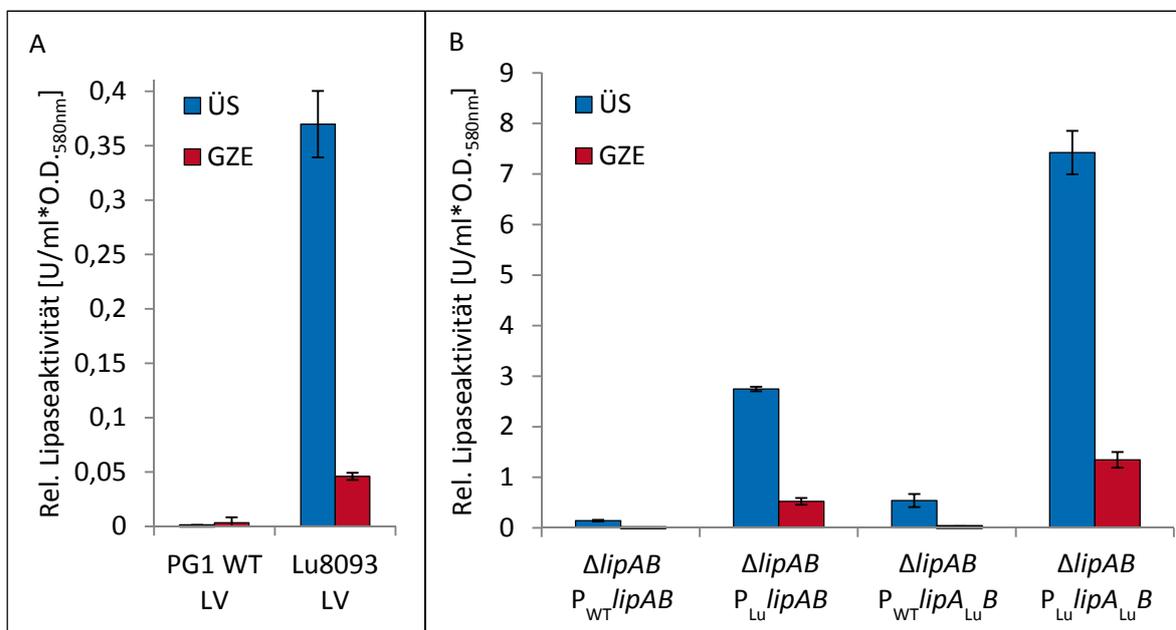


Abbildung 3.16 Relative Lipaseaktivitäten von *B. glumae* mit verschiedenen Lipasevarianten.

Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand (ÜS) und im Ganzzellextrakt (GZE) von **A:** *B. glumae* PG1 (PG1 WT) und *B. glumae* Lu8093 (Lu8093) mit pBBR1-MCS (LV) bzw. von **B:** *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* (Δ *lipAB*) mit den Plasmiden pBBR1-P_{WT}*lipAB* (P_{WT}*lipAB*), pBBR1-P_{Lu}*lipAB* (P_{Lu}*lipAB*), pBBR1-P_{WT}*lipA*_{Lu}*B* (P_{WT}*lipA*_{Lu}*B*) bzw. pBBR1-P_{Lu}*lipA*_{Lu}*B* (P_{Lu}*lipA*_{Lu}*B*) nach 14 h Kultivierung in LB-Medium. Diese tragen entweder das wildtypische *lipAB*-Operon, ein Operon mit jeweils einer der beiden Mutationen oder mit beiden Mutationen aus *B. glumae* Lu8093 (siehe Fließtext in Abschnitt 3.6). Aufgetragen sind Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Die Expression des wildtypischen *lipAB*-Operons in *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* mit pBBR1-P_{WT}*lipAB* führte zu einer Lipaseaktivität von 0,14 U/ml*O.D._{580nm} im zellfreien Kulturüberstand (Abbildung 3.16 B). Die Mutation im Lipasepromotor auf dem Plasmid pBBR1-P_{Lu}*lipAB* erhöhte mit 2,74 U/ml*O.D._{580nm} im Vergleich zur wildtypischen Variante die Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand um etwa den Faktor 20. Der Aminosäureaustausch im Signalpeptid der Lipase (pBBR1-P_{WT}*lipA*_{Lu}*B*) führte zu einer vierfachen Steigerung der Aktivität im Kulturüberstand. Die Kombination beider Mutationen auf dem Plasmid pBBR1-P_{Lu}*lipA*_{Lu}*B* steigerte die Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand sogar um den Faktor 50 auf 7,42 U/ml*O.D._{580nm}. Zudem erhöhte die Mutation im Promotor auf den Plasmiden pBBR1-P_{Lu}*lipA*_{WT}*B* und pBBR1-P_{Lu}*lipA*_{Lu}*B* die Lipaseaktivität im Ganzelleextrakt der entsprechenden Kulturen.

Lipasevarianten mit zwei Mutationen aus dem Produktionsstamm *B. glumae* Lu8093 erhöhen die Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand von *B. glumae* PG1.

3.6.2 Die gesteigerte Lipaseaktivität ist durch eine erhöhte Produktion und Sekretion der Lipase bedingt

Anschließend wurden die Lipase LipA im zellfreien Kulturüberstand und die Foldase LipB im Ganzelleextrakt der Kulturen aus Abschnitt 3.6.1 mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern für beide Proteine nachgewiesen (2.6.6). In Abbildung 3.17 wird deutlich, dass die gesteigerte lipolytische Aktivität auf eine erhöhte Proteinmenge zurückzuführen ist.

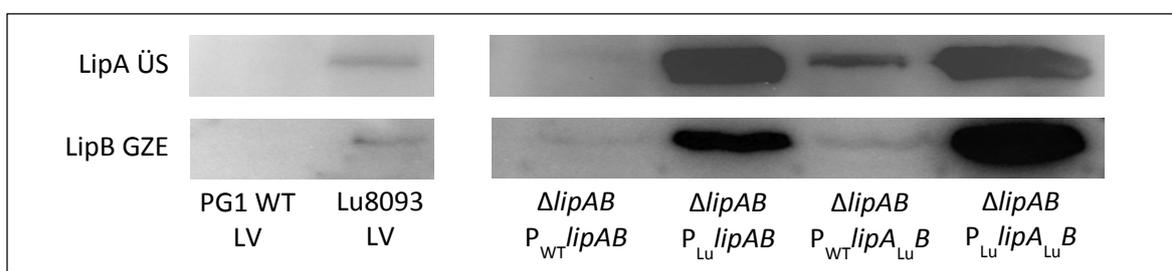


Abbildung 3.17 Nachweis der Lipase und Foldase in *B. glumae* mit verschiedenen *lipAB*-Varianten.

Immunologischer Nachweis mittels spezifischer Antikörper für die Lipase LipA im zellfreien Kulturüberstand (LipA ÜS) sowie die Foldase LipB im Ganzelleextrakt (LipB GZE) von *B. glumae* PG1 (PG1 WT), *B. glumae* Lu8093 (Lu8093) bzw. *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* (Δ *lipAB*) nach 14 h Kultivierung in LB-Medium mit verschiedenen Plasmiden: pBBR1-P_{WT}*lipAB* (P_{WT}*lipAB*), pBBR1-P_{Lu}*lipAB* (P_{Lu}*lipAB*), pBBR1-P_{WT}*lipA*_{Lu}*B* (P_{WT}*lipA*_{Lu}*B*) bzw. pBBR1-P_{Lu}*lipA*_{Lu}*B* (P_{Lu}*lipA*_{Lu}*B*). Pro Spur im SDS-Gel wurde eine Proteinmenge entsprechend einer Zelldichte von O.D._{580nm} = 5 (GZE) bzw. 50 (ÜS) aufgetragen.

In *B. glumae* PG1 mit Leervektor war weder die Lipase im zellfreien Kulturüberstand noch die Foldase im Ganzzellextrakt detektierbar. In *B. glumae* Lu8093 mit Leervektor waren beide Proteine eindeutig nachweisbar.

Proben von *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* mit dem wildtypischen *lipAB*-Operon (pBBR1- P_{WT} *lipAB*) wiesen keine Signale für die Lipase bzw. Foldase auf. Durch die Mutation im Promotor des *lipAB*-Operons waren die Signale der Lipase und Foldase deutlich sichtbar (pBBR1- P_{Lu} *lipAB*). Auch die Expression von P_{WT} *lipA_{Lu}B* führte zu sichtbaren Signalen der Lipase im Kulturüberstand, die jedoch schwächer waren als in den Spuren von P_{Lu} *lipAB*. Ein stärkeres Foldase-Signal im Ganzzellextrakt konnte hierbei nicht beobachtet werden. Beide Mutationen zusammen (P_{Lu} *lipA_{Lu}B*) führten wiederum zu deutlich sichtbaren Signalen der Lipase im Kulturüberstand und der Foldase im Ganzzellextrakt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die gesteigerte Lipaseaktivität auf eine erhöhte Menge der Lipase und nicht etwa auf eine erhöhte Aktivität einer gleichbleibenden Menge der Lipase zurückzuführen ist. In *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* mit Leervektor wurde weder LipA noch LipB nachgewiesen (ohne Abbildung).

Anschließend sollte gezeigt werden, ob die erhöhte Lipasemenge im extrazellulären Raum durch eine verstärkte Zelllyse bedingt war. Dazu wurde der Grad der Zelllyse mithilfe einer Aktivitätsmessung des intrazellulären Enzyms β -Lactamase (2.6.8) in den Ganzzellextrakten und zellfreien Kulturüberständen bestimmt (Abbildung 3.18).

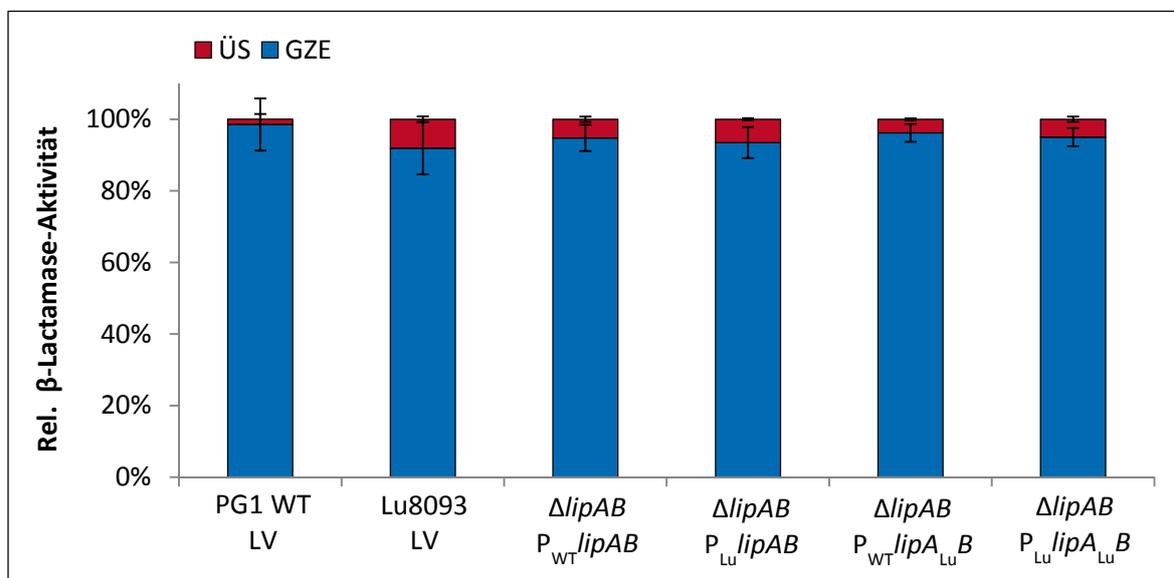


Abbildung 3.18 Nachweis von Zelllyse in verschiedenen *B. glumae*-Stämmen mit unterschiedlichen Lipasevarianten.

Messung der relativen β -Lactamase-Aktivität nach 14 h Kultivierung im zellfreien Kulturüberstand (ÜS) und im Ganzzellextrakt (GZE) in *B. glumae* PG1 (PG1 WT), *B. glumae* Lu8093 (Lu8093) bzw. *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* (Δ *lipAB*) mit verschiedenen Plasmiden: pBBR1- P_{WT} *lipAB* (P_{WT} *lipAB*), pBBR1- P_{Lu} *lipAB* (P_{Lu} *lipAB*), pBBR1- P_{WT} *lipA_{Lu}B* (P_{WT} *lipA_{Lu}B*) bzw. pBBR1- P_{Lu} *lipA_{Lu}B* (P_{Lu} *lipA_{Lu}B*). Als 100 % ist die Summe der Aktivitäten im ÜS und GZE der jeweiligen Kulturen dargestellt. Aufgetragen sind Mittelwerte einer biologischen Doppelbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Dabei lag die gemessene Aktivität der β -Lactamase im zellfreien Kulturüberstand aller Kulturen im Rahmen von 10 % der Gesamtaktivität, also der Summe der Aktivitäten im Überstand und Ganzzellextrakt. Es lag also keine verstärkte Zelllyse vor. Somit kann der Effekt der gesteigerten Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand auf eine erhöhte Lipaseproduktion und -sekretion zurückgeführt werden.

Die gesteigerte Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand kann durch eine erhöhte Produktion und Sekretion der Lipase aufgrund von zwei Punktmutationen erklärt werden.

3.6.3 Die Mutation im Bereich des *lipAB*-Promotors erhöht die Transkriptmenge von *lipA*

Da eine der beiden Mutationen im Promotorbereich des *lipAB*-Operons lokalisiert ist, liegt ein transkriptioneller Einfluss dieser Mutation nahe. Erste Ergebnisse mittels transkriptioneller Fusionen deuteten dies bereits an (Beselin, 2005). Daher wurden nun die Transkriptmengen der Gene *lipA* und *lipB* in den Kulturen aus Abschnitt 3.6.1 mittels *real-time* qPCR relativ quantifiziert (2.5.11 bis 2.5.15). Zusätzlich wurde die Transkriptmenge von *gspD* bestimmt. Die Referenz für *B. glumae* Lu8093 stellte der Wildtyp *B. glumae* PG1 dar. Die Transkriptmengen der verschiedenen Lipasevarianten in *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* wurden auf die Mengen für das wildtypische Plasmid pBBR1-P_{WT}*lipAB* bezogen.

Die Transkriptmengenbestimmung zeigte, dass die gesteigerte Menge der Lipase durch eine erhöhte Transkription des *lipAB*-Operons bedingt war (Abbildung 3.19). So war die Transkriptmenge sowohl von *lipA* als auch von *lipB* im Stamm *B. glumae* Lu8093 im Vergleich zum Wildtypen um etwa den Faktor 128 erhöht. Die Mutation im Promotorbereich des *lipAB*-Operons in *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* mit pBBR1-P_{Lu}*lipAB* führte zu einer etwa 16fachen Erhöhung der Transkriptmenge im Vergleich zum wildtypischen *lipAB*-Operon auf dem Plasmid pBBR1-P_{WT}*lipAB*. Die Punktmutation, die zum Austausch einer Aminosäure im Signalpeptid von LipA führt (pBBR1-P_{WT}*lipA*_{LuB}), hatte hingegen im Rahmen der Standardabweichung keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von *lipA*. Die Variante mit beiden Mutationen in *B. glumae* PG1 PG1 Δ *lipAB* mit pBBR1-P_{Lu}*lipA*_{LuB} erhöhte die Transkriptmenge von *lipA* um etwa den Faktor 20.

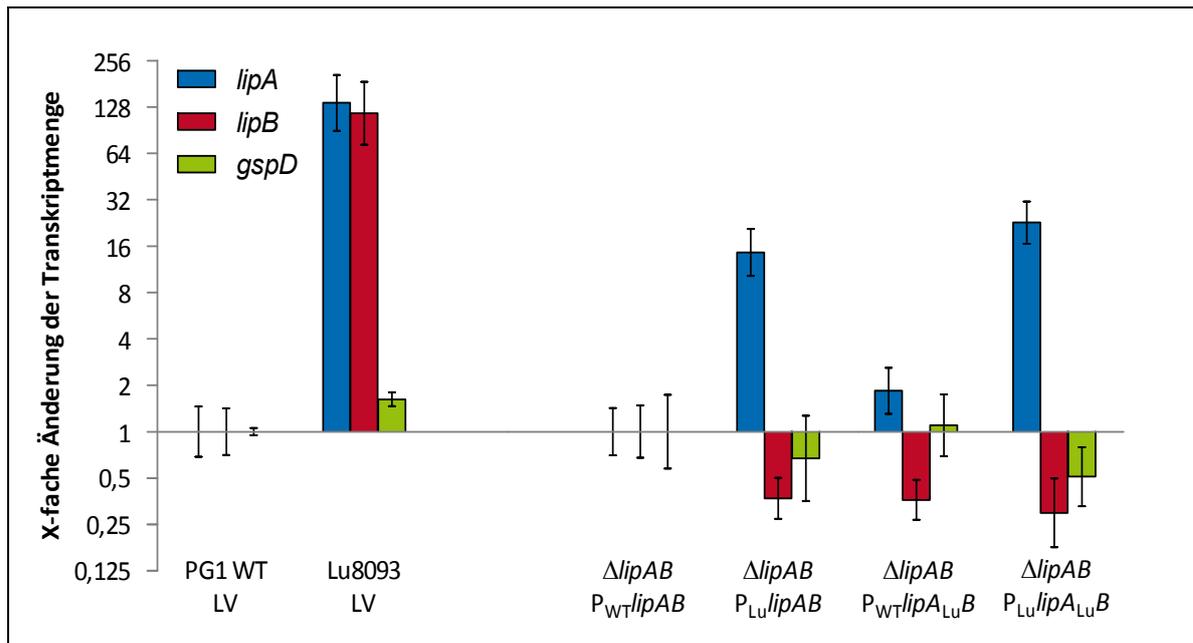


Abbildung 3.19 Relative Änderung der Transkriptmengen in verschiedenen *B. glumae*-Stämmen mit unterschiedlichen Lipasevarianten.

Aufgetragen ist die Veränderung der Transkriptmenge der Gene *lipA*, *lipB* und *gspD* in Bezug auf die entsprechende Referenz nach 14 h Kultivierung in LB-Medium. Die Referenz für *B. glumae* Lu8093 mit pBBR1-MCS Leervektor (Lu8093 LV) ist *B. glumae* PG1 mit pBBR1-MCS (PG1 WT LV). Die Referenz für die plasmidkodierte Lipasevarianten in *B. glumae* PG1 $\Delta lipAB$ ($\Delta lipAB$) mit pBBR1-P_{Lu}lipAB (P_{Lu}lipAB), pBBR1-P_{WT}lipA_{Lu}B (P_{WT}lipA_{Lu}B) bzw. pBBR1-P_{Lu}lipA_{Lu}B (P_{Lu}lipA_{Lu}B) ist das plasmidkodierte wildtypische *lipAB*-Operon pBBR1-P_{WT}lipAB (P_{WT}lipAB). Dargestellt sind die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Transkriptmenge von *lipB* jedoch war nicht in gleicher Weise von dieser Mutation im Promotorbereich beeinflusst. Hier war sogar eine etwa zweifache Verringerung der Transkriptmenge für alle Varianten zu verzeichnen. Die Kontrolle *B. glumae* PG1 $\Delta lipAB$ mit Leervektor wies erwartungsgemäß kein *lipA*- bzw. *lipB*-Transkript auf (rechnerisch mindestens 2¹⁰-fach reduzierte Transkriptmenge im Vergleich zur Referenz, ohne Abbildung).

Durch eine einzelne Mutation im Promotor des *lipAB*-Operons wird die Transkriptmenge von *lipA* um das 16fache erhöht. Dieser Effekt konnte nicht für das im gleichen Operon liegende *lipB* beobachtet werden.

3.6.4 Die gesteigerte Lipaseproduktion und -sekretion hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von *gspD*

In Abschnitt 3.5 wurde gezeigt, dass das Expressionslevel von *gspD*, welches für die Sekretionspore des Typ II-Sekretionsapparats kodiert, einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von *lipA* hat. Um zu klären, ob dieser Effekt bidirektional auftritt, das Expressionslevel von *lipA* also auch das von *gspD* beeinflussen kann, wurden im vorherigen Abschnitt die Mengenverhältnisse des *gspD*-Transkripts untersucht (siehe Abbildung 3.19). Hierbei zeigte sich jedoch, dass das Transkriptlevel von *gspD* unter Berücksichtigung der Standardabweichung weder durch eine erhöhte Transkription von *lipA* (pBBR1-P_{Lu}/*lipAB* und pBBR1-P_{Lu}/*lipA_{Lu}B*), noch durch das veränderte Signalpeptid der Lipase (pBBR1-P_{WT}/*lipA_{Lu}B* und pBBR1-P_{Lu}/*lipA_{Lu}B*) beeinflusst war. Der Stamm *B. glumae* Lu8093 wies im Vergleich zum Wildtypen nur eine geringfügig erhöhte Menge des *gspD*-Transkripts auf (etwa 1,5- bis 1,8fach). Die Leervektorkontrolle *B. glumae* PG1Δ*lipAB* mit pBBR1-MCS wies keine Änderung der *gspD*-Menge auf (ohne Abbildung).

Das Transkriptniveau von *gspD* wird nicht durch die erhöhte Transkription und Sekretion der verschiedenen Lipasevarianten beeinflusst.

3.7 Das *lipAB*-Operon unterliegt einer posttranskriptionellen Regulation

In dieser Arbeit wurde mittels *real-time* qPCR mehrfach beobachtet, dass eine gesteigerte Transkriptmenge von *lipA* nicht mit einer Steigerung der *lipB*-Transkriptmenge einhergeht (Abbildung 3.13 und Abbildung 3.19, rechts). Dies war unerwartet, da beide Gene auf einem bicistronischen Operon als transkriptionelle Einheit vorliegen (Frenken *et al.*, 1993a).

Allerdings erfasst die Methode der *real-time* qPCR nur die Transkriptmenge eines Gens zu einem definierten Zeitpunkt. Sie kann jedoch keine Aussage darüber treffen, wie oft ein Gen tatsächlich transkribiert wird.

Daher wurde mittels transkriptioneller Fusionen eines Reportergens untersucht, in welchen Mengen die Gene *lipA* und *lipB* transkribiert werden. Dazu wurde *lipA* bzw. *lipB* durch eine transkriptionelle Fusion von *gfpmut3* (mit eigener Ribosomenbindestelle) an der entsprechenden Stelle des Operons ersetzt (Abbildung 3.20). Diese Fusionen wurden sowohl für den wildtypischen Lipasepromotor P_{WT} als auch für den Promotor aus *B. glumae* Lu8093

(P_{Lu}) in einer Bachelorarbeit erzeugt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreut wurde (Bollinger, 2012). Die Stabilität des Proteins GFPmut3 in *B. glumae* PG1 wurde bereits von Beselin (2005) gezeigt. Während also die Bestimmung der Transkriptmengen über eine *real-time* qPCR immer nur die Menge Transkript erfassen konnte, die zum Zeitpunkt der Messung vorlag, erlaubte der Austausch von *lipA* bzw. *lipB* durch *gfpmut3* eine Aussage über die gesamte Menge des gebildeten Transkripts. Als Kontrolle, ob eine Basalexpression von *gfpmut3* ohne Einwirken des *lipAB*-Promotors möglich ist, wurde das Plasmid pBR-*gfpmut3* verwendet, welches als Zielvektor für alle Klonierungen diente.

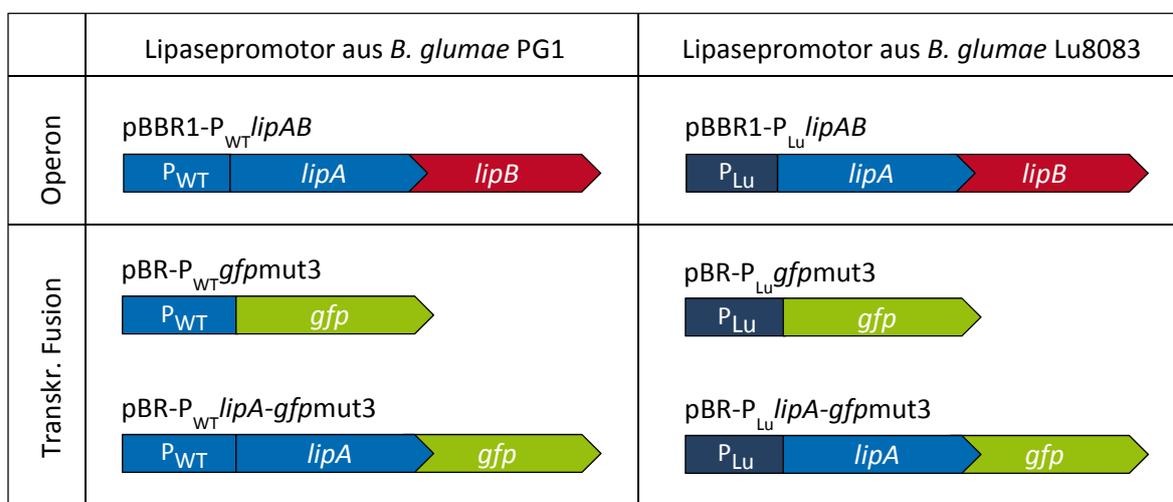


Abbildung 3.20 Schematische Darstellung des *lipAB*-Operons und der transkriptionellen *gfp*-Fusionen.

Dargestellt sind die verschiedenen Varianten der transkriptionellen Fusionen auf den entsprechenden Plasmiden. Dabei wird zwischen dem *lipAB*-Promotor von *B. glumae* PG1 (P_{WT}) und *B. glumae* Lu8093 (P_{Lu}) unterschieden. Die transkriptionellen Fusionen tauschen *lipA* bzw. *lipB* gegen *gfpmut3* aus, welches über eine eigene Ribosomenbindestelle verfügt. Somit kann über die Menge des gebildeten GFPs auf die tatsächlich transkribierte Menge des jeweiligen Gens *lipA* oder *lipB* geschlossen werden.

3.7.1 Die Transkripte von *lipA* und *lipB* werden in gleichen Mengen gebildet

Das Vorhandensein einer Foldase ist essenziell für die physiologische Prozessierung der plasmidkodierten Lipase (pBR- P_{WT} *lipA-gfpmut3* bzw. pBR- P_{Lu} *lipA-gfpmut3*). Daher wurden die Reporterfusionen im *B. glumae* PG1 Wildtypen anstatt in PG1 Δ *lipAB* exprimiert.

B. glumae PG1 mit jeweils einem der vier Konstrukte bzw. dem Kontrollplasmid pBR-*gfpmut3* wurde unter Standardbedingungen (2.4.2) in 20 ml LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl für 14 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der relativen Lipaseaktivität (2.6.7) im zellfreien Kulturüberstand und die relative Quantifizierung des gebildeten GFPmut3 (2.6.10) im Ganzzellextrakt.

Plasmide, in denen *lipB* gegen *gfpmut3* ausgetauscht war, führten mit $\sim 0,06$ U/ml \cdot O.D._{580nm} zu einer höheren Lipaseaktivität als die Plasmide, in denen *lipA* gegen *gfpmut3* ausgetauscht

war (Abbildung 3.21 A). Dies kann durch die zusätzliche Kopie des *lipA*-Gens auf diesen Plasmiden erklärt werden. Die Quantifizierung von GFPmut3 ergab für die Austausche von *lipA* und *lipB* unter Kontrolle des wildtypischen Promotors eine identische relative GFPmut3-Menge von jeweils etwa 200 RFU/O.D._{580nm} (Abbildung 3.21 B). Gleiches galt für die Varianten mit dem Promotor aus *B. glumae* Lu8093 (pBR-P_{Lu}*gfp*mut3 und -P_{Lu}*lipA-gfp*mut3) mit jeweils etwa 1200 RFU/ O.D._{580nm}. Die insgesamt höhere GFPmut3-Menge bei diesen Varianten ist dabei auf die erhöhte Promotoraktivität durch die Punktmutation zurückzuführen (vgl. Abbildung 3.19). Die Gene *lipA* und *lipB* werden also in gleichen Mengen transkribiert. Die Negativkontrolle *B. glumae* PG1 mit pBR-*gfp*mut3 produzierte mit 13 RFU/O.D._{580nm} nahezu kein GFPmut3. Mit etwa 0,03 U/ml* O.D._{580nm} wies sie eine ähnliche Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand auf wie die Stämme, in denen *lipA* durch *gfp*mut3 ausgetauscht war (*B. glumae* PG1 mit pBR-P_{WT}*gfp*mut3 bzw. -P_{Lu}*gfp*mut3).

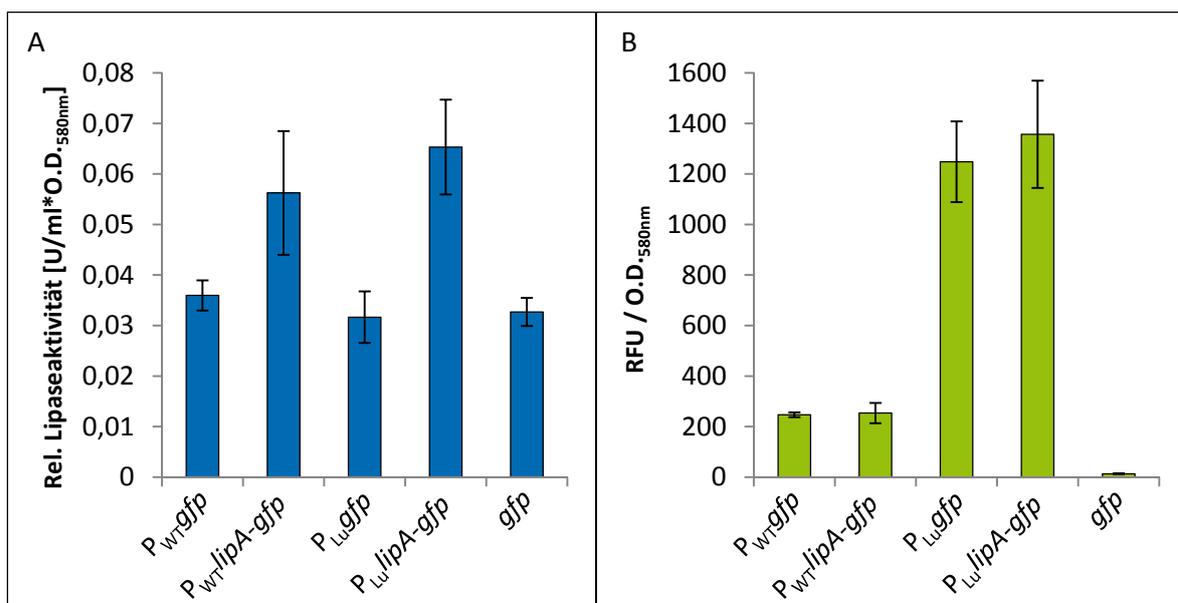


Abbildung 3.21 Lipaseaktivität und GFP-Quantifizierung für Reportergenfusionen mit dem *lipAB*-Operon.

A: Aufgetragen ist die relative Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand von *B. glumae* PG1 mit verschiedenen plasmidkodierten *gfp*mut3-Fusionen unter Kontrolle des wildtypischen *lipAB*-Promotors (P_{WT}) oder des Promotors aus *B. glumae* Lu8093 (P_{Lu}). Dabei war entweder *lipA* (P_{WT}*gfp* bzw. P_{Lu}*gfp*) oder *lipB* (P_{WT}*lipA-gfp* bzw. P_{Lu}*lipA-gfp*) gegen *gfp*mut3 ausgetauscht. Als Negativkontrolle diente das Plasmid pBR-*gfp*mut3 (*gfp*) mit *gfp*mut3 ohne *lipAB*-Promotor. **B:** Relative Quantifizierung von GFPmut3 im Ganzelleextrakt der in A beschriebenen Kulturen. Die ermittelte Fluoreszenz wurde auf die Zelldichte der entsprechenden Kultur normiert. Beide Graphen zeigen die Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Kultiviert wurde 14 h unter Standardbedingungen in LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl.

Ausgehend vom wildtypischen *lipAB*-Promotor werden die Gene *lipA* und *lipB* in gleichen Mengen transkribiert. Dies wurde auch für den Promotor aus *B. glumae* Lu8093 beobachtet, wobei hier beide Gene stärker transkribiert werden.

3.7.2 Vorhersage zweier Degradationsbereiche im *lipAB*-Operon

Die Gene *lipA* und *lipB* sind auf einem gemeinsamen Operon kodiert (Frenken *et al.*, 1993a) und werden in gleichen Mengen transkribiert (vgl. Abbildung 3.21 B). Trotzdem stellten verschiedene Experimente eine unterschiedlich starke Änderung der Transkriptmenge beider Gene fest (siehe bspw. Abbildung 3.19). Dies deutet auf einen Mechanismus hin, durch den nach der Transkription des *lipAB*-Operons die Mengen von *lipA* und *lipB* unabhängig voneinander reguliert werden.

Daher wurde nun untersucht, welche Bereiche der beiden Gene *lipA* und *lipB* tatsächlich auf einer gemeinsamen mRNA vorliegen. Dazu wurde *B. glumae* PG1 unter Standardbedingungen (2.4.2) in 20 ml LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl für 14 h kultiviert. Anschließend wurde RNA isoliert (2.5.11) und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (2.5.13). Diese cDNA wurde als Matrize in verschiedene PCRs eingesetzt (2.5.1), in denen durch Zugabe unterschiedlicher Primerpaare definierte Bereiche des *lipAB*-Operons amplifiziert werden sollten. Diese Primer waren RT-*lipA*-3'-up/dn (PCR1), RT-*lipA*-3'-up/RT-*lipB*-5'-dn (PCR 2), RT-*lipA*-i-up/dn (PCR 3), RT-*lipB*-i-up/dn (PCR 4) und RT-*lipA*-i-up/RT-*lipB*-i-dn (PCR 5). Die jeweiligen Bereiche und die tatsächlich gebildeten Amplikons in den einzelnen Reaktionen zeigt Abbildung 3.22.

Während in PCR 1 das 5'-Ende von *lipA* amplifiziert werden konnte, wurde in PCR 2 ein Amplikon erzeugt, welches den überlagernden Bereich beider Gene umfasste. Dies bestätigt die Aussage von Frenken *et al.* (1993a), dass die Transkripte von *lipA* und *lipB* auf einer gemeinsamen mRNA vorliegen. PCR 3 und PCR 4 erzeugten Fragmente, die interne Bereiche von *lipA* bzw. *lipB* abdeckten. Die äußeren, flankierenden Primer von PCR 3 und 4 wurden in PCR 5 zur Erzeugung eines Fragments eingesetzt, welches einen Großteil des *lipAB*-Operons abdeckte. Hier wurde jedoch kein PCR-Produkt gebildet, obwohl die Positivkontrolle mit genomischer DNA (gDNA) zeigte, dass die Produktbildung bei einer entsprechend vorhandenen Matrize stattfinden kann.

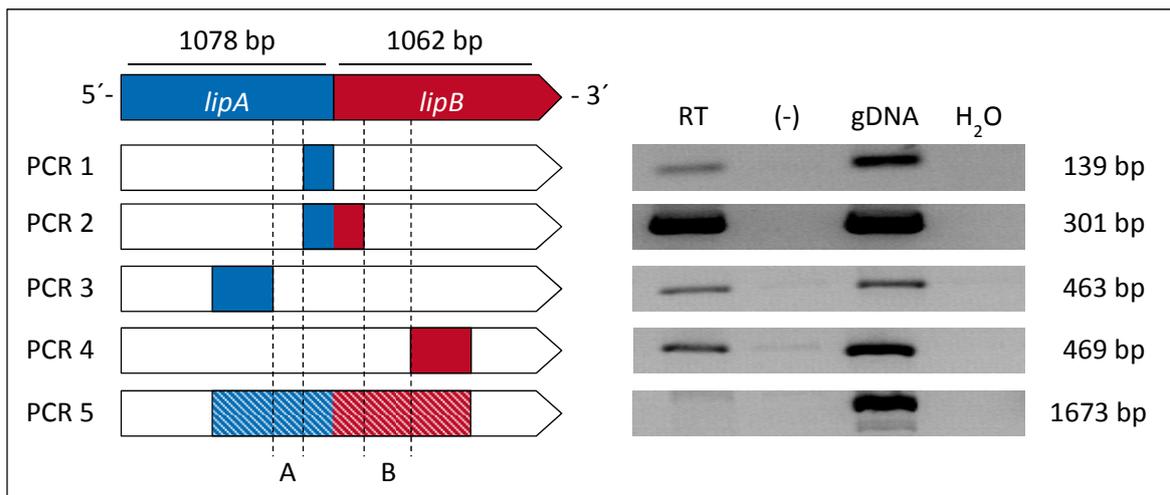


Abbildung 3.22 Nachweis verschiedener Fragmente des *lipAB*-Transkripts.

RNA aus *B. glumae* PG1 nach 14h Kultivierung unter Standardbedingungen in LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl wurde in cDNA transkribiert und diese als Matrize für verschiedene PCRs eingesetzt (RT). Als Negativkontrolle (-) diente eine identische Reaktion ohne reverse Transkriptase, in der nur dann spezifisches PCR-Produkt entsteht, wenn eine Verunreinigung mit genomischer DNA vorliegt. In einer weiteren Kontrollreaktion wurde Wasser statt der Matrize in die Reaktion eingesetzt (H₂O). In der Positivkontrolle wurde genomische DNA als Matrize (gDNA) eingesetzt. PCR 1 amplifizierte den 3'-Bereich von *lipA*. In PCR 2 wurde ein überlagerndes Fragment des 3'-Endes von *lipA* und der 5'-Region von *lipB* erzeugt. PCR 3 und PCR 4 amplifizierten jeweils einen internen Bereich von *lipA* bzw. *lipB*. In PCR 5 wurden die flankierenden Primer der Reaktionen 3 und 4 für ein Amplikon verwendet, das nahezu das ganze *lipAB*-Operon abdeckt. Hier war jedoch kein PCR-Produkt vorhanden (schematisch als schraffierte Fläche bei PCR 5 dargestellt). Die vertikalen, gestrichelten Linien markieren die Bereiche A und B als mögliche Degradationsbereiche des *lipAB*-Operons, die sich aus den Ergebnissen ableiten lassen. Die tatsächlichen Größen der jeweiligen Amplikons sind rechts neben den Agarosegel-Abbildungen aufgetragen und entsprachen der Größenabschätzung anhand eines Größenstandards. Experimente wurden in einer Bachelorarbeit durchgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreut wurde (Bollinger, 2012).

Dass in PCR 5 kein Produkt entstand, könnte durch eine Degradation vom 3'-Ende des Transkripts erklärt werden. In diesem Fall wäre auch der Bereich des *lipB*-Transkripts, in dem der Primer „RT-*lipB*-i-dn“ bindet, nicht mehr vorhanden. Demnach dürfte aber auch in PCR 4, in welcher der gleiche Primer für den *lipB*-Bereich verwendet wurde, ebenfalls kein Amplikon entstehen. Hier konnte jedoch eindeutig ein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden. Wenn das *lipAB*-Transkript also nicht vom 3'-Ende ausgehend degradiert wird, müsste eine interne Degradation stattfinden. Aufgrund der gelungenen Amplifikation der Transkriptbereiche in PCR 2, 3 und 4 kann eine interne Degradation des Transkripts auf die zwei Bereiche A und B eingegrenzt werden (siehe Abbildung 3.22).

Im *lipAB*-Transkript wurden zwei mögliche interne Degradationsbereiche identifiziert, die eine posttranskriptionelle Regulation ermöglichen.

3.8 Proteinmengenbestimmung der Lipase LipA und Foldase LipB in *B. glumae* PG1

Anschließend wurde überprüft, ob die posttranskriptionelle Degradation des *lipAB*-Transkripts einen Einfluss auf das Mengenverhältnis von Lipase und Foldase hat. Eine Quantifizierung der produzierten Lipase kann, abgesehen von inaktiver Lipase im Cytoplasma, durch einen Aktivitätstest erfolgen. Für Foldasen existieren jedoch keine Aktivitätstests. Daher wurde versucht, einen Tetracystein-*tag* zur Quantifizierung der Foldase einzusetzen. Der Tetracystein-*tag* besteht aus 6 Aminosäuren (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) und ermöglicht die Quantifizierung der Fusionsproteine mittels Fluoreszenz nach Ausbildung eines Komplexes über vier Disulfidbrücken mit dem Farbstoff FIASHTM (Griffin *et al.*, 1998). Allerdings führte die Fusion an den N- bzw. C-Terminus der Foldase zu einem Verlust der extrazellulären Lipaseaktivität von etwa 50 % (ohne Abbildung). Zudem konnten die Fusionsproteine weder in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen intakter Zellen, noch in fluoreszenzspektrometrischen Analysen des Ganzzellextrakts detektiert werden (2.6.11, ohne Abbildung).

Als Alternative wurde daher ein Foldase-Fusionsprotein mit einem C-terminalen Histidin-*tag* konstruiert. Ein solcher *tag* wurde bereits erfolgreich für die Foldase aus *P. aeruginosa* PAO1 verwendet (Knapp, 2009) und kann durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers mittels Western Blot semi-quantitativ bzw. mittels ELISA quantitativ nachgewiesen werden. Das entsprechende Konstrukt pBBR1-P_{WT}*lipAB*_{CHIS} basiert auf dem Plasmid pBBR1-P_{WT}*lipAB*. Wie im nächsten Abschnitt deutlich wird (siehe Abbildung 3.23), hat die C-terminale Fusion eines Histidin-*tag* an die Foldase LipB in *B. glumae* PG1 keinen negativen Einfluss auf die extrazelluläre Lipaseaktivität.

3.8.1 Die extrazelluläre relative Lipaseaktivität nimmt über die Zeit stetig zu

Die Plasmide pBBR1-P_{WT}*lipAB*_{CHIS} und pBBR1-P_{WT}*lipAB* wurden in *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* exprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen in 100 ml LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl (2.4.2). Um eine zeitaufgelöste Analyse zu ermöglichen, wurden ab 4 h nach Inokulation stündlich Proben für die Messung der Lipaseaktivität im Ganzzellextrakt und im zellfreien Kulturüberstand entnommen (2.4.4, 2.6.7). Nach 9 h wurden die Zellen sedimentiert (2.4.4), in frischem Medium resuspendiert und weitere 4 h mit stündlicher Probenentnahme kultiviert. Das Wechseln des Überstandes erleichterte die Messung neu gebildeter Lipase und den später gezeigten Mengenvergleich der Foldase. Die Messung

unmittelbar nach dem Wechsel des Mediums nach 9 h ist in den folgenden Abbildungen mit einem „*“ markiert.

B. glumae PG1Δ*lipAB* mit pBBR1-*P_{WT}lipAB_{CHis}* zeigte im Vergleich zu Kulturen mit pBBR1-*P_{WT}lipAB* keinen Unterschied in der Zunahme der Zelldichte über den kompletten Kultivierungszeitraum (ohne Abbildung). Wie aus Abbildung 3.23 ersichtlich, hatte der Histidin-*tag* keinen negativen Einfluss auf die relativen Lipaseaktivitäten im zellfreien Kulturüberstand.

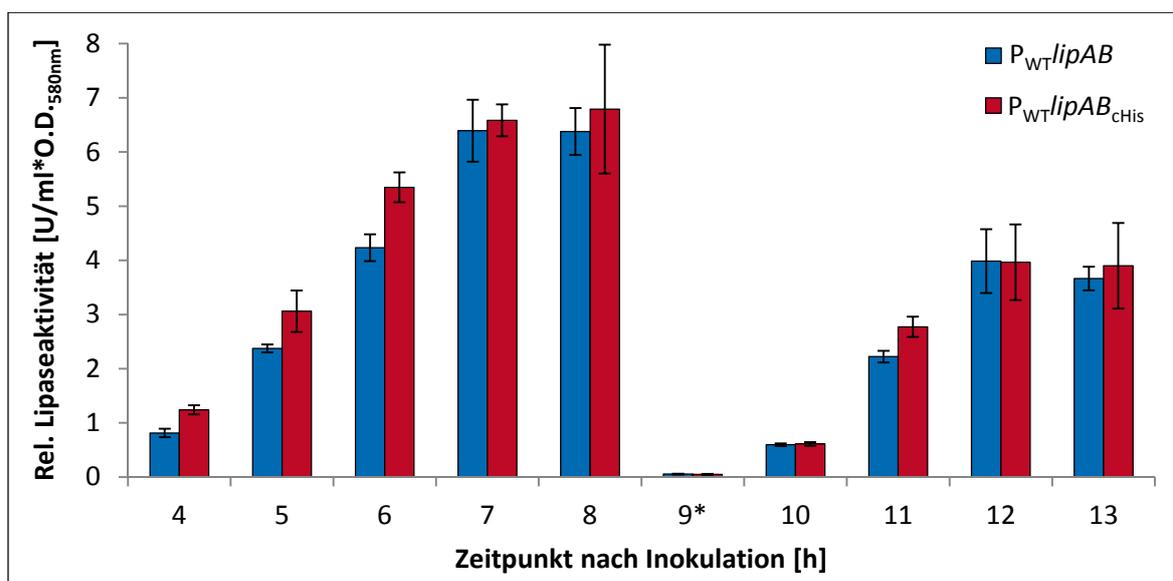


Abbildung 3.23 Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand von *B. glumae* PG1Δ*lipAB* mit einem LipB-Histidin-Fusionsprotein.

Aufgetragen sind die relativen Lipaseaktivitäten im zellfreien Kulturüberstand von *B. glumae* PG1Δ*lipAB* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation. Exprimiert wurde plasmidkodiert entweder das wildtypische *lipAB*-Operon auf pBBR1-*P_{WT}lipAB* (*P_{WT}lipAB*) oder eine Variante mit einer C-terminalen Fusion eines Histidin-*tag* an LipB auf pBBR1-*P_{WT}lipAB_{CHis}* (*lipAB_{CHis}*). Nach 9 h Kultivierung wurde der komplette zellfreie Kulturüberstand durch frisches Medium ersetzt (9*). Dargestellt sind die Mittelwerte einer biologischen Doppel- sowie methodischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen in LB-Medium mit 1 % (v/v) Olivenöl.

Bis zum Erreichen eines Plateaus zwischen 7 und 8 h war eine stetige Steigerung der relativen Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand zu verzeichnen. Die Aktivitätsmessung 9 h nach Inokulation erfolgte direkt nach dem Wechsel des Kultivierungsmediums. Hier war keine Lipaseaktivität messbar. Anhand der drei folgenden Messungen wurde bis zum erneuten Erreichen des Plateaus nach 12 h wiederum eine kontinuierliche Aktivitätssteigerung beobachtet. Die Lipaseaktivität im Ganzzellextrakt aller Kulturen lag für alle Messpunkte ab dem Wechsel des Kulturmediums nach 9 h unterhalb von 0,1 U/ml*O.D._{580nm} (ohne Abbildung). Somit handelte es sich bei der extrazellulär gemessenen Lipase ab diesem

Zeitpunkt um neu synthetisierte Lipase und nicht etwa um bereits gebildete, aber noch nicht sekretierte Lipase.

Die Fusion eines C-terminalen Histidin-*tag* an die Foldase LipB hat keinen negativen Einfluss auf die Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand von *B. glumae* PG1. Die relative Lipaseaktivität nimmt im Laufe der Kultivierung bzw. nach einem Wechsel des Mediums bis zum Erreichen eines Plateaus stetig zu.

3.8.2 Bei steigender Menge der extrazellulären Lipase bleibt das Niveau der intrazellulären Foldase konstant

Ausgehend von den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Kultivierungen wurde auch die Proteinmenge von LipB im Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* mit pBBR1-P_{WT}*lipAB* bzw. pBBR1-P_{WT}*lipAB*_{CHIS} zu allen betrachteten Zeitpunkten untersucht. Dazu wurden sedimentierte Zellen so in SDS-Probenpuffer resuspendiert, dass die Proteinmengen aller Proben der gleichen Zelldichte von O.D._{580nm} = 5 entsprachen (2.4.4, 2.6.5). Diese Proben wurden dann in einem ersten Schritt mittels Western Blot und einem His₆-spezifischen Antikörper auf das Vorhandensein von LipB_{CHIS} hin untersucht (2.6.6).

Wie Abbildung 3.24 zeigt, nahm die LipB_{CHIS}-Signalstärke in den Proben zwischen 4 und 6 h zu. Über den restlichen Kultivierungszeitraum war keine Änderung der Signalstärke feststellbar. Besonders herauszustellen sind hier die Signale ab 9 h nach Inokulation, da hier der Wechsel des Kulturmediums vorgenommen wurde. Ab diesem Zeitpunkt stieg zwar die extrazelluläre Lipaseaktivität erneut an (vgl. Abbildung 3.23), die Signalstärken des immunologischen Nachweises zeigten jedoch keine Zunahme der intrazellulären Foldase LipB_{CHIS}.

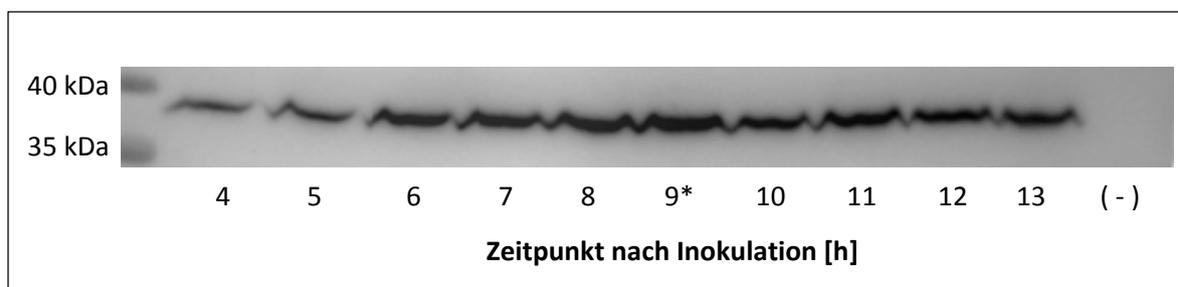


Abbildung 3.24 Nachweis von LipB_{CHIS} im Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* mit pBBR1-P_{WT}*lipAB*_{CHIS}.

Aufgetragen sind je Spur Proteinmengen des Ganzzellextrakts entsprechend einer Zelldichte von O.D._{580nm} = 5 von *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* mit pBBR1-P_{WT}*lipAB*_{CHIS} zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation. Diese entsprechen den in Abbildung 3.23 dargestellten Zeitpunkten. Nach 9 h Kultivierung wurde der komplette zellfreie Kulturüberstand durch frisches Medium ersetzt (9*). Als Kontrolle (-) diente eine gleichbehandelte Probe von *B. glumae* PG1 Δ *lipAB* mit pBBR1-P_{WT}*lipAB* (ohne Histidin-*tag*) nach 13 h.

Um die Aussage des immunologischen Nachweises zu validieren, wurde die LipB_{CHIS}-Konzentration ausgehend vom gleichen Zellmaterial mittels ELISA (2.6.6) quantifiziert. Auch die Proben von *B. glumae* PG1 mit pBBR1-P_{WT}lipAB (ohne Histidin-tag) wurden untersucht, um unspezifische Bindungen des Antikörpers aus der Konzentrationsbestimmung von LipB_{CHIS} herausrechnen zu können. Die Differenz zu den Proben mit Histidin-tag wurde als Grundlage zur Berechnung der Konzentration verwendet. Anhand einer Verdünnungsreihe mit gereinigter Foldase (2.6.1) konnte die Konzentration der in den Proben vorhandenen Foldase LipB_{CHIS} berechnet werden. Abbildung 3.25 zeigt die so ermittelten Konzentrationen von LipB_{CHIS} zu den verschiedenen Zeitpunkten.

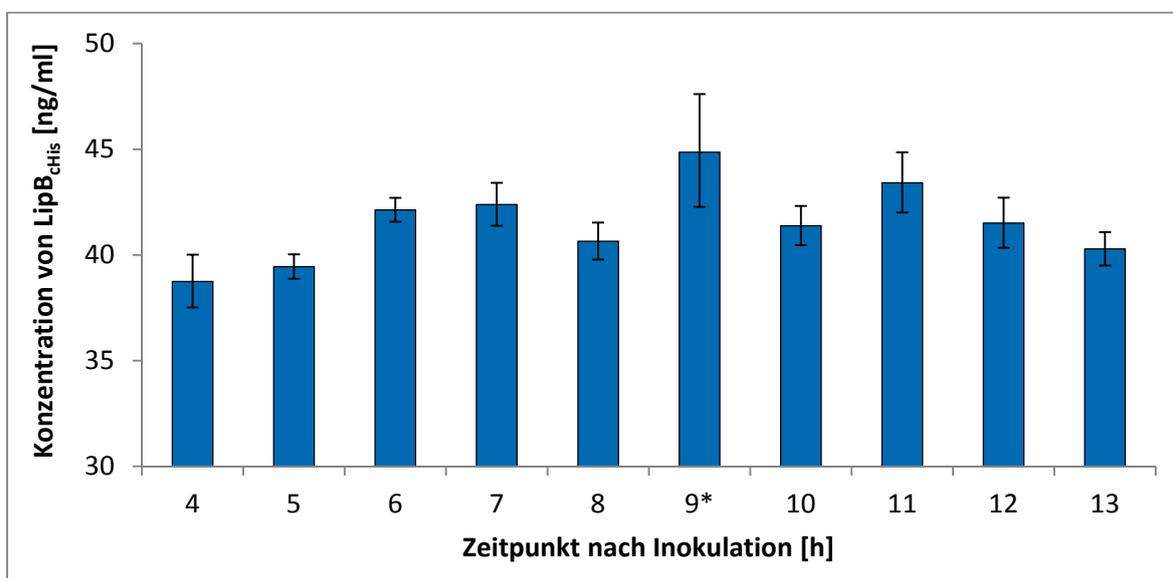


Abbildung 3.25 Quantifizierung der Menge von LipB_{CHIS} in *B. glumae* PG1ΔlipAB mit pBBR1-P_{WT}lipAB_{CHIS}.

Die Menge von LipB_{CHIS} wurde in Proben des Ganzzellextrakts von *B. glumae* PG1ΔlipAB mit pBBR1-P_{WT}lipAB_{CHIS} mittels ELISA quantifiziert. Die Proteinmenge wurde in jeder Probe auf eine Zelldichte entsprechend einer O.D._{580nm} = 10 normiert. Anschließend erfolgte eine Differenzbildung mit Werten aus einer parallel durchgeführten Messung der Ganzzellextrakte aus *B. glumae* PG1ΔlipAB mit pBBR1-P_{WT}lipAB (ohne Histidin-tag) zur Eliminierung der Quantifizierung von unspezifischen Interaktionen des His₆-spezifischen Antikörpers mit anderen Proteinen. Die so erhaltenen Werte wurden anhand einer Regressionskurve der Signalstärken von gereinigtem LipB_{CHIS} in die Konzentration von LipB_{CHIS} in den einzelnen Proben umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte aus einer biologischen Doppelbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus dieser biologischen sowie einer methodischen Doppelbestimmung.

Für die ersten drei Messzeitpunkte war ein leichter Anstieg der Foldase-Konzentration von $38,7 \pm 1,2$ ng/ml auf $42,1 \pm 0,6$ ng/ml zu verzeichnen. Über den restlichen Zeitraum, inklusive dem Messpunkt beim Wechseln des Kulturmediums nach 9 h, lag die Konzentration ab dem Messzeitpunkt nach 6 h zwischen $40,6 \pm 0,9$ und $44,8 \pm 2,8$ ng/ml.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Lipase LipA und ihre spezifische Foldase LipB, obwohl ihre Gene auf einem bicistronischen Operon liegen, über den gesamten Kultivierungsverlauf in unterschiedlichen Proteinmengen vorliegen.

Trotz einer stetigen Zunahme der Lipaseaktivität im Kulturüberstand bleibt die Konzentration der Foldase LipB im Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1 nach sechs Stunden relativ konstant.

3.8.3 Durch die Mutation im Promotor des *lipAB*-Operons erreicht die LipB-Menge ein höheres, aber trotzdem konstantes Niveau

Ebenfalls wurde die LipA- und LipB_{CHIS}-Menge untersucht, die ausgehend vom Plasmid pBBR1-P_{Lu}*lipAB*_{CHIS} mit dem stärkeren Promotor P_{Lu} aus *B. glumae* Lu8093 gebildet wird. Die Versuchsdurchführung entsprach der in den Abschnitten 3.8.1 und 3.8.2 beschriebenen. Die relative Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand nahm auch hier im Laufe der Kultivierung und nach dem Wechsel des Mediums stetig zu (Abbildung 3.26, oben).

Im Vergleich zum wildtypischen Promotor (P_{WT}) resultierte die Mutation im P_{Lu}-Promotor in einer etwa zwei- bis vierfachen Erhöhung der extrazellulären Lipaseaktivität (vgl. Abbildung 3.23). Der immunologische Nachweis der Foldase im Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1Δ*lipAB* mit pBBR1-P_{Lu}*lipAB*_{CHIS} zeigte, dass auch hier nach etwa 6 h Kultivierung eine konstante LipB_{CHIS}-Menge vorhanden war (Abbildung 3.26, unten). Diese war jedoch im Vergleich zum Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1Δ*lipAB* mit pBBR1-P_{WT}*lipAB*_{CHIS} insgesamt deutlich erhöht.

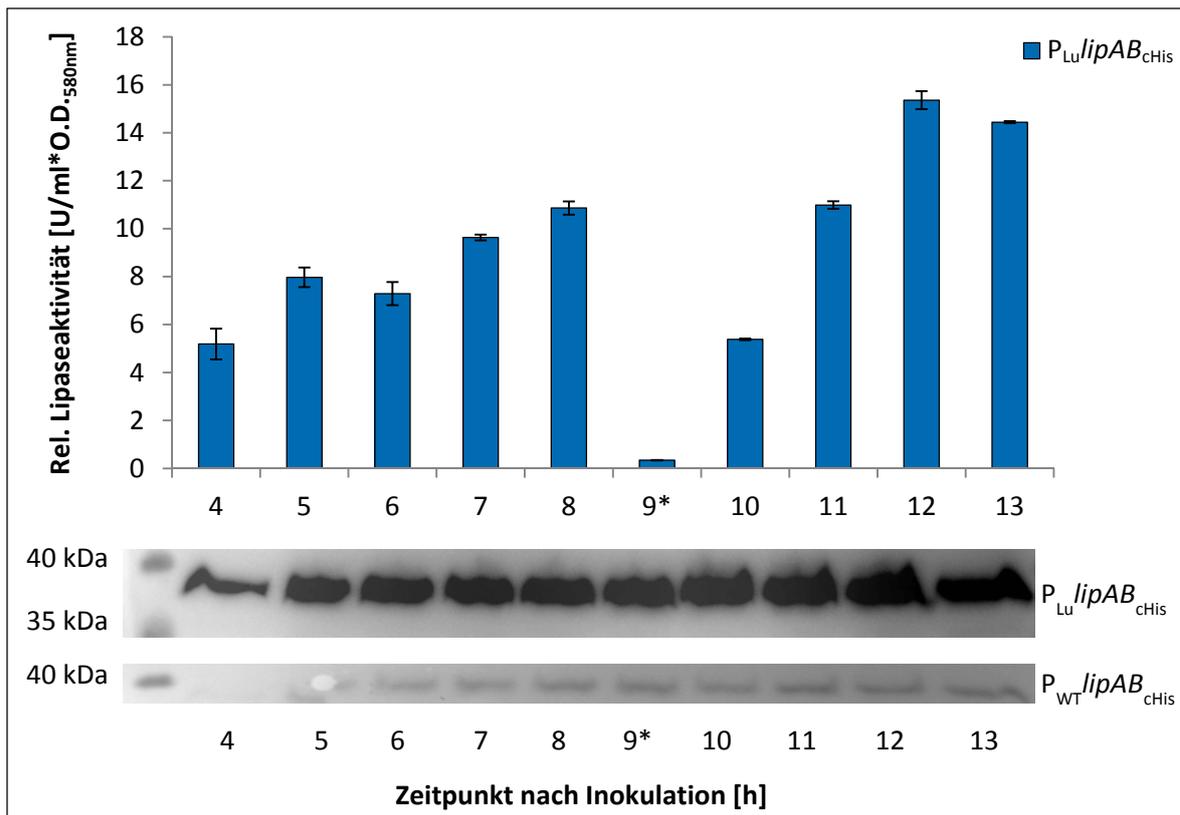


Abbildung 3.26 Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand und Nachweis von LipB_{CHIS} in *B. glumae* PG1Δ*lipAB* mit pBBR1-P_{Lu}*lipAB*_{CHIS}.

Oben: Aufgetragen sind die relativen Lipaseaktivitäten im zellfreien Kulturüberstand von *B. glumae* PG1Δ*lipAB* mit pBBR1-P_{Lu}*lipAB*_{CHIS} (P_{Lu}*lipAB*_{CHIS}) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation. Nach 9 h Kultivierung wurde der zellfreie Kulturüberstand durch frisches Medium ersetzt (9*). Dargestellt sind die Mittelwerte einer methodischen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Unten: Immunologischer Nachweis von LipB_{CHIS} im Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1Δ*lipAB* mit pBBR1-P_{Lu}*lipAB*_{CHIS} (P_{Lu}*lipAB*_{CHIS}) wie für Abbildung 3.24 beschrieben. Die Proben in der Reihe „P_{WT}*lipAB*_{CHIS}“ entsprechen den bereits in Abbildung 3.24 dargestellten Proben. Um die Vergleichbarkeit der Signalstärken zu gewährleisten, wurden die Proben aus beiden Kultivierungen für diese Abbildung identisch behandelt, auf dieselbe PVDF-Membran transferiert und parallel entwickelt.

Die Mutation im Promotor des *lipAB*-Operons erhöht im Vergleich zum wildtypischen Promotor sowohl die Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand als auch die Foldasemenge im Ganzzellextrakt. Die Foldasemenge bleibt aber auch hier trotz steigender Lipaseaktivität auf einem konstanten Niveau.

4. Diskussion

B. glumae PG1 ist aus mehreren Gründen ein vielversprechender Modellorganismus für die Forschung und die industrielle Biotechnologie. Erstens ist die Charakterisierung dieses Organismus und seiner molekularen Prozesse für die Agrarindustrie von Interesse, da einige Vertreter der Gattung *Burkholderia* ernst zu nehmende Pflanzenpathogene darstellen (Ham *et al.*, 2011). Zweitens bietet sich der in die niedrigste Risikogruppe R1 eingestufte *B. glumae* PG1 durch seine Verwandtschaft zu humanpathogenen Organismen wie *P. aeruginosa* oder *B. mallei* als Modellorganismus für die klinische Forschung an. Drittens ist *B. glumae* PG1 ein potenter Lipaseproduzent (Boekema *et al.*, 2007). Das industrielle Potenzial von *B. glumae* PG1 wurde bereits durch ein von der BASF SE erzeugtes Derivat *B. glumae* Lu8093 demonstriert, welches große Mengen der Lipase LipA produziert und sekretiert (Balkenhohl *et al.*, 1997, Boekema *et al.*, 2007). Dieses Potenzial ist von wirtschaftlichem Interesse, da Lipasen (nach Proteasen und Carbohydrasen) die drittgrößte Enzymgruppe mit industriellem Nutzen darstellen und sekretierte Enzyme die folgenden Reinigungsschritte deutlich vereinfachen (Saxena *et al.*, 2003, Hasan *et al.*, 2006, Casas-Godoy *et al.*, 2012). Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die detaillierte Charakterisierung der Lipaseproduktion und -sekretion in *B. glumae* PG1.

Daher wurden zwei große Themenkomplexe bearbeitet: Der erste Komplex befasst sich mit *B. glumae* PG1 als Produktionsstamm und betrachtet verschiedene Möglichkeiten, in diesem Organismus homologe wie heterologe Produkte zu synthetisieren. Im zweiten Komplex wird gezielt die Frage nach bisher unbekanntem Regulationsmechanismen gestellt, die einen Einfluss auf die Lipaseproduktion haben. Beide Komplexe sollen neue Möglichkeiten zur Optimierung von *B. glumae* als (Lipase-)Produzent aufzeigen.

4.1 Analyse von *B. glumae* PG1 als Lipaseproduzent

B. glumae PG1 bzw. Lu8093 produziert und sekretiert die Lipase LipA (Frenken *et al.*, 1992, Boekema *et al.*, 2007). Die diesen Prozessen zugrunde liegende Regulation ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Ein besseres Verständnis dieser zellulären Abläufe würde jedoch Möglichkeiten aufzeigen, die Lipaseproduktion weiter zu optimieren. Daher wurden vergleichende Analysen von *B. glumae* PG1 mit stimulierter bzw. inhibierter Lipaseproduktion in der exponentiellen, transienten und stationären Wachstumsphase durchgeführt. Die Kultivierung von *B. glumae* PG1 erfolgte dafür in einer Kleinfärmer-Anlage (vgl. Abbildung

3.1), die zum einen eine maximale Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistete und zum anderen mit einem Kultivierungsvolumen von 700 ml die parallele Probenentnahme für alle Folgeexperimente ermöglichte. So wurde die Vergleichbarkeit der nachfolgenden Analysen gewährleistet.

Das verwendete Minimalmedium E (MME), welches anorganische Salze und Citrat enthält (2.4.1), kann durch verschiedene Kohlenstoffverbindungen ergänzt werden, die einen Einfluss auf die Lipaseproduktion von *B. glumae* PG1 haben (Abbildung 3.2 B). Glukose und Saccharose etwa verhindern die Lipaseproduktion von *B. glumae* PG1 (Boekema *et al.*, 2007). In einer im Rahmen der vorliegenden Dissertation betreuten Masterarbeit wurde allerdings das ebenfalls Lipase-reprimierende Succinat für die Kultivierung im Fermenter als effizienter verwertbare Kohlenstoffquelle identifiziert (Hahn, 2012). Daher wurde hier für die Repression der Lipasebildung in den Kultivierungen Succinat eingesetzt. Die stimulierende Wirkung von Olivenöl auf die Lipaseproduktion von *B. glumae* PG1 im Schüttelkolben (Boekema *et al.*, 2007) konnte auch für die Kultivierung im Fermentationsmaßstab bestätigt werden (Abbildung 3.2 B).

Der Einfluss von Olivenöl auf die Lipaseproduktion wurde durch Transkriptanalysen näher charakterisiert. Dabei wurde für die exponentielle und transiente Wachstumsphase mittels *real-time* qPCR gezeigt, dass die stimulierende Wirkung des Olivenöls auf die Lipaseproduktion auf transkriptioneller Ebene stattfindet (Abbildung 3.2 A). Dies wurde durch die Analyse des Transkriptoms mittels DNA-Chip-Technologie bestätigt (Tabelle 3.3). Während durch diese beiden Methoden die relative Veränderung der Transkriptmengen nachgewiesen wurde, zeigte die absolute Quantifizierung des Transkripts mittels RNA-Sequenzierung weiterhin, dass die Zugabe von Succinat die Bildung des *lipAB*-Transkripts in der exponentiellen Wachstumsphase nahezu vollständig unterdrückt (Abbildung 3.3).

Damit konnte ein regulatorischer Zusammenhang zwischen der Kohlenstoffverfügbarkeit und der Lipaseexpression detailliert aufgezeigt werden. In früheren Arbeiten wurde vermutet, dass es sich bei einer solchen Regulation um eine Katabolitrepression handeln könnte (Boekema *et al.*, 2007). Dieser globale Regulationsmechanismus zeichnet sich dadurch aus, dass er, in Anwesenheit einer präferierten Kohlenstoffquelle, die Stoffwechselwege für den Abbau anderer Energiequellen reprimiert (Madigan & Martinko, 2006, Rojo, 2010). Dies zeigt sich für *B. glumae* PG1 in der transkriptionellen Repression der *lipAB*-Expression in Anwesenheit von Succinat (Abbildung 3.3) oder auch darin, dass die Konzentration von Olivenöl im Medium schneller abnimmt als die von Citrat (vgl. Abschnitt 3.1.3 und Tabelle

3.1). Allerdings konnte die für die Katabolitrepression typische Diauxie, also das Wachstum mit zwei exponentiellen Phasen, im Wachstumsverlauf von *B. glumae* PG1 nicht beobachtet werden (Madigan & Martinko, 2006). Daher kann nicht eindeutig geklärt werden, ob eine klassische Katabolitrepression vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass durch die Auswahl der Kohlenstoffquelle die Lipaseproduktion von *B. glumae* PG1 gezielt auf Ebene der Transkription induziert bzw. reprimiert werden kann.

Darüber hinaus führt Olivenöl zu einer erhöhten Menge von Rhamnolipiden im zellfreien Kulturüberstand (Abbildung 3.5). Dies kann auf eine erhöhte Transkription der Rhamnolipidsynthese-Gene *rhIB* und *rhIC* (Ochsner *et al.*, 1994a, Rahim *et al.*, 2001) zurückgeführt werden (Tabelle 3.3). Die Transkriptmenge des für die Produktion der Rhamnolipide ebenfalls essenziellen Gens *rhIA* (Ochsner *et al.*, 1994a) ist zwar ebenfalls erhöht, die Veränderung war unter den gewählten Testbedingungen jedoch nicht signifikant (Tabelle 8.1). Unter Lipase-induzierenden Bedingungen wies ebenfalls das Gen des Transkriptionsregulators RhIR, der in *P. aeruginosa* für die Induktion der Rhamnolipidsynthese-Gene *rhIA*, *rhIB* und *rhIC* verantwortlich ist (Ochsner *et al.*, 1994b, Lazdunski *et al.*, 2004), eine erhöhte Transkriptmenge auf (Tabelle 3.3). Daher ist es auch für *B. glumae* PG1 sehr wahrscheinlich, dass die für die Rhamnolipidsynthese verantwortlichen Gene *rhIB* und *rhIC* (und möglicherweise *rhIA*) durch den vermehrt produzierten Regulator RhIR induziert werden.

B. glumae wurde bereits in früheren Studien als Alternative zu *P. aeruginosa* für die Produktion von Rhamnolipiden vorgeschlagen und näher charakterisiert (Knorr, 2010, Costa *et al.*, 2011). In diesen Arbeiten wurden ebenfalls pflanzliche Öle zur Stimulation der Rhamnolipidproduktion eingesetzt, wie es für *P. aeruginosa* gebräuchlich ist (Sim *et al.*, 1997). Unklar ist allerdings, ob ein direkter Zusammenhang zwischen Olivenöl, dem Regulator RhIR und der Produktion der Lipase in *B. glumae* PG1 besteht. In *P. aeruginosa* konnte ein indirekter Zusammenhang zwischen der Lipaseexpression und dem Regulator RhIR, welcher Teil des *quorum sensing*-Systems (QS) ist, festgestellt werden (Schneidinger, 1997, Rosenau & Jaeger, 2000). Auch für das klinische Isolat *B. glumae* AU6208 wird vermutet, dass die Lipase in einem Zusammenhang mit diesem System steht (Devescovi *et al.*, 2007). Somit liegt nahe, dass auch die Lipase in *B. glumae* PG1 über das Zelldichte-abhängige QS-System reguliert wird. Allerdings scheint die QS-regulierte Produktion der Lipase und der Rhamnolipide in

B. glumae PG1 nicht alleine von der Zelldichte der Kultur abzuhängen, sondern auch maßgeblich von der Verfügbarkeit bestimmter Kohlenstoffquellen (wie oben dargelegt).

Rhamnolipide sind – wie auch die Lipasen – von industrieller Relevanz, da sie als Alternative zu synthetischen Tensiden genutzt werden können (siehe Abschnitt 1.5). Daher liefert die Tatsache, dass *B. glumae* PG1 diese beiden Biomoleküle im gleichen Medium produzieren und zudem noch in den zellfreien Kulturüberstand sekretieren kann, interessante Möglichkeiten für die parallele Produktion zweier industriell relevanter Stoffe. Durch die Kombination von Lipaseproduktions-optimierten Stämmen wie etwa *B. glumae* Lu8093 (Boekema *et al.*, 2007) und optimierten Medien für die Rhamnolipidproduktion (Costa *et al.*, 2011) könnten zudem die Ausbeuten weiter gesteigert werden.

Aus physiologischer Sicht ist eine gemeinsame Regulation der Lipase und der Rhamnolipide durchaus sinnvoll. Rhamnolipide weisen einen amphiphilen Charakter auf. Sie sind in der Lage, wasserunlösliche Stoffe wie etwa Olivenöl im wässrigen Medium durch Ausbildung von Micellen in Lösung zu bringen, was sie zu einer biologischen Alternative zu chemischen Detergenzien wie SDS macht (Patel & Desai, 1997, Costa *et al.*, 2011, Lovaglio *et al.*, 2011). Somit steht durch die Rhamnolipide mehr Öl zur Degradierung durch die im Wasser gelöste Lipase LipA zur Verfügung.

Einen Hinweis darauf, dass Olivenöl von *B. glumae* PG1 als Kohlenstoffquelle verwertet wird, liefert das Wachstumsverhalten einer Typ II-sekretionsdefizienten Mutante *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF*. Diese weist bei Kultivierung in MME mit Olivenöl ein geringeres Zellwachstum auf als der entsprechende Wildtyp. Das Wachstumsdefizit tritt jedoch nicht auf, wenn statt Olivenöl Succinat verwendet wird (Abbildung 3.1 A bis D). Daher kann das schlechtere Wachstum nicht alleine auf das Fehlen des Sekretionsapparates zurückgeführt werden, sondern muss in einem Zusammenhang mit einem der durch diesen Apparat sekretierten Proteine stehen. Da diese Mutante nicht in der Lage ist, die Lipase LipA in den Kulturüberstand zu sekretieren (Abbildung 3.4), kann hier das Olivenöl vermutlich nicht hydrolysiert werden und steht somit nicht als Kohlenstoffquelle zur Verfügung.

Die Analyse der extrazellulären Metabolite zeigte, dass Olivenöl vom Wildtypen *B. glumae* PG1 abgebaut wird (vgl. Abschnitt 3.1.3): Bei abfallender Konzentration der Glycerintrioleate, dem Hauptbestandteil des Olivenöls, steigt die Konzentration von Glycerin und freien Fettsäuren bis zum Messzeitpunkt in der exponentiellen Wuchsphase an. Dies entspricht exakt dem biochemischen Katalysemechanismus der Lipasen, bei dem Triacylglycerin in

Glycerin und Fettsäuren umgesetzt wird (Reaktionsschema in Abbildung 4.1). Die Abnahme der Glycerinkonzentration im weiteren Kultivierungsverlauf deutet darauf hin, dass Glycerin als Kohlenstoffquelle verwertet wird. Fettsäuren werden typischerweise intrazellulär durch den Prozess der β -Oxidation für den Citratzyklus verfügbar gemacht (Berg *et al.*, 2003).

Dabei werden die Fettsäuren durch Verknüpfung mit Coenzym A durch die Acyl-CoA-Synthetase in Acyl-CoA umgewandelt. Anschließend wird das Acyl-CoA durch eine Acyl-CoA-Dehydrogenase am namensgebenden β -Kohlenstoff oxidiert. In mehreren katalytischen Schritten folgt die Substitution der Acetyl-CoA-Gruppe durch ein zweites Molekül CoA, sodass Acetyl-CoA frei wird und eine um zwei Kohlenstoffe verkürzte Acyl-CoA-Verbindung entsteht. Diese kann erneut durch die β -Oxidation um zwei Kohlenstoffe verkürzt werden. Da Fettsäuren sowohl passiv durch Diffusion als auch durch aktive Prozesse über die Zellmembranen transportiert werden (Black & DiRusso, 2003), könnten die Zwischenprodukte der β -Oxidation auch extrazellulär quantifiziert werden.

Abschließend kann also festgestellt werden, dass *B. glumae* PG1 in den hier etablierten Fermentationsbedingungen mit der Lipase LipA und den Rhamnolipiden gleichzeitig zwei industriell relevante Komponenten sekretiert, deren Produktion zum einen durch Olivenöl stimuliert wird und die zum anderen zur Verwertung von Olivenöl beitragen. Im nächsten Abschnitt werden einige Möglichkeiten diskutiert, wie auf Grundlage der hier erhobenen systembiologischen Daten eine Optimierung der Lipaseproduktion in *B. glumae* PG1 möglich ist.

4.2 Möglichkeiten zur Optimierung der Lipaseproduktion

Bisher konnte gezeigt werden, dass *B. glumae* PG1 in Anwesenheit von Olivenöl die Lipase LipA produziert, die das Öl wiederum in Fettsäuren (und Glycerin) umsetzt. Diese werden typischerweise durch die β -Oxidation weiter degradiert.

Das Durchmustern einer Tn5-Insertionsbibliothek von *B. glumae* PG1 hinsichtlich Kolonien mit verstärkter lipolytischer Aktivität identifizierte einen Klon, in dem das Gen einer Acyl-CoA-Dehydrogenase (BGL_1c32350) inaktiviert war (Abschnitt 3.4.2 und Tabelle 8.2). Die Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysiert vermutlich eine der Reaktionen der β -Oxidation (siehe oben). Systembiologische Studien, die in einem Kooperationsprojekt an der Universität Greifswald durchgeführt wurden, wiesen diese Dehydrogenase im intrazellulären Proteom von *B. glumae* PG1 unter Lipase-induzierenden Bedingungen nach und bestätigen damit diese Vermutung

(Sicher, 2013). Da das Fehlen dieses Enzyms die Lipaseproduktion steigert, ist es möglich, dass Edukte, Zwischen- oder Endprodukte der β -Oxidation bzw. weiterführender Stoffwechselwege für die Regulation der *lipAB*-Expression verantwortlich sind. Möglicherweise benötigt ein bestimmter Transkriptionsregulator eines dieser Intermediate als Effektormolekül, um seine regulatorische Wirkung auf das *lipAB*-Operon auszuüben (siehe Abschnitt 4.4). Hier wird also eine neue Möglichkeit aufgezeigt, die Lipaseproduktion von *B. glumae* PG1 durch gezielte Eingriffe in bestimmte Stoffwechselkreisläufe zu erhöhen.

Die Lipase LipA wird in *B. glumae* PG1 über den Typ II-Sekretionsweg transportiert (Frenken *et al.*, 1993b, Knorr, 2010). Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der homologen Lipaseproduktion ergibt sich daher aus der Analyse des Sekretoms in Bezug auf solche Proteine, die unter Lipase-induzierenden Bedingungen wie die Lipase über den Typ II-Weg sekretiert werden und daher möglicherweise eine effiziente Sekretion der Lipase verhindern. Zur Identifizierung solcher Proteine wurden aus allen extrazellulär nachgewiesenen Proteinen mithilfe einer *in silico* Eingrenzung (vgl. Abschnitt 3.1.4) nur solche ausgewählt, die über ein Sec- oder Tat-Sequenzmotiv für den Transport über die innere Membran verfügen. Allerdings ist kein Sequenz-spezifisches Erkennungsmotiv für den Transport über die äußere Membran durch den Typ II-Sekretionsweg bekannt (Filloux, 2004), sodass eine weitere Eingrenzung basierend auf der Aminosäuresequenz nicht möglich war. Daher wurden ausgehend von den bereits eingegrenzten Proteinen nur solche betrachtet, die im Sekretom des Wildtypen, nicht aber in der Typ II-sekretionsdefizienten Mutante *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* identifiziert wurden. Insgesamt konnten so 10 Proteine identifiziert werden, die sehr wahrscheinlich über den Typ II-Sekretionsweg transportiert werden (Abbildung 3.4). Darunter war auch die Lipase LipA, die ja bereits als Substrat des Typ II-Sekretionswegs bekannt ist. Des Weiteren wurden drei hypothetische Proteine identifiziert, drei Proteine mit vorhergesagter enzymatischer Funktion und drei TonB-abhängige Rezeptoren. Die Identifizierung der drei, typischerweise in der äußeren Membran lokalisierten, TonB-abhängigen Rezeptoren (Ferguson & Deisenhofer, 2002) deutet möglicherweise auf einen gewissen Grad an Zelllyse hin. Allerdings kann die Existenz solcher Membranproteine im zellfreien Kulturüberstand auch durch die Ausbildung von Vesikeln erklärt werden, die periplasmatische Proteine und Proteine der äußeren Membran enthalten können (Kulp & Kuehn, 2010).

Somit konnten mögliche, bisher unbekannte Konkurrenzsubstrate der Lipase für die Sekretion über den Typ II-Sekretionsweg identifiziert werden. Solche Konkurrenzsubstrate verhindern

möglicherweise eine optimale Sekretion der Lipase, wodurch ein Teil der produzierten Lipase intrazellulär akkumuliert. Eine solche Akkumulation konnte beispielsweise in drei Tn5-Insertionsmutanten mit erhöhter Lipaseproduktion beobachtet werden (Abbildung 3.12). Die Vermeidung der Sekretionskonkurrenten durch Deletion der entsprechenden Gene könnte die Sekretionskapazität für die Lipase und damit die mögliche Ausbeute pro Kulturvolumen erhöhen.

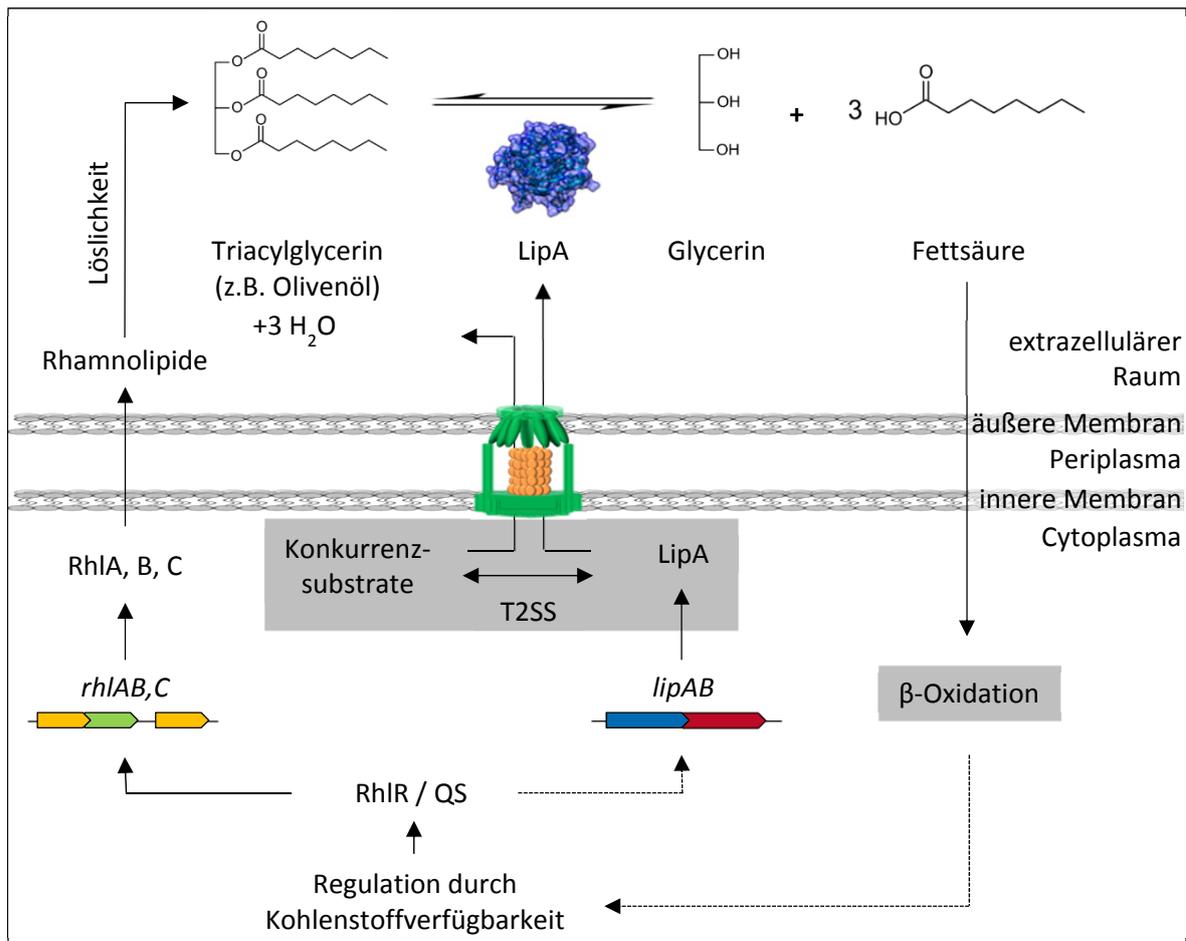


Abbildung 4.1 Physiologischer Zusammenhang zwischen Lipase- und Rhamnolipidproduktion mit möglichen Optimierungsmöglichkeiten.

Die Produktion der Lipase LipA wird durch Olivenöl auf transkriptioneller Ebene stimuliert. Gleichzeitig steigt die Produktion der Rhamnolipide. Diese erhöhen die Wasserlöslichkeit der Triacylglycerine, die durch die Lipase in Glycerin und Fettsäuren umgesetzt werden (Reaktionsschema aus Jaeger & Reetz (1998)). Die Fettsäuren werden intrazellulär durch die β-Oxidation degradiert. Das Fehlen einer möglicherweise an diesem Prozess beteiligten Acyl-CoA-Dehydrogenase (BGL_1c32350) erhöht die Lipaseproduktion. Daher kann ein regulatorischer Zusammenhang zwischen Edukten, Zwischen- oder Endprodukten der β-Oxidation oder weiterführender Stoffwechselwege und der Lipaseregulation vermutet werden (gestrichelte Pfeile). Möglicherweise ist diese Regulation abhängig vom *quorum sensing*-System, etwa über den Regulator RhIR, der auch die Gene der Rhamnolipidsynthese kontrolliert. Durch die Identifizierung von Konkurrenzsubstraten des Typ II-Sekretionssystems (T2SS) besteht zudem die Möglichkeit, gezielt die Sekretion der Lipase zu optimieren. Grau unterlegt sind die in dieser Arbeit aufgezeigten Mechanismen, über die die Lipaseproduktion optimiert werden kann.

4.3 Produktion heterologer Proteine in *B. glumae* PG1

In der Biotechnologie werden Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymen wie der Lipase verwendet, die in vielen verschiedenen Produktionsschritten eingesetzt werden (Schmid *et al.*, 2001, Jaeger & Eggert, 2002). Hier bieten sich besonders bakterielle Expressionssysteme an, da sie im Gegensatz zu pflanzlichen oder tierischen Zellen leicht zu kultivieren sind (Nagarajan, 2012). Das Gram-negative Bakterium *E. coli* wird seit Jahrzehnten als Modellorganismus in der Forschung verwendet und immer weiter für die Produktion heterologer Proteine optimiert (Chen, 2012). Das wohl bekannteste und am häufigsten verwendete Expressionssystem basiert auf der Expression der RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen (T7RP) in *E. coli* BL21(DE3). Dieses System zeichnet sich besonders dadurch aus, dass die Produktion der Zielproteine durch die Zugabe eines Induktors (IPTG) kontrollierbar und induzierbar ist (siehe Abschnitt 1.7).

Allerdings weist *E. coli* auch einige Eigenschaften auf, die für die Produktion bestimmter Proteine von Nachteil sind. Proteine, die natürlicherweise nicht im Cytoplasma lokalisiert sind, können zum Beispiel in *E. coli* nicht immer korrekt transportiert werden, da nicht alle entscheidenden Komponenten vorhanden sind. Membranproteine etwa akkumulieren in *E. coli* BL21(DE3) schnell in unlöslichen *inclusion bodies* (Hartley & Kane, 1988, Fahnert *et al.*, 2004), da sie meist über stark hydrophobe Bereiche verfügen. Daher werden für spezielle Proteine immer wieder spezielle Produktionsstämme etabliert, die durch besondere physiologische Eigenschaften bekannte Probleme umgehen können. Für Membranproteine bieten sich etwa Organismen wie *Rhodobacter capsulatus* an, die unter bestimmten Umweltbedingungen große Membranflächen ausbilden können, was die korrekte Lokalisierung von heterolog produzierten Membranproteinen erleichtert (Katzke *et al.*, 2010, Katzke *et al.*, 2012).

Weiterhin kann durch die Sekretion heterolog produzierter Proteine in den extrazellulären Raum deren intrazelluläre Akkumulation verhindert werden. Dies hat zudem den Vorteil, dass die folgenden Reinigungsschritte stark vereinfacht werden. So kann die Zellmasse etwa durch einfache Zentrifugation oder Filtrierung vom Zielprotein getrennt werden, was bei intrazellulär akkumulierenden Proteinen wesentlich aufwendiger ist. Für den Proteintransport über die Zellmembranen werden allerdings komplexe Sekretionsmechanismen benötigt, wie sie etwa *B. glumae* PG1 mit dem Typ II-Sekretionsapparat für den Transport der Lipase aufweist (siehe Abschnitt 1.6).

Wie bereits beschrieben, kann die Produktion der Lipase in *B. glumae* PG1 durch die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums stimuliert werden (Abbildung 3.2 B und Abbildung 3.4 B). Die plasmidbasierte Expression von *lipAB* steigert die produzierte und sekretierte Lipasemenge zudem noch deutlich (Abbildung 3.16). Die Fähigkeit von *B. glumae* PG1, große Mengen der homologen Lipase LipA zu synthetisieren, könnte auch auf die Produktion heterologer Proteine übertragbar sein.

Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass die T7RP plasmidkodiert in *B. glumae* PG1 produziert und zur Produktion von Modellproteinen eingesetzt werden kann (Beselin, 2005). Abbildung 3.6 B zeigt, dass auch eine genomkodierte Kopie des T7RP-Gens unter Kontrolle des *lac*-Promotors im Stamm *B. glumae* PGT7*PlacI* kontrolliert exprimiert werden kann. Als Alternative zum *lac*-Regulon wurde ein weiterer Stamm getestet, bei dem das Gen der T7RP nicht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors, sondern unter der Kontrolle des *lipAB*-Promotors steht. Dieser Promotor, der etwa durch die Zugabe von Olivenöl induziert werden kann, könnte einen entscheidenden Vorteil gegenüber künstlich induzierten Promotoren für *B. glumae* PG1 als neuartige Expressionsplattform aufweisen. Da es sich um den nativen Lipasepromotor handelt, der zudem durch einen natürlichen Induktor stimuliert wird (Abbildung 3.2 A, Boekema *et al.* (2007)), liegt die Vermutung nahe, dass die Expression der stromabwärts kodierten Gene erst dann stattfindet, wenn die Zelle über einen vollständigen Biosynthese- und Sekretionsapparat für die Lipase verfügt. Neben diesem physiologischen Aspekt stellt Olivenöl auch aus wirtschaftlicher Sicht eine interessante Alternative zu anderen Induktoren wie IPTG dar, welches zur Induktion des *lac*-Promotors verwendet wird. Die Kosten für IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM betragen 0,68 € pro Liter Kultur, während 1 % (v/v) Olivenöl mit 0,26 € pro Liter Kultur mehr als doppelt so günstig ist (Listenpreise Carl Roth, Stand 23.12.13: 100 g IPTG $\geq 99,9$ %, 715,50 €; 2,5 l Olivenöl Ph. Eur., 63,90 €). Der entsprechende Stamm *B. glumae* PGT7*Plip* produziert sogar eine deutlich größere Menge der T7RP als die klassische Variante *B. glumae* PGT7*PlacI*, und auch hier ist eine kontrollierte Produktion der Polymerase möglich, da diese ohne Induktor nicht in nachweisbaren Mengen gebildet wird (Abbildung 3.6 B).

Bei der heterologen Produktion des Modellproteins GFPmut3 zeigte sich (Abbildung 3.6 C), dass *B. glumae* PGT7*PlacI* in der Lage ist, eine nachweisbare Menge GFPmut3 zu bilden. Diese war jedoch geringer als die Menge, die im produktionsoptimierten *E. coli* BL21(DE3) gebildet wurde. Der Stamm *B. glumae* PGT7*Plip* hingegen produzierte kaum nachweisbare Mengen GFPmut3. Dies ist besonders dahingehend unerwartet, da dieser Stamm eine weitaus größere

Menge der T7RP produzierte als *B. glumae* PGT7*lacI* (Abbildung 3.6 B). Andererseits könnte auch genau dieser Umstand das Ausbleiben der GFP-Produktion erklären. *B. glumae* PGT7*Plip* und T7*PlacI* unterscheiden sich ausschließlich durch den Promotor des T7RP-Gens und, daraus resultierend, in der gebildeten T7RP-Menge. Daher ist es naheliegend, dass in *B. glumae* PGT7*Plip* gebildete T7RP aufgrund ihrer größeren Menge in inaktiven *inclusion bodies* akkumuliert. Dies ist ein bekanntes Problem bei starker Produktion heterologer Proteine, die als Stressantwort der Zelle erst aggregiert und anschließend degradiert werden (Villaverde & Carrio, 2003).

Somit muss über die Verwendung von *B. glumae* PG1 als Expressionsplattform unter Verwendung der T7RP eine differenzierte Aussage getroffen werden. Einerseits bietet sich dieser Stamm durch sein großes Produktions- und Sekretionspotenzial als neuartige Alternative zu bereits etablierten Systemen an. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden untersuchten T7-Expressionsstämme generell zur Produktion heterologer Proteine verwendet werden können. Andererseits benötigt der Ansatz eines durch Olivenöl induzierbaren Promotors weitere Optimierungsschritte, da hier zwar T7RP, aber kaum Zielprotein gebildet wird.

Trotzdem konnte hier für den Lipasepromotor gezeigt werden, dass dieser eine kontrollierte Expression des stromabwärts gelegenen T7RP-Gens ermöglicht. Die Fähigkeit eines Expressionssystems, erst nach Zugabe eines Induktors mit der Transkription des Zielgens zu beginnen, ist besonders bei der Produktion toxischer Proteine wie etwa heterologer DNase I wichtig, da solche Proteine ansonsten zum frühzeitigen Absterben der Zellkultur führen (Doherty *et al.*, 1993).

Der Lipasepromotor sollte daher weiter auf seine Anwendbarkeit für die heterologe Expression hin untersucht werden. Dazu wurde in dieser Arbeit ein plasmidbasiertes Expressionssystem erzeugt, das den wildtypischen Lipasepromotor mit einer *multiple cloning site* fusioniert, deren Sequenz an das oft verwendete Plasmid pET22b (Novagen®) adaptiert ist (siehe Anhang, Abbildung 8.1). Das Plasmidrückgrat entstammt dem *broad host range* Plasmid pBBR1-MCS (Kovach *et al.*, 1994), welches unter anderem in *E. coli*, *P. aeruginosa* und *B. glumae* repliziert werden kann. Zielgene, die in *B. glumae* PG1 exprimiert werden sollen, können so leicht aus bereits bestehenden Plasmiden wie etwa pET22b in das *B. glumae* PG1-exklusive Expressionsplasmid p*Blip* eingeführt werden. Durch den Lipasepromotor sollte auch hier eine Olivenöl-induzierte Expression des Zielgens erst dann stattfinden können, wenn die Zelle den für die Lipase nötigen Synthese- und Sekretionsapparat voll ausgebildet hat.

Zusätzlich sollte Glukose bzw. Saccharose im Medium eine Basalexpression ausgehend vom Lipasepromotor verhindern (Boekema *et al.*, 2007). Als Modellprotein wurde erneut GFPmut3 gewählt. Der immunologische Nachweis von GFPmut3 zeigte, dass dieses Plasmidsystem prinzipiell zur Herstellung heterologer Proteine in *B. glumae* PG1 genutzt werden kann (Abbildung 3.7). Allerdings fand eine deutliche Basalexpression statt, da GFPmut3 bereits vor der Induktion durch Olivenöl nachgewiesen werden konnte.

Ein Unterschied zwischen der kontrollierbaren Produktion der T7RP (Abbildung 3.6 B) und der nicht kontrollierbaren Produktion von GFPmut3 (Abbildung 3.7), die beide unter Kontrolle des Lipasepromotors stehen, liegt in der Anzahl der vorliegenden Genkopien. Während das T7RP-Gen als einzelne Kopie im Genom vorliegt, existieren mehrere Plasmide mit einem *gfpmut3*-Gen pro Zelle (Kopienzahl von pBBR1-MCS in *Brucella abortus*: ca. 10 (Elzer *et al.*, 1995)). Möglich wäre etwa, dass in Anwesenheit von Carbohydraten wie Glukose, Saccharose oder Succinat ein Repressor an den Lipasepromotor bindet und so die Expression der dahinterliegenden Gene verhindert. Erst die Anwesenheit eines bisher unbekanntes Effektormoleküls, welches möglicherweise ein Abbauprodukt des Olivenöls ist (siehe oben), inaktiviert den Repressor und ermöglicht so die Expression großer Mengen des *lipAB*-Operons (ein möglicher Regulator wird in Abschnitt 4.4 vorgestellt). Diese Regulation scheint bei einer genomischen Kopie zu einer kontrollierbaren Expression zu führen. Die Anzahl der Repressoren scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, um die höhere Anzahl der plasmidkodierten Lipasepromotoren kontrollieren zu können. Ein ähnliches Problem tritt etwa bei der *lac*-Promotor-regulierten heterologen Expression auf. Deswegen tragen viele Plasmide wie der pET22b (Novagen®) oder Plasmide der pVLT-Serie mit einem optimierten *tac*-Promotor (de Lorenzo *et al.*, 1993) ein zusätzliches Gen des *lac*-Repressors *LacI*. Dieser wird konstitutiv synthetisiert und verhindert die Expression des Zielgens vor Zugabe des Induktors.

4.4 Einfluss eines LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators auf die Bildung der Lipase

Bisher ist kein Transkriptionsregulator bekannt, der einen direkten Einfluss auf die Expression des *lipAB*-Operons in *B. glumae* PG1 hat. Daher wurden in dieser Arbeit Studien zur Identifikation solcher Regulatoren durchgeführt.

In DNA-Protein-Interaktionsstudien wurde ein putativer Regulator identifiziert, der *in vitro* an den Promotor des *lipAB*-Operons bindet (Abbildung 3.8). Dieser Regulator wurde aus einem Ganzzellextrakt von *B. glumae* PG1 isoliert, welcher unter Lipase-reprimierenden Bedingungen kultiviert wurde. Daher handelt es sich vermutlich um einen Repressor. Dieser

Regulator ist auf dem Gen BGL_1c34440 kodiert und wurde als Transkriptionsfaktor der LysR-Familie vorhergesagt (2.7.2). Unter Lipase-induzierenden Bedingungen konnte kein Protein identifiziert werden, das spezifisch an den Lipasepromotor bindet (siehe Abschnitt 3.3.1).

Die *in trans* Expression von BGL_1c34440 in *B. glumae* PG1 führte jedoch nur zu einer sehr geringen Verminderung der Lipaseaktivität (Abbildung 3.9 A). Zudem zeigten parallel durchgeführte Transkriptanalysen, dass der plasmidkodierte Regulator im Vergleich zur Kontrolle zwar stärker exprimiert wird, dies jedoch keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von *lipA* hat. (Abbildung 3.9 B). In zeitaufgelösten Studien, die in einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreuten Bachelorarbeit durchgeführt wurden, war der negative Einfluss des Regulators auf die Lipaseaktivität über den gesamten Kultivierungszeitraum von 19 Stunden nicht nachweisbar (Bollinger, 2012).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass der LysR-ähnliche Regulator eine spezifische Interaktion mit dem *lipAB*-Promotor eingeht und einen putativen, bisher unbekanntem Repressor darstellt. Dieser Einfluss konnte experimentell jedoch nicht eindeutig bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die ubiquitär verbreiteten LysR-ähnlichen Regulatoren (LTTR, *LysR-type transcriptional regulator*) nur in Verbindung mit einem spezifischen Effektormolekül reprimierend (bzw. induzierend) wirken (Maddocks & Oyston, 2008). Die Studien zum Einfluss auf die Lipaseproduktion wurden in LB-Medium mit Olivenöl durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des Repressors deutlicher darstellen zu können. Es ist also durchaus möglich, dass unter diesen Lipase-induzierenden Bedingungen das zur Repression nötige Effektormolekül nicht in ausreichenden Mengen vorhanden war. Für einen möglichen Einfluss von BGL_1c34440 auf die Lipaseproduktion in *B. glumae* PG1 spricht zudem, dass in *B. cenocepacia* ebenfalls ein LysR-ähnlicher Repressor (ShvR) identifiziert wurde, der eine reprimierende Wirkung auf die lipolytische Aktivität dieses Stamms ausübt (O'Grady *et al.*, 2011). ShvR und BGL_1c34440 weisen auf Proteinebene eine 27%ige Identität auf, wobei insgesamt 48 % der Primärstruktur ähnlich sind (PBLAST 2.2.29+, (Camacho *et al.*, 2009)). Außerdem verfügen Promotoren, die typischerweise mit LTTR interagieren, über zwei getrennte Erkennungssequenzen mit dem Muster ATC-N₉-GAT, welches als *nod*-Box bezeichnet wird (Goethals *et al.*, 1992). In der Stromaufwärts-Region des *lipAB*-Operons findet sich ein solches Motiv an der Position -31 ausgehend von *lipA*-Startcodon (Box 1, Abbildung 4.2). An Position -150 liegt ein zweites Motiv, das sehr ähnlich zur *nod*-Box ist, jedoch mit ATC-N₁₃-GAT einen längeren variablen Bereich zwischen dem palindromischen Muster aufweist (Box 2). In diesem Bereich wurde ebenfalls ein Promotor

des *lipAB*-Operons vorhergesagt, in dem ein einzelner Basenaustausch zu einer erhöhten *lipA*-Transkription führt (Abbildung 3.19 und Beselin (2005)). Beide Motive flankieren den Transkriptionsstart von *lipAB* sowie den zweiten vorhergesagten Promotor (Abbildung 4.2). Eine funktionale LTTR-Einheit besteht aus einem Homodimer, das mit einer *nod*-Box interagiert. Außerdem können zwei dieser Dimere, an unterschiedlichen Stellen des Promotors lokalisiert, eine tetramere Konformation eingehen, bei der es zu einer Konformationsänderung der DNA kommt (Maddocks & Oyston, 2008). Diese Konformationsänderung kann entweder zur Induktion oder Repression der stromabwärts gelegenen Gene führen, wie es zum Beispiel für die Regulation einer Glutamatsynthase aus *B. subtilis* gezeigt werden konnte (Picossi *et al.*, 2007).

Vor diesem Hintergrund kann für die LTTR-abhängige Regulation des *lipAB*-Operons folgendes Modell diskutiert werden: Zur Repression des *lipAB*-Operons bindet je ein Dimer aus BGL_1c34440 an die beiden *nod*-Boxen des Lipasepromotors. Durch Interaktion beider Dimere erfolgt eine Abschirmung der dazwischenliegenden DNA, auf der eine vorhergesagte Promotorregion und der Transkriptionsstart des *lipAB*-Operons liegen. Somit sind beide Promotoren nicht für die RNA-Polymerase zugänglich und es findet keine Transkription statt. Die Spezifität des Regulators für die *nod*-Box kann über ein Effektormolekül verändert werden, welches oftmals ein Teil eines Stoffwechselkreislaufes ist, der im Zusammenhang mit dem regulierten Gen steht. In *B. glumae* wird etwa die Toxoflavin-Synthese und der Transport der Toxoflavine über einen LysR-ähnlichen Regulator ToxR gesteuert, der wiederum mit Toxoflavin als Effektormolekül interagiert (Kim *et al.*, 2004). Solche Moleküle können entweder dazu führen, dass LTTR an die *nod*-Box bindet oder die Spezifität für die DNA verliert, wobei die genaue Funktion für jeden Regulator und jedes Effektormolekül unterschiedlich sein kann (Maddocks & Oyston, 2008). Da bei der *in trans* Expression von BGL_1c34440 nur eine geringe Reduktion der Lipaseaktivität messbar war (Abbildung 3.9 A), ist es möglich, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen ein Effektormolekül, welches für die reprimierende Wirkung des Regulators verantwortlich ist, nicht in ausreichenden Mengen vorhanden war. Welcher Art der Zusammenhang zwischen Effektor, Regulator und *nod*-Box für das *lipAB*-Operon ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise interagieren hier aber Carbonsäure-Salze wie Succinat direkt mit dem Regulator, wie es auch für Malonat und den Regulator MdcR in *Klebsiella pneumoniae* der Fall ist (Peng *et al.*, 1999). Picossi *et al.* (2007) zeigten zudem in *B. subtilis*, dass der Regulator GltC durch Interaktion mit α -Ketoglutarat eine induzierende Funktion hat, diese Funktion aber durch Interaktion mit

Glutamat verhindert wird. Somit ist auch im Fall von BGL_1c34440 möglich, dass dieser Regulator in Verbindung mit einem ersten Effektormolekül (welches in den *in vivo* Nachweisen aber fehlte) eine reprimierende Wirkung auf das *lipAB*-Operon ausübt, diese Wirkung aber durch ein zweites Effektormolekül verhindert wird. Hier wäre ein Edukt oder Zwischenprodukt der Fettsäure-degradierenden β -Oxidation denkbar, welches der Zelle das Vorhandensein von etwa Olivenöl signalisiert und so die Produktion der Lipase an die vorhandenen Kohlenstoffquellen anpasst. Dass die β -Oxidation möglicherweise in einem regulatorischen Zusammenhang mit der Lipaseproduktion steht, wurde bereits anhand einer Tn5-Insertionsmutante diskutiert (siehe Abschnitt 4.2). An diesem Punkt können weitere Studien anknüpfen, die den Einfluss von BGL_1c34440 auf die Lipaseproduktion und die Verknüpfung zwischen Kohlenstoffquelle und *lipAB*-Regulation näher untersuchen. Die Grundlage dafür liefert die vorliegende Arbeit durch die Identifizierung von zwei *nod*-Boxen im Promotor des *lipAB*-Operons und eines putativen LysR-ähnlichen Repressors.

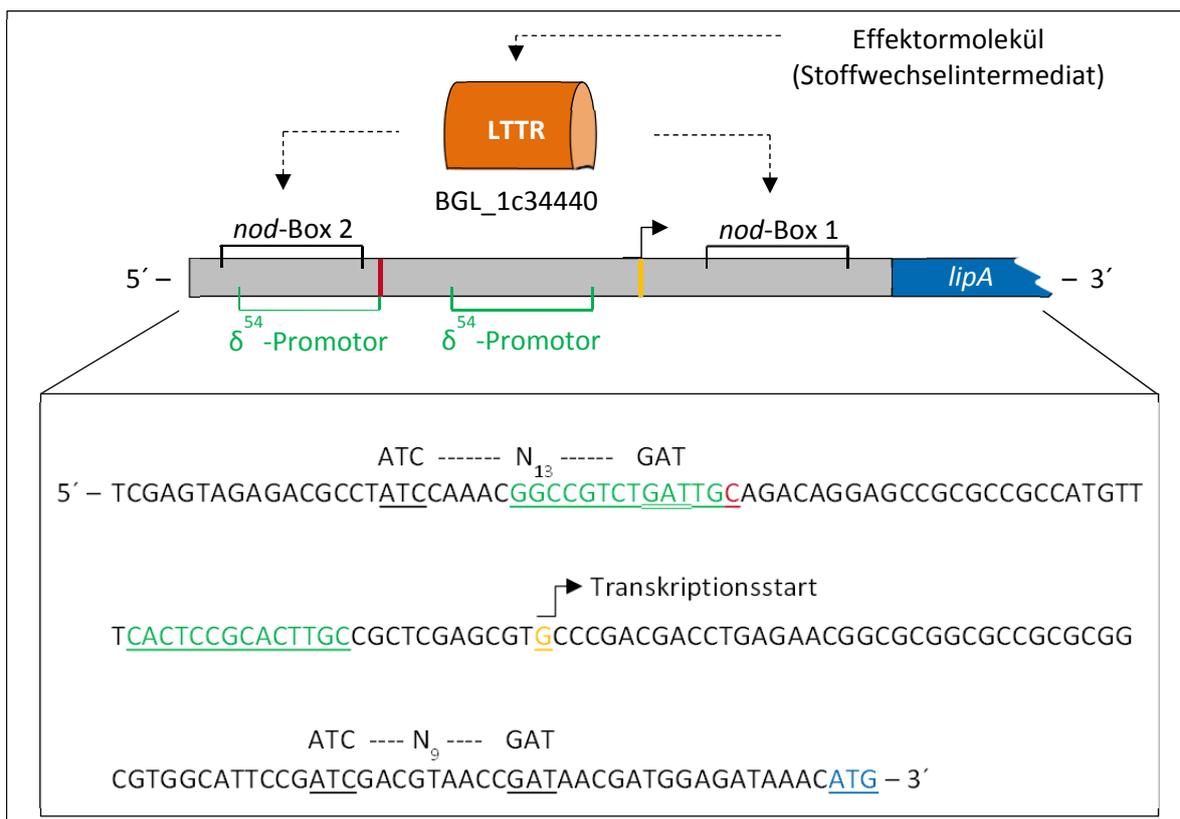


Abbildung 4.2 Mögliche Regulation von *lipAB* durch zwei *nod*-Boxen im Promotor.

Dargestellt ist der Promotor des *lipAB*-Operons mit zwei putativen Promotor-Bindestellen (grün) und dem experimentell ermittelten Transkriptionsstart (gelb, Beselin (2005)). Das Konsensusmotiv ATC-N₉-GAT (Goethals *et al.*, 1992) deckt sich mit dem als „*nod*-Box 1“ bezeichneten Bereich nahe des *lipA*-Startcodons (blau). Die „*nod*-Box 2“ zeigt ein sehr ähnliches Motiv (ATC-N₁₃-GAT) und überlagert einen der beiden vorhergesagten Promotoren. In direkter Nähe befindet sich die Position für die transkriptionsverstärkende Punktmutation (rot). Beide *nod*-Boxen flankieren den zweiten putativen Promotor und den Transkriptionsstart. Die Interaktion des LysR-ähnlichen Regulators BGL_1c34440 mit den *nod*-Boxen wird möglicherweise über ein Stoffwechselintermediat moduliert (gestrichelte Linien).

4.5 Die Regulation der Lipase ist Teil eines komplexen Netzwerks

Der Vergleich des Transkriptoms von *B. glumae* PG1 unter Lipase-induzierenden und -reprimierenden Bedingungen deutet durch die hohe Anzahl von Genen mit veränderter Transkriptmenge eine komplexe Regulation des *lipAB*-Operons an (vgl. Abschnitt 3.1.5). Da durch die unterschiedlichen verfügbaren Kohlenstoffquellen jedoch vermutlich auch der komplette Stoffwechsel von *B. glumae* PG1 beeinflusst war, kann allein anhand der Transkriptomdaten keine direkte Zuordnung einzelner Regulationskreisläufe zur Lipaseregulation stattfinden. Um mögliche regulatorische Einflüsse auf das *lipAB*-Operon näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Tn5-Insertionsbibliothek erstellt und anschließend auf erhöhte Lipaseproduktion durchmustert (Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2). Insgesamt konnten 18 Gene identifiziert werden, deren Disruption durch das Tn5-Transposon zu einer erhöhten lipolytischen Aktivität von *B. glumae* PG1 auf Lipase-Indikatorplatten führte (siehe Tabelle 8.2 im Anhang). Exemplarisch konnte zudem für drei Klone nachgewiesen werden, dass dieser Effekt auf eine erhöhte *lipA*-Transkription zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13).

Insgesamt haben nur drei der 18 Gene eine vorhergesagte Funktion als Transkriptionsregulator, die anderen sind vermutlich mit dem Zellmetabolismus oder anderen zellulären Funktionen assoziiert (siehe Tabelle 8.2). Dies bestärkt die Vermutung, dass die Lipase in *B. glumae* PG1 Teil eines komplexen Regulationsnetzwerkes ist. Schließlich führt auch die Inaktivierung von Genen, die in keinem direkten Zusammenhang mit der Lipase stehen, zur Erhöhung der lipolytischen Aktivität.

Das tiefere Verständnis der Regulation des *lipAB*-Operons ist ein grundlegendes Ziel dieser Arbeit. Daher soll hier kurz diskutiert werden, ob die drei Gene, deren Proteine eine vorhergesagte Funktion als Transkriptionsregulatoren haben, möglicherweise in einem direkten Zusammenhang mit der Lipaseexpression stehen: Das Gen BGL_1c32360 kodiert für einen Transkriptionsregulator der TetR-Familie. Generell haben solche Regulatoren eine reprimierende Funktion auf eine Vielzahl von zellulären Mechanismen (Ramos *et al.*, 2005). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Disruption des entsprechenden Gens zu einer Erhöhung der Lipaseproduktion führt. Für Regulatoren der TetR-Familie in *Burkholderia xenovorans* konnte erst kürzlich ein Konsensusmotiv erstellt werden (Maity *et al.*, 2012), welches das Muster TGTTA-N₁₀₋₁₅-TAACA erhält. Ein solches Motiv ist jedoch nicht im Promotor des *lipAB*-Operons zu finden. Daher kann vermutet werden, dass das Fehlen des

TetR-ähnlichen Repressors die Expression der Lipase nicht direkt beeinflusst, sondern indirekt über Beeinflussung anderer regulatorischer Systeme.

Das auf dem Gen BGL_1c12560 kodierte Protein hat ebenfalls eine putative Funktion als Transkriptionsregulator. Der Vergleich der konservierten Domänen mit Hilfe des Programms „CDD“ (Marchler-Bauer *et al.*, 2011) zeigte, dass das entsprechende Protein homolog zum Transkriptionsaktivator PspF ist. Dieser aktiviert in *E. coli* die δ^{54} -abhängige Expression eines bestimmten Operons (Jovanovic & Model, 1997, Lloyd *et al.*, 2004). Da auch das *lipAB*-Operon über zwei δ^{54} -Promotoren verfügt (Beselin, 2005), besteht möglicherweise ein direkter Zusammenhang zwischen der Disruption von BGL_1c12560 und der gesteigerten Lipaseproduktion in *B. glumae* PG1. Andererseits sollte das Fehlen eines putativen Aktivators eigentlich zur Reduktion der Lipaseproduktion führen, was den hier erzielten experimentellen Daten widerspricht. Daher kann auch dieser Regulator nicht eindeutig der direkten Regulation des Lipaseoperons zugeordnet werden.

Transkriptionsregulatoren der GntR-Familie, zu der auch das Protein des Gens BGL_2c27450 gezählt werden kann, weisen eine hohe Diversität bezüglich ihrer physiologischen Funktion, aber auch ihrer DNA-Bindemotive auf (Hoskisson & Rigali, 2009). Daher kann hier nicht näher untersucht werden, ob dieser Regulator direkt mit dem Lipasepromotor interagiert. Allerdings sind viele Beispiele für GntR-ähnliche Regulatoren mit Funktion im Zentralmetabolismus bekannt und für *E. coli* wurde gezeigt, dass ein solcher Regulator am Fettsäuremetabolismus beteiligt ist (DiRusso & Nystrom, 1998). Da auch in vorherigen Abschnitten dieser Arbeit diskutiert wurde, dass die Lipase über Edukte oder (Zwischen-) Produkte des Fettsäureabbaus reguliert wird, ist es durchaus denkbar, dass der GntR-ähnliche Regulator BGL_2c27450 direkt oder indirekt an der Lipaseregulation beteiligt ist.

Für drei Insertionsmutanten wurde exemplarisch der Einfluss der Gendisruption auf die Lipaseproduktion näher charakterisiert. Die entsprechenden Tn5-Insertionsmutanten zeigten nach Kultivierung im Schüttelkolben eine deutlich erhöhte Lipaseaktivität im Kulturüberstand und im Ganzzellextrakt im Vergleich zum Wildtypen (Abbildung 3.12). Für alle drei konnte dies auf eine erhöhte Transkriptmenge von *lipA* zurückgeführt werden (Abbildung 3.13).

In *B. glumae* PG1 Δ BGL_2c04170 wurde das Gen einer unspezifischen Serin/Threonin-Kinase inaktiviert, die möglicherweise Teil eines Zwei-Komponenten-Systems (Stock *et al.*, 2000, Podgornaia & Laub, 2013) sein könnte, durch das auch die Lipaseexpression reguliert wird. Ein solches Zwei-Komponenten-System, bestehend aus der Sensorkinase CbrA und dem

Antwortregulator CbrB, reguliert in *P. aeruginosa* die Expression des Lipaseoperons (Nishijyo *et al.*, 2001, Abdou *et al.*, 2011, Yeung *et al.*, 2011). Die Gene beider Proteine liegen laut Vorhersage der Pseudomonas-Datenbank (Winsor *et al.*, 2011) auf einem gemeinsamen Operon. Stromabwärts des Gens BGL_2c04170 findet sich ebenfalls ein (hypothetischer) Antwortregulator BGL_2c04160, sodass auch hier ein Zwei-Komponenten-System denkbar ist, welches ähnlich dem CbrA/B-System in *P. aeruginosa* einen Einfluss auf die Lipaseproduktion hat. Allerdings sind die Serin/Threonin-Kinase aus *B. glumae* PG1 und CbrA aus *P. aeruginosa* weder auf DNA- noch auf Proteinebene homolog (Sequenzvergleich mit NCBI BLASTN und BLASTP 2.2.29+ (Camacho *et al.*, 2009)).

Das in *B. glumae* PG1ΔBGL_2c07240 inaktivierte Gen kodiert eine Untereinheit eines ABC-Transporters (Typ I-Sekretion, siehe Einleitung Abschnitt 1.6) und das in *B. glumae* PG1ΔBGL_1c34940 inaktivierte Gen ist homolog zur Muramidase FlgJ, die an der Ausbildung von Flagellen beteiligt ist (Nambu *et al.*, 1999). Bei beiden Genen ist kein direkter Bezug zur Lipase ersichtlich, was einmal mehr darauf hindeutet, dass die Regulation des *lipAB*-Operons in einem größeren Netzwerk verankert ist. Trotz – oder gerade wegen – des nicht vollständig aufklärbaren Zusammenhangs einzelner Tn5-Insertionen mit der Lipaseproduktion liefern die hier erzielten Ergebnisse eine Grundlage für die weitere Erforschung der Lipaseregulation.

Die Transkriptanalyse der drei Insertionsmutanten ergab einige Auffälligkeiten (Abbildung 3.13). Erstens war zwar die *lipA*-Transkriptmenge etwa vier- bis achtfach erhöht, die Mengen des im gleichen Operon kodierten *lipB* zeigten jedoch eine gegenläufige Tendenz und waren im Vergleich zum Wildtypen um den Faktor zwei bis acht verringert. Dieses Phänomen wird in Abschnitt 4.8 ausführlich anhand weiterer Experimente erörtert. Zweitens wies *B. glumae* PG1ΔBGL_2c04170 eine etwa vierfach erhöhte *gspD*-Transkriptmenge und eine etwa zweifach erhöhte Transkriptmenge der Gene *gspE* und *gspF* auf. Die drei Gene sind als *gspDEF*-Operon zusammen im Genom von *B. glumae* PG1 lokalisiert. Die entsprechenden Genprodukte sind Bestandteile des Typ II-Sekretionsapparates, der für die Sekretion der Lipase essenziell ist. Dies wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Frenken *et al.*, 1993b, Knorr, 2010) und durch die Analyse des Sekretoms in dieser Arbeit bestätigt (vgl. Abschnitt 3.1.4). Der Zusammenhang zwischen veränderter Lipaseproduktion und dem Typ II-Sekretionsapparat wird im nächsten Abschnitt genauer analysiert.

4.6 Einfluss der Sekretion auf die Produktion der Lipase

In älteren Studien durchgeführte Komplementationsexperimente mit dem Typ II-sekretionsdefizienten Stamm *B. glumae* PG1Δ*gspD* lieferten bereits erste Hinweise darauf, dass eine *in trans* exprimierte Kopie von *gspD* in der Sekretionsmutante einen Einfluss auf die Lipaseproduktion hat (Knorr, 2010). Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurden Versuche zur Lipaseaktivität und Transkriptmengenbestimmungen für den Wildtypen und die sekretionsdefiziente Mutante *B. glumae* PG1Δ*gspD* durchgeführt. Beide Stämme wurden entweder mit einem Leervektor oder einem *gspD*-tragenden Plasmid (pBBR1-*gspD*) unter Lipase-induzierenden Bedingungen kultiviert (vgl. Abschnitt 3.5). Durch das Fehlen der Sekretionspore GspD in der äußeren Membran von *B. glumae* PG1Δ*gspD* war eine intrazelluläre Akkumulation der Lipase zu erwarten. Während cytoplasmatische Lipase enzymatisch inaktiv ist und daher nicht mittels eines Aktivitätstests nachgewiesen werden kann, sollte zumindest die periplasmatisch lokalisierte Lipase in diesem Test detektiert werden können. Allerdings wies *B. glumae* PG1Δ*gspD* sowohl intrazellulär als auch extrazellulär nahezu keine lipolytische Aktivität auf (Abbildung 3.14). Gleichzeitig waren die Transkriptmengen von *lipA* und *lipB* im Vergleich zum Wildtypen etwa vierfach reduziert (Abbildung 3.15). Damit lässt sich das Ausbleiben der lipolytischen Aktivität durch eine reprimierte *lipAB*-Transkription erklären. Es besteht also ein regulatorischer Zusammenhang zwischen einem funktionsfähigen Typ II-Sekretionsapparat und der Transkription des *lipAB*-Operons.

Aus physiologischer Sicht erscheint es für einen Organismus durchaus sinnvoll, die Produktion einer sekretierten Lipase durch einen solchen Rückkopplungseffekt zu verhindern, wenn der für die Sekretion verantwortliche Apparat nicht vollständig ausgebildet ist. Schließlich scheint die Produktion einer Fett-degradierenden Lipase nur dann als ökonomisch sinnvoll, wenn sie auch in das fetthaltige Medium sekretiert werden kann. Ein ähnliches Phänomen konnte auch für einen ABC-Transporter (Typ I-Sekretionssystem) und die durch diesen Komplex sekretierte α -Amylase in *B. subtilis* gezeigt werden (Leskela *et al.*, 1999). Hier führte eine Mutation in der ATPase des Transporters nicht nur zur Reduktion extrazellulärer Amylase, sondern auch zu einer verminderten Transkription des Amylasegens. Allerdings ist bisher nicht bekannt, in welcher Form ein defekter Sekretionsapparat von der Zelle erkannt wird und wie dieses Signal Einfluss auf Genregulation nimmt.

In den Komplementationsstudien, in denen die Deletion von *gspD* durch eine plasmidkodierte *gspD*-Kopie ausgeglichen werden sollte, zeigte sich, dass der oben beschriebene

Rückkopplungseffekt bidirektional funktioniert. Die komplementierte Sekretionsmutante weist im Vergleich zum Wildtypen sowohl intra- als auch extrazellulär eine deutlich erhöhte Lipaseaktivität auf (Abbildung 3.14). Die gesteigerte Lipaseaktivität kann wiederum auf eine erhöhte Transkriptmenge von *lipA* und *lipB* zurückgeführt werden (Abbildung 3.15). Diese Steigerung ist allerdings nicht im Wildtypen mit *in trans* exprimiertem *gspD* zu beobachten. Hier ist zwar ebenfalls eine durch die plasmidbasierte Expression von *gspD* bedingte erhöhte *gspD*-Transkriptmenge nachweisbar, diese hat jedoch keinen Einfluss auf die *lipAB*-Transkriptmenge und die intra- und extrazelluläre Lipaseaktivität. Dieser Unterschied zwischen *B. glumae* PG1 und PG1 Δ *gspD* könnte jedoch durch die Konstruktion der Mutante erklärt werden. Da *gspD* gemeinsam mit *gspE* und *gspF* in einem Operon kodiert ist, wurde *gspD* durch eine konstitutiv exprimierte Kanamycin-Resistenzkassette in gleicher Leserichtung ersetzt. Die Transkriptanalysen (Abbildung 3.15) unterstützen zwar die Beobachtung von J. Knorr, dass die Transkriptmengen von *gspE* und *gspF* von dieser nicht-physiologisch regulierten Expression nicht beeinflusst sind (Knorr, 2010). Möglicherweise reicht aber bereits eine sehr gering veränderte Transkriptmenge von *gspE* und *gspF* im Zusammenspiel mit einer stark erhöhten Transkriptmenge des plasmidkodierten *gspD* in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* aus, um einen induzierenden Einfluss auf die Lipaseproduktion zu haben, der in dieser Form nicht im Wildtypen nachbildbar ist.

Hier konnte also erstmals gezeigt werden, dass die Lipaseexpression in *B. glumae* PG1 durch ein bisher noch unbekanntes Signal vom Vorhandensein eines funktionsfähigen Sekretionsapparates abhängig ist. Zusätzlich scheint unter gewissen Expressionsbedingungen des *gspDEF*-Operons eine erhöhte Lipaseproduktion und -sekretion möglich, was durchaus auch für eine Optimierung von *B. glumae* PG1 hinsichtlich einer verbesserten Lipasesekretion genutzt werden kann.

Da ein erhöhtes *gspD*-Level eine verstärkte *lipAB*-Expression zur Folge hat, stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auch in der anderen Richtung auftritt, also ob eine verstärkte Lipaseproduktion auch einen transkriptionellen Einfluss auf die *gspD*-Expression hat. Die Analyse des Transkriptoms von *B. glumae* PG1 im Vergleich zwischen Lipase-induzierenden und -reprimierenden Bedingungen (vgl. Abschnitt 3.1.5) zeigte jedoch, dass die Transkriptmenge von *gspD* nicht signifikant verändert war. Der für die QS-abhängige Regulation des Typ II-Sekretionsapparates verantwortliche Regulator QsmR (Goo *et al.*, 2010) zeigte ebenfalls keine Änderung der Transkriptmenge durch die Induktion der Lipase. Gleiches

zeigte sich auch bei der Analyse des Einflusses der beiden Punktmutationen im *lipAB*-Operon aus *B. glumae* Lu8093: Die Mutationen erhöhen zwar die Transkription, Produktion und Sekretion der Lipase, dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von *gspD* (vgl. Abbildung 3.16 und Abbildung 3.19). Demnach hat zwar das *gspD*-Level in *B. glumae* PG1 einen Einfluss auf die Expression von *lipA*, die Expression von *lipA* unter den gewählten Versuchsbedingungen aber nicht auf die Transkription von *gspD*.

Betrachtet man unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis noch einmal die Tn5-Insertionsmutante PG1 Δ BGL_2c04170, in der sowohl die Transkriptmenge von *lipA* als auch von *gspD* erhöht ist, ist auch die Schlussfolgerung möglich, dass das Fehlen der unspezifischen Serin/Threonin-Kinase in dieser Mutante einen induzierenden Einfluss auf die Expression von *gspD* hat, was wiederum zu einer erhöhten Lipaseproduktion führt. Dieser Zusammenhang liefert auch einen neuen Erklärungsansatz, warum in QS-defizienten *B. glumae*-Stämmen keine Lipasesekretion feststellbar ist (Devescovi *et al.*, 2007, Goo *et al.*, 2010). Anders als von den Autoren vermutet, könnte die Lipase nicht direkt über das QS-System, sondern indirekt über den QS-abhängigen Typ II-Sekretionsapparat reguliert werden.

Letztendlich können zwar die zugrundeliegenden Mechanismen zurzeit nicht endgültig aufgeklärt werden, trotzdem liefern die Untersuchungen zum regulatorischen Einfluss des Typ II-Sekretionswegs auf die Lipaseproduktion neue und vielversprechende Möglichkeiten für eine Optimierung der Lipaseproduktion in *B. glumae* PG1.

4.7 Analyse eines optimierten *lipAB*-Operons

Der direkte Genomvergleich zwischen *B. glumae* PG1 und dem von der BASF SE generierten Derivat *B. glumae* Lu8093 zeigte, dass von den insgesamt 72 Punktmutationen im *B. glumae* Lu8093 zwei direkt mit dem Lipaseoperon assoziiert sind (S. Voget, unveröffentlicht). Einer dieser Basenaustausche befindet sich in der Promotorregion des Operons und erhöht die Transkriptionsrate des *lipA*-Gens (Beselin, 2005). Die zweite Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin an Position 4 des Lipaseproteins. Der Austausch findet also am N-Terminus des Signalpeptids statt, welcher für die Erkennung der Lipase durch den Sec-Apparat verantwortlich ist (Cunningham & Wickner, 1989, Frenken *et al.*, 1992).

Um die Auswirkung dieser beiden Mutationen einzeln sowie in Kombination miteinander zu untersuchen, wurden plasmidkodierte Lipasevarianten erstellt, die jeweils nur eine der beiden oder aber beide Mutationen tragen. Diese Lipasevarianten wurden in einem *lipAB*-defizienten *B. glumae* PG1-Stamm exprimiert und die Effekte der Mutationen mittels Lipaseaktivitätsmessungen, Proteinmengenbestimmung (Western Blot) und Transkriptmengenbestimmung (*real-time* qPCR) untersucht (siehe Abschnitt 3.6). Unter identischen Bedingungen wurden ebenfalls *B. glumae* PG1 und Lu8093 mit Leervektor analysiert. Dabei zeigte sich, dass die optimierte Lipaseproduktion und -sekretion von *B. glumae* Lu8093 im Vergleich zu *B. glumae* PG1 auf eine erhöhte Transkriptmenge von *lipA* und *lipB* zurückzuführen ist (Abbildung 3.16 A und Abbildung 3.19). Die Analyse der Lipasevariante mit der Mutation im Promotor (P_{Lu}) zeigte, dass diese Mutation zu einer erhöhten Menge der Lipase im Überstand und der Foldase im Ganzellextrakt führt (Abbildung 3.17). Ebenfalls wurde eine zwanzigfach erhöhte Lipaseaktivität festgestellt (Abbildung 3.16 B), die demnach einer erhöhte Lipaseproduktion und -sekretion zugeschrieben werden kann. Die verstärkte Produktion der Lipase lässt sich durch eine um den Faktor 16 gesteigerte Transkriptmenge von *lipA* erklären (Abbildung 3.19). Allerdings zeigte sich kein Unterschied in der *lipB*-Transkriptmenge, obwohl die Proteinmenge im Ganzellextrakt im Vergleich zur wildtypischen Lipasevariante deutlich erhöht war.

Die Mutation im Signalpeptid der Lipase führt zu einer vierfach erhöhten Lipaseaktivität im Überstand, die ebenfalls auf eine erhöhte Proteinmenge zurückgeführt werden kann (Abbildung 3.16 B und Abbildung 3.17). Die Transkriptmenge von *lipA* ist jedoch im Vergleich zur wildtypischen Variante nicht erhöht (Abbildung 3.19). Daher resultiert die erhöhte Lipasemenge im Überstand nicht aus einer allgemein erhöhten Bildung der Lipase. Da zudem eine erhöhte Zellyse ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 3.18), führt die Mutation im Signalpeptid also zu einer verbesserten Sekretion der Lipase in den extrazellulären Raum.

Beide Mutationen zusammen zeigen zudem einen synergetischen Effekt und steigern die gemessene Lipasemenge und -aktivität im Überstand und Ganzellextrakt noch einmal deutlich (Abbildung 3.16 B und Abbildung 3.17). Die im Vergleich zu den Stämmen mit Leervektor generell deutlich höhere Lipaseaktivität in Kulturen, die die plasmidkodierten Lipasevarianten exprimieren, lässt sich durch die erhöhte Kopienzahl des *lipAB*-Operons erklären. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für das Expressionsplasmid *pBlip* mit dem Lipasepromotor beschrieben (vgl. Abschnitt 4.3).

Zwar liegen keine experimentellen Daten zu den anderen Punktmutationen in *B. glumae* Lu8093 vor, mit den hier durchgeführten Analysen kann aber zumindest ein Teil der Produktionssteigerung auf die beiden Mutationen zurückgeführt werden, die mit dem Lipaseoperon in direkter Verbindung stehen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen kann der Einfluss der beiden Mutationen wie folgt gedeutet werden: Der Basenaustausch im Promotor des *lipAB*-Operons erhöht die Transkriptmenge von *lipA*, nicht aber die von *lipB*. Mögliche Gründe hierfür werden im nächsten Kapitel erörtert. Durch die höhere Menge *lipA*-Transkript wird mehr Lipase gebildet. Der Aminosäureaustausch in der Signalsequenz von LipA ersetzt das hydrophile, polare Serin gegen ein unpolares, hydrophobes Leucin. Der N-terminale Bereich des Signalpeptids, in dem dieser Austausch stattfindet, ist für die Interaktion mit der ATPase des Sec-Translocons SecA verantwortlich und besteht typischerweise aus einer positiv geladenen N-Domäne und einem hydrophoben Bereich (Cunningham & Wickner, 1989, Natale *et al.*, 2008). Durch den Austausch von Serin gegen Leucin wird die Hydrophobizität dieses Bereichs erhöht, sodass eine verbesserte Interaktion mit SecA und dadurch eine beschleunigte Sekretion durch die innere Membran denkbar ist. Der synergetische Effekt beider Mutationen kann dadurch erklärt werden, dass die durch die gesteigerte Transkription erhöhte Menge cytoplasmatischer Lipase nun durch eine verbesserte Interaktion mit SecA auch schneller in den periplasmatischen Raum sekretiert werden kann. Da die Lipase erst im Periplasma enzymatisch aktiv wird, kann sie erst hier intrazellulär mittels Aktivitätstest nachgewiesen werden. Die ähnlichen *lipA*-Transkriptmengen ausgehend von der Variante mit Promotormutation bzw. Doppelmutation lässt vermuten, dass in beiden Fällen ähnliche Mengen cytoplasmatisch lokalisierter Lipase gebildet werden (Abbildung 3.19). Im Falle der Doppelmutation aber erfolgt der Transport über die innere Membran effektiver, da hier mehr intrazelluläre (sprich: periplasmatische) Aktivität gemessen wurde. Beide Mutationen zusammen erhöhen also die Lipaseproduktion und -sekretion.

Besonders die Mutation im Signalpeptid der Lipase zeigt erstmals für *B. glumae* PG1, dass eine effektive Sekretion der Lipase nicht nur von der produzierten Menge, sondern auch von einer optimierten Interaktion mit dem Sekretionsapparat abhängt. Abbildung 4.3 stellt noch einmal schematisch dar, welche Regulationsmechanismen und Optimierungsmöglichkeiten der Lipaseproduktion in den letzten beiden Kapiteln erarbeitet wurden.

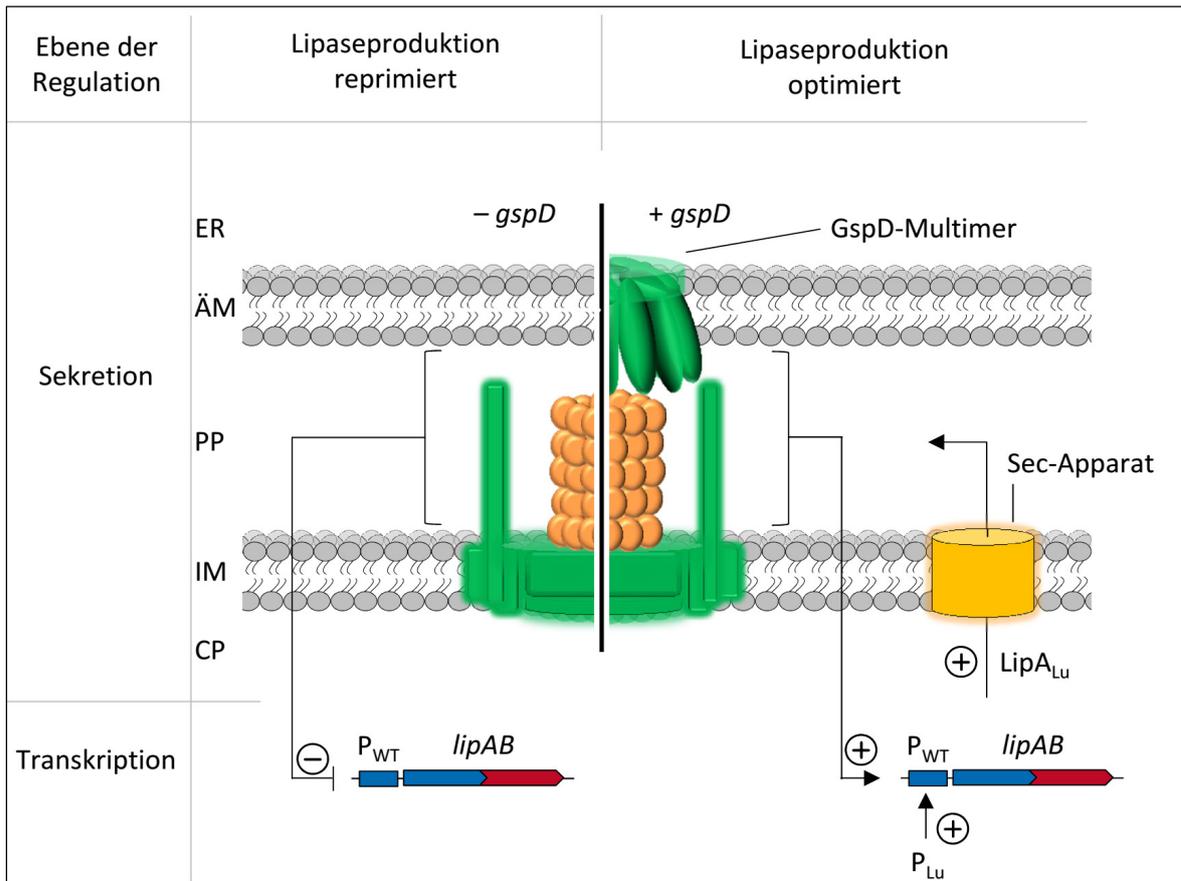


Abbildung 4.3 Regulatorische Zusammenhänge der Lipaseproduktion und -sekretion.

Schematisch dargestellt sind die Erkenntnisse aus Abschnitt 4.6 und 4.7. In *B. glumae* PG1 reguliert ein bisher unbekannter Signalweg die Transkription des *lipAB*-Operons in Abhängigkeit eines funktionsfähigen Typ II-Sekretionswegs. Ein unvollständiger Typ II-Sekretionsapparat inhibiert die Lipaseproduktion auf Ebene der Transkription. Ein erhöhtes *gspD*-Transkriptlevel hingegen kann unter gewissen Bedingungen die Produktion und Sekretion der Lipase LipA deutlich erhöhen. Eine erhöhte Sekretionseffizienz der Lipase wird auch durch einen Aminosäureaustausch in der Signalsequenz ($LipA_{Lu}$) erreicht, die vermutlich eine verbesserte Sekretion durch den Sec-Apparat ermöglicht. Im Zusammenspiel mit einer transkriptionssteigernden Mutation im Promotor (P_{Lu}) erhöht dies die Menge extrazellulärer Lipase deutlich. Abgekürzt sind Cytoplasma (CP), innere Membran (IM), Periplasma (PP), äußere Membran (ÄM) und extrazellulärer Raum (ER). Induzierende Effekte sind mit (+), reprimierende Effekte mit (-) gekennzeichnet.

4.8 LipA-unabhängige Regulation der LipB-Produktion

Die Lipase LipA benötigt das Lipase-spezifische Chaperon LipB für die Erlangung ihrer enzymatisch aktiven Konformation (Frenken *et al.*, 1993b, Pauwels *et al.*, 2006, Pauwels *et al.*, 2012). Die Gene beider Proteine liegen in *B. glumae* PG1 in einem bicistronischen Operon vor, wobei das sich das Stoppcodon von *lipA* mit dem Startcodon von *lipB* überlagert (Frenken *et al.*, 1993a). Vergleichende Transkriptstudien mit *B. glumae* PG1 unter Lipase-induzierenden

und -reprimierenden Bedingungen zeigten, dass die Transkriptmengen von *lipA* und *lipB* – induziert durch Olivenöl – beide um etwa den gleichen Faktor ansteigen (Abbildung 3.2 A). Auch der Vergleich zwischen *B. glumae* PG1 und dem Lipaseproduktionsstamm *B. glumae* Lu8093 zeigte, dass ein Anstieg der gemessenen Lipaseaktivität durch eine erhöhte Transkriptmenge von sowohl *lipA* als auch *lipB* erklärt werden kann (Abbildung 3.19, links). Diese konvergente Änderung der Transkriptmengen scheint jedoch nicht zwingend gegeben zu sein. So zeigte sich bei der Analyse der *lipAB*-Varianten, die eine Punktmutation im Promotor aufweisen, dass zwar die Transkriptmenge von *lipA* erhöht wird, die *lipB*-Transkriptmenge jedoch nicht beeinflusst ist (Abbildung 3.19, rechts). Auch die Transkriptmengenbestimmung in Tn5-Insertionsmutanten mit erhöhter Lipaseproduktion (vgl. Abbildung 3.12 und 3.13) zeigte, dass die erhöhte Lipaseaktivität durch mehr *lipA*-Transkript bedingt wird. Aber auch hier war die Transkriptmenge von *lipB* entweder nicht verändert oder sogar im Vergleich zum Wildtypen geringfügig vermindert. Bereits Frenken *et al.* (1993a) wiesen durch die Analyse des *lipAB*-Transkripts mittels Northern Blot darauf hin, dass zwar eine gemeinsame mRNA mit ca. 2600 bp detektiert werden konnte, aber auch eine weitere, dominierende *lipA*-mRNA-Spezies mit ca. 1400 bp vorhanden war.

Daher stellt sich die Frage, ob der Grund für die Transkriptmengenunterschiede zwischen *lipA* und *lipB* eine unterschiedlich starke Transkription beider Gene ist oder ob regulatorische Mechanismen erst nach der Transkription, also posttranskriptionell, für den Unterschied verantwortlich sind. Um dies zu überprüfen, wurden transkriptionelle Reporterfusionen mit dem wildtypischen *lipAB*-Promotor (P_{WT}) bzw. dem stärkeren Promotor P_{Lu} erstellt (siehe Schema in Abbildung 3.20). *B. glumae* PG1-Stämme mit einem Plasmid, welches *lipA* und *gfpmut3* (statt *lipB*) kodiert, wiesen eine höhere lipolytische Aktivität im zellfreien Kulturüberstand auf als solche, auf deren Plasmid das *lipA*-Gen durch *gfpmut3* ersetzt war (Abbildung 3.21 A). Dies war jedoch zu erwarten, da durch erstere Konstrukte eine höhere *lipA*-Kopienzahl vorlag.

Der Nachweis von GFPmut3 mittels fluorometrischer Quantifizierung ergab unter Verwendung des wildtypischen Promotors P_{WT} identische GFPmut3-Mengen sowohl für den *lipA*-Reporter als auch für den *lipB*-Reporter (Abbildung 3.21 B). Demnach werden beide Gene unter Kontrolle von P_{WT} in gleichen Mengen exprimiert. Unter Kontrolle des stärkeren Promotors P_{Lu} werden beide Gene ebenfalls in ähnlichen Mengen (wenn auch häufiger als mit P_{WT}) transkribiert. Trotzdem wurde mittels *real-time* qPCR, die die Transkriptmenge zu einem definierten Zeitpunkt widerspiegelt, ein Anstieg der *lipA*-, nicht aber der *lipB*-

Transkriptmenge unter Kontrolle des Promotors P_{L_u} gemessen (vgl. Abbildung 3.19 „ $\Delta lipAB$ $P_{WT} lipAB$ “ mit „ $\Delta lipAB$ $P_{L_u} lipAB$ “). Demnach muss eine posttranskriptionelle Regulation stattfinden.

Um nähere Erkenntnisse zu einer posttranskriptionellen Degradation des *lipAB*-Operons zu erhalten, wurde überprüft, welche Teilfragmente des *lipAB*-Transkripts mittels reverser Transkription und PCR nachweisbar sind (Abbildung 3.22). Dabei konnte ein Fragment nachgewiesen werden, welches zu gleichen Teilen jeweils mit ca. 150 Basen den überlagernden Bereich von *lipA* und *lipB* abdeckt. Interne Bereiche von *lipA* bzw. *lipB* mit jeweils ca. 450 Basen konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Allerdings war es nicht möglich, ein Gesamt-Fragment des untersuchten mRNA-Bereichs (ca. 1700 Basen) zu erhalten. Somit werden *lipA* und *lipB* zwar gemeinsam transkribiert, posttranskriptionell kommt es aber zu einer Degradation des gemeinsamen Transkripts. Kombiniert man nachweisbare und nicht-amplifizierbare Bereiche des *lipAB*-Transkripts aus oben beschriebenem Versuch, ergeben sich zwei mögliche Degradationsbereiche, hier Bereich A bzw. B genannt. Bereich A liegt am 3'-Ende des *lipA*-Transkripts, Bereich B nahe am 5'-Ende von *lipB*. Aus einer Degradation im Bereich A würde eine ca. 700–900 Basen lange, aus einer Degradation im Bereich B eine ca. 1200–1400 Basen lange *lipA*-mRNA-Spezies resultieren. Frenken *et al.* (1993a) identifizierten eine dominierende *lipA*-mRNA-Spezies mit ca. 1400 Basen, was eine Degradation im Bereich B wahrscheinlicher macht (siehe Abbildung 4.4). Allerdings gingen Frenken *et al.* (1993a) davon aus, dass das *lipAB*-Transkript vom 3'-Ende aus degradiert wird und dass deshalb kein Vollängentranskript nachgewiesen werden kann. In den hier durchgeführten Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass ein ca. 450 Basen langes Fragment am 3'-Ende des *lipAB*-Transkripts sehr wohl detektierbar ist (PCR 5 in Abbildung 3.22). Würde das Transkript jedoch vom 3'-Ende aus degradiert und wäre das der Grund, warum das 1700 Basen-Fragment nicht amplifiziert werden kann, dürfte ein kürzeres Fragment am 3'-Ende ebenfalls nicht amplifizierbar sein. Außerdem unterstützen die in Kooperation mit der Universität Greifswald erzeugten Transkriptomdaten mittels RNA-Sequenzierung (Abbildung 3.3 und zur Verdeutlichung in Abbildung 4.4) die Vermutung, dass das *lipAB*-Operon im Bereich B degradiert wird. Auch hier wurde im Vergleich zum restlichen *lipAB*-Transkript eine deutlich geringere mRNA-Menge im Bereich B nachgewiesen. Die Lage des Degradationsbereichs lässt ein translatierbares *lipA*-Transkript und ein verkürztes *lipB*-Transkript entstehen, aus dem kein LipB-Protein mehr synthetisiert werden kann.

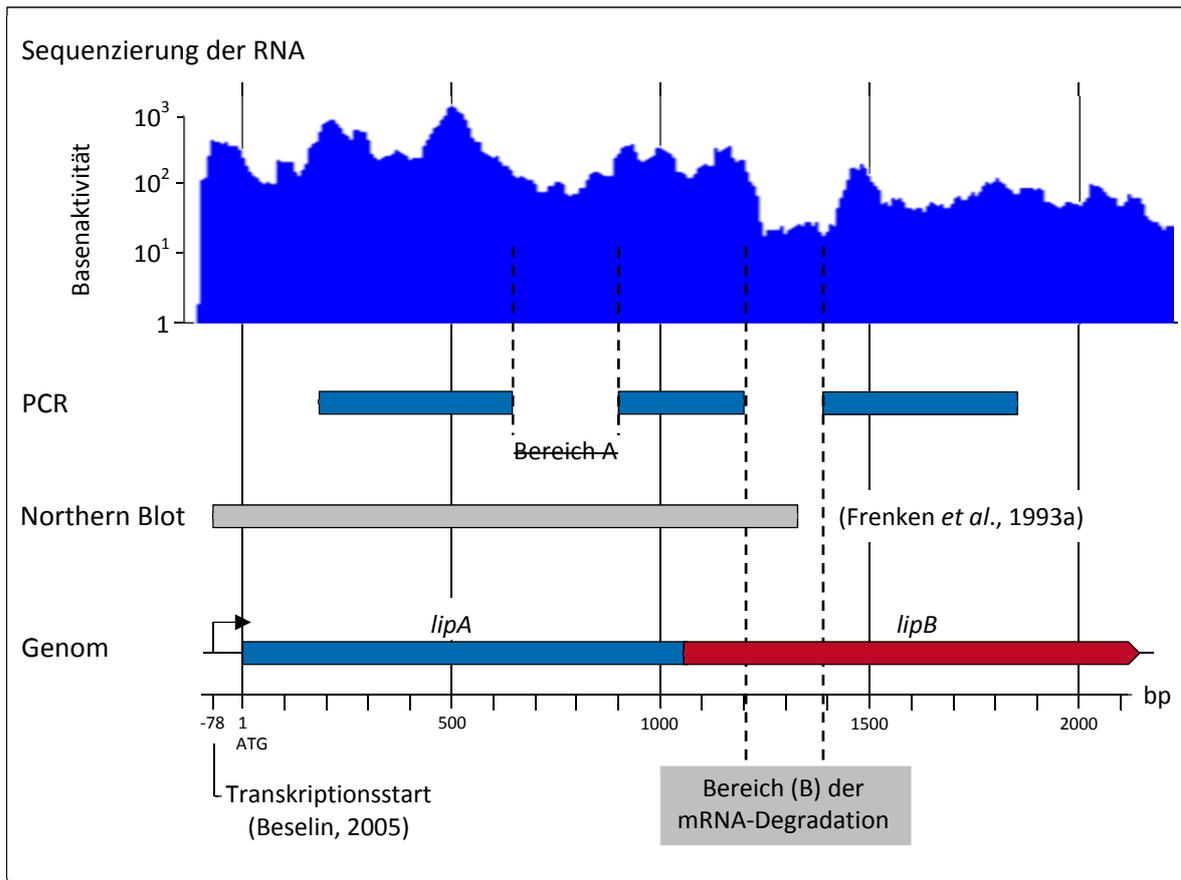


Abbildung 4.4 Zusammenfassendes Schema zu den *lipAB*-Transkriptanalysen.

Unten dargestellt ist das *lipAB*-Operon in *B. glumae* PG1 auf Genomebene mit einer Größenskala. Die Skala beginnt mit dem Startcodon (ATG) von *lipA*, zeigt aber auch den Transkriptionsstart und damit den Beginn der *lipAB*-Transkripts 78 Basen stromaufwärts (Beselin, 2005). Der Vergleich von Transkriptanalysen mittels Northern Blot (Frenken *et al.*, 1993a) und Analysen der vorliegenden Arbeit lässt den Schluss zu, dass das *lipAB*-Transkript in einem definierten Bereich (1200 bis 1440 Basen auf der Skala, Bereich B) degradiert wird. Eine Degradation im Bereich A hingegen kann aufgrund dieses Vergleichs ausgeschlossen werden (Bereich A, durchgestrichen). Alle Darstellungen beziehen sich maßstabsgetreu auf die Größenskala (unten, Angabe in Basenpaaren auf Genomebene). Die Abbildung zur RNA-Sequenzierung (oben) zeigt die Basenaktivität (Ordinate), die für jedes Nukleotid (Abszisse, entspricht Größenskala) ermittelt wurde. Die Basenaktivität beschreibt die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Base des Transkripts in der Sequenzierung identifiziert wurde.

Nachdem also gezeigt werden konnte, dass das *lipAB*-Transkript einer posttranskriptionellen Degradation unterliegt, stellt sich nun die Frage, wie dieser Prozess abläuft. Das Lipaseoperon in *P. aeruginosa* weist eine intergenische Region von 49 bp zwischen dem Lipase- und dem Foldasegen auf, in der ebenfalls regulatorische Elemente vermutet werden (Rosenau *et al.*, 2004). In dieser Region wurde eine stabile mRNA-Sekundärstruktur vorhergesagt, die möglicherweise als Erkennungs- und Schnittstelle für eine RNase E oder als Transkriptionsterminator fungiert (Rosenau, 2001, Rosenau *et al.*, 2004). Eine Termination der Transkription kann für das *lipAB*-Operon in *B. glumae* PG1 jedoch ausgeschlossen werden, da die Transkriptmenge im stromabwärts-gelegenen Bereich des Operons wieder ansteigt

(Abbildung 3.3 bzw. 4.4). Der mögliche Degradationsbereich innerhalb des *lipB*-Transkripts an Position 1200 bis 1400 im *lipAB*-Transkript (siehe Skala in Abbildung 4.4) wurde mit dem Programm „RNAfold“ (Gruber *et al.*, 2008, Lorenz *et al.*, 2011) auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturen untersucht. Auch hier wurden mehrere stabile – im Vergleich zur Struktur in der intergenischen Region des Lipaseoperons aus *P. aeruginosa* lange – Haarnadelstrukturen vorhergesagt (Abbildung 8.2 im Anhang). In Anlehnung an die Vermutung von Rosenau (2001) wird die Degradation des *lipAB*-Transkripts in *B. glumae* PG1 also möglicherweise durch eine RNase mit Endonukleaseaktivität vermittelt, wie es etwa auch für *E. coli* beschrieben ist (Mudd *et al.*, 1990). Für die RNase E etwa wurde eine konservierte Haarnadelstruktur als Erkennungsmotiv identifiziert (Diwa *et al.*, 2000). Allerdings ist im Allgemeinen für die Degradation durch die RNase E eine A-U-reiche Region auf der mRNA nötig (McDowall *et al.*, 1994, Kaberdin *et al.*, 2011), die im Degradationsbereich des *lipAB*-Transkripts nicht vorhanden ist. Daher kann dieser Bereich zwar eindeutig identifiziert werden, die Aufklärung des genauen Ablaufs der Degradation bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Betrachtet man die Lokalisierung und Funktion der Lipase und Foldase, erscheint eine Degradation des *lipAB*-Transkripts aus ökonomischer Sicht für *B. glumae* PG1 als durchaus nachvollziehbar. Die Foldase ist im Periplasma lokalisiert und aktiviert dort die Lipase, bevor diese in den extrazellulären Raum sekretiert wird (Frenken *et al.*, 1993a, Frenken *et al.*, 1993b). Die Abhängigkeit der Lipase von ihrer Foldase spiegelt sich in der Operonstruktur beider Gene wieder, wie es oft für Proteine mit funktionellem Zusammenhang beobachtet wird (Lawrence, 1999). Im Gegensatz zur sekretierten Lipase verbleibt die Foldase im Periplasma und kann theoretisch weitere Lipasemoleküle aktivieren. Dadurch müsste nicht für jede neu synthetisierte Lipase auch eine Foldase neu produziert werden, was eine enorme Energieersparnis bedeuten würde. Posttranskriptionelle Modifikationen sind zwar für bakterielle Operons bekannt und entscheidend für die Kontrolle der Genexpression (Arraiano *et al.*, 2010, Kaberdin *et al.*, 2011), für das *lipAB*-Operon in *B. glumae* PG1 konnte eine solche Modifikation jedoch hier erstmals gezeigt werden. Die hier durchgeführten Studien zur Operonstruktur von *lipAB* liefern einen Beweis für eine *lipA*-unabhängige Regulation von *lipB*. Es konnte gezeigt werden, dass diese Regulation durch eine posttranskriptionelle Degradation des gemeinsamen Transkripts stattfindet.

Die Vermutung, dass *in vivo* eine Foldase mehrere Lipasemoleküle aktivieren kann, wurde bisher experimentell nicht bestätigt. *In vitro* Experimente mit gereinigter Lipase und Foldase deuteten im Gegenteil sogar einen stabilen Komplex mit äquimolarem Verhältnis an (El Khattabi *et al.*, 2000), der durch die relativ große Interaktionsfläche beider Proteine bedingt wird (Pauwels *et al.*, 2006). Allerdings wird in der Literatur diskutiert, dass dieses 1:1-Verhältnis *in vivo* nicht zutrifft (Rosenau *et al.*, 2004, Pauwels *et al.*, 2006, Pauwels *et al.*, 2007).

Da hier nun erstmals die Art der posttranskriptionellen Regulation des *lipAB*-Operons gezeigt werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt überprüft, ob diese Regulation *in vivo* tatsächlich zu einer unterschiedlich großen Menge LipA im Vergleich zu LipB führt. Dazu wurden die vorliegenden Proteinmengen der extrazellulären Lipase und der intrazellulären Foldase zeitaufgelöst bestimmt. Während die Lipase durch die Messung der lipolytischen Aktivität quantifiziert werden konnte (Abbildung 3.23), erfolgte der Foldasenachweis immunologisch mittels Western Blot (Abbildung 3.24) und ELISA (Abbildung 3.25). Hierzu wurde ein C-terminal an die Foldase fusionierter Histidin-*tag* verwendet, der keinen negativen Einfluss auf die lipolytische Aktivität hat (siehe Abbildung 3.23). Es konnte gezeigt werden, dass über einen Kultivierungszeitraum von mehreren Stunden die relative Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand anstieg, während eine nahezu konstante Konzentration intrazellulärer Foldase detektiert wurde. Es ist also naheliegend, dass die Produktion intrazellulärer Foldase nach Erreichen einer gewissen Konzentration posttranskriptionell und unabhängig von der Lipaseproduktion verhindert wird, während weiterhin Lipase produziert und sekretiert wird. Um diesen Effekt deutlicher darstellen zu können, wurde nach neun Stunden Inkubation das Kultivierungsmedium durch frisches Medium ersetzt. Auch hier stieg die relative Lipaseaktivität (und damit die Lipasekonzentration) im zellfreien Kulturüberstand innerhalb der nächsten Stunden erneut auf ein Plateau an, während sich die Konzentration intrazellulärer Foldase nicht änderte (Abbildung 3.23 bis Abbildung 3.25). Analog dazu zeigten identisch durchgeführte Versuche mit der *lipAB*-Variante unter Kontrolle des stärkeren Promotors P_{Lu} ebenfalls eine gleichbleibende Konzentration der intrazellulären Foldase bei steigender extrazellulärer Lipasekonzentration (Abbildung 3.26). Allerdings lagen hier beide Proteine in höheren Konzentrationen vor.

Dadurch lässt sich auch erklären, warum in der Untersuchung der Mutation im *lipAB*-Promotor P_{Lu} zwar mehr Foldaseprotein detektiert wurde, dies aber nicht durch eine erhöhte

lipB-Transkriptmenge bestätigt werden konnte (vgl. Abbildung 3.17 und Abbildung 3.19). Bedingt durch den stärkeren Promotor P_{Lu} wurden zwar sowohl *lipA* als auch *lipB* stärker exprimiert, was zu einer erhöhten Menge Lipase und Foldase führte. Allerdings war zum Zeitpunkt der Transkriptmengenbestimmung nach 14 Stunden Kultivierung das gebildete *lipB*-Transkript vermutlich bereits wieder degradiert, sodass keine Unterschiede in den Transkriptmengen mehr nachweisbar waren.

Was dieser Versuchsaufbau nicht eindeutig belegen kann, ist, ob die gemessene konstante Foldasemenge tatsächlich durch eine verminderte Neusynthese bedingt ist oder ob sich ein Gleichgewicht zwischen neu gebildeter und proteolytisch degradierter Foldase einstellt (Proteinhomöostase). Auch in diesem Fall würde eine konstante Foldasemenge detektiert werden, obwohl permanent neue Foldase gebildet wird. Die Halbwertszeit und Bildungsrate der Foldase könnte durch Isotopenmarkierung neu gebildeter Proteine in der Zellkultur (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, kurz: SILAC) untersucht werden (Ong *et al.*, 2002, Fierro-Monti *et al.*, 2013). Allerdings ist eine Anpassung der Foldasemenge durch eine posttranskriptionelle Regulation aus mehreren Gründen wahrscheinlicher. Erstens ist ein katalytischer Aktivierungsprozess, bei dem eine Foldase mehrere Lipasen nacheinander aktivieren kann, ökonomisch sinnvoller, da die Zelle so weniger Energie in die Proteinbiosynthese neuer Foldase investieren muss. Zweitens müsste die intrazelluläre Foldasemenge in den Plateauphasen der extrazellulären Lipasekonzentration abnehmen, wenn beide Proteine in gleichen Mengen gebildet werden würden. Denn in der Plateauphase wird weniger neue Lipase gebildet, also würde auch weniger neue Foldase gebildet werden. Dies müsste bei gleichbleibender Degradationsrate aber zu einem Abfall der Foldasekonzentration führen, was jedoch nicht beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24, Zeitpunkt 7–8 bzw. 12–13). Drittens und letztens konnte in dieser Arbeit eine Degradation des *lipAB*-Operons im Bereich des *lipB*-Transkripts identifiziert werden, über die die Proteinbiosynthese der Foldase trotz stimulierter Lipaseproduktion reguliert werden kann. Deren Auswirkung wird zusammen mit den anderen in dieser Arbeit erzielten Erkenntnissen zur Lipaseproduktion und -sekretion in Abbildung 4.5 noch einmal schematisch zusammengefasst.

In der vorliegenden Arbeit konnte also erstmals gezeigt werden, dass – und wie – die Proteinmengen der Lipase LipA und Foldase LipB in *B. glumae* PG1 durch einen posttranskriptionellen Mechanismus moduliert werden. Die Einordnung der Lipase in ein komplexes regulatorisches Netzwerk (vgl. Abschnitt 4.4), in dem auch ein Zusammenhang mit dem Sekretionsapparat nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 4.6 und 4.7), ermöglicht neue Strategien für die Optimierung der Lipaseproduktion. Auch die Studien zur Rhamnolipid- und Lipaseproduktion (vgl. Abschnitt 4.1 und 4.2) bzw. Produktion heterologer Proteine (vgl. Abschnitt 4.3) in *B. glumae* PG1 liefern neue Erkenntnisse zu den Mechanismen der Lipaseregulation. Dieses Wissen kann letztendlich zur weiteren Produktionsoptimierung der biotechnologisch relevanten Lipase LipA beitragen.

5. Zusammenfassung

Burkholderia glumae PG1 produziert die biotechnologisch relevante Lipase LipA. Diese wird über den Typ II-Sekretionsapparat in den extrazellulären Raum transportiert. Im Laufe der Sekretion erlangt sie durch Interaktion mit dem im Periplasma lokalisierten Chaperon LipB (Lipase-spezifische Foldase) ihre aktive Konformation. Die Gene der Lipase und der Foldase befinden sich auf einer gemeinsamen transkriptionellen Einheit, dem *lipAB*-Operon.

Mit einem systembiologischen Ansatz wurden hier die zellulären Abläufe in *B. glumae* PG1 während der Lipaseproduktion in einer Kleinfärmenter-Anlage erfasst. Transkriptanalysen zeigten, dass Olivenöl die Transkription des *lipAB*-Operons induziert. In parallelen Untersuchungen der extrazellulären Metabolite mittels NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass Olivenöl als Lipase-typisches Substrat im Kulturüberstand von *B. glumae* PG1 in Glycerin und freie Fettsäuren zersetzt wird. Freie Fettsäuren werden im Fettsäuremetabolismus durch die β -Oxidation weiter degradiert. Die Inaktivierung eines vermutlich an der β -Oxidation beteiligten Enzyms führte zu einer erhöhten lipolytischen Aktivität. Dies deutet einen bisher unbekanntem regulatorischen Zusammenhang zwischen der β -Oxidation und der Lipaseproduktion an, der zur Optimierung der Lipaseproduktion genutzt werden kann.

Die Analyse des Transkriptoms zeigte, dass während der durch Olivenöl induzierten Lipaseproduktion mindestens 90 Gene eine veränderte Transkriptmenge aufweisen, von denen 12 für Transkriptionsregulatoren kodieren. Einer dieser Regulatoren ist der Transkriptionsaktivator RhIR. Dieser wird unter Lipase-induzierenden Bedingungen verstärkt synthetisiert und stimuliert die Bildung von Rhamnolipiden. Rhamnolipide finden als Biotenside ebenfalls Verwendung in der Industrie. Hier konnte gezeigt werden, dass *B. glumae* PG1 mit der Lipase und den Rhamnolipiden zeitgleich zwei biotechnologisch relevante Moleküle produziert. Die in dieser Arbeit etablierten Strategien zur heterologen Expression zeigten außerdem, dass *B. glumae* PG1 nicht nur zur Lipaseproduktion, sondern auch zur Produktion heterologer Proteine eingesetzt werden kann.

Die Gewinnung der Lipase für die biotechnologische Anwendung setzt eine effiziente Sekretion in den extrazellulären Raum voraus. Durch Analyse des extrazellulären Proteoms konnten in dieser Arbeit neben der Lipase weitere Proteine identifiziert werden, die ebenfalls über den Typ II-Weg sekretiert werden und als mögliche Konkurrenzsubstrate ein lohnendes Ziel für weitere Stammoptimierungen darstellen. Zudem konnte erstmals ein

Rückkopplungseffekt des Sekretionsapparates auf die Regulation der Lipaseproduktion charakterisiert werden. Dabei inhibiert ein unvollständiger Typ II-Sekretionsapparat die Transkription des *lipAB*-Operons. Eine verstärkte Synthese der Sekretionspore GspD hingegen führt durch diesen Rückkopplungseffekt zu einer Steigerung der Lipaseproduktion. Weiterhin zeigte eine Analyse des *lipAB*-Operons aus dem Lipase-überproduzierenden Derivat *B. glumae* Lu8093, dass ein Aminosäureaustausch im Signalpeptid der Lipase deren Sekretion verbessert. In Verbindung mit einer transkriptionsverstärkenden Mutation im *lipAB*-Promotor hat dieser Aminosäureaustausch einen synergetischen Effekt auf die Steigerung der extrazellulären Lipasemenge.

Über die komplexe Regulation des *lipAB*-Operons ist bisher nur wenig bekannt. Mithilfe von DNA-Protein-Interaktionsstudien konnte der LysR-ähnliche Transkriptionsregulator BGL_1c34440 *in vitro* als putativer Repressor des *lipAB*-Operons identifiziert werden.

Bislang wurde vermutet, dass die Foldase in einem katalytischen Mechanismus mehrere Lipasemoleküle nacheinander aktivieren kann. In dieser Arbeit durchgeführte Proteinmengenanalysen untermauern diese Hypothese, da bei steigender Menge extrazellulärer Lipase LipA die Menge der intrazellulären Foldase LipB konstant bleibt. Zudem konnte hier erstmals der dafür verantwortliche posttranskriptionelle Regulationsmechanismus des *lipAB*-Operons charakterisiert werden: Studien mit transkriptionellen Reportergenfusionen sowie Transkriptanalysen mittels PCR und RNA-Sequenzierung zeigten, dass ein gemeinsames *lipAB*-Transkript spezifisch im *lipB*-Bereich degradiert wird. Durch diese Degradation wird die Proteinbiosynthese der Foldase unabhängig von der Lipaseproduktion verhindert.

Die vorliegende Arbeit konnte also (i) einen lange Zeit nicht verstandenen Regulationsmechanismus des *lipAB*-Operons aufklären und (ii) durch die detaillierte Charakterisierung der Lipaseregulation und -sekretion eine Reihe von Optimierungsoptionen für die Lipaseproduktion in *B. glumae* PG1 aufzeigen.

6. Summary

Burkholderia glumae PG1 produces a biotechnological relevant lipase LipA. This lipase is transported to the extracellular space *via* the type II secretion pathway. Its active conformation is achieved by interaction with the periplasmic chaperone LipB (lipase-specific foldase) during the secretion process. Both genes, lipase and foldase, are located in a transcriptional unit called *lipAB* operon.

The use of small-scale bioreactors allowed a detailed analysis of the cellular processes in *B. glumae* PG1 under lipase producing conditions. Transcript analysis revealed that olive oil (a typical lipase substrate) induces the transcription of the *lipAB* operon. The profiling of extracellular metabolites by NMR spectroscopy confirmed that olive oil is decomposed into glycerol and free fatty acids. Free fatty acids are degraded by β -oxidation in the fatty acid metabolism. Interestingly, the inactivation of an enzyme presumably involved in the β -oxidation is able to increase lipolytic activity. This indicates a previously unknown regulatory relationship between the β -oxidation and the lipase production which can be used to optimize the production of the lipase.

Expression profiling identified more than 90 genes with an altered transcription profile during olive oil induced lipase production. Twelve of them encode for transcriptional regulators. One of these regulators is the transcriptional activator RhIR. Its biosynthesis is increased under lipase inducing conditions and activates the formation of rhamnolipids. Rhamnolipids find increasing application as biotensids in industrial biotechnology. Here, it was demonstrated that *B. glumae* PG1 produces two biotechnological relevant compounds (lipase and rhamnolipids) simultaneously. Furthermore, heterologous expression strategies established in the presented thesis proved that *B. glumae* PG1 is suitable not only for lipase production but also for the synthesis of heterologous proteins.

The downstream processing of lipase for biotechnological application requires its efficient secretion into the extracellular space. Besides the lipase, secretomics identified several proteins that are also secreted via the type II pathway. As possible concurrence substrates they appear as promising targets for further strain optimization. Moreover, a feedback effect of the secretion pathway on the regulation of the lipase production could be characterized for the first time. Herein, a damaged type II secretion system inhibits the *lipAB* transcription while an increased synthesis of the secretion pore GspD leads to an enhanced lipase production. In addition, a *lipAB* operon originating from the lipase-overproducing strain

B. glumae Lu8093 was analyzed. It was shown that a single amino acid replacement in the signal peptide of the lipase enhances the lipase secretion. Combined with a mutation that increases the lipAB transcription rate, this replacement increases the amount of extracellular lipase in a synergistic way.

At present, only little is known about the complex regulation of the *lipAB* operon. DNA-protein-interaction studies identified a LysR-type transcriptional regulator BGL_1c34440 *in vitro* as a putative repressor of the *lipAB* operon.

It was supposed that a single foldase is able to activate several molecules of lipases by a catalytical mechanism. Quantitative protein assays performed in the present work support this hypothesis. With increasing amount of extracellular lipase LipA, the amount of intracellular foldase LipB remains constant. Here, the underlying regulatory mechanism acting on a posttranscriptional level was characterized: studies with transcriptional reporter fusion as well as transcript analysis by PCR and RNA sequencing demonstrated that a combined *lipAB* transcript is degraded specifically at a defined region within *lipB*. This degradation inhibits the foldase biosynthesis without affecting the lipase production.

In conclusion, the presented work (i) solved a regulatory mechanism of the *lipAB* operon which was not understood so far and (ii) highlighted several targets for the optimization of lipase production in *B. glumae* PG1 by a detailed characterization of lipase regulation and secretion.

7. Literaturverzeichnis

- Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., Champion, P. A., Cox, J., Luirink, J., et al. (2007).** Type VII secretion - mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **5**(11): 883-891.
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lepine, F. & Deziel, E. (2010).** Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**(5): 1323-1336.
- Abdou, L., Chou, H. T., Haas, D. & Lu, C. D. (2011).** Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**(11): 2784-2792.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.
- Aravindan, R., Anbumathi, P. & Viruthagiri, T. (2007).** Lipase applications in food industry. *Indian J of Biotech.* **6**: 141-158.
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343 Pt 1**: 177-183.
- Arraiano, C. M., Andrade, J. M., Domingues, S., Guinote, I. B., Malecki, M., et al. (2010).** The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev* **34**(5): 883-923.
- Arvani, S., Markert, A., Loeschcke, A., Jaeger, K. E. & Drepper, T. (2012).** A T7 RNA polymerase-based toolkit for the concerted expression of clustered genes. *J Biotechnol* **159**(3): 162-171.
- Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. & Ladner, W. (1997).** Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation. *J Prak Chem-Chem Ztg* **339**(4): 381-384.
- Ball, G., Chapon-Herve, V., Bleves, S., Michel, G. & Bally, M. (1999).** Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**(2): 382-388.
- Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., et al. (1992).** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven *xcp* genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol Microbiol* **6**(9): 1121-1131.
- Banat, I. M., Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**(5): 495-508.
- Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004).** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **22**(11): 1399-1408.
- Bassler, B. L., Greenberg, E. P. & Stevens, A. M. (1997).** Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **179**(12): 4043-4045.
- Beal, R. & Betts, W. B. (2000).** Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* **89**(1): 158-168.
- Bebrone, C., Moali, C., Mahy, F., Rival, S., Docquier, J. D., et al. (2001).** CENTA as a

- chromogenic substrate for studying beta-lactamases. *Antimicrob Agents Ch* **45**(6): 1868-1871.
- Beck, K., Wu, L. F., Brunner, J. & Muller, M. (2000).** Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J* **19**(1): 134-143.
- Bell, P. J. & Karuso, P. (2003).** Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *epicoccum nigrum*. *J Am Chem Soc* **125**(31): 9304-9305.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2003).** Biochemie. Kapitel 22: Der Fettsäurestoffwechsel. Heidelberg ; Berlin Spektrum, Akad. Verl.
- Berks, B. C. (1996).** A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**(3): 393-404.
- Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000).** The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**(2): 260-274.
- Beselin, A. (2005).** Optimization of lipase production in *Burkholderia glumae*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Inaugural-Dissertation.
- Bilgin, N., Lee, J. I., Zhu, H. Y., Dalbey, R. & von Heijne, G. (1990).** Mapping of catalytically important domains in *Escherichia coli* leader peptidase. *EMBO J* **9**(9): 2717-2722.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Black, P. N. & DiRusso, C. C. (2003).** Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(3): 454-472.
- Boekema, B. K. H. L., Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., et al. (2007).** Hexadecane and tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Appl Environ Microb* **73**(12): 3838-3844.
- Bollinger, A. (2012).** Regulation des Lipase-Foldase Operon in *Burkholderia glumae*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Bachelorarbeit.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., et al. (2012).** Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**(7397): 185-194.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., et al. (1990).** A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**(6260): 767-770.
- Brenner, D. E., Krieg, N. R., Staley, J. T. & Garrity, G. M. (2005).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition. New York, Springer.
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T. A., Kuhlbrandt, W. & Collinson, I. (2002).** Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **418**(6898): 662-665.
- Brok, R., Van Gelder, P., Winterhalter, M., Ziese, U., Koster, A. J., et al. (1999).** The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity. *J Mol Biol* **294**(5): 1169-1179.

- Bruggink, A., Roos, E. C. & de Vroom, E. (1998).** Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics. *Org Process Res Dev* **2**(2): 128-133.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., et al. (2009).** BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 421.
- Campos, M., Nilges, M., Cisneros, D. A. & Francetic, O. (2010).** Detailed structural and assembly model of the type II secretion pilus from sparse data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29): 13081-13086.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. & Marty, A. (2012).** Lipases: an overview. *Methods Mol Biol* **861**: 3-30.
- Cha, K. H., Lee, Y. H., Ko, S. J., Park, S. K. & Park, I. J. (2001).** Influence of weather condition at heading period on the development of rice bacterial grain rot caused by *Burkholderia glumae*. *Res Plant Dis* **7**(3): 150-154.
- Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubes, J. P., Comeau, L. C., et al. (2002).** Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* **37**(7): 653-662.
- Chamberlin, M., McGrath, J. & Waskell, L. (1970).** New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature* **228**(5268): 227-231.
- Chandrasekaran, E. V. & Bemiller, J. N. (1980).** Constituent analysis of glycosaminoglycans. Methods in carbohydrate chemistry. Academic Press. R. L. Whistler. New York: 89-96.
- Chang, C. C., Chen, W. C., Ho, T. F., Wu, H. S. & Wei, Y. H. (2011).** Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J Biosci Bioeng* **111**(5): 501-511.
- Charbonnier, Y., Gettler, B., Francois, P., Bento, M., Renzoni, A., et al. (2005).** A generic approach for the design of whole-genome oligoarrays, validated for genotyping, deletion mapping and gene expression analysis on *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* **6**: 95.
- Chen, P. T., Shaw, J. F., Chao, Y. P., David Ho, T. H. & Yu, S. M. (2010).** Construction of chromosomally located T7 expression system for production of heterologous secreted proteins in *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem* **58**(9): 5392-5399.
- Chen, R. (2012).** Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv* **30**(5): 1102-1107.
- Chen, R., Barphagha, I. K., Karki, H. S. & Ham, J. H. (2012).** Dissection of quorum-sensing genes in *Burkholderia glumae* reveals non-canonical regulation and the new regulatory gene *tofM* for toxoflavin production. *PLoS One* **7**(12): e52150.
- Cherukuvada, S. L., Seshasayee, A. S. N., Raghunathan, K., Anishetty, S. & Pennathur, G. (2005).** Evidence of a double-lid movement in *Pseudomonas aeruginosa* lipase: Insights from molecular dynamics simulations. *PLoS Computational Biology* **1**(3): 182-189.
- Choo, K. H., Tan, T. W. & Ranganathan, S. (2009).** A comprehensive assessment of N-terminal signal peptides prediction methods. *BMC Bioinformatics* **10 Suppl 15**: S2.
- Clark, S. A. & Theg, S. M. (1997).** A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell* **8**(5): 923-934.

- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clement, C. & Ait Barka, E. (2008).** Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev* **32**(4): 607-626.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996).** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**(1): 33-38.
- Costa, S. G. V. A. O., Deziel, E. & Lepine, F. (2011).** Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Lett Appl Microbiol* **53**(6): 620-627.
- Cunningham, K. & Wickner, W. (1989).** Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8630-8634.
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., et al. (1994).** A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J Am Chem Soc* **116**(8): 3180-3186.
- Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Studier, F. W. (1984).** Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 2035-2039.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J. & Vasser, M. (1983).** The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(1): 21-25.
- De Bona, P., Deshmukh, L., Gorbatyuk, V., Vinogradova, O. & Kendall, D. A. (2012).** Structural studies of a signal peptide in complex with signal peptidase I cytoplasmic domain: the stabilizing effect of membrane-mimetics on the acquired fold. *Proteins* **80**(3): 807-817.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. & Timmis, K. N. (1993).** Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI^q/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**(1): 17-24.
- De Vos, P., Goor, M., Gillis, M. & Deley, J. (1985).** Ribosomal ribonucleic-acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Int J Syst Bacteriol* **35**(2): 169-184.
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J. J., et al. (2007).** Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Appl Environ Microb* **73**(15): 4950-4958.
- Deziel, E., Lepine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A., et al. (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**(2-3): 244-252.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003).** *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**(Pt 8): 2005-2013.
- DiRusso, C. C. & Nystrom, T. (1998).** The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol Microbiol* **27**(1): 1-8.
- Diwa, A., Bricker, A. L., Jain, C. & Belasco, J. G. (2000).** An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs

- feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev* **14**(10): 1249-1260.
- Doherty, A. J., Connolly, B. A. & Worrall, A. F. (1993).** Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene* **136**(1-2): 337-340.
- Douzi, B., Ball, G., Cambillau, C., Tegoni, M. & Voulhoux, R. (2011).** Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *J Biol Chem* **286**(47): 40792-40801.
- Douzi, B., Filloux, A. & Voulhoux, R. (2012).** On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**(1592): 1059-1072.
- Driessen, A. J. (2001).** SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol* **9**(5): 193-196.
- Driessen, A. J. & Nouwen, N. (2008).** Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* **77**: 643-667.
- Dubeau, D., Deziel, E., Woods, D. E. & Lepine, F. (2009).** *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol* **9**: 263.
- Dunlap, P. V. & Kuo, A. (1992).** Cell density-dependent modulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system in the absence of autoinducer and LuxR protein. *J Bacteriol* **174**(8): 2440-2448.
- Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J. N., et al. (2003).** Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol* **185**(9): 2749-2758.
- Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kurner, J., Bernadac, A., et al. (2005).** XcpX controls biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing pseudopilus. *J Biol Chem* **280**(36): 31378-31389.
- Dusane, D. H., Zinjarde, S. S., Venugopalan, V. P., McLean, R. J., Weber, M. M., et al. (2010).** Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnol Genet Eng Rev* **27**: 159-184.
- Eggert, T., van Pouderooyen, G., Dijkstra, B. W. & Jaeger, K. E. (2001).** Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. *FEBS Lett* **502**(3): 89-92.
- El Khattabi, M., Ockhuijsen, C., Bitter, W., Jaeger, K. E. & Tommassen, J. (1999).** Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. *Mol Gen Genet* **261**(4-5): 770-776.
- El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000).** Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *J Biol Chem* **275**(35): 26885-26891.
- El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2003).** Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. *J Mol Catal B-Enzym* **22**(5-6): 329-338.
- Elvin, C. M., Thompson, P. R., Argall, M. E., Hendry, P., Stamford, N. P., et al. (1990).** Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **87**(1): 123-126.

- Elzer, P. H., Kovach, M. E., Phillips, R. W., Robertson, G. T., Peterson, K. M., et al. (1995).** *In vivo* and *in vitro* stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species. *Plasmid* **33**(1): 51-57.
- Engbrecht, J. & Silverman, M. (1987).** Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res* **15**(24): 10455-10467.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971).** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**(9): 871-874.
- Estell, D. A., Graycar, T. P. & Wells, J. A. (1985).** Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J Biol Chem* **260**(11): 6518-6521.
- Fahnert, B., Lilie, H. & Neubauer, P. (2004).** Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **89**: 93-142.
- Ferguson, A. D. & Deisenhofer, J. (2002).** TonB-dependent receptors - structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* **1565**(2): 318-332.
- Ferrato, F., Carriere, F., Sarda, L. & Verger, R. (1997).** A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymol* **286**: 327-347.
- Fierro-Monti, I., Racle, J., Hernandez, C., Waridel, P., Hatzimanikatis, V., et al. (2013).** A novel pulse-chase SILAC strategy measures changes in protein decay and synthesis rates induced by perturbation of proteostasis with an Hsp90 inhibitor. *PLoS One* **8**(11): e80423.
- Filloux, A. (2004).** The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Bba-Mol Cell Res* **1694**(1-3): 163-179.
- Filloux, A. (2011).** Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An essay on diversity, evolution, and function. *Front Microbiol* **2**: 155.
- Filloux, A., Michel, G. & Bally, M. (1998).** GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**(3): 177-198.
- Fischer, M. & Pleiss, J. (2003).** The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res* **31**(1): 319-321.
- Flasz, A., Rocha, C. A., B., M. & Sajo, C. (1998).** A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *Med Sci Res*(26): 181-185.
- 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. *Analyt Biochem* **250**(2): 153-156.
- Francis, F., Kim, J., Ramaraj, T., Farmer, A., Rush, M. C., et al. (2013).** Comparative genomic analysis of two *Burkholderia glumae* strains from different geographic origins reveals a high degree of plasticity in genome structure associated with genomic islands. *Mol Genet Genomics* **288**(3-4): 195-203.
- Frank, K. & Sippl, M. J. (2008).** High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. *Bioinformatics* **24**(19): 2172-2176.

- Frenken, L. G. J., Bos, J. W., Visser, C., Muller, W., Tommassen, J., et al. (1993a).** An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. *Mol Microbiol* **9**(3): 579-589.
- Frenken, L. G. J., Degroot, A., Tommassen, J. & Verrips, C. T. (1993b).** Role of the *lipB* gene-product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol Microbiol* **9**(3): 591-599.
- Frenken, L. G. J., Egmond, M. R., Batenburg, A. M., Bos, J. W., Visser, C., et al. (1992).** Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active-site residues. *Appl Environ Microb* **58**(12): 3787-3791.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994).** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**(2): 269-275.
- Gabrielsen, O. S., Hornes, E., Korsnes, L., Ruet, A. & Oyen, T. B. (1989).** Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor τ - a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor. *Nucleic Acids Res* **17**(15): 6253-6267.
- 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**(4): 1180-1184.
- Goethals, K., Van Montagu, M. & Holsters, M. (1992).** Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1646-1650.
- Goo, E., Kang, Y., Kim, H. & Hwang, I. (2010).** Proteomic analysis of quorum sensing-dependent proteins in *Burkholderia glumae*. *J Proteome Res* **9**(6): 3184-3199.
- Goryshin, I. Y. & Reznikoff, W. S. (1998).** Tn5 *in vitro* transposition. *J Biol Chem* **273**(13): 7367-7374.
- Grant, S. G. N., 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**(12): 4645-4649.
- Griffin, B. A., Adams, S. R. & Tsien, R. Y. (1998).** Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**(5374): 269-272.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., et al. (1993).** Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* **268**(17): 12843-12847.
- Gronenborn, B. (1976).** Overproduction of phage lambda repressor under control of the *lac* promoter of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **148**(3): 243-250.
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neubock, R. & Hofacker, I. L. (2008).** The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* **36**(Web Server issue): W70-74.
- Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. (2004).** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(6): 763-781.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by

- vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**(14): 4121-4130.
- Hahn, R. (2012).** Etablierung und Optimierung von *Burkholderia glumae* als Modellorganismus in Fermentation und Expression. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Masterarbeit.
- Ham, J. H., Melanson, R. A. & Rush, M. C. (2011).** *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Mol Plant Pathol* **12**(4): 329-339.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hartley, D. L. & Kane, J. F. (1988).** Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **16**(2): 101-102.
- Hasan, F., Shah, A. A. & Hameed, A. (2006).** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Tech* **39**(2): 235-251.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**(1): 51-59.
- Hobl, B., Hock, B., Schneck, S., Fischer, R. & Mack, M. (2013).** Bacteriophage T7 RNA polymerase-based expression in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **92**(1): 100-104.
- Hoch, J. A. (2000).** Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**(2): 165-170.
- Hochuli, E., Dobeli, H. & Schacher, A. (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine-residues. *J Chromatogr* **411**: 177-184.
- Holland, I. B. (2010).** The extraordinary diversity of bacterial protein secretion mechanisms. *Methods Mol Biol* **619**: 1-20.
- Holland, I. B., Schmitt, L. & Young, J. (2005).** Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**(1-2): 29-39.
- Hoskisson, P. A. & Rigali, S. (2009).** Chapter 1: Variation in form and function: the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. *Adv Appl Microbiol* **69**: 1-22.
- Hynds, P. J., Robinson, D. & Robinson, C. (1998).** The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **273**(52): 34868-34874.
- Invernizzi, G., Papaleo, E., Grandori, R., De Gioia, L. & Lotti, M. (2009).** Relevance of metal ions for lipase stability: Structural rearrangements induced in the *Burkholderia glumae* lipase by calcium depletion. *J Struct Biol* **168**(3): 562-570.
- 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.
- Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2002).** Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**(4): 390-397.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., et al. (1994).** Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**(1): 29-63.

- Jaeger, K. E., Ransac, S., Koch, H. B., Ferrato, F. & Dijkstra, B. W. (1993).** Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **332**(1-2): 143-149.
- Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. (1998).** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**(9): 396-403.
- Jaeger, K. E., Schneidinger, B., Liebeton, K., Haas, D. & Reetz, M. T. (1996).** Lipase of *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Biology of Pseudomonads. T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas & S. Silver. Washington D.C., ASM Press: 319-330.
- Jang, M. S., Goo, E., An, J. H., Kim, J. & Hwang, I. (2014).** Quorum sensing controls flagellar morphogenesis in *Burkholderia glumae*. *PLoS One* **9**(1): e84831.
- Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T., et al. (2003).** Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis* **87**(8): 890-895.
- Jovanovic, G. & Model, P. (1997).** PspF and IHF bind co-operatively in the *psp* promoter-regulatory region of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **25**(3): 473-481.
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., et al. (2003).** Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* **12**(8): 1652-1662.
- Jungwirth, B., Emer, D., Brune, I., Hansmeier, N., Puhler, A., et al. (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**(2): 190-197.
- Jurgen, B., Barken, K. B., Tobisch, S., Pioch, D., Wumpelmann, M., et al. (2005).** Application of an electric DNA-chip for the expression analysis of bioprocess-relevant marker genes of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* **92**(3): 299-307.
- Kaberdin, V. R., Singh, D. & Lin-Chao, S. (2011).** Composition and conservation of the mRNA-degrading machinery in bacteria. *J Biomed Sci* **18**: 23.
- Kaplan, H. B. & Greenberg, E. P. (1985).** Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**(3): 1210-1214.
- Karki, H. S., Shrestha, B. K., Han, J. W., Groth, D. E., Barphagha, I. K., et al. (2012).** Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. *PLoS One* **7**(9): e45376.
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., et al. (2010).** A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Express Purif* **69**(2): 137-146.
- Katzke, N., Bergmann, R., Jaeger, K. E. & Drepper, T. (2012).** Heterologous high-level gene expression in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Methods Mol Biol* **824**: 251-269.
- Kim, J., Kang, Y., Choi, O., Jeong, Y., Jeong, J. E., et al. (2007).** Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Mol Microbiol* **64**(1): 165-179.

- Kim, J., Kim, J. G., Kang, Y., Jang, J. Y., Jog, G. J., et al. (2004).** Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol Microbiol* **54**(4): 921-934.
- Kim, J., Oh, J., Choi, O., Kang, Y., Kim, H., et al. (2009).** Biochemical evidence for ToxR and ToxJ binding to the tox operons of *Burkholderia glumae* and mutational analysis of ToxR. *J Bacteriol* **191**(15): 4870-4878.
- Kim, S., Park, J., Kim, J. H., Lee, J., Bang, B., et al. (2013).** RNAseq-based transcriptome analysis of *Burkholderia glumae* quorum sensing. *Plant Pathology J* **29**(3): 249-259.
- Knapp, A. (2009).** Molekulare Interaktion akzessorischer Proteine mit dem Chaperon LipH aus *Pseudomonas aeruginosa*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Diplomarbeit.
- Knorr, J. (2010).** Physiologie eines industriellen Produktionsstammes: Proteinsekretion, Regulation und Produktion von Biotensiden in *Burkholderia glumae*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Inaugural-Dissertation.
- Koch, A. K., Kappeli, O., Fiechter, A. & Reiser, J. (1991).** Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol* **173**(13): 4212-4219.
- Koch, H. G., Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H. K., et al. (1999).** In vitro studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. *Mol Biol Cell* **10**(7): 2163-2173.
- Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B. & Hellingwerf, K. J. (1993).** Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**(10): 2329-2342.
- Koressaar, T. & Remm, M. (2007).** Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**(10): 1289-1291.
- Korman, T. P., Sahachartsiri, B., Charbonneau, D. M., Huang, G. L., Beauregard, M., et al. (2013).** Dieselzymes: development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. *Biotechnol Biofuels* **6**(1): 70.
- Korotkov, K. V. & Hol, W. G. (2008).** Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **15**(5): 462-468.
- Korotkov, K. V., Krumm, B., Bagdasarian, M. & Hol, W. G. (2006).** Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol* **363**(2): 311-321.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M. & Hol, W. G. (2012).** The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* **10**(5): 336-351.
- 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**(5): 800-802.
- Kristensen, D. M., Kannan, L., Coleman, M. K., Wolf, Y. I., Sorokin, A., et al. (2010).** A low-polynomial algorithm for assembling clusters of orthologous groups from

- intergenomic symmetric best matches. *Bioinformatics* **26**(12): 1481-1487.
- Kulp, A. & Kuehn, M. J. (2010).** Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**: 163-184.
- Kumamoto, C. A. (1989).** *Escherichia coli* SecB protein associates with exported protein precursors *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5320-5324.
- Kuo, A., Callahan, S. M. & Dunlap, P. V. (1996).** Modulation of luminescence operon expression by N-octanoyl-L-homoserine lactone in *ainS* mutants of *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **178**(4): 971-976.
- Kurita, T. & Tabei, H. (1967).** On the pathogenic bacterium of bacterial grain rot of rice. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **33**: 111.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lang, D. A., Mannesse, M. L., de Haas, G. H., Verheij, H. M. & Dijkstra, B. W. (1998).** Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem* **254**(2): 333-340.
- Langmead, B. & Salzberg, S. L. (2012).** Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**(4): 357-359.
- Lawrence, J. (1999).** Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **9**(6): 642-648.
- Lazdunski, A. M., Ventre, I. & Sturgis, J. N. (2004).** Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**(7): 581-592.
- Leskela, S., Wahlstrom, E., Hyyrylainen, H. L., Jacobs, M., Palva, A., et al. (1999).** Ecs, an ABC transporter of *Bacillus subtilis*: dual signal transduction functions affecting expression of secreted proteins as well as their secretion. *Mol Microbiol* **31**(2): 533-543.
- Lesuisse, E., Schanck, K. & Colson, C. (1993).** Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem* **216**(1): 155-160.
- Lewenza, S., Falsafi, R. K., Winsor, G., Gooderham, W. J., McPhee, J. B., et al. (2005).** Construction of a mini-Tn5-*luxCDABE* mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a tool for identifying differentially regulated genes. *Genome Res* **15**(4): 583-589.
- Liebeke, M., Brozel, V. S., Hecker, M. & Lalk, M. (2009).** Chemical characterization of soil extract as growth media for the ecophysiological study of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **83**(1): 161-173.
- Lim, J., Lee, T. H., Nahm, B. H., Do Choi, Y., Kim, M., et al. (2009).** Complete Genome Sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. *J Bacteriol* **191**(11): 3758-3759.
- Lloyd, L. J., Jones, S. E., Jovanovic, G., Gyaneshwar, P., Rolfe, M. D., et al. (2004).** Identification of a new member of the phage shock protein response in *Escherichia coli*, the phage shock protein G (PspG). *J Biol Chem* **279**(53): 55707-55714.
- Login, F. H., Fries, M., Wang, X., Pickersgill, R. W. & Shevchik, V. E. (2010).** A 20-residue peptide of the inner membrane protein OutC mediates interaction with two distinct

- sites of the outer membrane secretin OutD and is essential for the functional type II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **76**(4): 944-955.
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Honer Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., et al. (2011).** ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol* **6**: 26.
- Lovaglio, R. B., dos Santos, F. J., Jafelicci, M., Jr. & Contiero, J. (2011).** Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids Surf B Biointerfaces* **85**(2): 301-305.
- Mackman, N., Nicaud, J. M., Gray, L. & Holland, I. B. (1985).** Identification of polypeptides required for the export of haemolysin 2001 from *E. coli*. *Mol Gen Genet* **201**(3): 529-536.
- Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. (2008).** Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**(Pt 12): 3609-3623.
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2006).** Brock Mikrobiologie. Kapitel 8.4: Globale Regulationsmechanismen. München, Pearson Studium. **11., überarbeitete Auflage.**
- Maity, T. S., Close, D. W., Valdez, Y. E., Nowak-Lovato, K., Marti-Arbona, R., et al. (2012).** Discovery of DNA operators for TetR and MarR family transcription factors from *Burkholderia xenovorans*. *Microbiology* **158**(Pt 2): 571-582.
- Makrides, S. C. (1996).** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**(3): 512-538.
- Manting, E. H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A. & Driessen, A. J. (2000).** SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J* **19**(5): 852-861.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., et al. (2011).** CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D225-229.
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthysens, G. & Cambillau, C. (1992).** *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* **356**(6370): 615-618.
- McAllister, W. T., Morris, C., Rosenberg, A. H. & Studier, F. W. (1981).** Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection. *J Mol Biol* **153**(3): 527-544.
- McDowall, K. J., Lin-Chao, S. & Cohen, S. N. (1994).** A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J Biol Chem* **269**(14): 10790-10796.
- Merril, C. R. (1990).** Gel-staining techniques. *Method Enzymol* **182**: 477-488.
- Mitchell, C. & Oliver, D. (1993).** Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol Microbiol* **10**(3): 483-497.
- Mudd, E. A., Krisch, H. M. & Higgins, C. F. (1990).** RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: evidence that *rne* and *ams* are the same genetic locus. *Mol Microbiol* **4**(12): 2127-2135.

- Mueller, M. M., Kugler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hormann, B., et al. (2012).** Rhamnolipids - next generation surfactants? *J Biotechnol* **162**(4): 366-380.
- Mülhardt, C. (2009).** Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.
- Mullen, T., Markey, K., Murphy, P., McClean, S. & Callaghan, M. (2007).** Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**(12): 869-877.
- Nagarajan, S. (2012).** New tools for exploring "old friends - microbial lipases". *Appl Biochem Biotech* **168**(5): 1163-1196.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R. M. & Kutsukake, K. (1999).** Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**(5): 1555-1561.
- Nandakumar, R., Rush, M. C. & Correa, F. (2007).** Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with panicle blight symptoms on rice in Panama. *Plant Dis* **91**(6): 767-767.
- Nandakumar, R., Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E., et al. (2009).** *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States. *Plant Dis* **93**(9): 896-905.
- Nardini, M. & Dijkstra, B. W. (1999).** Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* **9**(6): 732-737.
- Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E. & Dijkstra, B. W. (2000).** Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* **275**(40): 31219-31225.
- Natale, P., Bruser, T. & Driessen, A. J. (2008).** Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**(9): 1735-1756.
- Nguyen, T. T. & Sabatini, D. A. (2011).** Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications. *Int J Mol Sci* **12**(2): 1232-1244.
- Nishijyo, T., Haas, D. & Itoh, Y. (2001).** The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **40**(4): 917-931.
- Noble, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. & Frenken, L. G. J. (1993).** The crystal-structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *Febs Letters* **331**(1-2): 123-128.
- Noble, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. & Frenken, L. G. J. (1994).** Analysis of the structure of *Pseudomonas glumae* lipase. *Protein Eng* **7**(4): 559-562.
- Nunn, D. (1999).** Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends Cell Biol* **9**(10): 402-408.
- Nunn, D. N. & Lory, S. (1993).** Cleavage, methylation, and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT, -U, -V, and -W. *J Bacteriol* **175**(14): 4375-4382.

- O'Grady, E. P., Nguyen, D. T., Weisskopf, L., Eberl, L. & Sokol, P. A. (2011). The *Burkholderia cenocepacia* LysR-type transcriptional regulator ShvR influences expression of quorum-sensing, protease, type II secretion, and *afc* genes. *J Bacteriol* **193**(1): 163-176.
- Ochsner, U. A. (1993). Genetics and biochemistry of *Pseudomonas aeruginosa*. ETH Zürich. Inaugural-Dissertation.
- Ochsner, U. A., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994a). 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**(31): 19787-19795.
- Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994b). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**(7): 2044-2054.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6424-6428.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., et al. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**(3): 197-211.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., et al. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**(5): 376-386.
- Osborn, A. E. & Field, B. (2009). Operons. *Cell Mol Life Sci* **66**(23): 3755-3775.
- Palmer, T., Berks, B. C. & Sargent, F. (2010). Analysis of Tat targeting function and twin-arginine signal peptide activity in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* **619**: 191-216.
- Parke, J. L. & Gurian-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 225-258.
- Patel, R. M. & Desai, A. J. (1997). Surface-active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* GS3. *J Basic Microbiol* **37**(4): 281-286.
- Pauwels, K., Loris, R., Vandenbussche, G., Ruyschaert, J. M., Wyns, L., et al. (2005). Crystallization and crystal manipulation of a steric chaperone in complex with its lipase substrate. *Acta Crystallogr F* **61**: 791-795.
- Pauwels, K., Lustig, A., Wyns, L., Tommassen, J., Savvides, S. N., et al. (2006). Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. *Nat Struct Mol Biol* **13**(4): 374-375.
- Pauwels, K., Sanchez Del Pino, M. M., Feller, G. & Van Gelder, P. (2012). Decoding the folding of *Burkholderia glumae* lipase: Folding intermediates en route to kinetic stability. *PLoS One* **7**(5): e36999.
- Pauwels, K., Van Molle, I., Tommassen, J. & Van Gelder, P. (2007). Chaperoning Anfinsen: the steric foldases. *Mol Microbiol* **64**(4): 917-922.
- Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., Lipuma, J. J., Coenye, T., et al. (2005). Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol* **71**(7): 3917-3927.

- Peng, H. L., Shiou, S. R. & Chang, H. Y. (1999).** Characterization of *mcdR*, a regulatory gene of the malonate catabolic system in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**(7): 2302-2306.
- Peterson, G. L. (1977).** A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analyt Biochem* **83**(2): 346-356.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., *et al.* (2004).** UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**(13): 1605-1612.
- Picossi, S., Belitsky, B. R. & Sonenshein, A. L. (2007).** Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* *gltAB* expression by GltC. *J Mol Biol* **365**(5): 1298-1313.
- Podgornaia, A. I. & Laub, M. T. (2013).** Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **16**(2): 156-162.
- Porath, J. & Olin, B. (1983).** Immobilized metal-Ion affinity adsorption and immobilized metal-Ion affinity-chromatography of biomaterials - serum-protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* **22**(7): 1621-1630.
- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S. & Wagner, F. (1991).** Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Z Naturforsch C* **46**(3-4): 210-216.
- Py, B., Loiseau, L. & Barras, F. (2001).** An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep* **2**(3): 244-248.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., *et al.* (2001).** Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **40**(3): 708-718.
- Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., *et al.* (2005).** The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(2): 326-356.
- Raza, Z. A., Rehman, A., Khan, M. S. & Khalid, Z. M. (2007).** Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation* **18**(1): 115-121.
- Reese, M. G. (2001).** Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**(1): 51-56.
- Rojo, F. (2010).** Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**(5): 658-684.
- Rosenau, F. (2001).** Überexpression der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* und physiologische Charakterisierung der Foldasefunktion. Ruhr-Universität Bochum. Inaugural-Dissertation.
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2003).** Overexpression and secretion of biocatalysts in *Pseudomonas*. Enzyme Functionality: Design, Engineering, and Screening. A. Svendsen. New York, CRC Press.
- Rosenau, F. & Jaeger, K. E. (2000).** Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**(11): 1023-1032.

- Rosenau, F., Tommassen, J. & Jaeger, K. E. (2004).** Lipase-specific foldases. *ChemBiochem* **5**(2): 153-161.
- Ruff, A. J., Dennig, A. & Schwaneberg, U. (2013).** To get what we aim for - progress in diversity generation methods. *FEBS J* **280**(13): 2961-2978.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., et al. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press U.S.*
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S. P. & DiRita, V. J. (1995).** Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J* **14**(8): 1664-1673.
- Santambrogio, C., Sasso, F., Natalello, A., Brocca, S., Grandori, R., et al. (2013).** Effects of methanol on a methanol-tolerant bacterial lipase. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(19): 8609-18.
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B. & Davidson, W. S. (2003).** Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods* **52**(1): 1-18.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001).** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd Edition. St. Paul, MN, USA, The American Phytopathological Society Press.
- Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1996).** Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9505-9509.
- Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Gunther, K., et al. (2001).** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**(20): 4404-4422.
- Schatz, P. J. & Beckwith, J. (1990).** Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **24**: 215-248.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., et al. (2001).** Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**(6817): 258-268.
- Schmid, U. (1999).** Verfahrensoptimierung und Erzeugung selektiver Lipasemutanten durch gerichtete Evolution. Universität Stuttgart. Inaugural-Dissertation.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* **3**(6): 1101-1108.
- Schneidinger, B. (1997).** Überexpression und transkriptionelle Regulation des Lipaseoperons von *Pseudomonas aeruginosa* und funktionelle Charakterisierung der Lipase-spezifischen Foldase LipH. Ruhr-Universität Bochum. Inaugural-Dissertation.
- Schoemaker, H. E., Mink, D. & Wubbolts, M. G. (2003).** Dispelling the myths - biocatalysis in industrial synthesis. *Science* **299**(5613): 1694-1697.
- Senf, F., Tommassen, J. & Koster, M. (2008).** Polar secretion of proteins via the Xcp type II

- secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **154**(Pt 10): 3025-3032.
- Seydel, A., Gounon, P. & Pugsley, A. P. (1999)**. Testing the '+2 rule' for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Mol Microbiol* **34**(4): 810-821.
- Shahjahan, A. K. M., Rush, M. C., Groth, D. E. & Clark, C. A. (2000)**. Panicle Blight. *Rice Journal*(15): 26-29.
- Shibata, H., Kato, H. & Oda, J. (1998)**. Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB. *J Biochem* **123**(1): 136-141.
- Sicher, C. (2013)**. Analyse des intrazellulären Proteoms des Wildtyps PG1 und der Sekretionsmutante PG1ΔgspDEF von *Burkholderia glumae*. Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald. Bachelorarbeit.
- Silverstone, A. E., Arditti, R. R. & Magasanik, B. (1970)**. Catabolite-insensitive revertants of *lac* promoter mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**(3): 773-779.
- Sim, L., Ward, O. P. & Li, Z. Y. (1997)**. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**(4): 232-238.
- Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983)**. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic-engineering - transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio-Technol* **1**(9): 784-791.
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F. & Deziel, E. (2005)**. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**(6): 718-725.
- Stergiou, P. Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., et al. (2013)**. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv* **31**(8): 1846-59
- Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000)**. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stoop, E. J., Bitter, W. & van der Sar, A. M. (2012)**. Tubercle bacilli rely on a type VII army for pathogenicity. *Trends Microbiol* **20**(10): 477-484.
- 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**(1): 113-130.
- Summers, W. C. (1970)**. A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethyl pyrocarbonate. *Analyt Biochem* **33**(2): 459-63.
- Suzuki, F., Sawada, H., Azegami, K. & Tsuchiya, K. (2004)**. Molecular characterization of the *tox* operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *J Gen Plant Pathol* **70**(2): 97-107.
- Tang, L., Su, M., Zhu, L., Chi, L., Zhang, J., et al. (2013)**. Substitution of Val72 residue alters the enantioselectivity and activity of *Penicillium expansum* lipase. *World J Microbiol Biotechnol* **29**(1): 145-151.
- Tavares, L. F., Silva, P. M., Junqueira, M., Mariano, D. C., Nogueira, F. C., et al. (2013)**. Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia*

- kururiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(5): 1909-1921.
- Tayeb, L. A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., et al. (2008).** Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Res Microbiol* **159**(3): 169-177.
- Terpe, K. (2006).** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**(2): 211-222.
- Tielen, P., Rosin, N., Meyer, A. K., Dohnt, K., Haddad, I., et al. (2013).** Regulatory and metabolic networks for the adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to urinary tract-like conditions. *PLoS One* **8**(8): e71845.
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1992).** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **9**(1): 73-90.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
- Turner, L. R., Lara, J. C., Nunn, D. N. & Lory, S. (1993).** Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**(16): 4962-4969.
- Tuteja, R. (2005).** Type I signal peptidase: an overview. *Arch Biochem Biophys* **441**(2): 107-111.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., et al. (2012).** Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**(15): e115.
- Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T. & Jones, T. A. (1994).** Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J Mol Biol* **235**(2): 790-792.
- Urakami, T., Itoyoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K. I., et al. (1994).** Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**(2): 235-245.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. & Dunlap, P. V. (2007).** Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(Pt 12): 2823-2829.
- Van Weemen, B. K. & Schuurs, A. H. (1971).** Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* **15**(3): 232-236.
- Verger, R. (1997).** 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* **15**(1): 32-38.
- Villaverde, A. & Carrio, M. M. (2003).** Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* **25**(17): 1385-1395.
- Vogel, H. J. & Bonner, D. M. (1956).** Acetylornithinase of *Escherichia coli* - partial purification and some properties. *J Biol Chem* **218**(1): 97-106.

- Voulhoux, R., Taupiac, M. P., Czjzek, M., Beaumelle, B. & Filloux, A. (2000).** Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**(14): 4051-4058.
- Waegeman, H. & Soetaert, W. (2011).** Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**(12): 1891-1910.
- Weinberg, J. B., Alexander, B. D., Majure, J. M., Williams, L. W., Kim, J. Y., et al. (2007).** *Burkholderia glumae* infection in an infant with chronic granulomatous disease. *J Clin Microbiol* **45**(2): 662-665.
- Wiegand, S., Dietrich, S., Hertel, R., Bongaerts, J., Evers, S., et al. (2013).** RNA-Seq of *Bacillus licheniformis*: active regulatory RNA features expressed within a productive fermentation. *BMC Genomics* **14**: 667.
- Williams, P. & Camara, M. (2009).** Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**(2): 182-191.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. & Hunziker, W. (1990).** Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**(6260): 771-774.
- Winkler, U. K. & Stuckmann, M. (1979).** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**(3): 663-670.
- Winsor, G. L., Lam, D. K., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., et al. (2011).** Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D596-600.
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., et al. (2011).** Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Cell Fact* **10**: 80.
- Wolf, I. V., Meinardi, C. A. & Zalazar, C. A. (2009).** Production of flavour compounds from fat during cheese ripening by action of lipases and esterases. *Protein Pept Lett* **16**(10): 1235-1243.
- Woodley, J. M. (2013).** Protein engineering of enzymes for process applications. *Curr Opin Chem Biol* **17**(2): 310-316.
- Xu, T., Liu, L., Hou, S., Xu, J., Yang, B., et al. (2012).** Crystal structure of a mono- and diacylglycerol lipase from *Malassezia globosa* reveals a novel lid conformation and insights into the substrate specificity. *J Struct Biol* **178**(3): 363-369.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., et al. (1992).** Proposal of *Burkholderia* genus and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) *Microbiol Immunol* **36**(12): 1251-1275.
- Yeung, A. T., Bains, M. & Hancock, R. E. (2011).** The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**(4): 918-931.
- Zhang, Y. & Miller, R. M. (1995).** Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Appl Environ Microbiol* **61**(6): 2247-2251.
- Zhu, S. S., Li, M., Yu, X. & Xu, Y. (2013).** Role of Met93 and Thr96 in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase. *Appl Biochem Biotechnol* **170**(2): 436-447.

8. Anhang

Tabelle 8.1 Veränderte Transkriptmenge ausgewählter Gene in *B. glumae* PG1 unter Lipase-induzierenden Bedingungen.

Nach statistischer Auswertung der Rohdaten aus drei unabhängigen biologischen Replikaten sind die Transkriptmengen der Gene zu mindestens einem Zeitpunkt mindestens dreifach stärker (>3) oder schwächer (<0,333) exprimiert (lineare N-Way ANOVA, $p = 10^{-5}$) als in der Referenz (Ref., exponentielle Wachstumsphase in MME mit 0,35 % (w/v) Succinat). Die Werte der exponentiellen (exp.), transienten (trans.) und stationären (stat.) Wachstumsphase von *B. glumae* PG1 in MME mit 1 % (v/v) Olivenöl werden als die x-fache Änderung der Transkriptmenge im Vergleich zur Referenz angegeben. Gezeigt sind das geometrische Mittel und die Standardabweichung der biologischen Dreifachbestimmung. Die signifikant veränderten Werte sind mit einem „*“ markiert.

Gen	Protein	exp.	trans.	stat.	Ref.
BGL_1c02790	DNA-abhäng. RNA-Polym., α -Unt., RpoA	0,3* \pm 0,1	0,048* \pm 0,004	0,064* \pm 0,006	1,0 \pm 0,2
BGL_1c09940	RNA-Polym. Sigma-70-Faktor, RpoE1	0,39 \pm 0,03	0,15* \pm 0,05	0,2* \pm 0,1	1,00 \pm 0,2
BGL_1c11040	Acyl-Homoserinlacton-abh. Transkr.-aktivator	0,40 \pm 0,06	0,22* \pm 0,04	0,25* \pm 0,04	1,0 \pm 0,3
BGL_1c13770	RNA-Polym., Sigma-Faktor FliA	0,3 \pm 0,1	0,15* \pm 0,04	0,14* \pm 0,01	1,0 \pm 0,1
BGL_1c21520	RND-Efflux-Transp., äuß. Membr., NodT-Fam.	4,7* \pm 0,8	2,4 \pm 0,4	3,3* \pm 0,8	1,0 \pm 0,2
BGL_1c28690	Chaperon, HSP90-Familie	0,3* \pm 0,1	0,10* \pm 0,01	0,13* \pm 0,01	1,0 \pm 0,1
BGL_1c30880	Transkriptionsregulator, LsrR-Familie	0,5 \pm 0,2	0,31* \pm 0,01	0,39 \pm 0,02	1,0 \pm 0,1
BGL_2c09800	Transkriptionsregulator, GntR-Familie	1,9 \pm 0,2	3,9* \pm 0,1	4,0* \pm 0,5	1,0 \pm 0,1
BGL_2c12540	Transkriptionsregulator, TetR-Familie	0,5 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,27* \pm 0,01	1,0 \pm 0,2
BGL_2c20820	Transkriptionsregulator, LysR-Familie	2,9 \pm 0,7	4,2* \pm 1,6	4,7* \pm 1,0	1,0 \pm 0,1
BGL_2c29230	Put. Transkriptionsregulator, XRE-Familie	0,8 \pm 0,2	117,9* \pm 39,6	25,3* \pm 30,4	1,00 \pm 0,03
BGL_2c29300	Put. Signaltransduktionsantwortregulator, CheY-ähnlich	1,1 \pm 0,2	7,3* \pm 1,0	5,1* \pm 1,6	1,0 \pm 0,1
BGL_2c07470	RhIA	0,94 \pm 0,65	4,53 \pm 0,26	4,62 \pm 0,03	1,00 \pm 0,51

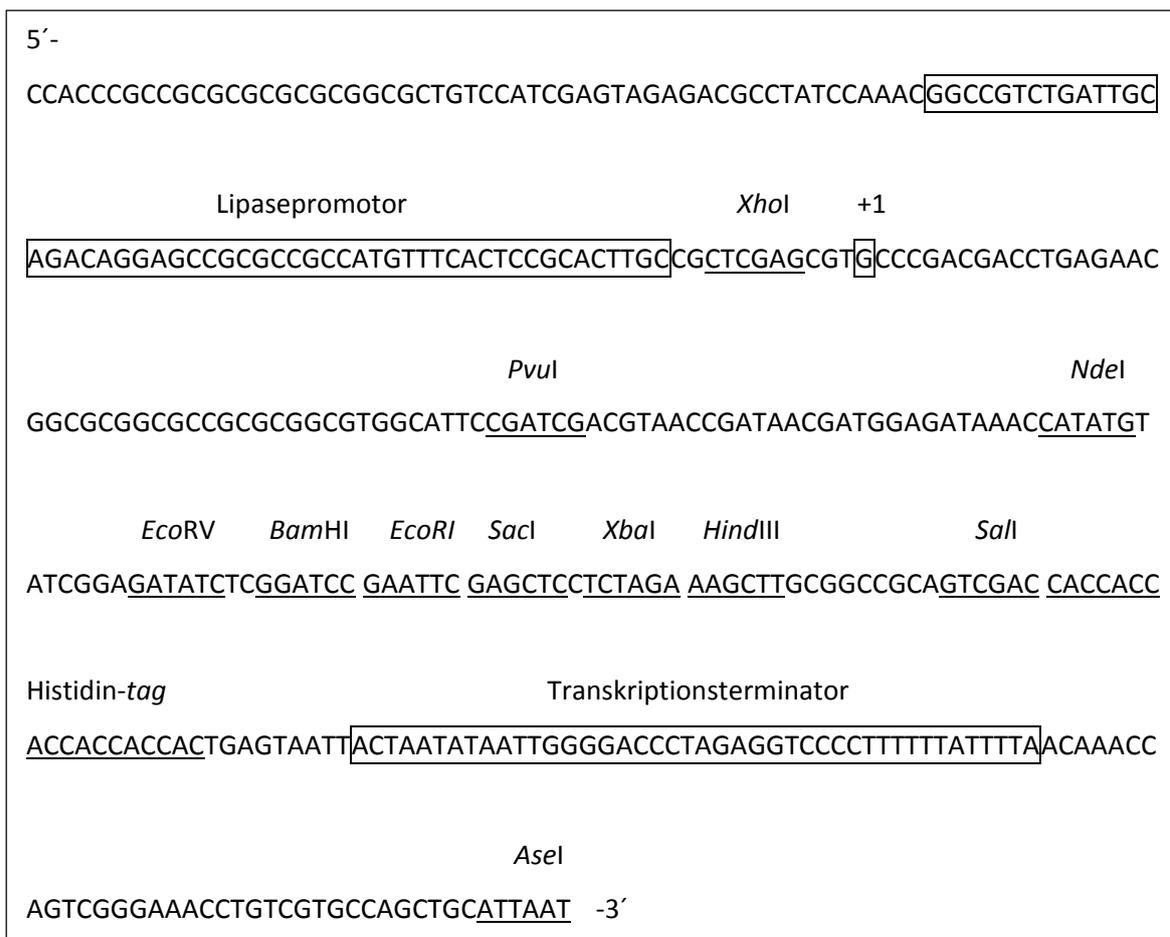


Abbildung 8.1 Multiple cloning site des Expressionsplasmids pBlip.

Unterstrichen sind die Erkennungsbereiche häufig verwendeter Restriktionsendonukleasen sowie der Histidin-tag. Mit einer Box umrandet sind regulatorische Bereiche. Stromabwärts des Lipasepromotors ist der Transkriptionsstart (Beselin, 2005) mit „+1“ markiert.

Tabelle 8.2 Gene mit putativem Einfluss auf die Lipaseproduktion.

Nr.	Gen	COG*	Putative Funktion
1	BGL_2c04170**	T	Nichtspezifische Serin/Threonin-Kinase
2	BGL_2c07240	E	ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein
3	BGL_1c34940	N	Flagellen-assemblierendes Protein/Muramidase FlgJ
4	BGL_1c04140	O	Glutathion-S-Transferase
5	BGL_2c21500	Q	Carboxymethylenbutenolidase
6	BGL_1c24390	S	Protein mit TGS-Domäne
7	BGL_1c30370	J	Translationselongationsfaktor G
8	BGL_2c13210	S	Hypothetisches Protein mit DUF88
9	BGL_1c32350	I	Acyl-CoA-Dehydrogenase
10	BGL_1c32360	K	Transkriptionsregulator, TetR-Familie
11	BGL_1c12560	K	δ^{54} -Interaktionsdomäne Transkriptionsregulator, Fis-Familie
12	BGL_1c16400	R	RNA-Chaperon Hfq
13	BGL_1c07200	F	Aspartat-Carbamoyltransferase PyrB
14	BGL_1c34520	S	Hypothetisches Protein
15	BGL_1c33120	E	Glykosyltransferase, Familie 3
16	BGL_1c08210	G	Glukose-6-Phosphate-1-Dehydrogenase Zwf
17	BGL_1c35390	N	Flagellarer Proteinexport, ATPase FliI
18	BGL_2c27450	K	Putativer Transkriptionsregulator, GntR-Familie

*COG: [E] Aminosäuretransport und -metabolismus, [F] Nukleotidtransport und -metabolismus, [G] Kohlenhydrattransport und -metabolismus, [I] Lipidtransport und -metabolismus, [J] Translation und Biogenese, [K] Transkription, [N] Zellbeweglichkeit, [O] posttranslationale Modifikation, [Q] Synthese, Transport und Katabolismus von Sekundärmetaboliten, [R] nur generelle Funktionsvorhersage möglich, [S] Funktion unbekannt, [T] Signaltransduktion (Kristensen *et al.*, 2010).

** : Aufgrund von identischen Sequenzen der Gene BGL_2c04170 und BGL_2c25020 in den Bereichen, die für die Lokalisierung des Transposons relevant waren, kann keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, in welchem der beiden Gene die Insertion stattfand. Beide Gene kodieren für eine putative nichtspezifische Serin/Threonin-Kinase.

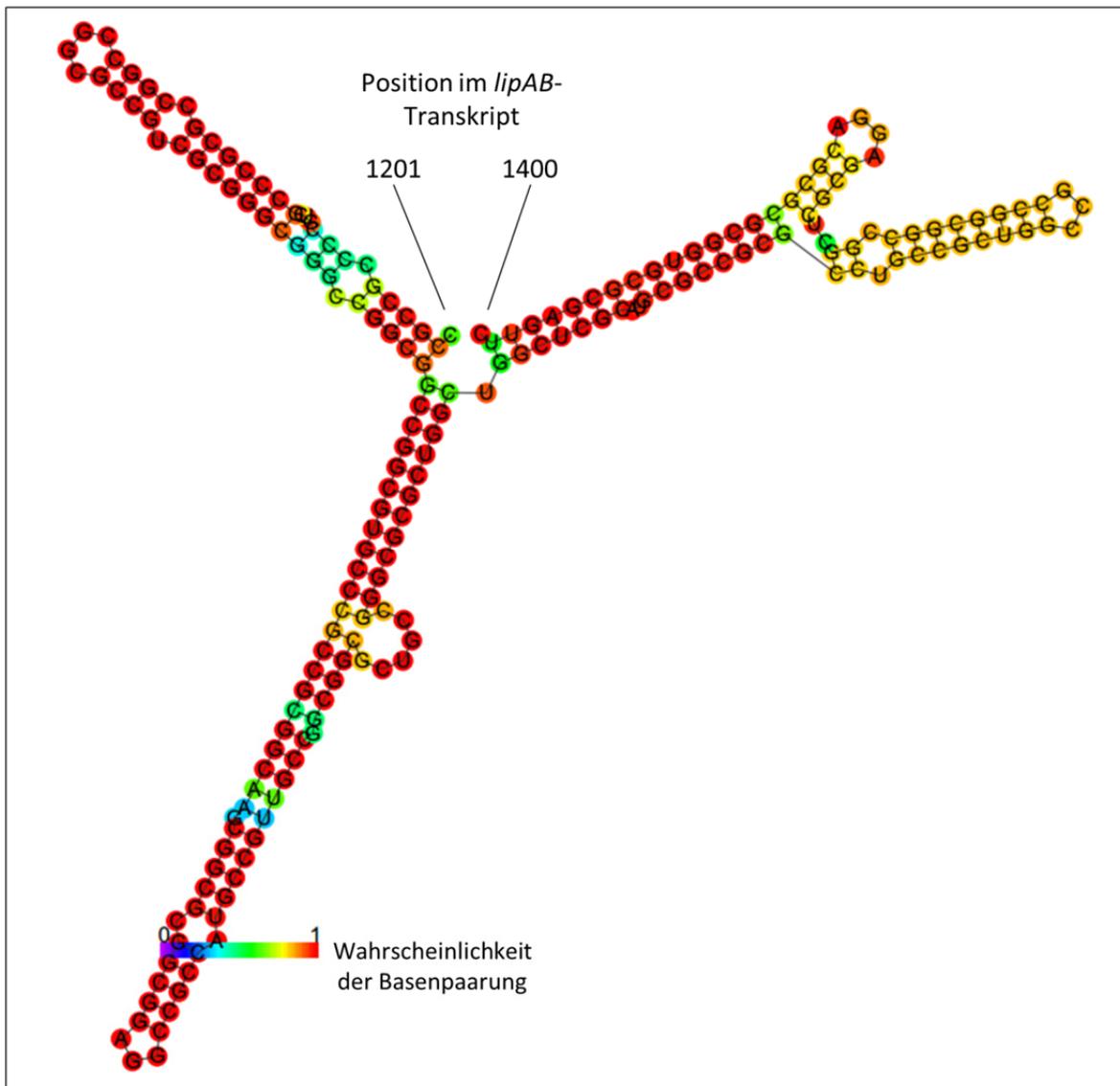


Abbildung 8.2 Vorhergesagte mRNA-Haarnadelstruktur innerhalb des Degradationsbereichs im *lipAB*-Transkript

Strukturvorhersage erfolgte mit dem Programm „RNAfold“ (Gruber *et al.*, 2008, Lorenz *et al.*, 2011). Betrachtet wurde der Bereich zwischen Position 1201 und 1400 des *lipAB*-Transkripts (siehe Skala in Abbildung 4.4), in dem die Degradation stattfindet. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit, mit der einzelne Basen miteinander interagieren, erfolgte mit den Parametern für *minimum free energy prediction* (siehe Farbskala: von lila nach rot bzw. unwahrscheinlich nach wahrscheinlich). Die graphische Darstellung erfolgte ebenfalls durch den „RNAfold WebServer“, daher konnte die Farbskala nachträglich nicht verschoben werden.

Lebenslauf**Persönliche Angaben**

Name	Andreas Knapp
Geburtsdatum	23.11.1984
Geburtsort	Neuss
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig, keine Kinder

Ausbildung

Aug. 1995 – Jun. 2004	Abitur mit Abschlussnote 2,0 Quirinus-Gymnasium Neuss
Okt. 2005 – Nov. 2009	Abschluss des Diplom-Studiengangs Biologie mit Note „ausgezeichnet“. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
ab Apr. 2010	Promotionsstudium im Fach Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berufliche Tätigkeiten

Okt. 2004 – Jun. 2005	Grundwehrdienst Bundeswehr Beendigung des Dienstes als Obergefreiter
Febr. 2009 – Aug. 2009	Studentische Hilfskraft Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Apr. 2010 – Jun. 2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich