

**Untersuchungen zur physiologischen Funktion der  
Esterase EstA aus  
*Pseudomonas aeruginosa*.**

**Inaugural-Dissertation**

zur

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

vorgelegt von

**Diplom-Biologin**

**Anette Gdynia**

aus Stettin

Düsseldorf, 2006

**Untersuchungen zur physiologischen Funktion der  
Esterase EstA aus  
*Pseudomonas aeruginosa*.**

**Inaugural-Dissertation**

zur

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

vorgelegt von

**Diplom-Biologin**

**Anette Gdynia**

aus Stettin

Düsseldorf, 2006

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Koreferent: Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2006

Hiermit versichere ich die hier vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Die Abbildungen des Ergebnisteils dieser Arbeit sind inhaltlich nicht veränderte Kopien der Originalaufnahmen. Diese Originalaufnahmen können jederzeit eingesehen werden.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger danke ich für die sehr interessante und aktuelle Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die konstruktive Diskussionsbereitschaft. Für die Einräumung großer experimenteller Freiheit und für die Ermöglichung wissenschaftlichen Austausches bin ich besonders dankbar.

Herrn Prof. Michael Bott, Institut für Biotechnologie, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Frau Dr. Susanne Wilhelm und Herr Dr. Frank Rosenau möchte ich mich für die engagierte Betreuung, die konstruktiven und anregenden Diskussionen und die freundschaftliche Unterstützung während der Promotionszeit bedanken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie und vor allem den der „*Pseudomonas*“-Gruppe möchte ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Herrn Dr. Jost Wingender, Frau Dr. Petra Tielen und Herrn Dr. Martin Strathmann der Abteilung Aquatische Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen danke ich für die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei der Laser-Scanning Mikroskopie.

Herrn Dr. Max Schobert und Mitarbeitern des Lehrstuhl der Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig danke ich für die freundliche Unterstützung in der Durchführung der 2-D-Gelelektrophoresen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Zähringer und Mitarbeitern am Forschungszentrum Borstel an dem Zentrum für Medizin und Biowissenschaften möchte ich mich für die freundliche Unterstützung in der HPLC-Aufreinigung der Rhamnolipide danken.

Mein innigster Dank gilt meinem Mann und meiner Familie, da sie mich von Anfang bis zum Ende unterstützt haben und ohne die das Ganze nicht möglich wäre.

## Veröffentlichungen in Rahmen der Promotion

**Rosenau, F., Heckmann, S., Smolski, A., Wingender, J., Flemming, H.-J., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. (2003)** The lipase LipC of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for cell motility and affects rhamnolipid production and biofilm formation. Book of abstracts, ASM Conference, Biofilms 2003, Victoria, British Columbia, Canada, p. 82.

**Gdynia, A., Rosenau, F., Wilhelm, S. & Jaeger, K.-E. (2006)** Outer membrane esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* influences rhamnolipid production, cell motility and biofilm formation. Manuscript in Vorbereitung

### Posterpräsentationen:

**Wilhelm, S., Smolski, A., Tielker, D., Molin, S., Kolmar, H., Jaeger, K.-E. (2003).** The outer membrane-bound esterase EstA is involved in rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa*. Québec, Canada, p. 85.

**Heckmann, S., Gdynia, A., Tielen, P., Wingender, J., Flemming, H.-C., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2005)** The physiological role of the extracellular lipase LipC from *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts, *Pseudomonas* 2005, Marseille, Frankreich, p. 141.

---

## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	V
Abkürzungen	VII

### 1. Einleitung

<b>1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>1</b>
<b>1.2. Sekretion</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Phospholipasen</b>	<b>3</b>
<b>1.4. Carboxylesterhydrolasen</b>	<b>4</b>
1.4.1. Lipasen	4
1.4.2. Esterasen	5
a. GDSL-Familie	5
b. Autotransporter-Proreine	6
<b>1.5. Rhamnolipid</b>	<b>9</b>
1.5.1. Struktur	9
1.5.2. Physiologische Rolle	10
1.5.3. Biotechnologischer Einsatz	10
1.5.4. Synthese	11
<b>1.6. „Quorum sensing“-System</b>	<b>13</b>
1.6.1. Rhl-Regulation der Rhamnosyltransferase-Synthese	16
<b>1.7. Biofilme</b>	<b>17</b>
<b>1.8. Beweglichkeit</b>	<b>18</b>

### 2. Material und Methoden

<b>2.1. Chemikalien und Enzyme</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Bakterien und Plasmide</b>	<b>21</b>
<b>2.3. Oligonukleotide</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Medien</b>	<b>22</b>
<b>2.5. Kultivierung und Lagerung von Bakterien</b>	<b>23</b>
<b>2.6. Isolierung von Nukleinsäuren</b>	<b>24</b>
<b>2.7. Gelelektrophorese der Nukleinsäuren</b>	<b>24</b>
<b>2.8. <i>In vitro</i> rekombination von DNA</b>	<b>24</b>
2.8.1. Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	24
2.8.2. Ligation von Vektor- und Fragment-DNA	24
<b>2.9. Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid DNA</b>	<b>24</b>
<b>2.10. Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation</b>	<b>24</b>

<b>2.11. Ortsgerichtete Mutagenese durch „overlap-extension“-PCR</b>	<b>25</b>
<b>2.12. Chromosomale Gfp-Markierung von <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>25</b>
<b>2.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	<b>26</b>
<b>2.14. Sequenzierung von DNA</b>	<b>26</b>
<b>2.15. Gewinnung von Kulturüberständen</b>	<b>26</b>
<b>2.16. Herstellung von Gesamtzellextrakten (GZE)</b>	<b>26</b>
<b>2.17. Fraktionierung von <i>P. aeruginosa</i>-Zellen</b>	<b>26</b>
<b>2.18. Präzipitation von Proteinen</b>	<b>26</b>
<b>2.19. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</b>	<b>26</b>
<b>2.20. Immunologischer Nachweis von Proteinen</b>	<b>27</b>
<b>2.21. Bestimmung der Enzymaktivität</b>	<b>27</b>
2.21.1. Esterase Nachweistest	27
a. Photometrischer pNpC-Test	27
b. Zymogramm	27
c. Tributyrin-Indikator-Platten	28
2.21.2. Isocitratlyase Aktivitätstest	28
2.21.3. Phospholipase Nachweistest	28
2.21.4. Protease Nachweistest	28
a. Protease-Indikator-Platten („skim-milk“-Platten)	28
b. Zymogramm	29
<b>2.22. „Drop-collapsing“-Test</b>	<b>29</b>
<b>2.23. Rhamnolipid-Untersuchung in <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>29</b>
2.23.1. Rhamnolipid-Extraktion aus Kulturüberständen	29
2.23.2. Orcinoltest zum Rhamnolipid-Nachweis	29
2.23.3. Dünnschichtchromatographie von Rhamnolipiden	29
<b>2.24. Biofilmuntersuchung</b>	<b>30</b>
2.24.1. Biofilmkultivierung	30
a. Kultivierung in Durchflusszellen	30
b. Kultivierung in Reagenzgläsern	30
2.24.2. Biofilmdetektion	30
a. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)	30
b. Kristallviolett-färbung	30
<b>2.25. Pyocyanin-Nachweis</b>	<b>30</b>
<b>2.26. Bestimmung der Zelloberflächen-Hydrophobizität</b>	<b>31</b>
<b>2.27. Untersuchung der AHL-Signalmoleküle aus <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>31</b>
2.27.1. Extraktion der AHL-Signalmoleküle	31
2.27.2. Dünnschichtchromatographie der AHL-Signalmoleküle	31
2.27.3. Detektion der AHL-Signalmolekülen mit Indikatorbakterien	31

---

<b>2.28. Untersuchung des „Pseudomonas-quinolon“-Signals (PQS)</b>	<b>32</b>
2.28.1. Extraktion von PQS	32
2.28.2. Dünnschichtchromatographie und Detektion von PQS	32
<b>2.29. Zwei-dimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten</b>	<b>32</b>
2.29.1. Zellernte	32
2.29.2. Phenolextraktion und Acetonfällung der Proteine	32
2.29.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	33
2.29.4. Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten	33
2.29.5. Rehydratisierung der Proteine	33
2.29.6. Elektrophorese der 1. Dimension	33
2.29.7. Äquilibration der IPG-Streifen	33
2.29.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.29.9. Elektrophorese der 2. Dimension	34
2.29.10. Fixierung und Fluoreszenzfärbung der 2-D Gele mit RuBPS	34
<b>2.30. MALDI-TOF Massenspektroskopie</b>	<b>34</b>
2.30.1. Probenaufbereitung und Proteasebehandlung	34
2.30.2. Reinigung der Protease-verdauten Peptide	35
<b>2.31. Überexpression und Reinigung von EstA</b>	<b>35</b>
2.31.1. EstA-Überexpression	35
2.31.2. Reinigung von EstA „inclusion bodies“	35
<b>2.32. Computerprogramme und Online-Datenbanken</b>	<b>35</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	
<b>3.1. Untersuchung der Oberflächenspannung der Kulturüberstände von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und der <i>estA</i>-Negativmutante</b>	<b>36</b>
<b>3.2. Einfluss der <i>estA</i>-Deletion und EstA-Überexpression auf die Rhamnolipidproduktion in <i>P. aeruginosa</i> PAO1</b>	<b>37</b>
<b>3.3. Untersuchung der Beweglichkeit von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und der <i>estA</i>-Negativmutante</b>	<b>39</b>
3.3.1. Untersuchung des Rhamnolipid-abhängigen Schwärmens	39
3.3.2. Untersuchung von „twitching motility“ und Schwimmen	40
<b>3.4. Untersuchung der Zelloberflächen-Hydrophobizität von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und der <i>estA</i>-Negativmutante</b>	<b>41</b>
<b>3.5. EstA Einfluss auf die Biofilmbildung</b>	<b>42</b>
3.5.1. Biofilmuntersuchung in Durchflusszellen	42
a. Einfluss der <i>estA</i> -Deletion auf die Biofilmbildung	43
b. Einfluss der EstA-Überexpression auf die Biofilmbildung	46
3.5.2. Kristallviolett-färbung der reifen Biofilme in Reagenzgläsern	46

---

<b>3.6. Einfluss der Esterase EstA auf des „Quorum sensing“-Systems von <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>48</b>
3.6.1. Las und Rhl-System	48
3.6.2. „Pseudomonas-quinolon“-Signal (PQS)	49
a. EstA Einfluss auf das PQS-regulierte Pyocyanin	50
b. EstA Einfluss auf die PQS-regulierte Elastase LasB	51
<b>3.7. Komplementation der <i>estA</i>-Mutante Phänotypen</b>	<b>54</b>
3.7.1. C4-HSL-Zugabe und die Beweglichkeit	54
3.7.2. C4-HSL-Zugabe und die Rhamnolipidproduktion	55
3.7.3. Rhamnolipidzugabe und die Beweglichkeit	55
3.7.4. Beweglichkeit der Mischkultur von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und der <i>estA</i> -Negativmutante	56
<b>3.8. Proteomuntersuchung von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und <i>estA</i>-Negativmutante</b>	<b>58</b>
3.8.1. Im <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) vermindert vorhandene Proteine	61
3.8.2. In der <i>estA</i> -Negativmutante verstärkt vorhandene Proteine	61
<b>3.9. Konstruktion einer Mutante im aktiven Zentrum von EstA</b>	<b>63</b>
<b>3.10. Nachweis der inaktiven EstA Variante in <i>P. aeruginosa</i> PAO1</b>	<b>64</b>
3.10.1. Expression von EstA <sup>mut</sup>	64
3.10.2. Esterolytische Aktivität von EstA <sup>mut</sup>	65
3.10.3. Lokalisierung von EstA	66
<b>3.11. Untersuchung der Mutante des aktiven Zentrum von EstA</b>	<b>67</b>
3.11.1. Bedeutung der EstA-Aktivität für die Rhamnolipidsynthese	67
3.11.2. Bedeutung der EstA-Aktivität für die Beweglichkeit von <i>P. aeruginosa</i>	68
3.11.3. Einfluss der EstA-Aktivität auf die Zelloberflächen-Hydrophobizität	69
3.11.4. Bedeutung der EstA-Aktivität für die Biofilmbildung	69
<b>3.12. Untersuchung der Esterase EstA auf Phospholipaseaktivität</b>	<b>73</b>
<b>3.13. Einfluss EstA-verdauter Membranfraktion des <i>P. aeruginosa</i> PAO1 auf das Schwärmverhalten der <i>estA</i>-Negativmutante</b>	<b>77</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>117</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>119</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>i</b>

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

<b>Abbildungen:</b>		<b>Seite</b>
Abb. 1	Schematische Darstellung des Autotransportermechanismus.	6
Abb. 2	Topologisches Model eines Autotransporter-Proteins und die Kristall-Struktur der Transporter-Domäne des NalP-Autotransporters aus <i>N. meningitidis</i> .	8
Abb. 3	Struktur der Oberflächen-aktiven Substanzen von <i>P. aeruginosa</i> .	9
Abb. 4	Rhamnolipid-Syntheseweg.	11
Abb. 5	Struktur der „Quorum sensing“ Signalmoleküle.	14
Abb. 6	„Quorum-sensing“-System bei <i>P. aeruginosa</i> .	15
Abb. 7	Modell zur „Quorum sensing“-Regulation des <i>rhlABRI</i> - Operons.	16
Abb. 8	Schematische Darstellung der ortsgerichteten Mutagenese durch „overlap-extension“-PCR.	25
Abb. 9	„Drop-collapsing“-Test zur Untersuchung der Oberflächenspannung von Kulturüberständen aus <i>P. aeruginosa</i> .	36
Abb. 10	Rhamnolipidmenge in den Kulturüberständen von <i>P. aeruginosa</i> .	37
Abb. 11	Dünnschichtchromatographie der Rhamnolipide aus den Kulturüberständen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	38
Abb. 12	Schwärmen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ).	40
Abb. 13	Schwimmen und „twitching motility“ von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ).	40
Abb. 14	Adhäsion von Zellen der <i>P. aeruginosa</i> Stämme PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ) an n-Hexadekan, zur Untersuchung der Oberflächen-Hydrophobizität.	41
Abb. 15	CLSM-Aufnahmen von Biofilmen des <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und der <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ) in Durchflusszellen.	44
Abb. 16	Die Quantifizierung der Biofilme von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ) mit dem Computerprogramm „COMSTAT“.	45
Abb. 17	CLSM-Aufnahmen des reifen Biofilms von <i>EstA</i> -Überexpressionsstamm in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Durchflusszellen.	46
Abb. 18	Kristallviolett-färbung und Quantifizierung der Biofilme von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ) in Reagenzgläsern.	47
Abb. 19	Nachweis der dünn-schichtchromatographisch aufgetrennter AHL-Signalmoleküle aus den Kulturüberständen vom <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und der <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ) mittels der AHL-Sensorstämme <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und <i>Chromobacterium violaceum</i> .	49
Abb. 20	Dünnschichtchromatographischer Nachweis vom „Pseudomonas-quinolon“-Signal (PQS) im Kulturüberstand von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ).	50
Abb. 21	Pyocyaninproduktion von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ).	51
Abb. 22	Nachweis der proteolytischen Aktivität in Kulturüberständen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	52
Abb. 23	Auswirkung der externen C4-HSL-Zugabe auf die Beweglichkeit der <i>estA</i> -Negativmutante ( $\Delta estA$ ).	54
Abb. 24	Orcinoltest zur Untersuchung der Auswirkung der C4-HSL-Zugabe auf die Rhamnolipidproduktion in der <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ).	55
Abb. 25	Auswirkung der externen Rhamnolipidzugabe auf die Beweglichkeit von der <i>estA</i> -Negativmutante ( $\Delta estA$ ).	56
Abb. 26	Schwimm- und Schwärmbewegung der Mischkultur von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ) und die Identifizierung der Zellen der äußersten Bewegungsspuren.	57
Abb. 27	Vergleich der zellulären 2-D-Proteinmuster von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und der <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ).	59
Abb. 28	Vergrößerter 2-D-Gelabschnitt, der die Isocitratlyase- und Malatsynthase-Proteine aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und <i>estA</i> -Negativmutante gegenüberstellt und Quantifizierung der Isocitratlyase-Aktivität.	62

Abb. 29	Schematische Darstellung der Expressionsvektoren der nativen Esterase (pBBX <sup>++</sup> ) und der im aktiven Zentrum mutierten Esterase-Variante (pBBX <sup>mut</sup> ) und Nachweis deren esterolytischen Aktivität im heterologen Stamm <i>E. coli</i> DH5a auf Tributyrinplatten.	63
Abb. 30	Immunologischer Nachweis von EstA und der inaktiven Esterase-Variante EstA <sup>mut</sup> in <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	64
Abb. 31	Esterase-Aktivitätstest und Zymogramm-Gel der rekombinierten Stämme der <i>estA</i> -Negativmutante.	65
Abb. 32	Zymogramm-Gel Rekombinationsstämmen der <i>estA</i> -Negativmutante nach deren Zellfraktionierung.	66
Abb. 33	Dünnschichtchromatographische und photometrischer Nachweis der Rhamnolipidmenge in den Kulturüberständen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und den Komplementationsstämmen von <i>estA</i> -Negativmutante.	67
Abb. 34	Schwimmen, Schwärmen und „twitching motility“ der komplementierten <i>estA</i> -Negativmutante ( $\Delta estA$ ).	68
Abb. 35	Adhäsion der Zellen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und den Komplementationsstämmen von <i>estA</i> -Negativmutante an n-Hexadekan.	69
Abb. 36	CLSM-Aufnahmen von Biofilmen des <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und der Komplementationsstämme von <i>estA</i> -Negativmutante in Durchflusszellen nach 24 und 72 h.	70
Abb. 37	Quantifizierung der Biofilme von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und der Komplementationsstämme der <i>estA</i> -Negativmutante mit dem Computerprogramms „COMSTAT“.	71
Abb. 38	Esterase-Aktivitätstest der heterolog in <i>E. coli</i> DH5a exprimierter EstA und Dünnschichtchromatographie zur Analyse deren Phospholipase-Aktivität.	74
Abb. 39	Dünnschichtchromatographie zur Analyse der Phospholipase B-Aktivität von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 EstA.	75
Abb. 40	Dünnschichtchromatographie zur Analyse der Phospholipase-Aktivität der <i>P. aeruginosa</i> EstA gegenüber Phosphatidylcholin (PC).	76
Abb. 41	Schwärmverhalten von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Negativmutante unter Zugabe EstA-Verdauter bzw. unverdauter Membranfraktion von <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	78
Abb. 42	Citratzyklus und Glyoxylatzyklus - Weichenstellung am Isocitrat.	101
Abb. 43	Verteilung der zellgebundenen und extrazellulären Rhamnolipide in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und der <i>estA</i> -Negativmutante.	104
Abb. 44	Angriffsorte der Phospholipasen am Phosphatidylcholin.	109
Abb. 45	Möglicher Schaltkreis zur EstA-Regulation.	113
Abb. 46	Schematische Darstellung der Phänotypen der <i>estA</i> -Negativmutante.	116

**Tabellen:**

Tab. 1	Die meist vorkommenden Rhamnolipide und deren Bezeichnung.	9
Tab. 2	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.	21
Tab. 3	Übersicht der verwendeten Plasmide.	22
Tab. 4	Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.	22
Tab. 5	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.	22
Tab. 6	Konzentrationen der zur Selektion eingesetzter Antibiotika.	23
Tab. 7	Massenspektrometrisch identifizierten Proteine aus den Zellen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und <i>estA</i> -Mutante ( $\Delta estA$ ).	60
Tab. 8	Mengen der zellgebundenen und extrazellulären Rhamnolipide in <i>P. aeruginosa</i> .	103
Tab. 9	Spaltprodukte des Phosphatidylcholins und Lysophosphatidylcholins nach Phospholipase Behandlung.	109

**Anhang:**

Anhang. 1	Glukosetransferreaktionen in der Rhamnolipid-Biosynthese.	i
Anhang. 2	Rhamnolipid-Syntheseweg	ii

---

**Abkürzungen**

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

Abb.	Abbildung
ABG	Minimalmedium AB mit Glukose
A. dest.	Aqua destillata
AHL(s)	<i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlacton(e)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchonininsäure („bicinchoninic acid“)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
CF	cystische Fibrose
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CLSM	konfokale(s) Laser-Scanning-Mikroskop(ie)
CMC	kritische Mizellen Konzentration („critical micelle concentration“)
C-Terminus	Carboxyterminus
3-D	dreidimensional
Da	Dalton
DE	unterschiedliche Expression („different expression“)
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESI	Elektrosprayionisation
GFP	grün fluoreszierendes Protein („green fluorescence proteine“)
GZE	Gesamtzellextrakt(e)
h	Stunde(n)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumphosphatpuffer
KÜ	Kulturüberstand
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Leervektor
M	Molar
MALDI	“Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation”
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
N-Terminus	Aminoterminal
O.D.	optische Dichte
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactosid
p.A.	„per analyse“

---

---

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Plac	Promotor des <i>lacZYA</i> -Operons
PQS	„Pseudomonas-quinolone“-Signal
QS	„Quorum-sensing“
RL	Rhamnolipid
RT	Raumtemperatur
Rf-Werte	related to front bzw. Retentionsfaktor
RuBPS	Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sp <sup>R</sup>	Spectinomycin-Resistenz
Str <sup>R</sup>	Streptomycin-Resistenz
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TOF	„Time Of Flight“
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtkultur(en)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

**Nomenklatur für Rhamnolipide:**

RL-1,2	Mono-Rhamnolipid (RhC <sub>10</sub> C <sub>10</sub> )
RL-2,2	Di-Rhamnolipid (Rh <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub> )

**Nomenklatur für AHL-Signalmoleküle:**

C4-HSL	<i>N</i> -Butanoyl-L-Homoserinlacton
C6-HSL	<i>N</i> -Hexanoyl-L-Homoserinlacton
3-oxo-C6-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Hexanoyl)-L-Homoserinlacton
3-oxo-C8-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Octanoyl)-L-Homoserinlacton
3-oxo-C10-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Decanoyl)-L-Homoserinlacton
3-oxo-C12-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Dodecanoyl)-L-Homoserinlacton

# 1. Einleitung

## 1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Die Gattung *Pseudomonas* wurde erstmals 1891 von Migula beschrieben. Die Klassifizierung und Charakterisierung dieser Gattung erfolgte aufgrund relativ grober morphologischer Merkmale, zu denen Gram-negative, nicht-sporenbildende, gerade oder leicht gekrümmte, polar begeißelte Stäbchenbakterien zählten. Erst mit der Entwicklung des molekularbiologischen 16S rRNA Vergleichs, der der phylogenetischen Bestimmung dient, wurde die Gattung *Pseudomonas* in fünf rRNA-Homologie-Gruppen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) eingeteilt. Bis heute wird die Art *Pseudomonas aeruginosa* auf der Basis der morphologischen und physiologischen Aspekte dem  $\gamma$ -Zweig der Purpurbakterien (Proteobakterien) zugeordnet. Im Jahr 2000 wurde das 6,3 Mbp große *P. aeruginosa* PAO1 Genom komplett sequenziert (Stover *et al.*, 2000).

Die Pseudomonaden leben chemoorganotroph, mesophil und fakultativ aerob und haben eine Reihe charakteristischer artspezifischer Eigenschaften, wie den Besitz einer einzelnen polaren Flagelle, die Fähigkeit der Denitrifikation (unter anaeroben Bedingungen), die Produktion fluoreszierender Farbstoffe wie Pyocyanin und Pyoverdin und die Fähigkeit, bei Temperaturen bis 43°C zu wachsen (Palleroni, 1993; Hof *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2000). Durch die hohe Anpassungslosigkeit besitzt *P. aeruginosa* die Fähigkeit, sich an verschiedene ökologische Nischen anzupassen und ist ubiquitär an zahlreichen terrestrischen und aquatischen Habitaten verbreitet.

Bei *P. aeruginosa* handelt es sich um einen der zahlreichsten Organismen (Costeron & Anwar, 1994). Die Tatsache, dass dieser Mikroorganismus fakultativ humanpathogen ist und für einen erheblichen Teil nosokomialer Infektionen verantwortlich ist (Picard *et al.* 1994; Wagner *et al.*, 2004), macht *P. aeruginosa* zu einem wichtigen Forschungsobjekt unter den opportunistischen Bakterien. Er befällt primär immunsupprimierte bzw. immundefiziente Personen, die z.B. unter Krebs, AIDS oder der cystischen Fibrose (CF), einer autosomal rezessiven Erbkrankheit, leiden (Bodey *et al.*, 1983; Winkler *et al.* 1985; Picard *et al.* 1994). Eitrige Infektionen mit *P. aeruginosa* treten bei Verbrennungswunden, postoperativen Wunden sowie chronischen Harnwegsinfektion auf und sind sogar die Haupttodesursache bei der Infektion des bronchiopulmonalen Traktes bei CF-Patienten (Jaeger *et al.*, 1992b; Elkin & Geddes, 2003). Eine erfolgreiche Therapie der *P. aeruginosa*-Infektion wird durch die hohe

intrinsische Antibiotikaresistenz sowie durch die Ausbildung von Biofilmen auf dem Wirtsgewebe erschwert (Quinn, 1992; Høiby, 2002; Conway *et al.*, 2003). Die Pathogenität von *P. aeruginosa* resultiert aus einer Vielzahl von zellgebundenen und extrazellulären Virulenzfaktoren. Dazu gehören die Zellwandkomponente des Lipopolysaccharids (LPS) das Lipid A, das -erst nach der Autolyse im Wirt freigesetzt,- seine toxische Antigenwirkung ausüben kann, viele Exotoxine wie: das Exopolysaccharid Alginate, das als Adhäsion die initiale Kolonialisierung bedingt, das Pigment Pyocyanin, das die Proliferation und die Chemotaxis der Lymphozyten hemmt und das Rhamnolipid, welches die Auflösung der Lungenoberfläche verursacht und den mucoziliären Transport unterbricht. Pathologischen Charakter haben auch eine Vielzahl Proteine und Exotoxine, sowie verschiedene Proteasen, Lipasen und Phospholipasen, die vornehmlich an der Zellyse und somit an der Gewebsschädigung, aber auch an der Unterdrückung bestimmter zellulärer Wirts-Funktionen beteiligt sind (Liu, 1979; Ohman & Chakrabarty, 1981; Cryz *et al.*, 1984; Hingley *et al.*, 1986; Nicas & Iglewski, 1986, Ulmer *et al.*, 1990; Jaeger *et al.*, 1992a/b; Read *et al.*, 1992; König *et al.*, 1996; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Bitter, 2003).

Neben der Bedeutung als Krankheitserreger ist *P. aeruginosa* auch wegen der Vielzahl extrazellulärer Enzyme von großem biotechnologischen Interesse (Jaeger *et al.*, 1996 a/b; 1997; 1999; Jaeger & Reetz, 2000). Zu den Enzymen gehören drei Phospholipasen, mehrere Proteasen, zwei Lipasen und eine Esterase.

## 1.2. Sekretion

Die extrazellulären Enzyme des Gram-negativen *P. aeruginosa* müssen via Proteinexport, der die Überwindung der Cytoplasma,- und der äußeren Membran umfasst, in das extrazelluläre Medium gelangen.

Die Mehrheit der Proteine passiert die Cytoplasmamembran mit Hilfe des Sec-Apparates über den generellen Sekretionsweg (GEP; **g**eneral **e**xport **p**athway) (Tommassen *et al.*, 1992; de Groot *et al.*, 1996; Filloux *et al.*, 1998). Die an dem GEP zu sekretierenden Proteine werden an ihrer N-terminalen 18-26 AS langen Sequenz erkannt. Diese Sequenz initiiert den Transport des ungefalteten Proteins aus dem Cytoplasma ins Periplasma, wobei die Abspaltung der Signalsequenz erfolgt (Watson, 1984; Pugsley, 1993; Desvaux *et al.*, 2004 a/b; Henderson *et al.*, 2004). Der alternative Weg, der so genannte Tat-Weg (**t**win-**a**riginin-**t**ranslocation), der nach der zwei Arginine beinhaltenden Signalsequenz der zu

transportierenden Proteinen benannt wurde, dient der Passage bereits gefalteter Proteine (Voulhoux *et al.*, 2001, Ochsner *et al.*, 2002).

Es wird im Allgemeinen zwischen Ein- und Zweischritt-Mechanismen und Sec-abhängigen und Sec-unabhängigen Mechanismen differenziert (Filloux *et al.*, 1998, Koster *et al.*, 2000, Ma *et al.*, 2003).

Drei Typen der Sekretionswege (I, III und IV) exportieren die Proteine in einem Ein-Schritt-Mechanismus, wobei er für Typ IV noch nicht endgültig geklärt ist (Ma *et al.*, 2003). Bei dem Sekretions-Typ II und Typ V handelt es sich um Zwei-Schritt-Mechanismen, und wie der Name schon sagt, werden die auf diese Weise sekretierten Proteine zuerst über die innere Membran und dann in einem separaten unabhängigen Mechanismus über die äußere Membran transportiert. Die meisten extrazellulären Enzyme und Toxine werden über den aus 12 Proteinen komplex aufgebauten Sekretionsweg Typ II, der daher auch GSP (**g**eneral **s**ecretory **p**athway) genannt wird, sekretiert (Filloux *et al.*, 1998).

### **1.3. Phospholipasen**

Die natürlichen Substrate der Phospholipasen (PL) sind die Glycerophospholipide, die neben Glykolipiden und Proteinen der Hauptbestandteil biologischer Membranen sind. Die PL spalten die Phospholipide in Fettsäuren und eine lipophile Substanz, die vom Substrat abhängig ist.

*P. aeruginosa* besitzt drei Phospholipasen C. Zwei dieser PLC haben eine hohe Homologie zueinander: die nicht hämolytische PlcN und die hämolytische PlcH, der eine pathogene Wirkung basierend auf der vaskulären Permeabilität und der Gewebsschädigung zugeschrieben wird. Diese PL sind vornehmlich an der Infektion der Harnwege aber auch der Lunge beteiligt (Berka *et al.*, 1981). Die Induktion der PlcH durch Phosphat-limitierte Bedingungen kann eine signifikante Rolle für die Pathogenität spielen, da Patienten, die mit Gram-positiven Bakterien infiziert sind, eine reduzierte zirkulierende Phosphatmenge aufweisen (Terada *et al.*, 1999). Beide Phospholipasen haben eine ausgeprägte katalytische Effizienz vornehmlich gegenüber eukaryotischen Substraten, z. Bsp. das Phosphatidylcholin, das ein Hauptbestandteil der Lungenoberfläche darstellt und welches sie in Phosphorylcholin und Diacylglycerol spalten (Berka *et al.*, 1981; Ostroff *et al.*, 1989). Die dritte Phospholipase C ist ebenfalls hämolytisch aktiv und gehört einer neuen Klasse der Phosphocholin-spezifischen PLC: PC-PLC an. Es ist ein multimeres Protein, das außer des PlcH Proteins

weiteres co-sekretiertes, womöglich Chaperon-Aktivität aufweisendes Protein benötigt (Stonehouse *et al.*, 2002). Die Untersuchungen der neuen PC-PLC ist allerdings noch nicht endgültig erforscht.

## 1.4. Carboxylesterhydrolasen

Die Carboxylesterhydrolasen werden in Carboxylesterasen und Lipasen unterteilt und katalysieren sowohl die Spaltung der Esterbindung von Carboxylestern, wobei Carboxylsäuren und Alkohole entstehen, als auch im Fall der Gegenreaktion die Estersynthese. Diese Gruppe der Enzyme gehört oft zu der Familie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (Ollis *et al.*, 1992; Nardini & Dijkstra, 1999), die aus zwei Domänen bestehen und eine weitestgehend konservierte katalytische Triade aus den AS: Serin, einer sauren AS wie Aspartat oder Glutamat, und Histidin besitzen (Arand *et al.*, 1993). Das katalytisch aktive Serin liegt in dem Konsensusmotiv Gly-X-Ser-X-Gly vor (Pelletier & Altenbucher, 1995).

### 1.4.1. Lipasen

Lipasen hydrolysieren bevorzugt langkettige ( $\geq C_{10}$ ), wasserunlösliche Triacylglycerole. Sie sind jedoch in der Lage auch kurzkettige Substrate zu spalten (Verger, 1997). *P. aeruginosa* besitzt zwei extrazelluläre Lipasen, LipA und LipC, die eine hohe Homologie (51 % Identität) zu einander haben. Beide Enzyme benötigen für deren Faltung das Lip-Protein (**lipase-specific foldase**): LipH, dessen Gen in einem bicistronischen Operon mit *lipA* organisiert ist (Schneidinger, 1997). Während der Sekretion interagieren beide Lipasen mit periplasmatischen Proteinen, die für deren Reifung verantwortlich sind. Zu diesen gehört neben LipH, die die Lipasen in eine aktive Konformation überführt, auch das Dsb-Protein (**disulfide bond formation**) (Jaeger *et al.*, 1994: 1996b; Rosenau & Jaeger 2000; Urban *et al.*, 2001). Beide Lipasen werden am Ende der logarithmischen Phase in den extrazellulären Raum sekretiert.

### 1.4.2. Esterasen

Carboxylesterasen (Esterasen) hydrolysieren kurzkettige ( $\leq C_{10}$ ), wasserlösliche Fettsäureester (Verger, 1997). Die Esterasen sind weit verbreitete Enzyme, die bereits bei Menschen, Tieren, Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen beschrieben wurden und welche bis auf wenige Ausnahmen vornehmlich zellulär vorliegen (Krisch, 1971; Hong *et al.*, 1991; Denamur *et al.*, 1993). In *P. aeruginosa* wurde 1997 neben den Lipasen ein weiteres lipolytisches Enzym entdeckt, das aufgrund seiner Präferenz zu kurzkettigen, wasserlöslichen Substraten als Esterase EstA bezeichnet wurde (Wilhelm, 1997). Wegen der vorliegenden Sequenzhomologie, gehört dieses Enzym der GDSL-Familie der lipolytischen Enzyme an.

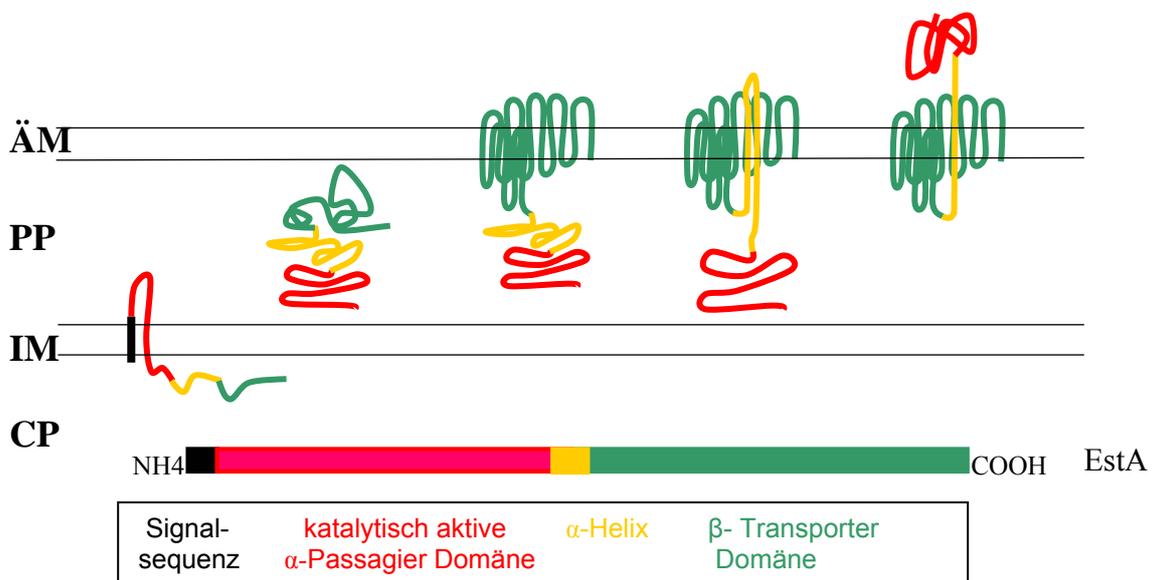
#### a. GDSL-Familie

Die GDSL-Familie unterscheidet sich von den anderen lipolytisch wirksamen Enzymen in der Lokalisierung und Zusammensetzung des Konsensusmotives um das katalytisch wirksame Serin. Das N-terminal liegende Motiv aus G-D-S-X-S um das zentrale Serin besteht aus den Aminosäuren: Glycin, Aspartat, Serin und Leucin. Dabei ist das Glycin des  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen-Konsensusmotives (G-X-S-X-G) durch ein Serin ersetzt (Jäger *et al.*, 1994; Upton & Buckley, 1995; Arpigny & Jäger, 1999; Wilhelm *et al.*, 1999). Die Katalytische Triade besteht aus Serin<sub>38</sub> aus Histidin<sub>310</sub> und Aspartat<sub>313</sub> (Wilhelm, 1999). Das in dem Motiv G-D-S-X-S zentral liegende Serin<sub>38</sub> liegt auf einem so genannten nukleophilen Ellenbogen, wodurch eine Änderung der Konformation des Proteins, gegenüber den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen resultiert (Upton & Buckley, 1998). Das aktive Zentrum der GDSL-Hydrolasen soll hierbei flexibel arrangiert sein und durch variierende Konformationsmuster optimal an unterschiedliche Substrate binden können, wodurch die ideale Umsetzung vieler katalytischer Reaktionen möglich wird (Huang *et al.*, 2001).

Die Esterase EstA ist im Gegensatz zu den anderen Komponenten des lipolytischen Systems in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* lokalisiert (Wilhelm, 1999). Sie ist 622 AS groß und hat ein Molekulargewicht von 66,8 kDa. Die Esterase weist die Charakteristika eines Autotransporter-Proteins auf.

## b. Die Autotransporterproteine

Die Autotransporterproteine (AT-Proteine) gehören neben „two-partner-secretion“ (TPS)-Proteinen dem Typ-V Sekretionsweg an. Während in der TPS das zu sekretierende Protein ein spezifisches Transporter-Protein für den Export benötigt, stellt die AT-Sekretion die einfachste Sekretionsform für Proteine dar, in der das Protein autonom die äußere Zellwand durchquert (Henderson *et al.*, 1998; Henderson & Nataro, 2001; Yen, *et al.*, 2002). 1987 beschrieben Pohlner *et al.* zum ersten Mal die Autotransporter-Sekretion für das Immunoglobulin IgA1 von *Neisseria gonorrhoeae*. Ihren Namen verdanken die AT-Proteine der Weise, auf die sie aus der Zelle transportiert werden.



**Abb. 1: Schematische Darstellung des Autotransportermechanismus.** Dargestellt ist der Aufbau des Autotransporterproteins EstA und dessen Integration in die äußere Membran. ÄM= äußere Membran, PP= Periplasma, IM= inner Membran und CP= Cytoplasma, NH<sub>4</sub>-Protein-Terminus, COOH-Protein-Terminus.

Der Sekretionsmechanismus (Abb. 1) basiert nämlich auf dem eigenständigen energieunabhängigen Transport eines bereits durch den Sec-Apparat ins Periplasma translozierten Proteins über die äußere Membran an die Zelloberfläche (Sijbrandi *et al.*, 2003; Henderson *et al.*, 2004). EstA ist das erste *P. aeruginosa*-Enzym, das über den Typ V Sekretionsmechanismus transportiert wird (Wilhelm *et al.*, 1999). Ein wichtiges gemeinsames Charakteristikum der heterogenen Gruppe der AT-Proteine ist die Tatsache, dass sie Virulenzfaktoren ihrer Organismen sind (Loveless & Saier, 1997; Henderson *et al.*, 1998) und

häufig aus drei Domänen aufgebaut sind (s. Abb. 1): 1) Die N-terminale Signalsequenz welche für den Transport über die Cytoplasmamembran via Sec-Apparat relevant ist, 2) die anschließende  $\alpha$ -Passagier-Domäne, welche die katalytisch aktive Triade des Proteins beinhaltet und 3) die C-terminale  $\beta$ -Transporter-Domäne, welche eine Pore in der äußeren Membran bildet, durch welche die  $\alpha$ -Domäne transportiert wird.

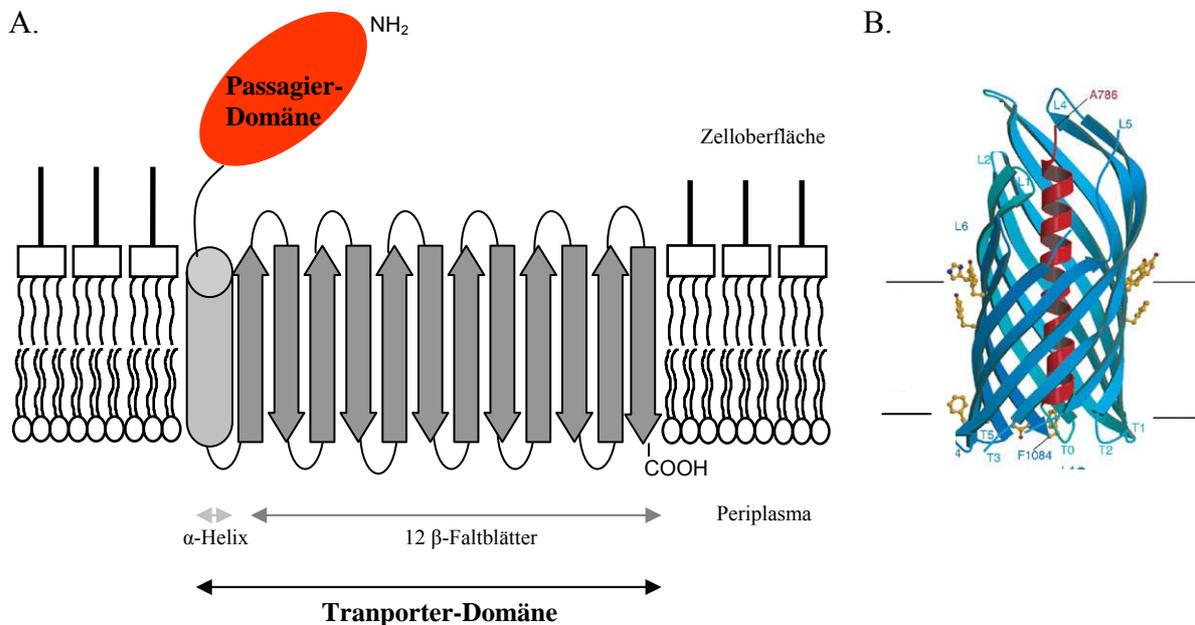
Durch den Transport am Sec-Apparat und der damit einhergehenden Abspaltung der Signalsequenz (24 Aminosäuren bei EstA) gelangt das Protein-Intermediat ins Periplasma.

Der C-Terminus der AT-Proteine besitzt ein AS-Motiv aus alternierend angeordneten polaren und hydrophoben Aminosäuren, die stets von einem Phenylalanin oder Tryptophan als letzter AS gefolgt werden (Henderson *et al.*, 1998). Das Motiv findet sich auch bei anderen Proteinen der äußeren Membran wieder und scheint für die spontane Insertion und korrekte Faltung in der ÄM essentiell zu sein (Stuyvé *et al.* 1991; de Cock *et al.* 1997; Hendrixon *et al.* 1997). Für den eigentlichen Insertionsvorgang der Poren-bildenden  $\alpha$ -Domäne in die äußere Membran wird eine temporäre Haarnadel-förmige Struktur angenommen. Diese soll die Translokation der enzymatisch aktiven  $\beta$ -Domäne durch die äußere Membran ermöglichen (Jose *et al.*, 1995). Hierbei wird zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne eine Verbindung in Form einer  $\alpha$ -Helix angenommen, die die Sekretion der katalytisch aktiven  $\alpha$ -Domäne erleichtert (Suzuki *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 1998). Nach der spontanen Insertion der Transporter-Domäne in die äußere Membran nimmt sie die energetisch günstige Form des so genannten  $\beta$ -Fasses an. Diese Form besteht in EstA aus 12 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, deren alternierende hydrophobe Aminosäure-Reste zur Membran hin und die hydrophilen Aminosäure-Reste zum Inneren der wässrigen Pore, die sie bildet, hin ausgerichtet sind (Abb. 1A) (Loveless & Saier, 1997; Henderson *et al.*, 1998; Van Gelder *et al.*, 2002). Das erste und letzte der 10-14 antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter der AT-Proteinen bilden bei der Insertion in die ÄM untereinander Wasserstoffbrücken aus, wodurch eine geschlossene ringförmige Formation der Pore entsteht.

Hat die  $\alpha$ -Domäne die Zelloberfläche erreicht, so gibt es drei mögliche Reaktionen: die dauerhafte Bindung der  $\alpha$ -Domäne an die  $\alpha$ -Helix und somit beständige Lokalisierung an der Zelloberfläche, die Abspaltung der katalytisch aktiven Domäne durch eine Protease, wobei hier zwischen Entlassung dieser ins umgebene Medium und Erhaltung eines Kontaktes zu  $\beta$ -Domäne via nonkovalenter Bindungen unterschieden wird. Die katalytisch aktive  $\alpha$ -Domäne des integralen Membranprotein EstA bleibt an der  $\alpha$ -Helix gebunden und wird an der Zelloberfläche von *P. aeruginosa* exponiert (Wilhelm *et al.*, 1999; Wilhelm, 2001). 2004 veröffentlichten Oomen *et al.* die Kristall-Struktur der C-terminalen Transporter-Domäne des

Autotransporter-Proteins NalP aus *Neisseria meningitidis* (Abb. 2B). Dieses AT-Protein bildet in der äußeren Membran ebenfalls eine hydrophobe Pore aus 12 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, durch welche die N-terminale  $\alpha$ -Helix in den extrazellulären Raum reicht. Diese Pore weist einen Durchmesser von  $10 \times 12,5 \text{ \AA}$  auf, was auf einen ungefalteten Transport des N-Terminus hindeutet (Oomen *et al.*, 2004).

Die Exposition eines Enzyms an der Zelloberfläche von einem virulenten Mikroorganismus bringt ihm physiologische Vorteile: es erhöht dessen Fähigkeit im Wirt zu überleben und sich in ihm zu reproduzieren. Die genaue physiologische Funktion und Bedeutung der enzymatischen Aktivität von EstA ist noch unbekannt bis auf die Tatsache, dass es sich für *P. aeruginosa* um kein essentielles Protein handelt (Schäfer, 1998).



**Abb. 2: Topologisches Model eines Autotransporter-Proteins und die Kristall-Struktur der Transporter-Domäne des NalP-Autotransporters aus *N. meningitidis*** (nach Oomen *et al.*, 2004). Die 12 antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter sind durch Pfeile, die  $\alpha$ -Helix durch ein Kegel dargestellt (A). Blau sind die 12 antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter, rot die  $\alpha$ -Helix dargestellt (B).

Autotransporter-Proteine stellen wegen ihrer Eigenheiten ein für die Biotechnologie bedeutendes Objekt dar. Auf AT-Proteine basierende Oberflächendisplaysysteme eröffnen die Möglichkeit putative Rezeptoren oder Liganden auf ihre Bindungs-Aktivität hin zu testen, heterologe Proteine funktionell zu untersuchen, sowie Enzyme zu exprimieren und anschließend einfach zu reinigen (Valls *et al.*, 2000; Jose *et al.*, 2002; Kjaergaard *et al.*, 2002).

## 1.5. Rhamnolipid

Das Rhamnolipid (RL) ist ein von *P. aeruginosa* produziertes Detergenz, das erstmals 1949 von Jarvis und Johnson beschrieben wurde. Dieses extrazelluläre Glycolipid wird als sekundäres Metabolit in der stationären Wachstumsphase produziert (Hauser & Karnovsky, 1954/1958; Syldatk *et al.*, 1985). Die erste ihm zugeschriebene Eigenschaft war dessen hämolytische Wirkung. Somit ist das Rhamnolipid neben der PlcH das zweite Hämolysin von *P. aeruginosa*.

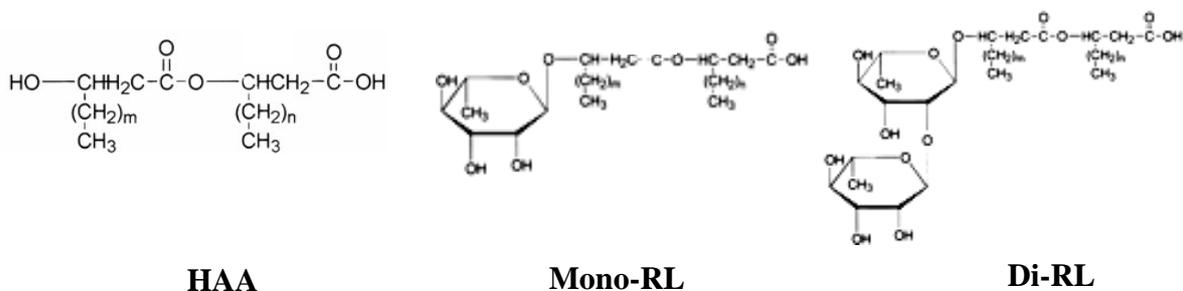
### 1.5.1 Struktur

Chemisch betrachtet ist das Rhamnolipid ein Glycolipid. Den Lipid-Anteil bildet eine bzw. zwei mit einer Esterbindung verknüpfte  $\beta$ -Hydroxydekansäuren (C10). Den Zuckeranteil bildet ein bzw. zwei glykosidisch verbundene Rhamnosemoleküle. Die lipophile Kohlenwasserstoffkette des Fettsäureanteils und der hydrophile Kohlenhydratanteil verleihen dem RL einen amphipatischen Charakter. Die Nomenklatur der RL resultiert aus der Anzahl der Rhamnosemoleküle und der Fettsäuren, die sie tragen (Tab. 1, Abb. 3).

**Tab. 1: Die meist vorkommenden Rhamnolipide und deren Bezeichnung.**

Rhamnolipid*	Strukturformel	weitere Bezeichnung	Referenz
RL-1,2	RhC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	Mono-RL	Itoh <i>et al.</i> , 1971
RL-2,2	Rh <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	Di-RL	Hisatsuka <i>et al.</i> , 1971

- \* In der Formel RL-X,Y bezeichnet die erste Ziffer (X) die Molekülanzahl der Rhamnosin, die zweite Ziffer (Y) die Molekülanzahl der Fettsäuren.



**Abb. 3: Struktur der Oberflächen-aktiven Substanzen von *P. aeruginosa*.** HAA[(3-(3Hydroxyalkanoyl)-Hydroxyalkansäure], Mono-RL (L-rhamnosyl- $\beta$ -Hydroxydekanoyl- $\beta$ -Hydroxydekansäure), Di-RL (L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- $\beta$ -Hydroxydekanoyl- $\beta$ -Hydroxydekansäure) (Maier & Soberón-Chávez, 2000).

Die meist vorkommenden Formen des Rhamnolipids sind das Mono- (RL-1,2) bzw. das Di-Rhamnolipid (RL-2,2), welche an den zwei kondensierten Fettsäuren ( $\beta$ -Hydroxydekanoyl- $\beta$ -Hydroxydekansäuren) ein bzw. zwei Rhamnosemoleküle tragen. RL-Formen, deren Lipidanteil aus einer  $\beta$ -Hydroxydekansäure besteht, nämlich das RL-2,1 und RL-1,1, werden vorwiegend von ruhenden Zellen produziert (Syldatk *et al.*, 1985a).

### **1.5.2. Physiologische Rolle**

Die hauptsächliche physiologische Rolle dieses Biodetergenz für den Produktionsorganismus *P. aeruginosa* liegt in der Erschließung wasserunlöslicher Verbindungen als Nährstoffe. Das RL ist somit essentiell, um aliphatische Kohlenstoffverbindungen in die Zelle aufzunehmen (Zhang & Miller, 1992). In diesem Zusammenhang wird zum einen das RL mit einer veränderten Zelloberfläche, nämlich der Erhöhung der Hydrophobizität, assoziiert (Zhang & Miller, 1994; Herman *et al.*, 1997) und zum anderen die RL-induzierte Freisetzung von LPS der äußeren Zellmembran detektiert (Al-Tahhan *et al.*, 2000). Die LPS-Freisetzung bedingt die hydrophobe Zelloberfläche und somit den direkten Kontakt zu der hydrophoben Verbindung, wodurch die Substanzaufnahme begünstigt wird. Die erste Eigenschaft, die dem Rhamnolipid zugeschrieben wurde, ist deren Hitzestabilität und hämolytische Wirkung (Sierra 1960, Johnson and Boese-Marrazzo 1980). Eine wesentliche Funktion des Biodetergenz basiert auf dessen antimikrobieller Wirkung (Abalos *et al.*, 2001), sowie dessen Wirkung als Virulenzfaktor (Kownatzki *et al.*, 1987). Die letale Dosis des RL für eine Maus beträgt 500  $\mu$ g. Die Virulenzwirkung ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Es wird allerdings angenommen, dass die RL zwischen die Phospholipide der Lungenoberfläche interkalieren, diese auflösen und sie für andere Virulenzfaktoren angreifbarer machen. Das Rhamnolipid ist bewiesenerweise an der Biofilmentwicklung von *P. aeruginosa* beteiligt, in dem es die Nährstoffversorgung und das Ablösen der Zellen von reifen Biofilm bedingt (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). Außerdem ist das Rhamnolipid für das Schwärmen von *P. aeruginosa* unentbehrlich (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003).

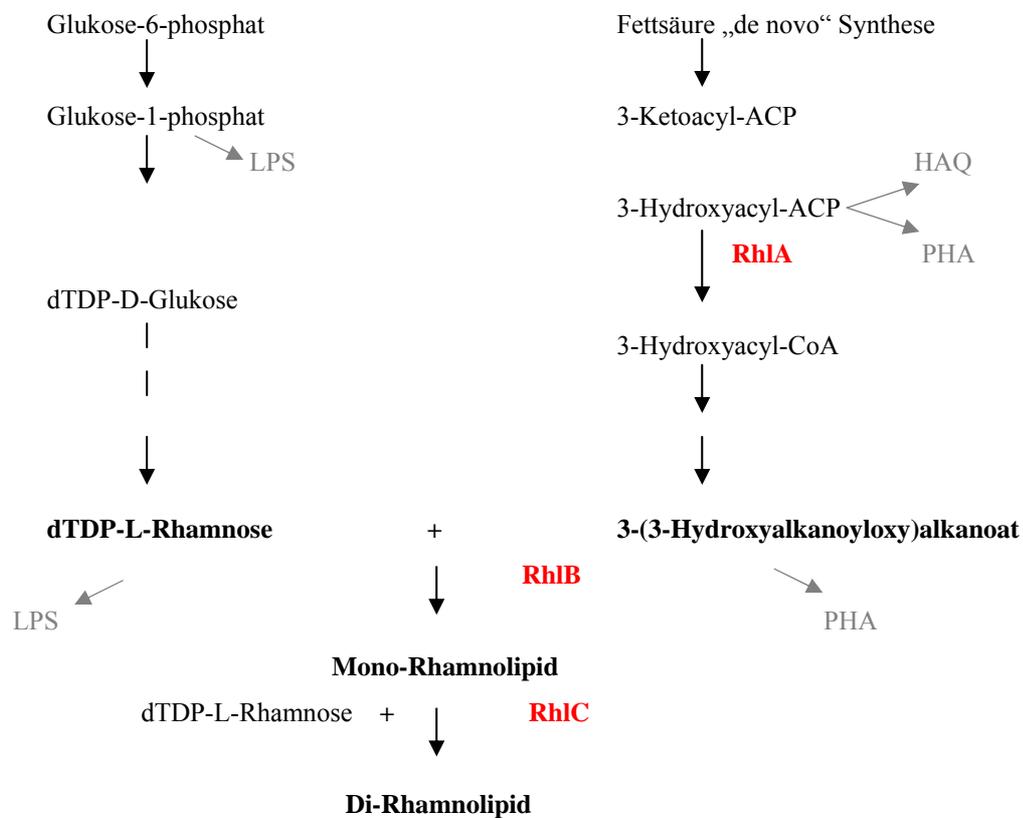
### **1.5.3. Biotechnologischer Einsatz**

Der biotechnologische Einsatz von dem RL aus *P. aeruginosa* resultiert aus dem Vorteil, den ein Biodetergenz gegenüber einem chemisch synthetisierten Detergenz hat. Chemische Detergenzien haben oft mutagene bzw. karzinogene Wirkung und da sie nur teilweise oder gar nicht biologisch abgebaut werden können, tragen sie erheblich zur Kontamination von Böden und Wasser bei (Poremba *et al.*, 1991; Banat *et al.*, 2000) bei. Das RL findet

heutzutage vor allem Einsatz in der Öltankerreinigung und zur Sanierung von Xenobiotika-kontaminierten Böden. (Van Dyke *et al.*, 1993; Hermann *et al.*, 1997;). Diese aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoff-verbindungen (darunter Hexadekan, Paraffin, Anthracen und Phenathren) werden von RL in die wässrige Phase überführt und erhöhen deren Bioverfügbarkeit für natürliche Bodenbakterien (Maier & Sóberon-Chávez, 2000; Sandrin *et al.*, 2000). Das RL wird aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung ebenfalls für die biologische Kontrolle der zoosporen Pflanzenpathogene verwendet und findet Einsatz in der Herbizid-, Fungizid- und Bakteriozidindustrie (Vollenbroich *et al.*, 1997; Banat *et al.*, 2000; Maier & Sóberon-Chávez, 2000; Abalos *et al.*, 2001).

#### 1.5.4. Synthese

Die RL-Synthese (Abb. 4) ist von dem Rhl-System zell-dichteabhängig reguliert (worauf später eingegangen wird) und erfolgt im Cytoplasma durch zwei aufeinander folgende Glukosetransferreaktionen.



**Abb. 4: Rhamnolipid-Syntheseweg.** Die Daten sind nach Soberón-Chávez *et al.*, (2005) und Campos-Garcia *et al.*, (1998) verändert worden. Rhl: Rhamnosyltransferase; LPS: Lipopolysaccharid; PHA: Polyhydroxyalkanoat; PQS: 2-heptyl-3-hydroxy-4-Quinolon ; HAQ: 4-Hydroxy-2-alkylquinolines.

Die Rhamnosyltransferasen RhlB und RhlC katalysieren nacheinander die Übertragung der Rhamnose von einer Thymidin-Diphospho-Rhamnose (TDP-Rhamnose). Im Fall von RhlB wird die Rhamnose auf die  $\beta$ -Hydroxydekanoyl- $\beta$ -Hydroxydekansäure übertragen, wodurch das Mono-Rhamnolipid (L-rhamnosyl- $\beta$ -Hydroxydekanoyl- $\beta$ -Hydroxydekansäure) entsteht. Im Fall von RhlC wird die Rhamnose auf das Mono-Rhamnolipid übertragen, wodurch das Di-Rhamnolipid entsteht (Anhang 1) (Burger *et al.*, 1963, 1966; Ochsner & Reiser, 1995; Ochsner *et al.*, 1994b; Rahim *et al.*, 2001).

Die Acyltransferase RhlA katalysiert die in der RL-Synthese vorangegangene Übertragung des 3-Hydroxyacyl-Restes von ACP auf das CoA und (Anhang 2). Aus der Kondensation zweier 3-Hydroxyacyl-CoA-Verbindungen resultiert das HAA (3-(3-Hydroxyalkanoyl)-Hydroxyalkan- säure, bzw. acid), dem als RL-Vorläufer ebenfalls eine Detergenzwirkung zugeschrieben wird (Déziel *et al.*, 2003) (Abb. 3).

Das Hydroxyalkanoyl-ACP ist eine möglich Ausgangsverbindung für die polymerisierten  $\beta$ -Hydroxyfettsäuren des Zellspeicherstoffes: das **Polyhydroxyalkanoat** (PHA) (Campos-Garcia *et al.*, 1998; Lépine *et al.*, 2002; Rehm *et al.*, 2001). Chayabutra & Ju (2001) haben die zeitlich aufeinander folgende Produktion von PHA und Rhamnolipid untersucht und eine Regulationsumschaltung des  $\beta$ -Hydroxyalkansäure-Flusses von PHA- zu Rhamnolipid-Synthese beim Erreichen der stationären Wachstumsphase festgestellt. Die Enzyme, die die Kondensierung bzw. Polymerisierung der  $\beta$ - Hydroxydekansäuren synthetisieren, sind in beiden Fällen nicht bekannt. Die RL-Synthese ist stark von den Umweltbedingungen abhängig. Optimale Kulturbedingungen stellt der pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5, die Temperatur zwischen 30-34 °C, das Vorhandensein wasserunlöslicher Substanzen (z. Bsp. Hexadekan, Paraffin), sowie limitierte Kationen- (Mg, Ca, Na bzw. Fe) und Phosphat-Menge (Syldatk *et al.*, 1985 a/b; Guerra-Santos, 1986; Koch *et al.*, 1991; Ochsner *et al.*, 1994; Wild *et al.*, 1997; Chayabutra *et al.*, 2000; Maier & Soberón-Chávez, 2000). Der Rhamnolipid-Biosyntheseweg teilt sich viele Schritte mit der Synthese von PHA, Lipopolysaccharid (LPS), Alginat (durch das AlgC) und HAQ (4-Hydroxy-2-alkylquinolines), das ein PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-Quinolone)- Vorläufer ist. Während die RL-Synthese weitestgehend untersucht ist, bedarf die RL-Freisetzung aus der *P. aeruginosa* Zelle einer weiteren Klärung.

## 1.6. „Quorum sensing“-System

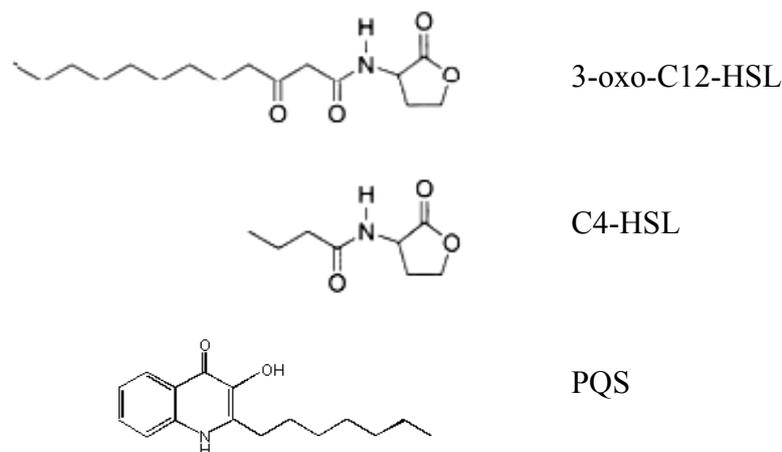
Seitdem bekannt ist, dass die strikt einzellige Lebensweise der Mikroorganismen ein Sonderfall darstellt und das Vorkommen von Lebensgemeinschaften der Regelfall ist, werden diese ausgiebig untersucht. Die multizelluläre Organisationsform der Mikroorganismen setzt die Fähigkeit der interzellulären Kommunikation voraus (Crespi, 2001; Jacob *et al.*, 2004; Parsek & Greenberg, 2005).

Kommunikationssysteme, die von Mikroorganismen zur Erkennung der eigenen Populationsdichte eingesetzt werden, fasst man heute unter dem Begriff „Quorum sensing“ (QS)-Systeme zusammen, wobei die kleinste Einheit, die zu zelldichteabhängigen, interzellulären Reaktionen befähigt ist, per Definition das Quorum darstellt (Fuqua *et al.*, 1994). Die niedermolekularen Substanzen, die als Pheromone zum Informationsaustausch über die Zelldichten unter den Mikroorganismen verwendet werden, sind „Autoinducer“ oder Signalmoleküle. Anstelle der Sprache nutzten die Bakterien diese Signalmoleküle, die sie in das umgebende Medium entlassen. Neben der Freisetzung der Signalmoleküle sind die Bakterien fähig die Anzahl (Konzentration) dieser Signalmoleküle innerhalb der Population zu messen. QS ist das Phänomen, welches durch die Akkumulation der Signalmoleküle einer einzigen Zelle das Wahrnehmen der Anzahl der Zellen (Zelldichte) ermöglicht und als Antwort darauf die Expression spezifischer Gene veranlasst. Eine Vielzahl physiologischer Prozesse der Bakterienzelle werden QS-reguliert. Dazu gehört die Produktion und Sekretion von Virulenzfaktoren aber auch Beweglichkeit und Biofilmbildung. Der Vorteil einer synchronisierten QS-abhängigen Sekretion der Virulenzfaktoren für ein fakultativ pathogenes Bakterium wie das *P. aeruginosa* besteht darin, von dem Wirtsabwehrmechanismus lang genug unbemerkt zu bleiben und die Infektion strategisch, ohne frühe Unterbindung durch das Abwehrsystems, durchzuführen.

In neuen unabhängigen Untersuchungen wurden 3-7 % aller *P. aeruginosa* Gene als QS-reguliert bezeichnet (Hentzer *et al.*, 2003, Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003).

Die am häufigsten verwendeten Signalmoleküle unter den Gram-positiven Bakterien sind die Peptide, unter den Gram-negativen Bakterien sind es hingegen die N-Acyl-L-Homoserin-Lactone (AHL). Es handelt sich hierbei um verschiedene N-Acyl-L-homoserinlactone, die sich im Wesentlichen durch die Länge der N-Acyl-Seitengruppe (bisher wurden Moleküle mit bis 14 Kohlenstoffatomen beschrieben) sowie durch Modifikationen an Position C-3 (3-Oxo- oder 3-Hydroxygruppe) unterscheiden.

Eines der bestuntersuchten bakteriellen QS-Systemen stellt das Zell-Zell-Kommunikationssystem von *P. aeruginosa* dar. Dieser Organismus besitzt zwei QS-Systeme: das in der Regulation hierarchisch höher stehende Las-System und das Rhl-System. Diese Systeme wurden nach den ersten entdeckten Regulationssystemen, die sie kontrollieren, benannt. Das Las-System kontrolliert neben der Expression der **LasB**-Elastase, Exotoxin A, Komponenten des Xcp Typ II Sekretions-Apparates (XcpR, XcpP) auch die Biofilmbildung, wohingegen das untergeordnete Rhl-System die Synthese der Rhamnolipide (Expression der Gene *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*), der Elastase, des Pyocyanins, der alkalischen Protease und das Schwärmen kontrolliert. Die Signalmoleküle, die von den *P. aeruginosa* QS-Systemen zur Kontrolle eingesetzt werden, ist das *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-Homoserinlacton (3-oxo-C12-HSL) für das Las-System und das *N*-Butanoyl-L-Homoserinlacton (C4-HSL) für das Rhl-System (Pearson *et al.*, 1994; 1995) (Abb. 5). Während das kurzkettige C4-HSL frei über die *P. aeruginosa*-Membran diffundieren kann, wird das langkettige 3-oxo-C12-HSL neben der langsamen Diffusion über die Membran zusätzlich über einen aktiven Exportmechanismus (MexAB-OprM Pumpe) aus der Zelle befördert (Pearson *et al.*, 1999).

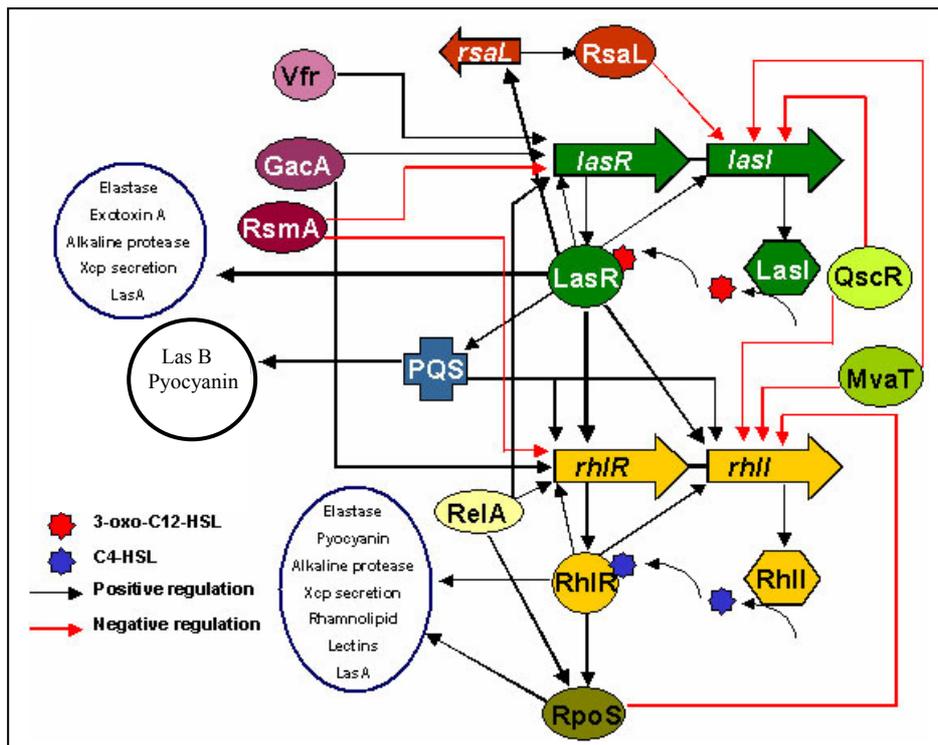


**Abb. 5: Struktur der „Quorum sensing“ Signalmoleküle.** A: *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-Homoserinlacton (3-oxo-C12-HSL) für das Las-System B: *N*-Butanoyl-L-Homoserinlacton (C4-HSL) für das Rhl-System C: „Pseudomonas-quinolon“-Signal (PQS) 2-heptyl-3-hydroxy-4-Quinolon (aus Camara *et al.*, 2002).

Ein drittes Signalmolekül von *P. aeruginosa* stellt das „Pseudomonas-quinolon“-Signal (PQS) dar (Abb. 5). Bei dem PQS handelt es sich um 2-heptyl-3-hydroxy-4-Quinolon, das strukturell stark von den AHL abweicht und wahrscheinlich nicht an der Zelldichte-Wahrnehmung des Bakteriums beteiligt ist (McKnight *et al.*, 2000) Das PQS wird in Abhängigkeit von dem Verhältnis zwischen C4-HSL und 3-oxo-C12-HSL in der frühen stationären Phase gebildet

(McGrath *et al.*, 2004; Pesci *et al.*, 1999). Es erhöht die Expression von den Rhl-System-Strukturgenen: *rhlR* und *rhlI*, verstärkt die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren und ist essentiell für die Pyocyanin-Synthese (Pesci *et al.*, 1999; Diggle *et al.*, 2003).

Eine grobe Darstellung der quervernetzten, komplexen Regulation des „Quorum sensing“-Systems von *P. aeruginosa* ist in Abb. 6 dargestellt.

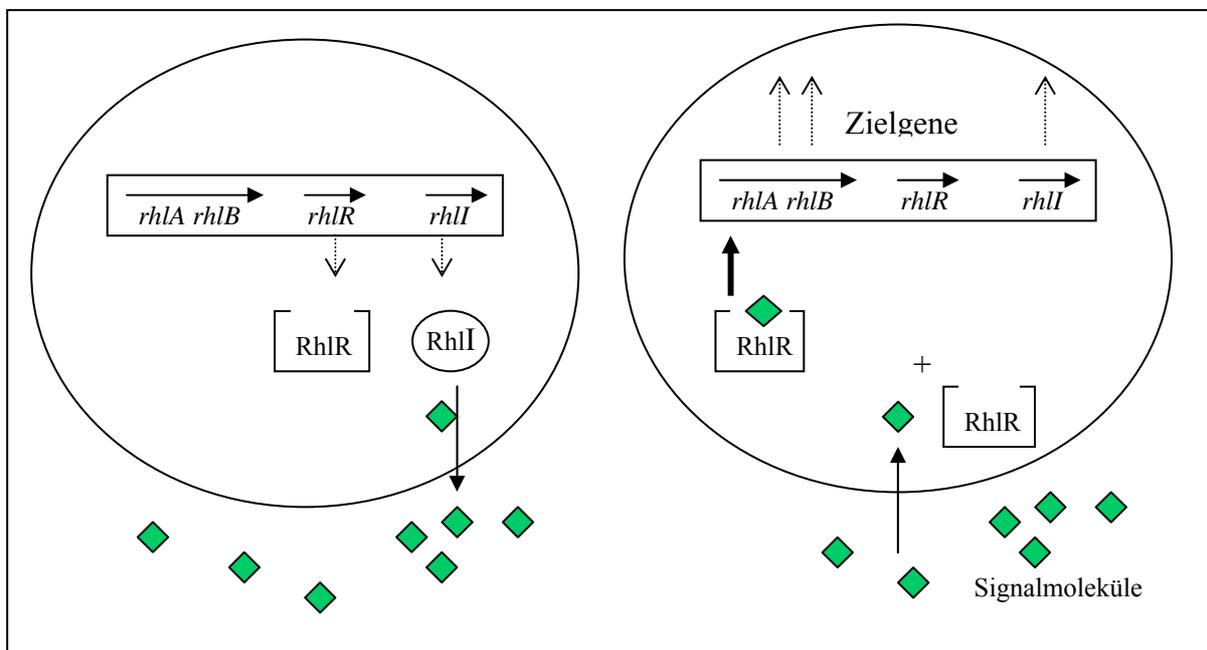


**Abb. 6: „Quorum sensing“-System bei *P. aeruginosa*.** Verändert von den Seiten der University of Nottingham Quorum Sensing Research Group (2006): [www.nottingham.ac.uk/quorum/pseudomonas2.htm](http://www.nottingham.ac.uk/quorum/pseudomonas2.htm). Aktivierenden Regulatoren: GacA, Vhr, RelA, RpoS; reprimierende Regulatoren: RsmA, QscR, MvaT; Quorum sensing Systeme: Las und Rhl; R: Regulator; I: Induktor

### 1.6.1. Rhl-Regulation der Rhamnosyltransferase-Synthese

Am Beispiel der Synthese der Rhamnosyltransferasen (Rt), die von dem *P. aeruginosa* Rhl-System reguliert wird, soll die Funktionsweise eines „Quorum sensing“-Systems geschildert werden (Abb. 7).

Die Komponenten des Rhl-Systems mit den Genen *rhlR* und *rhlI* liegen zusammen mit den Rt-Strukturgenen *rhlA* und *rhlB* auf einem Gencluster. Das Gen *rhlI* kodiert für die Signalmolekül-Synthase RhlI, die das Signalmolekül C4-HSL synthetisiert.



**Abb. 7: Modell zur „Quorum sensing“-Regulation des *rhlABRI*- Operons.** Verändert nach Ochsner & Reiser (1995). Gepunkteter Pfeil .....> : Expression; durchgehender Pfeil —> : Signalmolekül-Diffusion; dicker Pfeil —> : Transkriptionsinduktion; ◆ : C4-HSL

Die Signalmoleküle diffundieren durch die Membran und erreichen bei einer hohen Populationsdichte einen Schwellenwert, bei dem sie an den Transkriptionsaktivator RhIR, für den das *rhlR* Gen kodiert, binden. Dieser Komplex aus C4-HSL und dem Regulatorprotein RhIR bindet an die Promotorregion des Genclusters (*rhlA*, *rhlB*, *rhlR* und *rhlI*) und aktiviert deren Transkription. Zusätzlich zur Synthese der Rt-Gene wird die Synthese der Signalmoleküle induziert. Der Vollständigkeit wegen ist zu erwähnen, dass das *rhlC*-Gen unabhängig von dem *rhlABRI*-Operon kodiert, jedoch dessen Expression ebenfalls von dem Rhl-System kontrolliert wird.

## 1.7. Biofilme

Die planktonische Lebensweise stellt nur einen kleinen Anteil der in der Natur vorkommenden Lebensformen der Mikroorganismen dar. Eine Vielzahl natürlich auftretender Daseinsformen bildet die sessile Organisation von Lebensgemeinschaften und Mischkulturen in Biofilmen. Laut Madigan (2000) versteht man unter einem Biofilm „Kolonien von schleim- umhüllten, mikrobiellen Zellen, die an einer Oberfläche haften“, wobei die Oberfläche (Substratum) eine Grenzschicht zu fest/gasförmig, fest/flüssig oder flüssig/gasförmig sein kann. Der mit der sessilen Lebensweise einhergehende Effekt ist ein veränderter Phänotyp in Bezug auf die Wachstumsrate und die Genexpression (Tolker-Nielsen & Molin, 2004).

Biofilme kommen in der Umwelt ubiquitär im Boden, im Wasser, auf Pflanzen und Tieren vor und bieten den Organismen enorme Vorteile an. Zum einen stellt ein Biofilm durch seine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) einen exzellenten Schutz vor Bioziden (Antibiotiker und Desinfektionsmittel) und Austrocknung dar (Watnick & Kolter, 2000; Stoodley *et al.*, 2002; Schulte *et al.*, 2003). Zum anderen ist die Mikronische des Biofilms mit sehr konstanten Lebensbedingungen ein perfekter Lebensraum für die angepassten Bakterien, sogar in schwer anzuschließenden Habitaten. Des Weiteren ermöglicht der enge Kontakt zwischen den Individuen des Biofilmes einen Austausch des genetischen Materials, durch den Bakterien enorme Selektionsvorteile erlangen können (Watnick & Kolter, 2000; Wuertz, 2002).

Bei der Entstehung von Biofilmen unterscheidet man fünf verschiedene Phasen (Sauer *et al.*, 2002): 1. die initiale Adhäsion, 2. die irreversible Bindung, 3/4. die Reifungs-Phase, die in aufeinander Zuwachsen und übereinander Wachsen der Zellen unterteilt wird und 5. die Ablösungs-Phase.

Bei der initialen Adhäsion (Phase 1) treten planktonische Zellen über schwache Bindungskräfte (elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) reversibel mit der Phasengrenze in Kontakt. Dieser Anheftungs-Prozess ist im Wesentlichen von der Oberflächenbeschaffenheit der Zelle (Bruinsma *et al.*, 2001) aber auch von den Zelloberfläche-exponierten Flagellen und Pilli abhängig (O'Toole & Kolter 1998; Klausen *et al.*, 2003). In der Phase 2 haften die Zellen irreversibel an der Oberfläche an und bilden durch Akkumulation der Zellen so genannte Mikrokolonien. Der Stoffwechsel wird der sessilen Lebensweise angepasst und außer der Produktion von EPS sind viele weitere Unterschiede in der zellulären Genexpression zu planktonischen Zellen zu erkennen (Sauer, 2002). Durch das

logarithmische Wachstum der Mikrokolonien nähern sich diese gegenseitig an (Phase 3) und wachsen schließlich übereinander (Phase 4). Das Wachstum und die Ablösung der Zellen halten in dieser Phase die Waage. Mit der Zeit differenziert sich eine komplexe, dreidimensionale, heterogene Struktur des Biofilmes, die durch Bereiche hoher Zelldichte zum einen sowie Nährstoff,- und Abfall-führender Kanäle zum anderen gekennzeichnet ist (Costerton *et al.*, 1994). Essentiell für die Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Kanäle ist das Detergenz Rhamnolipid (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). In der Ablösungsphase (Phase 5) lösen sich die einzelnen Zellen oder größere Zellaggregate aus dem Biofilmverband entweder durch aktive Bewegung oder passiv ab, wobei Löcher in der Biofilmarchitektur entstehen (Sauer, 2002).

Die Genese und Architektur des Biofilmes als Lebensraum der Mikroorganismen benötigt einer strikten zell-dichteabhängigen Kontrolle, die das QS-System erfüllt. Die QS-Systeme sind, neben den Umweltgegebenheiten, für die Differenzierung von Biofilmen essentiell.

Das physiologisch vielseitige, ubiquitäre, humanpathogene *P. aeruginosa* ist ein beliebtes Modellorganismus für die Erforschung der Biofilme (Smith & Iglewski, 2003b; Tolker-Nielsen & Molin, 2004). Als primäre Voraussetzung für Biofilmbildung wurde die Beweglichkeit der *P. aeruginosa*-Zellen beschrieben (O'Toole & Kolter, 1998).

## **1.8. Beweglichkeit**

*P. aeruginosa* verfügt über drei differente Formen der Fortbewegung: das Schwimmen, das sogenannte „twitching motility“ und das Schwärmen. Mit Hilfe der Rotation des polaren Flagellums kann sich *P. aeruginosa* in planktonischer Lebenssituation durch Schwimmen in Flüssigkeiten bewegen. „Twitching motility“ geschieht an festen Oberflächen und resultiert aus der Streckung der Typ IV Pili, Anheftung dieser an der Oberfläche und der folgenden Kontraktion zum Erlangen einer Positionsänderung (Merz *et al.*, 2000; Skerker & Berg; 2001). Das Schwärmen ist von beiden Zellfortsätzen abhängig und für die Bewegung auf semisolidem Untergrund relevant (Köhler *et al.*, 2000). Die Beweglichkeit der Zellen ermöglicht das Aufsuchen neuer Habitate bzw. verlassen bisheriger Umgebung und dient der Anpassung an die sich ändernden Bedingungen. In diesem Zusammenhang spielt sie ebenfalls eine für die Virulenz von *P. aeruginosa* entscheidende Rolle und zwar ermöglicht sie die Ausbreitung von Infektionen (O'Toole *et al.*, 1998; D'Argenio *et al.*, 2001). Außerdem stellt die Motilität der Zellen eine maßgebliche Voraussetzung zur Biofilmbildung (Köhler *et al.*,

2000). Ein Zusammenhang zwischen der Bewegungsform des Schwärmens und dem Rhamnolipid wird postuliert. Das Biodetergenz sowie deren Vorstufe, das HAA, sollen nämlich diese Bewegungsart durch Herabsetzen der Reibung zwischen der Zelle und dem Untergrund unterstützen (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003). Das Vorhandensein einer Schleimschicht, die aus der RL-induzierten Entlassung eines LPS-Anteils resultiert, begünstigt hierbei die Beweglichkeit des Flagellums und der Pili (Al-Tehhan *et al.*, 2000).

### 1.9. Ziele dieser Arbeit

Die enzymatische Aktivität von EstA besteht in der Hydrolyse von Esterbindungen kurzkettiger ( $\leq C_{10}$ ) Fettsäuren. Aufgrund des Konsensusmotivs G-D-S<sub>38</sub>-X-S um das katalytisch aktive Serin<sub>38</sub> wird EstA zu der GDSL-Familie der lipolytischen Enzyme gezählt (Arpigny & Jäger, 1999). Die katalytische Triade besteht neben dem Serin<sub>38</sub> aus Histidin<sub>310</sub> und Aspartat<sub>313</sub> (Wilhelm, 1999). EstA ist ein äußeres Membranprotein, das seine katalytisch aktive Domäne in den extrazellulären Raum exponiert (Wilhelm *et al.*, 1999). Aufgrund des Sekretionsmechanismus gehört EstA zu den Autotransporterproteinen. Diese Proteine bilden mit einer Domäne des Proteins eine Pore in der äußeren Membran, durch welche die katalytisch aktive Domäne in den extrazellulären Raum transportiert wird (Oomen *et al.*, 2004). Viele Funktionen von Autotransporterproteinen sind bereits beschrieben worden und konnten häufig mit der Virulenz ihres Organismus assoziiert werden. EstA wurde ebenfalls als potentieller Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* PAO1 in der chronischen Atemwegsinfektion bei Ratten identifiziert (Potvin *et al.*, 2003). Für die Esterase EstA ist eine erste Zuordnung zu der Klasse der Esterasen getroffen worden, der Sekretionsmechanismus sowie die Lokalisierung in der Zelle sind bekannt. Allerdings ist bislang die physiologische Bedeutung des Proteins für *P. aeruginosa* PAO1 ungeklärt.

In dieser Arbeit sollte daher die Physiologie der Esterase EstA von *P. aeruginosa* PAO1 erkundet werden. Dabei sollte die Charakterisierung der *estA*-Negativmutante im Vergleich zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT) relevante Hinweise auf die potentielle Funktionen dieses Enzyms liefern. Untersucht werden sollten die charakteristischen virulenzassoziierten Phänotypen von *P. aeruginosa*. Zu diesen zählen neben der Beweglichkeit, die die Ausbreitung des virulenten Organismus ermöglicht und in *P. aeruginosa* in drei Formen wie Schwimmen, Schwärmen und „twitching motility“ vorkommt, auch noch die Produktion extrazellulärer Enzyme. Einen weiteren wichtigen Aspekt dieser Arbeit sollte die Untersuchung der Biofilmbildung darstellen, welche nähere Informationen zu der

Organisation dieses ubiquitär vorkommenden Bakteriums bringen sollte und welche z.B. von der Zelloberflächenbeschaffenheit und der Zellbeweglichkeit abhängt.

Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit sollte die Konstruktion einer inaktiven Variante der Esterase sein. Dabei soll das katalytisch aktive Serin<sub>38</sub> in der katalytischen Triade mutiert werden. In dem anschließenden Vergleich der aktiven und inaktiven Esterase soll die Relevanz der enzymatischen Aktivität des Enzyms untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll die Beteiligung der porenförmigen Struktur des äußeren Membranproteins EstA in Transportprozessen untersucht werden.

Aufgrund der oberflächenexponierten Lokalisierung von EstA sollten ebenfalls potentielle Substrate der Esterase ein wichtiges Untersuchungsobjekt darstellen. Dabei sollte ein Schwerpunkt auf das extrazelluläre Rhamnolipid, dessen Struktur zwei estergebundene Fettsäuren aufweist, gelegt werden. Weitere potentielle Ziele für die Esteraseaktivität sollten in Betracht gezogen werden.

Da eine Vielzahl physiologischer Prozesse Zelldichteabhängig reguliert ist, sollte die Analyse des „Quorum sensing“-Systems einen wichtigen Aspekt dieser Arbeit darstellen. Die interzelluläre Kommunikation stellt einen bedeutsamen Gegenstand der Regulation virulenzassoziierter Phänotypen dar und könnte die Ergebnisse in einen globalen Zusammenhang bringen. Um potentielle regulatorische Zusammenhänge zu klären sollte die Proteomuntersuchung der *estA*-Negativmutante und des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) weiterführende Ergebnisse liefern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien und Enzyme

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

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

**Chemikalien:** Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg)

**Enzyme:** Die verwendeten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Restriktionsenzyme von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach), T4-DNA-Ligase und T4-DNA-Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und *Pfu*-DNA-Polymerase von Stratagene (Heidelberg)

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

### 2.2. Bakterien und Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren und rekombinante Plasmide sind in Tab. 2, Tab. 3 und Tab. 4 aufgeführt.

**Tab. 2: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.**

Stamm	Genotyp	Referenz / Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1ΔU169</i> (Φ80 <i>DlacZM15</i> )	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm</i> (λ <i>Its857ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1</i> )	Studier & Moffat, 1986
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>P. aeruginosa</i> PASCH I	<i>estA::Smr/Spr</i>	Schäfer, 1998
<i>P. aeruginosa</i> PAO1- <i>rhlA</i>	PAO1, <i>rhlA::Gmr</i>	Rahim <i>et al.</i> , 2001
<i>P. aeruginosa</i> RTII-2	PAO1, <i>rhlC::Gmr</i>	Rahim <i>et al.</i> , 2001
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>gfp</i>	WT mit chromosomalem <i>gfp</i> mut3-Marker	Tielker, 2005
<i>P. aeruginosa</i> PASCH <i>gfp</i>	Δ <i>estA</i> mit chromosomalem <i>gfp</i> mut3-Marker	diese Arbeit
<i>P. aeruginosa</i> PAN10	<i>lasB::Km</i>	Braun <i>et al.</i> , 1998
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	<i>traG::lacZ traR</i> (pZLR4) Gm30 AHL-Sensorstamm	Cha <i>et al.</i> , 1998
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Mini Tn5 Km25 AHL-Sensorstamm	McClellan <i>et al.</i> , 1997

**Tab. 3: Übersicht der verwendeten Plasmide.**

Plasmid	genetische Marken	Referenz / Bezugsquelle
pRK600	Cmr <i>ori</i> -ColE1 RK2- <i>mob</i> +RK2- <i>tra</i> + Helferplasmid in Konjugationen	Kessler <i>et al.</i> , 1992
pBK-mini-Tn7- <i>gfp3</i>	pUC19-Derivat mit mini-Tn7-Smr- PA1/04/03- <i>egfp</i>	Koch <i>et al.</i> , (2001)
pBBR1MCS	Cmr Kmr Apr <i>mob</i> + <i>lacZ</i> a Cmr <i>rep mob</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1994

**Tab. 4: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.**

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBBX+	3,3 kb <i>XhoI</i> -Fragment mit <i>estA</i> in pBBR1MCS Plac-Ktr.	Wilhelm, 1997
pBBXmut	pBBX+, mit Punktmutation in <i>estA</i> (S38A)	diese Arbeit
pBR22Est	2,4 kb <i>NdeI/XhoI</i> -Fragment, <i>estA</i> unter PT7Φ10-Kontrolle	Wilhelm, 2001

### 2.3. Oligonukleotide

**Tab. 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Nukleotidsequenzen 5'→3'	Merkmal
Estup	GTTGCAGCGGGTGCGGGTGTC	
MutEstup	GTGTTCCGGCGACG <u>CCCT</u> CAGCGATG	Ser→Ala
MutEstdown	CATCGCTGAGGG <u>CG</u> GTCGCCGAACAC	Ser→Ala
Estdown	GGTCTGGTGCTACAATCGCG	

### 2.4. Medien

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

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

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

[phosphate-limited proteose peptone-glucose-ammonium salt = PPGAS]

5 g/l Glukose; 10 g/l Pepton; 1,08 g/l NH<sub>4</sub>Cl; 1,48 g/l KCl; 14,6 g/l Tris; 0,36 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; HCl pH = 7,2

**PPGAS-Medium** modifiziert für die Biofilm Kultivierung in Durchflusszellen:

0,5 g/l Glukose; 1 g/l Pepton; 0,108 g/l NH<sub>4</sub>Cl; 0,148 g/l KCl; 14,6 g/l Tris; 0,36 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,505 g/l KNO<sub>3</sub>; HCl pH = 7,2

**APM-Medium** (Ohmen & Chakrabarty, 1991):

Lösung I 21,81 g/l; Lösung II 10,11 g/l; Lösung III 4,92 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; Lösung IV 1,37 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O; 3,9 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Die Lösungen werden getrennt autoklaviert und in folgenden Mengen eingesetzt: 100 ml Lsg. I; 100 ml Lsg. II; 50 ml Lsg. III; 750ml Lsg. IV

**ABG-Medium** (Chilton *et al.*, 1974):

AB-Salz (20-fach): 20 g/l NH<sub>4</sub>Cl; 6 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 3 g/l KCl; 0,2 g/l CaCl<sub>2</sub>; 50 mg/l FeSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O; AB-Puffer (20-fach): 60 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 23 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und folgendermaßen zusammengesetzt: 100 ml AB-Satz (20-fach); 100 ml AB-Puffer (20-fach); 40 ml D-Glukose (10 %); 176 ml A.dest

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Hitzelabile Chemikalien wurden mit Membranfiltern mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm (Schleicher und Schüll, Dassel) sterilfiltriert und den autoklavierten Medien bei einer Temperatur von 60 °C zugesetzt.

Für die Bewegungsplatten wurde für Schwimm-, Schwärm und „twitching motility“-Platten 0,3 % (w/v), 0,5 % (w/v) und 1,5 % (w/v) Agar in das PPGAS-Medium zugegeben. Dabei wurde für die Schwärmplatten anstelle des NH<sub>4</sub>Cl im PPGAS-Medium das 0,05 % Glutamat als einzige N-Quelle zugegeben.

Für den qualitativen Nachweis von Enzymen wurden Indikatorplatten verwendet, auf welche üblicherweise Einzelkolonien überimpft wurden und welche 24 h bei 30°C inkubiert wurden.

Alle Nähr- und Testmedien wurden 20 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter, Porendurchmesser 0,25 oder 0,45 µm) und dem Medium (60 °C) nachträglich zugesetzt.

## 2.5. Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Übernachtskulturen von *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden in LB-Medium angelegt und bei 37 °C bebrütet. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina im Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH), bei 180–220 UpM kultiviert. Dabei entsprach das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10. Stämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 6) kultiviert. Hauptkulturen von *P. aeruginosa* wurden aus einer ÜK auf eine O.D.<sub>580 nm</sub> = 0,05 in PPGAS-Medium beimpft und bei 30 °C bebrütet. Das PPGAS-Medium gewährleistet eine Erhöhung der produzierten Rhamnolipidmenge gegenüber dem LB-Medium und findet in den RL-Analysen eine breite Anwendung (Guerra-Santos *et al.*, 1986; Zhang & Miller, 1994; Wild *et al.*, 1997). Hauptkulturen für die Untersuchung der Rhamnolipide wurden 48 h inkubiert, da die maximale Rhamnolipidmenge in Kulturüberstand nach 30 h erreicht ist. Die anderen Hauptkulturen wurden 16 h bei 30 °C. In den Hauptkulturen wurden zur Selektion ausschließlich die Antibiotika zugesetzt, deren Resistenz auf Plasmid kodiert war. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

Tab. 6: Konzentrationen der zur Selektion eingesetzter Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration für <i>E. coli</i> (µg/ml)	Konzentration für <i>P. aeruginosa</i> (µg/ml)
Ampicillin (Ap)	100	-
Carbenicilin(Cb)	-	600
Gentamycin (Gm)	10	50
Tetracyclin (Tc)	10	100
Chloramphenicol (Cm)	50	300
Streptomycin (Sm)	50	100
Spectinomycin (Sp)	-	100
Kanamycin (Km)	50	-
Irgasan (Irg)	-	25

## 2.6. Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firmen Invitex (Berlin) und Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller.

Chromosomale DNA aus Zellen von *P. aeruginosa* wurde nach Gamper *et al.* (1992) isoliert.

## 2.7. Gelelektrophorese der Nukleinsäuren

DNA-Fragmente wurden zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,6 % - 2 % (w/v) nach Sambrook *et al.* (1989) elektrophoretisch getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde  $0,5 \times$  TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurde die „1kb-ladder“ der Firma Gibco-BRL (Eggenstein) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin Extract“-Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren) sowie des „QiaEx II“-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

## 2.8. *In vitro* rekombination von DNA

### 2.8.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur gezielten hydrolytischen Spaltung von Phosphodiesterbindungen innerhalb spezifischer Basensequenzen von DNA wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen des Typs II (DNA-Bindungsstelle ist identisch mit Schnittstelle) eingesetzt. Um eine vollständige Hydrolyse zu gewährleisten, wurden pro µg DNA 5 U der entsprechenden Endonuklease in den Restriktionsansatz eingesetzt und 1 h bei benötigter Temperatur inkubiert. Für optimale Reaktionsbedingungen wurde der vom Hersteller mitgelieferte Puffer eingesetzt.

### 2.8.2 Ligation von Vektor- und Fragment-DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend hydrolysiertes Vektor-DNA wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Die Ligase ist in der Lage, unter Hydrolyse von ATP die kovalente Verknüpfung benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Moleküle zu bilden. Das Enzym wurde nach Herstellerprotokoll im mitgelieferten Puffer eingesetzt und 2 h bei RT inkubiert. Die Vektor- und die zu inserierende DNA wurden in einem Verhältnis von 25 ng DNA /kb Vektor zu 125 ng DNA/kb vom Insert eingesetzt.

## 2.9. Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid DNA

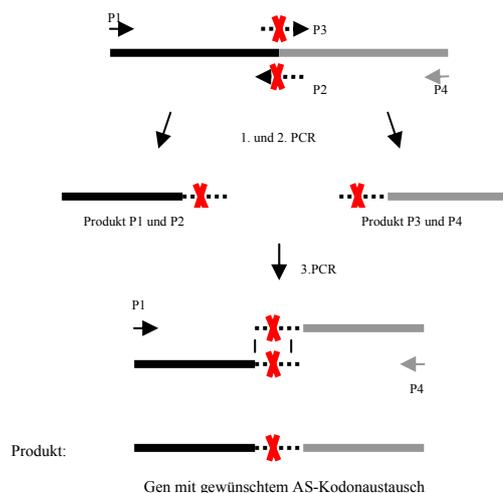
Die Transformation sowie die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli* Zellen wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt.

## 2.10. Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Nichtkonjugative Stämme können durch ein zusätzliches konjugatives Plasmid zum Transfer ihrer Plasmid-DNA mobilisiert werden. In solchen Fällen wurde in der tri-parentalen Konjugation der Stamm *E. coli* pRK2013 (*tra*<sup>+</sup>) als der mobilisierende Stamm dem Konjugationsansatz zugefügt. Dabei wurde 1 ml einer ÜK des plasmidhaltigen Donorstamms *E. coli* S17-1 und falls erforderlich 1 ml des Stammes *E. coli* pRK2013 mit

2 ml des jeweiligen Rezipientenstamms von *P. aeruginosa*, der zuvor für 10 min bei 46 °C inkubiert wurden, gemischt und durch Zentrifugation (3 min; 5.000 g; RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für mindestens 4 h bei 37 °C auf einer LB-Agarplatte inkubiert, bevor diese in 1 ml Saline (0,9 % NaCl) suspendiert und in Verdünnungen  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion des Donorstamms enthielt der Selektivagar zusätzlich 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, CH).

## 2.11. Ortsgerichtete Mutagenese durch „overlap-extension“-PCR



Bei dieser PCR-Mutagenese werden drei unabhängige PCR-Reaktionen (Ho *et al.*, 1989) benötigt um eine zielgerichtete Mutation an eine DNA-Stelle einzufügen (Abb. 8). Hierfür werden vier geeignete Primer benötigt: die Ziel-DNA-flankierenden Primer P1 und P4, sowie zwei zueinander komplementäre Primer (P3 und P4), die zentral in ihrer Sequenz die Mutation enthielten, welche den gewünschten Kodonaustausch ermöglicht (Tab. 5).

**Abb. 8: Schematische Darstellung der ortsgerechten Mutagenese durch „overlap-extension“-PCR.** Die Kreuze in den als Pfeil dargestellten Oligonukleotide symbolisieren die einzuführende Mutation.

In den ersten zwei PCRs wurden mit den Primern P1 und P2 bzw. P3 und P4 die Genabschnitte die unterhalb bzw. oberhalb der Mutation gelegenen Sequenz (P1 bis P2) amplifiziert. Die Produkte dieser zwei PCRs wurden anschließend zusammen mit den Genflankierenden Primern P1 und P4 in eine dritte PCR eingesetzt. Bei dieser overlap-PCR, bilden die beiden Produkte untereinander Wasserstoffbrücken aus, da sie um den mutierten Genabschnitt zueinander komplementär sind; die überlappenden Sequenzen fungieren zum einen als Primer, da von ihren Sequenz-Enden die Amplifikation vorangehen kann, zum anderen dienen sie als Template für die flankierenden Primer P1 und P4. Das Produkt dieser „overlap-extension“-PCR ist die rekombinante DNA, die an der gewünschten Stelle eine Mutation trägt.

## 2.12. Chromosomale Gfp-Markierung von *P. aeruginosa*

Die ortsspezifische Insertion des *gfp*-Gens in eine neutrale, intergenische Region im Genom von *P. aeruginosa* stromabwärts des *glmS*-Gens erfolgte mit Hilfe des mini-Tn7-Systems nach Koch *et al.* (2001). Dazu wurden die Plasmide pBK-mini-Tn7-*gfp2* bzw. pBK-mini-Tn7-*gfp3* und pUX-BF13 mit Hilfe des Helferplasmids pRK600 durch tetra-parentalen, konjugativen Transfer nach *P. aeruginosa* mobilisiert. Die *gfp*-markierten Bakterien wurden durch Selektion auf Gm- bzw. Sm-haltigem PIA isoliert.

**2.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 10 ng Plasmid- oder 20 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 50 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCRAutomaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 × (2 min: 98 °C); 30 × (1 min: 95 °C; 0,5 min: 50–65 °C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5-2 min × 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); 1 × (5 min: 72 °C). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin Extract“-Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers. Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

**2.14. Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Quiagen GmbH, Hilden, durchgeführt.

**2.15. Gewinnung von Kulturüberständen**

Die Zelldichte einer Flüssigkultur wurde bestimmt (O.D.<sub>580nm</sub>) und die Zellen durch Zentrifugation (20 min; 13.000 g; 4°C) geerntet. Der Überstand wurde abgenommen, im Bedarfsfall sterilfiltriert (Schleicher und Schüll, NC45 Membranfilter, 0,45µm Porendurchmesser) und sofort verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das Zellsediment wurde für die Herstellung von Gesamtzellextrakt verwendet.

**2.16. Herstellung von Gesamtzellextrakten (GZE)**

Das unter 2.14 gewonnene Zellsediment wurde im Puffer (100 mM Tris/HCl; pH 8,0) aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250; 5-10 min; Leistungszyklus 50 %; 20 Watt). Der GZE (O.D.<sub>580nm</sub> = 0,15 / ml) wurde fraktioniert (2.17) gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.19), in Enzymtests (2.21) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

**2.17. Fraktionierung von *P. aeruginosa*-Zellen**

Die in 100 mM Tris/HCl, pH 8 suspendierte Gesamtzellextrakte wurden nach der Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W250; 5 min; Leistungszyklus 50 %; 20 Watt) für 10 min bei 5.000 g zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (1 h; 13000 g). Die hierbei sedimentierten Membranproteine wurden direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen, während die im Überstand lokalisierten Proteine der Periplasma und Cytoplasma zunächst durch TCA-Fällung nach Peterson (1997) präzipitiert wurden.

**2.18. Präzipitation von Proteinen**

Proteinproben wurden nach Peterson (1977) mit 0,1 Volumen Natriumdesoxycholat-Lösung (1 % w/v) und mit 0,1 Volumen 70 % (w/v) Trichloressigsäure vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (30 min, 13000 Upm) wird das Sediment mit 80 % Aceton gewaschen und getrocknet.

**2.19. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von

SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli *et al.* (1970) bestehend aus einem 5 % Sammel- und einem 12 % Trenngel. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und vor dem Auftragen 10 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merrill (1990) mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg) gefärbt. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese durch TCA-Fällung nach Sivaraman *et al.* (1997) präzipitiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

## 2.20. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung der Apparatur „Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad, München) auf eine PVDF Membran (Bio-Rad, München) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektroblot in einem nach Dunn (1986) beschriebenen Puffer (10 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 20 % (v/v) Methanol) bei 150 mV für 15 min und bei 300 mV für weitere 20 min. Die PVDF-Membran wurde anschließend für 2,5 h bei RT oder ü.N. bei 4°C in TBST (50 mM Tris/HCl pH 6,8; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 % (v/v) Tween 20) mit 1 % (w/v) Milchpulver blockiert. Der immunologische Nachweis von der Esterase auf der PVDF-Membran erfolgte unter Verwendung eines monoklonalen Antiserums in einer Verdünnung von 1:50000. Die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „ECL-Western Blotting Detection“-System (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) und den Zweit-Antikörpers Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Bio-Rad, München) in einer Verdünnung von 1:5000. Die Dokumentation erfolgte über die Belichtung eines Röntgenfilmes.

## 2.21. Bestimmung der Enzymaktivität

### 1.21.1. Esterase Nachweistest

#### a. Photometrischer pNPC-Test

Pro Reaktion wurden 1,5 ml (V) Testlösung [25  $\mu$ l pNPCaproat in 5 ml Ethanol gelöst; plus 100 ml Puffer (100 mM KP<sub>i</sub> pH 7,2; 10 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)] mit 5-50  $\mu$ l (v) Probe vermischt und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die O.D.<sub>410nm</sub> der Ansätze im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) bestimmt. Angegeben werden die Werte als relative Aktivität, wobei die O.D. bei 410 nm auf 1 ml Probenvolumen und auf die Zelldichte (O.D.<sub>580nm</sub>) bezogen ist ( $[O.D._{410nm}/O.D._{580nm}]/ml$ ) oder als unit. Ein U (unit) Enzymaktivität ist definiert als Bildung von 1  $\mu$ mol pNP/min und der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) wurde bestimmt mit 10400 M<sup>-1</sup> ( $U=OD_{410nm}/min \cdot V/v \cdot \epsilon^{-1}$ ).

#### b. Zymogramm

GZE (2.16) oder Fraktionsproben (2.17), die in SDS-PAGE aufgetrennt wurden und eine Esteraseaktivität aufweisen, können mittels 4-Methylumbelliferyl Butyrat im Gel sichtbar gemacht werden (Riedel *et al.*, 2003). Hierfür inkubiert man das SDS-Gel 20 min in 10 ml 50 mM Tris HCL mit 25 % Isopropanol und ü.N. in 10 ml 50 mM Tris HCl. Die Entwicklung passierte in 0,01M 4-Methylumbelliferyl butyrat in DMF. Die Esterase wird durch seine Größe und Substratspezifität gegenüber dem blau fluoreszierenden Methylumbelliferylbutyrat, in einem SDS-Polyacrylamidgel mittels UV-Licht visualisiert. Die Dokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt.

### c. Tributyrin-Indikator-Platten

Zur Detektion von Lipase- und Esterase-Aktivität wurde der Tributyrinagar nach Kok *et al.* (1993) hergestellt: 7,5 ml Tributyrin und 0,75g Gummi arabicum ad 15 ml A.dest, das Tributyrin mit Ultraschall (3 min; 75 W; 100 %) emulgieren und zu 500 ml autoklaviertem PPGAS-Agar (60°C) geben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,4 mM IPTG. Nach dem Überimpfen von Einzelkolonien auf diese Platten, erfolgte die Inkubation bei 30°C für 24 h.

#### 1.21.2. Isocitratlyase Aktivitätstest

Der Test wurde in einer modifizierten Form nach Barbaro *et al.* (2001) durchgeführt. Zellen einer 24h Kultur, die in 10 ml PPGAS-Medium inkubiert worden waren, wurden durch 30 minutige Zentrifugation bei 8000 g gefällt und in 1 ml 100 mM Tris (pH=8) aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W250; 5 min; Leistungszyklus 50 %; 20 Watt). Nachdem die unaufgeschlossenen Zellen durch Zentrifugation (20 Minuten; 7000 UpM) entfernt worden waren, wurden Aliquots von 50 bis 600 µl des Überstand jeweils auf 1 ml mit 100 mM Tris (pH=8) aufgefüllt und 2 ml der Substratlösung (300µl MgCl, 10 µmol; 300 µl Cystein-HCl, 5 µmol; 300µl phenylhydrazine-HCl, 10 µmol; 800 µl KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Puffer, 64,5 µmol; pH 7,4 und 300 µl Isocitrat, 10 µmol) zugefügt. Die relative Aktivität wurde nach 20 Minuten Inkubation bei RT durch Messung der O.D.<sub>324</sub> des Reaktionsansatzes unter Berücksichtigung der Zelldichte berechnet.

#### 1.21.3. Phospholipase Nachweistest

Die Vorschrift stammt von Timpe *et al.* (2003). Als Substrat für 0,001-0,1U putativen Phospholipase (hier: EstA) wurde 1 mg egg-yolk type XIII-E Phosphatidylcholine (PC (Sigma)) oder 150 µg Lysophosphatidylcholine (LPC (Sigma)) benutzt. Die enzymatische Reaktion verlief bei 37°C, 300 UpM über Nacht in 500 µl Puffer (5 mM Tris; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM ZnCl<sub>2</sub>; pH=7,2).

Nach Extraktion mit 3 ml Chloroform-Methanol (4:1) Lösung, wurde die Chloroform-Phase vacuumgetrocknet. Die Produkte wurden in 20 µl Chloroform-Methanol (2:1) Lösung resuspendiert und auf Silika Gel 60 Platte (Merck) zusammen mit den Standarts: 100 µg PC, 200 µg LPC und 150 µg egg-yolk glycerophosphorylcholine (GPC, Sigma) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Für diese Auftrennung wurde das System von Matsuzawa und Hostetler (1980) benutzt: nach Entwicklung der Dünnschichtchromatographie-Platte mit Chloroform-Methanol-Wasser (65:35:5) bis 7 cm Höhe wurde die DC-Platte getrocknet und erneut und diesmal vollständig bis zum oberen Rand (18cm) mit dem Laufmittel bestehend aus Heptane- Diethylether- Ameisensäure (90:60:4). Nach anschließendem Trocknen der Platte wurde diese mit 0,05 % Jodlösung in Chloroform zur Visualisierung der Phospholipide und deren Produkte besprüht. Die reversible Gelbfärbung wurde direkt dokumentiert (Scanner).

Alternativ wurden als Substrat für 0,1 U EstA (PL) die Membran-Fractionen des *P. aeruginosa* PAO1, die einer Zellzahl O.D.<sub>580nm</sub>=10 entstammen, benutzt. Nach deren Extraktion wurden die Produkte der enzymatischen Reaktion in 10 µl Ethylacetat resuspendiert auf die Schwärmplatten getropft. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurden im 1,5 cm Abstand Einzelkolonien inokuliert und die Platte 24h bei 30 °C inkubiert.

#### 1.21.4. Protease Nachweistest

##### a. Protease-Indikator-Platten („skim-milk“-Platten)

Für die Herstellung der Platten wird das PPGAS-Agar mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (30 min, 105 °C) versetzt. Proteaseaktivität führt zur Entstehung klarer Höfe um die aufgetropften Kulturüberstände (10 µl) bzw. gepickten Bakterienkolonien.

### **b. Zymogramm**

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

#### **2.22. „Drop-collapsing“-Test**

10 µl des KÜ einer 24h Kultur, die in 25ml PPGAS-Medium bei 30 °C inkubiert wurde, wurde auf den Deckel einer Petrieschale pipettiert (Lindum *et al.*, 1998). Die Form eines Tropfens gibt Aussage über das Vorhandensein an Biodetergenz. Je mehr Detergenz im Kulturüberstand vorhanden ist umso geringer die Oberflächenspannung und umso geringer der Halt des Tropfens in Kugelform.

#### **2.23. Rhamnolipid-Untersuchung in *P. aeruginosa***

##### **2.23.1. Rhamnolipid-Extraktion aus Kulturüberständen**

50-300 µl PPGAS-Kulturüberstand einer 48 h Kultur wurde auf 300 µl mit A.dest aufgefüllt. Durch zweimalige Extraktion mit 600 µl Diethylether (Sieigma) wurden die Rhamnolipide aus der Probe isoliert. Die vereinigten Diethylether-Phasen wurden in Vakuumzentrifuge vollständig evaporiert.

##### **2.23.2. Orcinoltest zum Rhamnolipid-Nachweis**

Dieser photometrische Nachweistest für 3-Desoxy-Hexosen stellt eine indirekte Möglichkeit zur Quantifizierung von Rhamnolipiden (Chandrasekaran & Bemiller, 1980; modifiziert nach Ochsner, 1993). Im sauren Medium und beim Erhitzen entsteht durch Fettsäure-Hydrolyse und Furfural-Bildung der 3-Desoxy-Hexose eine Chromophor-Formation des Zuckers. Das Furfural kondensiert mit dem Orcinol (3,5-Dihydroxytoluene) und es entsteht ein gelbes, bei O.D.<sub>421nm</sub> photometrisch detektierbares Produkt. Hierfür fügt man dem Rhamnolipid-Extrakt (2.23.1) 100 µl A.dest, 100 µl 1,6 % (w/v) Orcinol (Sigma) und 800 µl 60 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, durchgemischt die Probe gründlich und inkubiert sie 30 min bei 80 °C unter schütteln (Thermoschüttler). Anschließend folgt die photometrische Messung bei 421 nm. Mit Hilfe der Eichgeraden von Rhamnose als Standard wurde die Rhamnolipidkonzentration der Proben bestimmt. Dabei gilt in Abhängigkeit von dem Verhältnis RL-1,1 zu RL-2,1:

$$1 \mu\text{g Rhamnose} \triangleq 2,5 \pm 0,5 \mu\text{g Rhamnolipid}$$

##### **2.23.3. Dünnschichtchromatographie von Rhamnolipiden**

Die Rhamnolipide aus 100–300 µl Kulturüberstand wurden mit Diethylether extrahiert (2.23.1) und in 10 µl Ethanol aufgenommen. Die Proben wurden auf die Kieselgel 60 F<sub>254</sub> [Merck] Glasplatte (20 cm × 20 cm) punktförmig mit einer Hemmelton-Pipette aufgetragen. Die Platte wurde in einen mit dem Laufmittel [Chloroform: Methanol: Essigsäure (65:15:2)] gesättigten Tank gestellt und wieder herausgeholt, sobald die Lauffront 2 cm von dem Plattenrand entfernt war. Die bei RT getrocknete DC-Platte wurde mit dem Farbreagenz: 0,15 g Orcinol (Sigma); 42 ml A.dest; 8,4 ml Schwefelsäure besprüht und in trockenem Zustand bei 110 °C 10 min inkubiert. Die Rhamnolipid-Dots färbten sich braun. Die Dokumentation erfolgte mit einem Scanner. Als Standard galt 0,1 mg HPLC-aufgereinigtes sterilfiltriertes RL in A.dest, das von Ochsner, U.A. zur Verfügung gestellt wurde (Ochsner, 1995).

## 2.24. Biofilmuntersuchung

### 2.24.1. Biofilmkultivierung

#### a. Kultivierung in Durchflusszellen

Die Kultivierung von Biofilmen in Durchflusszellen (ein Kanal:  $3 \times 8 \times 54$  mm) auf Glasdeckgläsern (Borosilikatglas  $24 \times 60$  mm, 0,17 mm dick [Fa. Marienfeld „Superior“]) erfolgte nach Klausen *et al.* (2003b) unter Verwendung von *gfp*-markierten Bakterienstämmen (Koch *et al.*, 2001) in hierfür modifiziertem PPGAS-Medium (2.4) oder dem APM-Medium (2.4) bei 30 °C über einen Zeitraum von 3 Tagen. Die Durchflusszellen wurden mit 5 ml einer Zellsuspension aus einer ÜK beimpft, die  $1 \times 10^7$  Zellen/ml aufwies. Nach der Beimpfung wurden die Durchflusszellen für 1 h stehen gelassen, um die Adhäsion der Zellen an das Substratum zu ermöglichen. Anschließend wurde unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe (Ismatec, IPC-N, Wertheim-Monfeld) der Medienstrom von 20 ml/h gestartet. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden jeweils zwei Kanäle pro Bakterienstamm analysiert. Bei fehlender *gfp*-Markierung eines Bakterienstammes wurde der DNA-bindende Farbstoff SYTO 9 (Molekular Probes, Eugene, USA) verwendet, indem 2,5 ml Färbelösung (1,5 µl SYTO 9-Stammlösung je 1 ml APM-Medium) in jedes Kanal injiziert wurden. Die Analyse der Biofilme erfolgte in mittels CLSM (2.24.2.a.).

#### b. Kultivierung in Reagenzgläsern

Die Biofilmbildung in Reagenzgläsern, die zuvor mit Ethanol und A.dest gründlich gespült wurden, erfolgte in 3 ml PPGAS Medium, bei 30 °C und 100 UpM für 24 h. Die Analyse erfolgte mittels Kristallviolett-färbung der Biofilme (2.24.2.b.).

### 2.24.2. Biofilmdetektion

#### a. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)

Biofilme in Durchflusszellen (2.24.1.a.) wurden in jeweils zwei unabhängigen Experimenten kultiviert und es wurden mindestens drei verschiedene Stellen eines Biofilms mittels CLSM analysiert. Die Visualisierung der Biofilme wurde mit einem konfokalen Laser- Scanning Mikroskop (LSM 510; Carl Zeiss, Jena) unter Verwendung einer Achroplan  $40 \times 0,60$ -NA-Linse durchgeführt. Die Aufnahme der 3-D-Bildstapel erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm unter Einsatz eines LP 505 nm Langpassfilters, wobei die Größe des *pinhole* 1,0 Airy unit betrug. Die CLSM-Visualisierung der Biofilme, die in Durchflusszellen kultiviert wurden, erfolgte nach Klausen *et al.* (2003b). Für die Aufnahme der Biofilme wurde die Zeiss LSM Software (Version 2.8) verwendet.

#### b. Kristallviolettfärbung

Die Färbemethode wurde nach Modifikation der Vorschriften von O'Tool & Kolter (1998) und Hentzer *et al.* (2001) durchgeführt. Den 3 ml Kulturen in den Reagenzgläsern (2.24.1.b) wurden 750 µl einer 1 % (v/v) Kristallviolett Lösung hinzu gegeben und sie wurden 3 h bei RT inkubiert. Die vollständige Flüssigkeit wurde danach entnommen, der kristallviolett-gefärbte Biofilmrand mit A.dest gewaschen und vollständig in 1 ml Ethanol gelöst. Die Messung der Farbstofflösung in den Verdünnungen  $10^{-2}$  bis  $10^{-4}$  erfolgte bei O.D.<sub>580nm</sub>.

## 2.25. Pyocyanin-Nachweis

5 ml einer 24 h Kultur in 25 ml PPGAS-Medium wurden mit 3 ml Chloroform extrahiert. Das Extrakt wurde erneut mit 0,2 N HCl reextrahiert. Der relative Pyocyanin-Gehalt der organischen Phase wurde spektralphotometrisch bei 520 nm bestimmt. Dieser Wert wurde mit 17,072 multipliziert um so die Pyocyanin-Konzentration in mg/ml Kultur zu bestimmen (Kurachi, 1958).

## 2.26. Bestimmung der Zelloberflächen-Hydrophobizität

Der MATH (microbial adhesion to hydrocarbon)-Test, der der Bestimmung der Hydrophobizität der Zelloberfläche dient, wurde modifiziert nach Rosenberg, 1984 durchgeführt. 10 ml Kulturen in PPGAS-Medium wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben angezogen. Eine Zellzahl von  $O.D._{580nm} = 0,7$  wurde, nachdem es mit 0,5 ml PUM-Puffer (22,2 g/l  $K_2HPO_4$ ; 7,26 g/l  $KH_2PO_4$ ; 1,8 g/l Urea; 0,2 g/l  $MgSO_4$ ) gewaschen wurde, in 2 ml desselben aufgenommen und mit unterschiedlichen Mengen 50-200  $\mu$ l des hydrophoben Hexadekans versetzt. Dem anschließenden Vortexen über 2 min, bei welchem die Substanz in Kontakt mit den Zellen kommt, folgt nach 15 min die photometrische Messung der Unterphase bei  $O.D._{580nm}$ . Die hydrophoben Zellen haften an das Hexadekan und ihre Menge nimmt mit steigender Hexadekanmenge in Probeansatz in der Unterphase ab.

## 2.27. Untersuchung der AHL-Signalmoleküle aus *P. aeruginosa*

### 2.27.1. Extraktion der AHL-Signalmoleküle

Für den AHL Nachweis langer AHL-Moleküle mit *Agrobacterium tumefaciens* wurden 1 ml Aliquots der Kulturüberstände von 24 h Kulturen (PPGAS-Medium; 30 °C; vergleichbare  $O.D._{580nm}$ ), zwei Mal mit 400  $\mu$ l Dichlormethan extrahiert. Nach dem Vakuumtrocknen des organischen Lösungsmittels, wurden die Signalmoleküle in 10  $\mu$ l Ethylacetat aufgenommen. Für den AHL Nachweis kurzer AHL-Moleküle mit *Chromobacterium violaceum* wurden 5 ml Aliquots der Kulturüberstände von 24 h Kulturen (PPGAS-Medium; 30 °C; vergleichbare  $O.D._{580nm}$ ) zwei Mal mit 2 ml Dichlormethan extrahiert. Nach dem Lyophilisieren des organischen Lösungsmittels, wurden die Signalmoleküle in 10  $\mu$ l Ethylacetat aufgenommen.

### 2.27.2. Dünnschichtchromatographie der AHL-Signalmoleküle

Für den Nachweis und die Identifikation von AHL-Signalmolekülen nach Shaw *et al.* (1997) wurden 10  $\mu$ l der aus Kulturüberständen extrahierten AHLs (2.27.1.) auf DC-Platten (RP-18 F254s, 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt) aufgebracht und als Laufmittel 60 % Methanol in Wasser verwendet. Als Standards wurden synthetische AHLs aufgetragen. Nach der Auftrennung der Proben wurden die DC-Platten für 1 h bei 30 °C getrocknet.

### 2.27.3. Detektion der AHL-Signalmolekülen mit Indikatorbakterien

Der Nachweis von AHL-Signalmolekülen erfolgte nach McClean *et al.* (1997) bzw. Shaw *et al.* (1997) mit Hilfe der AHL-Biosensor-Bakterien *Chromobacterium violaceum* CV026 bzw. *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), die durch gentechnische Veränderungen keine AHL-Signalmoleküle produzieren können, jedoch auf deren externe Zugabe als Detektoren reagieren können. Die DC-Platten wurden mit 150 ml Indikatorbakterien in Weichagar überschichtet (für *C. violaceum*: 33 % ÜK in LB, 66 % LB-Agar (1,12 % (w/v) Agar), für *A. tumefaciens*: 33 % ÜK in ABG-Medium, 66 % Agar (1,12 % (w/v)), 100  $\mu$ g/ml X-Gal). Nach einer Bebrütung für 24 h bei 30 °C konnten die entstandenen violetten bzw. hellblauen Spots mit Hilfe der Standard-Moleküle als AHLs identifiziert werden. Als Standarts wurden synthetischen AHL-Moleküle verwendet, die nach der von Eberhardt *et al.* (1981) beschriebenen Methode von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dyker (Lehrstuhl Organische Chemie, Ruhr-Universität Bochum) hergestellt (C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C12-HSL) oder von der Firma Fluka, Sternheim (C6-HSL) bezogen wurden. Gelöst wurden AHLs stets in Ethylacetat.

## **2.28. Untersuchung des „Pseudomonas-quinolon“-Signals (PQS)**

### **2.28.1. Extraktion von PQS**

Die PQS-Extraktion erfolgte nach einer Kultivierung von 16, 20, 24 und 48 h bei 30 °C in 400 ml PPGAS-Medium. Jeweils 10 ml Kulturüberstand wurde mit dem gleichen Volumen Ethylacetat für 30 Sekunden stark gemischt und anschließend 20 min bei 10.000 UpM zentrifugiert. Die organische Phase wurde im Rotationsverdampfer (Büchi, R-205) bei 37 °C unter Anlegen eines Vakuums eingetrocknet und der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen.

### **2.28.2. Dünnschichtchromatographie und Detektion von PQS**

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung erfolgte auf Kieselgel-Platten (F<sub>254</sub>, 20 × 20 cm, Merck, Darmstadt). Die DC-Platten wurden zuvor 30 min in 5 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> inkubiert und nach dem Trocknen 1 h bei 100 °C im Hybridisierungssofen erhitzt. 10 ml der Proben wurden jeweils auf die DC-Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurde Dichlormethan : Methanol (95:5) verwendet. Die DC-Platten wurden unter UV-Licht betrachtet. Die Identifikation des PQS erfolgte durch ESI-MS-Analyse der in Frage kommenden Spots (durchgeführt von der Arbeitsgruppe Dr. Piotrowski, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum).

## **2.29. Zwei-dimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten**

Das von O'Farrell (1975) veröffentlichte Prinzip der zwei-dimensionalen Polyacrylamid-gelelektrophorese (2 D-PAGE) zur Trennung von Proteinen nach deren Ladung und Molekulargewicht. Diese Methode wurde von Görg und Mitarbeiter in dem Auflösungsvermögen der 2-D Technik durch Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten bei der isoelektrischen Fokussierung (Görg *et al.*, 1985) verbessert.

### **2.29.1. Zellernte**

200 ml *P. aeruginosa* Kulturen wurden im PPGAS Medium bei 30 °C über 24 h bebrühtet. Nach Erreichen der O.D.<sub>580</sub> von 3 wurde das Medium sofort mit dem gleichen Volumen an eisgekühltem Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7,4) versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden bei 8000 g und 4 °C für 20 Minuten abzentrifugiert, die Zellsedimente zwei mal mit 50 ml Kalium-Phosphat-Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei 8000 g in 3 ml Kalium-Phosphat-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in Portionen zu 1 ml bei -80 °C gelagert. Von diesen wurden je 60 µl für die spätere BCA-Proteinbestimmung (2.29.3.) entnommen und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

### **2.29.2. Phenolextraktion und Acetonfällung der Proteine**

Die Zellen (940 µl) wurden mit 1 ml Kalium-Phosphat-Puffer und 2 ml Phenol (pH 7,4) versetzt und 2 Minuten stark geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Inkubation der Probe für 10 Minuten bei 70 °C. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis und 20 Minuten Zentrifugieren zur Phasentrennung bei 4000 g, wurde die wässrige Phase verworfen. Dem viermaligem Waschen mit 2 ml A.dest wurden die Schritte (starkes Schütteln, 10 Minuten bei 70 °C, 10 Minuten bei 0 °C, Zentrifugation, Verwerfen der wässrigen Phase) wiederholt. Danach wurden die Proteine durch Zugabe von 4 ml kaltem Aceton und 10-minütige Inkubation auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (4000 g; 15 min; 4 °C) wurde der Überstand (Phenol/Aceton-Gemisch) verworfen und der Proteinextrakt mit weiteren 6 ml Aceton gewaschen. Der Überstand der erneuten Zentrifugation wurde wieder verworfen und der an Luft getrocknete Proteinextrakt bei -80 °C gelagert.

### 2.29.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Um die Proteinkonzentration eines zellfreien Bakterienextrakts mit Hilfe des BCA-Tests zu bestimmen, wurden die Zellen alkalisch aufgeschlossen. Dabei wurden 60 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl destilliertem Wasser verdünnt und danach mit 150 µl 2 N Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Die Suspension wurde 1 Stunde bei 70 °C im Thermoschüttler inkubiert. Von diesem Zelllysate wurden 50 µl für den BCA-Test eingesetzt. Die Lösungen des BCA-Tests wurden kurz vor Gebrauch so angesetzt und der Test nach Angaben des Herstellers Sigma (Deisenhofen) durchgeführt.

### 2.29.4. Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten

Zur Analyse der Proteinexpressionsmuster von *P. aeruginosa* wurde die Methode der 2-D-Gelelektrophorese eingesetzt (O'Farrell, 1975). Für die erste Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), wurden Polyacrylamidgele mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen, pH 5-8) der Firmen Biorad und Amersham Pharmacia verwendet. Bevor der getrocknete Proteinextrakt für die IEF eingesetzt wird, muss dieser rehydratisiert werden.

### 2.29.5. Rehydratisierung der Proteine

Unter Berücksichtigung der Tatsache dass 50 % der Proteine während der Extraktion verloren gehen, gibt der BCA-Test die Möglichkeit die Proteinkonzentration der gefällten Proteine mit Rehydratisierungslösung auf 3 mg/ml einzustellen. Die getrockneten Proteinextrakte wurden in der entsprechenden Menge an Rehydratisierungslösung a (Harnstoff, 7 M; Thioharnstoff, 2 M, CHAPS 4 % (w/v); DTT 50 mM) versetzt und 3 h bei RT zur Resuspendieren belassen. Mit dem PlusOne-2D-QuantKit (Amersham Biosciences, Freiburg, D) ist die Proteinkonzentration-Bestimmung einer mit Detergenzien versetzter Probe möglich. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und mit Rehydratisierungslösung a auf die endgültige Proteinkonzentration von 500 µg Protein in 200 µl eingestellt. Dieser Ansatz wurde mit 100 µl Rehydratisierungslösung b (2,5 ml Rehydratisierungslösung-a; 125 µl Ampholytlösung; 125 µl TritonX-100; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt und für die IEF in den Rehydratisierungs-Tray (Amersham Pharmacia) pipettiert. Die pH-Gradientstreifen wurden vor der eigentlichen Fokussierung vorsichtig in den mit Proteinproben beladenen Rehydratisierungs-Tray hineingelegt, nach 0,5 h mit Mineralöl überschichtet und ü.N. bei RT inkubiert.

### 2.29.6. Elektrophorese der 1. Dimension

Nach der Rehydratisierung der IEF-Streifen in der Proteinlösung erfolgte die Fokussierung im IEF-Tray (PROTEAN IEF-Cell, Biorad). Nachdem die in A.dest getränkten Filter (Whatmann Papier) auf die Elektroden gelegt worden waren, wurden die IEF-Streifen mit der Gelseite nach unten in den IEF-Tray gelegt. Es wurde das in folgende Zeitprogramm für die anliegende Spannung verwendet (1 h 250V; 1 h 500V; 1 h 1000V; 22 h 5000V, ∞ 500V) wobei die Stromstärke auf 50 µA / Streifen begrenzt wurde. Nach mindestens 100 000 Vh war die isoelektrische Fokussierung beendet und die Gelstreifen wurden bis zur 2. Dimension in Klarsichthüllen bei -80 °C eingefroren oder gleich für die 2. Dimension vorbereitet.

### 2.29.7. Äquilibration der IPG-Streifen

Die fertig fokussierten IPG-Gele wurden jeweils mit 5 ml SDS-Äquilibrationpuffer, der 15 mM DTT enthielt, überschichtet und für 15 Minuten leicht schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Streifen zweimal für 15 Minuten in 5 ml SDS-Äquilibrationpuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,8); 6 M Harnstoff; 2 % (w/v) SDS; 35 % (w/v) Glycerin 35 %; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 150 mM Iodacetamid) gelegt.

### **2.29.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese PAGE (SDS-PAGE)**

In der zweiten Dimension der 2-D Gelelektrophorese werden die Proteine durch erneute Elektrophorese nach ihrer molekularen Masse getrennt. Das homogen vernetzte SDS-Gel wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) ohne Sammelgel hergestellt und die 2. Dimension über einen Zeitraum von 6-16 Stunden durchgeführt. Der Vernetzungsgrad betrug je nach Bedarf 10 % Polyacrylamid (2.19.).

### **2.29.9. Elektrophorese der 2. Dimension**

Die fokussierten und äquilibrierten IPG-Streifen wurden mit einer Pinzette seitlich auf die Oberkanten der SDS-Gele gelegt und mit Sealing-Solution (25 ml SDS-Elektrophoresepuffer [380 mM Glycin; 50 mM Tris; 0,1 % SDS (w/v)]; 2 % (w/v) Agarose; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) fixiert und die SDS-Gele in die Elektrophoreseapparatur (Ettan-DALT, Amersham Pharmacia) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 25 °C und einer Spannung von 80 V durchgeführt und endete nachdem der Farbmarker das Ende des Gels erreicht hatte.

### **2.29.10. Fixierung und Fluoreszenzfärbung der 2-D Gele mit RuBPS**

Die Proteine wurden mit Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (RuBPS) angefärbt. Das Färbeprotokoll wurde von Rabilloud *et al.* (2001) mit leichten Modifikationen übernommen: Zuerst wurden die Proteine bis zu 16 Stunden im Gel fixiert, wobei die Fixierlösung (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) nach den ersten 2 Stunden einmal ausgetauscht wurde. Zur Färbung mit RuBPS wurden die Gele anschließend für mindestens 6 Stunden in RuBPS-Färbelösung (0,8 µM Ruthenium-Chelat; 30 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure) kubierte. Vor dem Scannen im Laser-Scanner (Molecular Imager FX der Firma Bio-Rad) wurden die Gele in A.dest gewaschen.

Zur Dokumentation und Auswertung der Proteinmuster am Computer wurden die gefärbten Gele eingescannt. Hierzu wurde für die RuBPS-gefärbten Gele der Fluoreszenzscanner Molecular Imager FX verwendet. Die Bilddateien wurden mit dem Programm Z3 (Version 2.0, Compugen) analysiert.

## **2.30. MALDI-TOF Massenspektroskopie**

Die Identität der Proteine aus den 2-D Gelen wurde im Massenspektrometer durch MALDITOF („Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation“ / „Time Of Flight“) Analysen bestimmt.

### **2.30.1. Probenaufbereitung und Proteasebehandlung**

Nachdem die Proteine aus dem Gel ausgeschnitten worden waren, wurden sie 5 Minuten mit 200 µl A.dest gewaschen und für 15-20 weitere Minuten bei RT mit 20 µl Acetonitril versetzt. Der Überstand wurde verworfen und die Gelfragmente getrocknet, wonach sie mit 10 µl Trypsinlösung (2 µg/ml Trypsin; 50 mM Ammoniumbicarbonat) überschichtet und für mindestens 12 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Die Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix erfolgte wie folgt: Nachdem 15 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben worden waren, wurden die Proben für 15 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden 50 µl Acetonitril hinzugefügt und das Gemisch für weitere 15 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Überstände mit den darin enthaltenen Peptiden wurden abgenommen und in Eppendorfgläsern gesammelt. Um weitere Peptide aus den Gelstückchen zu extrahieren, wurden diese mit 50 µl 5 % Ameisensäure für 15 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Die Gelfragmente wurden dann erneut durch Zugabe von 50 µl Acetonitril und 15-minütiger Inkubation (schüttelnd; 37 °C) dehydratisiert. Die Überstände wurden vereinigt und in der SpeedVac getrocknet.

### 2.30.2. Reinigung der Protease-verdauten Peptide

Die gewonnenen Peptidlösungen wurden mit ZipTips der Firma Millipore entsalzen und aufkonzentriert. Hierbei handelt es sich um Pipettenspitzen mit eingebrachtem „reversed phase“ C-18 Chromatografiematerial geringen Volumens, an welches Peptide gebunden, gewaschen und anschließend in einem sehr kleinen Volumen wieder eluiert werden können. Zur unmittelbaren Eluierung der gesamten Probe auf ein MALDI-Target wurden ZipTip<sub>μC18</sub> eingesetzt. Die ZipTips wurden zunächst durch mehrmaliges Pipettieren einer Lösung von 0,5 % Ameisensäure und 65 % Methanol gewaschen und anschließend durch Pipettieren von 0,5 % Ameisensäure und 5 % Methanol äquilibriert. Danach erfolgte das Binden der Peptide am Trägermaterial durch zehnmaliges langsames Pipettieren der Probe, gefolgt von der Reinigung der Peptide durch fünfmaliges Pipettieren von je 10 μl frischer Waschlösung (0,5 % Ameisensäure; 5 % Methanol). Anschließend wurden die gereinigten Peptide durch mehrmaliges Pipettieren von 5 μl Elutionslösung (0,5 % Ameisensäure; 65 % Methanol) in ein Mikroliterreaktionsgefäß eluiert. Zur Vorbereitung der MS-Analyse wurden danach 0,5 μl Eluat mit 0,5 μl matrixgesättigter Elutionslösung (α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure; 0,5 % Ameisensäure; 65 % Methanol) gemischt und auf einen Probenpunkt des MS-Targets platziert. Alle weiteren Arbeitsschritte der MALDI-Analyse wurden im Labor von Dr. Lothar Jänsch an der GBF in Braunschweig durchgeführt.

## 2.31. Überexpression und Reinigung von EstA

### 2.31.1. EstA-Überexpression

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) mit dem Vektor pBR22Est wurde unter Selektionsdruck bis zu der Zelldichte von 0,5 bebrütet. Die Expression von EstA wurde mit 0,4 mM IPTG induziert und die Zellen nach weiteren zwei Stunden geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden im 100 mM Tris-HCL (pH 8) mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Branson-Sonifier W 250; 5-10 min; Leistungszyklus 50 %; 20 Watt).

### 2.31.2. Reinigung von EstA „inclusion-bodies“

Die aufgeschlossenen Zellen der Überexpressions-Kultur (2.31.2) wurden zentrifugiert (30 min, 5000g, GSA, 4°C) und so das „inclusion bodies“ enthaltende Sediment erhalten. EstA „inclusion bodies“ wurden in 100 mM Tris-HCL (pH 8) mit 8 M Harnstoff aufgenommen, mit Rückfaltung-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 8); 0,8 M Harnstoff; 5 mM EDTA; 1% (v/v) TritonX100) im Verhältnis 1:14 vermischt und 1 h bei RT inkubiert, bevor sie in dem pNpC-Test (2.21.1.a) zur Bestimmung der Aktivität eingesetzt wurden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20°C.

Die Einengung der Esterase EstA erfolgte in Zentrifugationskonzentratoren Vivaspin 20 mit der Ausschlussgröße von 10000 MWCO bei 3000 g unter Angaben des Herstellers.

## 2.32. Computerprogramme und Online-Datenbanken

DNA-Sequenzinformationen von *P. aeruginosa* wurden von dem „Pseudomonas-Genome Project“ bezogen (<http://www.pseudomonas.com>). Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997).

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

### 3. Ergebnisse

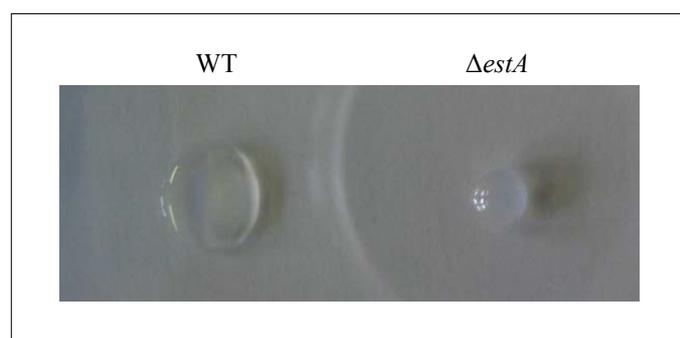
Die physiologische Bedeutung der Aktivität der Esterase EstA ist bislang ungeklärt. Es ist allerdings bekannt, dass sie kurze ( $\leq C10$ ) Esterbindungen spalten kann und in der äußeren Membran der Zelloberfläche lokalisiert ist, deren katalytisch aktive Domäne in den extrazellulären Raum exponiert (Wilhelm *et al.*, 1999). Wie viele bekannte Autotransporter ist EstA ein potentieller Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* PAO1 (Potvin *et al.*, 2003). Die extrazelluläre Aktivität zum einen und die Substratspezifität in Verbindung mit der Virulenz zum anderen eröffnet der Esterase EstA die Möglichkeit an der Synthese eines Virulenzfaktors im Kulturüberstand beteiligt zu sein. Ein dafür prädisponierter Kandidat ist das Rhamnolipid. Seine Prädispositionen bestehen in extrazellulärem Vorkommen in der logarithmischen Wachstumsphase, dem ihm zugeschriebenen Virulenzpotential und dessen molekularer Struktur. Rhamnolipid (RL) besteht aus bis zu zwei Rhamnosemolekülen und zweier daran bindender  $\beta$ -Hydroxyfettsäuren, die ihrerseits über eine Esterbindung verbunden sind. Diese Esterbindung könnte als mögliches physiologisches Substrat der Esterase in betracht gezogen werden.

Als optimale Bedingungen für eine erhöhte RL-Produktion gilt die Limitierung der Phosphatmenge im Kulturmedium (Syldatk *et al.*, 1984; Chayabutra *et al.*, 2000). Für alle folgenden Untersuchungen wurden daher für die Kultivierung der Zellen das phosphatlimitierte PPGAS-Medium und eine Temperatur von 30 °C gewählt.

#### 3.1. Untersuchung der Oberflächenspannung der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante

Zunächst sollte das Vorkommen des Rhamnolipids in der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) detektiert werden. Der „drop-collapsing“-Test ist eine einfache Methode, um das Vorhandensein an Biodetergenz im Kulturüberstand zu überprüfen (2.22).

**Abb. 9:** „Drop-collapsing“-Test zur Untersuchung der Oberflächenspannung von Kulturüberständen aus *P. aeruginosa*. 10  $\mu$ l der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) wurden auf einen Petrischalendeckel pipettiert.

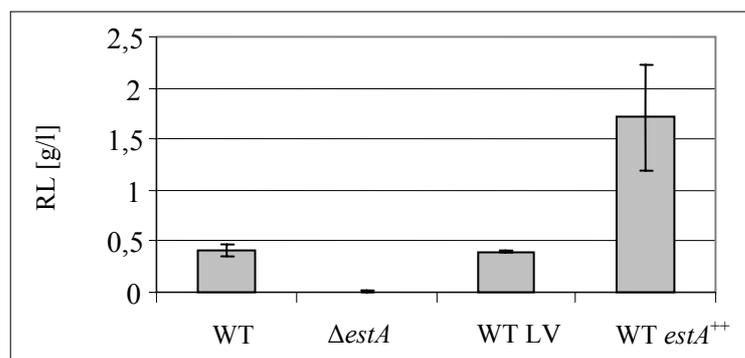


Ein Aliquot des Kulturüberstandes wird auf den Deckel einer Petrischale pipettiert und die Form des Tropfens untersucht. Ist der Tropfen kugelig, so hat er aufgrund der hohen Oberflächenspannung die energetisch vorteilhafteste Form angenommen. Ist im Tropfen des Kulturüberstandes ein Detergenz vorhanden, das die Oberflächenspannung herabsetzt, so ändert sich die Tropfenform und die Flüssigkeit des Tropfens breitet sich an der Oberfläche aus. Die Abbildung 9 zeigt die unterschiedlichen Tropfenformen der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp (WT) und der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ). Während der Tropfen der *estA*-Negativmutante kugelig ist, ist die Fläche, mit der der Kulturüberstand-Tropfen des WT die Plastikfläche berührt, größer geworden und der Tropfen ist abgeflacht. Im Kulturüberstand vom *P. aeruginosa* PAO1 ist ein Biodetergenz vorhanden, das die Oberflächenspannung des Tropfens herabsetzt, wohingegen der Kulturüberstand der *estA*-Negativmutante bedeutend weniger bzw. kein Detergenz aufweist.

### 3.2. Einfluss der *estA*-Deletion und EstA-Überexpression auf die Rhamnolipidproduktion in *P. aeruginosa* PAO1

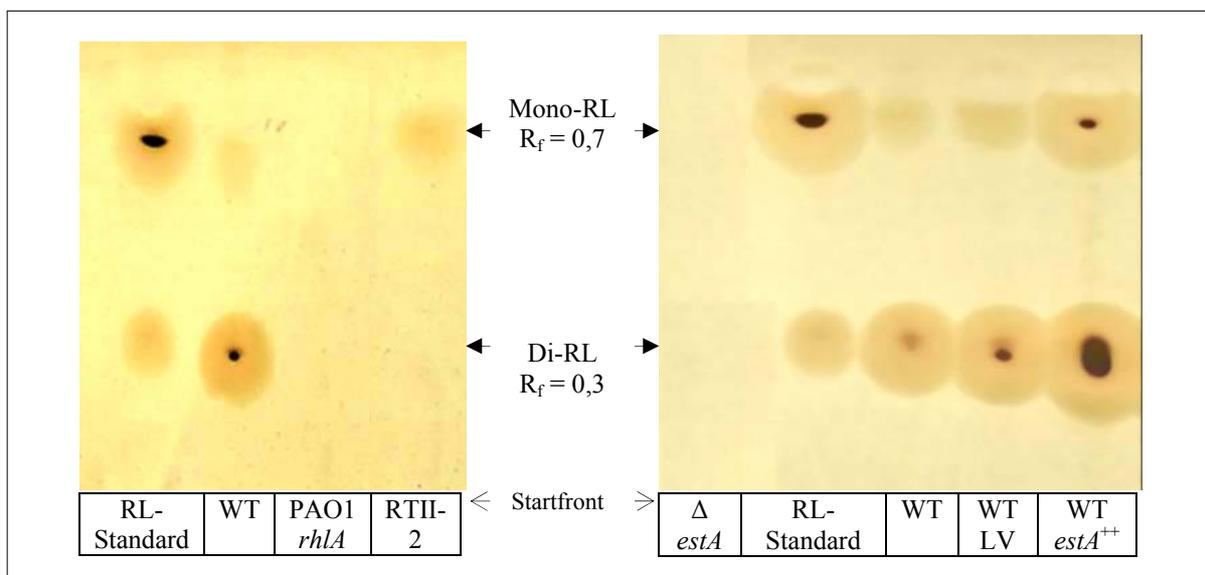
Der „drop-collapsing“-Test lieferte erste Anzeichen der Abwesenheit eines Detergenz in dem Kulturüberstand von der *estA*-Negativmutante. Die folgenden Untersuchungen der Rhamnolipidmenge (RL-Menge) sollten diese Annahme präzisieren. Neben der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) wurde der entsprechende EstA-Überexpressionsstamm (WT *estA*<sup>++</sup>) betrachtet, in dem das *estA*-Gen auf dem Plasmid pBBR1MCS kloniert (Wilhelm, 1999) konstitutiv im *P. aeruginosa* PAO1 exprimiert wird. Als Kontrolle diente der *P. aeruginosa* PAO1 mit dem Leervektor pBBR1MCS (WT LV). Die Rhamnolipide wurden nach 48 h Inkubation aus den Kulturüberständen extrahiert (2.23.1) und die RL-Menge mit dem Orcinoltest bestimmt (2.23.2). Dieser photometrische Nachweistest für 3-Dexoxy-Hexosen

**Abb. 10: Rhamnolipidmenge in den Kulturüberständen von *P. aeruginosa*.** In den KÜ der *P. aeruginosa*-Stämme: Wildtyp (WT), *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), Leervektorkontrolle (WT LV) und EstA-Überexpression (WT *estA*<sup>++</sup>) wurde mittels Orcinoltests die Rhamnolipidmenge bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf unabhängiger Experimente.



(Rhamnose) stellt eine indirekte Möglichkeit für die Quantifizierung der Rhamnolipide dar (Chandrasekaran & Bemiller, 1980). Das Diagramm, das sich aus den Messungen der Orcinoltests ergibt (Abb. 10), veranschaulicht den Einfluss von EstA auf die RL-Anwesenheit im Kulturüberstand. Der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und die Leervektorkontrolle (WT LV) weisen 0,4 g/l Rhamnolipid auf. Die Deletion von *estA* ( $\Delta estA$ ) führt zu einer gravierenden Abnahme der extrazellulären RL-Menge, wohingegen deren Überexpression ( $estA^{++}$ ) zu dem konträren Resultat, nämlich einer deutlichen Erhöhung der RL-Menge um mehr als das Vierfache führt.

Die extrahierten Rhamnolipide können mit der dünnschichtchromatographischen Auftrennung näher charakterisiert werden (2.23.3). Das Di-RL (RL-2,2) wird auf der Kieselgelplatte stärker retiniert als das Mono-RL (RL-1,2). Daraus ergeben sich die R<sub>f</sub>-Werte (related to front bzw. Retentionsfaktor) von 0,7 für das hydrophilere Mono-RL und 0,3 für das Di-RL.



**Abb. 11: Dünnschichtchromatographie der Rhamnolipide aus den Kulturüberständen von *P. aeruginosa* PAO1.** Rhamnolipide aus 48h-Kulturüberständen der *P. aeruginosa* Rhamnosyltransferase-Mutanten Rhamnosyltransferase A-Mutante (PAO1-*rhlA*) und Rhamnosyltransferase C-Mutante (RTII-2) (A), sowie von *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp (WT), *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), EstA-Überexpressionsstamm ( $estA^{++}$ ) und Leervektorkontrolle (LV) (B) wurden extrahiert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit Orcinol-Farbbreuzung detektiert. Als Standard gelten analysierte RL aus *P. aeruginosa* (Zähringer, FZB).

Die dünnschichtchromatographische (DC) Auftrennung der Rhamnolipide aus den Überständen von *P. aeruginosa* PAO1 (WT), *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), EstA-Überexpressionsstamm (WT  $estA^{++}$ ) und dem Stamm der Leervektorkontrolle (WT LV) ist in Abbildung 11 dargestellt. Zur Kontrolle wurden die Rhamnosyltransferasemutanten PAO1-*rhlA* ( $\Delta rhlA$ ) und RTII-2 ( $\Delta rhlC$ ) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Das Fehlen der Acetyltransferase RhlA, die für die Mono-RL-Synthese essentiell ist (Déziel *et al.*, 2003),

führt wie erwartet zur Abwesenheit von Rhamnolipid. Dagegen produziert die in der Rhamnosyltransferase C ( $\Delta rhIC$ ) deletierte Mutante, die die Übertragung einer zweiten Rhamnose auf das Mono-RL synthetisiert, ausschließlich das Mono-RL. Die Deletion von *estA* führt zu einer nicht detektierbaren Menge an Rhamnolipid, die Mono- und Di-RL-Menge in dem EstA-Überexpressionsstamm (WT *estA*<sup>++</sup>) ist hingegen deutlich gegenüber der *P. aeruginosa* WT-Menge erhöht. Zusammenfassend kann man eine Korrelation zwischen der *estA*-Anwesenheit und der Rhamnolipidanwesenheit im Kulturüberstand feststellen.

Eine Beteiligung der Esterase EstA an der Spaltung der Ester-verbundenen Fettsäuren des Lipidanteils des Rhamnolipids ist nicht möglich. Falls das extrazelluläre Rhamnolipid als Substrat für die in der äußeren Membran sitzende Esterase EstA dienen sollte, würden sich in einer *estA*-Negativmutante die im Kulturüberstand befindenden Rhamnolipide im Übermaß anhäufen müssen. Die RL-Menge im Kulturüberstand der *estA*-Negativmutante ist jedoch drastisch minimiert. Daher scheint dieser Reaktionsschritt nicht von EstA katalysiert zu sein.

Im Weiteren sollten die durch Rhamnolipid bedingten virulenzassoziierte Eigenschaften für den Stamm der *estA*-Negativmutante untersucht werden, um festzustellen, ob das Fehlen von Rhamnolipid allein und vor Allem direkt auf die *estA*-Deletion zurückzuführen ist. Bedingt die *estA*-Deletion die Rhamnolipidproduktion, so sind die RL-abhängigen Effekte ebenfalls in der *estA*-Negativmutante verändert.

### **3.3. Untersuchung der Beweglichkeit von *P. aeruginosa* PAO1 und der *estA*-Negativmutante**

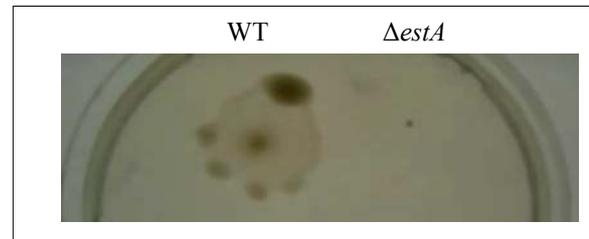
Für *P. aeruginosa* werden drei unterschiedliche Beweglichkeitsformen beschrieben: das Schwimmen, „twitching motility“ und das Schwärmen. Bei einer sessilen Lebensweise von *P. aeruginosa* kann das extrazellulär vorliegende Rhamnolipid die Reibung zwischen der Zelle und dem Habitatsuntergrund verringern und somit als eine art „Schmierstoff“ die Beweglichkeit der Mikroorganismen auf Oberflächen unterstützen. Dies ist für das Schwärmen von *P. aeruginosa* bereits beschrieben worden (Déziel *et al.* 2003).

#### **3.3.1. Untersuchung des Rhamnolipid-abhängigen Schwärmens**

Als Biodetergenz reduziert das Rhamnolipid nicht nur die Oberflächen- sondern auch die Grenzflächen-Spannung zwischen Schichten unterschiedlicher Polarität. Für die Bewegung auf semisoliden Oberflächen ist das Schwärmen zuständig, welches eine Flagellum-, und Typ

IV Pilli-abhängige Bewegung darstellt. Es wurde bereits beschrieben, dass das Rhamnolipid für diese Beweglichkeitsform eine essentielle Rolle spielt (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.* 2003). Der Einfluss der *estA*-Deletion auf das Schwärmen sollte im Folgenden untersucht werden.

**Abb. 12: Schwärmen von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ).** Einzelkolonien der Stämme wurden auf eine 0,5 % Schwärm-Agarplatte mit 0,05 % Glutamat als einzige N-Quelle gepickt und ü.N. bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist eine repräsentative Platte aus fünf voneinander unabhängigen Ansätzen.



Einzelkolonien des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante wurden auf die Schwärmplatten (2.4) gepickt und ü.N. bei 30 °C inkubiert. Das Ergebnis in Abbildung 12 zeigt das Schwärmen des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) sowie das Fehlen der Schwärmbewegung für die *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ).

### 3.3.2. Untersuchung von „twitching motility“ und Schwimmen

Aus Gründen der Vollständigkeit sollten die beiden anderen Beweglichkeitsformen des Schwimmens und „twitching motility“ für *P. aeruginosa* PAO1 WT und *estA*-Negativmutante untersucht werden (2.4). Bislang wurde kein Zusammenhang zwischen der RL-Menge und diesen beiden Beweglichkeitsarten beschrieben.



**Abb. 13: Schwimmen und „twitching motility“ von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ).** Einzelkolonien der Stämme wurden auf eine Schwimm-, und „twitching motility“-Agarplatte, mit der entsprechenden Agarkonzentration von 0,3 und 1,5 % gepickt und ü.N. bei 30°C inkubiert. Dargestellt sind repräsentativ Platten, die in fünf voneinander unabhängigen Ansätzen vergleichbar aussahen.

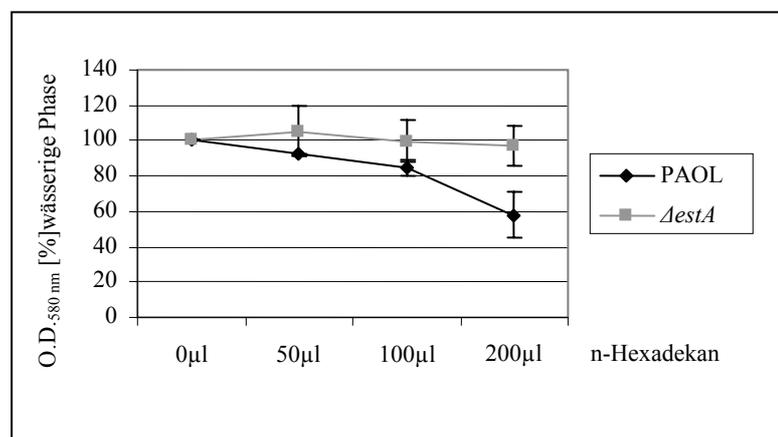
Die Schwimm-, und „twitching motility“-Platten in Abbildung 13 zeigen, dass in Gegensatz zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT), der beide Beweglichkeitsformen bewerkstelligt, die *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) keine der beiden Bewegungsarten ausführen kann.

### 3.4. Untersuchung der Zelloberflächen-Hydrophobizität von *P. aeruginosa* PAO1 und der *estA*-Negativmutante

Neben dem extrazellulären Rhamnolipid kann die Beschaffenheit der Zelloberfläche einen Einfluss auf die Beweglichkeit von *P. aeruginosa*-Zellen haben. Das RL-Vorkommen wird mit einer veränderten Zelloberfläche, nämlich der Erhöhung der Hydrophobizität, assoziiert (Zhang & Miller, 1994; Herman *et al.*, 1997; Chen & Zhu, 2005). Der dafür verantwortliche Mechanismus soll eine RL-induzierte Freisetzung eines LPS-Anteils von der Zelloberfläche sein, mittels welcher der direkte Kontakt der Zelle zum hydrophoben Substrat ermöglicht wird (Al-Tahhan *et al.* 2000, Noordmann & Janssen 2002). Durch diesen direkten Kontakt ist die Zell-Aufnahme und Verwertung des Substrates für den Organismus gesichert.

Durch unterschiedliche Zusammensetzung der Zellhülle verändert sich die Beschaffenheit und somit die physikalische Eigenschaft der Zelloberfläche. Die Zelloberflächenbeschaffenheit von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante wurde mit dem MATH (microbial adhesion to hydrocarbon)-Test untersucht (2.26), welcher eine bekannte Methode darstellt, um Zelloberflächen-Hydrophobizität und Zellanheftung zu untersuchen (Rosenberg 1984).

**Abb. 14: Adhäsion von Zellen der *P. aeruginosa* Stämme PAOL (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) an n-Hexadekan zur Untersuchung der Oberflächen-Hydrophobizität.** Jeweils 1,2 ml Bakterien-suspension ( $O.D._{580nm} = 0,7$ ) wurden mit 50, 100 bzw. 200  $\mu$ l n-Hexadekan gemischt. Nach 15 min wurde die Trübung ( $O.D._{580nm}$ ) der wässrigen Phase, in der die nicht an das n-Hexadekan bindende Zellen verblieben sind, gemessen. Der Ansatz ohne n-Hexadekan-Zugabe wurde gleich 100% gesetzt. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.



Der Tests beruht auf der Bindung der Zellen an das flüssige, hydrophobe n-Hexadekan. Vermischt man die Zellen mit einer steigenden Menge an diesem Kohlenwasserstoff, lässt das Gemisch ruhen und die Komponenten miteinander interagieren, so kann in der wässrigen Phase mittels Messung der optische Dichte ( $O.D._{580nm}$ ) die Menge der dort verbliebenen Zellen festgestellt werden. Zellen, die nicht mit n-Hexadekan interagieren, verbleiben in der wässrigen Phase und gelten als hydrophil. Im Gegensatz dazu gehen Zellen, die eine

Bindung mit n-Hexadekan eingegangen sind, in die organische Phase des Gemisches über und gelten als hydrophob. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse des MATH-Tests vom *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante. Die Zelloberflächen der beiden Stämme haben einen unterschiedlichen Charakter bezüglich der Hydrophobizität. Während der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) eine hydrophobe Beschaffenheit der Zelloberfläche aufweist, zeigt die *estA*-Negativmutante eine hydrophile äußere Zellhülle.

### 3.5. EstA Einfluss auf die Biofilmbildung

Die Zelloberflächenbeschaffenheit spielt eine große Rolle sowohl bei der Beweglichkeit der Mikroorganismen auf Oberflächen als auch bei deren Anheftung an das Substratum (Oberfläche). Während die Beweglichkeit der Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung für das Aufsuchen neuer, geeigneter Lebensräume ist, schafft das Anheften der Zellen die Voraussetzung für die Besiedlung dieser Räume. Die natürliche Lebensweise der meisten in der Natur vorkommenden Bakterien ist die einer multizellulären Gemeinschaft, des Biofilms (Costerton *et al.*, 1995; 1999). Neben der Beweglichkeit und Anheften der Zellen an Oberflächen, spielt das Rhamnolipid eine entscheidende Rolle in der Biofilmorganisation. Dem Biodetergenz wird die Aufgabe zugeschrieben, Kanäle für den zuführenden und abführenden Metabolittransport in der Biofilmstruktur frei zu halten und für die Ablösung der Zellen aus der Biofilmgemeinschaft verantwortlich zu sein (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003; Boles *et al.*, 2005).

Es konnte bislang gezeigt werden, dass sowohl die Rhamnolipidproduktion als auch die Beweglichkeit der *estA*-Negativmutante gegenüber dem *P. aeruginosa* WT stagniert ist und die Zelloberflächen-Polarität unterschiedlich ist. Die Beteiligung beider Prozesse an der Bildung und Struktur von Biofilm lässt eine gegenüber dem *P. aeruginosa* WT veränderte Architektur des Biofilmes in der *estA*-Negativmutante vermuten. Dies sollte im Folgenden untersucht werden.

#### 3.5.1. Biofilmuntersuchung in Durchflusszellen

Für die Untersuchung der Biofilme in den Durchflusszellen wurden die Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und *estA*-Negativmutante mit dem *gfp* („green fluorescent protein“)-markiert (2.12). Der genomische GFP-Marker, der in *Aequorea victoria* für ein grün fluoreszierendes Protein kodiert, wurde mittels Tn7-Transposons an eine intergenetische

Region in das Genom von der *estA*-Negativmutante integriert (Koch *et al.*, 2001). Er ermöglicht die kontinuierliche Beobachtung der Biofilme mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM). Die Kultivierung der Biofilme in Durchflusszellen (2.24.1.a) erfolgte für 72 h, wobei in Abständen von 24 h die Biofilmbeschaffenheit mit der CLSM analysiert wurde (2.24.2.a). Die Kultivierung und die Analyse der Biofilme mittels CLSM wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Wingender (Biofilm Centre, Abteilung Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt.

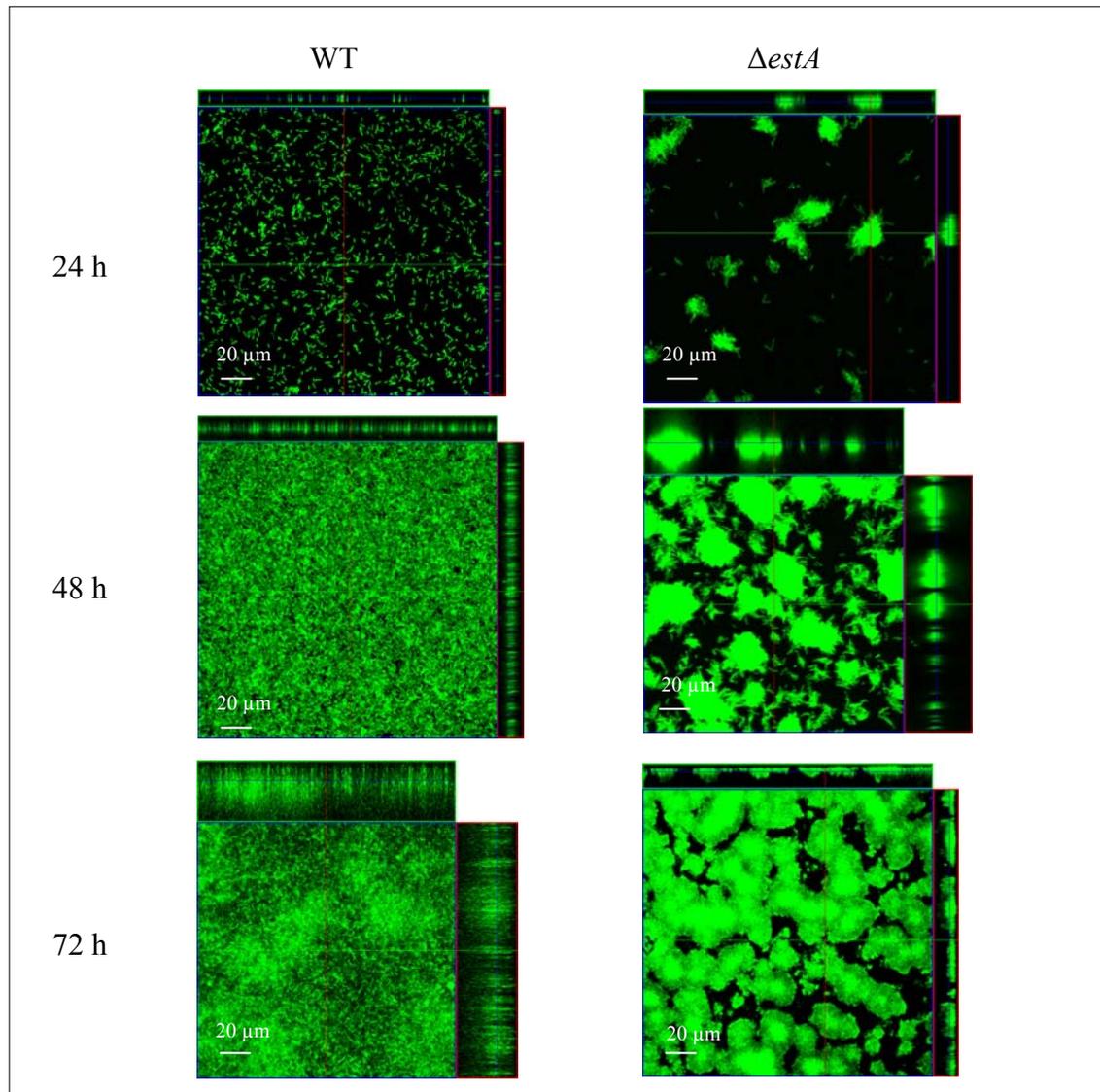
Die Biofilm-Kammern wurden stets mit der gleichen Menge an Zellen ( $5 \cdot 10^7$ ) beimpft und eine peristaltische Pumpe sorgte für eine konstante Nährstoffzufuhr. Das 30°C warme PPGAS- bzw. APM- Medium wurde an die Durchflusszellverhältnisse angepasst (d.h. die Nährstoffe wurden entsprechend reduziert (2.4)). Jeder Stamm wurde dabei in drei bis vier voneinander unabhängigen Versuchen analysiert. Die Biofilmstruktur der Stämme in den beiden Minimalmedien ähnelte einander.

#### **a. Einfluss der *estA*-Deletion auf die Biofilmbildung**

In den CLSM-Aufnahmen sind zwischen *P. aeruginosa* PAO1 und der *estA*-Negativmutante deutlich auffallende Unterschiede in allen Phasen der Biofilmbildung sichtbar (Abb. 15). Die plane, flache Biofilmoberfläche des *P. aeruginosa* PAO1 unterscheidet sich eindeutig von der in Aggregate strukturierten unebenen, ebenso hohe Biofilmstrukturen als auch unbesiedelte Flächen aufweisenden Biofilmarchitektur der *estA*-Negativmutante.

Der optischen Beurteilung der Biofilme folgt in Abbildung 16 die quantitative Auswertung der Biofilme bezüglich der Biomasse, des Ausmaßes der Oberflächenbelegung und der maximalen Biofilmdicke mit Hilfe des Computerprogramms „COMSTAT“ (Heydorn *et al.*, 2000), die der optischen Diagnose entspricht. Zu dem Zeitpunkt von 24 h verteilen sich die geringen Biomassen des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante auf eine unterschiedliche Weise. Der WT belegt einen prozentuell höheren Anteil an der Substratoberfläche als die *estA*-Negativmutante. Das bedeutet, dass sich der Biofilm planer und homogener auf der Oberfläche verteilt als im Fall von der *estA*-Negativmutante. Nach 48 h steigt für die *estA*-Negativmutante sowohl die Biofilmmasse als auch die Biofilmdicke bedeutend an und liegt deutlich über der des *P. aeruginosa* WT. Parallel dazu ist die prozentuale Oberflächenbelegung in Relation zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT) geringer. Dies bedeutet, dass der Biofilm der *estA*-Negativmutante die anfängliche Aggregat-Struktur mit weit voneinander entfernt liegenden Zellanhäufungen und dem dazwischen liegenden

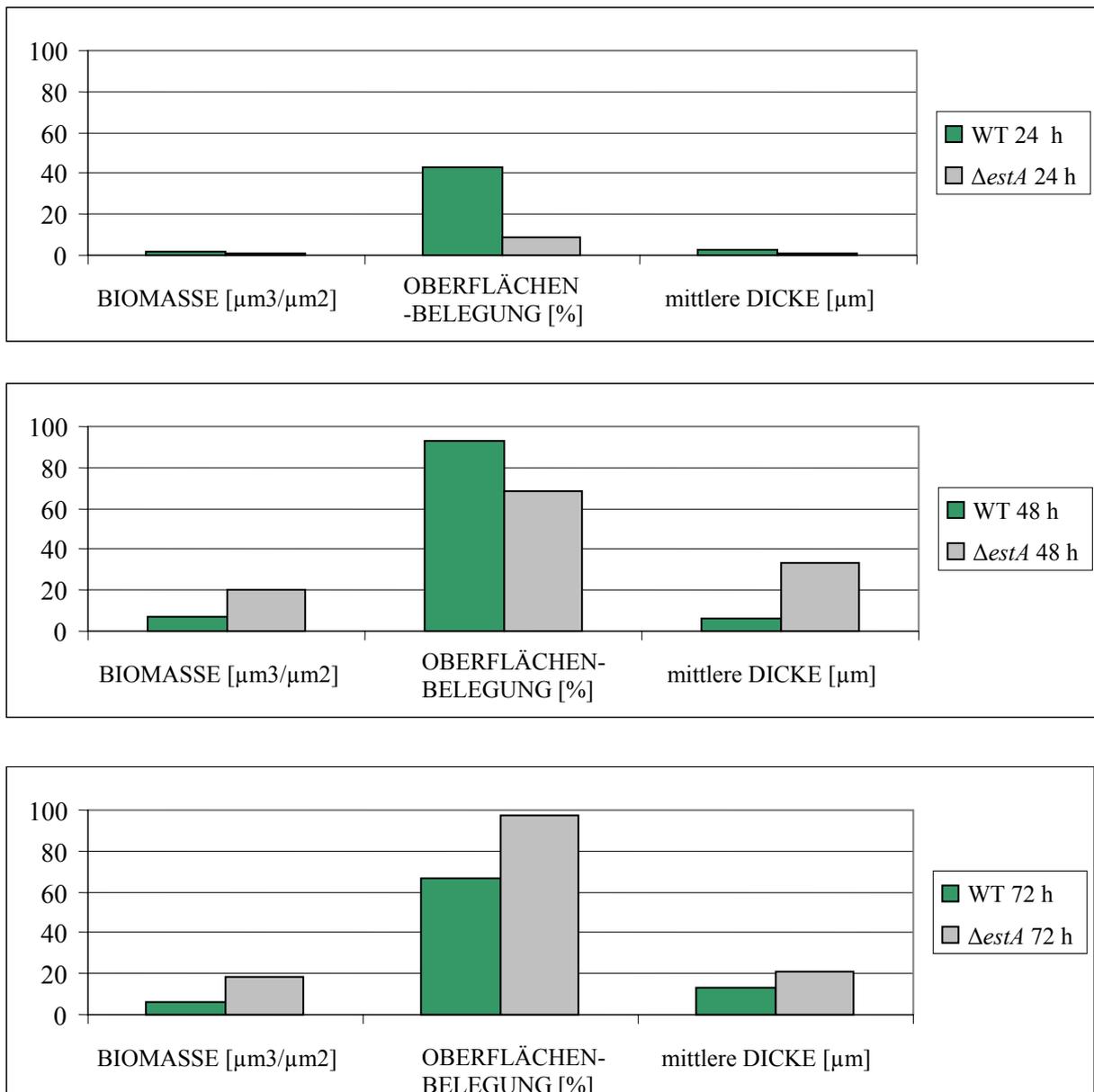
unbesiedelten Raum beibehält. Die in Folge des Zellwachstums entstehende Biomasse lagert sich auf die bereits bestehenden Zellkolonien und führt zum Höhenwachstum des Biofilms. Der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) hingegen erfährt nur eine geringe Zunahme an Biomasse und einen enormen Anstieg der prozentualen Oberflächenabdeckung. Dies deutet auf das Besiedeln freier Zwischenräume des planen Biofilmes, welcher in Folge dessen dichter wird, jedoch flach bleibt.



**Abb. 15: CLSM-Aufnahmen von Biofilmen des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) in Durchflusszellen.** Die Kultivierung der Biofilme erfolgte über 72 h bei 30 °C unter konstantem Medienstrom von 20 ml/h in APM-Medium. Die *gfp*-markierten Zellen wurden nach 24, 48 und 72 h mittels CLSM visualisiert. Skala 20 µm.

Zu dem Zeitpunkt von 72 h ist für die *estA*-Negativmutante keine besondere Veränderung der Biofilmmasse zu verzeichnen, die Dicke des Biofilmes ist allerdings zurückgegangen, während die Oberflächenbelegung deutlich gestiegen ist. Die Biofilmdicke stagniert auf

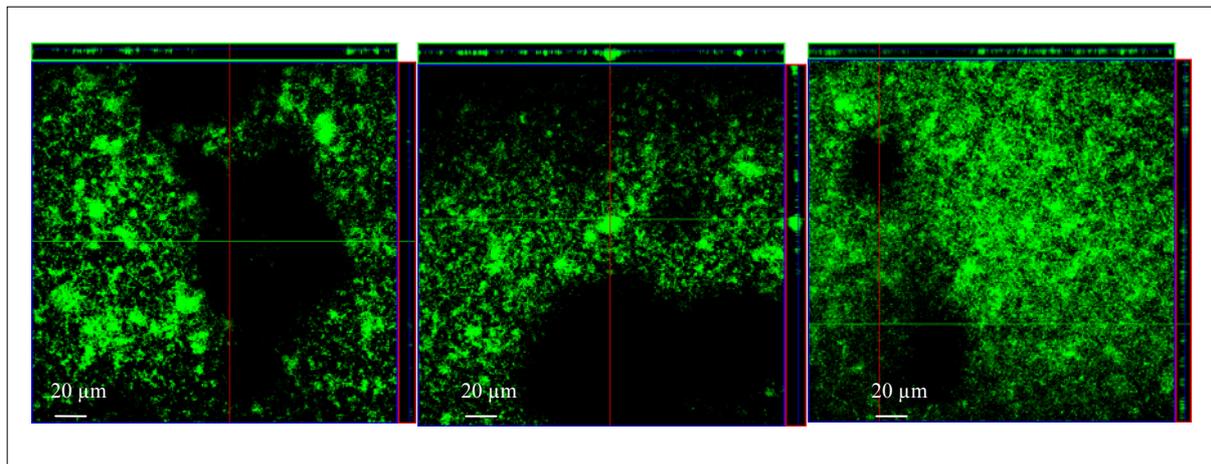
Kosten des Füllens des Raumes zwischen den Zellaggregaten. Während für den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) die Biomasse unverändert bleibt, nimmt die Oberflächendeckung ab und die Biofilmdicke zu. Dies bedeutet, dass der Biofilm insgesamt aufgelockert wird und an Höhe gewinnt. Insgesamt ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem planen homogenen *P. aeruginosa* WT-Biofilm und dem Mikrokolonien aufweisendem *estA*-Negativmutante Biofilm zu verzeichnen.



**Abb. 16:** Die Quantifizierung der Biofilme von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) mit dem Computerprogramm „COMSTAT“. Die Biomasse, die prozentuale Oberflächenbelegung und die mittlere Biofilmdicke wurden exemplarisch für die CLSM-Aufnahmen der Biofilme aus Abbildung 14 berechnet.

## b. Einfluss der EstA-Überexpression auf die Biofilmbildung

Während die Auswirkung der Deletion von Esterase EstA auf die Biofilmarchitektur von *P. aeruginosa* PAO1 im einzelnen beschrieben wurde, sollte im nächsten Schritt die Überexpression von EstA betrachtet werden. Als Überexpressionsstamm wurde der *P. aeruginosa* PAO1 Stamm mit dem Vektor pBBX<sup>+</sup> (*estA*<sup>++</sup>) gewählt. Bei diesem Vektor handelt es sich um das pBBR1MCS Plasmid mit dem *estA*-Gen unter Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors. Dieser EstA-Überexpressionsstamm hat die Besonderheit eine gegenüber dem *P. aeruginosa* PAO1 (WT) drastisch erhöhte Menge an Rhamnolipid zu synthetisieren (vgl. Abb. 10). Die Biofilmbeschaffenheit des EstA-Überexpressionsstammes entsprach zu dem Zeitpunkt von 24 und 48 h weitestgehend der des *P. aeruginosa* PAO1



**Abb. 17: CLSM-Aufnahmen des reifen Biofilms von EstA-Überexpressionsstamm in *P. aeruginosa* PAO1 in Durchflusszellen.** Dargestellt sind drei unabhängige Biofilmaufnahmen von dem EstA-Überexpressionsstamm *P. aeruginosa* (WT *estA*<sup>++</sup>) nach 72 h Inkubation in PPGAS- bzw. APM-Medium.

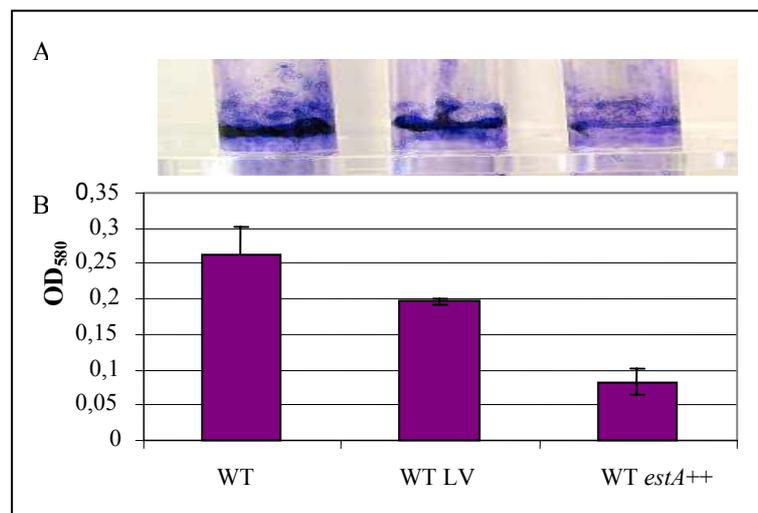
(WT) und des WT mit dem Leervektor (LV) (ohne Abb.), wies allerdings nach 72 h Inkubation deutliche Unterschiede in den CLSM-Aufnahmen auf. Diese Aufnahmen (Abb. 17) des reifen Biofilms zeigten auffällige, mitten im Biofilm liegende, von Zellen unbesiedelte Flächen. Diese Flächen variierten in ihrer Größe und Form und lagen diffus in dem planen und aufgelockertem Biofilm. Diese zellfreie Flächen deuten auf Zellverbände, die sich von dem Substratum abgelöst haben, hin.

### 3.5.2. Kristallviolett-färbung der reifen Biofilme in Reagenzgläsern

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von Biofilmanheftung ist die Kristallviolett-färbung von Biofilm (2.24.2b). Die zu untersuchenden Kulturen wuchsen 24 h in

Reagenzgläsern, anschließend wurde die Kulturflüssigkeit verworfen und der an dem Reagenzglas haftende Biofilm mit dem Farbstoff gefärbt. Der kristallviolettgefärbte Biofilm wurde mittels Ethanol vom Reagenzglas abgelöst und anschließend zur Mengequantifizierung die optische Dichte der verdünnten Proben bei 580 nm gemessen. Die Kristallviolettfärbung der reifen Biofilme an den Reagenzgläsern ist in Abbildung 18A dargestellt. Der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und die Leervektorkontrolle (WT LV) zeigen einen ähnlich stark ausgeprägten kristallviolettgefärbten Biofilmrand, wohingegen der Biofilm des *estA*-Überexpressionsstammes (WT *estA*<sup>++</sup>) einen deutlich geringeren Biofilmrand aufweist.

**Abb. 18: Kristallviolettfärbung und Quantifizierung der Biofilme von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) auf Reagenzgläsern.** In drei unabhängigen Versuchen wurde der 24 h alte Biofilm der Stämme *P. aeruginosa* PAO1 (WT), Leervektorkontrolle (WT LV) und EstA-Überexpression (WT *estA*<sup>++</sup>) erst mit Kristallviolett gefärbt, fotografiert (A) und dann mit Ethanol vom Reagenzglas entfernt. Die Quantifizierung erfolgte über die Messung der O.D.<sub>580nm</sub> für einer 10<sup>-2</sup> Verdünnung (B).



Die Quantifizierung der an das Reagenzglas haftenden Zellen der Biofilme ist in Abbildung 18B dargestellt. Der Biofilm des EstA-Überexpressionsstammes besteht aus weniger als der Hälfte der Biofilmzellen, die den *P. aeruginosa* PAO1 WT-Biofilm ausmachen. Diese Ergebnisse bestätigen die CLSM-Aufnahmen (Abb. 17) der vermehrten Zellablösung der EstA-überexprimierenden Zellen von einem reifen Biofilm.

Der Phänotyp der *estA*-Negativmutante korreliert mit den RL-abhängigen Eigenschaften eines Stammes, daher scheint die direkte Beteiligung an der Produktion von Rhamnolipid möglich.

### 3.6. Einfluss der Esterase EstA auf das „Quorum sensing“-System von *P. aeruginosa*

Einige der bisher beschriebenen Phänotypen der *estA*-Negativmutante, zu denen die Rhamnolipidproduktion, Schwärmen oder Biofilmbildung gehören, sind „Quorum sensing“ (QS) abhängig reguliert (O'Toole & Kolter, 1998; Van Delden & Iglewski, 1998; Köhler *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2003; Déziel *et al.*, 2003).

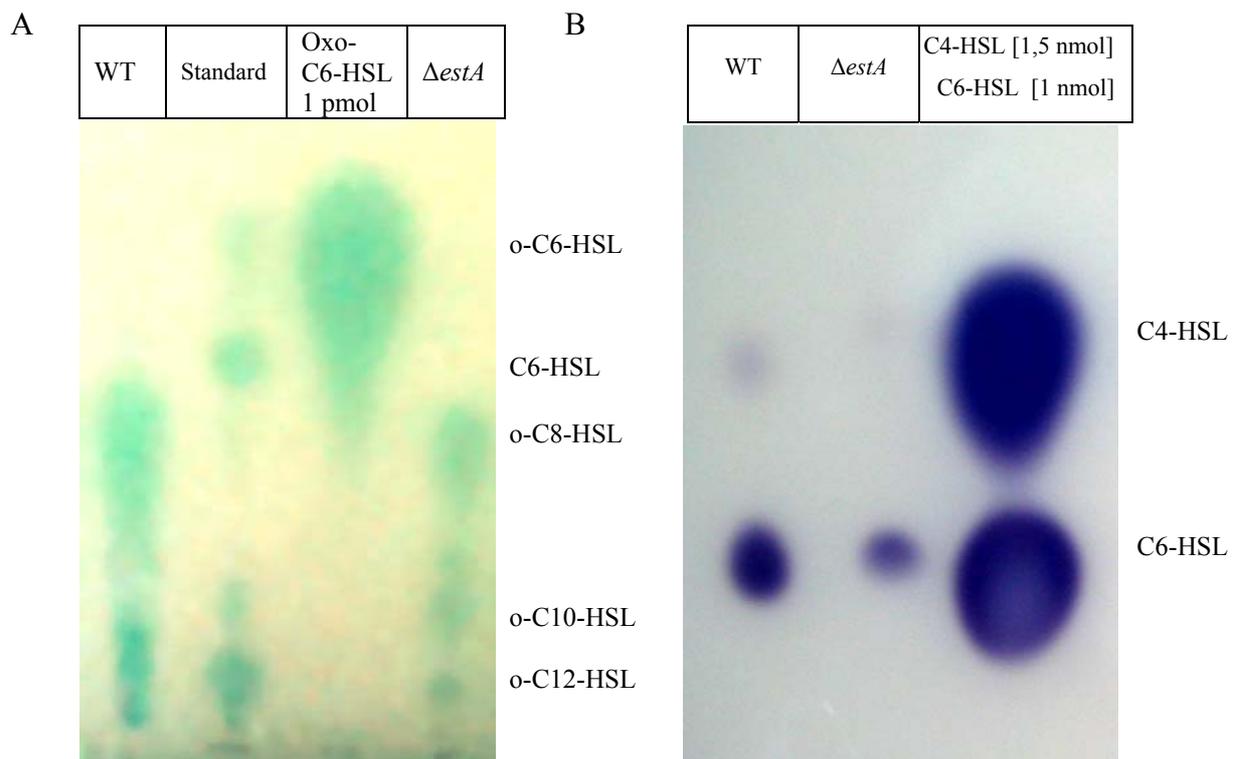
Um zu untersuchen, ob der gegenüber dem *P. aeruginosa* PAO1 (WT) veränderte Phänotyp der *estA*-Negativmutante auf die drastische Reduktion der Rhamnolipide in Folge der *estA*-Deletion zurückzuführen ist, oder auf eine durch *estA*-Deletion bedingte Veränderung in einer höheren Ebene, wie der des QS-Systems zurückzuführen ist, wurden im Folgenden die Signalmoleküle von *P. aeruginosa* WT und der *estA*-Negativmutante analysiert.

#### 3.6.1. Las und Rhl-System

Von den *P. aeruginosa* Las und Rhl-Systemen werden hauptsächlich die Signalmoleküle 3-oxo-C12-HSL und C4-HSL produziert. In geringer Menge kommen auch 3-oxo-C6-HSL und C6-HSL, sowie C8-HSL und C10-HSL vor. Es gibt spezielle Sensorbakterien, mittels derer Homoserinlacton Signalmoleküle detektiert werden können. Zum einen ist es *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), mit dem hauptsächlich langkettige *N*-Acyl-L-Homoserinlacton (AHL)-Moleküle (C12-C6) von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden können, zum anderen *Chromobacterium violaceum* CV026, das vor allem kurzkettige HSL-Moleküle (C<sub>6</sub>-HSL und C<sub>4</sub>-HSL) detektiert (McClellan *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1997). Bei beiden Stämmen handelt es sich um AHL-Synthase-Mutanten. Bei Anwesenheit von extern vorliegenden geeigneten AHL-Molekülen reagieren diese Stämme mit der Produktion detektierbarer Substanz. *A. tumefaciens* produziert  $\beta$ -Galaktosidase, wodurch das zusätzlich zur Verfügung gestellte Substrat X-Gal in ein blaues Produkt umgesetzt wird und *C. violaceum* produziert den violetten Farbstoff Violacein.

Um die AHL-Moleküle für den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante zu untersuchen, wurden aus den Überständen von 24h Kulturen vergleichbarer O.D.<sub>580nm</sub> die Signalmoleküle extrahiert (2.27.1), dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (2.27.2) und mit den Sensorbakterien (2.27.3) nachgewiesen. Der Extrakt aus einem Milliliter der Kulturüberstände wurde zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung und Detektion der Signalmoleküle mit dem Sensorbakterium *A. tumefaciens* NTL4 eingesetzt. Die Abbildung 19A zeigt das Vorhandensein an 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C10-HSL und 3-oxo-C8-HSL in *P. aeruginosa* WT und der *estA*-Negativmutante, wobei die *estA*-Negativmutante jeweils eine

nur unwesentlich geringere Menge an diesen Signalmolekülen aufweist. Der Nachweis der kurzkettigen Signalmoleküle aus fünf Millilitern der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* WT und der *estA*-Negativmutante auf der Dünnschichtchromatographieplatte erfolgte mittels *C. violaceum* und ist in Abbildung 19B dargestellt.



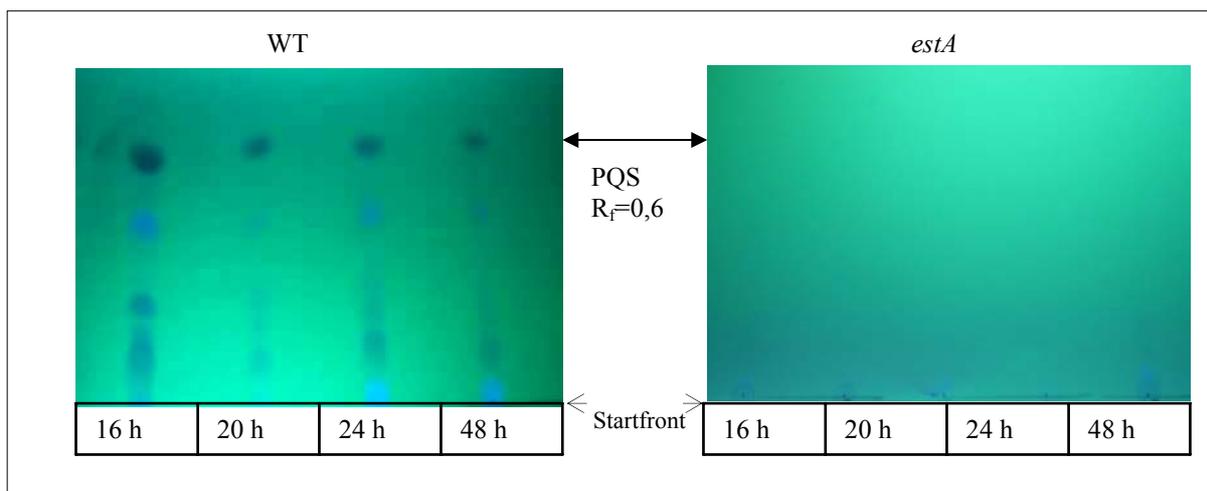
**Abb. 19:** Nachweis der dünnschichtchromatographisch aufgetrennter AHL-Signalmoleküle aus den Kulturüberständen vom *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) mittels der AHL-Sensorstämme *Agrobacterium tumefaciens* und *Chromobacterium violaceum*. Nachweis der langen AHL-Signalmoleküle mit *A. tumefaciens* (A) und der kurzen HSL-Signalmoleküle mit *C. violaceum* (B) aus 24 h-Kulturüberständen. Die Extrakte aus einem (A) bzw. fünf (B) Millilitern der Kulturen vergleichbarer O.D.<sub>580nm</sub> wurden aufgetragen. Exemplarische Darstellung dreier unabhängiger Versuche.

Eine gegenüber dem *P. aeruginosa* WT niedrigere Menge an C6-HSL konnte für die *estA*-Negativmutante detektiert werden. Das Signal für das C4-HSL ist für den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) nur schwach und fehlt für die *estA*-Negativmutante völlig.

### 3.6.2. „Pseudomonas-quinolon“-Signal (PQS)

Das „Pseudomonas-quinolon“-Signal (PQS) ist das dritte Signalmolekül von *P. aeruginosa*, welches in der Hierarchie des QS-Netzwerks oberhalb des Rhl-Systems einzuordnen ist (vgl. Abb. 6). Zu den Zeitpunkten von 16, 20, 24 und 48 h wurden aus je einer Hauptkultur, die vergleichbare optische Dichten aufwiesen, 10 ml Proben abgenommen, aus welchen das PQS

isoliert (2.28.1) und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt wurde (2.28.2). Die dünnschichtchromatographisch aufgetrennten PQS wurden mittels des  $R_f$ -Wertes von 0,6 (Calfée *et al.*, 2001) und der anschließenden ESI-Massenspektroskopie-Analyse der in Frage kommenden Spots identifiziert. Die Dünnschichtchromatographieplatten sind in Abbildung 20 dargestellt und zeigen für den *P. aeruginosa* WT das Vorhandensein einer höheren Menge an PQS zum Zeitpunkt von 16 h gegenüber vergleichbaren, niedrigeren Mengen an PQS zu



**Abb. 20: Dünnschichtchromatographischer Nachweis vom „Pseudomonas-quinolon“-Signal (PQS) im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ).** Aufgetragen wurden PQS-Ethylacetat-Extrakte aus jeweils 10ml Kulturüberstand einer 400 ml Kultur einer vergleichbaren optischen Dichte nach 16, 20, 24 und 48h Inkubation. Die Visualisierung der aufgetrennten Proben erfolgte unter UV-Licht. Das Ergebnis stellt eine 3-fache Reproduktion dar.

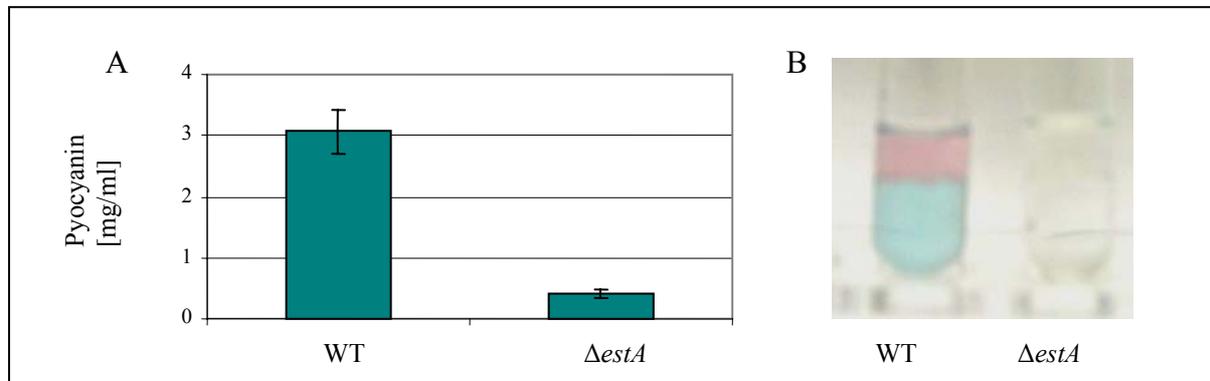
den Untersuchungszeitpunkten von 20, 24 und 48 h. Die *estA*-Negativmutante zeigt zu keinem dieser Zeitpunkte der Kultivierung das Vorhandensein an PQS.

#### a. EstA Einfluss auf das PQS-regulierte Pyocyanin

Nachdem für die *estA*-Negativmutante eine PQS-Defizienz festgestellt wurde, sollten als indirekte Bestätigung des Befundes die PQS-abhängigen Prozesse in der Zelle untersucht werden. Dazu gehört die Pyocyaninproduktion. Die Synthese dieses Farbstoffes steht unter der strikten Kontrolle von PQS (Diggle *et al.*, 2003).

Ein weiterer auffälliger Phänotyp für die *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) ist das Fehlen der blau-grünen Färbung der Kultur in PPGAS-Medium, die auf das blaue Pigment Pyocyanin zurückzuführen ist. Pyocyanin kann mit Hilfe von Chloroformextraktion und einer Reextraktion mit HCl in einer 24 h Kultur quantifiziert werden (2.25). Abbildung 21B zeigt die Salzsäure-Extrakte von Pyocyanin für den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und die *estA*-

Negativmutante (O.D.<sub>580nm</sub> 2,3-2,5). Während der WT den blau-grünen Farbstoff aufwies, war diese Phase für die *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) farblos. Die Quantifizierung der Pyocyanin-



**Abb. 21: Pyocyaninproduktion von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ).** Aus 24h inkubierten Kulturen wurde das Pyocyanin extrahiert und der HCl-Reextrakt bei 520 nm spektralphotometrisch gemessen. Die Pyocyaninmenge wurde ermittelt und in mg/ml Kulturüberstand angegeben (Kurachi, 1958) (A). Bilder der HCl-Extrakte; das blaue Pigment Pyocyanin befindet sich in der Unterphase (B)

menge erfolgte mittels Messung der Absorption der Salzsäure-Extrakte bei 520 nm und Berechnung der Pyocyaninmenge in mg pro ml Kultur (Abb. 21A) und spiegelt die optische Darstellung wieder. Die *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) produziert im Gegensatz zum WT nur kaum nachweisbare Mengen an Pyocyanin. Die Pyocyaninmenge der *estA*-Negativmutante von 0,41 mg/ml entspricht nur einem Siebtel der in *P. aeruginosa* PAO1 (WT) detektierten Menge (3,1 mg/ml).

### b. EstA Einfluss auf die PQS-regulierte Elastase LasB

Das PQS induziert ebenfalls die Expression der Elastase LasB (Pesci *et al.*, 1999). Daher sollte die Produktion dieser Elastin-hydrolysierenden Protease näher untersucht werden.

Um die proteolytische Aktivität der Stämme zu vergleichen, wurden zunächst die Protease-Indikatorplatten (auch „skim-milk“-Platten genannt) (2.21.4.a) benutzt. Die Kulturüberstände der *P. aeruginosa* Stämme: WT und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) sowie deren Komplementationsstamm ( $\Delta estA estA^{++}$ ) (EstA-Überexpression in der *estA*-Negativmutante) und die adäquate Leervektorkontrolle ( $\Delta estA LV$ ) wurden auf diesen Platten auf deren hydrolytische Aktivität gegenüber Proteinen untersucht. Die proteolytische Aktivität wird auf diesen Sensorplatten in Form klarer Höfe sichtbar. Das Ergebnis ist in Abbildung 22B zu sehen. Für den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) deutet der klare, große Hof auf die meiste proteolytische Aktivität hin. Während für den Kulturüberstand der *estA*-Negativmutante



erwartet gleich der Mutante. In dem EstA-Komplementationsstamm ( $\Delta estA estA^{++}$ ) konnte die Elastase LasB-Aktivität komplementiert werden, die Aktivität der alkalischen Protease ist jedoch gegenüber den anderen Stämmen deutlich zurückgegangen.

Die Ergebnisse des Zymogramms bestätigen die Resultate der „skim-milk“-Platten. Die *estA*-Deletion führt zu einem signifikanten Rückgang der extrazellulären proteolytischen Aktivität, der auf die drastische Reduktion der Aktivität der Elastase LasB zurückzuführen ist. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der *estA*-Negativmutante kein C4-HSL zu detektieren ist. Die Abwesenheit von PQS konnte zusätzlich durch die drastische Reduktion von Pyocyanin und LasB-Aktivität bestätigt werden.

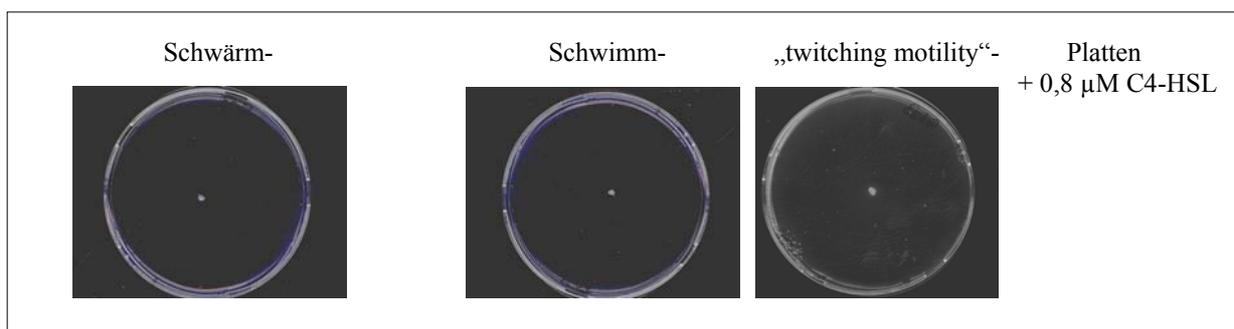
### 3.7. Komplementation der Phänotypen der *estA*-Negativmutante

In den folgenden Experimenten wurde versucht, den Phänotyp der *estA*-Negativmutante zu kompensieren, indem sekundäre Substanzen, die dem Stamm fehlen und welche den Phänotyp zu bestimmen scheinen extern zugegeben werden. Dadurch sollte untersucht werden, ob EstA möglicherweise an der Synthese dieser Substanzen beteiligt ist. Wäre es der Fall, so könnte die externe Zufuhr dieser Substanz den *P. aeruginosa* WT-Zustand in der *estA*-Negativmutante wiederherstellen.

#### 3.7.1. C4-HSL-Zugabe und die Beweglichkeit

Neben der Tatsache der starken Reduktion von PQS in der *estA*-Negativmutante ist das Fehlen des kurzen C4-HSL-Signalmoleküls des Rhl-Systems in der Mutante signifikant. Daher wurde im Folgenden versucht, das Schwärmen der *estA*-Negativmutante, repräsentativ für einen QS-regulierten Prozess, mit der externen Zugabe von C4-HSL zu kompensieren. Damit sollte der Einfluss der *estA*-Deletion auf das Rhl-System, genauer auf die C4-HSL-Produktion, untersucht werden. Würde die *estA*-Deletion das Fehlen dieses Signalmoleküls direkt bedingen, so sollte deren Zugabe den *P. aeruginosa* (WT)-Phänotyp restaurieren.

Während das Schwärmen QS-System reguliert wird und in Korrelation mit dem Rhamnolipid gebracht werden kann, sind das Schwimmen und „twitching motility“ unabhängig vom Rhamnolipid und auch vom „Quorum sensing“-System (Beatson *et al.*, 2002). Aus Gründen der Vollständigkeit wurden jedoch alle drei Formen der Beweglichkeit nach der Zugabe von C4-HS untersucht.



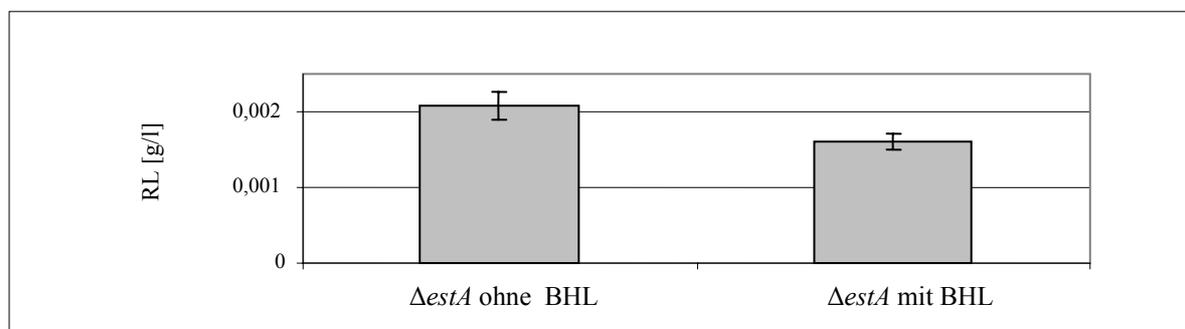
**Abb. 23: Auswirkung der externen C4-HSL-Zugabe auf die Beweglichkeit der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ).** 8  $\mu\text{M}$  C4-HSL wurden in den PPGAS-Agar der Beweglichkeitsplatten zugegeben und die Platten über 24h bei 30°C inkubiert. Dargestellt sind exemplarische Platten, die einer 3-fachen Wiederholung entsprachen.

Die Menge von 2 bis 10  $\mu\text{M}$  C4-HSL wurde dafür in den Agar der Beweglichkeitsplatten hinzugegeben und die Bewegung des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) (ohne. Abb.) und der *estA*-

Negativmutante untersucht. In Abbildung 23 sind für die *estA*-Negativmutante, stellvertretend für alle Ansätze, die Schwimm-, Schwärm-, und „twitching motility“-Platten (2.4) abgebildet, in die 8µM C4-HSL zugegeben wurde. Das von außen zugefügte C4-HSL hat keinen Einfluss auf jegliche Art der Beweglichkeit der *estA*-Negativmutante. Die Beweglichkeit des Mikroorganismus kann durch das Vorhandensein des externen C4-HSL nicht wiederhergestellt werden. Die Beweglichkeit des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) bleibt von C4-HSL-Zugabe ebenfalls unverändert.

### 3.7.2. C4-HSL-Zugabe und die Rhamnolipidproduktion

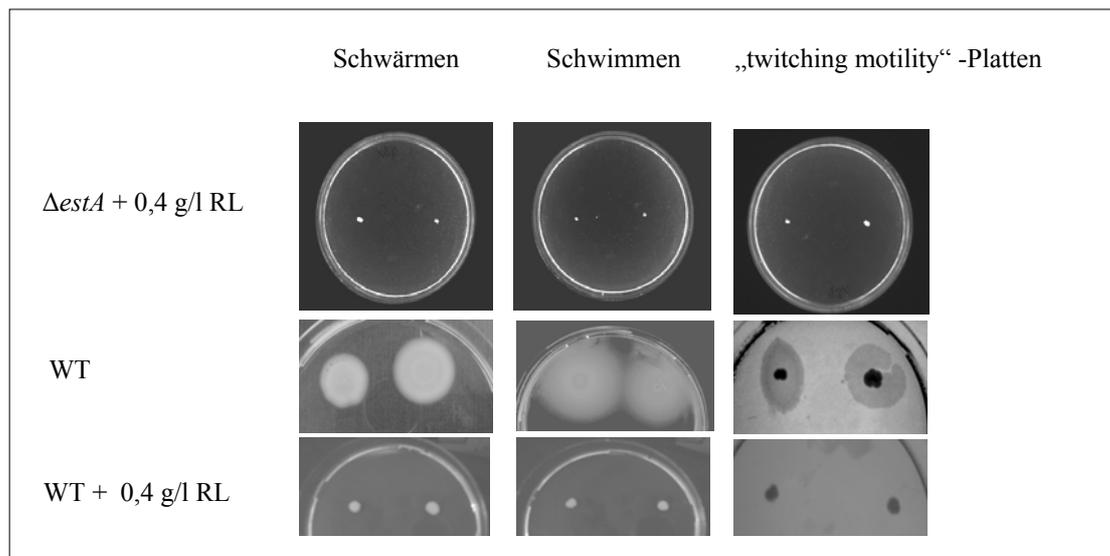
Um den Einfluss von externem C4-HSL auf die Rhamnolipidproduktion in der *estA*-Negativmutante zu untersuchen, wurde der Flüssigkultur des Stammes 8µM C4-HSL zugegeben. Die RL-Menge der *estA*-Negativmutante wurde nach Zugabe von C4-HSL mit dem Orcinoltest (2.23.2) bestimmt und mit der Parallelkultur ohne Signalmolekül-Zugabe verglichen. Abbildung 24 zeigt das Ergebnis, welches eine unveränderte RL-Menge in der *estA*-Negativmutante unabhängig von der Zugabe von C4-HSL zeigt. Dabei sind die absoluten Mengen an Rhamnolipid sehr gering.



**Abb. 24:** Orcinoltest zur Untersuchung der Auswirkung der C4-HSL-Zugabe auf die Rhamnolipidproduktion in der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ). Einer 10 ml PPGAS-Kultur von *estA*-Negativmutante wurden 8µM C4-HSL zugegeben und nach 48 h Kultivierung bei 30°C der photometrische Orcinoltest zur RL-Mengenbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte 5-facher Wiederholung.

### 3.7.3. Rhamnolipidzugabe und die Beweglichkeit

In Anschluss an diese Beobachtung wurde ebenfalls die Auswirkung der Zugabe von Rhamnolipid auf die Beweglichkeit der *estA*-Negativmutante untersucht. Hierfür wurden die Beweglichkeitsplatten mit jeweils der vom *P. aeruginosa* PAO1 (WT) produzierten Menge an Rhamnolipid (0,4 g/l) versetzt.



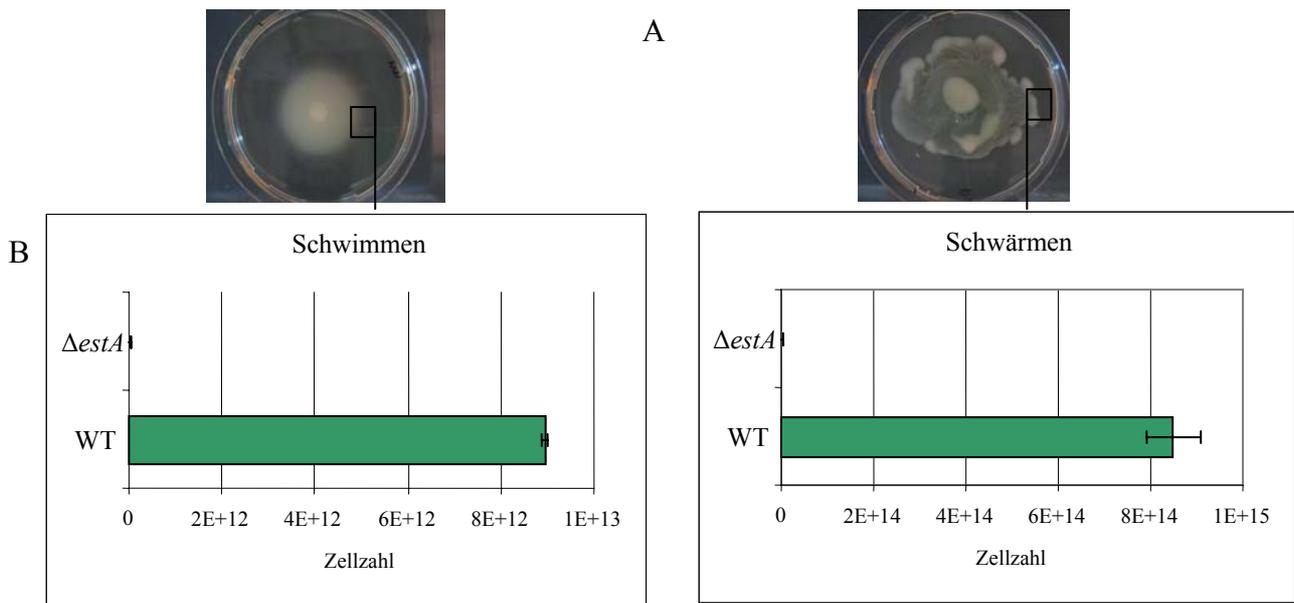
**Abb. 25: Auswirkung der externen Rhamnolipidzugabe auf die Beweglichkeit von der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ).** 0,4 g/l RL wurden in den PPGAS-Agar der Beweglichkeitsplatten zugegeben und die Platten über 24h bei 30°C inkubiert. Dargestellt sind exemplarische Platten, die einer 3-fachen Wiederholung entsprachen.

Das von außen hinzugefügte Rhamnolipid befähigt die *estA*-Negativmutante nicht, sich fort an bewegen zu können. Im Gegensatz dazu wird der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) in Folge von RL-Zugabe unbeweglich. Das Schwimmen, Schwärmen und „twitching motility“ konnte für den *P. aeruginosa* WT nicht detektiert werden.

### 3.7.4. Beweglichkeit der Mischkultur von *P. aeruginosa* PAO1 und der *estA*-Negativmutante

Der nächste Versuch der Wiederherstellung der Schwimm- und Schwärmbewegung basierte auf der Herstellung einer aus dem *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante bestehenden Mischkultur, bei der jeweils die gleiche Zellzahl ( $O.D._{580nm} = 2$ ) beider Stämme eingesetzt wurde. Diese Mischkultur wurde auf Schwimm- und Schwärmagar-Platten (2.4) getropft. Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob der *P. aeruginosa* WT die *estA*-Negativmutante mit einer extrazellulären Substanz versorgen kann, die nötig ist, um das Beweglichkeitspotential der Mutante wiederherzustellen.

Nach der erfolgten Inkubation wurden von den äußeren Ausläufern der Bewegungszonen (Abb. 26A) Abstriche abgenommen und in verschiedenen Verdünnungen auf den stammspezifischen Selektionsplatten (*estA*-Negativmutante trägt  $Str^R/Sp^R$ ) ausplattiert und der Anteil an der *estA*-Negativmutante festgelegt. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 26B dargestellt.



**Abb. 26: Schwimm- und Schwärmbewegung der Mischkultur von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) und die Identifizierung der Zellen der äußersten Bewegungsspuren.** Schwimm- und Schwärmplatte (A). Quantifizierung der am weitesten gewanderten Zellen der Mischkultur mittels Antibiotika-Selektionsplatten (B). Das Ergebnis wurde 3-fach kontrolliert.

Der Anteil von *estA*-Negativmutante an den Zellen, die sich an den äußeren Bewegungsspuren befanden, betrug für das Schwimmen 0,36 % und für das Schwärmen 0,48 %. Die mobilen Zellen sind größtenteils *P. aeruginosa* WT-Zellen und der *estA*-Negativmutante Anteil ist verschwindend gering. Der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) produziert „in vivo“ keine extrazelluläre Substanz, welche der *estA*-Negativmutante erlauben würde sich eigenständig bewegen zu können.

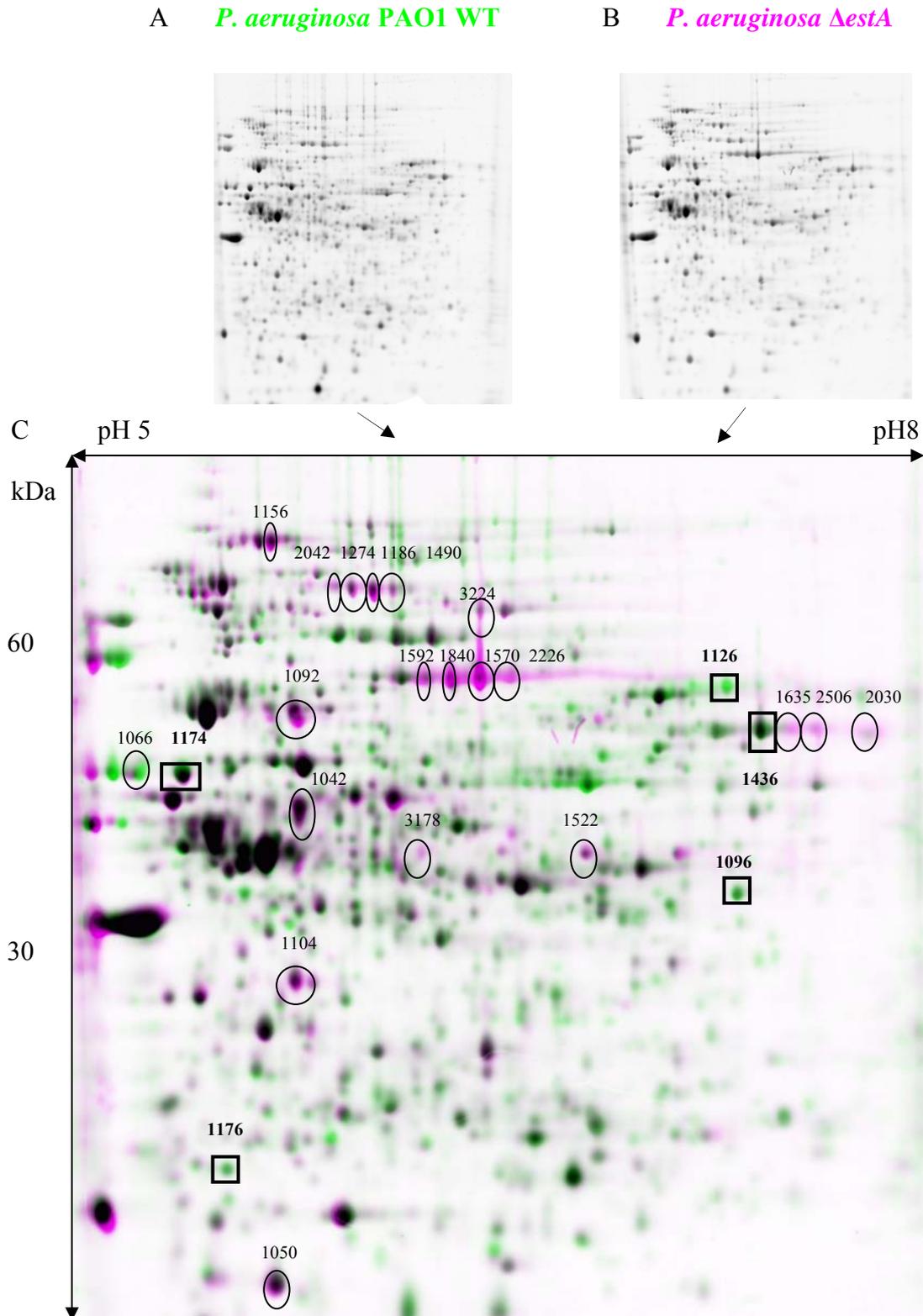
### 3.8. Proteomuntersuchung von *P. aeruginosa* PAO1 und *estA*-Negativmutante

Bislang wurde eine Anzahl an physiologischen Gegebenheiten bzw. Prozessen festgestellt, in den sich die *estA*-Negativmutante von dem *P. aeruginosa* PAO1 (WT) unterscheidet. Betrachtet man die Fülle der diversen Phänotypen der *estA*-Negativmutante und sucht nach einer Erklärung dieser Tatsachen, so kann die 2-D-Gelelektrophorese neue Einsichten bringen. So könnte ein putativer Regulationsmechanismus in der Esterase Negativmutante unterbrochen sein, der mittels 2-D-Gelelektrophorese detektiert werden könnte. Die Proteomuntersuchung der *estA*-Negativmutante sollte im Vergleich zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT) zu neuen Erkenntnissen in diesem Zusammenhang führen.

Zellen aus stationären Kulturen (24 h) beider Stämme wurden geerntet (2.29.1), aufgeschlossen und die cytoplasmatischen Proteine gefällt (2.29.2). Die weitere Proteomanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Schobert am Lehrstuhl der Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig.

Jeweils 500 µg zelluläre Proteine wurden analog deren isoelektrischer Punkte fokussiert (2.29.4-7). Die weitere Auftrennung der Proteine nach deren Größe erfolgte mittels 10 %-iger SDS-PAGE (2.29.8-9), zur Visualisierung wurden die Gele mit dem 0,8 µM Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium-Chelat (Ruthenium-II-bathophenanthrolindisulfonat; RuBPS) gefärbt (2.29.10), mit einem Fluoreszenzscanner digital dokumentiert und mit dem Computerprogramm Z3 (Version 3.0, Compugen, Tel Aviv, Israel) ausgewertet.

Die Abbildungen 27A und 27B zeigen die digitalen Aufnahmen der 2-D-Gele von *P. aeruginosa* PAO1 und der *estA*-Negativmutante. Unter Verwendung der Z3-Software wurden die miteinander zu vergleichenden Gele (WT und *estA*-Negativmutante) übereinander gelegt (Abb. 27C), wobei die Protein-Spots des einen Gels grün und die des anderen pink eingefärbt werden. Existieren die Protein-Spots in beiden Gelen, so werden sie durch die Überlagerung schwarz dargestellt. Das *P. aeruginosa* PAO1 Protein-Muster ist in grüner Farbe und das der *estA*-Negativmutante in pink dargestellt. Die Spots, die jeweils nur in einem der beiden 2-D-Gele vorkamen und demzufolge Proteinen entsprachen, die deutlich unterschiedlich in beiden Stämmen synthetisiert werden, wurden aus den Gelen ausgestochen, tryptisch verdaut (2.30.1) und deren Identität im Massenspektrometer durch MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight) Analysen (2.30.2) im Labor von Dr. Lothar Jänsch an der GBF in Braunschweig bestimmt. Die eindeutig identifizierten Proteine sind in Abbildung 27C umrandet und mit einer Nummer versehen



**Abb. 27:** Vergleich der zellulären 2-D-Proteinmuster von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ). 500  $\mu$ g Proteine aus Zellen der 24h-Kulturen von *P. aeruginosa* WT und *estA*-Negativmutante wurden in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 10 %-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung (0,8  $\mu$ M) visualisiert. Proteinmuster von *P. aeruginosa* WT-Zellen (A), Proteinmuster von *estA*-Negativmutante-Zellen (B), Überlagerung beider Gele, wobei Bild A in grün und Bild B in pink dargestellt sind. Identische Proteinmengen führen bei der Überlagerung zu schwarzen Proteinflecken. Oval umkreiste Proteinsignale sind in der *estA*-Negativmutante verstärkt, rechteckig markierte vermindert vorhanden (C).

Tabelle 7 listet die in der Massensektroskopie identifizierten Proteine auf und enthält neben den Namen weitere Informationen: den Gennamen falls vorhanden, die PA-Nummer, die die Lage in Genom bestimmt, die Molekulare Masse des Proteins und den DE-Wert (“different expression”), der den Induktionsfaktor darstellt.

**Tab. 7: Massenspektrometrisch identifizierten Proteine aus den Zellen von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ).** Jedes Protein besitzt eine ID-Nummer im dazugehörigen Gel (Abb. 25). Nach dem tryptischen Verdau wurden die ausgewählten Proteine mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Für diese wurden die Bezeichnung, das Gen, der Genlocus und der theoretische Wert der Molekulargewichte, sowie Proteinmengen, der in der *estA*-Negativmutante in Relation zum *P. aeruginosa* WT induzierten bzw. reprimierten Proteine (DE-Werte >1 : vermehrt vorhanden; DE-Werte <1 : vermindert vorhanden) angegeben.

ID	Proteinname	Gen	Genlocus	MW [kDa]	DE-Wert
3178	probable acyl-CoA dehydrogenase		PA0879	43,141	57,9
3224	probable isocitrate lyase		PA2634	59,306	34,68
1840	probable isocitrate lyase		PA2634	59,306	24,8
2506	lipoamide dehydrogenase-glc	<i>lpdG</i>	PA1587	50,362	23,2
2226	probable isocitrate lyase		PA2634	59,306	16,7
1570	probable isocitrate lyase		PA2634	59,306	13,6
1592	probable isocitrate lyase		PA2634	59,306	9,9
2042	malate synthase G	<i>glcB</i>	PA0482	78,782	6,97
1522	outer membrane porin OprE precursor	<i>oprB</i>	PA0291	49,637	5,2
1560	probable oxidoreductase		PA1127	36,509	5,16
1104	carbamate kinase	<i>arcC</i>	PA5173	33,173	4,8
2030	lipoamide dehydrogenase-glc	<i>lpdG</i>	PA1587	50,362	4,75
1050	superoxide dismutase	<i>sodB</i>	PA4366	21,451	4,6
1092	probable fumarase		PA4333	55,013	4,5
1490	malate synthase G	<i>glcB</i>	PA0482	78,782	4,03
1156	aconitate hydratase 2	<i>acnB</i>	PA1787	94,196	3,4
1274	malate synthase G	<i>glcB</i>	PA0482	78,782	3,4
1186	malate synthase G	<i>glcB</i>	PA0482	78,782	4,1
1066	flagellin type B	<i>fliC</i>	PA1092	49,213	0,8
1176	heme oxygenase	<i>hemO</i>	PA0672	21,94	0,58
1096	glutaminase-asparaginase	<i>ansB</i>	PA1337	38,62	0,53
1174	probable class III aminotransferase		PA2413	50,412	0,222
1436	nitrite reductase precursor	<i>nirS</i>	PA0519	62,728	0,05
1126	pyochelin biosynthesis protein PchD	<i>pchD</i>	PA4228	60,719	0,035
1635	lipoamide dehydrogenase-glc	<i>lpdG</i>	PA1587	50,362	-

Anhand der DE-Werte erfolgt eine Unterteilung der Proteine in drei Gruppen. Die Proteine 1) die in *estA*-Negativmutante vermindert (DE-Werte < 0,5); 2) die in der *estA*-Negativmutante verstärkt (DE-Werte > 2) und 3) die im *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante in gleicher Menge vorhanden sind (DE-Werte zwischen 0,5 und 2).

### 3.8.1. Im *P. aeruginosa* PAO1 (WT) vermindert vorhandenen Proteine

Zu den vermindert vorhandenen Proteinen in der *P. aeruginosa estA*-Negativmutante gehören: 1) das an der Produktion der polaren Flagelle beteiligte Flagellin FliC; 2) eine Häm-Oxygenase; 3) eine Glutaminase AnsB, die zur Spaltung des Glutamat-Aminosäurepools im Cytoplasma vorliegt; 4) eine im gleichen Zusammenhang stehende putative Aminotransferase; 5) der Vorläufer der Nitratreduktase NirS, welcher in der Verwertung von Nitrat eine Rolle spielt, sowie 6) das Enzym PchD, welches an der Synthese des Siderophors und Chelators Pyochelin beteiligt ist.

### 3.8.2. In der *estA*-Negativmutante verstärkt vorhandene Proteine

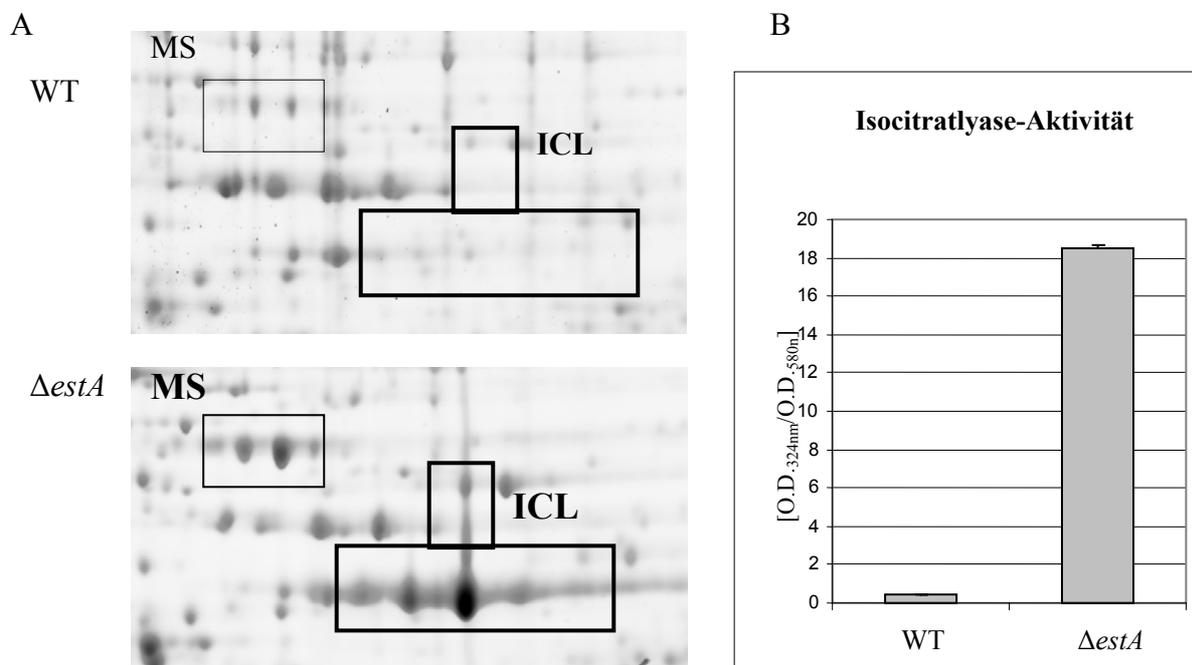
Die in der *estA*-Negativmutante vermehrt vorkommenden Proteine, liegen im *P. aeruginosa* WT in einer niedrigeren Menge vor. Die Lipoamid-Dehydrogenase Glc [ID 1635 und ID 2506] fehlt hingegen im *P. aeruginosa* PAO1 völlig in diesen Formen, ist allerdings in der mehr basischen Form [ID 2030], in einer jedoch gegenüber der *estA*-Negativmutante verminderten Menge vorhanden. Die Lipoamid-Dehydrogenase Glc ist eine Untereinheit des aus drei Enzymen bestehenden Multienzymkomplexes der im Citratzyklus aktiven  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase.

In der *estA*-Negativmutante ist eine Vielzahl an Proteinen in einer höheren Menge vorhanden als im *P. aeruginosa* WT, was auf deren Induktion hinweisen könnte. Zu diesen Proteinen zählen viele, die im weitesten Sinne mit dem Citratzyklus in Verbindung gebracht werden, wie: Acyl-CoA-Dehydrogenase, Isocitratlyase, Malatsynthase und Lipoamid-Dehydrogenase-Glc.

Die Substanz, welche den höchsten DE-Wert in der *estA*-Negativmutante aufweist, d.h.: am stärksten gegenüber dem *P. aeruginosa* WT in der Menge angestiegen ist, ist die Acyl-CoA-Dehydrogenase, ein an der Umwandlung vom Coenzym A (CoA) beteiligtes Protein. CoA lagert Carbonsäuren in energiereiche Thioesterbindung an, aktiviert diese und beteiligt sich an deren Umsatz.

Das am häufigsten detektierte Protein unter den erhöht in der *estA*-Negativmutante vorhandenen, ist allerdings die Isocitratlyase (ICL). Die ICL liegt in vielen unterschiedlichen Formen, an unterschiedlichen Stellen im 2-D-Gel vor und ist zusammen mit der ebenfalls stärker vertretenen Malatsynthase (MS) in Abbildung 28A in gesonderten Vergrößerungen der 2-D-Gele des *P. aeruginosa* WT und der *estA*-Negativmutante dargestellt. Isocitrat-Lyase (ICL) und Malatsynthase (MS) gehören dem Glyoxylatzyklus an, welcher als parallel zu dem

Citratsäurezyklus stattfindender Zyklus bekannt ist. Das vermehrte Vorkommen der Enzyme des Glyoxylatzyklus in der *estA*-Negativmutante könnte auf dessen erhöhten Einsatz und höheren physiologischen Bedarf in diesem Stamm hindeuten. Die ICL-Aktivität kann mit Hilfe eines enzymatischen Tests quantifiziert werden (2.21.2). Hierfür wurden *P. aeruginosa* WT- und *estA*-Negativmutante- Zellen, die analog der 2-D-Gele aus 24 h Kulturen stammen, aufgeschlossen und die Spaltung von 10  $\mu\text{mol}$  Isocitrat photometrisch gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 28B dargestellt und spiegelt den signifikanten Unterschied der ICL-Aktivität in beiden Stämmen wieder. Die Aktivität des Enzyms in der *estA*-Negativmutante ist um das 40-fache höher als im *P. aeruginosa* PAO1 (WT).



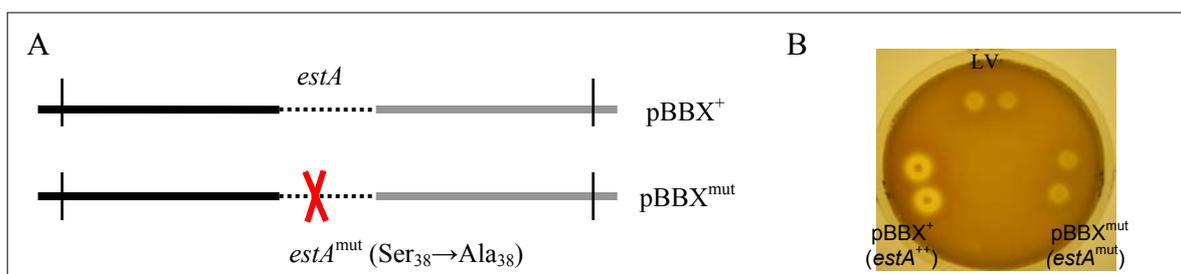
**Abb. 28: Vergrößerter 2-D-Gelabschnitt, der die Isocitratlyase- und Malatsynthase-Proteine aus *P. aeruginosa* PAO1 und *estA*-Negativmutante gegenüberstellt und Quantifizierung der Isocitratlyase-Aktivität.** Dargestellt ist das 2-D-Gel von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) (oben) und der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) (unten). Die Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus von *P. aeruginosa* Isocitratlyase (ICL) bzw. Malatsynthase (MS) sind dick bzw. dünn umrandet (A). Die Ergebnisse des Isocitratlyase-Aktivitätstests stammen aus analog zu den 2-D-Gelen angezogenen Kulturen und sind 3-fach reproduziert worden (B).

Somit scheint unter den differenziell produzierten Proteinen kein Regulator- bzw. Kontroll-Mechanismus betroffen zu sein, welcher den EstA-Phänotyp erklären könnte.

### 3.9. Konstruktion einer Mutante im aktiven Zentrum von EstA

Anhand der Ergebnisse der Proteinuntersuchung der *estA*-Negativmutante und des *P. aeruginosa* PAO1 konnte kein Regulationssystem gefunden werden, welches alle beschriebenen Phänotypen in einen kausalen Zusammenhang stellt. Es besteht weiterhin die Überlegung, ob die Esterase EstA direkt an der Produktion von Rhamnolipid beteiligt ist. Die Spaltung der Esterbindung zwischen den zwei Fettsäuren im Lipidanteil des Rhamnolipids wurde bereits ausgeschlossen (vgl. 3.2). Der Transport des Rhamnolipids aus der Zelle ist der zweite Sachverhalt der RL-Produktion, der noch nicht beschrieben wurde. Der Weg des Rhamnolipid aus der Zelle in das umgebende Medium könnte putativ von der in der äußeren Membran lokalisierten Esterase abhängig sein. Die Esterase bildet nämlich eine Transmembran-Pore, die theoretisch als Exportweg für das Rhamnolipid dienen könnte. Mit dieser Theorie würden die bislang erzielten Ergebnisse übereinstimmen. Die Deletion der Esterase EstA würde zur Blockade des RL-Exportes und demzufolge zur RL-Abwesenheit, dagegen deren Überexpression zum RL-Anstieg im Kulturüberstand führen. Um diese Annahme zu spezifizieren, sollte untersucht werden, ob die Aktivität von EstA für die RL-Biosynthese essentiell ist oder die strukturelle Anwesenheit der Esterase in Form der extrazellulären Pore der wesentliche Faktor ist, der die RL-Biosynthese limitiert. Eine Mutation im katalytisch aktiven Zentrum der Esterase EstA sollte eine EstA-Variante schaffen, die strukturell unverändert ist aber katalytisch inaktiv sein soll, um diesen Sachverhalt eventuell zu klären.

Unter Verwendung einer „overlap-extension“-PCR (2.11/2.13) wurde zielgerichtet eine Mutation in die native *estA*-Sequenz eingefügt, aus welcher der Kodonaustausch an EstA von Serin<sub>38</sub> der katalytischen Triade (S<sub>38</sub>D<sub>310</sub>H<sub>313</sub>) gegen Alanin resultieren sollte (vgl. Abb. 8).



**Abb. 29: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren der nativen Esterase (pBBX<sup>+</sup>) und der im aktiven Zentrum mutierten Esterase-Variante (pBBX<sup>mut</sup>) und Nachweis deren esterolytischen Aktivität im heterologen Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  auf Tributyrinplatten.** Das native *estA*-Gen wurde in Folge von „overlap-Extension“-PCR (Abb. 7) mutagenisiert, so dass in der Esterase ein Kodonaustausch von Serin<sub>38</sub> zu Alanin<sub>38</sub> resultiert. Der Vektor pBBX<sup>+</sup> kodiert für die native Esterase (*estA*<sup>+</sup>), der pBBX<sup>mut</sup> für die mutagenisierte Esterase-Variante (*estA*<sup>mut</sup>) (A). Einzelkolonien von *E. coli* DH5 $\alpha$  Leervektor (LV), DH5 $\alpha$ pBBX<sup>+</sup> (*estA*<sup>+</sup>) und DH5 $\alpha$  pBBX<sup>mut</sup> (*estA*<sup>mut</sup>) wurden auf Tributyrinagar überimpft, 24 h bei 30 °C und 72 h bei RT inkubiert (B).

Diese mutagenisierte Variante von *estA* wurde in das Plasmid pBBX<sup>+</sup> (*estA*<sup>++</sup>), anstelle der nativen Sequenz kloniert, so dass das Plasmid pBBX<sup>mut</sup> entstand (Abb. 29A). Das Plasmid wurde in den heterologen Wirt *E. coli* DH5α kloniert (2.9) und auf Esteraseaktivität untersucht. Dazu dienten Tributyrin-Platten (2.21.1.c), welche die hydrolytische Aktivität in Form klarer Höfe erkennen lassen. Abbildung 28B zeigt, dass sowohl *E. coli* DH5α mit der mutierten Variante von EstA (*estA*<sup>mut</sup>) als auch die Leervektorkontrolle (pBBR1MCS; LV) im Vergleich zur Positivkontrolle *E. coli* DH5α pBBX<sup>+</sup> (*estA*<sup>++</sup>) kaum hydrolytische Aktivität aufweist. Die Mutation in der *estA*-Sequenz im Vektor pBBX<sup>mut</sup> wurde zur Sicherheit mittels DNA-Sequenzierung verifiziert (Quiagen GmbH, Hilden, Germany).

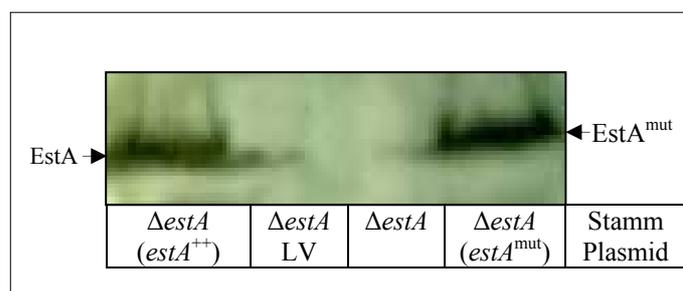
### 3.10. Nachweis der inaktiven EstA Variante in *P. aeruginosa* PAO1

Das Plasmid pBBX<sup>mut</sup> (*estA*<sup>mut</sup>) wurde mittels Konjugation (2.10) in die *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) eingebracht, so dass der Stamm, in dem die inaktive Form von EstA die einzige Esterase darstellt, entstand.

#### 3.10.1 Expression von EstA<sup>mut</sup>

Um die Expression von EstA und EstA<sup>mut</sup> in dem *estA*-Deletionsstamm ( $\Delta estA$ ) von *P. aeruginosa* zu überprüfen, wurde ein immunologischer Nachweis durchgeführt (2.20), in dem der EstA-Überexpressionsstamm ( $\Delta estA estA^{++}$ ) als Positivkontrolle diente.

**Abb. 30: Immunologischer Nachweis von EstA und der inaktiven Esterase-Variante EstA<sup>mut</sup> in *P. aeruginosa* PAO1.** Ganzzellextrakte einer O.D.<sub>580nm</sub> = 0,05 der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) alleine, der *estA*-Negativmutante mit Leervektor (LV) sowie den Expressionsplasmiden pBBX<sup>+</sup> (*estA*<sup>++</sup>) bzw. pBBX<sup>mut</sup> (*estA*<sup>mut</sup>) verwendet. Der Nachweis wurde mit dem EstA-spezifischen Serum (1:25000) geführt und 3-fach überprüft.

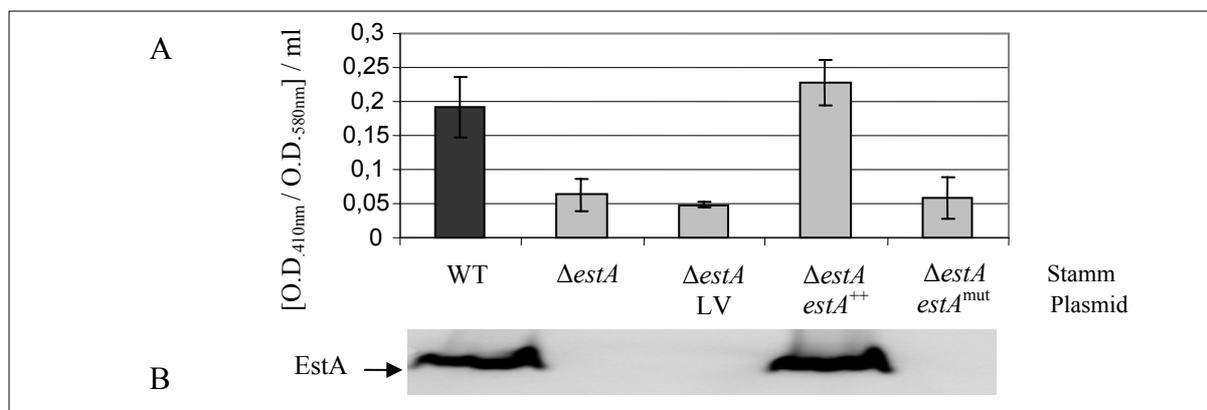


Für diesen immunologischen Nachweis wurde zur Detektion von EstA und EstA<sup>mut</sup> das polyklonale Anti-EstA-Serum eingesetzt. Die inaktive Variante von EstA, das Protein EstA<sup>mut</sup> ebenso wie die native Esterase EstA sind in *P. aeruginosa* PAO1 nachweisbar (Abb. 30). Diese immunologische Detektion deutet auf eine erfolgreiche Expression der inaktiven Esterase EstA<sup>mut</sup> in *P. aeruginosa* hin.

### 3.10.2. Esterolytische Aktivität von EstA<sup>mut</sup>

Um anschließend die Aktivität des Proteins EstA<sup>mut</sup> in *P. aeruginosa* zu überprüfen, wurde der photometrische Esterase Aktivitätstest (pNpC-Test) durchgeführt (2.21.1a), bei dem das *para*-Nitrophenyl-Caproat als Substrat verwendet wird. Eine deutliche Esterase-Aktivität im Ganzzellextrakt (GZE) (2.16) für *P. aeruginosa* PAO1 und die Positivkontrolle der EstA-Überexpression in der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA estA^{++}$ ) konnte gezeigt werden (Abb. 31A). Für die Stämme der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), der Expression der plasmidkodierten inaktiven EstA-Variante in der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) sowie für die Leervektorkontrolle ( $\Delta estA LV$ ) ist nur eine geringe Hintergrundaktivität messbar.

Bestätigt wird dieser Befund in im Zymogramm-Gel (Abb. 31B), bei dem das fluoreszierende Methylumbelliferylbutyrat als Esterase-Substrat genutzt wird (2.21.1b). Eine Esterase-Aktivität wird hierbei nur im *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante mit plasmidkodierter nativer Esterase ( $\Delta estA estA^{++}$ ) detektiert. Somit konnte die Expression der inaktiven Esterase-Variante (EstA<sup>mut</sup>) in *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Weiterhin wurde bestätigt, dass der Austausch von Serin<sub>38</sub> zu Alanin zu einem inaktiven Enzym führt.

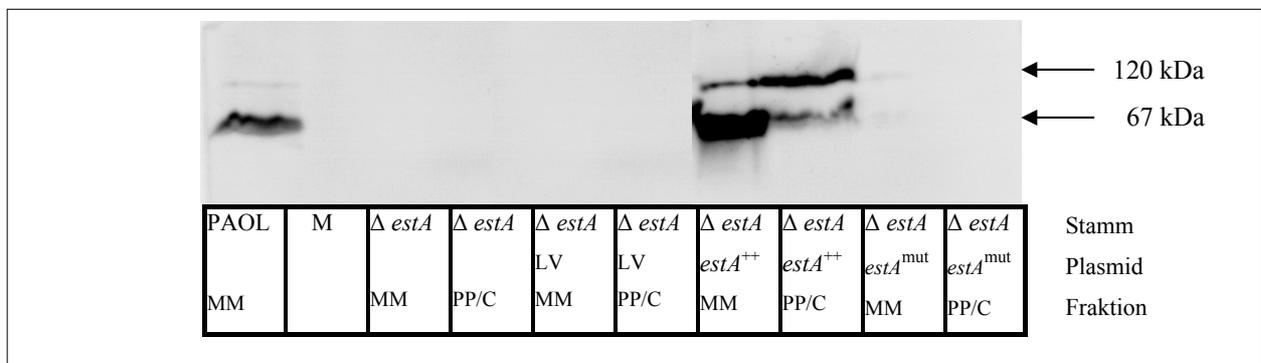


**Abb. 31: Esterase-Aktivitätstest und Zymogramm-Gel der rekombinierten Stämme der *estA*-Negativmutante.** Für die Stämme *P. aeruginosa* WT, *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) sowie der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) mit Leervektor (LV) und den Überexpressionsplasmiden pBBX<sup>+</sup> ( $estA^{++}$ ) - bzw. pBBX<sup>mut</sup> ( $estA^{mut}$ ) wurden 10  $\mu$ l der GZE (O.D.<sub>580nm</sub> = 0,15) für den pNpC-Test eingesetzt (A). Zellen, die der O.D.<sub>580nm</sub> = 0,25 entsprachen wurden nach der SDS-PAGE mit dem fluoreszierenden Substrat Methylumbelliferylbutyrat mittels UV-Licht (254-366nm) visualisiert (B).

### 3.10.3. Lokalisierung von EstA

Die Esterase EstA ist ein äußeres Membranprotein. Zur Bestätigung der Lokalisierung von EstA wurden Proteine fraktionierter Zellen (2.17) des *P. aeruginosa* PAO1 (WT), der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), der *estA*-Negativmutante mit plasmidkodierter inaktiver Esterase ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) und plasmidkodierter nativer Esterase ( $\Delta estA estA^{++}$ ) sowie die fraktionierten

Zellen der Leervektorkontrolle ( $\Delta estA$  LV) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die EstA-Aktivität in Zymogramm-Gel nachgewiesen (2.21.1.b). Die nach Zentrifugation des GZE sedimentierte Fraktion wurde dabei als Gesamtmembran betrachtet, sowie die lösliche Fraktion als Cytoplasma/Periplasma Fraktion. Die  $estA$ -Negativmutante ( $\Delta estA$ ) sowie die Rekombinationen des Stammes mit LV oder der inaktiven Esterase ( $\Delta estA$  LV oder  $\Delta estA estA^{mut}$ ) weisen wie erwartet keine Aktivität auf (Abb. 32). Detektiert wurde die Esterase-Aktivität in der Membranfraktion des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) sowie in den Fraktionen der Membran und des Gemisches aus Periplasma und Cytoplasma von dem Komplementationsstamm der  $estA$ -Negativmutante mit der aktiven Esterase ( $\Delta estA estA^{++}$ ).



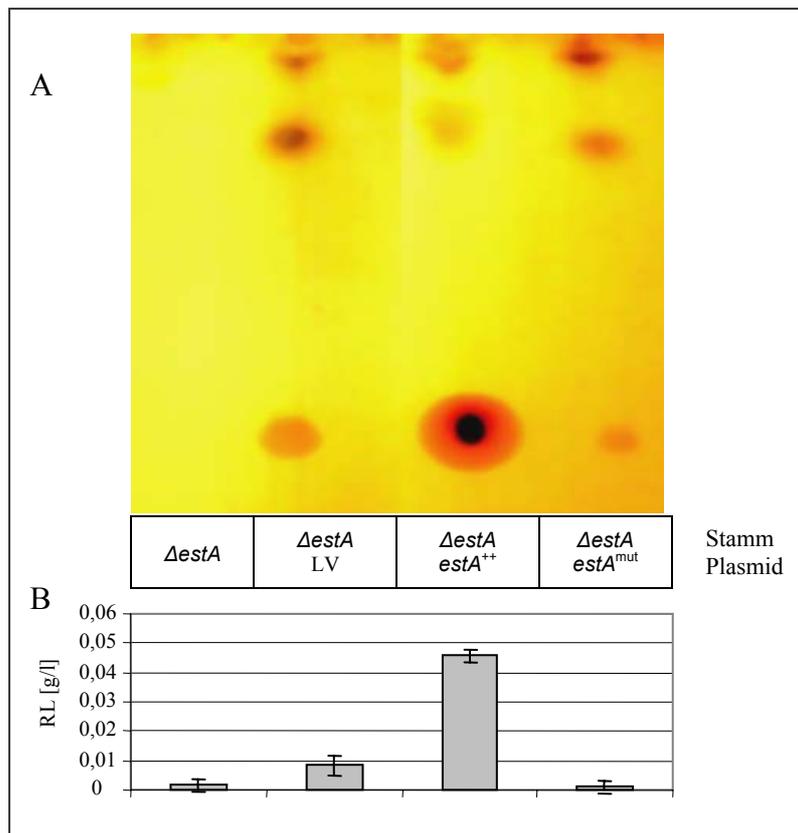
**Abb. 32: Zymogramm-Gel von Rekombinationsstämmen der  $estA$ -Negativmutante nach deren Zellfraktionierung.** Die Zellen ( $O.D._{580nm} = 0,25$ ) der Stämme *P. aeruginosa* PAO1 (WT),  $estA$ -Negativmutante ( $\Delta estA$ ) alleine sowie mit Leervektor (LV) und den Überexpressionsplasmiden  $pBBX^+$  ( $estA^{++}$ ) und  $pBBX^{mut}$  ( $estA^{mut}$ ) wurden fraktioniert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und die EstA-Aktivität mittels des fluoreszierenden Methylumbelliferylbutyrat mit UV-Licht (254-366nm) visualisiert. MM-Membranfraktion; PP/C- Periplasma- und Cytoplasma-Fraktion

Dabei ist festzuhalten, dass aktive Esterase nur im *P. aeruginosa* WT und in der komplementierten  $estA$ -Negativmutante zu verzeichnen ist. Mehr noch es ist zu verzeichnen, dass für die EstA-Überexpression in der  $estA$ -Negativmutante jeweils zwei Banden detektiert werden. Während in der Membranfraktion hauptsächlich die untere der beiden, die EstA-Größe von 67 kDa aufweisende Bande dominiert, ist in der Periplasma-Cytoplasma-Mischfraktion die höhere Bande, die in der Höhe von ca. 120 kDa liegt, stärker zu detektieren. Dieser Effekt wiederholt sich in einem geringeren Ausmaß in der Membranfraktion des *P. aeruginosa* (WT). Die Membranlokalisierung für die aktive Esterase EstA in der *P. aeruginosa* PAO1 ist somit gesichert.

### 3.11. Untersuchung der Mutante des aktiven Zentrums von EstA

#### 3.11.1. Bedeutung der EstA-Aktivität für die Rhamnolipidsynthese

Der nächste Versuch sollte die Relevanz der enzymatischen Aktivität von EstA für die RL-Produktion aufklären. Dazu wurde die RL-Produktion mit der dünnschichtchromatographischen (DC) Auftrennung (2.23.3) sowie dem Orcinoltest (2.23.2) untersucht. Während in der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) kein Rhamnolipid auf der Dünnschichtchromatographieplatte nachgewiesen werden konnte, konnte für die Leervektorkontrolle (*estA* LV) und den Stamm der *estA*-Negativmutante mit plasmidkodierter inaktiven EstA-Variante (*estA<sup>mut</sup>*) eine für *P. aeruginosa* WT untypische RL-Verteilung detektiert werden (Abb. 33A). Für die Negativmutante mit plasmidkodierter aktiver Esterase (*estA<sup>++</sup>*) konnte das Rhamnolipid in der für *P. aeruginosa* PAO1 typischen Verteilung nachgewiesen werden.



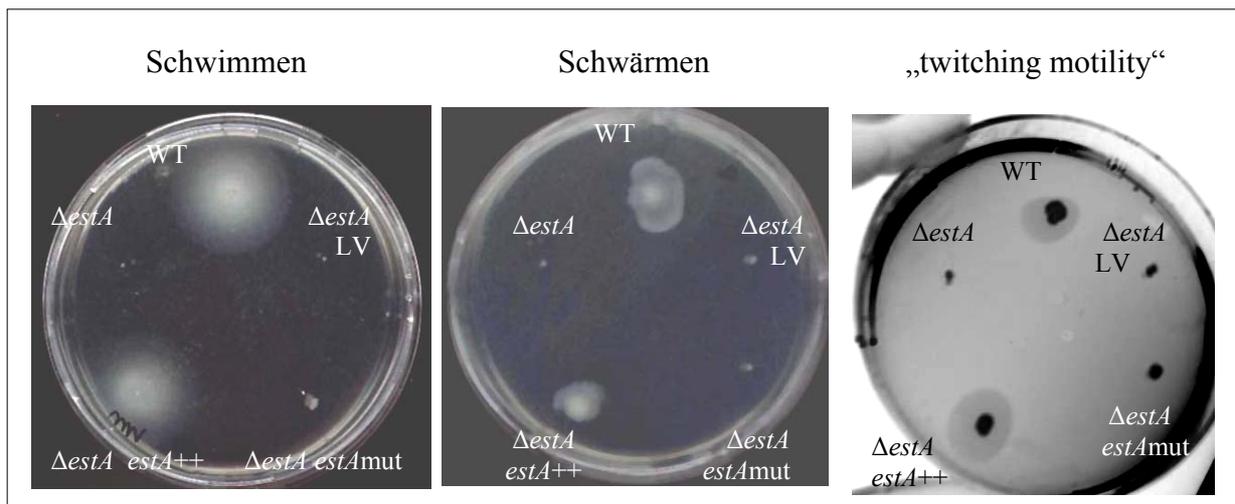
**Abb. 33: Dünnschichtchromatographische und photometrischer Nachweis der Rhamnolipidmenge in den Kulturüberständen von *P. aeruginosa* PAO1 und den Komplementationsstämmen von *estA*-Negativmutante.** Rhamnolipide aus 48 h Kulturüberständen der *P. aeruginosa*-Stämme *estA*-Negativmutante alleine ( $\Delta estA$ ), mit Leervektor ( $\Delta estA$  LV), mit plasmidkodierter nativer Esterase ( $\Delta estA estA^{++}$ ) und inaktiver Esterase ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) wurden extrahiert. Anschließend erfolgten die DC-Auftrennung (A) und der Orcinoltest (B). Dargestellt ist exemplarisch eine DC-Platte und die 5-fach reproduzierten Ergebnisse des Orcinoltests.

Der Orcinoltest (Abb. 33B) bestätigt die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Auftrennung und zeigt für die *estA*-Negativmutante alleine, mit Leervektor (LV) und mit

plasmidkodierter inaktiven EstA-Variante ( $estA^{mut}$ ) ein fast vollständiges Fehlen des Rhamnolipids. Eine deutliche Menge an Rhamnolipid ist nur für den Stamm, der die aktive Esterase ( $\Delta estA estA^{++}$ ) exprimiert messbar. Damit konnte gezeigt werden, dass nicht nur das EstA-Protein als solches, sondern dessen enzymatische Aktivität für die RL-Biosynthese in *P. aeruginosa* eine entscheidende Rolle spielt.

### 3.11.2. Bedeutung der EstA-Aktivität für die Beweglichkeit von *P. aeruginosa*

Einer der deutlichen Phänotypen der  $estA$ -Negativmutante von *P. aeruginosa* besteht darin, dass keine Beweglichkeit festgestellt werden konnte. Daher wurde der Effekt der Inaktivierung von EstA bei Komplementationen der  $estA$ -Negativmutante von *P. aeruginosa* untersucht. Die Bedeutung der Aktivität der Esterase EstA hinsichtlich der Beweglichkeit sollte dadurch näher untersucht werden.

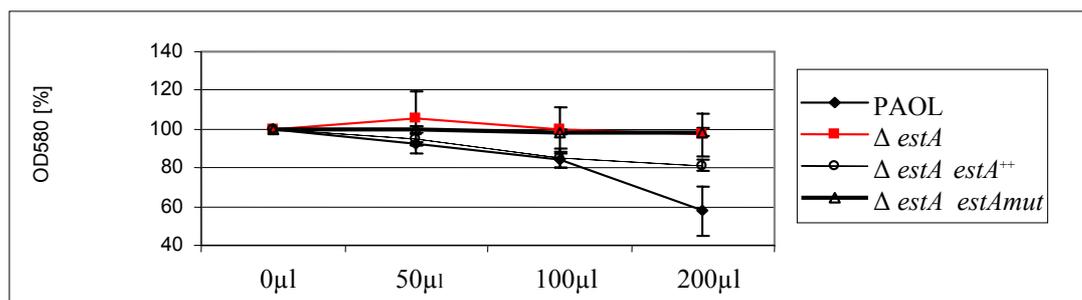


**Abb. 34: Schwimmen, Schwärmen und „twitching motility“ der komplementierten  $estA$ -Negativmutante ( $\Delta estA$ ).** Einzelkolonien der Stämme der  $estA$ -Negativmutante ( $\Delta estA$ ), der  $estA$ -Negativmutante mit Überexpression der inaktiven ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) und der aktiven Esterase-Form ( $\Delta estA estA^{++}$ ) sowie der Leervektorkontrolle ( $\Delta estA LV$ ) wurden auf eine Schwimm-, Schwärm- bzw. „twitching motility“-Agarplatte mit der entsprechenden Agarkonzentration von 0,3; 0,5 bzw. 1,5 % gepickt und ü.N. bei 30°C inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Platten, die in vier voneinander unabhängigen Ansätzen vergleichbar aussahen.

Abbildung 34 zeigt deutlich, dass nur die Komplementation mit der nativen Esterase zur Wiederherstellung der Beweglichkeit in der ansonsten nicht mobilen  $estA$ -Negativmutante führt. Somit ist neben der RL-Synthese auch die Beweglichkeit von *P. aeruginosa* und darunter QS-abhängige Schwärmen sowie das Schwimmen und „twitching motility“ von der Aktivität der Esterase EstA abhängig.

### 3.12.3. Einfluss der EstA-Aktivität auf die Zelloberflächen-Hydrophobizität

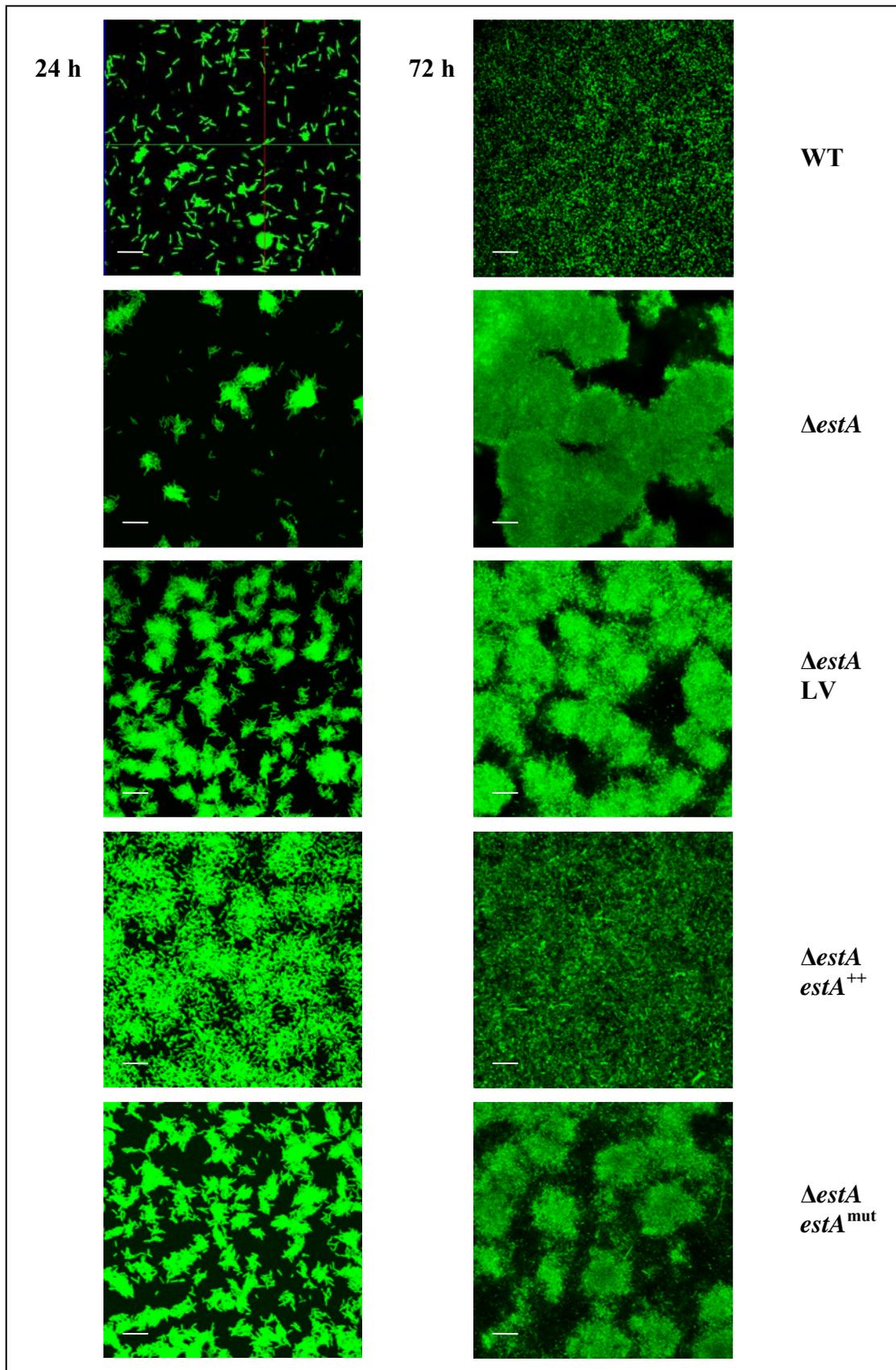
Des Weiteren wurde die Veränderung der Zelloberflächen-Hydrophobizität der *estA*-Negativmutante durch die zusätzliche Expression der aktiven Esterase EstA bzw. deren inaktiver Variante EstA<sup>mut</sup> untersucht (2.26). Während die *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), die Leervektorkontrolle ( $\Delta estA$  LV, nicht abgebildet) und der *estA*-Deletionsstamm mit der plasmidkodierte inaktiven EstA-Variante ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) eine hydrophile Zelloberfläche besitzen, zeigt der Stamm der *estA*-Negativmutante mit der Überexpression der katalytisch aktiven Esterase ( $\Delta estA estA^{++}$ ) eine hydrophobere Zelloberfläche, die der Zelloberfläche des *P. aeruginosa* (WT) nahe kommt (Abb. 35). Die Aktivität der Esterase EstA beeinflusst den Charakter der Zelloberflächenbeschaffenheit hinsichtlich der Polarität. Das Fehlen der Esterase-Aktivität geht mit einer Polarität (Hydrophilität), deren Überexpression mit einer Unpolarität (Hydrophobizität) der Zelloberfläche einher.



**Abb. 35: Adhäsion der Zellen von *P. aeruginosa* PAO1 und den Komplementationsstämmen von *estA*-Negativmutante an n-Hexadekan.** Jeweils 1,2 ml Bakteriensuspension ( $O.D._{580nm} = 0,7$ ) der Stämme *P. aeruginosa* WT, der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), der *estA*-Negativmutante mit Überexpression der inaktiven ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) und der aktiven Esterase-Form ( $\Delta estA estA^{++}$ ) sowie der Leervektorkontrolle ( $\Delta estA$  LV) wurden mit 50, 100 bzw. 200µl n-Hexadekan gemischt. Nach 15 min wurde die Trübung ( $O.D._{580nm}$ ) der wässrigen Phase gemessen. Der Ansatz ohne n-Hexadekan-Zugabe wurde gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.11.4. Bedeutung der EstA-Aktivität für die Biofilmbildung

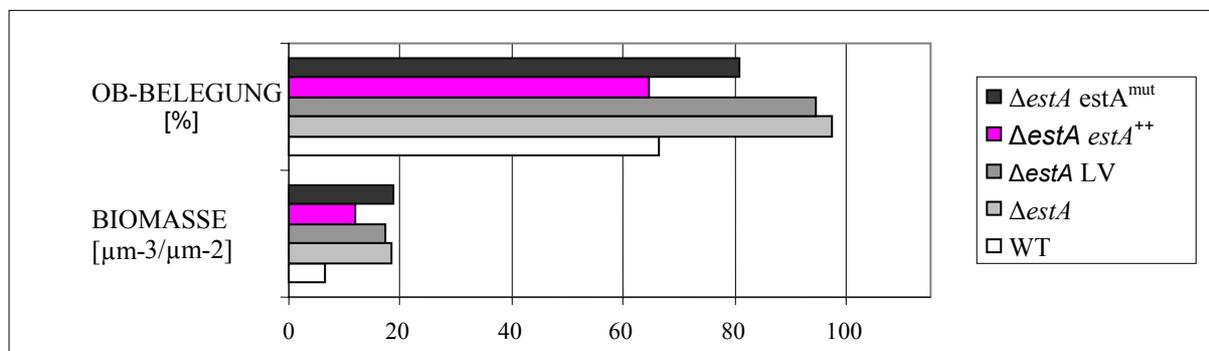
Die Physiologie des gemeinschaftlichen Lebens im Biofilm, die durch die bereits geschilderten Phänotypen (RL-Menge, Beweglichkeit und Zelloberflächen-Hydrophobizität) beeinflusst wird, wurde zu den Zeitpunkten von 24 und 72h mit CLSM untersucht (2.24.1.a/ 2.24.2a) und in Abbildung 36 dargestellt. Die aggregierten Zellkolonien in dem Biofilm der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ) und der Leervektorkontrolle ( $\Delta estA$  LV) sowie der *estA*-Negativmutante mit plasmidkodierter inaktiver EstA-Variante ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) sind zu beiden Zeitpunkten der Biofilmuntesuchung deutlich zu erkennen. Demgegenüber ist der Biofilm der



**Abb. 36: CLSM-Aufnahmen von Biofilmen des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der Komplementationsstämme von *estA*-Negativmutante in Durchflusszellen nach 24 und 72h.** Biofilme des *P. aeruginosa* WT, der *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), *estA*-Negativmutante mit plasmidkodierter nativer Esterase ( $\Delta estA estA^{++}$ ) und inaktiver EstA-Variante ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) und der Leervektorkontrolle ( $\Delta estA$  LV) wurden bei 30°C unter konstantem Medienstrom von 20 ml/h mit APM-Medium kultiviert. Skala 20  $\mu$ m.

*estA*-Negativmutante mit plasmidkodierter nativer Esterase ( $\Delta estA estA^{++}$ ) nach 24 h planer als die anderen Stämme. Er weist noch leicht zu erkennende aggregierte Strukturen auf, die jedoch im Gegensatz zu den anderen Stämmen von vereinzelt Zellen umgeben sind. Der Biofilm des Komplementationsstammes mit der nativen Esterase ist gegenüber dem *P. aeruginosa* WT dichter besiedelt. Nach 72 h entspricht die Biofilmbeschaffenheit dieses Komplementationsstammes allerdings ganz der des *P. aeruginosa* PAO1 (WT); der Biofilm ist dünner und lockerer geworden und löst sich vom Untergrund ab. Unterdessen sind die Zellen der Biofilme der *estA*-Negativmutante, der Leervektorkontrolle und *estA*-Negativmutante mit plasmidkodierter inaktiver Esterase in stark zusammenhängenden Mikrokolonien organisiert. Diese Mikrokolonien erfahren aufgrund des Zellwachstums eine Zunahme der Biofilmmasse und besiedeln immer stärker die Untergrundoberfläche.

Die COMSTAT-Auswertung der Biofilme (Abb. 37) ist explizit für den Zeitpunkt von 72 h dargestellt und zeigt für die Stämme der *estA*-Negativmutante, der Leervektorkontrolle und der *estA*-Negativmutante mit plasmidkodierter inaktiver EstA-Variante eine gegenüber dem *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und dem Komplementationsstamm mit nativer Esterase höhere Biofilmmasse einhergehend mit einer höheren prozentuellen Oberflächenbelegung.



**Abb. 37: Quantifizierung der Biofilme von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der Komplementationsstämme der *estA*-Negativmutante mit dem Computerprogramms „COMSTAT“.** Die Biomasse und die prozentuelle Oberflächenbelegung wurden exemplarisch für die Biofilme aus Abbildung 35 für den WT, die *estA*-Negativmutante ( $\Delta estA$ ), *estA*-Negativmutante mit Überexpression der aktiven- ( $\Delta estA estA^{++}$ ) und inaktiven EstA-Variante ( $\Delta estA estA^{mut}$ ) und der Leervektorkontrolle ( $\Delta estA LV$ ) berechnet.

Die Expression der aktiven EstA-Variante scheint die charakteristischen *P. aeruginosa* WT-Eigenschaften des Biofilms in der *estA*-Negativmutante wiederherzustellen, nämlich Auflockerung und Auflösung der Biofilmarchitektur aus Zellaggregaten.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Expression der aktiven Esterase EstA in der *estA*-Negativmutante zum Aufheben der für diesen Stamm typischen, ihn vom *P. aeruginosa* WT absondernden, Charakteristika führt. Die RL-Biosynthese wurde wiederhergestellt,

sowohl das Schwimmen, „twitching motility“ als auch Schwärmen konnten wieder als Beweglichkeitsformen von dem Komplementationstamm benutzt werden. Die hydrophile Zelloberfläche änderte ihre Eigenschaft und wurde hydrophob und die für die *estA*-Negativmutante typischen Biofilm-Aggregate wurden aufgelöst, wodurch ein planer Biofilm entstand. Damit scheint bestätigt zu sein, dass die Aktivität der Esterase EstA eine essentielle Rolle in all diesen Prozessen spielen muss. Allerdings scheint die genaue, spezifische enzymatische Reaktion von EstA noch ungewiss zu sein.

### 3.12. Untersuchung der Esterase EstA auf Phospholipaseaktivität

EstA-Aktivität ist direkt oder indirekt essentiell für die Rhamnolipidsynthese und die daraus resultierenden bzw. parallel erscheinenden Phänotypen wie die Beweglichkeit, die Zelloberflächen-Hydrophobizität und die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PAO1.

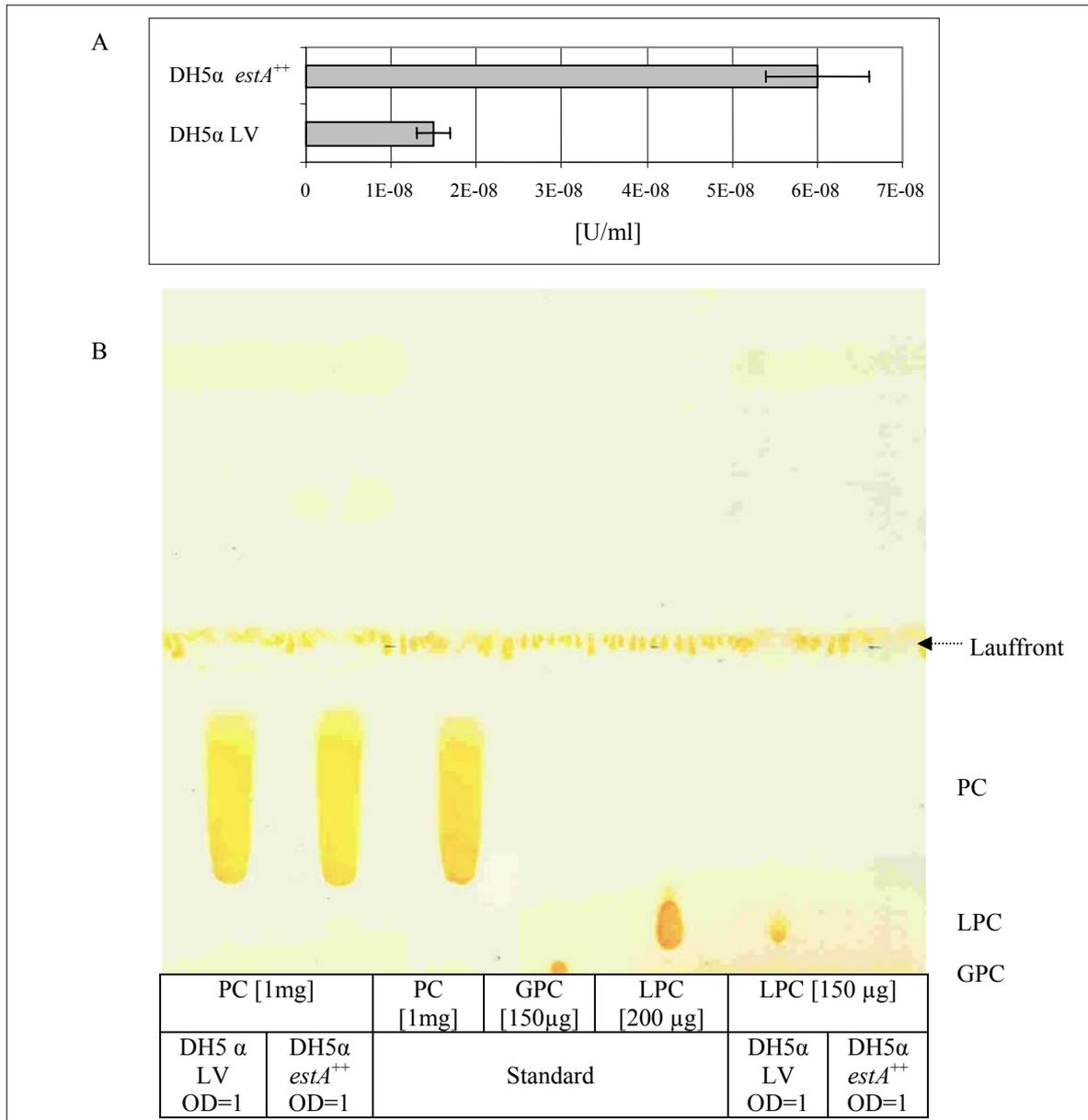
Für EstA stellt die Abspaltung von kurzkettiger Fettsäuren (C4-C10) aus einer Esterbindung eine nachgewiesene enzymatische Aktivität dar. Dies spiegelt jedoch nicht zwangsläufig die relevante natürliche Aktivität wieder.

Die Esterase EstA wurden erneut mittels BLAST (NCBI) einem Homologievergleich (2.32.) unterzogen (Altschul *et al.*, 1997). Homologien zu folgenden Enzymklassen Autotransporter Lipase, Phospholipase/Lecitinase/Hämolysin, Esterase und Serin-Protease wurden gefunden. Die homologen Proteine finden sich in den Organismen *Yersinia mollaretii*, *Nostoc punctiforma*, *Moraxella bovis*, *Burkholderia sp.* und *Legionella pneumophila*, wobei die größte Homologie von 46 % und Identität von 31 % zu einer Phospholipase aus dem Gram-negativen, fakultativ anaeroben Bakterium *Y. mollaretti* bestand. Weitere homologe Proteine waren Phospholipasen A bzw. B aus den Gram-negativen aeroben *M. bovis* (Homologie 37 %; Identität 23 %) bzw. *L. pneumophila* (Homologie 42 %; Identität 29 %). Um eine putative Phospholipaseaktivität für EstA ausschließen bzw. bestätigen zu können, wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

Phospholipasen werden klassifiziert in Abhängigkeit von der Substratbindung, die sie spalten. Das Phosphatidylcholin (PC) stellt ein Substrat dar, welches sowohl von der Phospholipase A (PLA) als auch von der Phospholipase B (PLB) gespalten wird. Die Produkte der beiden Reaktionen sind im Fall von PLA die freien Fettsäuren und das Lysophosphatidylcholin (LPC), im Fall von PLB die freien Fettsäuren und das Glycerophosphatidylcholin (GPC). Das LPC wiederum wird nur von der PLB, jedoch nicht von PLA gespalten. Die Spaltprodukte von PC durch die hydrolytische Wirkung von PLC bzw. PLD stellt das Diacylglycerol bzw. die Phosphorsäure dar.

In einem Anfangsversuch wurden 1 mg PC und 150 µg LPC (Timpe *et al.* 2003) jeweils mit Ganzzellextrakten (GZE) von *E. coli* DH5α behandelt, die die Esterase EstA von einem Plasmid überexprimiert hatten (DH5α *estA*<sup>++</sup>) und als Negativkontrolle Zellen von *E. coli* DH5α mit dem äquivalenten Leervektor pBBR1MCS (DH5α LV). Um die Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten, wurden stets Zellen einer O.D.<sub>580nm</sub> von 1 in 100 µl Volumen eingesetzt. Die lipolytische Aktivität der Ganzzellextrakte (2.16) wurde zusätzlich mit einem Aktivitätstest (2.21.1.a) kontrolliert. Entsprechend den Erwartungen zeigten die

Ganzzellextrakte der EstA-Überexpression in *E. coli* DH5 $\alpha$  eine lipolytische Aktivität von durchschnittlich  $6 \cdot 10^{-8}$  U/ml gegenüber der Aktivität der Leervektorkontrolle von  $1,5 \cdot 10^{-8}$  U/ml (Abb. 38A). Der enzymatische Verdau verlief über Nacht bei 37°C und die extrahierten Substrate und Produkte der Reaktion wurden anschließend dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit 0,05 % Jodlösung reversibel gefärbt (2.21.3).



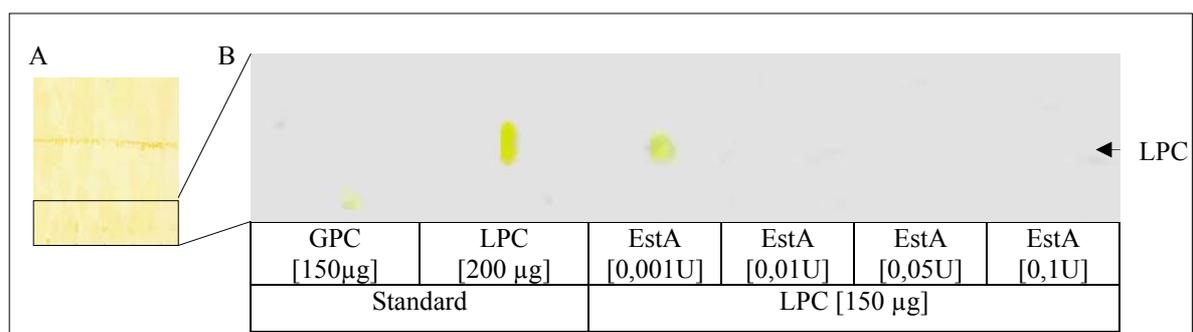
**Abb. 38: Esterase-Aktivitätstest der heterolog in *E. coli* DH5 $\alpha$  exprimierter EstA und Dünnschichtchromatographie zur Analyse deren Phospholipaseaktivität.** pNpC-Test zur Feststellung der esterolytischen Aktivität plasmidkodierter Esterase (*estA*<sup>++</sup>) in *E. coli* DH5 $\alpha$  gegenüber der Leervektorkontrolle (LV) (A). Aufgetrennte Extrakte der enzymatischen Reaktion von 1 mg PC bzw. 150  $\mu$ g LPC mit jeweils den Zellen der EstA-Überexpression (DH5 $\alpha$  *estA*<sup>++</sup>) und der Leervektorkontrolle (DH5 $\alpha$  LV), die die enzymatische Aktivität von  $6 \cdot 10^7$  U und  $1,5 \cdot 10^7$  U aufwiesen (B). Als Standard dienten die unverdaute Substanzen PC, GPC und LPC (Sigma). GPC: Glycerophosphatidylcholin; PC: Phosphatidylcholin; LPC: Lysophosphatidylcholin; Pfeil: Chloroform-Methanol-Wasser-Lauffront

Zur Kontrolle wurde das Standard LPC (200 µg) in einem äquivalenten Reaktionsansatz ohne Zugabe von Substrat oder *E. coli* Zellen behandelt, um einen eigenständigen Zerfall der Substanz oder den Verlust während der Extraktion zu überprüfen (Abb. 38B in Vergleich zu Abb. 40). Die Standardsubstanz LPC blieb unverändert, was auf unbedenkliche Reaktionsbedingung schließen lässt.

Die Dünnschichtchromatographie in Abbildung 38B zeigt im Fall der Hydrolyse von PC keine Veränderung des Substrates, allerdings sind eventuell die freien Fettsäuren (FS) detektierbar, die auf eine Hydrolyse von PC durch PLA bzw. PLB hindeuten und ein weiteres Signal, das eventuell DAG sein könnte, das ein PLC Spaltprodukt von PC darstellt. Diese Resultate erhält man jedoch bei *E. coli* mit Leervektor und mit exprimierter EstA.

Das spezifische Substrat von PLB stellt das LPC dar. Das vollständige Fehlen von LPC, das mit den Zellen des EstA-Expressionsstammes (*E. coli* DH5α *estA*<sup>++</sup>) behandelt wurde, deutet auf das Vorhandensein einer PLB-aktiven Substanz in den Zellen des Stammes hin, die höchstwahrscheinlich auf die Esterase EstA zurückzuführen ist, da die Leervektorkontrolle (*E. coli* DH5α LV) keinen Einfluss auf das LPC hatte.

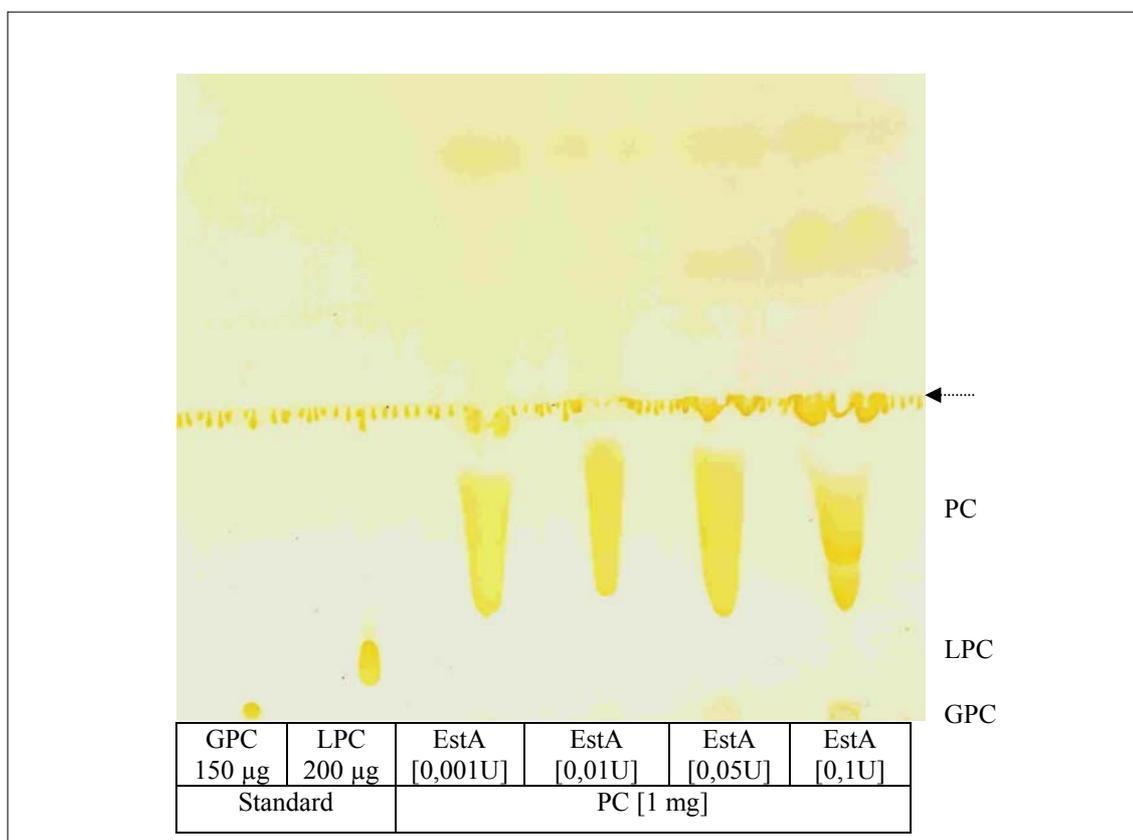
Um diese Phospholipaseaktivität eindeutig der Esterase EstA zuordnen zu können, wurde diese in *E. coli* Stamm BL21 (DE3) in dem Vektor pBR22Est überexprimiert, aufgereinigt und einkonzentriert (2.31) und eingesetzt um sowohl das LPC als auch das PC zu verdauen.



**Abb. 39: Dünnschichtchromatographie zur Analyse der Phospholipase B-Aktivität von *P. aeruginosa* PAO1 EstA.** Das PLB-spezifische Substrat LPC wurde mit 0,001-0,1U EstA ü.N. behandelt und der extrahierte Reaktionsansatz mit DC analysiert (A). Ein vergrößerter Ausschnitt der DC-Platte, mit nachträglich verändert Farbsättigung zur besseren Visualisierung. (B). GPC: Glycerophosphatidylcholin; LPC: Lysophosphatidylcholin

150 µg LPC wurden mit einer aufsteigenden Menge an EstA (0,001-0,05 U) versetzt und das dünnschichtchromatographische Ergebnis (Abb. 39) zeigt, dass die Menge von 0,01 U der *P. aeruginosa* Esterase EstA 150 µg LPC in einer ü.N. Reaktion bei 37°C vollständig zersetzt. Die Spaltprodukte der Reaktion sind in der Dünnschichtchromatographieplatte nicht sichtbar, allerdings fehlt das Substrat völlig, was auf dessen Spaltung hindeutet.

Da anhand dieses Ergebnisses der Esterase EstA eine Phospholipase B Aktivität zugeschrieben werden kann, sollte das PC ebenfalls von EstA gespalten werden können. Um oben genanntes Problem auszuschließen, wurde bei dieser Durchführung der PL die gereinigte Esterase aus *P. aeruginosa* für den Verdau von PC eingesetzt. Die Produkte der Hydrolyse von 1 mg PC mit einer steigenden Menge an EstA (0,001-0,1 U) wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und in Abbildung 40 dargestellt. Zu erkennen ist deutlich, dass 0,05 U der Esterase EstA benötigt werden, um einen anfänglichen Verdau von PC detektieren zu können. Entsprechend der unvollständigen Spaltung von PC ist zwar die geringe Menge an den putativen freien Fettsäuren (FS) nur schwach sichtbar, allerdings ist das zweite Spaltprodukt der PLB nämlich das GPC eindeutig detektierbar.



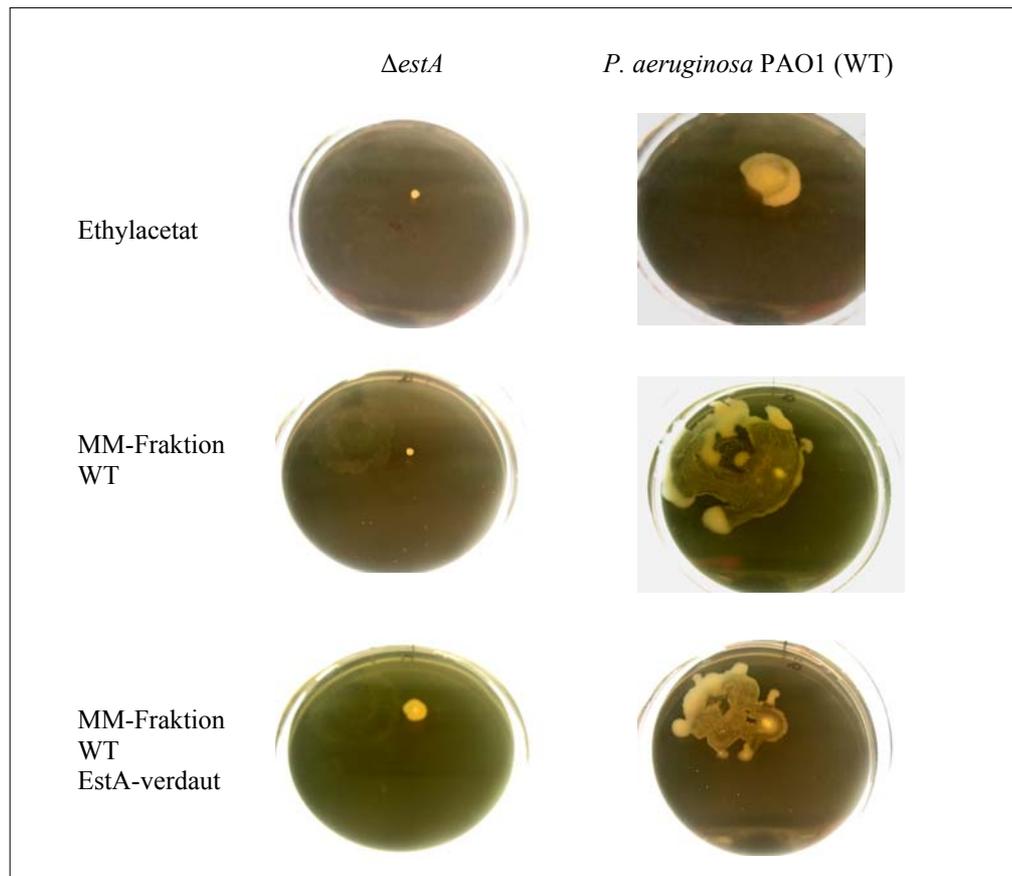
**Abb. 40: Dünnschichtchromatographie zur Analyse der Phospholipaseaktivität der *P. aeruginosa* EstA gegenüber Phosphatidylcholin (PC).** PC wird als Substrat von PLA in die freien Fettsäuren und LPC bzw. von PLB in die freien Fettsäuren und GPC zersetzt. GPC: Glycerophosphatidylcholin; LPC: Lyso-phosphatidylcholin; Pfeil: Chloroform-Methanol-Wasser-Lauffront

Die Untersuchung der Phospholipaseaktivität von *P. aeruginosa* Esterase EstA verifiziert eine Phospholipase B Aktivität, die auch den Synonym Lysophospholipase Aktivität besitzt.

### 3.13. Einfluss EstA-verdauter Membranfraktion des *P. aeruginosa* PAO1 auf das Schwärmverhalten der *estA*-Negativmutante

Das äußere Membranprotein EstA besitzt zusätzlich zu dessen Esteraseaktivität eine Phospholipase B Aktivität. Hinsichtlich der Lokalisierung des Proteins und dessen neuer enzymatischer Aktivität, nämlich der Spaltung von Phospholipiden, stellt sich die Frage nach der Relevanz dieser Tatsache für die hier erforschten physiologischen Merkmale. Das natürliche, „in vivo“ vorkommende Substrat für die Esterase EstA könnte die aus Phospholipiden bestehende äußere Membran von *P. aeruginosa* darstellen. Die Spaltung der extrazellulären Schicht der Phospholipide hätte zur Folge, dass zum einen das Phospholipid als Substrat gespalten wird, was mit Veränderung der Zelloberflächenbeschaffenheit einhergeht und zum anderen ein Spaltprodukt entsteht, das eine putativ essentielle Rolle in den physiologischen Gegebenheiten des Mikroorganismus spielen könnte. Es wird von so genanntem „lipid signalling“ gesprochen.

Die praktische und zu eindeutigen Ergebnissen führende Methode, um diese Theorie auf ihre Richtigkeit zu untersuchen, ist der Verdau der Membran von *P. aeruginosa* mit der EstA = PLB und die Überprüfung der Auswirkung des extrahierten Reaktionsansatzes auf die Beweglichkeit der Stämme *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante. Für diesen Versuch wurde das Schwärmen ausgewählt. Die Membranfraktionen (aus GZE der Zellen von O.D.<sub>580nm</sub> = 10) des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) wurden mit überexprimierter einkonzentrierter EstA (PLB) behandelt (0,1U) und die mittels Extraktion eingeeengten Produkte dieser enzymatischen Spaltung auf die Schwärm-Agarplatten getropft (1.21.3.). Zusätzlich wurde zur Kontrolle die unbehandelte Membranfraktion von *P. aeruginosa* PAO1 auf eine Kontrollplatte getropft, um deren alleinige Wirkung auf das Schwärmen zu spezifizieren. Die Extrakte wurden in Ethylacetat gelöst und auf die Platten getropft, daher galt es die Wirkung des Lösungsmittels auf das Schwärmverhalten ebenfalls zu überprüfen. Die Abbildung 41 zeigt das Resultat dieses Versuches. Der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) zeigt wie erwartet deutlich ausgeprägte Schwärmzone auf der Schwärmplatte. Dabei wird das Schwärmen durch die zusätzlich im Agar bereitgestellte EstA-verdaute bzw. unverdaute Membranfraktion verstärkt ausgeführt. Die Schwärmspuren breiten sich über die Extrakte hinaus und die Zellen bedecken größere Flächen der Agarplatten.



**Abb. 41: Schwärmverhalten von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante unter Zugabe EstA-verdauter bzw. unverdauter Membranfraktion von *P. aeruginosa* PAO1.** Die verdaute- bzw. unverdaute-Membranfraktion (MM-Fraktion) wurde nach der Extraktion und Lyophilisation in 10 µl Ethylacetat auf die Schwärmplatte getropft. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurden die Stämme im Abstand von 1,5 cm von dem Ethylacetat-Eintropfpunkt inokuliert. Die Platten wurden 24 h in 30 °C inkubiert und fotografiert.

Für die unbewegliche *estA*-Negativmutante konnte durch das Zufügen EstA-verdauter *P. aeruginosa* PAO1 Membranfraktion das Schwärmen partiell wiederhergestellt werden. Somit scheint die Phospholipaseaktivität der Esterase von großer Relevanz in der Beweglichkeit von *P. aeruginosa* PAO1 zu sein. Die Phospholipaseaktivität der Esterase EstA scheint das Schwärmverhalten von *P. aeruginosa* zu generieren.

## 4. Diskussion

Die Esterase EstA ist ein lipolytisches Enzym von *P. aeruginosa* PAO1 und katalysiert die Hydrolyse von Esterbindungen kurzer ( $\leq C10$ ) Fettsäureketten.

Die Zellwand der Gram-negativen Bakterien besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran zwischen den sich das Periplasma befindet. In diesem periplasmatischen Raum ist neben vielen Enzymen die gelartige Peptidoglykanschicht zu finden, die dem Bakterium die osmotische Stabilität und dessen Zellform verleiht (Poxton, 1993). Ähnlich der inneren Membran fungiert die äußere Membran ebenfalls als Diffusionsschranke und zwar sowohl für die periplasmatischen Enzyme, als auch für extrazelluläre Komponenten. In ihr sind zahlreiche Proteine vorzufinden. Zu den unterschiedlichen Funktionen, die die äußeren Membranproteine (OMP) (**outer membran protein**) haben können, zählen: Translokatoren wie Porine, und Kanalproteine, Rezeptoren, Enzyme und Signaltransduktoren. Während die Porine eine Diffusionspore für kleine hydrophile Moleküle bilden, handelt es sich bei den Kanalproteinen um substanzspezifische Porine, die auf wenige Substrate spezialisiert sind. Die Rezeptoren sind hoch spezifisch für bestimmte chemische Verbindung und benötigen für ihre Wirksamkeit Energie, wohingegen Enzyme Proteine sind die spezielle Substrate mit katalytischer Aktivität umsetzen. Signaltransduktoren hingegen sind als äußere Sensoren wirksam, die die Hinweise bezüglich der Umgebung in einer zelleinwärts gerichteten Informationsübertragung gewährleisten.

Die Esterase EstA ist ein Enzym in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* und gehört der GDSL-Familie von Lipase an, deren Konsensusmotiv um das katalytisch aktive Serin<sub>38</sub> aus G-D-S<sub>38</sub>-X-S besteht (Arpigny & Jäger, 1999). Die katalytische Triade besteht neben dem Serin<sub>38</sub> aus Histidin<sub>310</sub> und Aspartat<sub>313</sub> (Wilhelm, 1999). Im Gegensatz zu den  $\alpha$ -helikalen Untereinheiten der Transmembranproteine der inneren Membran besitzen die Proteine der äußeren Membran in Gram-negativen Bakterien keine hydrophoben Segmente, die lang genug wären die äußere Membran zu durchspannen. Die OMP bestehen daher zum größten Teil aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Stukturen, die in der lipophilen Membran einen in der Mitte wassergefüllten Hohlraum aufweisen (Oomen *et al.*, 2004). Das äußere Membranprotein Esterase ist ein Autotransportprotein (AT-Protein), das wie der Name schon impliziert autonom und ohne Energieverbrauch an die Zelloberfläche transportiert wird. Nach dem Durchqueren der inneren Membran am Sec-Apparat ist das Protein im Periplasma angekommen. Während die C-terminale Transporter-Domäne spontan in die äußere Membran

insetiert und ihre native Struktur aus 12  $\beta$ -Faltblätter annimmt, bleibt die N-terminale Passagier-Domäne, die die katalytische Aktivität des Proteins trägt, unterdessen ungefaltete im Periplasma auf eine ungewisse Weise von der proteolytischen Hydrolyse verschont (Henderson *et al.*, 1998). Es wird spekuliert, dass periplasmatische Chaperone bzw. intermolekulare Auto-Chaperon-Aktivität eines Teils des AT-Proteins den Proteolyseschutz gewährleisten (Pugsley, 1993; Jose *et al.*, 1995). Das so genannte  $\beta$ -Fass stellt eine Pore dar, durch welche die Passagier-Domäne auf eine bislang nicht weiter charakterisierte Weise in den extrazellulären Raum befördert wird. Es wird postuliert, dass eine vorübergehende haarnadelförmige Struktur angenommen wird, die mittels einer kranartigen Bewegung die Passagier-Domäne durch die äußere Membran befördert (Pohlner *et al.*, 1987; Henderson *et al.*, 2004). Die Passagier-Domäne von EstA bleibt an die Transporter-Domäne gebunden und ist an der Zelloberfläche enzymatisch aktiv. Die esterolytische Aktivität wurde durch die Spaltung eines kurzkettigen p-Nitrophenylester (pNpC) verifiziert (Wilhelm *et al.*, 1999).

Untersuchungen der Struktur der AT-Proteine zeigen neben einer stark variierenden Passagier-Domänen, die konservierte Form der Transporter-Domäne. Diese unter den Gram-negativen Bakterien konservierte Transporter-Domäne scheint entwicklungsgeschichtlich als gemeinsamer Ursprung der AT-Proteine zu gelten. In folge der phylogenetischen Entwicklung resultiert durch Rekombinationen der Transporter-Domäne mit unverwandten Proteinen (der zu werdenden Passagier-Domäne) die stark heterogene Gruppe der AT-Proteine (Henderson *et al.*, 1998). Dieser heterologen Gruppe gehören vornehmlich Proteine der Pflanzen-, Tier-, und Human-pathogenen Gram-negativen Bakterien an (Henderson *et al.*, 1998). Viele Vertreter der AT-Proteine sind bereits charakterisiert worden und deren Funktionen konnten in sechs virulenz-relevante Kategorien eingeteilt werden. Viele AT-Proteine werden in die Gruppen der Adhäsine und Proteasen eingeteilt. Einzelnen AT-Proteinen sind toxische und invasive Fähigkeiten zugeschrieben, andere wiederum tragen zu Beweglichkeit oder zur Resistenz der Organismen bei (Henderson *et al.*, 1998).

Für das Autotransporterprotein EstA aus *P. aeruginosa* ist das Virulenzpotential ebenfalls beschrieben worden (Potvin *et al.*, 2003). Die enzymatische Zuordnung von der Esterase EstA, ihr Sekretionsmechanismus sowie deren Lokalisierung in der Zelle sind zwar bekannt, allerdings ist die physiologische Bedeutung des Proteins für *P. aeruginosa* bislang ungeklärt. Die enzymatische Eigenschaft sowie die Positionierung von EstA in *P. aeruginosa*, nämlich die Hydrolyse von Esterbindungen kurzer ( $\leq C_{10}$ ) Kohlenstoffketten und die Lokalisierung in der äußeren Membran unter Exponierung der katalytischen Domäne an der Zelloberfläche,

(Wilhelm, 2001) sind mögliche Indizien für die Beteiligung dieses Enzyms an der Spaltung des estergebundenen Fettsäureanteils vom Rhamnolipid. Neben der Freisetzung von Rhamnolipid aus der Zelle ist nämlich die Spaltung von Rhamnolipiden noch nicht beschrieben worden, wäre aber putativ von der Esterase durchführbar. Diese Annahme sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, um dadurch die putative physiologische Bedeutung von EstA zu determinieren.

Für alle physiologischen Untersuchungen der *P. aeruginosa* wurden in dieser Arbeit die Temperatur von 30°C und das phosphatlimitierte PPGAS-Medium benutzt (2.4). Dieses Medium erhöht die RL-Produktion in *P. aeruginosa* und findet eine breite Anwendung in den RL-Untersuchungen (Wild *et al.*, 1997). Außerdem spiegelt die begrenzte Phosphatmenge die Verhältnisse in dem Wirt wieder. Menschen, die mit Gram-negativen Bakterien infiziert werden, weisen einen in Blutplasma reduzierten Phosphatspiegel auf (Weinberg, 1974). Der physiologische Kontext, der das Rhamnolipid und das Autotransporterprotein EstA verbindet ist sicherlich die Virulenz und die Human-Pathogenität. Somit ist das Versuchsmedium bestmöglich an die Aufgabenstellung angepasst.

### **Einfluss von EstA auf die Rhamnolipidproduktion**

Die einfachste Methode ein Detergenz in Flüssigkeiten zu detektieren stellt der „drop-collapsing“-Test dar. Dieser basiert auf der Untersuchung der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten, die aufgrund von Vorhandensein eines oberflächenaktiven Detergenz herabgesetzt wird. Der Kulturüberstand einer 24 h Kultur von *P. aeruginosa* PAO1 und *estA*-Negativmutante wurde mittels dieses Tests untersucht (Abb. 9). Der Tropfen des Kulturüberstandes von *P. aeruginosa* WT hat eine in die Breite laufende, flache Form und unterscheidet sich eindeutig von dem kugelrunden, kleinstmögliche Oberfläche bildenden Tropfen des Kulturüberstandes der *estA*-Negativmutante. Der *P. aeruginosa* PAO1 weist eine gegenüber der *estA*-Negativmutante niedrigere Oberflächenspannung auf, was auf das Vorhandensein einer extrazellulären, oberflächenaktiven Substanz zurückzuführen ist, welche in der *estA*-Negativmutante entweder gänzlich fehlt oder in einer kleineren Menge synthetisiert wird.

Der Kulturüberstand der *estA*-Negativmutante weist eine gegenüber dem *P. aeruginosa* PAO1 erhöhte Oberflächenspannung auf.

Der photometrische 3-Dexoxy-Hexosen-Nachweistest (Orcinoltest) bietet die Möglichkeit das Rhamnolipid im Kulturüberstand indirekt zu quantifizieren und somit die oberflächenaktive Detergenz-Substanz näher zu charakterisieren. Die photometrischen Ergebnisse zeigen eine mit der *estA*-Deletion einhergehende signifikante Abnahme der RL-Menge (Abb. 10). Während der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) im Kulturüberstand 0,4 g/l Rhamnolipid aufweist, ist in Folge der *estA*-Deletion die RL-Menge auf 0,008 g/l gesunken. Die Überexpression der Esterase unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors im *P. aeruginosa* WT führt dagegen zu einer Überproduktion an Rhamnolipid um mehr als das zweifache der WT-Menge und beträgt 1,7 g/l. Um die produzierten Rhamnolipide zu spezifizieren gibt es die Möglichkeit der dünnschichtchromatographischen (DC) Auftrennung der Rhamnolipide entsprechend ihrer Hydrophobizität. Die DC-Auftrennung der Rhamnolipide verdeutlicht, dass der *P. aeruginosa* WT sowohl das hydrophile Mono-RL als auch das hydrophobe Di-RL synthetisieren kann (Abb. 11). Die *estA*-Deletion führt zur dünnschichtchromatographisch nicht detektierbaren RL-Menge, wohingegen EstA-Überexpression die Zunahme beider Rhamnolipide bewirkt. Die Aussagen über das Verhältnis von Mono- zu Dirhamnolipid anhand der DC-Auftrennung sind nicht zulässig. Die Mono- und Di-RL-Signale auf den DC-Platten können nämlich quantitativ nicht miteinander verglichen werden, da die Färbung rhamnospezifisch ist und daher das Signal einer Rhamnose bei Mono-RL nicht der farblichen Intensität der Di-Rhamnose bei Di-RL gegenübergestellt werden kann (Smolski, 2002). Die zusätzlich durchgeführten Kontrollen mit den Rhamnosyltransferase-Mutanten PAO1-*rhlA* bzw. RTII-2 ( $\Delta$ *rhlC*), die entsprechend ihrer Mutationen kein Rhamnolipid bzw. ausschließlich das Mono-Rhamnolipid synthetisieren, bestätigen zum einen die Kompetenz der DC-Analyse, zum anderen zeigen sie, dass die *estA*-Negativmutante der Rhamnolipid-defizienten Mutante PAO1-*rhlA* gleicht.

Die Deletion von *estA* führt zum drastischen Rückgang der RL-Menge im Kulturüberstand von *P. aeruginosa*. Die Überexpression von EstA verursacht einen gravierenden Anstieg der extrazellulären RL-Menge.

### **Beweglichkeit**

*P. aeruginosa* PAO1 verfügt über drei Fortbewegungsarten: das Schwimmen, die so genannte „twitching motility“ und das Schwärmen, die in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Lebensraums: flüssig, fest und semisolid ausgeführt werden. Während das Schwimmen

Flagellum-abhängig ist, „twitching motility“ eine Typ IV Pili-abhängige Bewegungsform darstellt, ist das Schwärmen von beiden Zellfortsätzen abhängig (Köhler *et al.*, 2000).

Das Schwärmen ist die einzige Bewegungsform, für die bereits eine Abhängigkeit von Rhamnolipid beschrieben wurde (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005). Das Rhamnolipid fördert das Schwärmen, indem es als Biodetergenz die Reibung zwischen der Zelloberfläche und dem Bewegungsuntergrund herabsetzt. Zudem wurde beschrieben, dass das Rhamnolipid die Ablösung von hydrophilem Anteil des LPS an der Zelloberfläche bewirkt (Al-Tahhan *et al.*, 2000). Diese abgelöste Masse stellt möglicherweise eine in der Konsistenz schleimige Schicht dar, die sowohl die Flagellumrotation als auch die Pillikontraktion begünstigen kann.

Während *P. aeruginosa* PAO1 ungehindert auf dem PPGAS-basierenden semisoliden Agar schwärmt, ist die stark RL-limitierte *estA*-Negativmutante nicht fähig diese Bewegungsform auszuführen (s. Abb. 12). Wie vermutet scheint das Fehlen des extrazellulären Rhamnolipids in der *estA*-Negativmutante die Fähigkeit zu Schwärmen zu unterbinden.

Die *estA*-Negativmutante produziert nur minimale Mengen des Detergenz Rhamnolipid, das sich als amphipathisches Molekül an Grenzflächen unterschiedlicher Polarität bzw. Hydrophobizität lagert und dadurch die Oberflächenreibung zwischen der Zelle und dem Habitatsuntergrund herabsetzt. Die essentielle Rolle des Rhamnolipids für diese Mobilität resultiert ebenfalls aus dem durch ihn vermittelten Abschilfern eines Anteils der LPS-Schicht von der Zelloberfläche. Die entstandene klebrige, feuchte Konsistenz aufweisende Biomasse ermöglicht während einer sessilen Lebensart die Ausführung der Bewegungsabläufe durch die Zellfortsätze. Für das Schwärmen wurde eine Abhängigkeit nicht nur von dem Rhamnolipid aber auch von dem „Quorum sensing“-System, und da vornehmlich von dem Rhl-System, nachgewiesen (Köhler *et al.*, 2000). Die *rhlR*- sowie *rhlI*-defiziente Mutanten sind nämlich schwärmunfähig, während die *lasI*- sowie *lasR*-Mutanten lediglich eine Reduktion ihrer Schwärmfähigkeit aufweisen (Köhler *et al.*, 2000). Der geringe Einfluss des Las-Systems auf die Schwärmbewegung könnte mit der hierarchischen Anordnung der beiden QS-Systeme erklärt werden (vgl. Abb. 6), denn eine Störung des Las-Systems die volle Induktion des Rhl-Systems verhindern würde. Die hier erzielten Ergebnisse implizieren eine Störung des Rhl-Systems in Folge der *estA*-Deletion, die sich in der extremen Rhamnolipidreduktion und der Schwärmdefizienz des Stammes begründen.

Die *estA*-Negativmutante ist unfähig die rhamnolipidabhängige Form der Bewegung, das Schwärmen, auszuführen.

Zusätzlich zum Schwärmen wurden die zwei anderen Beweglichkeiten das Schwimmen und „twitching motility“ untersucht (Abb. 13). In der Literatur wird für diese Beweglichkeiten kein Zusammenhang zum Rhamnolipid bzw. zur QS-Regulation gefunden. Ganz im Gegenteil wird das „twitching motility“ als QS-unabhängig reguliert bezeichnet (Beatson *et al.*, 2002). Die Untersuchungen ergab eine volle Beweglichkeit für den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und das Fehlen von Schwimm- und „twitching motility“-Bewegung für die *estA*-Negativmutante. Aufgrund der Tatsache, dass die QS-Regulation für die beiden Beweglichkeiten nicht besteht, impliziert dieser Befund, dass die *estA*-Deletion in einem anderen hierarchisch hochgestelltem Regulationssystem beschädigt sein muss.

Die Deletion der Esterase EstA in *P. aeruginosa* verändert die Mobilität des Stammes. Im Gegensatz zum *P. aeruginosa* WT ist dieser weder fähig das QS-abhängige Schwärmen, noch das Schwimmen oder „twitching motility“ auszuführen.

Die *estA*-Negativmutante ist gänzlich unbeweglich. Während das Schwärmen als QS-regulierte und RL-abhängige Bewegung beschrieben ist, wurde zunächst eine Schädigung des QS-Systems genauer des Rhl-Systems vermutet. Die Resultate der Schwimm- und „twitching-motility“-Defizienz für die *estA*-Negativmutante, die keine QS-regulierten Prozesse darstellen benötigen einen anderen Erklärungsansatz. Dieser stellt die Esterase regulatorisch in den Vordergrund. Die unterschiedlichen Befunde bezüglich der Beweglichkeit der *P. aeruginosa* PAO1 und der *estA*-Negativmutante, zusammen mit Befunden der differentiellen RL-Produktion könnten auf eine essentielle noch ungeklärte Rolle der Esterase EstA in diesen physiologischen Prozessen von *P. aeruginosa* deuten.

### **Zelloberflächen-Hydrophobizität**

Als nächstes wurde die Zelloberflächen-Hydrophobizität des *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante untersucht. Die Adhäsion der Mikroorganismen resultiert aus der Interaktion der Zelloberfläche mit einer Oberfläche und wird durch Rezeptoren und Anhefte an der Zelloberfläche beeinflusst (Busscher & Weerkamp, 1987). Die Hydrophobizität mikrobieller Zelloberflächen wird ubiquitär als Hauptfaktor der Adhäsion angesehen (Rosenberg & Kjelleberg, 1986; Rosenberg & Doyle, 1990). Das Rhamnolipid übt einen Einfluss auf die Zelloberflächenbeschaffenheit aus. Das Abstreifen der hydrophilen LPS

Bestandteile durch dieses Detergenz trägt zur Hydrophobizität der Zelloberfläche bei (Al-Tahhan *et al.*, 2000).

Zur Überprüfung dieser Tatsache wurde der Zelladhäsionstest an n-Hexadekan durchgeführt. An diese hydrophobe Substanz binden Zellen mit hydrophober Zelloberfläche (ZO) stärker als Zellen mit einem hydrophilen Zelloberflächen-Charakter. Die Untersuchung der ZO-Hydrophobizität ergab für den *P. aeruginosa* PAO1 WT einen hydrophoben und für die *estA*-Negativmutante einen hydrophilen Oberflächencharakter und bestätigt somit, dass Zellen bei Anwesenheit von Rhamnolipid hydrophiler sind (Abb. 14).

*estA*-Negativmutante weist gegenüber der hydrophoben Zelloberfläche des *P. aeruginosa* PAO1 eine hydrophile Zelloberflächenbeschaffenheit.

Die Produktion von Rhamnolipid im *P. aeruginosa* PAO1 bedingt die einhergehende ZO-Hydrophobizität (Zhang & Miller, 1994; Herman *et al.*, 1997; Chen & Zhu, 2005). Unter Vorhandensein hydrophober Substrate wird von einer RL-abhängigen Entlassung LPS-Bestandteile von der äußeren Zellwand von *P. aeruginosa* berichtet, die mit der parallelen Zunahme der ZO-Hydrophobizität einhergeht (Chen & Zhu, 2005). Die äußere Membran Gram-negativen Bakterien ist asymmetrisch aufgebaut und besteht aus der inneren Phospholipidschicht und der äußeren Lypopolysaccharid (LPS)-Schicht. Das LPS ist amphipatisch und besteht aus dem hydrophoben LipidA Anteil und dem kovalent daran bindenden hydrophilen Polysaccharidanteil, das seinerseits aus dem Oligosaccharid, der zentralen Core-Region und dem stark variablen O-Antigen besteht. Die O-spezifischen Seitenketten bestehen aus N-acetylierten Aminozuckern und Uronsäuren. In Abhängigkeit von Vorhandensein dieser O-spezifischen Seitenketten wird zwischen rauhem (ohne O-spezifische Seitenketten; „rough“-LPS, R-LPS) und glattem LPS (mit O-spezifischen Seitenketten; „smooth“-LPS, S-LPS) unterschieden (Knirel *et al.*, 2001). Das glatte LPS wird noch in zwei Arten untergliedert. Das „B-Banden“ LPS, das das typische bakterielle LPS mit langen Polysaccharidketten darstellt und das „A-Band“-LPS, dessen Polysaccharidketten viel kürzer sind (Rivera *et al.*, 1988). Unterschiedliche LPS-Schichten können in einem *P. aeruginosa* Stamm parallel vorkommen. Das Rhamnolipid verursacht allerdings das Abschilfern des hydrophilen „B-Band“ LPS was die Hydrophobizität der Zelloberfläche verursacht (Norman *et al.*, 2002).

Umgekehrt führt der Mangel an Rhamnolipid im Kulturüberstand der *estA*-Negativmutante zum Fehlen dieses Effektes. Die Zelloberfläche bleibt unverändert und daher hydrophil (Al-

Tehhan *et al.*, 2000). Der Stamm ist somit nicht in der Lage einen direkten Kontakt zu einer unpolaren Oberfläche aufzunehmen. Dies wirkt sich ebenfalls bei der Verwertung hydrophober C-Quellen aus. Die *estA*-Negativmutante sollte dann nicht mehr in der Lage sein einen direkten Kontakt zu einer unpolaren Verbindung herzustellen, um diese für seinen Stoffwechsel zu erschließen. Das Fehlen des Rhamnolipids, das als Folge aus der *estA*-Deletion resultiert, würde demzufolge einen physiologischen Nachteil in der Nährstoffversorgung des Stammes mit sich bringen.

### **Biofilmbildung**

In ihren natürlichen Habitaten leben die Bakterien an einen Untergrund haftend, in dem Zellverband der Biofilme (Costerton *et al.*, 1995). Das Rhamnolipid sowie die Beweglichkeit, spielen eine essentielle Rolle in der primären Phase der Biofilmbildung. Es ist bekannt, dass die Beweglichkeit und da vor allem „twitching motility“ der Zellen die initiale Anheftung der Zellen in der Biofilmbildung bedingt (O’Tool & Kolter, 1998). Das Haften der Zellen an eine Oberfläche bedingt den Ursprung eines Biofilms. In der weiteren Phase der Biofilmentwicklung wird dem Rhamnolipid selbst eine entscheidende Rolle zugewiesen. Das Rhamnolipid ist für den ausgeglichenen Nährstofftransport zu den Zellen und Syntheseabfalltransport von den Zellen weg verantwortlich, indem er die Transportkanälchen freihält (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). Zum anderen ist das Rhamnolipid für das Ablösen von Zellen aus der Biofilmgemeinschaft verantwortlich (Espinosa-Urgel, 2003; Boles *et al.*, 2005).

Die Biofilmbildung vereint die Einflüsse der Beweglichkeit, der Rhamnolipidproduktion und der Zelloberflächen-Beschaffenheit. Somit sollte die Untersuchung des Biofilmes für die hier behandelte Problemstellung wichtige Ergebnisse erbringen.

Die Untersuchung der Biofilme von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und *estA*-Negativmutante zeigt, wie vermutet deutliche Unterschiede in der Struktur, Architektur und Beschaffenheit der sessilen Lebensform (Abb. 15). Während nach 24 h, dem Zeitpunkt der initialen Adhäsion, die WT Zellen die Oberfläche des Glasobjektträgers gleichmäßig besiedeln, bildet die *estA*-Negativmutante Zellaggregationen. Die Zellen der Mutante liegen nicht einzeln vor, sondern häufen sich vermehrt an einer Stelle, unbesiedelte Flächen des Substratum freilassend. Zu dem Zeitpunkt der irreversiblen Bindung, nach 48 h, verstärkt sich der initiale Charakter des klonalen Wachstums. Die Mutante entwickelt große, vielzellige Mikrokolonien, zwischen den unbesiedelten Flächen zu finden sind, die kaum vereinzelte Zellen aufweisen.

Die WT-Zellen besiedeln den Lebensraum plan und bedecken immer mehr das gesamte Substratum. Nach 72 h hat die Reifungs-Phase eingesetzt. Der WT-Biofilm ist dicker aber lockerer geworden. Die Zellaggregate der *estA*-Negativmutante expandieren sowohl in die Höhe als auch in die Breite und wachsen so aufeinander zu, wobei sie sehr dicht besiedelt sind und durch das Wachstum jetzt immer mehr Substartraum bedecken.

Die standardmäßig bei der Biofilmuntersuchung durchgeführte COMSTAT-Berechnung (Heydorn *et al.*, 2000) der Biomasse, der mittleren Biofilmdicke und der prozentualen Oberflächenbedeckung bestätigt die mittels CLSM-Aufnahmen wahrgenommenen Befunde (Abb. 16). Die Biofilmmasse und maximale Biofilmdicke des *P. aeruginosa* WT liegt bis auf den Zeitpunkt von 24 h unter der der *estA*-Negativmutante, wobei der Unterschied zum Zeitpunkt von 48 h am stärksten zu verzeichnen ist. Zu diesem Zeitpunkt ist die Biofilmmasse der *estA*-Negativmutante dreimal so groß und die maximale Biofilmdicke fünfmal höher als die des WT. Die Oberflächenbelegung des *P. aeruginosa* WT steigt von 24 zu 48 h von 42,6 % auf 93,2 %, die der *estA*-Negativmutante von 9,1 % auf 68,9 %. Bis zu dem Zeitpunkt von 72 h steigt die prozentuale Oberflächenbelegung für die *estA*-Negativmutante noch mal um 28 %, während die des WT um 26,8 % abnimmt. Zusammenfassend kann aus diesen Daten für den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) zunächst ein ebenmäßiger, kontinuierlich dünner Biofilm bestätigt werden, worauf eine Auflockerung des Biofilmes mit zunehmender Höhe und abnehmender prozentualen Oberflächenbedeckung einhergeht. Die *estA*-Negativmutante hingegen besiedelt das Substratum ungleichmäßig in Form von hohen dichten Zellaggregaten, die in Folge des Wachstums immer mehr Oberfläche einnehmen.

*estA*-Negativmutante bildet einen heterogenen Biofilm, der gegenüber dem planen und homogenen *P. aeruginosa* WT Biofilm charakteristische Aggregationen in Mikrokolonien-Strukturen aufweist.

Die Zeitpunkte der Biofilmbetrachtung sind willkürlich gewählt worden. Die Stadien der Entwicklung sind zeitlich nicht exakt festlegbar und hängen von Kultivierungsbedingungen sowie dem stammspezifischen Wuchsverhalten ab. Da Unterschiede in der Kultivierung aufgrund des Versuchsaufbaus auszuschließen sind, befinden sich die Stämme, da sie parallel mit der gleichen Zellzahl angeimpft wurden, in den gleichen Stadien deren Biofilmentwicklung. Die gravierenden Unterschiede im Biofilmcharakter sind folglich durch die Deletion des Esterasegens bedingt.

Die unterschiedlichen Phänotypen von *P. aeruginosa* PAO1 und *estA*-Negativmutante, wie Beweglichkeit, Zelloberflächenbeschaffenheit und Rhamnolipidmenge werden in der Biofilmarchitektur beider Stämme deutlich sichtbar. Die Unbeweglichkeit der *estA*-Negativmutante spiegelt sich stark in der Struktur des Biofilms wieder. Während sich bewegliche *P. aeruginosa* WT Zellen über dem vorhandenen Substratum ausbreiten und einzeln neue Räume besiedeln, ist das für die unbeweglichen Zellen der *estA*-Negativmutante undurchführbar. An dem Anheftungsort angelangt, können sich diese von dort nicht fortbewegen, wachsen klonal und bilden die auffälligen Zellaggregate. Ein weiterer Punkt ist die hydrophile Zelloberfläche, die eine veränderte Anheftung der Zellen der *estA*-Negativmutante an das Biofilmsubstrat zur Folge zu haben scheint. Dies ist schon der veränderten anfänglichen Biofilmarchitektur zu entnehmen. Die Zellen der *estA*-Negativmutante haften nicht vereinzelt an der Glasoberfläche, sie scheinen eher aneinander zu haften und bilden so schneller die in der CLSM sichtbare Mikrokolonien aus, da gleichpolare Flächen danach streben aneinander zu binden, während entgegengesetzte Polaritäten zur Abstoßung neigen. Somit sind die eher hydrophilen Zellen der *estA*-Negativmutante daran gehindert an die hydrophobe Glasoberfläche zu binden, während die eher hydrophoben Zellen von *P. aeruginosa* PAO1 unbehindert binden. Das Fehlen des Rhamnolipids beeinflusst die Biofilmarchitektur der *estA*-Negativmutante ebenfalls. Die Auflockerung des *P. aeruginosa* WT-Biofilmes geschieht durch das Freisetzen von Bakterien aus dem Biofilmverband und ist durch das Rhamnolipid bedingt. In der *estA*-Negativmutante fehlt das Rhamnolipid, daher bleibt der Biofilm in seiner Beschaffenheit kompakt. Die Mikrokolonien der *estA*-Negativmutante weisen keine freien Kanäle bzw. Zwischenräume auf und die Zelldichte in diesen Zellanhäufungen ist relativ hoch. Das Aneinanderhaften der Zellen und die fehlende Kanalbildung kann auf das Fehlen des Rhamnolipids zurückgeführt werden (Davey *et al.*, 2002).

Das Anheften von Zellen an Oberflächen und die strukturierte homogene Biofilmarchitektur sind als Resultat der *estA*-Deletion gestört.

Der Untersuchung der RL-limitierten *estA*-Negativmutante folgte die des RL-überproduzierenden *EstA*-Überexpressionsstammes im *P. aeruginosa* PAO1. Die Entwicklung des Biofilms von *P. aeruginosa* WT, der plasmidkodierte *estA* überexprimiert vollzieht sich weitestgehend ähnlich der des *P. aeruginosa* WT alleine. Der Biofilm weist jedoch nach 72 h, zum Zeitpunkt der Ablösung, im relativ dicht besiedelten Biofilm unbesiedelte Flächen auf,

die als Folge von Abdriften der Zellaggregate aus dem Biofilmverband zu betrachten sind (Abb. 17). Das Freisetzen von Bakterien aus dem Biofilm resultiert aus der erhöhten Rhamnolipidproduktion des Stammes.

In Folge der RL-Überproduktion setzt die Ablösungsphase der Biofilmentwicklung ein.

Der EstA-Überexpressionsstamm produziert im Vergleich zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT) eine erhöhte RL-Menge und diese Detergenz ist an dem Ablösungsvorgang maßgeblich beteiligt (Stoodley, 2001; Boles, 2005). Rhamnolipide lagern sich zwischen den Zellen und der Besiedlungsoberfläche, setzen so die Anheftungskräfte herab und führen zum Ablösen der Zellen vom Untergrund. Auch die Tatsache, dass die Expression des *rhlAB*-Operons, der für die RL-Synthesegene kodiert, in Biofilmen erst in den Mikrokolonientiefen ab 20 µm detektiert wurde (Lequette & Greenberg, 2005), spricht für das rhamnolipidvermittelte Ablösen der Zellaggregate vom Biofilmuntergrund.

Das gleiche Ergebnis konnte ebenfalls für Biofilme in Reagenzgläsern beobachtet werden (Abb. 18). Die Kristallviolettfärbung zeigt bereits nach 24 h ein vergleichbares Resultat. Die Zahl der am Reagenzglas haftender Zellen nimmt als Folge der EstA-Überexpression im WT in Relation zum *P. aeruginosa* WT um 31 % ab.

Das Ablösen des Biofilms und somit das Erreichen der Ablösungsphase ist von dem Nährstoffangebot und daraus resultierendem Entwicklungszyklus der Zellen abhängig. Da die Nährstoffe im Reagenzglas bereits nach 24 h von der sich vermehrenden Population in dem Reagenzglas größtenteils erschöpft sind, setzt die Ablösungsphase schneller als bei der kontinuierlichen Nährstoffversorgung in Durchflusszellen ein.

In früheren Studien wurde bereits beschrieben, dass das Rhamnolipid einen Einfluss auf die Biofilmarchitektur ausübt. Das Biodetergenz ist dafür verantwortlich unbesiedelte Räume, in Form von Kanälen, zwischen den Biofilmzellen freizuhalten. Durch diese Kanäle werden Nährstoffe zu den Zellen hin und Abfälle von den Zellen weg transportiert, wodurch eine Nährstoffbalance im Biofilm gewährleistet wird. Gleichzeitig sorgt das Rhamnolipid dafür, dass diese Kanäle nicht durch *P. aeruginosa*-eigene Zellen aber auch nicht durch fremde Organismen besiedelt werden (Davey *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2002). Dabei ist das Rhamnolipid an dem aktiven Ablösen einzelner Bakterien bis ganzen Bakterienkolonien von dem Biofilmverband beteiligt (Stoodley *et al.*, 2001; Boles *et al.*, 2005). Das Abtrennen der Mikroorganismen von der Biofilmgemeinschaft stellt eine wichtige physiologische Eigenschaft dar, die das Zurückkehren in planktonische Lebensweise bei ungeeigneten

Nischenverhältnissen, beispielsweise Nährstoffmangel, ermöglicht und somit das Aufsuchen einer geeigneten Lebensumgebung und das Fortbestehen der Population sichert. Die Expression der RL-Synthesegene in tiefen Biofilmschichten, die den nährstoffarmen Biofilmschichten entsprechen, mag auch hierbei relevant sein (Lequette & Greenberg, 2005). Das Ablösen der Zellen spielt nicht nur in der freien Natur, sondern auch bei der Infektionspathogenese eine entscheidende Rolle, wodurch die Infektion weiterer noch nicht befallener Organbereiche durch die abgelösten krankheitserregenden Zellen ermöglicht wird (Parsek & Sigh, 2003).

### **„Quorum sensing“-Systeme**

Das QS-System stellt ein kompliziertes Netzwerk von Regulationsmechanismen dar, für den immer neue beeinflussende Faktoren beschrieben werden. Dieses komplexe System ist nicht nur an der Wahrnehmung von Signalmolekülen und dadurch resultierenden Induktion bestimmter Zielgene beteiligt. Vielmehr erfolgt die Regulation auf verschiedenen Ebenen zu unterschiedlichen Wachstumsphasen abhängig von äußeren Bedingungen des Bakteriums (Schuster *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). Zu den globalen Regulatoren des QS-Systems zählen das Las- und Rhl-System sowie das „Pseudomonas quinolon“-Signal-(PQS)-System (Fuqua *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1999). Das Las-System ist dem Rhl-System hierarchisch höhergestellt. Beide Systeme regulieren zell-dichteabhängig unter Mitwirkung ihrer Signalmoleküle der Acetylhomoserinlactone (AHL). Das Las-System verfügt über 3-oxo-C12-HSL und das Rhl-System über C4-HSL, die jeweils in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert werden. Das PQS-System wird als Stationärphasen-Regulatorsystem bezeichnet. Das „Pseudomonas quinolon“-Signal ist ein 2-heptyl-3-hydroxy-4-Quinolon, wird komplex in Abhängigkeit von dem Verhältnis von 3-oxo-C12-HSL zu C4-HSL reguliert und steht regulatorisch zwischen dem Las und dem Rhl-System (McKnight *et al.*, 2000). Zusätzlich zu den globalen Regulatoren spielen viele verschiedene Mechanismen eine modulierende Wirkung auf das QS-System.

### **Rhl- und Las-System**

Die bislang beschriebenen Phänotypen der *estA*-Negativmutante konnten zum großen Teil mit der starken Reduktion von Rhamnolipid plausibel erklärt werden. Die Deletion der Esterase scheint die drastische Abnahme der RL-Menge zu verursachen. Nicht nur die Rhamnolipid-defizienz sondern auch das Schwärmen und die Biofilmbildung sind QS-abhängig reguliert

(O'Toole & Kolter, 1998; Van Delden and Iglewski, 1998; Köhler *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2003; Déziel *et al.*, 2003). Daher liegt der Schluss nahe, dass die Esterase EstA nicht nur die RL-Synthese beeinflussen könnte, sondern ein übergeordnetes Kontrollmechanismus, wie z. Bsp. das „Quorum sensing“-System, beeinflusst. Die Störung des QS-Systems in Folge der *estA*-Deletion würde nämlich alle QS-abhängigen Phänotypen der *estA*-Negativmutante erklären können. Der direkte Einfluss der *estA*-Deletion auf die RL-Synthese bzw. deren indirekte Einfluss über den QS-System sollte im Folgenden durch die Untersuchung der Signalmoleküle von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante geklärt werden. Der Nachweis der Signalmoleküle erfolgte mit Hilfe von Sensorbakterienstämmen. Zu diesen Sensorstämmen zählt *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), das die langkettige Signalmoleküle (C12-HSL bis C6-HSL) des Las-Systems detektiert und *Chromobacterium violaceum* CV026 welches die kurzkettigen AHL-Moleküle (C6-HSL und C4-HSL) des Rhl-Systems von *P. aeruginosa* nachweist. Diese Stämme sind in Folge gentechnischer Veränderung unfähig selber AHL-Signalmoleküle zu produzieren, reagieren jedoch auf deren externe Zugabe als Sensoren. Bei Anwesenheit geeigneter AHL-Moleküle produziert *A. tumefaciens* NTL4 die  $\beta$ -Galaktosidase, wodurch das zusätzlich zur Verfügung gestellte Substrat X-Gal in ein blaues Produkt umgesetzt wird, der Stamm *C. violaceum* CV026 reagiert auf AHL-Zugabe mit der Synthese des violetten Farbstoffes Violacein.

*P. aeruginosa* produziert vor allem 3-oxo-C12-HSL und C4-HSL. Während das kurzkettige C4-HSL frei über die *P. aeruginosa*-Membran diffundieren kann, wird das langkettige 3-oxo-C12-HSL neben der langsamen Diffusion über die Membran zusätzlich über einen aktiven Exportmechanismus (MexAB-OprM Pumpe) aus der Zelle befördert (Pearson *et al.*, 1999).

In beiden Stämmen *P. aeruginosa* (WT) und der *estA*-Negativmutante konnten mit dem *A. tumefaciens* Stamm die 3-oxo-C-12, 3-oxo-C-10 und 3-oxo-C-8-AHLs detektiert werden (s. Abb. 19A). Die Menge der AHLs liegt für die *estA*-Negativmutante für alle nachgewiesenen Signalmoleküle unterhalb der für *P. aeruginosa* PAO1 (WT). Zusätzlich ist im WT das 3-oxo-C-6-AHL in sehr geringer Menge nachweisbar. *A. tumefaciens* reagiert am sensitivsten auf die substituierten 3-oxo-AHLs, aber vor allem auf das, normalerweise von ihm selber produzierte Signalmolekül 3-oxo-C-8-AHL. Das ist der Grund wieso der Detektionsspot für das an der C-3-Position substituierte C-8-AHL stärker zu sehen ist als der für das am stärksten in *P. aeruginosa* vertretene 3-oxo-C-12-AHL.

Mit dem Sensorstamm *C. violaceum* CV026 konnte im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) das C6-HSL in einer höheren Menge detektiert werden als in dem von der *estA*-

Negativmutante (s. Abb. 19B). Das C4-HSL ist in der *estA*-Negativmutante nicht vorhanden. Entsprechend des eigenen QS-Systems reagiert der Stamm *C. violaceum* sensitiver gegenüber nicht-substituierten Signalmolekülen. Eine erhöhte Sensitivität zeigt er allerdings nur gegenüber dem homologen C6-HSL. Nichtsdestotrotz weist die *estA*-Negativmutante eine Defizienz des kurzen Signalmoleküls (C4-HSL) auf. C4-HSL ist das Signalmolekül des Rhl-Systems in *P. aeruginosa* wodurch unter anderem die RL-Synthese kontrolliert wird. Fehlt das C4-HSL in der *estA*-Negativmutante wird der RL-negative Phänotyp erklärbar, ohne dass EstA direkt mit dem Rhamnolipid interagiert.

*estA*-Negativmutante produziert im Gegensatz zum *P. aeruginosa* PAO1 kein C4-HSL.

## PQS

Der Untersuchung der AHL-Signalmoleküle der „Quorum-sensing“ Systeme Las und Rhl folgte die des „Pseudomonas-quinolon“-Signals (PQS). PQS ist chemisch betrachtet wie bereits erwähnt ein 2-heptyl-3-hydroxy-4-Quinolon und gehört zu der 4-Quinolon-Familie, welche für deren antibiotische Aktivität bekannt ist (Pesci *et al.*, 1999). Neben den Homoserinlaktonen (3-oxo-C12-HSL und C4-HSL) ist PQS ein in seiner Art einzigartiges Signalmolekül von *P. aeruginosa*. Anders als die Homoserinlaktone-Signalmoleküle wird PQS erst gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase produziert und erreicht eine maximale Konzentrationen in der stationären Phase (Diggle *et al.*, 2003; Lepine *et al.*, 2003). Die PQS-Produktion ist positiv von dem 3-oxo-C12-HSL des Las-Systems kontrolliert, dabei ist die PQS-Bioaktivität von dem Rhl-System abhängig (Pesci *et al.*, 1999; McKnight *et al.*, 2000; Diggle *et al.*, 2003). Das PQS erhöht seinerseits die Expression von *rhlI* und *rhlR*, wodurch das PQS essentiell für die Aktivierung bestimmter Rhl-kontrollierter Gene ist (Diggle *et al.*, 2003). Die Pyocyanin-Synthese, ebenso wie die Synthese der Elastase LasB zählen zu den vom Rhl-System kontrollierten Phänotypen, die von der Anwesenheit von PQS in der stationären Phase abhängig sind (Pesci *et al.*, 1999; Diggle *et al.*, 2003). Insgesamt kann das PQS in der „Quorum sensing“- Hierarchie zwischen das Las- und Rhl-System eingeordnet werden. Dabei beeinflusst es positiv das Rhl-System und damit die Produktion der durch RhlR und C4-HSL regulierter Virulenzfaktoren, u. a. Pyocyanin (McKnight *et al.*, 2000; Gallagher *et al.*, 2002). Neben der Kontrollfunktion des PQS über multiple Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* (Pesci *et al.*, 1999; Diggle *et al.*, 2003) wurde das PQS in *P. aeruginosa*

Stämmen von CF-Patienten nachgewiesen, was impliziert, dass das PQS als Signal für die Besiedlung der Lungen als Habitat signifikant ist (Collier *et al.*, 2002).

Der Nachweis von PQS für *P. aeruginosa* WT und die *estA*-Negativmutante erfolgte zu unterschiedlichen Phasen des Zellwachstums, nach 16, 20, 24 und 48 h. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Stämmen (Abb. 20). Für den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) konnte zu jedem Untersuchungszeitpunkt das PQS detektiert werden, wobei die größte Menge nach 16 h Kultivierung verzeichnet wurde. Im Gegensatz dazu kann für die *estA*-Negativmutante keine PQS-Produktion nachgewiesen werden, was auf einen Defekt in der Synthese von PQS bzw. der Signalübertragung zu PQS zu deuten ist. Das Defizit am PQS in der *estA*-Negativmutante stellt einen weiteren Phänotyp des Stammes dar.

Es gibt Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Rhamnolipidsynthese und dem PQS-Vorkommen. Calfee *et al.* wiesen nach, dass das Rhamnolipid analog dessen Funktion langkettige Kohlenwasserstoffverbindungen in Lösung zu überführen ebenfalls die PQS-Löslichkeit fördert, woraus eine PQS-Bioaktivitätszunahme resultiert (Calfee *et al.*, 2004). Die hier erbrachten Ergebnisse können ebenfalls auf eine Korrelation zwischen dem PQS- und RL-Vorkommen im Kulturüberstand hinweisen. Die in Folge der *estA*-Deletion eingetretene maximale Reduktion der RL-Menge könnte der limitierende Faktor für die Löslichkeit und dadurch das Vorkommen an extrazellulärem PQS sein.

Wiederum könnte der Einfluss von PQS auf das Rhl-System (Diggle *et al.* 2003) die Rhamnolipidsynthese bedingen (s. Abb. 6). In diesem Konzept würde der Esterase EstA eine PQS-kontrollierende Funktion zugeschrieben werden müssen, das heißt in der „Quorum sensing“-Kaskade oberhalb des PQS eingreifen.

#### *estA*-Negativmutante weist im Gegensatz zum *P. aeruginosa* WT kein PQS auf.

Um eine indirekte Bestätigung des veränderten „Pseudomonas-quinolon“-Signals zu erbringen, wurden die PQS-anhängigen Phänotypen wie Pyocyanin-Produktion und Elastase LasB-Produktion untersucht.

### **Pyocyanin**

Das Pyocyanin ist ein Phenazinderivat und ein Virulenzfaktor von *P. aeruginosa*, der die Cilienbewegung der Lungenepithelzellen hemmt und Apoptose von Granulozyten induziert (Ulmer *et al.*, 1990; Whiteley *et al.*, 1999; Usher *et al.*, 2002). Das Pyocyanin ist ein blaues

Pigment, das zusammen mit der Produktion des Siderophores Pyoverdin für die grün-blaue Färbung der Kulturen sorgt. Die Pyocyanin-Synthese wird ebenso wie die Rhamnolipid-Synthese durch Phosphatmangel induziert und ist sowohl von dem Rhl-System als auch vom PQS-reguliert (Pearson *et al.*, 1997; Diggle *et al.*, 2003; Slater & Medina *et al.*, 2003).

Die Pigmentierung der *P. aeruginosa* Kultur des WT und der *estA*-Negativmutante unterscheiden sich deutlich während der Inkubation im phosphatlimitierten PPGAS-Medium sowie auf PPGAS-basierenden Agarplatten. Um die Pyocyanin-Menge zu quantifizieren wurde das Pyocyanin extrahiert und photometrisch gemessen (Abb. 21). Die *estA*-Negativmutante produziert nur sehr geringe Pyocyanin-Mengen von 0,41 mg/ml, während für den *P. aeruginosa* WT das Siebenfache detektiert wurde (3,1 mg/ml). Die PQS-Defizienz der *estA*-Negativmutante scheint sich somit auch negativ auf die Pyocyanin-Synthese ausgewirkt zu haben.

*estA*-Negativmutante produziert nur geringe Mengen PQS-reguliertes Pyocyanin.

### **Elastase LasB**

LasB ist eine Elastin-hydrolysierende Protease von *P. aeruginosa*, die mittels des Xcp-Apparates aus der Zelle entlassen wird (Tomassen *et al.*, 1992). Neben der LasA-Protease und alkalischen Protease ist die Elastase LasB ein wichtiger Virulenzfaktor von *P. aeruginosa*, die der Enzymfamilie der Proteasen zugehören (Nicas *et al.*, 1985; Tamura *et al.*, 1992). Die alkalische Protease weist ein breites Substratspektrum auf, ihre Aktivität ist allerdings 10-fach geringer als die der Elastase LasB (Moriyama & Homma, 1985). Die Expression der Elastase LasB ist vom „Quorum sensing“-System reguliert und zwar hauptsächlich von dem Las- aber im geringen Masse auch von dem Rhl-System (Brint & Ohman, 1995). Pesci *et al.* haben nachgewiesen, dass die Expression des Elastase kodierenden *lasB*-Gens von dem „Pseudomonas-quinolon“-Signal PQS kontrolliert wird (Pesci *et al.*, 1999).

Um diese Gegebenheit für den PQS-defizienten Stamm der *estA*-Negativmutante zu überprüfen, wurde die proteolytische Eigenschaft der *estA*-Negativmutante mittels Indikatorplatten und Zymogramm-Gel untersucht (Abb. 22). Das Ergebnis des Indikatorplattentests, der einen allgemein geringeren proteolytischen Charakter für die *estA*-Negativmutante festlegte, bestätigte sich ebenfalls in dem Zymogramm-Gel. Gemessen am *P. aeruginosa* WT geht die *estA*-Deletion mit einer Defizienz der LasB Proteaseaktivität

einher. Die *estA*-Negativmutante ist in der proteolytischen Eigenschaft gegenüber Elastase der *lasB*-Mutante gleichzustellen. Die Überproduktion der Esterase in der *estA*-Negativmutante hat zur Folge, dass das LasB wieder WT-ähnliche Aktivität aufweist. Zusätzlich ist ein Rückgang der alkalischen Proteaseaktivität gegenüber dem *P. aeruginosa* WT zu verzeichnen. Die alkalische Protease ist allerdings anders reguliert als das *lasB*-Gen, wodurch dieses Ergebnis nicht auf die PQS- bzw. EstA-Anwesenheit zurückgeführt werden kann.

Die für unsere Fragestellung relevante PQS-abhängige LasB-Produktion ist in der *estA*-Negativmutante eindeutig gestört und dieser Phänotyp konnte mittels Komplementation mit Esterase wiederhergestellt werden. Dies könnte auf eine wiederhergestellte PQS-Synthese und der daraus folgenden Produktion des LasB zurückgeführt werden. Dies würde bedeuten EstA übt Einfluss auf der Ebene der Signalübertragung zu PQS aus. Somit wären die nachgeschalteten Glieder in der Kontrollkette wie Pyocyanin und LasB ebenfalls blockieren. Auf der anderen Seite kann die wiedererlangte RL-Produktion des Komplementationsstammes die PQS-Löslichkeit und dadurch auch die Aktivität gefördert haben.

#### *estA*-Negativmutante weist eine Abnahme der Aktivität der Elastase LasB auf.

Die Produktion von AHL-Signalmolekülen scheint in der *estA*-Negativmutante im Vergleich zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT) insgesamt herunterreguliert zu sein, der auffälligste Unterschied liegt allerdings im völligen Fehlen des Rhl-Signalmoleküls C4-HSL und des „Pseudomonas-quinolon“-Signals (PQS).

Viele der QS-regulierten Phänotypen der *estA*-Negativmutante lassen sich durch das Fehlen von Rhamnolipid erklären. Allerdings wäre die putative Annahme einer übergeordneten Stellung von EstA, die einen Einfluss auf das QS- und PQS-System hätte, ebenfalls vertretbar. In der hierarchischen Reihenfolge der Regulatorsysteme steht das Las-System über dem PQS-System und dieser wiederum über dem Rhl-System (s. Abb. 6). Unter der strikten Kontrolle des PQS-Systems steuert das Rhl-System die Produktion von Rhamnolipid, LasB und Pyocyanin sowie den Vorgang des Schwärmens (Van Delden & Iglewski, 1998). Die Reduktion all dieser Substanzen bzw. der Bewegungsform ist in der *estA*-Negativmutante gegeben. Es ist denkbar, dass die Esterase EstA in diesem Regelkreis an der Übertragung der Information zum PQS bzw. zum Rhl-System eine putative Rolle spielen könnte. Der Eingriff an beiden Stellen der Regulation wäre putativ vorstellbar. Ein direkter Einfluss von EstA auf das Rhl-System könnte die C4-HSL-Reduktion bewirken, die ihrerseits einen Einfluss auf das PQS ausüben würde. Die PQS-Bioaktivität ist nämlich von dem Verhältnis von C4-HSL zu 3-

oxo-C12-HSL abhängig (Pesci *et al.*, 1999). Deshalb könnte eine C4-HSL-Defizienz die PQS-Defizienz zur Folge haben. Andererseits würde der Einfluss von EstA auf der Ebene von PQS dessen Produktion bzw. Aktivität schädigend, das Rhl-System negativ beeinflussen können. Die Kontrollwirkung von PQS über das Rhl-System ist bereits für die Rhamnolipid- und Pyocyanin-Synthese beschrieben worden (McKnight *et al.*, 2000; Gallagher *et al.*, 2002; Diggle *et al.*, 2003), daher könnte umgekehrt die PQS-Defizienz die C4-HSL-Defizienz bedingen.

### **Komplementation des *estA*-Deletionsphänotyps**

Um die physiologischen Gegebenheiten der *estA*-Negativmutante weiterführend zu erklären, wurde zunächst der Versuch der Komplementation ausgewählter Phänotypen unternommen. Die mögliche Restaurierung dieser physiologischen Prozesse sollte nähere Information zu der Aufgabe der Esterase EstA in der jeweiligen Fragestellung bringen.

Die Beweglichkeit und da vor allem das QS-regulierte Rhl-System-abhängige Schwärmen wurde als ein zentraler natürlicher Prozess ausgewählt. Der Vollständigkeit wegen wurden allerdings alle Bewegungsarten, auch die QS-unabhängigen Bewegungsformen wie Schwimmen und „twitching motility“ untersucht (Beatson *et al.*, 2002). Die *estA*-Negativmutante ist unbeweglich, so würden sich bereits kleine positive Auswirkungen schnell in Form von Bewegungsspuren deutlich bemerkbar machen. Durch die Zugabe des Rhl-System-Signalmoleküls C4-HSL in die Beweglichkeitsplatten der C4-HSL-defizienten *estA*-Negativmutante sollte überprüft werden, ob diese die Beweglichkeit wiedererlangt. Die Zugabe von 2 bis zu 10  $\mu\text{M}$  C4-HSL führte allerdings zu keiner Veränderung der jeweiligen Beweglichkeitsform der *estA*-Negativmutante (Abb. 23).

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht wie sich die Zugabe von Rhamnolipid auf die Beweglichkeit von der *estA*-Negativmutante auswirkt. Das Rhamnolipid ist in der *estA*-Negativmutante nur geringfügig vorhanden und beeinflusst einige der Phänotypen dieses Stammes. Die Zugabe von 0,4 g/l Rhamnolipid, der Menge die normalerweise vom *P. aeruginosa* PAO1 (WT) produziert wird, wurde in den Beweglichkeitsagar hinzugegeben. Als Ergebnis konnte keine Komplementation der Beweglichkeit durch externe RL-Zugabe verzeichnet werden (Abb. 25). Mehr noch, die Zugabe von Rhamnolipid zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT) führte zu einem unerwartetem Ergebnis, da dieser Stamm jetzt ebenfalls nicht mehr fähig war sich zu bewegen. Weder durch Schwärmen noch durch Schwimmen oder „twitching motility“.

Dieses Phänomen wird wahrscheinlich dadurch bedingt sein, dass kürzlich RL als Stoff identifiziert wurde, welches andere Kolonien des gleichen Stammes dazu bringt nicht ineinander zu wachsen und Abstand zu halten (Caiazza *et al.*, 2005). D.h. in diesem Versuch wird der gepickten *P. aeruginosa* PAO1 Kolonie vorgetäuscht, dass andere Bakterien in der Nähe sind und das Habitat schon besiedelt ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl die externe Zugabe des Rhl-System-Signalmoleküls C4-HSL als auch die Zugabe von Rhamnolipid keine kompensierende Wirkung auf die mangelnde Beweglichkeit der *estA*-Negativmutante hat. Auf der anderen Seite zeigte der Kontrollversuch, dass externe Zugabe von Rhamnolipid die Beweglichkeit von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) vollständig unterbunden hatte. Caiazza *et al.*, haben kürzlich ein ähnliches Resultat beschrieben (Caiazza *et al.*, 2005). Die Zugabe vom Kulturüberstand (KÜ) eines RL-defizienten Stammes sowie die Zugabe von aufgereinigtem Rhamnolipid führte zum fehlenden Schwärmverhalten. Demgegenüber führte die Zugabe von Kulturüberstand eines RL-defizienten Stammes keine Folgen für das Schwärmen von *P. aeruginosa*. Es wird postuliert, dass das Schwärmen entlang eines RL-Gradienten stattfindet. Die Zellen produzieren externes Rhamnolipid, das in den Agar diffundiert. Von dem Inokulationspunkt ausgehend breiten sich die Zellen in Richtung geringerer RL-Konzentration aus, das heißt sie entfernen sich radiär von dem Inokulationspunkt weg. In Folge der externen RL-Zugabe fehlt dieser Gradient, da das Rhamnolipid überall im Agar in der gleichen Konzentration vorhanden ist. Dieses Verhalten legt das Bestehen eines Sensorsystems für das extrazelluläre Rhamnolipid nahe. Dieser sollte im Stande sein das Rhamnolipid zu detektieren und darauf mit einem adäquaten Signal zu reagieren, denn Beweglichkeitsabläufe basieren auf der chemotaktischen Antwort auf chemische Stimuli (Masduki *et al.*, 1995). In diesem Versuch wurde die Auswirkung der externen RL-Zugabe zusätzlich auf die anderen Beweglichkeiten des Schwimmen und „twitching motility“ gezeigt. Die nächste Untersuchung galt der Komplementierung der RL-Produktion der *estA*-Negativmutante durch externe C4-HSL Zugabe, diesmal in flüssiger Kultur. 8 µM C4-HSL wurde der Kultur der *estA*-Negativmutante zugesetzt und nach erfolgter Inkubation die RL-Menge im Kulturüberstand bestimmt (Abb. 24). Das Resultat dieser Komplementation ergab, dass die *estA*-Negativmutante trotz Zugabe des C4-HSL keine erhöhte bzw. *P. aeruginosa* WT-ähnliche Menge an Rhamnolipid produzierte.

Die artifizielle Zugabe der Substanzen von Außen kann natürlich ein Problem darstellen. Bei der physiologischen Synthese werden die Menge, der Zeitpunkt und die Sekretion von einem

komplexen Netzwerk kontrolliert. Hier sei die komplizierte Kontrolle des QS-Systems über der RL-Produktion erwähnt. Festzuhalten bleibt jedoch, dass keine Komplementation zu verzeichnen war, somit die Produktion von C4-HSL wahrscheinlich nicht, oder nicht direkt für die Phänotypen der Esterasemutante verantwortlich ist.

Nachdem die Zugabe der oben genannten Komponenten zu keiner weiterführenden Erklärung verholfen hatte, wurden die Kulturen von *P. aeruginosa* WT und der *estA*-Negativmutante vermischt und dann die Beweglichkeit untersucht. Damit sollte herausgefunden werden, ob es sich, bei einer potentiell fehlenden Verbindung, um eine sekretierte, extrazelluläre Substanz handelt, die vom *P. aeruginosa* WT freigesetzt wird und der *estA*-Negativmutante wieder zur Beweglichkeit verhilft.

Eine Mischkultur aus ü.N. gewachsenen Zellen von *P. aeruginosa* WT und der *estA*-Negativmutante wurde hergestellt, in der beide Organismen mit der gleichen Zellzahl vertreten waren. Die Zellen dieser Mischkultur wurden ohne den Kulturüberstand auf die entsprechenden Schwimm- und Schwärmplatten pipettiert und ü.N bei 30 °C inkubiert (Abb. 26). Die äußeren Zonen der Beweglichkeitsspuren wurden auf das prozentuale Vorhandensein beider Organismen, mittels Titerbestimmung auf Selektionsagarplatten, überprüft. Der prozentuale Anteil an der *estA*-Negativmutante lag für beide Beweglichkeitsarten bei unter 0,5 %. Demzufolge synthetisiert *P. aeruginosa* WT keine extrazelluläre Beweglichkeitskomplementierende Substanz, die eine aktive Beweglichkeit der *estA*-Negativmutante ermöglicht. Die prozentuell niedrige Menge der *estA*-Negativmutanten in den äußeren Ausläufern der Beweglichkeitsspuren ist auf passive Prozesse zurückzuführen. Somit scheint die Beweglichkeitsrelevante Substanz, die der *estA*-Negativmutante fehlt, nicht extrazellulären Charakters zu sein. Womöglich handelt es sich aber um einen zelleigenen Prozess oder Signal, der dem Organismus deren Beweglichkeit vermittelt. Die in der äußeren Membran lokalisierte Esterase könnte eine Art Sensorfunktion ausüben, die bei einer chemotaktischen Bewegung durchaus relevant sein könnte. Für eine fehlende Sensorfähigkeit zumindest gegenüber dem Rhamnolipid spricht die Tatsache, dass der *P. aeruginosa* PAO1 (WT) auf die externe RL-Zugabe reagiert und die *estA*-Negativmutante das nicht tut.

Extern zugefügtes C4-HSL und Rhamnolipid kompensieren nicht die fehlende Beweglichkeit der *estA*-Negativmutante. Der *P. aeruginosa* PAO1 liefert in einer Mischkultur nicht die notwendige Substanz, die der *estA*-Negativmutante die Beweglichkeit wieder ermöglicht.

## Proteomuntersuchung

Der Phänotyp der *estA*-Negativmutante weist die charakteristischen, sie vom *P. aeruginosa* PAO1 (WT) unterscheidenden Eigenschaften auf: stark reduzierte RL-Produktion, Schwärm-Defizienz, hydrophile Zelloberfläche und aggregierter Biofilmcharakter. Diese Eigenschaften können im wesentlichen auf das Fehlen des Biodetergenz Rhamnolipid zurückgeführt werden. Die Defizienz der *estA*-Negativmutante im Schwimmen und „twitching motility“ ist allerdings nicht auf das Fehlen von Rhamnolipid zurückzuführen.

Die Untersuchung der QS-Systeme für den *P. aeruginosa* WT und die *estA*-Negativmutante sollte Aufklärung über die regulatorische Funktion von der Esterase EstA in einer höher gelegenen Instanz bringen. Eine putative übergeordnete Rolle von EstA in dem „Quorum sensing“-PQS-Netzwerk der Regulation wäre möglich. Um herauszufinden ob ein hierarchisch übergeordnetes Regulatorsystem nachzuweisen ist wurde für die *estA*-Negativmutante und den *P. aeruginosa* PAO1 (WT) eine Proteom-Untersuchung der intrazellulären Proteine nach 24 h Wachstum durchgeführt.

Die intrazelluläre Proteinmengen von 500µg der *estA*-Negativmutante und des *P. aeruginosa* WT wurden in zwei Dimensionen, der pH-abhängigen Isoelektrischen-Fokussierung analog der isoelektrischen Punkte und der folgenden größenabhängigen SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 27). Die in ihrer vorhandenen Menge stark abweichenden Proteine wurden mittels Massenspektrometrie analysiert und identifiziert. Der DE-Wert („different expression“) gibt dabei den Induktionsfaktor an.

### Proteine, die in der *estA*-Negativmutante geringer vorhanden sind (DE < 0,5)

Proteine die hier betroffen sind scheinen eher im Stickstoffmetabolismus beteiligt zu sein.

### Proteine, die in der *estA*-Negativmutante stärker vorhanden sind (DE > 2)

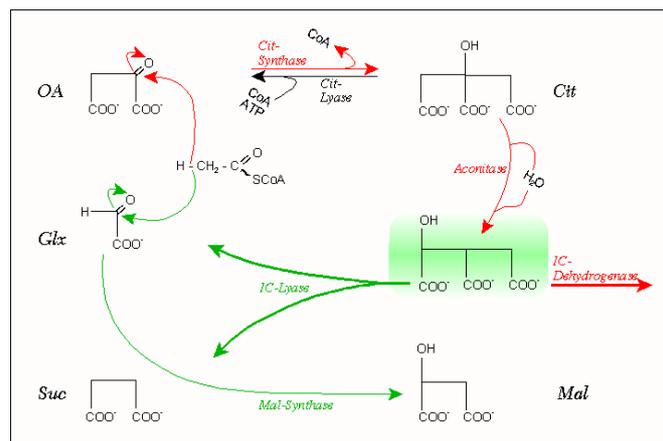
Das Protein mit dem höchsten DE-Wert von 57,9 (Tab. 7), dessen Menge in der *estA*-Negativmutante am stärksten gegenüber dem *P. aeruginosa* PAO1 (WT) erhöht ist, ist die Acyl-CoA-Dehydrogenase. Dieses Protein ist am ersten Schritt der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren beteiligt. Dabei wird Acyl-CoA durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase oxidiert, wobei ein Enoyl-CoA entsteht. CoenzymA (CoA) lagert Carbonsäuren in energiereiche Thioesterbindung an, aktiviert diese und beteiligt sich an deren Umsatz. Acyl-CoA-Dehydrogenase ist also ein Enzym ohne welches das Degradieren und Prozessieren von

Fettsäuren nicht möglich wäre. Der Fettsäure-Stoffwechsel scheint in der *estA*-Negativmutante im Vergleich zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT) verändert zu sein.

Die Lipoamid-Dehydrogenase liegt in der *estA*-Negativmutante in drei Formen vor, wohingegen in *P. aeruginosa* PAO1 (WT) nur eine bestimmte Zustandsform vorhanden ist. ID 1635 und ID 2506 fehlen im Wildtyp völlig und die mehr basische Form von Glc [ID 2030] ist nur in stark reduzierter Menge vorhanden. Lipoamid-Dehydrogenase ist ein Protein, welches zusammen mit der Pyruvat-Dehydrogenase und der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex bilden. Dieser Multiprotein-komplex katalysiert die Umwandlung von Pyruvat in  $\text{CO}_2$  und Acetyl-CoA, welches in den Citratzyklus eingeht. Es stellt ein Bindeglied zwischen Glykolyse und dem Citratsäurezyklus dar. Auch im weiteren Verlauf des Kohlenstoffkreislaufs finden sich Veränderungen in der *estA*-Mutante.

Das Protein in der *estA*-Negativmutante, welches verstärkt (DE-Wert von 34,7 - 9,9) und am zahlreichsten (fünf Mal) detektiert wurde, ist die Isocitratlyase (ICL) (Tab. 7). Die hohe Anzahl der ICL Detektionen im 2-D-Gel sollte aus den unterschiedlichen Modifikationen des Enzyms in der *estA*-Negativmutante resultieren (Abb. 27/28A). Bereits eine Phosphorylierung eines Proteinmoleküls, um ein Beispiel zu bringen, resultiert in unterschiedlichen Laufverhalten in einem 2-D-Gel. Daher kann angenommen werden, dass die ICL in sehr vielen unterschiedlichen Zustandsformen in der *estA*-Negativmutante vorliegt.

Die Isocitratlyase (ICL) als auch die Malatsynthese (MS), die ebenfalls in einer hohen Menge in der *estA*-Negativmutante vorliegt, sind die Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus. Der Glyoxylatzyklus nimmt seinen Ursprung am Isocitrat des Citratzyklus und im Zuge dessen werden aus dem Fettsäureabbau, Kohlenhydrate aufgebaut. Abbildung 42 zeigt die Weichenstellung von Citratzyklus und Glyoxylatzyklus am Isocitrat (IC).



**Abb. 42: Citratzyklus und Glyoxylatzyklus-Weichenstellung am Isocitrat nach Hurley *et al.*, 1989.** (IC-Zyklus grün unterlegt)

Die Inaktivierung der IC-Dehydrogenase des Citratzyklus führt zur Umschaltung des Reaktionsablaufes in Richtung des Glyoxylatzyklus. Dies geschieht meist bei Energieüberschuß in der Zelle, um Biosynthesestufen zu erzeugen. Ein weiterer wichtiger Unterschied besteht darin, dass im Citratzyklus nur ein und im Glyoxylatzyklus zwei Acyl-CoA eingeschleust werden können, welche im betrachteten Fall vielleicht durch die verstärkte  $\beta$ -Oxidation mittels Acyl-CoA-Dehydrogenase auftreten.

Während im Citratzyklus das IC (C6) durch zweimalige Decarboxylierung in Succinat (C4 plus Reduktionsäquivalente) umgewandelt wird, werden diese Schritte im Glyoxylatzyklus umgangen und es entsteht Glyoxylat (C2). Die ICL spaltet das IC direkt zum Succinat und dem namensgebenden Glyoxylat. Die MS wandelt wiederum das Glyoxylat unter Vorhandensein von AcylCoA in Malat und CoA um. Durch Unterbleiben der beiden Decarboxylierungsreaktionen werden zwei C-Atome eingespart und der Kohlenhydratspeicher der Zelle wird aufgefüllt. Unter normalen Bedingungen dominiert der Reaktionsweg des Citratzyklus, jedoch bei einem Kohlenhydratmangel findet eine Umschaltung zum Glyoxylatzyklus statt. Welche Faktoren in der *estA*-Negativmutante zur stärkeren Nutzung des Glyoxylatzyklus führen unterliegt nur Spekulationen.

Der ICL-Test (Abb. 28B) ist ein photometrischer Test mittels welchem die Enzymaktivität quantifiziert werden kann. Dieser Test ergab für eine analog zu den 2-D-Gelen angezogene Kultur der *estA*-Negativmutante eine 40-fach höhere Aktivität der ICL als in der des *P. aeruginosa* WT. Dies unterstützt die Ergebnisse der proteomischen Untersuchung und bekräftigt sowohl die hohe Expression als auch die hohe Bioaktivität der ICL in der *estA*-Negativmutante gegenüber dem *P. aeruginosa* WT.

In der *estA*-Negativmutante scheint eine physiologische Gegebenheit eingetreten zu sein, unter welcher im Gegensatz zum *P. aeruginosa* WT die Fettsäuren in zelleigene Kohlenhydrate umgewandelt werden müssen. Es könnte sich dabei um eine vermehrte Fettsäureansammlung oder einen Defizit an Kohlenhydraten handeln.

Die Umwandlung von Fettsäuren (FS) zu Kohlenhydraten in dem Glyoxylatzyklus könnte allerdings Auswirkung auf den Fettsäurehaushalt der Zelle haben. So könnte postuliert werden, dass diese alternativ zum Citratzyklus ablaufende Reaktionskette einen Mangel an Fettsäuren zur Folge hat und dadurch FS-haltige Substanzen nicht synthetisiert werden können. Zu diesen könnte das Rhamnolipid zählen, an dessen Aufbau C10 Fettsäuren einen wesentlichen und essentiellen Anteil haben. Dies würde bedeuten, dass resultierend aus der *estA*-Deletion der Fettsäuresyntheseweg von seinem normalen Ablauf abweicht, dadurch der

---

Fettsäurehaushalt gestört ist und kein bzw. nur sehr wenig Rhamnolipid produziert werden kann.

Die Notwendigkeit zur Umschaltung zum Glyoxylatzyklus kann aus der Tatsache resultieren, dass für die *estA*-Negativmutante in Folge der Deletion von *estA* eine gestörte Kohlenstoffversorgung in der Zelle entsteht. Dies kann auf das Fehlen des Rhamnolipids zurückzuführen sein, für das bereits die Relevanz in der Aufnahme von Kohlenstoffverbindungen in die Zelle beschrieben wurde (Zhang & Miller, 1992).

Es besteht zusätzlich eine Verbindung zwischen der Fettsäurebiosynthese und der AHL-Synthese in *P. aeruginosa*, die die erniedrigte Signalmolekül-Menge in der *estA*-Negativmutante erklären könnte. Dazu muss bekannt sein, dass die AHL-Synthese unter Wirkung von LasI bzw. RhII-Synthasen aus den Vorstufen S-Adenosylmethionin (SAM) für den Lakton-Ring und unterschiedlich beladenen Acyl-ACPs (acyl carrier proteins) für die variablen Acyl-Seitenketten, katalysiert wird. Die Erklärung für die allgemein niedrige Menge der HSL in der *estA*-Negativmutante gegenüber dem *P. aeruginosa* WT könnte darin liegen, dass die Inaktivierung der IC-Dehydrogenase des Citratzyklus, die Verfügbarkeit des Acyl-ACP beeinflusst. Da Acyl-ACP während der Fettsäurebiosynthese gebildet wird, hat der Zellstoffwechsel unmittelbaren Einfluss auf die Produktion der verschiedenen AHL-Moleküle (Val & Cronan, 1998). So könnte die veränderte Fettsäurebiosynthese an der Reduktion der AHL-Moleküle in der *estA*-Negativmutante beteiligt sein.

Zusammenfassend lässt sich aus den Proteomdaten schließen, dass in der *estA*-Negativmutante aus bisher nicht bekannten Gründen der Metabolismus in Richtung des Glyoxylatzyklus verschoben ist.

Mit den Daten der Proteomuntersuchung konnte leider kein Regulatorprotein identifiziert werden, welches alle Befunde und somit alle Phänotypen der *estA*-Negativmutante erklärt. Jedoch scheint die erniedrigte bzw. erhöhte Menge der an N-Stoffwechsel bzw. C-Stoffwechsel beteiligter Proteine in der *estA*-Negativmutante ein Hinweis auf die Dysfunktion eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems, des CbrA/B Systems zu sein, welches für die Balance zwischen N- und C-Metabolismus in *P. aeruginosa* sorgt (Nishijyo, *et al*, 2001). Zur Bestätigung dieser Annahmen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Unterstützend soll jedoch hier bestätigt werden, dass dieses Zwei-Komponenten-Regulationssystem CbrA/B mit den lipolytischen Enzymen aus *P. aeruginosa* korreliert ist. Dieses System wurde in unserem Labor als LipQ/R beschrieben (Düfel, 2000).

## Inaktivierung von EstA

Äußere Membranproteine können in Porine, Kanalproteine, Rezeptoren sowie enzymatische Proteine unterteilt werden. Während Porine unspezialisierte Diffusionsporen für kleine, hydrophile Moleküle darstellen, Kanalproteine für wenige Substanzen spezifische Porine darstellen, weisen Rezeptoren sehr hohe Spezifität gegenüber einer bestimmten Substanz auf. Durch die Rezeptoren wird letztendlich eine zelleinwärts gerichtete Information der Umwelt weiterleitet. Enzyme katalysieren substratspezifische Reaktionen und sind oft in einen physiologisch relevanten Vorgang der Zellen eingebunden.

Die Esterase ist ein äußeres Membranprotein und das erste beschriebene Enzym in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* (Wilhelm, 1999). Die Deletion von EstA führt zur Störung einiger physiologischer Vorgänge in *P. aeruginosa*.

Die Proteomuntersuchung der *estA*-Negativmutante zeigte gegenüber dem *P. aeruginosa* WT eindeutige Differenzen, erbrachte allerdings keine Erklärung für die physiologischen Unterschiede beider Stämme. Anscheinend ist das Vorhandensein der Esterase EstA der essentielle Faktor, der die Physiologie bezüglich der zuvor genannten Größen der *P. aeruginosa* beeinträchtigt. Um die Rolle der Esterase zu spezifizieren gilt es festzulegen, ob die Struktur und Lokalisierung der Esterase oder ihre enzymatische Aktivität diesbezüglich relevant ist, das heißt eine Transportfunktion der Pore von EstA in der äußeren Membran oder die enzymatische Funktion entscheidend für die beschriebenen Phänotypen ist.

In einer vorangegangenen Arbeit (Smolski, 2002) wurde mittels HPLC-Untersuchung (HPLC - **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) die Menge an zellgebundenem und extrazellulärem Rhamnolipid bestimmt (Tab. 8). Diese vervollständigen die Ergebnisse, die in dieser Arbeit für die Rhamnolipide der Kulturüberstände erzielt wurden.

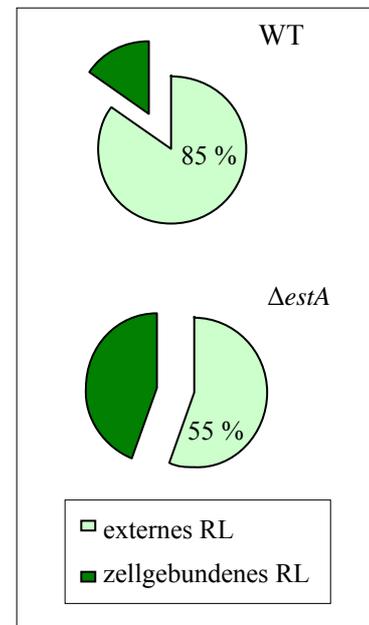
A			B	
	zellgebunden	Kulturüberstand	Kulturüberstand	
Stamm	RL [mg/l] / M	RL [mg/l] / M	RL [mg/l]	
WT	7,14	39,7	400	
$\Delta estA$	0,43	0,35	0,8	
WT ( <i>estA</i> <sup>++</sup> )	9,1	467	1500	

**Tab. 8: Mengen der zellgebundenen und extrazellulären Rhamnolipide in *P. aeruginosa*.** Rhamnolipid-Mengen wurden für die Stämme *P. aeruginosa* PAO1 WT und *estA*-Negativmutante, sowie für den EstA-Überexpressionsstamm im WT (WT *estA*<sup>++</sup>) nach 48 h Kultivierung untersucht. Die Auswaage der HPLC-aufgereinigten zellgebundenen und extrazellulären Rhamnolipide nach A. Smolski, 2002 (A) sowie die Ergebnisse des photometrischen Nachweistests für die extrazellulären Rhamnolipide (B).

Aus allen zur Verfügung stehenden Daten geht hervor, dass die Überexpression von EstA vor allem zu einem gravierenden Anstieg an RL-Menge im Kulturüberstand führt, wohingegen die *estA*-Deletion die drastische Abnahme der extrazellulären RL-Menge zur Folge hat.

**Abb. 43: Verteilung der zellgebundenen und extrazellulären Rhamnolipide in *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *estA*-Negativmutante nach Smolski, 2002.** Prozentuale Angaben beziehen sich auf die Werte aus Tabelle 8A.

Im *P. aeruginosa* PAO1 (WT) liegt ein sehr hoher Prozentsatz an Rhamnolipid extrazellulär vor (85 %). Dieses Verhältnis verstärkt sich während der Esterase Überexpression (98 % extrazelluläres RL) und verhält sich konträr in Folge der Deletion der Esterase. Ein hoher prozentualer Anteil (45 %) der absolut ohnehin geringen Rhamnolipidmenge in der *estA*-Negativmutante liegt hier zellgebunden vor (Abb. 43).



Ein hoher prozentualer Anteil von dem geringfügig vorhandenem Rhamnolipid liegt in der *estA*-Negativmutante zellgebundenen vor.

Diese Daten könnten auf die Beteiligung der Esterase EstA an der RL-Freisetzung aus der Zelle deuten. Das Fehlen des putativen Exporters würde nämlich mit einer Abnahme der extrazellulären RL-Menge einhergehen und zur relativen Akkumulation der Rhamnolipide an bzw. in der Zelle führen.

Die Konstruktion der Mutante im aktiven Zentrum von EstA und deren Untersuchung auf die betroffenen Phänotypen sollten die Relevanz der enzymatisch aktiven Esterase bzw. der strukturell intakten aber inaktiven Esterase für die erwähnten Phänotypen konkretisieren. Stimmen die Ergebnisse für *estA*-Negativmutante und Mutante des aktiven Zentrums von EstA überein, sind die Phänotypen einzig auf die enzymatische Aktivität von EstA zurückzuführen. Im Umkehrschluss würde die strukturelle Bedeutung der EstA als putatives Porin in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* aus unterschiedlichen Ergebnissen geschlossen werden können. In die Basensequenz von *estA* wurde mittels „overlap-extension“-PCR eine Punktmutation eingefügt, die dafür verantwortlich ist, dass das katalytisch wirksame Serin an der Position 38 durch ein Alanin ersetzt wird. Dieser

sequenzierte, mutagenisierte *estA*-Genabschnitt ersetzte die native *estA*-Sequenz in dem Vektor pBBX<sup>+</sup>, wodurch die inaktive *estA*-Variante (*estA*<sup>mut</sup>) in dem pBBR1MCS-Vektor konstitutiv exprimiert wird. Dieses Plasmid wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  getestet, enzymatisch als inaktiv charakterisiert (Abb. 29B) und anschließend in einer triparentalen Konjugation in die *P. aeruginosa estA*-Negativmutante konjugiert (3.10). Die Expression der in diesem Stamm einzig durch die Plasmid kodierten, inaktiven EstA<sup>mut</sup> erfolgt im Gegensatz zu der chromosomalen *P. aeruginosa* WT-EstA konstitutiv und in größeren Menge, was aber wahrscheinlich für die zu untersuchenden Zellprozesse keine Behinderung darstellt. Die inaktive EstA-Variante (EstA<sup>mut</sup>) wird unter denselben Bedingungen exprimiert wie die aktive Esterase EstA, sodass die unterschiedlichen Resultate für beide Stämme auf die Aktivität von EstA zurückgeführt werden konnten. Der Ausgangsvektor pBBR1MCS in der *estA*-Negativmutante galt als Leervektorkontrolle.

Die erfolgreiche Expression der inaktiven Esterase EstA<sup>mut</sup> in der *estA*-Negativmutante von *P. aeruginosa* (Abb. 30), sowie deren fehlende enzymatische Aktivität (Abb. 31AB) wurden nachgewiesen. Die zusätzlich für den EstA-Überexpressionsstamm im *P. aeruginosa* PAO1 (WT) durchgeführte Untersuchung zur Lokalisierung der Esterase EstA in der Zelle erfolgte mit einem Zymogramm-Gel (Abb. 32) und zeigte das Vorkommen jeweils zweier EstA-Banden in der Membranfraktion und der Periplasma-Cytoplasma Mischfraktion. Die kleinere der beiden bei ca. 67 kDa entspricht der Größe der Esterase von 66,8 kDa, wohingegen die größere bei ca. 120 kDa ein EstA-Dimer vermuten lassen kann. Während in der Membranfraktion vornehmlich die monomere Variante vorliegt, ist in dem periplasmatischen und cytoplasmatischen Raum vorwiegend die dimere Variante detektierbar.

Für die Autotransporterproteine stellt die Porengröße der Transporter-Domäne einen limitierenden Faktor bezüglich der Größe bzw. Sperrigkeit und demzufolge Faltung der Passagier-Domäne dar. Für die periplasmatische Passagier-Domäne von EstA-Form wird analog zu anderen AT-Proteinen resultierend aus dem Durchmesser der  $\beta$ -Fass Pore (von z. Bsp. 10 x 12,5 Å für das AT-Protein NalP aus *Neisseria meningitidis* (Omen *et al.*, 2004)) eine ungefaltete Proteinform angenommen. Es wird daher vorausgesetzt, dass die Faltung der AT-Proteine erst während bzw. nach deren Transport durch die äußere Membran geschieht. Für die periplasmatischen ungefalteten Autotransporterproteine ist bislang noch ungeklärt wie diese der Proteolyse entgehen. Vermutet werden Auto-Chaperon-Aktivitäten oder accessorische Proteine (Pugsley, 1993; Henderson *et al.*, 1998). Anhand der hier erzielten

Ergebnisse könnte postuliert werden, dass die Esterase temporäre EstA Dimere bildet, die für die Stabilität der Passagier-Domäne in der Periplasma verantwortlich sein könnten.

Die Untersuchung der RL-Produktion, der Beweglichkeit, der ZO-Hydrophobizität und der Biofilmbildung der inaktiven EstA-Variante EstA<sup>mut</sup> gegenüber der *estA*-Negativmutante und dem EstA-Überexpressionsstamm sollte die Bedeutung der enzymatischen EstA-Aktivität für diese Prozesse aufklären.

Die Rhamnolipidsynthese konnte zum einen mit der DC-Auftrennung zum anderen mit dem Orcinoltest analysiert werden. Die Dünnschichtchromatographie zeigt für die *estA*-Negativmutante kein RL-Signal (Abb. 33A). Die *estA*-Negativmutante sowie die Mutante des aktiven Zentrums in EstA (EstA<sup>mut</sup>) zeigen das gleiche Ergebnis und zwar schwache Signale in Höhe des Di-RL und stärkere in Höhe des Mono-RL. Das Di-RL ist in *P. aeruginosa* stets in einer höheren Menge vorhanden als das Mono-RL (Smolski, 2002), insofern ist das umgekehrte RL-Verhältnis für *P. aeruginosa* untypisch. Der Vektor pBBR1MCS ist bei uns bekannt für Veränderungen in Bezug auf sekretierte Substanzen. Das vermeintliche Vorhandensein von Rhamnolipid in den Stämmen der *estA*-Negativmutante mit exprimierter mutierter Esterase (*estA*<sup>mut</sup>) und mit Leervektor (LV) sind höchstwahrscheinlich Artefakte, was durch den Orcinoltest bestätigt wird. Ausschlaggebend ist die Tatsache, dass das Ergebnis der inaktiven EstA Variante (*estA*<sup>mut</sup>) dem der Leervektorkontrolle entspricht. Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Auftrennung für den Überexpressionsstamm der nativen Esterase unterscheiden sich deutlich von den anderen. Die Verteilung von Mono- und Di-RL verhält sich wieder wie im *P. aeruginosa* (WT). So kann festgestellt werden, dass nur die Überexpression der aktiven Form von EstA zur Wiederherstellung der RL-Produktion in der *estA*-Negativmutante führt. Dies wird ebenfalls von den Ergebnissen des Orcinoltests bekräftigt (Abb. 33B). Eine eindeutige Detektion von Rhamnolipid mit diesem Test konnte nur in dem Stamm der Überexpression der nativen Esterase nachgewiesen werden. Die Menge von 0,046 g/l für diese komplementierte *estA*-Negativmutante ist allerdings deutlich niedriger als die RL-Menge von 0,4 g/l, die der *P. aeruginosa* WT produziert. Dies kann jedoch auf die konstitutive Überexpression von EstA zurückgeführt werden. Dadurch ist der Stoffwechsel aus der Balance gebracht, so dass die Synthese sekundärer Metabolite wie des Rhamnolipids nur niedrigere Werte zu erreichen vermag. Schlussfolgernd konnte nachgewiesen werden, dass nur eine enzymatisch aktive Esterase den Phänotyp der *estA*-Negativmutante bzgl. der RL-Synthese komplementieren kann.

Die enzymatische EstA-Aktivität ist für die Rhamnolipidproduktion essentiell.

Die Untersuchung der Beweglichkeit der folgenden *P. aeruginosa* Stämme: *estA*-Negativmutante, der *estA*-Negativmutante mit Überexpressionplasmiden der inaktiven und der aktiven Esterase-Form sowie der Leervektorkontrolle erbrachte ein eindeutiges Ergebnis (Abb. 34). Der Überexpressionsstamm der nativen Esterase schwimmt, schwärmt und verfügt über „twitching motility“ analog zum *P. aeruginosa* WT, während die anderen Stämme unbeweglich bleiben. Nur die Expression der aktiven EstA-Variante führt zum vollen Erlangen der Beweglichkeit der ansonsten unbeweglichen *estA*-Negativmutante. Auch diese Befunde zeigen, dass die Beweglichkeit nur durch Expression einer aktiven Esterase wiederhergestellt werden kann.

EstA-Aktivität ist für das QS-abhängige Schwärmen, aber auch für das Schwimmen und „twitching motility“ von *P. aeruginosa* essentiell.

Nachdem die RL-Synthese und die Mobilität der *estA*-Negativmutante durch die zusätzliche Expression der aktiven EstA wiederhergestellt werden konnte, sollte die Beschaffenheit der Zelloberfläche untersucht werden. Die hydrophile Zelloberfläche der *estA*-Negativmutante bleibt unverändert solange der LV bzw. die enzymatisch inaktive EstA exprimiert wird (Abb. 35). Wie erwartet konnte nur für die Überexpression der katalytisch aktiven Esterase EstA eine gegenüber der *estA*-Negativmutante erhöhte Hydrophobizität der Zelloberfläche registriert werden, die der des WT nahe kommt.

EstA-Aktivität beeinflusst die Zelloberflächen-Hydrophobizität. Das Vorhandensein der aktiven Esterase verstärkt den hydrophoben Charakter der Zelloberfläche, wohingegen das Fehlen der Aktivität der Esterase eine gegenüber dem *P. aeruginosa* PAO1 (WT) hydrophilere Zelloberfläche bedingt.

Bislang scheint die Funktion der untersuchten physiologischen Prozesse der RL-Produktion, Beweglichkeit und Zelloberflächen-Hydrophobizität von EstA-Aktivität abzuhängen. Diese drei Phänotypen sind relevant für die Biofilmentwicklung, wodurch eine strikte Abhängigkeit der Biofilmstruktur von der EstA-Aktivität anzunehmen war.

Die Deletion der Esterase, deren Komplementation mit katalytisch inaktiven EstA sowie die adäquate LV-Kontrolle zeigen zum Zeitpunkt von 24 h die für die *estA*-Negativmutante den typische in Mikrokolonien angeordnete aggregierte Biofilmform (Abb. 36). Demgegenüber lösen sich die Aggregate der Zellanhäufungen nach 24 h bei Expression der aktiven EstA in

der *estA*-Negativmutante sichtbar auf, bis nach 72 h Expression ein WT-homologer planer homogener Biofilm mit der CLSM detektiert wird (Abb. 37). Die CLSM zeigt zu dem Zeitpunkt von 24 h sich andeutende und zu dem Zeitpunkt von 72 h bereits ausgeprägte Abhängigkeit der Homogenität des Biofilms von der Anwesenheit der aktiven Esterase.

#### Aktive EstA ist wesentlich bei der Entwicklung eines planen homogenen Biofilmes.

Alle Untersuchungen der Mutante im aktiven Zentrum von EstA entsprechen den für die *estA*-Negativmutante. Erst die Expression der enzymatisch aktiven Esterase komplementiert den *estA*-Negativmutante Phänotyp. Somit scheint die enzymatische Aktivität und nicht die strukturellen Gegebenheiten von EstA maßgeblich für die phänotypischen Unterschiede zwischen der *estA*-Negativmutante und *P. aeruginosa* PAO1 (WT) zu sein. EstA scheint also nicht an dem Export von Rhamnolipid aus der Zelle beteiligt zu sein. Die enzymatische Aktivität von EstA ist bedeutsam für die Prozesse der Rhamnolipidproduktion, Beweglichkeit, Zelloberflächen-Hydrophobizität und Biofilmbildung.

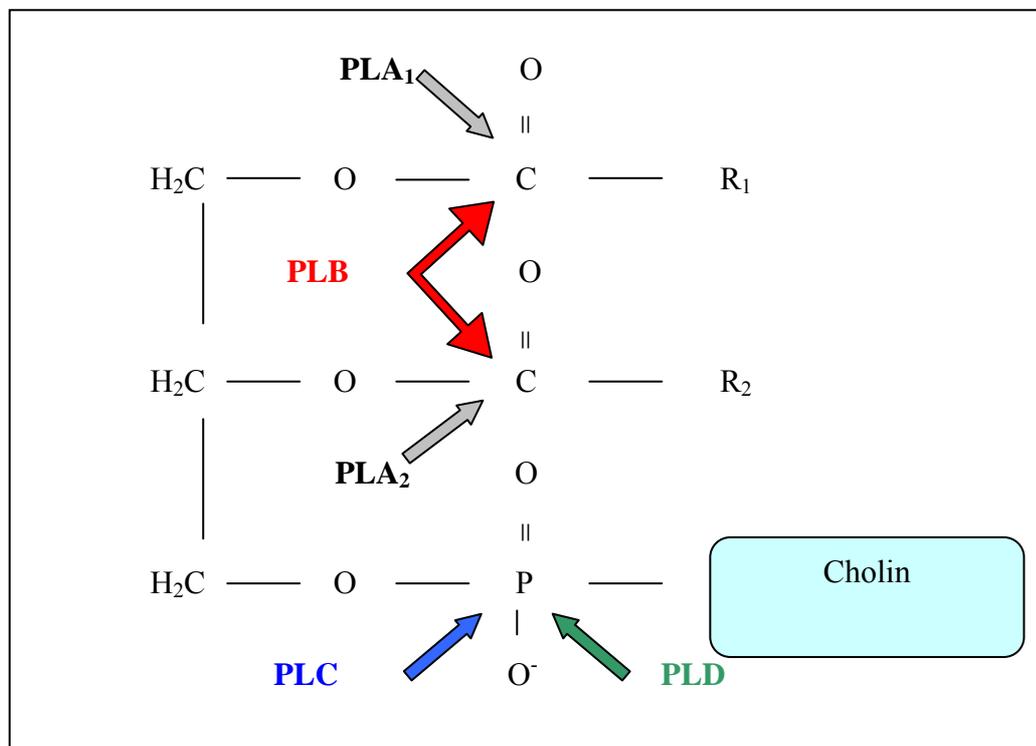
#### **Charakterisierung der „physiologischen“ enzymatischen Aktivität von EstA**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Fehlen der enzymatischen EstA-Aktivität die Phänotypen der *estA*-Negativmutante bestimmt. Die eigentliche Funktion der Esterase scheint allerdings ungewiss zu sein. Der bisherige Befund der Spaltung der Substrate Tributyrin und pNpC führen zur Namensgebung der Esterase (Wilhelm *et al.*, 1999; Funke, 2001). Dabei ist jedoch unklar, ob es sich dabei um physiologisch relevante Aktivitäten handelt, oder ob auch andere Substrate hydrolysiert werden können. Die Einordnung der Esterase zu den Autotransporterproteinen, ferner zu der GDSL-Familie der lipolytischen Enzyme und zu den äußeren Membranproteinen (OMP), die ihre katalytische Domäne zellgebunden behalten (Wilhelm, 2001), gibt Hinweise zu dem extrazellulären Wirkungsort des Enzyms.

Homologievergleiche der Esterase EstA mit anderen Proteinen mittels BLAST (NCBI) (2.32.) ergeben Homologien zu Autotransporterproteinen Lipase, Phospholipase, Lecitinase, Hämolyisin, Esterase und Serin-Protease. Die höchste Homologie (46 %) besteht zu einer Phospholipase aus *Yersinia pneumophila*. Eine Homologie von 37 % und eine Identität von 23 % wurden zu dem McaP Protein des Gram-negativen aeroben Bakterium *Moraxella bovis* berechnet. Dieses Ergebnis weist zwar nicht die höchste Homologie auf, McaP scheint allerdings viele Parallelen zu EstA aufzuweisen. Es ist ebenfalls ein AT-Protein, das der

GDSL-Familie angehört und welches neben der Esterase-Aktivität zusätzlich eine Phospholipase B Aktivität aufweist (Timpe *et al.*, 2003).

Die Phospholipase Wirkung der Esterase EstA sollte überprüft werden. Als geeignetes Substrat gilt das Phosphatidylcholin PC (Abb. 44). Diese Verbindung bietet Spaltungsansatzpunkte für alle fünf Phospholipasen (PL) A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C und D. Während PLC und PLD das PC an je einer anderen Seite der Phosphatbindung spalten, spaltet PLA<sub>1</sub> bzw. PLA<sub>2</sub> die erste bzw. die zweite Acyl-Gruppe an dem Glyceringerüst und PLB hydrolysiert beide Acyl-Gruppen von dem PC. Die Phospholipaseaktivität von EstA kann nach erfolgter enzymatischer Reaktion mittels DC-Identifizierung der Spaltprodukte spezifiziert werden (Tab. 9).



**Abb. 44: Angriffsorte der Phospholipasen am Phosphatidylcholin.** Hydrolysestelle der Phospholipase (PL)-n: PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLB, PLC und PLC sind mit Pfeilen gekennzeichnet. R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>- stehen für Acyl-Gruppe.

Während nach der Spaltung mit PLC bzw. PLD das Diacylglycerol (DAG) bzw. freie Phosphorsäuren und Cholin entstehen, in Folge der PLA Hydrolyse jeweils freie Fettsäuren und Lysophosphatidylcholin (LPC) detektiert werden, entsteht nach der PLB Spaltung neben freien Fettsäuren das Glycerophosphatidylcholin (GPC). Um zwischen PLA und PLB unterscheiden zu können, wird das LPC als Substrat eingesetzt. Während die PLB das GPC als Produkt aufweist, wird das LPC nicht von PLA gespalten.

**Tab. 9 : Spaltprodukte des Phosphatidylcholins und Lysophosphatidylcholins nach Phospholipase Behandlung.**

Substrat	Phospholipase (PL)	Produkt
Phosphatidylcholin (PC)	PLA <sub>1</sub> , PLA <sub>2</sub>	Fettsäure, Lysophosphatidylcholin (LPC)
	PLB	Fettsäure, Glycerophosphatidylcholin (GPC)
	PLC	Diacylglycerol (DAG)
	PLD	Phosphorsäure, Cholin
Lysophosphatidylcholin (LPC)	PLA <sub>1</sub> , PLA <sub>2</sub>	-
	PLB	Fettsäuren, Glycerophosphatidylcholin (GPC)

Um die Phospholipaseaktivität für das EstA-Protein zu untersuchen, wurde wie folgt vorgegangen. Zellen des *E. coli* DH5 $\alpha$  Stamms, in dem native EstA überexprimiert war (DH5 $\alpha$  *estA*<sup>++</sup>), und Zellen der Leervektorkontrolle des Stammes (DH5 $\alpha$  LV) wurden zunächst auf ihre lipolytische Aktivität untersucht. Nach Bestätigung einer enzymatischen Aktivität gegenüber pNpC für die Ganzzelleextrakte (GZE) des EstA-Überexpressionsstammes (Abb. 38) wurden diese parallel zu den enzymatisch inaktiven GZE der Leervektorkontrolle in einem Test zur Spaltung von 1 mg Phosphatidylcholin (PC) sowie 150  $\mu$ g Lysophosphatidylcholin (LPC) eingesetzt (Timpe *et al.*, 2003).

Die dünnschichtchromatographische Detektion der Spaltprodukte (Abb. 39) zeigt für beide Ansätze (Reaktionsansatz und Kontrollansatz) das unveränderte PC sowie das Fehlen des Substrates LPC in dem Ansatz mit dem GZE EstA-überexprimierender Zellen. Als Produkt wurden ausschließlich die freien Fettsäuren sichtbar; das GPC ist dünnschichtchromatographisch nicht detektierbar, was die eindeutige Zuordnung einer PLB Aktivität nicht zulässt. Das Verschwinden des Substrates ist allerdings ein eindeutiger Hinweis auf die Phospholipaseaktivität der überexprimierten Esterase gegenüber LPC.

Eine genaue Zuordnung der hier für EstA angenommenen Phospholipaseaktivität ist nur bedingt möglich solange kein reines Protein eingesetzt wird. Erst dann sind *E. coli* eigene Phospholipasen aus dem Versuch ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurde daher die Esterase EstA überexprimiert, aufgereinigt und einkonzentriert und für die weiteren Untersuchungen der PL-Aktivität benutzt.

Die Wirkung von EstA wurde zunächst auf das Substrat LPC untersucht. Abbildung 40 zeigt, dass bereits 0,05 U der Esterase EstA genügen um die vollständige Menge von 150  $\mu$ g an LPC zu hydrolysieren. Ein Produkt wurde in diesem Versuchsansatz jedoch nicht detektiert.

Es ist allerdings von einer Phospholipaseaktivität des EstA-Proteins auszugehen. Vermehrt deshalb, weil zur Kontrolle eine Standard-Probe in einem Reaktionsansatz ohne EstA-Behandlung nach deren Extraktion DC-Aufgetrennt und gefärbt wurde. Dieser Kontrollansatz schloss eine Autohydrolyse des Substrates und einen Verlust der Probe während der Extraktion aus. Durch die Hydrolyse von LPC ist eine PLA-Aktivität für EstA ausgeschlossen, da PLA das LPC nicht spalten dürfte.

Das Phosphatidylcholin (PC) wurde von der Esterase aus den *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen nicht hydrolysiert, da möglicherweise die Enzymmenge zu gering war. Eine PL-Aktivität sollte jedoch für das typische Phospholipase-Substrat PC nachweisbar sein. Daher wurde das PC ebenfalls mit einer steigenden Menge an gereinigtem EstA (0,001-0,1 U) behandelt. Das Ergebnis dieser Hydrolyse ist in Abbildung 41 zu sehen. Die Konzentration von 0,05 U EstA lässt das PC-Spaltprodukt GPC erkennen, das eine PLB-Aktivität nachweist.

Zusätzlich zu deren Funktion als Esterase ist EstA eine Phospholipase B, die sowohl das PC als auch das LPC spaltet.

Esterasen und Phospholipasen zählen zu den lipolytischen Enzymen und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substrate. Zurzeit ist nur wenig über die Rolle der Esterasen an sich hinsichtlich der Virulenz bekannt. Hingegen ist die Virulenz von Phospholipasen, vor allem die von PLA und PLC genauer untersucht. Phospholipasen können die Lungenoberfläche zerstören (Flieger *et al.*, 2000), können vaskuläre Permeabilität vergrößern (Muckle & Gyles, 1983; Ghannoum, 2000), können das Besiedeln vom Wirtsgewebe erleichtern (Ziprin *et al.*, 2001) und können Signaltransduktionen ermöglichen (Prokazova *et al.*, 1998).

### **Einfluss EstA-hydrolysierter Membran von *P. aeruginosa* auf Schwärmfähigkeit der *estA*-Negativmutante.**

EstA besitzt zusätzlich zu ihrer Esterase-Aktivität eine Phospholipase B Aktivität. Die Membranständigkeit von EstA lässt die Vermutung kommen, sie könnte Phospholipide der äußeren Membran hydrolysieren. Die Spaltung der Phospholipide hätte zwei Folgen für *P. aeruginosa*, zum einen die Änderung der Zelloberfläche zum anderen das Vorkommen freier Spaltprodukte der phospholipolytischen Reaktion. Diese Spaltprodukte könnten als sekundäre Botenstoffe andere enzymatischen Aktivitäten kontrollieren und an einem putativen „lipid signalling“ der Zelle beteiligt sein (Barker *et al.*, 2004).

In dem folgenden Versuch wurde mittels Zell-Fraktionierung die Membran von *P. aeruginosa* PAO1 mit der EstA=PLB in einer enzymatischen Reaktion verdaut, die Produkte extrahiert und auf Schwärm-Agarplatten getropft (s. Abb. 41). Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass die Zugabe EstA-Verdauter Membranfraktion die Schwärmbewegung der EstA-Negativmutante partiell komplementiert.

EstA-verdaute *P. aeruginosa* Membranfraktion ermöglicht partiell das Schwärmen in der *estA*-Negativmutante.

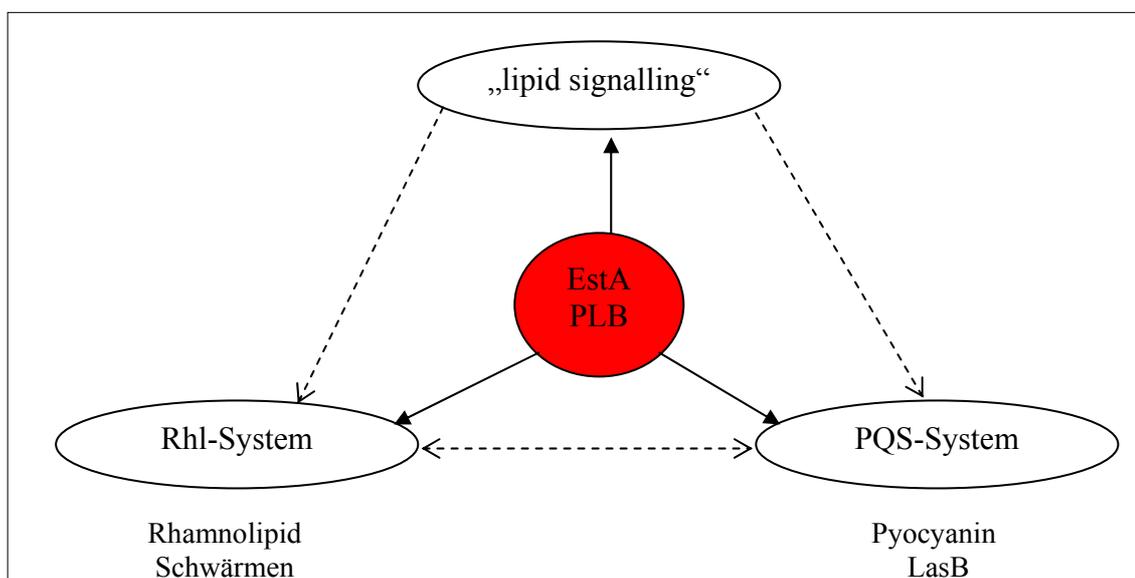
In Folge des Verdaus der *P. aeruginosa* Membran mit der Phospholipase B Aktivität aufweisenden Esterase EstA, entstehen Produkte, die dem bewegungsdefizienten Stamm der *estA*-Negativmutante die Beweglichkeit des Schwärmens wieder ermöglichen. Die phospholipolytische Spaltung der Membran liefert noch nicht näher charakterisierte Produkte, die jedenfalls die Fähigkeit haben teilweise das QS-abhängige Schwärmen der Esterase-Deletionsmutante zu komplementieren. Anscheinend stellt die Membran von *P. aeruginosa* das natürliche Substrat der Esterase dar. Die Aktivität der Esterase stellte sich bereits als ein essentieller Faktor für viele physiologisch wichtige Funktionen heraus. Die Esterase spielt eine essentielle Rolle nicht nur für die von QS-System unabhängigen Bewegungen wie „twitching motility“ und Schwimmen, scheint aber auch in der Regulation des QS-Systems und PQS-Systems und deren nachgeschalteten Genen eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Änderung der Zelloberflächenbeschaffenheit durch die katalytische Aktivität der Esterase zum einen und die daraus resultierenden Produkte zum anderen stellen zwei Größen dar, die für *P. aeruginosa* physiologisch relevant zu sein scheinen. Lipid-Substanzen, die eine Auswirkung auf physiologische Prozesse haben, sind unter dem Oberbegriff „lipid signalling“-Substanzen bekannt. Die Entstehung solcher Spaltprodukte in Folge der enzymatischen Reaktion von EstA könnte eine Art Signalkaskade auslösen, die in *P. aeruginosa* eine Reaktion bewirkt. Dieses Ergebnis würde für eine hierarchisch hochgestellte Position der Esterase plädieren, in Folge dessen ein EstA generiertes Signal die *estA*-Negativmutante zum Schwärmen befähigt.

Veränderungen in der Zellentwicklung stellen den wichtigsten Bestandteil der Anpassung an äußere Umweltbedingungen eines Mikroorganismus dar (Baysse *et al.*, 2005). Dies soll am Beispiel der Änderung der Membranfluidität erklärt werden. Ein gewisser Grad an Membranfluidität ist für das Überleben der Organismen entscheidend. Die Anpassung der Fluidität an die entsprechende Temperatur schafft die Voraussetzung für die Adaption. Diese

resultiert aus der Variation der Zusammensetzung der Membranlipide (Los & Murata, 2004). Um die Zusammensetzung der Membranlipide verändern zu können, benötigt der Organismus komplexe regulatorische Kreisläufe z. Bsp. könnte es das QS-System sein. Solche Systeme benötigen Sensoren für die Wahrnehmung der Umweltverhältnisse, um als Antwort die Expression adäquater Gene koordinieren zu können (Baysse *et al.*, 2005).

Zu unterschiedlichen Umweltbedingungen, aber auch verschiedenen Zeitpunkten der Zellentwicklung und Populationsentwicklung muss der Phänotyp an diese Bedingungen angepasst werden, um nicht nur das Überleben zu sichern, sondern auch die Synthese entsprechender sekundärer Metabolite, zu denen Enzyme und andere Virulenzfaktoren zählen, zu gewährleisten (Winzer & Williams, 2001). Nur somit ist die beste Anpassung an die Nischenverhältnisse gesichert.

Die Beteiligung der Esterase an der Veränderung mannigfaltiger Phänotypen von *P. aeruginosa* scheint ein Hinweis dafür zu sein, dass EstA ein wichtiges Stellglied eines Kontrollmechanismus ist. Die Relevanz für viele physiologische Prozesse, die Lokalisierung in der äußeren Membran, sowie die Phospholipaseaktivität prädisponiert EstA für einen korrespondierenden Signaltransduktor in einem hierarchisch hochgestellten Regulator-System von *P. aeruginosa*. So könnte EstA ein putativer Sensor in der äußeren Membran sein, der die Bedingungen des Habitates detektiert und diese Information ins Zellinnere übermittelt. Als Sensor könnte die Esterase mittels ihrer hydrolytischen Aktivität ein Signal für eine Signaltransduktionskette produzieren („lipid signalling“), die in hierarchisch hochgestellte Regulation der Zelle eingreifen könnte (Abb. 45).



**Abb. 45: Möglicher Schaltkreis zur EstA-Regulation.**

Der Einfluss von EstA auf das „Quorum sensing“- System ist durch das Fehlen des C4-HSL und der auf das PQS-System in dem Fehlen des PQS-Signalmoleküls begründet. EstA-Aktivität scheint ein in dem QS-System von *P. aeruginosa* mitwirkendes Stellglied zu sein, dessen Funktion nicht allein in der Spaltung einer bestimmten chemischen Substanz liegen kann. Resultierend aus der Phospholipaseaktivität von EstA (Ergebnisse 3.12.) könnte auf das „lipid signalling“ spekuliert werden, welches für Bakterien bisher jedoch nur vermutet wurde. Viele Phospholipasen, darunter die in eukaryotischen Zellen, haben die Aufgabe von Signalezymen. Enzyme, die z. Bsp. das Phosphatidylcholin spalten können, werden in Eukaryoten mit dem Mechanismus der Signaltransduktion assoziiert. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei vielen Zellprozessen, zu den die Induktion der Synthese bestimmter Gene, Induktion der Aktivität bestimmter Proteine aber auch der programmierte Zelltod (Apoptose) zählt (Terada *et al.*, 1999). Daher kann spekuliert werden, dass durch die Hydrolyse von Phospholipiden durch EstA auch Signaltransduktion erfolgen kann. Rein spekulativ kann darüber nachgedacht werden, ob diese Prozesse im Infektionsgeschehen im Wirt ebenfalls eine Rolle spielen könnten, indem Phospholipide gespalten werden und dadurch in eukaryotischen Zellen putativ als sekundäre Signalstoffe an dem Signalmechanismus teilhaben könnten. Dies könnte einen enormen Vorteil in der Strategie der Anpassung und Überlebens eines pathogenen Bakteriums in seinem Wirt bringen.

### **Physiologische Relevanz**

Die *estA*-Negativmutante produziert nur minimale Mengen des oberflächenaktives Detergenz Rhamnolipid. Die weiteren Phänotypen der *estA*-Negativmutante (Abb. 46) haben zunächst auf eine starke Abhängigkeit von Rhamnolipid gedeutet. Das Detergenz spielt nämlich eine entscheidende Rolle an der Beschaffenheit der Zelloberfläche; diese wurde in der *estA*-Negativmutante hydrophiler, was durch Rhamnolipid induziertes Abschilfern des hydrophoben B-Band LPS-Anteils zu erklären wäre. Des Weiteren spielt das Rhamnolipid während der Biofilmbildung eine wichtige Funktion in der Erzeugung von Nährstoffkanälen sowie in der Zellablösung. Die dicht besiedelte, aggregierte Mikrokolonien aufweisende Biofilmarchitektur der *estA*-Negativmutante könnte in Folge des Rhamnolipidmangels resultieren. Die Schwärmbewegung wird ebenfalls durch das Rhamnolipid beeinflusst, daher könnte das Fehlen von Rhamnolipid die Schwärmunfähigkeit des Stammes bedingen.

Die ursprüngliche Annahmen die Esterase könnte die Esterbindung zwischen  $\beta$ -Hydroxyfettsäuren in dem Lipidanteil des Rhamnolipids spalten, erwies sich als nicht

zutreffend, denn der EstA-Überexpressionsstamm weist eine mehr als 10-fach höhere Rhamnolipidmenge im Kulturüberstand auf (Tab. 9) als der *P. aeruginosa* WT. Würde EstA an der Spaltung von Rhamnolipid beteiligt sein, müsste ein RL-Mangel verzeichnet werden. Über den Exportmechanismus des Rhamnolipids aus der Zelle ist noch nicht näher bekannt. Die Untersuchung der Esterase auf eine putative Transporterfunktion für das Rhamnolipid erfolgte durch die Konstruktion einer enzymatisch inaktiven, dennoch strukturell intakten Variante, mit der in der äußeren Membran lokalisierten Transporter-Domäne, der EstA-Pore. Es stellte sich allerdings heraus, dass nicht die Struktur der Esterase sondern ihre Aktivität für die RL-Produktion relevant ist. Die enzymatische Aktivität ist nicht nur für die RL-Synthese wesentlich, aber auch für das Schwärmen, hydrophobe Zelloberfläche und einen homogenen Biofilmcharakter.

Alle oben genannten Phänotypen stellen, außer dass sie RL-abhängig sind, „Quorum sensing“ regulierte Prozesse der Zelle dar. Die Untersuchung des QS-Systems von *P. aeruginosa* bestätigte für die *estA*-Negativmutante das Defizit an C4-HSL (*N*-Butanoyl-L-Homoserinlacton), dem Signalmolekül des Rhl-Systems. Zusätzlich konnte das fehlende Auftreten des „Pseudomonas-quinolon“-Signal (PQS) festgestellt werden, sowie das Ausbleiben PQS-assoziiierter Faktoren wie Elastase B und Pyocyanin. Diese Befunde könnten auf einen Einfluss von EstA auf die QS-Regulation von *P. aeruginosa* deuten. Auf welcher hierarchischen Ebene die Esterase dabei eingreift, scheint hierbei noch nicht endgültig geklärt zu sein (vgl. Abb. 6). Die Esterase könnte putativ in beide Systeme eingreifen. Das Fehlen des C4-HSL, als Folge der *estA*-Deletion könnte die Abwesenheit des PQS bewirken, da dieses von dem Verhältnis von C4-HSL zu 3-oxo-C12-HSL, den Signalmolekülen des Rhl- und Las-Systems, reguliert wird (McKnight *et al.*, 2000). Andererseits könnte, der aus der *estA*-Deletion resultierende, Mangel an PQS das C4-HSL-Defizit bewirken, denn das PQS-System steht regulatorisch über dem Rhl-System und erhöht die Expression der Rhl-System-abhängiger Gene (Abb. 46) (Pesci *et al.*, 1999; Diggle *et al.*, 2003).

Neben den QS-regulierten Phänotypen der *estA*-Negativmutante wurden allerdings auch solche Phänotypen beschrieben, die QS- und RL-unabhängig sind. Es handelt sich dabei um das mangelnde Schwimmen und „twitching motility“.

Die enzymatische Aktivität von EstA sollte weiter charakterisiert werden und aufgrund von Homologievergleichen zu anderen Proteinen wurde die Phospholipaseaktivität untersucht. Die Phospholipase B Aktivität konnte anhand der hydrolytischen Spaltung von Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin und der Detektion des Spaltproduktes

Glycerophosphatidylcholin nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die EstA-verdaute Membranfraktion von *P. aeruginosa* die Schwärbewegung der bewegungsdefiziten *estA*-Negativmutante partiell wiederherstellen. Das Generieren eines physiologisch relevanten Signals deutet auf eine übergeordnete Rolle von EstA in der zelleigenen Regulation hin. Die physiologische Relevanz des Auftreten einer lipidartigen Verbindung deutet auf so genanntes „lipid signalling“ hin. Die hydrolytische Aktivität von EstA könnte ein Signal erzeugen, welches in das regulatorische Zellgeschehen eingreifen könnte.

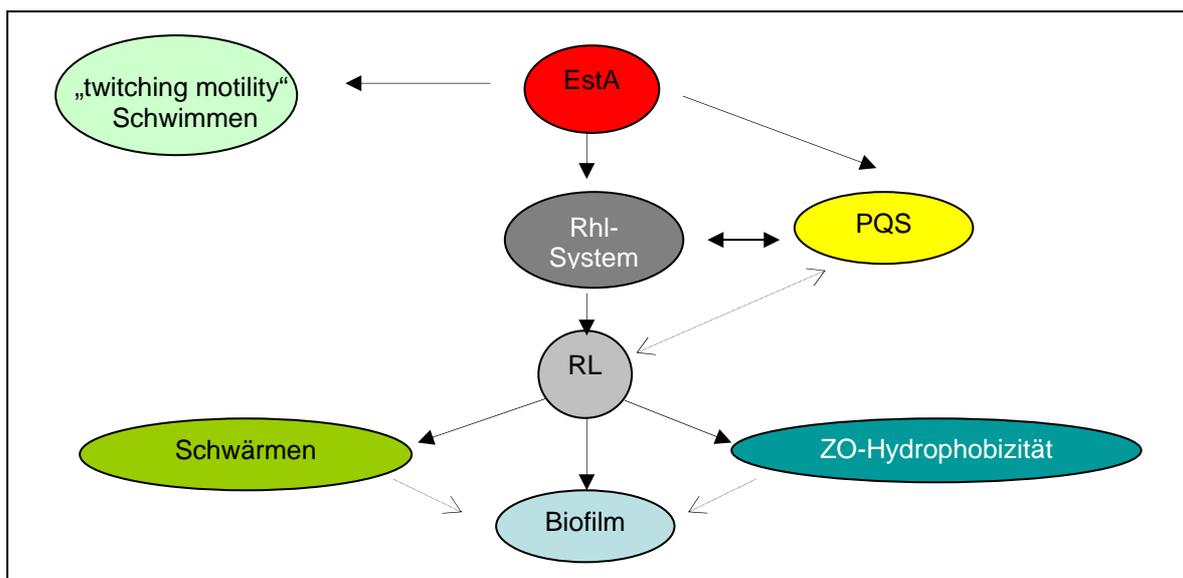


Abb. 46: Schematische Darstellung der Phänotypen der *estA*-Negativmutante.

Zusammenfassend kann auf eine wichtige physiologische Rolle von EstA geschlossen werden, die bedingt durch ihre enzymatische Aktivität eine regulatorische Funktion ausüben könnte, die über viele virulenzassoziierte Prozesse der Zelle entscheidet (Abb. 46). Ein Eingriff in die Feinabstimmung vom „Quorum sensing“- System und dem PQS-System scheint nachgewiesen zu sein. Eine mögliche Aufgabe von EstA als Sensor bzw. Signaltransduktor in der äußeren Membran, der eine zelleinwärts gerichtete Information übermittelt, könnte denkbar sein. EstA ist daher für *Pseudomonas aeruginosa* enorm wichtig, denn das Fehlen dieses zellgebundenen Enzyms wirkt sich nachteilig für den Stamm aus. Er besitzt dann nur eine minimale Menge des extrazellulären Detergenz, das die Erschließung hydrophober Kohlenwasserstoffe für den Organismus limitiert; er ist nicht bewegungsfähig, was ihn am Aufsuchen neuer Habitate hindert; er hat eine hydrophile Zelloberfläche, was die Bindung an hydrophobe Oberflächen behindert, heißt die Besiedlung vieler Habitate erschwert und er bildet einen Biofilm, der dicht besiedelte, nicht optimal mit Nährstoffen versorgte Mikrokolonien aufweist.

## 5. Zusammenfassung

Die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* ist ein Autotransporterprotein, dessen Transporter-Domäne eine Pore in der äußeren Membran bildet, durch welche die katalytisch aktive Passagier-Domäne an die Zelloberfläche transportiert wird. Die zellgebundene, in den extrazellulären Raum exponierte, enzymatisch aktive Domäne besitzt eine hydrolytische Aktivität gegenüber Esterbindungen kurzkettiger Fettsäuren (Wilhelm, 2001). Analog der anderen Autotransporterproteine wurde auch für die Esterase ein Virulenzpotential beschrieben (Potvin *et al.*, 2003). Außer der Zugehörigkeit zu der Enzymgruppe der Esterasen, deren Lokalisierung in der Zelle und der Art der Sekretion ist die physiologische Funktion von der Esterase EstA bislang ungeklärt gewesen. Um die natürliche Bedeutung von EstA für *P. aeruginosa* zu ergründen wurden zunächst die virulenzassoziierten Phänotypen der *estA*-Negativmutante untersucht. Die *estA*-Negativmutante produziert nur minimale Mengen des oberflächenaktiven Biodetergenz Rhamnolipid, sie hat im Gegensatz zum *P. aeruginosa* PAO1 (WT) eine hydrophile (polare) Zelloberfläche und bildet einen heterogenen Biofilm mit charakteristischen, dicht besiedelten Aggregationen in Form von Mikrokolonien. Die *estA*-Negativmutante ist unfähig sich mittels des Schwärmens noch mittels des Schwimmen und „twitching motility“ zu bewegen.

Die Konstruktion einer enzymatisch inaktiven Esterase, in der das Serin der katalytischen Triade (S<sub>38</sub>D<sub>310</sub>H<sub>313</sub>) gegen ein Alanin ausgetauscht wurde und Expression dieser in der *estA*-Negativmutante ergab einen *P. aeruginosa* Stamm, der strukturell intakte, membranständige, hydrolytisch unwirksame Esterase aufweist. Die Untersuchung dieses Stammes bestätigte, dass die oben genannten virulenzassoziierten Phänotypen der *estA*-Negativmutante: die Rhamnolipidproduktion, Zelloberflächen-Hydrophobizität, Beweglichkeit und homogene Biofilmbildung aus fehlender enzymatischer Aktivität von EstA resultieren und dass EstA ebenso wenig an der Spaltung von Rhamnolipid, als auch an deren Export aus der Zelle beteiligt ist.

Die Untersuchung der drei globalen „Quorum sensing“- Systeme zeigte, dass die Deletion von *estA* keinen Einfluss auf das Las-System ausübt, zum Fehlen des Rhl-System Signalmoleküls C4-HSL (*N*-Butanoyl-L-Homoserinlacton) und des „Pseudomonas-quinolon“-Signalmoleküls (PQS) führt. Die strikt PQS-regulierte ElastaseB fehlt in der *estA*-Negativmutante völlig und die Pyocyaninmenge ist drastisch reduziert.

Die Ergebnisse der Proteomuntersuchung deuten auf eine noch nicht ergründete Verschiebung des Zellmetabolismus der *estA*-Negativmutante gegenüber dem *P. aeruginosa* PAO1 (WT) von Citratzyklus in Richtung des Glyoxylatzyklus.

Neben der Fähigkeit, Esterbindungen zu hydrolysieren, wurde für EstA eine neue enzymatische Aktivität der Lysophospholipase bestimmt. Diese bestätigte die Esterase EstA ist ebenfalls eine Phospholipase B.

Die Membran fraktionierter *P. aeruginosa* Zellen wurde als putatives Substrat mit der Esterase enzymatisch verdaut und die Produkte dieser hydrolytischen Aktivität kompensieren die Schwärmfähigkeit der unbeweglichen *estA*-Negativmutante.

Die Phospholipase B Aktivität aufweisende Esterase EstA beeinflusst durch ihre Aktivität eine Vielzahl physiologisch relevanter Zellprozesse. Die Deletion von *estA* hat negative Auswirkung auf das globale Quorum sensing-Netzwerk von *P. aeruginosa*. Sie führt zum Fehlen der Signalmoleküle des Rhl-Systems und des Pseudomonas-quinolon-Signal-Systems. Diese Ergebnisse beweisen, dass EstA eine accessorische Regulatorfunktion in dem komplexen Netzwerk des Quorum sensing-Systems von *P. aeruginosa* zu haben scheint. Die Membran von *P. aeruginosa* könnte ein putatives Substrat von EstA darstellen. Deren Hydrolyse liefert nämlich Produkte, die physiologisch relevante Funktionen in der Zellbewegung steuern. Dies wiederum deutet auf ein so genanntes „lipid signalling“, heißt dass EstA in Folge deren enzymatischen Aktivität ein Signal generiert, der physiologische Relevanz für *P. aeruginosa* hat.

## 6. Literatur

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., Garcia, F., Manresa, A. (2001)** Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* **17**: 1367-1371
- Al-Tehhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M. (2000)** Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substances. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3262-3268
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Alexeyev M.F. (1995)** Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67
- Arand, M., Grant D.F., Beetham, J.K., Friedberg, T., Oesch, F., Hammock, B.D. (1993)** Sequence similarity of mammalian epoxides hydrolases to the bacterial haloalkane dehydrogenase and other related proteins. *FEBS Lett* **338**: 251-256
- Arpigny, J.L., Jaeger, K.-E. (1999)** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343**: 177-183
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000)** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 495-508
- Barbaro, S.E. Trevors, J.T., Inniss W.E. (2001)** Effects of low temperature, cold shock, and various carbon sources on esterase and lipase activities and exopolysaccharide production by a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. *Can J Microbiol* **47**: 194-205
- Beatson, A.B., Whitchurch, C.B., Semmler, A.B.T., Mattick, J.S. (2002)** Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**: 3598-3604
- Berka, R.M., Gray, G.L., Vasil, M.L. (1981)** Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **34**: 1071-1074
- Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J., Vasil, M.L. (2004)** A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* **53**: 1089-1098
- Baysse, C., Cullinane, M., Dénervaud, V., Burroves, E., Dow, J.M., Morrissey, J.P., Tam, L., Trevors, J.T., O'Gara, F. (2005)** Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alternation of membrane properties. *Microbiol* **151**: 2529-2542
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Bitter, W. (2003)** Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* **179**: 307-314
- Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., Jadeja, L. (1983)** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* **5**: 297-313
- Boles, B.R., Theondel, M., Singh, P.K. (2005)** Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* **57**: 1210-23
- Braun, P., de Groot, A., Bitter, W., Tommassen, J. (1998)** Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**: 3467-3469
- Brint, J.M., Ohman, D.E. (1995)** Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* **177**: 7155-7163
- Bruinsma G.M., van der Mei, H.C., Busscher H.J. (2001)** Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic lenses and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomaterials* **24**: 1663-1670

- Burger, M.M., Glaser, L., Burton, R.M. (1963)** The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **238**: 2595-2602
- Burger, M.M., Glaser, M., Burton, R.M. (1966)** Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol* **8**: 441-445
- Busscher, H.J., Weerkamp, A.H. (1987)** Specific and nonspecific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol Rev* **46**: 165-173
- Caballero, A. R., Moreau, J. M., Engel, L. S., Marquart, M. E., Hill, J. M., O'Callaghan, R. J. (2001)** *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal Biochem* **290**: 330-337
- Calfee M.W., Coleman, J.P, Pesci, E.C. (2001)** Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor exoression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11633-11637
- Calfee, M.W., Shelton, J.G., McCubrey, G.S., Pesci, E.C. (2005)** Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa*-produced surfactant. *Infect Immun* **73**: 878-882
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M.Q., O'Toole, G.A. (2005)** Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 7351-7361
- Camara, M., Williams, P., Hardman, A. (2002)** Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial smalltalk. *Lancet Infect Dis* **2**: 667-676
- Campos-García, J., Caro, A.D., Nájera, R., Miller-Maier, R.M., Al-Tahhan, R.A., Soberón-Chávez, G. (1998)** The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* gene encodes an NADPH-dependent  $\beta$ -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J Bacteriol* **180**: 4442-4451
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., Farrand, S. K. (1998)** Production of acylhomoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *MolPlant Microbe Interact* **11**: 1119-1129
- Chandrasekaran, E.V., Bemiller, J.N. (1980)** Constituent analyses of glycosaminoglycans. In: Whistler, R.L., Bemiller, J.N. (Hrsg.): *Methods in Carbohydrate chemistry VIII*. Academic Press, NY, San Francisco, London pp 89-96
- Chayabutra, C., Wu, J., Ju, L-K. (2000)** Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnology and Bioengineering* **72**: 25-33
- Chen, G., Zhu, H. (2005)** Lux-marked *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide production in the presence of rhamnolipid. *Colloids Surf B Biointerfaces* **41**: 43-8
- Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1974)** *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 3672-3676
- Costerton, J. W. (1995)** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **15**: 137- 140
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995)** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745
- Collier, D. N., Anderson, L., McKnight, S. L., Noah, T. L., Knowles, M., Boucher, R. Schwab, U., Gilligan, P., Pesci, E.C. (2002)** A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* **215**: 41-46
- Costeron, J.W., Anwar, H. (1994)** *Pseudomonas aeruginosa*: the microbe and the pathogen. In: Balth, A.L., Smith, R.P. (Hrsg.): *Pseudomonas aeruginosa* infections and treatment. Marcel Dekker, Inc., Nem York., pp 1-20
- Costerton, J.M, Lewandowski Z., De Beer D., Caldwell D., Korber D., James, G. (1994)** Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **176**: 2137-3142
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. , Greenberg, E. P. (1999)** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322
- Crespi, B.J. (2001)** The evolution of social behavior in microorganisms. *TRENDS Ecol & Evol* **16**: 176-183
- Cryz, S.J. Jr., Pitt T., Furer E., Germanier R. (2004)** Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **44**: 508-513
- D'Argenio, d.A., Calfee, W.M., Rainey P.B., Pesci E.C. (2002)** Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* **184**: 6481-6489

- Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole. (2003)** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **184**: 3027-33
- Davies, D.G, Parsek, M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. (1998)** The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298
- de Cock, H., Struyve, M., Kleerebezem, M., van der Krift, T., Tommassen, J. (1997)** Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **269**: 473-478
- Denaumur, E., Picard, B., Decpux, G., Denis, J.-B., Elion, J. (1993)** The absence of correlation between allozyme and *rrn* RFLM analysis indicates a high gene flow rate within human clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *FEMS Microbiol Lett* **110**: 275-280
- de Groot, A., Krijger, J.-J., Filloux, A., Tommassen, J. (1996)** Characterization of type II protein secretion (*xcp*) genes in the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida*, strain WCS358. *Mol Gen Genet* **250**: 491-504
- Desvaux, M., Parham, N.J., Henderson, I.R. (2004a)** The autotransporter secretion system. *Res Microbiol* **155**: 53-60
- Desvaux, M., Parham, N.J., Henderson, I.R. (2004b)** Type V Protein Secretion: Simplicity Gone Awry? *Curr Iss Mol Biol* **6**: 111-124
- Déziel, 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-hydroxyalkanoxyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**: 2005-2013
- Déziel, E., Comeau, Y., Villemur, R. (2001)** Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* **183**: 1195-1204
- Diggle, S.P., Winzer, K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Camara, M., Williams P. (2003)** The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of the stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* **50**: 29-43
- Dunn, S.D. (1986)** Effect of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**: 144-153
- Düfel, H. (2000)** Untersuchung zur Regulation der Lipase-Genexpression in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- Elkin, S., Geddes, D. (2003)** Pseudomonal infection in cystic fibrosis: the battle continues. *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**: 609-618
- Espinosa-Urgel, M. (2003)** Resident parking only : rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J Bacteriol* **185**: 699-700
- Filloux, A, Michel, G., Bally, M. (1998)** GSP dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp-System of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 177-198
- Flieger, a., Gongab, S., Faigle, M., Mayer, H.A., Kehrer, U., Mussotter, J., Bartmann, P., Neumeister, B. (2000)** Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiol Lett* **188**: 129-133
- Funke, S.A. (2001)** Expression und Reinigung des Autotransporterproteins EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- 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**: 2796-2806
- Fuqua, C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. (1996)** Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**: 727-751
- Gamper, M., Ganter, B., Polito M.R., Haas D. (1992)** RNA processing modulates the expression of *arcDAPC* Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **226**: 943-957

- Görg, A., Postel, W., Günther, S. und Weser, J. (1985)** Improved horizontal twodimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on-transfer to the second dimension. *Electrophoresis* **6**: 599-604
- Ghannoum, M.A. (2000)** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122-143
- Guerra-Santos, L.H., Kappeli, O., Fiechter, A. (1986)** Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production of nutritional and environmental factors. *Appl Microbiol Biotechnol* **24**: 443-448
- Hanahan, H.P. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hauser, G., Karnovsky, M.L. (1954)** Studies on the production of glycolipid by *P. aeruginosa*. *J Bacteriol* **68**: 645-654
- Hauser, G., Karnovsky, M.L. (1958)** Studies on the biosynthesis of L-rhamnose. *J Biol Chem* **233**: 287-291
- Henderson, I.R., Nataro, J.P. (2001)** Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**: 231- 1243
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J.P. (1998)** The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *TRENDS Microbiol* **6**: 370-378
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., Ala'Aldeen, D. (2004)** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744
- Hendrixson, D.R., de la Morena, M.L., Stathopoulos, C., St Geme, J.W. 3rd (1997)** Structural determinants of processing and secretion of the Haemophilus influenzae hap protein. *Mol Microbiol* **26**: 505-18
- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, R. (2001)** Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* **183**: 5395-5401
- Herman, D.C., Zhang, Y., Miller, R.M. (1997)** Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow condition. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3622-3627
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S. (2000)** Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**: 2395-2407
- Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S. (2002)** Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2008-2017
- Hingley, S.T., Hastie, A.T., Kueppers, F., Higgins M.L., Weinbaum G., Shrylock, T. (1986)** Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. *Infect Immun* **51**: 254-262
- Hisatsuka, K., Nakahara, T., Sano, N., Yamada, K. (1971)** Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Arg Biol Chem* **35**: 686-692
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989)** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-9
- Hof, H., Müller, R.L., Dörries, R (2000)** Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Holloway, B.W., Krishnapillai, V., Morgan, A.F. (1979)** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**: 73-102
- Hong, K.H., Jang, W.H., Choi, K.D., Yoo, O.J. (1991)** Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Carboxylesterase : Cloning and expression of the esterase gene in *Escherichia coli* *Agri Biol Chem* **55**: 2839-2845
- Høiby, N. (2002)** Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros* **1**: 249-254
- Huang, C.H., Xu, K.D., Mc Fetters G.A., Steward, P.S. (1998)** Spatial patterns of alkaline phosphate expression within bacterial colonies and biofilm in response to phosphate starvation. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1526-1531

- Hurley, J.H., Thorsness, P.E., Ramalingam, V., Helmers, N.H., Koshland, D.E., Stroud, R.M. (1989)** Structure of a bacterial enzyme regulated by phosphorylation, isocitrate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8635-6839
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., Suzuki, T. (1971)** Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. *J Antibiotics* **24**: 855-859
- Jacob, E.B., Becker, I., Shapario, Y., Levine, H. (2004)** Bacterial linguistic communication and social intelligence. *TRENDS Microbiol* **12**: 366-372
- Jaeger, K.-E., Kinscher, D.A., König, B., König, W. (1992a)** Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemistry and potential role as a virulence factor. In: Høiby, N., Pedersen, S.S. (Hrsg.): *Cystic fibrosis, basic and clinical research* Elsevier, Amsterdam, pp 119-121
- Jaeger, K.-E., Kinscher, D.A., Philippou, S., Høiby, N., Winkler, U.K. (1992b)** Lipase as a virulence factor in pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections: biochemical and histopathological evidence. (Abstr.) International VAAM/DGHM Workshop on molecular pathogenesis of bacteria- basic and applied aspects. Schierke
- Jaeger, K.-E., Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Reetz, M.T. (1996a)** Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**: 99-105
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Liebeton, K., Haas, D., Reetz, M.T., Philippou, S., Gerritse, G., Ransac, S., Dijkstra, B.W. (1996b)** Lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular biology and biotechnical application. In: Nakazawa et al. (Hrsg.): *Molecular biology of Pseudomonas aeruginosa*. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp 319-330
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Zonta, A., Reetz, M.T. (1997)** Bacterial lipases for biotechnological applications. *J Mol Catalys B: Enzymatic* **3**: 3-12
- Jaeger, K.-E., Wohlfarth, S., Winkler, U.K. (1991)** Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Alberghina, L., Schmid, R.D., Verger, R. (Hrsg.): *Lipases: structure, mechanism and genetic engineering*. GBF Monographien, Verlag Chemie, Weinheim, Vol. 16: 381-384
- 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.-J., Ransac S., Koch, H.B., Ferrato, F., Dijkstra, B.W. (1994)** Topological characterisation and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **332**: 143-149
- Jarvis, F.G., Johnson, M.J. (1949)** A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* **71**: 4124-4126
- Jose, J., Jahnik, F., Meyer, T.F. (1995)** Common structural features of IgA1 proteaselike outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* **18**: 378-380
- Jose, J., Bernhardt, R., Hannemann, F. (2002)** Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J Biotechnol* **95**: 257-268
- Kamath, S., Kapatral, V., Chakrabarty, A.M. (1998)** Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. *Mol Microbiol* **30**: 933-941
- Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K.N. (1992)** A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301
- Kim, E.J., Wang, W., Deckwer, W.D., Zeng, A.P. (2005)** Expression of the quorum sensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density. *Microbiology* **151**: 1127-1138
- Kjaergaard, K., Hasman, H., Schembri, M. A., Klemm, P. (2002)** Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J Bacteriol* **184**: 4197-4204
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. (2003)** Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pilli mutant. *Mol Microbiol* **45**: 1511-1524

- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. (2003b)** Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* **50**: 61-68
- Knirel, Y.A., Bystrova, O.V., Shashkov, A.S., Lindner, B., Kocharova, N.A., Senchenkova, S.N., Moll, H., Zähringer, U., Hatano., K, Pier, G.B. (2001)** Structural analysis of the lipopolysaccharide core of a rough, cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem* **268**: 4708-4719
- Koch, A.K., Käppeli, O., Fiechter, A., Reiser, J. (1991)** Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol* **173**: 4212-4219
- Koebnik, R., Locher, K.P., Van, V. (2000)** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**: 239-253
- Kok, R.G., Christoffels, V.M., Vosmann, B., Hellingwerf, K.J. (1993)** Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**: 2329-2342
- Koster, M., Bitter, W., Thommassen, J. (2000)** Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* **290**: 325-331
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop II, R.M., Peterson, K.M. (1994)** pBRR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Bio Techniques* **16**: 800-802
- Köhler T., Curty L.K., Barja, F., van Delden, C., Pechère, J.-C. (2000)** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signalling and requires flagella and pilli. *J Bacteriol* **182**: 5990-5996
- König, B., Jaeger, K.-E., Sage, A.E., Vasil, M.L., König, W. (1996)** Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediation release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes and monocytes) *Infect Immun* **64**: 3252-3258
- Krisch, K. (1971)** Carboxylic ester hydrolases In : *The Enzymes* Vol.V, third edition. Boyer, P.D. (ed.). Academic Press New York and London. pp. 43-69
- Kurachi, M. (1958)** Studies on the biosynthesis of pyocyanine. Isolation and determination of pyocyanine. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ* **36**: 163-173.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lequette, Y., Greenberg, E.P. (2005)** Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**: 37-44
- Lépine, F., Déziel, E., Milot, S., Villemur, R. (2002)** Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Mass Spectrom* **37**: 41-46
- Lepine, F., Deziel, E., Milot, S., Rahme, L.G. (2003)** A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochim Biophys Acta* **1622**: 36-41
- Lindum, P.W., Anthoni, U., Christoffersen, C., Eberl, L., Molin, S., Givskov, M. (1998)** *N*-acyl-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular surface-active lipopeptide required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**: 638-6388
- Liu, P.V. (1979)** Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Duggert, R.G. (ed.): *Clinical manifestations of infection and current therapy*. Academic Press, New York, pp. 63-88
- Los, D.A., Murata, N. (2004)** Membrane fluidity and its role the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta* **1666**: 142-157
- Loveless, B.J., Saier, M.H. Jr (1997)** A novel family of channel-forming, autotransporting bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol* **14**: 113-123
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M., Saier, M.H., Jr. (2003)** Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* **1611**: 223-233
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2000)** *Biology of microorganisms*, 9th edition. Prentice Hall, New Jersey

- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., Ausubel, F.M. (1999)** Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**: 47-56
- Maier, R.M., Soberón-Chávez, G. (2000)** *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 625-633
- Masduki, A., Nakamura, J., Ohga, T., Umezaki, R., Kato, J., Ohtake, H. (1995)** Isolation and characterisation of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **177**: 948-952
- Matsuzawa, Y., and Hostetler, K.Y. (1980)** Inhibition of lysosomal phospholipase A and phospholipase C by chloroquine and 4,4'-bis-(diethylaminoethoxy) alpha, beta-diethyl diethylene. *J Biol Chem* **255**: 5190-5194.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Williams, P. (1997)** Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of Nacylhomoserine lactones. *Microbiology* **143**: 3703-3711
- McClure, C.D., Schiller, N.L. (1992)** Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *J Leukocyte Biol* **51**: 97-102
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H., Pesci, E.C. (2000)** The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 2710-2708
- McGrath, S., Wade, D. S., Pesci, E. C. (2004)** Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett* **230**: 27-34
- Merril, C.R. (1990)** Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**: 477-488
- Merz, A.J., Mo, M., Sheetz, M.P. (2000)** Pilus retraction powers twitching motility. *Nature* **407**: 98-102
- Migula, W. (1891)** Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe **1**: 235-238
- Miller, J. H. (1972)** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Morihara, K., Homma, J.Y., (1985)** *Pseudomonas* proteases. In: I.A. Holder (ed.) Bacterial enzymes and virulence. CRC Press, Boca Raton, Fla, pp. 41-79
- Muckle, C.A., Gyles, C.L. (1983)** Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. *Am J Vet Res* **44**: 1149-1153
- Nardini, M., Dijkstra, B.W. (1999)**  $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing *Curr Opin Struct Biol* **3**: 732-737
- Nicas, T.L., Iglewski, B.H. (1985)** The contribution of exoproducts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* **31**: 387-392
- Nicas, T.L., Iglewski, B.H. (1986)** Toxins and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Socatch, J.R. (ed.) The bacteria, Vol X: The biology of *Pseudomonas*. Academic Press, Orlando, pp. 195-213
- Nishijyo, T., Haas, D., Itoh, Y. (2001)** The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **40**: 917-31
- Noordmann, W.H. and Janssen, D.B. (2002)** Rhamnolipid stimulate uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4502-4508
- Norman, R.S., Frontera-Suau, R., Morris, P.J. (2002)** Variability in *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide Expression during Crude Oil Degradation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5096-5103
- Ochsner, U.A. (1993)** Genetics and biochemistry of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactant synthesis. Dissertation, Swiss Federal Institute of Technology Zurich
- Ochsner, U.A., Reiser, J. (1995)** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **92**: 6424-6428
- Ochsner, U.A., Snyder, A., Vasil, A.I., Vasil, M.L. (2002)** Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8312-8317

- O'Farrell, P.H. (1975)** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biological Chemistry*, **250**: 4007 – 4021
- Ohmen, D.E., Chakrabarty, A.M. (1981)** Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolate. *Infect Immun* **33**: 142-148
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A. (1992)** The alpha/beta hydrolase fold *Protein Eng.* **5**: 197-211
- Oomen, C.J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., Gros, P. (2004)** Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *J EMBO* **23**: 1257-1266
- Ostroff, R.M., Wretling, B., Vail, M.L. (1989)** Mutations in hemolytic phospholipase c operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect and Immun* **57**: 1369-1373
- O'Toole, G.A., Kolter, R. (1998)** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295 - 304
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Dorselaer, A., Lunardi, J. (2001)** A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**: 699-704
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., Doudoroff, M. (1973)** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol* **23**: 333-339
- Palleroni, N.J. (1993)** *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 231-251
- Pelletier, I., Altenbucher, J. (1995)** A bacterial esterase is homologous with non-heam haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiol* **141**: 459-468
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2000)** Relationships between community behaviour and pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Brogden, K.A., Roth, J.A., Stauton, T.B., Bolin, C.A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J.(Hrsg): *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. ASM Press, Washington, D.C., pp 77-92
- Parsek, M.R., Sigh, P.K. (2003)** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **57**: 677-701
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. (1995)** A second Nacylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1490-1494.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P. (1994)** Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 197-201.
- Pearson, J. P., Van Delden, C., Iglewski, B. H. (1999)** Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**: 1203-1210
- Pesci, E.C., Iglewski, B.H. (1999)** Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Dunny, G.M., Winsans, S.C. (Hrsg.): *Cell-cell signalling in bacteria*. ASM Press, Washington D.C., pp 259-273
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., Iglewski, B. H. (1999)** Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11229-11234
- Peterson, G.L. (1977)** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more general applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356
- Picard, B., Denamur, E., Barakat, A., Elison, J., Goulet, P. (1994)** Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. *J Med Microbiol* **40**: 313-322
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., Meyer, T.F. (1987)** Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462

- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S., Wagner, F. (1991)** Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Z Naturforsch* **46c**: 210-216
- Potvin E., D.E. Lehoux, I. Kukavica-Ibrulj, K.L. Richard, F.Sanschagrin, G.W. Lau. (2003)** In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**: 1294-308
- Poxton, I.R.(1993)** Prokaryote envelope diversity. *J Appl Bacteriol* **74**: 1-11
- Prokazova, N.V., Zvezdina, N.D., Korotaeva, A.A. (1998)** Effect of lysophosphatidylcholine on transmembrane signal transduction. *Biochemistry (Moscow)* **63**: 31-37
- Pugsley, A.P. (1993)** The complete general secretora pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108
- Quinn, J.P. (1992)** Intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas Molekular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Dorselaer, A., und Lunardi, J. (2001)** A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**: 699-704.
- Rahim, R., Ochsner, U.A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J.S., Soberón-Chávez, G. (2001)** Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **40**: 708-718
- Read, R.C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T., Hall, R., McDonald-Gibson, W., Lund, V., Taylor, G. (1992)** Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol* **76**: 2271-2277
- Rehm, B.H.A., Mitsky, A.T., Steinbüchel, A. (2001)** Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: Establishment of the transacylase (PhaG)- mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3102-3109
- Riedel, K., Talker-Huiber, D., Givskov, M., Schwab, H., Eberl, L. (2003)** Identification and Characterization of GDSL Esterase Gene located proximal to the *swr* Quorum-sensing system. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3901-3910
- Rivera, M., Bryan, L.E., Hancock, R.E., McGroarty, E.J. (1988)** Heterogeneity of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of lipopolysaccharide chain length. *J Bacteriol* **170**: 512-521
- Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2000)** Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanism of secretion. *Biochemie* **82**: 1023-1032
- Rosenberg, M. (1984)** Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* **22**: 289-295
- Rosenberg, M., Doyle, R.J. (1984)** Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. In: R.J. Doyle and M. Rosenberg (ed.), *Microbial cell surface hydrophobicity*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Rosenberg, M., Kjelleberg, S., (1986)** Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. *Microb Ecol* **9**: 353-393
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., Déziel, E. (2005)** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 718-725
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Sandrin, T.R., Chech, A.M., Maier, R.M. (2000)** A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4585-4588
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G.D., Costerton, J. W., Davies, D.G. (2002)** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **185**: 1140-1154.

- Schäfer, M. (1998)** Ein neues lipolytisches Enzym von *Pseudomonas aeruginosa*: Überexpression, Reinigung und physiologische Charakterisierung. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P. (2003)** Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**: 2066-2079
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Jr., Rinehart, K.L., Farrand, S.K. (1997)** Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6036-6041
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A. (1983)** A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio Technology* **1**: 784 -790
- Skerker, J.M., Berg, H.C. (2001)** Direct observation of extension and retraction of Type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6901-6904
- Slater, H., Crow, M., Everson, L., Salmond, G.P.C. (2003)** Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin in both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol Microbiol* **47**: 303-320
- Smith, R.S., Iglewski, B.H. (2003)** *P.aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**: 56-60
- Smolski, A. (2002)** Einfluß des lipolytischen System auf die Produktion von Rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Stanislavsky, E.S., Lam, J.S. (1997)** *Pseudomonas aeruginosa* antigens and potential vaccines. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 243-277
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective highlevel expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130
- Stutts, M.J., Schwab, J.H., Chen, M.G., Knowles, M.R., Boucher, R.C. (1986)** Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on bronchial epithelial ion transport. *Am Rev Respir Dis* **134**: 17-21
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., Costerton, J.W. (2001)** Growth and detachment off cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* **67**:5608-5613
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., Olson, M. V. (2000)** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964
- Struyve, M., Moons, M., Tommassen, J. (1991)** Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**: 141-148
- Struyve, M., Moons, M., Tommassen, J. (1991)** Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**: 141-148
- Suzuki, T., Lett, M.C., Sasakawa, C. (1995)** Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem* **270**: 30874-30880
- Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F. (1985a)** Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas spec.* DSM 2874 grown on *n*-alkanes. *Z Naturforsch* **40c**: 51-60
- Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U., Wagner, F. (1985b)** Production of four interfacial active rhamnolipids from *n*-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas species* DSM 2874. *Z Naturforsch* **40c**: 61-67
- Tamura, Y., Suzuki, S., Sawada, T. (1992)** Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Microb Pathog* **12**: 237-244
- Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I., Vasil, M.L. (1999)** *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect and Immun* **67**: 2371-2376
- Tielker, D. (2005)** Physiologie und Biotechnologie des Lektins LecB aus *Pseudomonas aeruginosa*, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Timpe J.M., Holm, M.M., Vanlerberg, S.L., Basrur, V., Lafontaine, E.R. (2003)** Identification of a *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesin and lipolytic activities. *Infect Immun* **71**: 4341-4350

- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., Molin, S. (2000)** Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *J Bacteriol* **182**: 6482-8489
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M., Lazdunski, A. (1992)** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **103**: 73-90
- Upton, C., Buckley, J.T. (1995)** A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem Sci* **20**: 178-179
- Ulmer, A. J., Pryjma, J., Tarnok, Z., Ernst, M., Flad, H. D. (1990)** Inhibitory and stimulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanine on human T and B lymphocytes and human monocytes. *Infect Immun* **58**: 808-815
- Urban, A., Leipelt A.M., Eggert, T., Jaeger, K.-E. (2001)** DsbA and DsbC effect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 587-596
- Usher, L.R., Lawson, R.A., Geary, I., Taylor, C.J., Bingle, C.D., Taylor, G.W., Whyte, M.K. (2002)** Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* **168**: 1861-1868
- Van Delden, C., Iglewski, B.H. (1998)** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**: 551-560
- Val, D.L., Cronan, J.E., Jr. (1998).** *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J Bacteriol* **180**: 2644-2651
- Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V., Fernandez, L. A. (2000)** Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol* **18**: 661-665
- Van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., Trevors, J.T. (1993)** *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid surfactants: structural characterisation and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can J Microbiol* **39**: 1071-1078
- Van Gelder, P., Dumas, F., Bartoldus, I., Saint, N., Prilipov, A., Winterhalter, M., Wang, Y., Philippsen, A., Rosenbusch, J.P., Schirmer, T. (2002)** Sugar transport through maltoporin of *Escherichia coli*: role of the greasy slide. *J Bacteriol* **184**: 2994-2999
- Verger, R. (1997)** Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **15**: 32-38
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.-F., Filloux, A. (2001)** Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway *EMBO J* **20**: 6735-6741
- Wagner, V.E., Gillis, R.J., Iglewski, B.H. (2004)** Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* **22**: 15-20
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H., Zhang, L. H. (2004)** Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHLlactonase). *J Biol Chem* **279**: 13645-13651
- Watson, M.E.E. (1984)** Complication of published signal sequences. *Nucleic Acid Res* **13**: 5145-5164
- Weinberg, E.D. (1974)** Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* **134**: 952-955
- Whiteley, M., Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2000)** Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 4356-4360
- Wild, M., Caro, A.D., Hernández, A.L., Miller, R.M., Soberón-Chávez, G. (1997)** Selection and partial characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol Lett* **153**: 279-285
- Winzer, K., Williams, P. (2001)** Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 131-143
- Wilhelm, S. (1997)** Klonierung, Sequenzierung und Expression eines Esterasegens aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Wilhelm, S., Tommassen, J., Jaeger, K.-E. (1999)** A novel lipolytic enzyme in the outer membrane of *P. aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6977-6986
- Wilhelm, S. (2001)** Identifizierung und Charakterisierung des Sekretionsweges der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- Winkler, U.K., Wingender, J., Jaeger, K.-E. (1985)** Infektion der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa* bei der Cystischen Fibrose. *Klein Wochenschr* **63**: 490-498

**Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jorgensen, F., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P., G.S. Stewart (1998)** Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. FEMS Microbiol. Lett. **163**: 185-192

**Yanisch-Perron, C., Viera, J., Messing, J. (1985)** Improved M13 cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**: 103-119

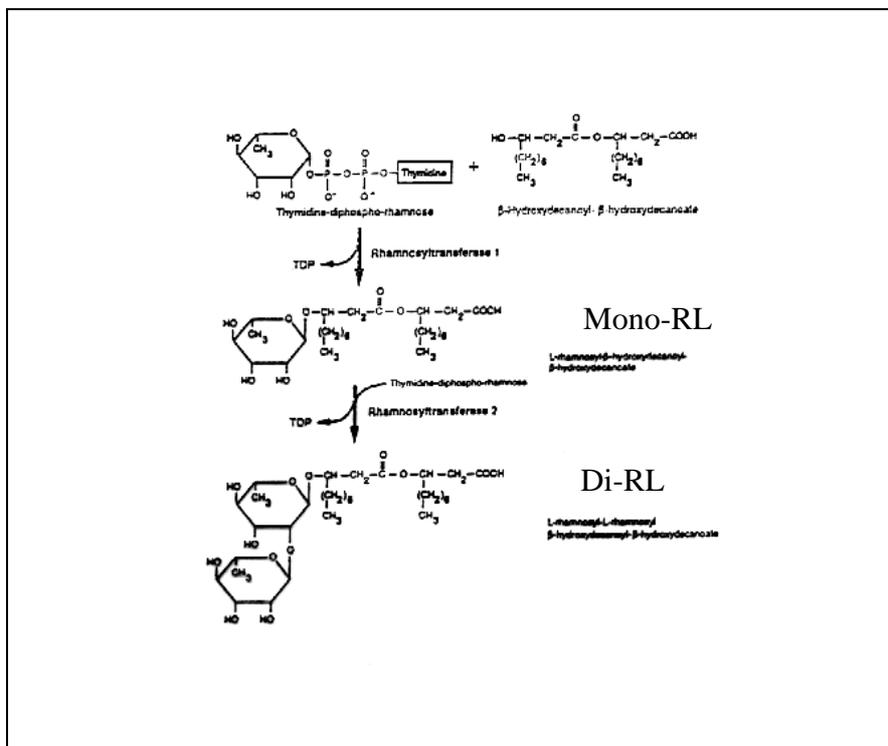
**Yen, M.-R., Peabody, C.R., Partovi, s.m., Zhai, Y., Tseng, Y.-H., Saier, .H. (2002)** Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. Biochem Biophys Acta **1562**: 6-31

**Zhang, Y., Miller, R.M. (1992)** Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl Environ Microbiol **58**: 3276-3282

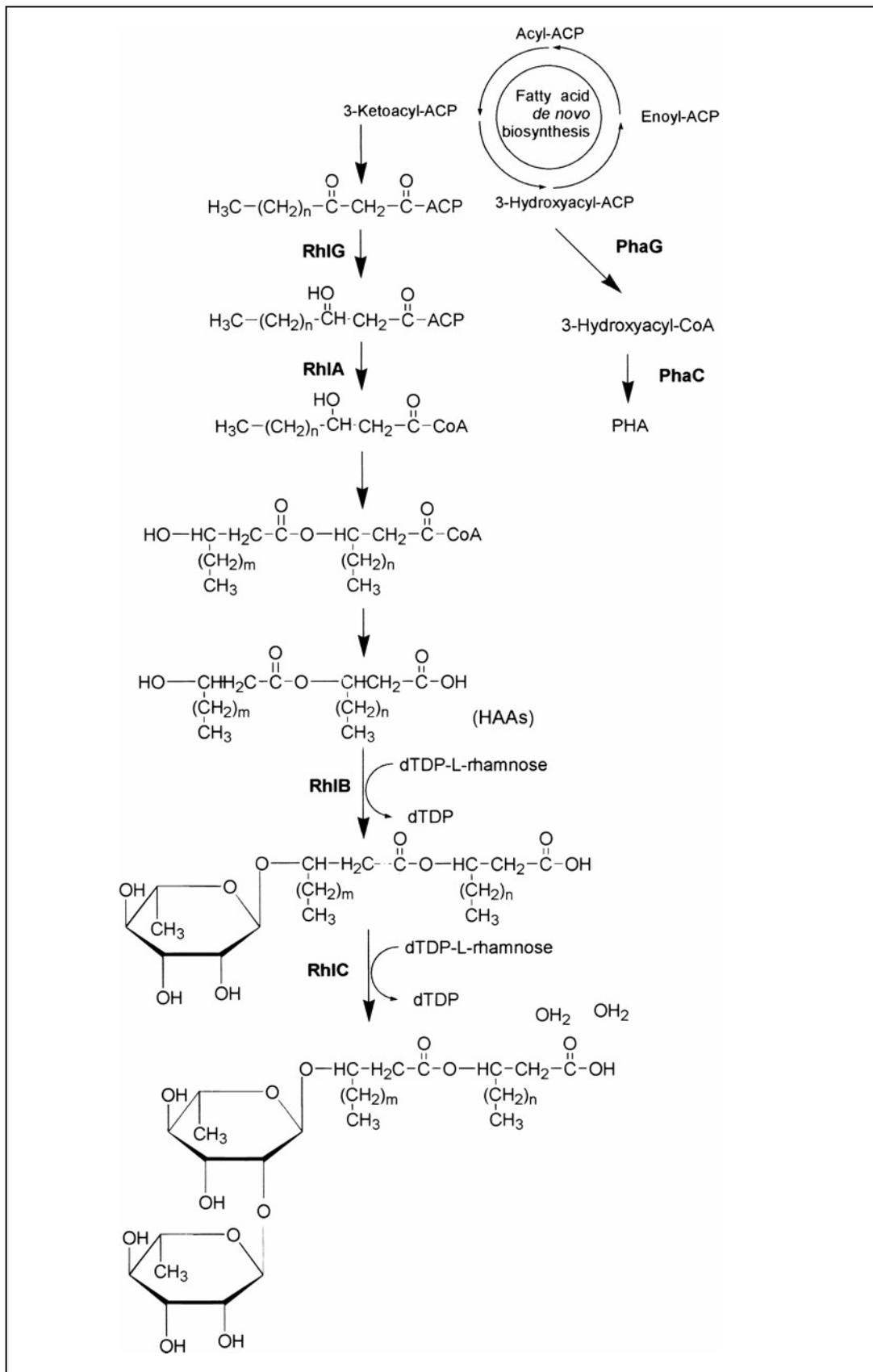
**Zhang, Y., Miller, R.M. (1994)** Effect of *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl Environ Microbiol **60**: 2101-2106

**Ziprin, R.L., Young, C.R., Byrd, J.A., Stanker, L.H., Hume, M.E., Gray, S.A., Kim, B.J., Konkol, M.E. (2001)** Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. Avian Dis **45**: 549-557

7. Anhang



Anhang 1: Glukosetransferreaktionen in der Rhamnolipid-Biosynthese verändert nach Burger *et al.*, 1963.



Anhang 2: Rhamnolipid-Syntheseweg nach Déziel *et al.*, 2003.