

**Einfluss des Lipase-spezifischen Chaperons LipH auf die Faltung
und Sekretion der Lipasen LipA und LipC aus
*Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Diplom-Biologe
Sascha Hausmann**

aus Mülheim a. d. Ruhr

Düsseldorf, April 2008

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“
(Albert Einstein)

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2008

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H. and Jaeger, K.-E. (2007).

Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem.* 8(1): 55-60

Hausmann, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. and Rosenau, F. (2008).

Mutations towards enantioselectivity adversely affect secretion of *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *FEMS Microbiol. Lett.* 282(1):65-72

Hausmann, S., Simon, R., Pietruszka, J., Jaeger, K.-E. and Rosenau, F. (2008).

A novel one-step *in vitro* activation/ affinity purification/ immobilization strategy for the production of lipases. Manuskript in Vorbereitung.

Hausmann, S., Wilhelm, S., Rosenau, F. and Jaeger, K.-E. (2008).

Pseudomonas aeruginosa Lif is a bi-specific lipase chaperone that assists *in vitro* folding of lipases LipA and LipC. Manuskript in Vorbereitung.

Hausmann, S., Hoge, R., Wilhelm, S., Rosenau, F. and Jaeger, K.-E. (2008).

Identification of residues affecting Xcp-dependent secretion of *P. aeruginosa* exoproteins. Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge im Rahmen internationaler Kongresse

Kreuz, A., Hausmann, S., Hacker, S., Rosenau, F., Wilhelm S., and Jaeger, K.-E. (2004).

Factors affecting lipase production in *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts, 2nd EU-meeting Nanofoldex, Visp, Schweiz.

Hausmann, S., Gruetzmacher, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2005).

Lipase and foldase from *Pseudomonas aeruginosa*: Structure / function relationship in folding and secretion. Book of abstracts, 4th EU-meeting Nanofoldex, Gordes, Frankreich.

Gruetzmacher, S., Hausmann, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. and Rosenau, F. (2005).

Improvement of lipase production by directed evolution of a specific chaperone from *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts, 5th EU-meeting Nanofoldex, Lausanne, Schweiz.

Posterpräsentationen

Hausmann, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E and Rosenau, F. (2005).

The lipase-specific foldase of *Pseudomonas aeruginosa*: an inter- or intramolecular chaperone? Book of abstracts, *Pseudomonas 2005*, Marseille, Frankreich, p. 73

Hausmann, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. and Rosenau, F. (2006).

Physiology of the lipase-specific foldase of *Pseudomonas aeruginosa*. Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2006, p. 124

Hausmann, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. and Rosenau, F. (2007).

Comparative characterization and molecular backgrounds of the chain length specificity of the two lipases LipA and LipC of *Pseudomonas aeruginosa*. Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2007, p. 94

Danksagungen

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

Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei der Europäischen Union bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes: „Nanofoldex – Exploiting the secretion machinery of *Pseudomonads* for the nanotechnological production of pharmaceuticals“.

Bei Prof. Dr. Harald Kolmar und Dr. Stefan Becker aus dem „Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie“ der Technischen Universität Darmstadt bedanke ich mich für die konstruktive Kooperation.

Den Mitarbeitern des „Instituts für Bioorganische Chemie“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, insbesondere Herrn Robert Simon, danke ich für die freundliche und tatkräftige Unterstützung bei den chemischen Synthesen und der Analytik.

Bei Kris Pauwels aus dem *Department of Molecular and Cellular Interactions* des *Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie* an der *Vrije Universiteit Brussel*, möchte ich mich für die Modellierung und Überlassung der Struktur des Lipase-Foldase Komplexes aus *P. aeruginosa* bedanken.

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

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET, vor allem der Labore 206 und 306, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit danken. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Alexander Schulz für die Durchsicht meines Manuskriptes.

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

Abschließend möchte ich Anne danken, die jederzeit für mich da war und mir stets Halt gegeben hat.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	V
Abkürzungen	IX
1. Einleitung	1
1.1 Lipasen	1
1.1.1 Struktur-Funktionsbeziehungen von Lipasen	2
1.1.2 Lipasen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.3 Lipasen in der Biotechnologie	6
1.2 Proteinfaltung und molekulare Chaperone	8
1.2.1 Lipase-spezifische Foldasen	9
1.2.2 Regulation der Expression von Lif-Proteinen	10
1.2.3 Spezifität von Lif-Proteinen	11
1.2.4 Interaktion der Lif-Proteine mit Lipasen	11
1.2.5 Physiologische Rolle der Lif-Proteine	13
1.3 Sekretionsmechanismen von Lipasen	13
1.3.1 Ein-Schritt Sekretionsmechanismen	13
1.3.2 Zwei-Schritt Sekretionsmechanismen	14
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Chemikalien und Enzyme	20
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	20
2.3 Oligonukleotide	24
2.4 Anzucht von Bakterien	25
2.4.1 Nährmedien	25
2.4.2 Indikatormedien	26
2.4.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	26
2.5 Isolierung von Nucleinsäuren	27
2.6 Gelelektrophorese von Nucleinsäuren	27
2.7 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	27
2.8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	27
2.9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	28
2.10 Polymerase-Kettenreaktion	28
2.10.1 Standard-PCR	28

2.10.2 Ortsspezifische Mutagenese	28
2.11 Sequenzierung von DNA	29
2.12 Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten	29
2.13 Herstellung von Sphäroblasten	29
2.14 Herstellung der Periplasma-, Cytoplasma- und Membranfraktion	29
2.15 Membranfraktionierung	30
2.16 Löslichkeitsanalyse von Proteinen	30
2.17 Reinigung von Lipase „inclusion bodies“	30
2.18 <i>In vitro</i> Renaturierung von Lipasen aus „inclusion bodies“	30
2.19 Reinigung von Proteinen als Poly-Histidin Fusionsprotein	31
2.20 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen	31
2.21 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	31
2.22 Gelfiltrations-Chromatographie	32
2.23 Gekoppelte Ein-Schritt Reinigung und <i>in vitro</i> Aktivierung von Lipasen mit an Beads immobilisiertem Chaperon	32
2.24 Bestimmung von Lipaseaktivitäten	33
2.24.1 Spektralphotometrische Bestimmung von Lipaseaktivität	33
2.24.2 Gaschromatographische Bestimmung der Lipaseaktivität	33
2.25 Präzipitation von Proteinen	34
2.26 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.27 Immunologischer Nachweis von Proteinen	34
2.28 Synthese des 2-Methyldecansäure- <i>p</i> NP Esters	35
2.29 NMR-Spektroskopie der synthetisierten Stoffe	36
2.30 Computerprogramme und Datenbanken	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Optimierung der heterologen Überexpression und Reinigung von LipA und LipH	37
3.1.1 Optimierung der Expression in <i>E. coli</i> und Reinigung der Lipasen	37
3.1.2 Expression in <i>E. coli</i> und Reinigung von LipH	41
3.2 Klonierung, Expression, Reinigung, <i>in vitro</i> Rückfaltung und Charakterisierung der Lipase LipC	43
3.2.1 heterologe Expression und Reinigung von LipC	44
3.2.2 Die Rückfaltung von LipC ist von LipH, Glycerol und Ca ²⁺ abhängig	45
3.2.3 LipC weist ein breiteres Substratspektrum als LipA auf	52

3.2.4 Der Tunnel zum aktiven Zentrum von LipC weist ein größeres Volumen auf als derjenige von LipA.....	54
3.3 Identifizierung essentieller Reste für die Typ II-Sekretion anhand der Unterschiede der Tertiärstrukturen von LipA und LipC	56
3.3.1 LipC wird nicht über den „klassischen“ Xcp-Apparat sekretiert	56
3.3.2 Identifizierung von Resten in LipA, die potentiell die Typ-II abhängige Sekretion beeinflussen	59
3.3.3 Die Sekretion der an K223 und N224 mutagenisierten Lipasevarianten ist beeinträchtigt.....	63
3.4 Der Einfluss von Punktmutationen in der enantioselektiven Lipasevariante 1H8 auf ihre Sekretion	67
3.4.1 Die Ausbeute einer homologen Überexpression der Lipase 1H8 ist aufgrund einer verminderten Sekretion stark herabgesetzt.....	68
3.4.2 Die Lipase 1H8 besitzt die Fähigkeit eine Disulfidbrücke auszubilden.....	70
3.4.3 die Mutationen D20N und T180I der Lipase 1H8 vermindern ihre Sekretion.....	71
3.5 Die Interaktion der Lipasen mit ihrem Chaperon und ihre biotechnologische Nutzung als „Ein- Schritt“ Affinitätsreinigung	75
3.5.1 <i>In vitro</i> rückgefaltetes LipA geht mit seinem Chaperon LipH einen stabilen und aktiven Proteinkomplex ein.....	76
3.5.2 Die Nutzung der Interaktion zwischen der Lipase und ihrem Chaperon als Ein-Schritt Affinitätsreinigung	77
3.5.3 Der <i>in vitro</i> generierte LipAH Komplex weist vergleichbare Eigenschaften wie homolog exprimierte Lipase auf.....	80
3.5.4 Die heterolog exprimierte Lipasevariante 1H8 zeigt die gleiche Enantiopräferenz im Komplex mit LipH wie homolog exprimierte Lipase.....	83
3.5.5 Der LipAH-Proteinkomplex kann nicht durch unterschiedliche physikalische, chemische oder biologische Methoden aufgelöst werden.....	88
3.5.6 N- und C-terminal immobilisiertes LipH verhält sich unterschiedlich	98
3.6 Charakterisierung einer translationalen Lipase-Foldase Fusion.....	102
3.6.1 LipA::H ist in <i>E. coli</i> nur bei schwacher Expression aktiv	107
3.6.2 LipA::H ist in <i>P. aeruginosa</i> nur bei schwacher Expression aktiv.....	109
3.6.3 Die LipA-LipH Fusion ist bei starker Expression ausschließlich als vollständiges Protein detektierbar	111
3.6.4 Zelluläre Lokalisation der LipA- und LipH-Anteile der Fusion	112
3.6.5 Der LipH-Anteil weist in das Periplasma.....	114
3.6.6 Reinigung von LipA::H mit C-terminalem His-Tag unter nativen und denaturierenden Bedingungen aus <i>E. coli</i>	115
3.6.7 Rückfaltungsexperimente mit der Fusion.....	118
3.6.8 Prozessierungsexperimente von heterolog gereinigter Fusion mit Zelllysaten	119

3.7 Die Nutzung der Ein-Schritt Reinigung für die Präparation einer noch nicht fertig gefalteten Lipase für die Strukturaufklärung	122
4. Diskussion	130
4.1 Optimierung der heterologen Expression und Reinigung von LipA und LipH	130
4.2 Charakterisierung von LipC und Untersuchung der LipH-abhängigen Faltung	132
4.3 Identifizierung essentieller Reste für die Typ-II abhängige Sekretion durch die Xcp-Maschinerie	136
4.4 Der Einfluss von Punktmutationen in der enantioselektiven Lipasevariante 1H8 auf ihre Sekretion	142
4.5 Die Interaktion der Lipasen mit ihrem Chaperon und ihre biotechnologische Nutzung als „Ein- Schritt“ Affinitätsreinigung	146
4.6 Charakterisierung einer translationalen Fusion aus Lipase und Foldase.....	157
4.7 Die Nutzung der Ein-Schritt Affinitätsreinigung für die homogene Präparation noch nicht aktivierter Lipase	164
 5. Zusammenfassung	 169
6. Literatur	173
7. Anhang	189

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1.1	Reaktionsschema der von Lipasen katalysierten Hydrolyse eines Triacylglycerols zu Glycerin und freien Fettsäuren	1
Abb. 1.2	3D-Strukturmodell der <i>P. aeruginosa</i> -Lipase LipA in der <i>ribbon</i> Darstellung	4
Abb. 1.3	Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte der Bildung der reifen Lipase LipA in <i>P. aeruginosa</i>	5
Abb. 1.4	Gerichtete Evolution der Enantioselektivität der Lipase LipA aus <i>P. aeruginosa</i>	7
Abb. 1.5	3D-Struktur des Lipase-Lip Komplexes aus <i>B. glumae</i>	12
Abb. 3.1	SDS-PAGE zum Vergleich der Ausbeuten nach Überexpression der Lipase mit und ohne Signalsequenz in <i>E. coli</i> BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors in LB	38
Abb. 3.2	SDS-PAGE der Expression von LipA als „inclusion bodies“ in <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLipA-SS in LB	39
Abb. 3.3	SDS-PAGE nach Überexpression der Lipase in M9 mit und ohne Zusatz von Spurenelementen und FeSO ₄ in <i>E. coli</i> BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors	40
Abb. 3.4	SDS-PAGE Analyse des Reinigungserfolgs der LipA „inclusion bodies“ nach Expression in optimiertem Minimalmedium	40
Abb. 3.5	SDS-PAGE der Expression von LipH als LipH ₁ -NHis in <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pEHTHis19	41
Abb. 3.6	SDS-PAGE der Reinigung von LipH ₁ -CHis durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	42
Abb. 3.7	SDS-PAGE der Expression von LipC als „inclusion bodies“ in <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLipC-SS in optimiertem M9-Medium	44
Abb. 3.8	Ausbeute der <i>in vitro</i> Aktivierung von LipA und LipC bei steigenden Konzentrationen Glycerol und in Ab- bzw. Anwesenheit der Lipase-spezifischen Foldase	45
Abb. 3.9	Effizienz der <i>in vitro</i> Aktivierung von LipA und LipC unter Zusatz von EDTA und einem Überschuss verschiedener Salze	46
Abb. 3.10	Einfluss von nicht-ionischen Detergenzien auf die <i>in vitro</i> Rückfaltung von LipA und LipC mit LipH	47
Abb. 3.11	Einfluss von ausgewählten anionischen Detergenzien auf die <i>in vitro</i> Aktivierung von LipA und LipC durch die Lipase-spezifische Foldase	48
Abb. 3.12	Einfluss von zwitterionischen Detergenzien auf die <i>in vitro</i> Renaturierung der Lipasen durch die Lipase-spezifische Foldase	49
Abb. 3.13	Auswirkungen verschiedener Detergenzien auf die <i>in vitro</i> Aktivierung von LipA und LipC	50
Abb. 3.14	Aktivität von <i>in vitro</i> aktiviertem LipA und LipC gegen <i>p</i> -Nitrophenolester mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge	52
Abb. 3.15	Abhängigkeit der Substratkonzentration von <i>p</i> NPP auf die lipolytische Aktivität von LipA und LipC zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten	53
Abb. 3.16	3D-Struktur von LipA und generiertes Modell der Struktur von LipC	54
Abb. 3.17	Vergleich der zum aktiven Zentrum führenden Tunnel von LipA und LipC	55
Abb. 3.18	Bestimmung der lipolytischen Aktivität bei Expression des <i>lipAH</i> - bzw. <i>lipCH</i> Operons in verschiedenen <i>P. aeruginosa</i> Stämmen durch Tributyrinplatten und mit <i>p</i> NPP als Substrat	57
Abb. 3.19	Bestimmung der lipolytischen Aktivität bei Koexpression des <i>lipAH</i> - bzw. <i>lipCH</i> Operons und des <i>xcp</i> -Genclusters in <i>P. putida</i> durch Tributyrinplatten und mit <i>p</i> NPP als Substrat	58
Abb. 3.20	Alignment der Primärstruktur von LipA und LipC durch den T-COFFEE Algorithmus	59
Abb. 3.21	Strukturelles Alignment der Röntgenstruktur von LipA mit dem LipC Strukturmodell	60
Abb. 3.22	Ansichten der Tertiärstrukturen der Lipasen C und A, des Exotoxin A und der Elastase B	62
Abb. 3.23	Bestimmung der lipolytischen Aktivität und immunologischer Nachweis von LipA Varianten im Kulturüberstand nach Expression in <i>P. aeruginosa</i> PABS1	64
Abb. 3.24	Abhängigkeit der Substratkonzentration von <i>p</i> NPP auf die lipolytische Aktivität von LipA und deren Varianten zur Bestimmung der Michaelis-Konstante	65
Abb. 3.25	Vergleich der lipolytischen Aktivität der Kulturüberstände nach Expression von LipA und LipA 1H8 unter Kontrolle des T7-Promotors in PABST7.1	67
Abb. 3.26	Anteil der lipolytischen Aktivität von sekretiertem LipA 1H8 und LipA nach Expression in <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1 in Bezug auf die Gesamtaktivität	68

Abb. 3.27	SDS-PAGE Analyse der Kulturüberstände der Überexpression von LipA und LipA 1H8 unter Kontrolle des T7-Promotors in <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1 und immunologischer Nachweis von LipA und LipA 1H8 nach Expression unter Kontrolle des T7-Promotors in <i>P. aeruginosa</i>	69
Abb. 3.28	Analyse der elektrophoretischen Homogenität der in die <i>in vitro</i> Rückfaltung eingesetzten Proteine und SDS-PAGE zur Untersuchung der Ausbildung von Disulfidbrücken in LipA und LipA 1H8 nach <i>in vitro</i> Renaturierung	70
Abb. 3.29	Bestimmung der lipolytischen Aktivität und immunologischer Nachweis von LipA 1H8 und der entsprechenden Varianten nach Expression in <i>P. aeruginosa</i> PABS1 unter Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors	72
Abb. 3.30	Lokalisation der Lage der Mutationen von LipA 1H8 in der 3D-Struktur von LipA aus <i>P. aeruginosa</i>	74
Abb. 3.31	Aufgenommenes Elutionsprofil von LipA, LipH ₁ -NH ₂ und <i>in vitro</i> zurückgefaltetem LipA während der Gelfiltration	76
Abb. 3.32	Überblick über die kombinierte Ein-Schritt <i>in vitro</i> Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung der Lipase	77
Abb. 3.33	SDS-PAGE Analyse der Proteinzusammensetzung der Fraktionen einer kombinierten „Ein-Schritt <i>in vitro</i> Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“	78
Abb. 3.34	Vergleich der lipolytischen Aktivität des immobilisierten LipAH Komplexes bei mehreren aufeinanderfolgenden Biotransformationen	79
Abb. 3.35	Spezifität von <i>in vitro</i> generiertem LipAH Komplex und freiem LipA aus dem Kulturüberstand von <i>P. aeruginosa</i> gegen <i>p</i> -Nitrophenolester mit unterschiedlicher Kettenlänge und Abhängigkeit der Substratkonzentration von <i>p</i> NPP auf die lipolytische Aktivität des LipAH Komplex und freier Lipase zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten	81
Abb. 3.36	Resistenz von LipAH und freiem LipA gegenüber thermischer Inaktivierung	82
Abb. 3.37	NMR-Analyse des synthetisierten 2-Methyldecansäure- <i>p</i> -Nitrophenols	84
Abb. 3.38	Trennung der Enantiomere von 2-Methyldecanoat durch Gaschromatographie an chiraler Phase	85
Abb. 3.39	Trennung der Enantiomere von 2-Methyldecanoat durch Gaschromatographie an chiraler Phase nach lipolytischer Spaltung von 2-Methyldecansäure- <i>p</i> -Nitrophenol	86
Abb. 3.40	Analyse der mit NaCl behandelten Fraktionen des immobilisierten LipAH Komplexes	88
Abb. 3.41	Analyse der Fraktionen des bei verschiedenen Temperaturen inkubierten immobilisierten LipAH Komplexes	89
Abb. 3.42	Analyse der Fraktionen des mit steigenden Urea-Konzentrationen inkubierten immobilisierten LipAH Komplexes	90
Abb. 3.43	Lipolytische Aktivität der Fraktionen vor und während der durchgeführten kombinierten „Ein-Schritt <i>in vitro</i> Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ von LipA durch LipH ₁ -NH ₂ und Inkubation mit oxidiertem bzw. reduziertem Glutathion	91
Abb. 3.44	Lipolytische Aktivität von Kulturüberständen nach homologer Expression von LipA und LipA S82A unter Kontrolle des T7-Promotors und immunologischer Nachweis von LipA S82A im Gesamtzellextrakt und Kulturüberstand nach homologer Expression unter Kontrolle des T7-Promotors	93
Abb. 3.45	Löslichkeitsanalyse von LipA S82A nach heterologer Überexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors und lipolytische Aktivität der Fraktionen der durchgeführten kombinierten „Ein-Schritt <i>in vitro</i> Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ von LipA durch LipH ₁ -NH ₂ und nachfolgende Inkubation mit gereinigtem LipA S82A	94
Abb. 3.46	Lokalisation des N-terminalen Drittels von LipA in dem Lipase-Chaperon Komplex anhand des 3D-Strukturmodells aus <i>P. aeruginosa</i>	95
Abb. 3.47	SDS-PAGE Analyse des Reinigungserfolgs der LA-1 „inclusion bodies“	96
Abb. 3.48	Lipolytische Aktivität der Fraktionen der durchgeführten kombinierten „Ein-Schritt <i>in vitro</i> Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ von LipA durch LipH ₁ -NH ₂ und nachfolgende Inkubation mit gereinigtem LA-1 Peptid	97
Abb. 3.49	Aufgenommenes Elutionsprofil der Proteinkomplexe aus Lipase und LipH ₁ -NH ₂ bzw. LipH ₁ -CH ₃ während der Gelfiltration	98
Abb. 3.50	Vergleich der lipolytischen Aktivität der Fraktionen vor und während der durchgeführten kombinierten „Ein-Schritt <i>in vitro</i> Aktivierung und Immobilisierung“ von LipA durch LipH ₁ -NH ₂ bzw. LipH ₁ -CH ₃	99

Abb. 3.51	Vergleich der lipolytischen Aktivität der Fraktionen vor und während der Immobilisierung von LipA-LipH _r -CHis und LipA-LipH _r -NHis und SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen	100
Abb. 3.52	Schematischer Überblick über Beispiele möglicher Lokalisationen der Gene bakterieller Chaperone in Relation zu den zu faltenden codierten Enzymen	102
Abb. 3.53	Ausschnitt der Sequenzen des <i>lipAH</i> Operons und der <i>in silico</i> erstellten translationalen Fusion im Bereich der im Wildtyp Fall vorhandenen intergenischen Region	103
Abb. 3.54	Lage des C-Terminus von LipA und des N-Terminus von LipH in dem Strukturmodell des LipAH Proteinkomplexes aus <i>P. aeruginosa</i>	103
Abb. 3.55	Sekundärstrukturvorhersage der <i>in silico</i> generierten Fusion im Bereich der ehemaligen intergenischen Region des <i>lipAH</i> Operons	104
Abb. 3.56	Tributyrynplatten von Kulturen, die LipA::H unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen unter Kontrolle des T7-Promotors exprimieren	107
Abb. 3.57	SDS-PAGE Analyse der Proteinzusammensetzung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET22A::HΔA vor und 2 h nach Induktion	108
Abb. 3.58	Vergleich der lipolytischen Aktivität von Kulturen, die <i>lipA::H</i> bzw. <i>lipAH</i> unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen unter Kontrolle des T7-Promotors und des <i>lac</i> - Promotors exprimierten, auf Tributyrinplatte	109
Abb. 3.59	Lipolytische Aktivität der Gesamtzellextrakte und Überstände von Kulturen, die <i>lipA::H</i> bzw. <i>lipAH</i> unter Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors exprimierten	110
Abb. 3.60	Immunologischer Nachweis von LipA::H nach homologer Expression in <i>P. aeruginosa</i> unter Kontrolle des T7-Promotors und des <i>lac</i> -Promotors in den Gesamtzellextrakten	111
Abb. 3.61	Immunologischer Nachweis von LipH und LipA nach homologer Expression von <i>lipAH</i> und <i>lipA::H</i> unter Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors und Fraktionierung	112
Abb. 3.62	Immunologischer Nachweis von LipH nach homologer Expression von <i>lipA::H</i> unter Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors und Fraktionierung der inneren und äußeren Membran	113
Abb. 3.63	Immunologischer Nachweis von LipH nach Trypsinverdau präparierter Sphäroplasten von <i>P. aeruginosa</i> Kulturen, die <i>lipAH</i> bzw. <i>lipA::H</i> unter Kontrolle von P _{lac} exprimierten	114
Abb. 3.64	Nachweis der Funktionalität von LipA::H als Poly-Histidin Fusionsprotein unter nicht-induzierenden Bedingungen in <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1 auf Tributyrinplatte	115
Abb. 3.65	Analyse der Löslichkeit von LipA::H-CHis nach heterologer Überexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors	116
Abb. 3.66	SDS-PAGE der Reinigung von LipA::H-CHis durch eine IMAC unter denaturierenden Bedingungen nach heterologer Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) und unter nativen Bedingungen nach Inkubation mit Laurylmaltosid (2% (w/v))	117
Abb. 3.67	Lipolytische Aktivität nach <i>in vitro</i> Renaturierung von LipA::H-CHis mit LipA bzw. LipH _r -CHis	118
Abb. 3.68	SDS-PAGE der Fraktionen einer IMAC nach Expression von LipA::H-CHis im homologen Wirt <i>P. aeruginosa</i> PABS1	120
Abb. 3.69	Immunologischer Nachweis von LipA::H-CHis bzw. seiner C-terminalen Fragmente nach Inkubation von gereinigter, intakter Fusion mit Gesamtzellextrakten von <i>P. aeruginosa</i> PABS1 und <i>E. coli</i> DH5α	121
Abb. 3.70	Alignment der Primärstruktur von LipH G5 und LipH durch den ClustalW Algorithmus und Lage der homologen Bereiche des LipH G5 in dem Strukturmodell des LipAH Komplexes von <i>P. aeruginosa</i>	123
Abb. 3.71	Alignment der Primärstruktur von LipH G1 und LipH durch den ClustalW Algorithmus und Lage der homologen Bereiche des LipH G5 in dem Strukturmodell des LipAH Komplexes von <i>P. aeruginosa</i>	124
Abb. 3.72	SDS-PAGE der Gesamtzellextrakte der Kulturen nach heterologer Überexpression von LipH G5, LipH G5N, LipHG5C und LipH G1 in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	125
Abb. 3.73	Analyse des Reinigungserfolgs der verschiedenen LipH Varianten nach durchgeführter IMAC per SDS-PAGE	126
Abb. 3.74	SDS-PAGE Analyse der Interaktionsexperimente der in den Elutionsfraktionen enthaltenen Proteine mit Gesamtzellextrakt, das „nahe natives“ LipA enthielt	127
Abb. 3.75	Immunologischer Nachweis von LipH und LipA mit den für das Beadexperiment eingesetzten Fraktion und der Elution des Interaktionsexperiments per Western Blot	128
Abb. 4.1	3D-Strukturmodell des LipAH Komplexes aus <i>P. aeruginosa</i>	141
Abb. 4.2	Lage der Mutationen, die die Sekretion nachteilig beeinflussen, in der 3D-Struktur von LipA	145
Abb. 4.3	Darstellung der intermolekularen Salzbrücke zwischen dem C-Terminus der Foldase und der Lipase anhand der Struktur des Proteinkomplexes aus <i>B. glumae</i> und des Strukturmodells aus <i>P. aeruginosa</i>	151

Abb. 4.4	Fluoreszenzspektren von mit unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff versetztem LipA unter Verwendung des Farbstoffs 8-Anilino-1-Naphtalen-Sulfonsäure	153
Abb. 4.5	Lokalisation der Minidomänen und der Spaltstellen durch Behandlung mit 2-Nitro-5-Thiocyanobenzoat in LipH G5	168
Abb. 7.1	Klonierung von LipA ohne Signalsequenz in pLipA-SS	189
Abb. 7.2	Schema der Konstruktion von pLipC-SS	190
Abb. 7.3	Klonierungsschema der enantioselektiven Lipasevariante LipA 1H8 ohne ihre Signalsequenz in pLipA 1H8-SS	191
Abb. 7.4	Schema der Klonierung der Foldasevarianten LipH G5 und LipH G1 mit N-terminalem Poly-Histidin-Peptid	192
Abb. 7.5	Schema der Subklonierung der N- und C-terminal lokalisierten Minidomänen von LipH G5	193
Abb. 7.6	Schema der Umklonierung von <i>lipA 1H8</i> bzw. der entsprechenden Einzel- und Mehrfachvarianten unter Kontrolle des <i>lac</i> Promotors	194
Abb. 7.7	Klonierungsschema des Gens der inaktivierten LipA Variante S82A	195
Abb. 7.8	Schema der Konstruktion und Klonierung von <i>lipA::H</i> in das Plasmid pET22A::HΔA	196
Abb. 7.9	Schema der Umklonierung von <i>lipA::H</i> in die pUCPKS Derivate pUCPL6A und pUCPLip1	197
Abb. 7.10	Schema der Klonierung von <i>lipA::H</i> in pBR22b für die Konstruktion von <i>lipA::H-CHis</i>	198
Abb. 7.11	Klonierungsschema der an den Positionen K223 und N224 mutagenisierten LipA Varianten	199

Tabellen

Tab. 2.1	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	20
Tab. 2.2	Übersicht der verwendeten Vektoren	21
Tab. 2.3	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	24
Tab. 2.4	Endkonzentrationen der zur Selektion verwendeten Antibiotika	26
Tab. 3.1	Zusammenfassung der ermittelten Michaelis-Konstanten der LipA Varianten für pNPP	66
Tab. 3.2	Densitometrische Analyse der Signalintensitäten der immunologisch detektierten Lipase-Varianten	73
Tab. 3.3	Enantioselektivität der Hydrolyse von 2-Methyldecansäure- <i>p</i> -Nitrophenol, katalysiert durch Wildtyp LipA und LipA 1H8 aus Kulturüberständen nach homologer Expression und mit ihrem Chaperon LipH komplexiert	87
Tab. 3.4	Übersicht über relevante Eigenschaften der Lipase-Foldase Operons verschiedener Organismen, die während der <i>in silico</i> Fusion betrachtet wurden sowie die zur Fusion führenden eingefügten Mutationen	104
Tab. 4.1	Absolute und relative Häufigkeit der Start-Codons ATG, GTG und TTG in verschiedenen Organismen	158
Tab. 7.1	Übersicht über relevante Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine und ihrer Varianten	188

Abkürzungen

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

λ	Wellenlänge
2-MDA	2-Methyldecansäure
A	Ampere
A. dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-1-Naphtalensulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
Cb	Carbenicillin
CD	circular Dichroismus
CMC	kritische micellare Konzentration
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
Dsb	<i>disulfide bond formation</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
g	Gramm
GEP	<i>general export pathway</i>
GSP	<i>general secretory pathway</i>
GZE	Gesamtzellextrakt
h	Stunde(n)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Merettich-Peroxidase
HSQC	<i>heteronuclear single quantum-coherence</i>
IB	<i>inclusion bodies</i>
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
IR	intergenische Region
kat	Katal

kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani Broth
Lif	Lipase-spezifische Foldase
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute(n)
MTB	<i>main terminal branch</i>
mTB	<i>minor terminal branch</i>
NaDoc	Natriumdesoxycholat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTA	Nitrilo-3-Essigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
O.D.	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i>
Pa	Pascal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenyl-Palmitat
ppm	<i>parts per million</i>
PVDF	Polyvenylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAG	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRP	<i>signal recognititon particle</i>
TBME	tert-Butylmethylether
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

1. Einleitung

Schon vor mehr als einem Jahrhundert beschrieb der Medizin-Nobelpreisträger Christiaan Eijkman Bakterien, die in der Lage waren, Fette zu spalten (Eijkman, 1901). Diese Degradierung wird durch „lipolytische Enzyme“ katalysiert, wobei der Begriff neben Phospholipasen (EC 3.1.4.3) auch Lipasen (EC 3.1.1.3) und Esterasen (EC 3.1.1.1) umfasst. Während Phospholipasen, wie der Name bereits suggeriert, an dem Abbau von Phosphoglyceriden beteiligt sind, spalten Lipasen und Esterasen die Glycerolester von lang- bzw. kurzkettigen Fettsäuren durch Hydrolyse (Abb. 1.1).

Das Vorkommen von Lipasen erstreckt sich über das gesamte Organismenreich. Sie konnten sowohl in Säugetieren, Pflanzen und Pilzen, als auch in prokaryontischen Mikroorganismen identifiziert werden (Krisch, 1971; Hong *et al.*, 1991). Während bei höheren Organismen die Funktion der Lipasen in der Mobilisierung von Speicherfetten besteht (Borgström & Brockmann, 2004), ist die Bedeutung mikrobieller Lipasen für ihre Produzenten noch weitgehend unverstanden (Rosenau & Jaeger, 2004).

Lipolytische Enzyme sind wegen ihres biotechnologischen Potentials (Jaeger *et al.*, 1997; Jaeger & Reetz, 1998; Houde *et al.*, 2004; Salameh & Wiegel, 2007) und ihrer Funktion als Virulenzfaktoren bei pathogenen Mikroorganismen (Jaeger *et al.*, 1991; Jaeger *et al.*, 1992a; Jaeger *et al.*, 1992b; Jaeger *et al.*, 1994a; Upton & Buckley, 1995; Koenig *et al.*, 1996; Aragon *et al.*, 2002; Mullen *et al.*, 2007) stärker in das wissenschaftliche Interesse gerückt.

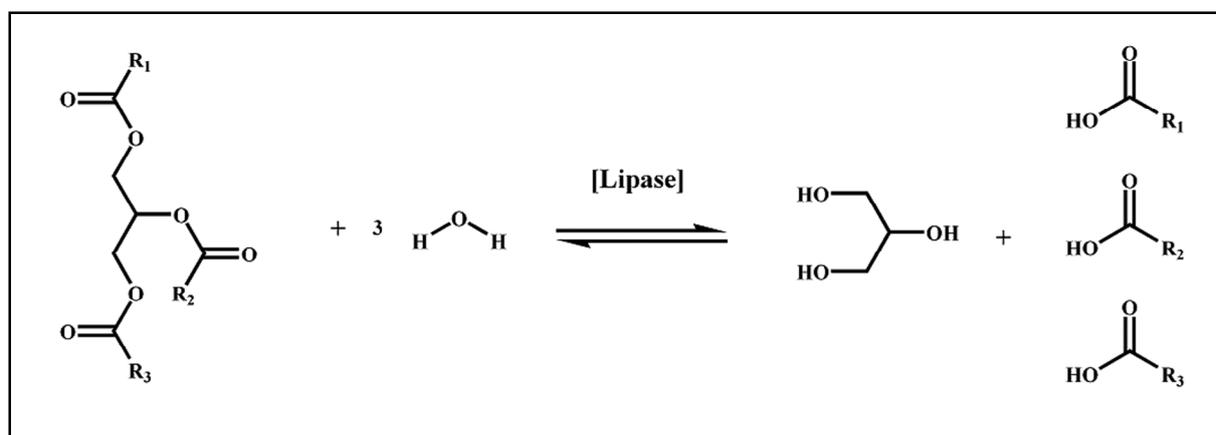


Abb. 1.1: Reaktionsschema der von Lipasen katalysierten Hydrolyse eines Triacylglycerols zu Glycerin und freien Fettsäuren bzw. der Synthese eines Triacylglycerols aus Glycerin und freien Fettsäuren.

1.1 Lipasen

Während Esterasen kurzkettige, wasserlösliche Fettsäureester ($\leq C_{10}$) hydrolysieren, spalten Lipasen neben diesen kurzkettigen Substraten auch langkettige, wasserunlösliche Triacylglycerole ($\geq C_{10}$) (Verger, 1997). Neben den verschiedenen Substratspezifitäten kann als weiteres Unterscheidungsmerkmal von Lipasen und Esterasen die Kinetik der katalysierten Reaktion betrachtet werden (Sarda & Desnuelle, 1958). Die Hydrolyse von Carbonsäureestern durch Esterasen folgt der Michaelis-Menten Kinetik, die Spaltung von Triglyceriden in Di- und Monoglyceriden, Glycerol und freien Fettsäuren durch Lipasen

(Brockerhoff & Jensen, 1974) weist einen sigmoidalen Reaktionsverlauf auf. Lipasen zeigen unterhalb der Sättigungsgrenze mit Substrat nur eine geringe Aktivität. Ein Überschreiten dieser Grenze resultiert in einem Übergang des Substrats von einem monomeren in einen aggregierten Zustand, so dass sich eine sog. Interphase ausbildet, und ein sprunghafter Anstieg der lipolytischen Aktivität beobachtet werden kann. Das Phänomen der als Interphasenaktivierung bezeichneten Kinetik konnte durch Strukturuntersuchungen verschiedener Lipasen erklärt werden. Die Strukturen der betrachteten Lipasen wiesen eine flexible α -helicale Polypeptidkette auf, welche das aktive Zentrum bedeckt und demnach als „Deckel“ beschrieben wurde. Bei Kontakt des Enzyms mit der Interphase findet eine Konformationsänderung statt und ermöglicht eine Interaktion des freigelegten aktiven Zentrums mit dem Substrat (Brzozowski *et al.*, 1991; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Gleichzeitig wird durch die Änderung der Proteinstruktur eine große hydrophobe Oberfläche exponiert, von der vermutet wird, dass sie den Zusammenhalt von Lipase und Interphase verbessert (Brzozowski *et al.*, 1991). Aufgrund weiterer in den letzten Jahren identifizierter und charakterisierter Lipasen wurde festgestellt, dass die beschriebene Interphasenaktivierung kein eindeutiges Merkmal für Lipasen darstellt (Verger, 1997). So weist die Lipase aus *B. subtilis* keine Deckelstruktur auf, und die Lipase LipA aus *P. aeruginosa* zeigt trotz eines Deckels nicht die beschriebene Interphasenaktivierung (Jaeger *et al.*, 1993; Lesuisse *et al.*, 1993).

1.1.1 Struktur-Funktionsbeziehungen von Lipasen

Aufgrund von durchgeführten Homologievergleichen der Aminosäuresequenz werden Lipasen in acht Familien unterteilt (Arpigny & Jaeger, 1999). Eine Vielzahl bakterieller Lipasen wurde bereits isoliert und charakterisiert (Saxena *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang wurde eine Reihe von Lipasen durch Röntgen-Strukturanalyse untersucht. Zu den aufgeklärten Kristallstrukturen zählen unter anderem diejenigen der Lipasen aus *Burkholderia glumae* (Noble *et al.*, 1993), *Chromobacterium viscosum* (Lang *et al.*, 1996), *Pseudomonas aeruginosa* (Nardini *et al.*, 2000), *B. subtilis* (van Pouderoyen *et al.*, 2001) und *B. stearothermophilus* (Tyndall *et al.*, 2002).

Lipasen gehören häufig zur Familie der Serin-Hydrolasen (Derewenda & Derewenda, 1991), die wegen eines enthaltenden charakteristischen Strukturmotivs auch häufig als α/β Hydrolasen bezeichnet werden (Ollis *et al.*, 1992; Nardini & Dijkstra, 1999) und zu denen neben lipolytischen Enzymen unter anderem auch verschiedene Proteasen und andere Hydrolasen zählen (Pelletier & Altenbuchner, 1995). Serin-Hydrolasen sind durch das Vorkommen einer sog. katalytischen Triade charakterisiert (Blow, 1990). Diese an der Katalyse beteiligte, im aktiven Zentrum vorhandene, Triade besteht aus drei Aminosäureresten. Sie setzt sich aus einer nucleophilen Aminosäure, dem für die katalytische Aktivität essentiellen Serin (Brenner, 1988), einer sauren Aminosäure, meist Aspartat oder auch Glutamat, und einem konservierten Histidinrest zusammen (Brady *et al.*, 1990; Schrag *et al.*, 1991). Dabei befindet sich der Serin-Rest in einem konservierten Konsensusmotiv, welches ein Pentapeptid der Sequenz Gly-X₁-Ser-X₂-Gly darstellt und ein charakteristisches β - ϵ -Ser- α -Motiv bildet, das für die sterischen Voraussetzungen der Katalyse erforderlich ist zu

sein scheint (Ollis *et al.*, 1992). Die Hydrolyse des Substrats erfolgt durch einen nucleophilen Angriff der Hydroxyl-Gruppe der Serin-Seitenkette auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Esterbindung, wobei ein tetraedrischer Übergangszustand entsteht. Nach Freisetzung des Alkohols wird ein Acyl-Lipase-Komplex gebildet, der im Folgenden unter Freisetzung der Fettsäure und des Enzyms hydrolysiert wird (Jaeger & Reetz, 1998).

1.1.2 Lipasen von *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist das erste Gram-negative Bakterium, in dem zwei homologe Lipasen der Familie I.1 identifiziert wurden. Diese beiden Lipasen wurden als LipA und LipC annotiert. Die von *P. aeruginosa* gebildete Lipase LipA hat ein apparentes Molekulargewicht von 29 kDa. Das 311 Aminosäuren große Präprotein wird mit einer 26 AS langen N-terminalen Signalsequenz von einem 936 bp großen Gen (*lipA*) codiert. Damit die Lipase enzymatische Aktivität erlangt, ist die Anwesenheit der 37,5 kDa großen Lipase-spezifischen Foldase LipH zwingend notwendig (Wohlfarth *et al.*, 1992). Das 1023 bp lange Gen (*lipH*), welches für diese Foldase codiert, befindet sich zusammen mit *lipA* in einem bicistronischen Operon (Jaeger *et al.*, 1994a). Die Expression der Lipase unterliegt der Kontrolle von zwei Promotoren, zum einen einem RpoN (σ 54) abhängigen Promotor P1 und zum anderen einem noch nicht näher charakterisierten Promotor P2, der sich weitere 330 bp stromaufwärts von P2 befindet (Duefel, 2000). Ein für den Promotor P1 erforderlicher spezifischer Aktivator der Transkriptionsinitiation konnte mit LipR als Teil eines Zweikomponenten-Regulationssystems zusammen mit LipQ, die eine putative signaltransduzierende Sensor kinase darstellt, sowohl in *P. aeruginosa* als auch in dem verwandten Stamm *P. alcaligenes* gefunden werden (Duefel, 2000; Nishijyo *et al.*, 2001; Krzeslak *et al.*, 2008), wobei das transduzierte Signal bisher noch nicht näher charakterisiert wurde. Die physiologische Funktion der Lipase ist bis jetzt unverstanden (Rosenau & Jaeger, 2000). Es ist aber zu vermuten, dass das Protein aufgrund der komplexen Regulationsmechanismen nicht nur zur Nutzung von Fetten als C-Quelle gebildet wird.

LipA gehört zur Subfamilie I.1 der lipolytischen Enzyme (Arpigny & Jaeger, 1999) und war die erste Lipase, deren Struktur innerhalb dieser Subfamilie erfolgreich aufgeklärt werden konnte (Nardini *et al.*, 2000). So konnte der typische Faltungstyp der α/β -Hydrolasen (Ollis *et al.*, 1992) anhand der Struktur ermittelt werden. Die katalytische Triade des aktiven Zentrums wird durch die Aminosäuren Ser⁸², Asp²²⁹ und His²⁵¹ gebildet. Zwischen den Resten Cys¹⁸³ und Cys²³⁵ weist das reife Protein eine intramolekulare Disulfidbrücke auf, die das Enzym stabilisiert, aber nicht für die korrekte Faltung, Interaktion mit LipH und somit für seine katalytische Aktivität essentiell ist (Liebeton *et al.*, 2001). Der *loop*, der das an der katalytischen Triade beteiligten His²⁵¹ enthält, wird durch ein oktaedrisch koordiniertes Ca²⁺-Ion stabilisiert und ist somit für die katalytische Aktivität des Enzyms vonnöten (Nardini *et al.*, 2000).

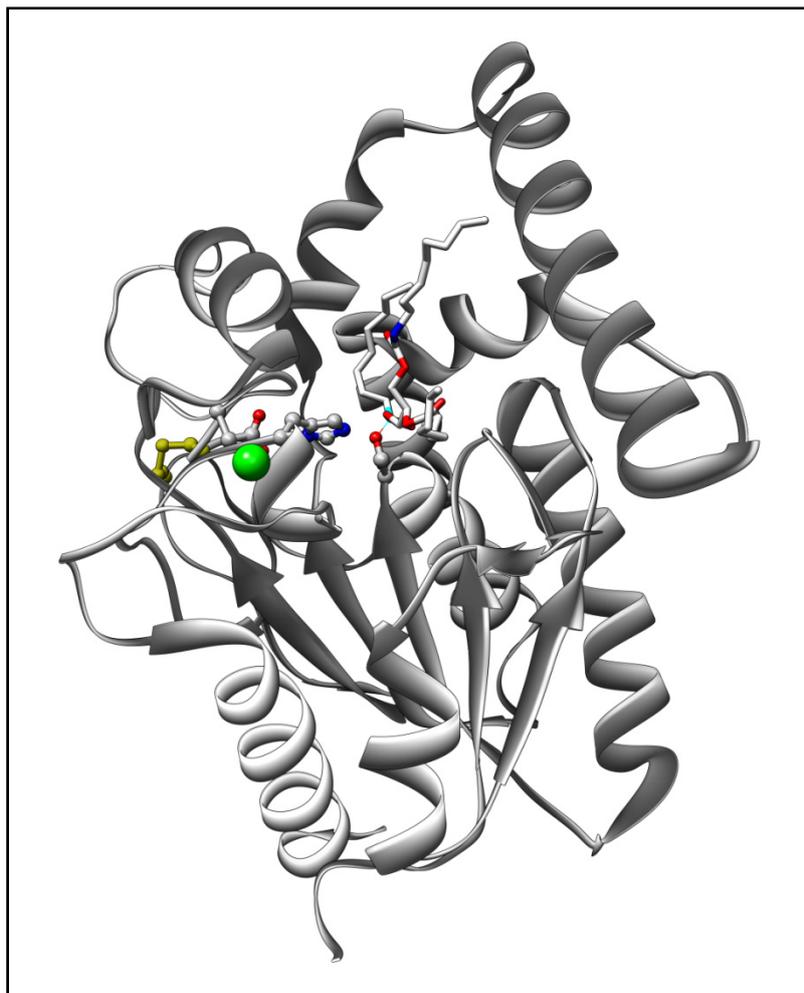


Abb. 1.2: 3D-Strukturmodell der *P. aeruginosa*-Lipase LipA (nach Nardini *et al.*, 2000; PDB Code 1ex9) in der *ribbon* Darstellung. Als *sticks* gezeigt ist der kovalent vom nucleophilen Ser⁸² gebundene Phosphonat Inhibitor. Das Ca²⁺-Ion (grün) und die intramolekulare Disulfidbrücke bildenden Seitenketten des Cys183 und Cys235 (gelb), sowie die Seitengruppen des Ser⁸², Asp²²⁹ und des His²⁵¹ der sog. katalytischen Triade sind als *ball and stick* dargestellt. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Die Lipase wird gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase gebildet und durch den Typ II-Sekretionsmechanismus in das extrazelluläre Medium sekretiert (Abb. 1.3) (Jaeger *et al.*, 1991). Der Sec-Apparat erkennt das Präprotein aufgrund der N-terminalen Signalsequenz und transportiert es über die innere Membran. Im Periplasma wird durch die Dsb-Proteine („*disulfide bond formation*“) die Disulfidbrücke geknüpft (Urban *et al.*, 2001). Weiterhin wird eine Funktion der periplasmatischen Proteasen bei der Reifung der Lipase diskutiert (Rosenau & Jaeger, 2000; Urban, 2000; Windgassen, 2000; Gruetzmacher, 2003). Nach der von dem an der inneren Membran verankerten LipH vermittelten Übergang in die aktive Konformation (Jaeger *et al.*, 1994a; Schneidinger, 1997) erfolgt die Sekretion der Lipase durch den Xcp-Apparat in das extrazelluläre Medium (Tommasen *et al.*, 1992; Lazdunski *et al.*, 1996; Filloux *et al.*, 1998).

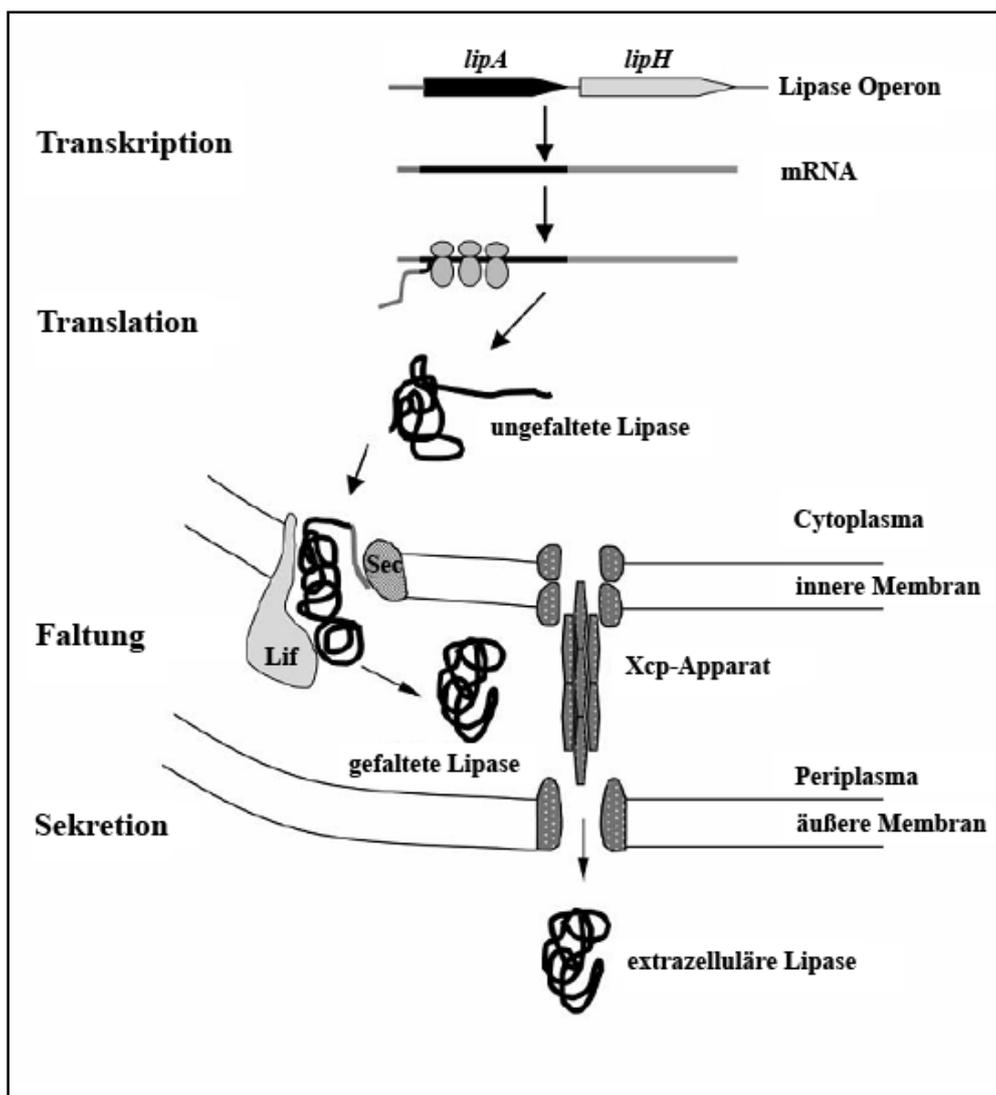


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte der Bildung der reifen Lipase LipA in *P. aeruginosa* (nach Rosenau *et al.*, 2004). Nach Transkription des bicistronischen Operons und Translation wird die ungefaltete Lipase über ihre N-terminale Signalsequenz erkannt und über den Sec-Apparat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

Neben der Triacylglycerollipase LipA besitzt *P. aeruginosa* als einziges bekanntes Gram-negatives Bakterium noch eine weitere annotierte Lipase des Typs I.1. Eine Besonderheit dieser Lipase LipC besteht darin, dass direkt stromabwärts von *lipC* kein Gen für eine Lipase-spezifische Foldase identifiziert werden konnte (Martinez *et al.*, 1999). Die Lipase LipC weist ein Molekulargewicht von 31,9 kDa auf. Das 306 Aminosäuren große Protein ist zu 55 % mit LipA identisch. Auf genetischer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass es unter anderen physiologischen Bedingungen als LipA gebildet wird, während eine Beteiligung des Chaperons LipH, das zusammen mit LipA in einem bicistronischen Operon lokalisiert ist, an der Faltung von LipC vermutet wurde (Martinez *et al.*, 1999). Bislang wurde jedoch kein direkter biochemischer Beweis erbracht, dass LipH als erste Lipase-spezifische Foldase tatsächlich mit zwei Lipasen interagieren und sie in ihre katalytisch aktive Konformation überführen kann. Die Aktivität von LipC ist unter Wildtyp Expressionsbedingungen um ein

Vielfaches geringer als diejenige von LipA (Heckmann, 2001), weswegen das Enzym bislang nicht charakterisiert wurde.

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

1.1.3 Lipasen in der Biotechnologie

Durch ihre Fähigkeit, Acylglycerole nicht nur zu spalten, sondern sie ebenfalls mit hoher Enantioselektivität und breiter Substratspezifität zu synthetisieren (Erdmann *et al.*, 1990; Jaeger & Reetz, 1998), herrscht ein großes biotechnologisches Interesse an mikrobiellen Lipasen (Drepper *et al.*, 2006). Da diese Enzyme Stabilität in organischen Lösungsmitteln aufweisen und keine Cofaktoren benötigen, bieten sich Möglichkeiten zur industriellen Anwendung (Jaeger & Reetz, 1998; Jaeger & Eggert, 2002). Hierbei sind Lipasen der Gattung *Pseudomonas* von besonderem Interesse, da sich in dieser Gattung Enzyme finden, die neben den schon beschriebenen biotechnologisch relevanten Eigenschaften weitere Vorzüge wie Thermostabilität und Aktivität bei alkalischem pH aufweisen und als Zusätze von Detergenzien eingesetzt werden (Soberon-Chavez & Palmeros, 1994; Jaeger *et al.*, 1994a). Neben der beschriebenen Transesterifikation konnten mit Hilfe von Lipasen auch Umsetzungen von Cyanhydrinen, Chlorhydrinen, Lactonen und die Acylierung von Aminen und Ammoniak katalysiert werden (Jaeger & Reetz, 1998; Gotor, 2002). Aufgrund der beschriebenen Vielfalt durchführbarer Reaktionen werden neben der Verwendung von Lipasen als Ersatz für Detergenzien in Waschmitteln (Godfrey & West, 1996) diese Enzyme dazu eingesetzt, mehrfach ungesättigte Fettsäuren für die Lebensmittelindustrie (Gill & Valivety, 1997; Flickinger, 2007; Sabikhi, 2007), Biopolymere (Gross *et al.*, 2001; Panova & Kaplan, 2003), Biodiesel aus Pflanzenölen (Iso *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007) und enantiomerenreine Grundbausteine für die Pharmaindustrie (Patel, 2001; Patel, 2006) herzustellen.

Da für den biotechnologischen Einsatz von Enzymen aufgrund der industriell benötigten Reaktionsbedingungen genau definierte Anforderungen an das Protein zum Beispiel hinsichtlich seiner Stabilität, Aktivität und Enantioselektivität gestellt werden, ist es häufig nicht möglich, unmodifizierte Enzyme zu verwenden. Daher besteht die Notwendigkeit, Enzyme für bestimmte zu katalysierende Reaktionen hinsichtlich ihrer gewünschten Eigenschaften zu optimieren. Möglichkeiten für dieses Vorgehen bietet das Prinzip der gerichteten Evolution (Kuchner & Arnold, 1997; Jaeger *et al.*, 2001; Reetz & Jaeger, 2002; Reetz & Carballeira, 2007). Hierbei zählt die Optimierung der Enantioselektivität von LipA aus *P. aeruginosa* zu den am besten untersuchten Beispielen. Sie konnte erfolgreich

hinsichtlich ihrer Enantioselektivität der Hydrolyse des Modellsubstrats 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenylester in beide Richtungen optimiert werden (Abb. 1.4) (Liebeton *et al.*, 2000; Reetz *et al.*, 2001; Zha *et al.*, 2001). Für das (S)-Enantiomer konnte der E-Wert von 1,1 auf $E=51$ durch Schaffung einer neuen Bindetasche gesteigert werden (Reetz *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 2002; Bocola *et al.*, 2004). Die auf diese Weise generierte Lipasevariante, LipA 1H8 genannt, weist sechs Aminosäuresubstitutionen auf, von denen durch Analyse der Enantioselektivität entsprechender Einzelmutanten drei Substitutionen identifiziert werden konnten, die die Enantioselektivität des Enzyms bedingen (S53P, S155M und L162G), wohingegen die anderen keinen Einfluss auf den E-Wert der Lipase nahmen (Reetz *et al.*, 2007).

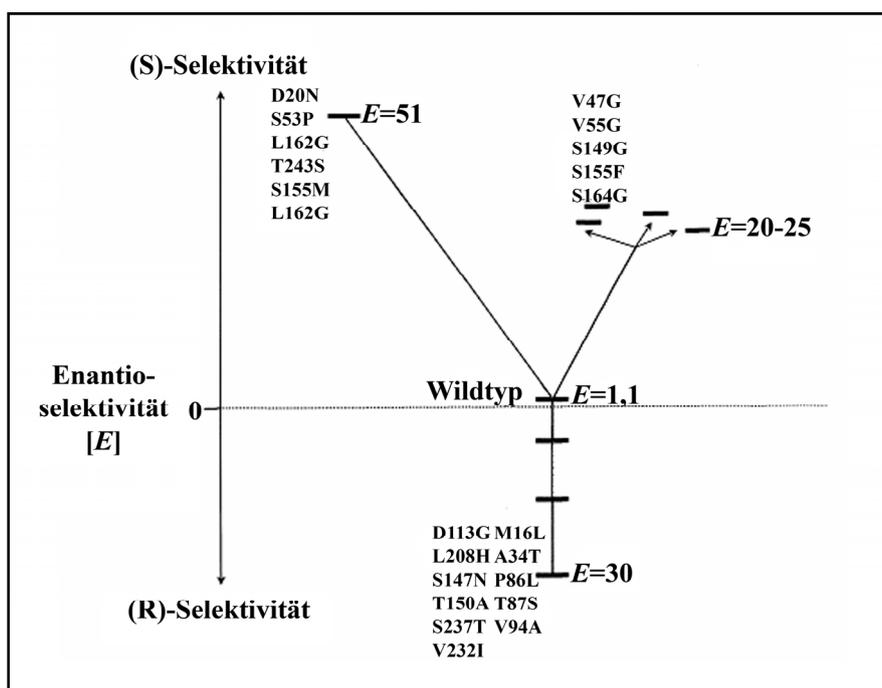


Abb. 1.4: Gerichtete Evolution der Enantioselektivität der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* (nach Jaeger *et al.*, 2002). Die Enantioselektivität des Wildtyp-Enzyms und der generierten Varianten sind als E-Werte zusammen mit den eingefügten Aminosäuresubstitutionen dargestellt.

1.2 Proteinfaltung und molekulare Chaperone

Zu Beginn der Untersuchungen der molekularen Mechanismen von Proteinfaltungen wurde angenommen, dass die gesamte benötigte Information für die vollständige Faltung eines Proteins in seiner Primärstruktur enthalten ist und es somit spontan seine native Konformation einnehmen kann (Anfinsen, 1973). Inzwischen ist jedoch eine Vielzahl von Proteinen bekannt, die zur Einnahme ihrer aktiven Form die Hilfe von akzessorischen Proteinen benötigen. Diese Faltungsmediatoren werden je nach ihrer Aktivität in molekulare und sterische Chaperone eingeteilt (Ellis, 1998).

In der Gruppe der molekularen Chaperone sind nicht verwandte Proteine zusammengefasst, die die Fähigkeit besitzen, ungefaltete bzw. teilweise gefaltete Proteine zu binden oder ihre Fehlfaltung zu verhindern (Hartl, 1996; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Auf diese Weise erleichtern sie weitere Faltungsprozesse und Oligomerisationen sowie evtl. durchzuführende Transportvorgänge (Hendrick & Hartl, 1993). Das erste charakterisierte molekulare Chaperon stellt das Histon-bindende Protein Nucleoplasmin dar, das durch seine Aktivität die Bildung von Nucleosomen fördert (Laskey *et al.*, 1978). Das wichtigste am Export von Proteinen in Gram-negativen Organismen beteiligte molekulare Chaperon ist SecB (den Blaauwen & Driessen, 1996), welches im Cytoplasma schon während der Translation an zu transportierende Präproteine bindet. So fördert SecB den Verbleib des Präproteins in einer ungefalteten Form, die über den Sec-Apparat exportiert werden kann (Liu, 1979; Lecker *et al.*, 1989). Neben SecB existiert eine Vielzahl anderer molekulare Chaperone, wie z. B. DnaK, DnaJ und GroEL, die an der Sekretion von Proteinen beteiligt sind. Es wurde beschrieben, dass DnaK und DnaJ die Aufgabe von SecB in entsprechenden Mutanten übernehmen können (Wild *et al.*, 1992), während GroEL für die Sekretion der Prä- β -Lactamase essentiell ist (Bochkareva *et al.*, 1988).

Bestimmte Prozesse während der Faltung von Proteinen, die eine hohe Aktivierungsenergie benötigen, werden durch die sog. sterischen Chaperone katalysiert (Ellis, 1998). Hierbei werden intra- und intermolekulare Chaperone unterschieden.

Proteine, die eine als Pro-Region bezeichnete Sequenz enthalten, die die Faltung des Proteins katalysiert, werden intramolekulare Chaperone genannt (Braun *et al.*, 1996). Diese Sequenzbereiche sind häufig N-terminal lokalisiert und wurden z. B. bei vielen extrazellulären bakteriellen Proteasen wie Subtilisin und der α -lytischen Protease identifiziert und untersucht (Eder & Fersht, 1995; Braun & Tommassen, 1998; Ellis, 1998). Auch in *P. aeruginosa* konnte eine Pro-Sequenz, die die Faltung der proteolytisch aktiven Elastase LasB katalysiert, aber kein Bestandteil des reifen Proteins ist, identifiziert werden (Braun *et al.*, 1996). Aber auch C-terminal lokalisierte Propeptide wurden bereits beschrieben (Conesa *et al.*, 2001). Im Anschluss an die Faltung wird das Propeptid autokatalytisch oder durch die Aktivität einer weiteren Protease entfernt (Eder & Fersht, 1995; Shinde & Inouye, 1995a). Intramolekulare Chaperone weisen im Vergleich mit anderen Faltungsmediatoren eine erhöhte Spezifität und ATP-Unabhängigkeit auf (Shinde *et al.*, 1995).

Intermolekulare Chaperone weisen die Eigenschaft auf, spezifischer als die schon beschriebenen molekularen Chaperone die Faltungsprozesse oder die Sekretion von bestimmten Proteinen zu vermitteln (Ellis, 1997). Im Gegensatz zu den intramolekularen Chaperonen stellen die intermolekularen Chaperone eigenständige Proteine dar, welche die

Faltung von Proteinen mehrmals katalysieren können. So unterstützt das PapD-Protein in bestimmten *E. coli*-Stämmen die Ausbildung von Pili, indem es die Faltung der zur Selbstassemblierung fähigen Untereinheiten PapA, H, K, E, F und G im Periplasma vermittelt und eine frühzeitige Selbstassoziation verhindert (Kuehn *et al.*, 1991). Intermolekulare Chaperone werden häufig in Zusammenhang mit der Typ III-Sekretion gefunden (Wattiau & Cornelis, 1993; Neyt & Cornelis, 1999; Dittmann *et al.*, 2007; Buettner *et al.*, 2008). In *P. aeruginosa* wird die Faltung der Lipase LipA von dem Chaperon LipH, das zu der Gruppe der Lif-Proteine (Lipase-spezifischen Foldasen) gehört, katalysiert (Jaeger *et al.*, 1994a).

1.2.1 Lipase-spezifische Foldasen

Die genaue Funktionsweise der Lif-Proteine ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie als intermolekulare Chaperone spezifisch Lipasen in eine katalytisch aktive Form falten (Hobson *et al.*, 1993; Frenken *et al.*, 1993a; Aamand *et al.*, 1994; Ihara *et al.*, 1995; Kok *et al.*, 1995; Schneidinger, 1997). Lipase-spezifische Foldasen konnten in *Burkholderia cepacia* (Joergensen *et al.*, 1991), *P. aeruginosa* (Wohlfarth *et al.*, 1992), *Burkholderia glumae* (Frenken *et al.*, 1993a; Frenken *et al.*, 1993b), *Acinetobacter calcoaceticus* (Kok *et al.*, 1995), *Vibrio cholerae* (Ogierman *et al.*, 1997) und *Pseudomonas wisconsinensis* (Duefel, 2000) beschrieben werden. Die Foldasen werden in einem bicistronischen Operon mit den zu faltenden Lipasen codiert. Untersuchungen an den Lif-Proteinen aus *P. aeruginosa*, *B. glumae* und *B. cepacia* ergaben, dass diese periplasmatisch lokalisierten Chaperone mit Hilfe einer N-terminal lokalisierten hydrophoben Domäne in der inneren Membran befestigt sind (Frenken *et al.*, 1993b; Schneidinger, 1997), wobei diese jedoch nicht für die Aktivität des Chaperons essentiell ist (Shibata *et al.*, 1998b; El Khattabi *et al.*, 1999; Quyen *et al.*, 1999).

Die äquimolare Stöchiometrie der Chaperon-vermittelten Faltung der Lipasen konnte im Fall von *B. cepacia* durch Co-Immunopräzipitationen gezeigt werden (Hobson *et al.*, 1995). Darüberhinaus konnte in der röntgenkristallographischen Struktur des Lipase-Lif Komplexes aus *B. glumae* die Interaktion der Lipase mit einem Lif-Protein nachvollzogen werden (Pauwels *et al.*, 2005; Pauwels *et al.*, 2006).

Durch aufgenommene CD-Spektren konnte anhand der Lipase aus *B. glumae* gezeigt werden, dass sie auch schon ohne Zugabe der spezifischen Foldase *in vitro* einen sog. „nahen nativen“ Zustand einnimmt. Durch Zugabe der Foldase konnte die Lipase in den katalytisch aktiven Zustand überführt werden, der sich jedoch in den aufgenommenen CD-Spektren nicht von dem „nahen nativen“ Zustand unterscheiden ließ (El Khattabi *et al.*, 2000).

1.2.2 Regulation der Expression von Lif-Proteinen

In der Regel sind Lipase-spezifische Foldasen zusammen dem zu faltenden Enzym in einem bicistronischen Operon lokalisiert (Rosenau *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* stellt hier mit seiner zweiten Lipase LipC eine Ausnahme dar, da kein stromabwärts lokalisiertes Gen, welches für eine Lipase-spezifische Foldase codiert, identifiziert werden konnte. Die Beteiligung an der Faltung von LipC von dem in mit LipA in einem Operon codierten LipH wurde bislang nicht direkt gezeigt. Die Expression von LipA wird durch das Zweikomponenten-System, bestehend aus LipQ und LipR, sowie ein allgemeines Regulatorprotein vermittelt (Jaeger *et al.*, 1999; Rosenau & Jaeger, 2000; Nishijyo *et al.*, 2001). Da LipC auch unter vollständiger Repression von LipA exprimiert wird, besteht unter der Voraussetzung, dass LipH die Faltung der Lipase katalysiert, die Notwendigkeit zur unabhängigen Expressionskontrolle von LipH.

Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass ein eigener Promotor in der 49 bp umfassenden Region zwischen *lipA* und *lipH* identifiziert werden konnte, der die Expression von LipA und LipH entkoppelt (Rosenau, 2001). Somit besteht die Möglichkeit einer separaten Expression von LipH, um die Faltung von LipC zu vermitteln.

Der Transkriptionsstart der mRNA von *lipH* wurde durch „*primer extension*“ in der intergenischen Region lokalisiert. Die in dieser Region identifizierten direkten und indirekten repetitiven Sequenzen bilden in der mRNA starke Sekundärstrukturen wie „*hairpin loops*“ aus, welche die Transkriptions-Termination oder Prozessierungsereignisse durch mRNA-degradierende Enzyme initiieren können (Wohlfarth *et al.*, 1992). Ähnliche Sekundärstrukturbildende Elemente wurden auch in den entsprechenden Operons aus *P. alcaligenes* (Gerritse *et al.*, 1998a) und *A. calcoaeticus* (Kok *et al.*, 1995) identifiziert. Für sie wird eine Beteiligung an der stärkeren Expression der Lipasen in Relation zu den Lipase-spezifischen Foldasen diskutiert. Die Prozessierung des Primär-Transkripts des Lipase-Lif Operons aus *B. glumae* und *P. aeruginosa* konnte durch Northern-Blot Analysen bestätigt werden, in denen lediglich ein Hauptfragment, das dem Lipase-Gen entspricht, nach Prozessierung detektiert wurde, während der Bereich des Transkripts, welches für die Foldase codierte, degradiert zu werden schien (Frenken *et al.*, 1993a; Schneidinger, 1997). Diese Degradation ist vereinbar mit der Beobachtung, dass in Relation zu den entsprechenden Lipasen eine geringere Menge der Lif-Proteine in *B. glumae* und *P. aeruginosa* nachweisbar ist. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Lif-Proteine *in vivo* in der Lage sind, die Faltung der Lipasen mehrfach zu katalysieren (Gerritse *et al.*, 1998b; El Khattabi *et al.*, 1999). Dem steht die Beobachtung gegenüber, dass bei heterologer Expression der getrennt induzierbaren Gene der Lipase und der Foldase aus *B. glumae* in *E. coli* nur lipolytische Aktivität detektiert wurde, wenn zuerst die Expression der Foldase und dann die der Lipase induziert wurde (Aamand *et al.*, 1994). Wurde die Expression der Foldase nachträglich wieder gestoppt, so wurde ein sigmoidaler Verlauf bezüglich der Aktivierung der Lipase nachgewiesen, der auf einen Verbrauch der Foldase hinwies (Aamand *et al.*, 1994). Diese Unstimmigkeiten sind möglicherweise auf die Bildung eines stabilen Lipase-Foldase Komplexes zurückzuführen, der nur durch Interaktion mit der Sekretionsmaschinerie getrennt werden kann. Demnach verbleibt die Lipase bei Expression in *E. coli*, der nicht über den entsprechenden Typ-II Sekretionsapparat verfügt, an die Foldase assoziiert, so dass das Chaperon in diesem Fall „verbraucht“ wird.

1.2.3 Spezifität von Lif-Proteinen

Wie bereits der Name vermuten lässt, interagieren Lipase-spezifische Foldasen nur mit ihrem Zielprotein und falten es spezifisch in seine aktive Konformation. Durch Experimente, bei denen versucht wurde, die Lipase aus *B. glumae* bzw. *P. aeruginosa* durch Koexpression der Foldase des jeweiligen anderen Organismus zu falten, konnte keine Aktivierung der Lipasen festgestellt werden (Shibata *et al.*, 1998c; El Khattabi *et al.*, 1999). Selbst innerhalb der nahe verwandten Spezies *P. aeruginosa*, *P. wisconsinensis* und *P. alcaligenes* konnten bei Koexpression der Lipasen mit den homologen Foldasen der anderen Organismen nur geringe Mengen aktiven Enzyms gemessen werden (El Khattabi *et al.*, 1999).

Es wird vermutet, dass der C-Terminus der Lipase-spezifischen Foldasen einen starken Einfluss auf die Spezifität und Erkennung der Lipase nimmt. Hybride aus Anteilen der Foldasen aus *P. aeruginosa* und *B. glumae* waren nur dann in der Lage, die Lipase aus *B. glumae* zu aktivieren, wenn sie wenigstens die 138 C-terminal lokalisierten Aminosäuren beinhalteten (El Khattabi *et al.*, 1999).

1.2.4 Interaktion der Lif-Proteine mit Lipasen

Die Expression enzymatisch aktiver, extrazellulärer Lipase ist ein komplexer Prozess, bei dem in *P. aeruginosa* das korrekte Zusammenspiel von etwa 30 akzessorischen Proteinen, die an der Faltung und Sekretion beteiligt sind, essentiell ist (Rosenau & Jaeger, 2000; Rosenau & Jaeger, 2004). Aus diesem Grund ist der Teilaspekt der Faltung *in vivo* nur schwer nachzuvollziehen. Die meisten Erkenntnisse beruhen auf Experimenten, in denen verschiedene Lipase-Lif Systeme in heterologen Wirten exprimiert oder gereinigte Proteine *in vitro* untersucht wurden. In diesen Experimenten wurde der Proteinkomplex aus Lipase und Foldase immer wieder als äußerst stabil beschrieben, so dass er immunologisch oder durch chemisches *crosslinking* nachgewiesen werden konnte (Hobson *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 1998b). Der Proteinkomplex aus *B. glumae* weist eine so hohe Stabilität auf, dass beide Proteine kokristallisiert und ihre Röntgenstrukturen im Komplex aufgeklärt werden konnten (Pauwels *et al.*, 2005; Pauwels *et al.*, 2006). In diesem Komplex wies die Lipase-spezifische Foldase eine die schon gefaltete Lipase umgreifende, bisher nicht beschriebene ausgedehnte α -helicale Struktur auf. Die Interaktionsfläche zwischen Lipase und Lif-Protein beträgt in diesem Komplex 5378 \AA^2 und ist, in Relation zu der durchschnittlichen Fläche einer Protein-Protein Interaktion von etwa 1600 \AA^2 , mehr als dreimal so groß. Die ausgedehnte Interaktionsfläche und die ermittelte Dissoziationskonstante von $K_D = 5 \text{ nM}$ spiegeln die hohe Spezifität der Interaktion mit der Lipase wider (Pauwels *et al.*, 2007). Allerdings stellt sich durch die ermittelte Affinität und die große Fläche, mit der beide Proteine interagieren, die Frage, wie die Dissoziation der Proteine nach erfolgter Faltung initiiert wird. Eine Beteiligung der Sekretionsmaschinerie an der Lösung der Lipase aus dem Lipase-Foldase Komplex wird diskutiert.

Innerhalb der Struktur der Foldase konnten weiterhin 2 Minidomänen identifiziert werden, die jeweils N- und C-terminal lokalisiert sind und von jeweils 3 der insgesamt 11 α -Helices gebildet werden, während die anderen helicalen Strukturen das Enzym umspannen, so dass

sich die für die Interaktion putativ essentiellen Minidomänen auf gegenüberliegenden Seiten der Lipase befinden (Abb. 1.5). In der Struktur war das ermittelte konservierte Motiv der Lipase-spezifischen Foldasen $R_{x1x2}FDY(F/C)L(S/T)A$ (Rosenau *et al.*, 2004) in der N-terminalen Minidomäne in der ersten der 3 α -Helices lokalisiert. Darüberhinaus wurde festgestellt, dass die Interaktion beider Proteine über konservierte Bereiche der Lipasen und Lif-Proteine vermittelt wird.

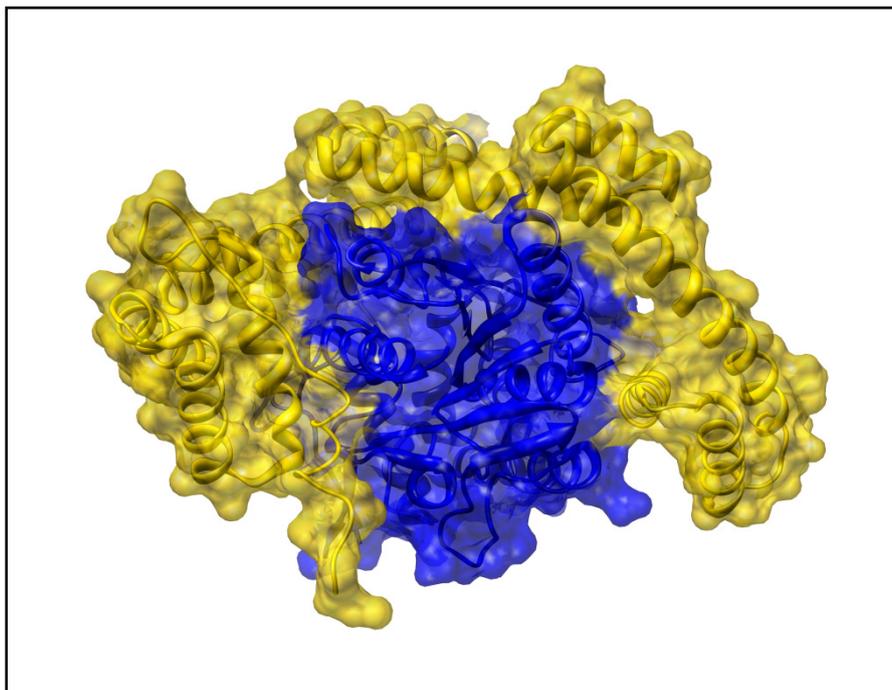


Abb. 1.5: 3D-Struktur des Lipase-Lif Komplexes aus *B. glumae* (nach Pauwels *et al.*, 2006; PDB Code 2es4). Die Proteine sind in der *ribbon* Darstellung mit transparenten Oberflächen dargestellt. Die Lipase ist blau, die Foldase gelb hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Die 3D-Struktur der mit ihrem Chaperon komplexierten Lipase unterschied sich nicht deutlich von der ebenfalls aufgeklärten Tertiärstruktur freier, sekretierter Lipase. Es konnte gezeigt werden, dass der Lipase-Foldase Proteinkomplex sogar in Kristallen enzymatische Aktivität aufwies, ohne die Diffraktion zu beeinflussen (Pauwels *et al.*, 2006).

In *in vitro* Rückfaltungen, die mit CD-Spektroskopie verfolgt wurden, konnte bei Interaktion der Foldase mit der Lipase eine vermehrte Bildung von α -helicalen Strukturen beobachtet werden, während bei Abwesenheit der Lipase der Verlust einer ausgeprägten Tertiärstruktur nachgewiesen werden konnte (El Khattabi *et al.*, 1999). In Bezug auf die aufgelöste Struktur des Lipase-Foldase Komplexes wird angenommen, dass die Foldase während der Bindung der Lipase, besonders in der Region zwischen den beiden Minidomänen, erhebliche Veränderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur durchläuft, um die Faltung zu vermitteln.

1.2.5 Physiologische Rolle der Lif-Proteine

Es ist nicht auszuschließen, dass Lif-Proteine außer der reinen Aktivierung der Lipase noch andere physiologische Funktionen übernehmen. Es wurde vermutet, dass sie auch als Lipase-Inhibitor nach erfolgter Faltung analog den Propeptiden von Proteasen dienen, um unerwünschte intrazelluläre enzymatische Aktivität zu vermeiden (Ihara *et al.*, 1995). Allerdings scheint die Komplexierung der Lipase mit ihrem Chaperon nicht inhibierend zu wirken, da der Lipase-Lif Proteinkomplex *in vitro* enzymatische Aktivität zeigt (El Khattabi *et al.*, 2000; Pauwels *et al.*, 2006). Andererseits kann eine Fixierung der enzymatisch aktiven Lipase durch das Chaperon in der Nähe der inneren Membran, bis die Sekretion erfolgt, vorteilhaft sein.

Eine andere putative Rolle der Lif-Proteine ist die Vermittlung der Typ-II Sekretion der Lipase. Da ein in der Tertiärstruktur vorhandenes Sekretionssignal der Exoenzyme diskutiert wird, das den Export der nativen Proteine vermittelt (Koster *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001), könnte dieses Signal aus Strukturelementen der Lipase und der Foldase gestellt werden.

1.3 Sekretionsmechanismen von Lipasen

Es wird vermutet, dass mehr als 30 % bakterieller Genome für extracytoplasmatische Proteine codieren (Economou, 1998). Bakterielle Lipasen sind extrazelluläre Enzyme, deren Translokation über die bakteriellen Membranen essentiell ist. Es existieren unterschiedliche Mechanismen für diesen Transport, die in Ein- und Zwei-Schritt Sekretionsmechanismen unterteilt werden (Filloux *et al.*, 1998).

1.3.1 Ein-Schritt Sekretionsmechanismen

Bei der **Typ I-Sekretion**, die auch als ABC-Transport (ATP-binding cassette) bezeichnet wird, wird das zu sekretierende Protein ohne periplasmatisches Intermediat direkt in das Außenmedium transportiert (Higgins, 1992; Pugsley, 1993). Der Sekretionsapparat wird aus dem namensgebenden ABC-Protein, welches in der inneren Membran verankert ist, und zwei weiteren Proteinen gebildet (Higgins, 1992). Das ebenfalls in der inneren Membran befestigte Membran-Fusions-Protein (MFP) durchspannt das Periplasma und dessen C-terminale Domäne interagiert mit der äußeren Membran. Das dritte, den Apparat vervollständigende Protein, ist ein Protein der äußeren Membran (outer membrane protein, OMP). Die über den ABC-Transporter zu sekretierenden Proteine werden aufgrund eines nicht abspaltbaren C-terminal vorhandenen Signalpeptids erkannt (Binet *et al.*, 1997). Die Sekretion der Lipase aus *Serratia marcescens* wird über diese Maschinerie vermittelt (Akatsuka *et al.*, 1995). Das am besten untersuchte Beispiel für ein durch diesen Sekretionsweg transportiertes Protein stellt das α -Hämolyysin von *Escherichia coli* dar (Holland *et al.*, 1990; Kenny *et al.*, 1991; Balsalobre *et al.*, 2006). Als Hauptsubstrat für diesen Transporter in *P. aeruginosa* konnte die alkalische Phosphatase identifiziert werden (Guzzo *et al.*, 1991; Baumann *et al.*, 1993). Weiterhin wurde der Transport des Häm-bindenden Proteins HasA mit Hilfe eines Typ I-

Sekretionsapparates beschrieben (Létoffé *et al.*, 1998; Stover *et al.*, 2000). Bei weiteren Untersuchungen konnten durch Homologievergleiche zwei weitere putative Sekretionsapparate des Typ I-Weges in *P. aeruginosa* bestimmt werden, über deren Funktionalität und Zielsubstrate bis jetzt jedoch nichts bekannt ist (Ma *et al.*, 2003).

Bei der **Typ III**-Sekretion handelt es sich um einen weiteren Ein-Schritt Transportmechanismus, bei dem die Proteine ohne Abspaltung einer Signalsequenz sekretiert werden (Cornelis & Wolf-Watz, 1997). Das Erkennungssignal scheint bei dieser auch als kontaktabhängig bezeichneten Sekretion im aminoterminalen Teil des Zielproteins lokalisiert sein (Yahr *et al.*, 1996; Hauser *et al.*, 1998; Warren & Young, 2005). Bei der Typ III-Sekretion wird zwischen Flagellen und pathogenitätsbezogenen Sekretionssystemen unterschieden (Nguyen *et al.*, 2000). Das Flagellen-System exportiert die Untereinheiten von Flagellen, die sog. Flagelline (Aizawa, 2001). Bei dem pathogenitätsbezogenen Sekretionssystem, der für Bakterien wie *Salmonella* sp. (Galan, 1996), *Shigella* sp. (Parsot & Sansonetti, 1996), *Yersinia* sp. (Cornelis & Wolf-Watz, 1997) und auch *P. aeruginosa* (Yahr *et al.*, 1996) beschrieben wurde, wird das Protein in einem einzigen Schritt aus dem Cytosol des Bakteriums in das Cytoplasma des Wirtes übertragen (Hueck, 1998). Von diesem System sekretierte Proteine stehen immer mit der Virulenz der Bakterien in Verbindung (Lee, 1997). Bei Typ III-Sekretionsapparaten handelt es sich um Multikomponenten-Systeme, die aus jeweils über 12 Proteinen bestehen und eine Nadel-ähnliche Struktur formen (Nguyen *et al.*, 2000). Bei der Translokation werden die Proteine nicht nur sekretiert, sondern auch direkt in eine Wirtszelle injiziert. Somit wird bei diesem Transport direkt eine dritte Membran überwunden, wobei die Induktion der Sekretion erst bei Kontakt mit den Wirtszellen erfolgt (Cornelis & Wolf-Watz, 1997; Lee, 1997). In *P. aeruginosa* ist sowohl das Flagellen- als auch das pathogenitätsbezogene System vorhanden, wobei durch letzteres Virulenzfaktoren wie die Exoenzyme S, T, U und Y direkt in die Wirtszelle transportiert werden (Yahr *et al.*, 1996; Yahr *et al.*, 1997; Yahr *et al.*, 1998).

1.3.2 Zwei-Schritt Sekretionsmechanismen

Transport über die innere Membran

Für den Transport von Proteinen über die innere Membran Gram-negativer Bakterien sind bislang drei Mechanismen bekannt. Diese weisen alle Analogien zu den Prozessen des Proteinexports aus Organellen eukaryontischer Zellen auf (Fekkes & Driessen, 1999).

Der größte Teil der sekretierten Proteine, inklusive der meisten bekannten bakteriellen Lipasen, wird mit Hilfe des **Sec-Apparates** über den sog. GEP („general export pathway“) über die innere Membran transportiert (Pugsley, 1993). Das Exportsignal für die Translokation stellt dabei eine N-terminale Erkennungssequenz dar (Watson, 1984). Diese ist meist 20 bis 25 Aminosäuren lang und wird in eine N-terminal gelegene positiv geladene, eine zentrale hydrophobe und eine polare C-terminale Domäne unterteilt (von Heijne, 1990; Pugsley, 1993; Saier, 2006). Der Sec-Apparat besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, von denen einige essentiell sind (SecE, SecG, SecY, YidC, FtsY, Fth), während andere nur in manchen Organismen gefunden werden (SecA, SecB, SecD, SecF, YajC). Durch das

vollständig sequenzierte Genom von *P. aeruginosa* konnte das Vorhandensein all dieser Proteine ermittelt werden (Ma *et al.*, 2003). Das Chaperon SecB bindet bereits während der Translation im Cytoplasma an gekennzeichnete Proteine, gewährleistet auf diese Weise eine ungefaltete, sekretionskompetente Form und vermittelt die Bindung an SecA. Der so gebildete SecA-Präproteinkomplex bindet im Folgenden an die in der Membran verankerten Proteine SecE, SecG und SecY. Damit wird die Bildung des eigentlichen Translokons induziert, welches durch SecD und SecF stabilisiert wird. Unter ATP-Hydrolyse wird das zu transportierende Protein in das Periplasma gebracht (Hanada *et al.*, 1994; Duong & Wickner, 1997; Driessen *et al.*, 1998; Economou, 1998) und die Signalsequenz von einer Signalpeptidase abgespalten (Paetzel *et al.*, 1997).

Alternativ zum GEP können Proteine über den **SRP-Weg** (signal recognition particle) transportiert werden. Dabei wird das Zielprotein durch eine stark hydrophobe Signalsequenz schon während der Translation von einem SRP erkannt und gebunden. Durch die Interaktion mit FtsY, einem SRP-Rezeptor, wird das zu sekretierende Protein SecA/B-unabhängig auf den SecYEG Translokasekomplex übertragen und durch ihn exportiert (Stroud & Walter, 1999; Beck *et al.*, 2000). Dieser Weg wird vor allem zum Transport von Proteinen der inneren Membran ohne ausgeprägte periplasmatische Domänen genutzt (Valent *et al.*, 1998; Scotti *et al.*, 1999; Stroud & Walter, 1999; van Geest & Lolkema, 2000). Für den Export bakterieller Lipasen wurde er bislang nicht beschrieben.

Eine Möglichkeit, Proteine vollständig unabhängig vom Sec-Apparat zu exportieren, bietet die **TAT-Sekretion** („*twin-arginin-translocation*“). Bei diesem Mechanismus werden vollständig gefaltete Proteine im Komplex mit evtl. benötigten Cofaktoren über die Cytoplasmamembran transportiert. Die Erkennung der Proteine, die über diesen Weg sekretiert werden, wird durch ein sog. „Twin-Arginin-Motiv“ innerhalb der Sequenz erreicht. Verglichen mit der Translokation über den Sec-Apparat stellt die TAT-Sekretion in *E. coli* einen recht speziellen Mechanismus für nur wenige Proteine dar (Berks *et al.*, 2000). Auch in *P. aeruginosa* konnte ein funktionsfähiges TAT-System identifiziert werden, für das bislang nur 18 zu sekretierende Proteine ermittelt werden konnten (Ochsner *et al.*, 2002). Bei drei dieser Proteine konnte ein weiterer Transport über die Periplasmamembran mit Hilfe des Xcp-Apparats beschrieben werden, so dass dieser Weg nicht alleine den Sec-abhängig transportierten Enzymen vorbehalten ist (Voulhoux *et al.*, 2001).

Transport über die äußere Membran

Nachdem die über innere Membran translozierten Proteine im Periplasma gefaltet und aktiviert wurden, erfolgt in einem zweiten, unabhängigen Schritt die Sekretion der zu exportierenden Proteine über die äußere Membran. Dieser Vorgang wird zusammen mit der Sec-abhängigen Translokation über die Cytoplasmamembran (GEP) als GSP („*general secretory pathway*“) bezeichnet, der in vielen Gram-negativen Bakterien verbreitet ist (Pugsley, 1993; Pugsley *et al.*, 1997; Filloux *et al.*, 1998; Russel, 1998; Saier, 2006). Man unterscheidet dabei zwischen mehreren Wegen der Sekretion, den Nebenwegen, auch als mTB („*minor terminal branch*“) bezeichnet und dem Hauptweg, der **Typ II-Sekretion**. Bei der auch „*main terminal branch*“ (MTB) des GSP genannten Sekretion gelangen die Proteine

zuerst über den Sec-Apparat in das Periplasma. Neuere Ergebnisse weisen jedoch ebenfalls auf eine Beteiligung der TAT-Maschinerie bei dem Transport über die innere Membran hin (Voulhoux *et al.*, 2001). In *P. aeruginosa* konnten zwei komplette Systeme der Typ II-Sekretion gefunden werden, wobei es sich um das Xcp- und das Hxc-System handelt (Ma *et al.*, 2003). Der aufwendig aufgebaute Xcp-Sekretionsapparat des MTB wird bei *P. aeruginosa* aus mindestens 12 verschiedenen Genprodukten gebildet, welche sich von der äußeren bis zur inneren Membran erstrecken (Tommassen *et al.*, 1992; Filloux *et al.*, 1998; Koster *et al.*, 2000). Durch das Xcp-System werden das Exotoxin A, die Elastasen LasA und LasB, die Phospholipasen PlcH und PlcN sowie die Lipasen LipA und LipC sekretiert (Lazdunski *et al.*, 1990; Tommassen *et al.*, 1992; Jaeger *et al.*, 1996; Lazdunski *et al.*, 1996; Filloux *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 1999), während das Hxc-System anscheinend nur für den Transport der alkalischen Phosphatase LapA genutzt wird (Ball *et al.*, 2002). Der eigentliche Sekretionsprozess wird wahrscheinlich durch XcpR, einer ATPase in der inneren Membran energetisiert (Turner *et al.*, 1993; Ball *et al.*, 1999). Die Pore für den Durchtritt der Proteine wird aus 12 XcpQ-Untereinheiten gebildet und weist eine große zentrale Öffnung von 95 Å auf (Bitter *et al.*, 1998; Brok *et al.*, 1999; Bitter, 2003). Die Proteine XcpP und XcpQ vermitteln die Spezifität des Sekretionsapparates (Lindeberg *et al.*, 1996; Bouley *et al.*, 2001), wobei mit XphA und XqhA homologe Proteine identifiziert werden konnten, die ebenfalls die Funktionen von XcpP und XcpQ übernehmen können (Martinez *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 2007). Durch diesen modularen Aufbau scheint eine Möglichkeit gegeben zu sein, die Spezifität der Sekretion an die physiologischen Gegebenheiten anzupassen. Die Größe der Pore ist mit der Beobachtung vereinbar, dass bereits vollständig gefaltete Proteine exportiert werden (Filloux *et al.*, 1998). In mehreren über den Xcp-Apparat transportierten Exoproteinen konnten für die Sekretion essentielle Sequenzbereiche identifiziert werden (McVay & Hamood, 1995; Lu & Lory, 1996; Voulhoux *et al.*, 2000). Da in diesen Bereichen jedoch keine Sequenzhomologien identifiziert werden konnten und aufgrund der Tatsache, dass native Proteine erkannt werden, wird ein in der Tertiärstruktur vorhandenes Signal diskutiert (Koster *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001).

Die Faltung der Exoproteine erfolgt im Periplasma (Pugsley, 1992; Braun *et al.*, 1996). An diesem Vorgang sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, so z. B. spezifische Faltungsmediatoren wie das Propeptid der Elastase LasB, das als intramolekulares Chaperon eine korrekte Faltung des Enzyms vermittelt (Kessler & Safrin, 1988; Braun *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 1998) oder intermolekulare Chaperone, wie z. B. die Lipase-spezifische Foldase LipH aus *P. aeruginosa*, die die Lipase LipA faltet (Jaeger *et al.*, 1994a; Jaeger *et al.*, 1996; Schneidinger, 1997). Weiterhin werden im Periplasma Disulfidbrücken durch das Dsb-System ausgebildet, das auf diese Weise einen wichtigen Faktor bei der Ausbildung periplasmatischer Intermediate für eine korrekte Faltung darstellt (Pugsley, 1992; Missiakas & Raina, 1997).

Bei Proteinen, welche nach dem Transport über den Sec-Apparat in das Periplasma über die **Typ V-Sekretion** die äußere Membran ohne Hilfe von Exportproteinen passieren können bzw. in sie inserieren, handelt es sich um die sog. **Autotransporter**. Der Prototyp der sich autotransportierenden Enzyme stellt die IgA1 Protease von *Neisseria gonorrhoeae* dar (Pohlner *et al.*, 1987). Nach dem Transport dieser Protease über den Sec-Apparat wird der Durchtritt des Proteins über die äußere Membran ohne Hilfe von anderen Proteinen durch seine C-terminale Domäne vermittelt. Dabei bildet die Domäne eine integrale

Membranstruktur aus, die dem Aufbau von Porinen ähnelt und sich aus antiparallelen β -Faltblättern, die eine β -barrel Struktur formen, zusammensetzt. Der N-terminale Teil des Proteins kann im Folgenden durch die gebildete Pore treten, wird durch Autoproteolyse abgespalten und in den Extrazellularraum freigesetzt (Pohlner *et al.*, 1987; Klauser *et al.*, 1993; Jose *et al.*, 1995). In weiteren Arbeiten konnten noch andere über einen Autotransportmechanismus verfügbaren Proteine identifiziert werden (Loveless & Saier, 1997; Henderson *et al.*, 1998; Wilhelm *et al.*, 1999), die im Folgenden aufgrund von Homologievergleichen der Sequenz der C-terminalen Bereiche zu einer sog. Autotransporterfamilie (ATF) zusammengefasst wurden (Loveless & Saier, 1997). Eine genauere Betrachtung der Sequenzhomologie dieser Proteine zeigte, dass die Gemeinsamkeiten innerhalb dieser Familie eher in strukturellen Ähnlichkeiten als in Homologien ihrer Sequenzen liegen. Die Sequenzen der Proteine der ATF weisen nur zwei konservierte Aminosäuren auf, die als Pro₁₇₁ und Gly₂₅₁ identifiziert wurden (Loveless & Saier, 1997). Autotransporter sind meist über 12 β -Faltblatt-Domänen des C-terminalen Teils des Proteins in der äußeren Membran (β -Domäne) verankert, während die N-terminale Domäne an der Zelloberfläche die katalytische Aktivität beinhaltet (α -Domäne) (Henderson *et al.*, 1998; Tamm *et al.*, 2001; Oomen *et al.*, 2004). Während die in der β -Domäne enthaltenen alternierenden hydrophoben Aminosäurereste eine Verankerung des Proteins ermöglichen, erlauben die sich zum Zentrum der Pore orientierenden hydrophilen Aminosäuren den Durchtritt der α -Domäne durch die äußere Membran. Nach dem Transport der Passagierdomäne wurden bereits mehrere Möglichkeiten der weiteren Abläufe beschrieben: i) der N-Terminus bleibt durch die durch die β -Domäne vermittelte Verankerung an der Zelloberfläche exponiert (O'Toole *et al.*, 1994; St Geme & Cutter, 2000); ii) die α -Domäne wird durch Autoproteolyse abgespalten (Pohlner *et al.*, 1987); iii) die kovalente Verknüpfung der α - und β -Domäne wird mit Hilfe anderer Proteasen abgespalten, wobei die α -Domäne entweder freigesetzt wird (Steinhauer *et al.*, 1999) oder über nicht-kovalente Wechselwirkungen an der β -Domäne verbleibt (Suhr *et al.*, 1996). Proteine der Autotransporterfamilie finden sich in pathogenen Bakterien und sind scheinbar ausschließlich Virulenzfaktoren (Rosenau & Jaeger, 2000). In *P. aeruginosa* wurde bislang die Esterase EstA als einziges der ATF zugehöriges Enzym beschrieben (Wilhelm *et al.*, 1999). Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass wahrscheinlich noch eine Serin-Protease und eine Aminopeptidase existieren (Ma *et al.*, 2003).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Biotechnologische Fragestellungen

Durch die Stabilität mikrobieller Lipasen in organischen Lösungsmitteln und das Fehlen benötigter Cofaktoren weisen diese Enzyme das Potential auf, als Biokatalysatoren in der Industrie eingesetzt zu werden (Jaeger & Reetz, 1998; Jaeger & Eggert, 2002). Lipasen der Gattung *Pseudomonas* sind von besonderem Interesse, da sich in dieser Gattung Enzyme finden, die weitere Vorzüge wie Thermostabilität und Aktivität bei alkalischem pH aufweisen (Soberon-Chavez & Palmeros, 1994; Jaeger *et al.*, 1994a). Die heterologe Expression aktiver Lipase in für die industrielle Produktion bevorzugten Stämmen erweist sich jedoch aufgrund der komplexen Faltungs- und Sekretionsereignisse, der diese Enzyme unterliegen, als schwierig. Heterolog exprimierte Lipase tendiert zur Aggregation und zur Bildung von „inclusion bodies“, da die zur Sekretion benötigte Transportmaschinerie nicht vorhanden ist. Das Enzym kann zwar nachträglich *in vitro* durch das entsprechende Lip-Protein aktiviert werden, jedoch erfordert dieses Vorgehen die Expression und Reinigung eines zusätzlichen Proteins.

Aufgrund industrieller Reaktionsbedingungen werden an das einzusetzende Enzym genaue Anforderungen hinsichtlich seiner Stabilität, Aktivität und Enantioselektivität gestellt. Wegen dieser benötigten Eigenschaften werden Anstrengungen unternommen, Enzyme bezüglich der geforderten Eigenschaften z. B. durch das Prinzip der gerichteten Evolution zu optimieren (Reetz & Jaeger, 2002). Der Sequenzraum, in dem eine gerichtete Evolution durchgeführt werden kann, wenn eine homologe Expression angestrebt wird, ist jedoch aufgrund der essentiellen Interaktionen mit der Vielzahl akzessorischer Proteine begrenzt.

Aus oben genannten Gründen sollten im Rahmen dieser Arbeit Möglichkeiten entwickelt werden, eine effizientere Expression und Reinigung aktiver *P. aeruginosa* Lipase nach heterologer Expression durchführen zu können. Unter diesem Aspekt sollten Strategien entwickelt werden, um die spezifische Interaktion der Lipasen mit ihrer Lipase-spezifischen Foldase biotechnologisch zu nutzen.

Physiologische Fragestellungen

Unter Ausnutzung der entwickelten Strategien konnten nachfolgend weitere, eher physiologisch orientierte, Fragestellungen bearbeitet werden:

Durch das enge Zusammenwirken der für die Faltung und Sekretion essentiellen akzessorischen Proteine konnten die genauen molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung der Lipase durch die Lipase-spezifische Foldase beitragen, bislang nicht nachvollzogen werden. Es konnten zwar mehrere Tertiärstrukturen von Lipasen und auch diejenige eines Lipase-Foldase Komplexes aufgeklärt werden (Lang *et al.*, 1996; Nardini *et al.*, 2000; Pauwels *et al.*, 2006), jedoch wurde die Lipase in allen Fällen schon durch ihr Chaperon aktiviert, so dass nur der Zustand nach der Faltung bekannt ist. Demgegenüber konnten von

LipA aus *P. aeruginosa* nach heterologer Expression ohne das entsprechende Chaperon, Reinigung und Überführung in den „nahen nativen“ Zustand in NMR ^{15}N - ^1H -Einbindungskorrelationsanalysen keine auswertbaren Spektren aufgezeichnet werden, vermutlich bedingt durch die starke Heterogenität der Faltungszustände innerhalb der Probe. Deswegen sollte eine andere Strategie etabliert werden, um den „nahen nativen“ Zustand möglichst homogen präparieren zu können.

Lipase-spezifische Foldasen weisen hinsichtlich ihrer Funktionalität einige Gemeinsamkeiten zu Propeptiden von Proteasen auf. Sie wirken hochspezifisch als sterische Chaperone, um eine energetische Barriere in der Faltung der Lipase zu überwinden. Für eine Serin-Protease aus *Aeromonas sobria* konnte ein Gen identifiziert werden, welches durch 22 bp getrennt stromabwärts lokalisiert ist und ein für das Enzym essentielles Chaperon codiert (Okamoto *et al.*, 2000). *In silico* Analysen ergaben, dass eine translationale Fusion aus *lipA* und *lipH* in *P. aeruginosa* einfach durch Deletion einer Base im Stop-Codon des *lipA* konstruiert werden kann. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und charakterisiert.

Die zweite Lipase, LipC, aus *P. aeruginosa* wurde bislang nicht charakterisiert. Weiterhin wurde bislang nicht direkt auf molekularer Ebene gezeigt, ob LipH, welches mit LipA in einem bicistronischen Operon codiert wird, tatsächlich wie vermutet an der Faltung von LipC beteiligt ist. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

LipC wird möglicherweise, trotz der hohen Homologie zu LipA, nicht über den „klassischen“ Xcp-Sekretionsapparat, der von dem Gencluster bestehend aus *xcpP* bis *xcpZ* gebildet wird, sekretiert. Dies sollte untersucht und darauf aufbauend weitere Analysen durchgeführt werden, um eventuell weitere Rückschlüsse auf das noch nicht identifizierte Signal, welches die Typ-II Sekretion vermittelt, ziehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

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

- Antibiotika:** Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)
- Chemikalien:** Biomol (Hamburg), Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg)
- Enzyme:** Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym von Sigma (Deisenhofen), T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A und T4-DNA-Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Pfu-DNA-Polymerase von Stratagene (Heidelberg), TripleMaster DNA-Polymerase von Eppendorf (Hamburg), DNaseI von Promega (Mannheim).
- Medienkomponenten:** Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), Oxoid (Wesel)
- Antikörper:** Der Zweitantikörper, Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat, wurde von der Firma BioRad (München) bezogen.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle / Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dem (λIts857 indI Sam7 nin5 lavUV5-T7gene1)</i>	Studier & Moffatt, 1986
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F ⁻ <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 supE44 ara-14 galK2 lacYIproA2 rpsL20 xyl-5 λ leu mtl-1</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44 Δ(lacZYA-argF)U196 (Φ80ΔlacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAG2 Δ <i>xcpQ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Δ <i>xcpQ</i>	de Groot <i>et al.</i> , 2001

Fortsetzung Tab. 2.1:

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PABS1	$\Delta(\frac{3}{4}lipA \frac{1}{3}lipH)$	Schneidinger, 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PABST7.1	$\Delta(\frac{3}{4}lipA \frac{1}{3}lipH)$ miniD-180 (<i>tetA tetR lacI^q P_{lacUV5}-T7gene1</i>)	Jaeger <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas putida</i> BMTU650	Wildtyp	Roche-Diagnostics, Penzberg, Deutschland

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Vektoren

Vektoren für <i>E. coli</i>	Genotyp	Quelle / Referenz
pET19b	ColE1 P _{T7Φ10} lacI ^q , Amp ^R	Novagen, Madison (USA)
pET22b	ColE1 P _{T7Φ10} lacI ^q , Amp ^R	Novagen, Madison (USA)
Vektoren mit weitem Wirtsbereich	Genotyp	Quelle / Referenz
pBBR1MCS	mob lacZ α P _{lac} Cm ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pBR22b	mob P _{T7Φ10} lacI ^q , Cm ^R	Rosenau & Jaeger, 2003
pUCPKS	ColE1 P _{T7Φ10} P _{lac} SF, Amp ^R	Watson <i>et al.</i> , 1996
pLAFR3	IncP1 λ cos, rlx, Tc ^R	Staskawicz <i>et al.</i> , 1987
rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle / Referenz
pAX24	pLAFR3 (12,5 kb; <i>xcp</i> Gencluster), Tc ^R	Filloux <i>et al.</i> , 1990
pBBL7	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipAH</i> P _{lac} - kontrolliert), Cm ^R	Wilhelm <i>et al.</i> , 2007
pBBL7 Q1	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipA</i> D20N <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit
pBBL7 Q2	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipA</i> S53P <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit
pBBL7 Q3	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipA</i> S155M <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit
pBBL7 Q5	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipA</i> L162G <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit
pBBL7 Q6	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipA</i> T180I <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit
pBBL7 Q7	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipA</i> T180I <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit
pBBL7 Q52	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipA</i> S53P L162G <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 2.2:

rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle / Referenz
pBBL7 Q452	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipA</i> S53P S155F L162G <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit
pBBL7CH	pBBR1MCS (2308 bp; <i>lipC lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	Heckmann, unveröffentlicht
pBR22bLipA::HΔA-CHis	pBR22b (1878 bp; <i>lipA::HΔA-CHis</i> P _{lac} -kontrolliert), Cm ^R	diese Arbeit
pBR22LA-1	pBR22b (410 bp; <i>lipAI</i> P _{T7} -kontrolliert), Cm ^R	Hacker, 2003
pBR22LipH _t -CHis	pBR22b (962 bp; <i>lipH_t-CHis</i> P _{T7} -kontrolliert), Cm ^R	Walter, 2003
pEHTHis19	pET19b (985 bp; <i>lipH_t-NHis</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Jorasch, 1996
pEST100LipH-G1	pEST100 (179 bp; <i>lipH GI::e-tag::estA*</i>), Cm ^R	Becker, unveröffentlicht
pEST100LipH-G5	pEST100 (436 bp; <i>lipH GI::e-tag::estA*</i>), Cm ^R	Becker, unveröffentlicht
pET22bA::HΔA	pET22b (2307 bp; <i>lipA::HΔA</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pETLipHG1-NHis	pET19b (179 bp; <i>lipHG1-NHis</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pETLipHG5-NHis	pET19b (436 bp; <i>lipHG5-NHis</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pETLipHG5C-NHis	pET19b (151 bp; <i>lipHG5C-NHis</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pETLipHG5N-NHis	pET19b (232 bp; <i>lipHG5N-NHis</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pLipA-SS	pET22b (916 bp; <i>lipA-SS</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pLipA1H8-SS	pET22b (916 bp; <i>lipA 1H8-SS</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pLipC-SS	pET22b (934 bp; <i>lipC-SS</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pTMAH12	pT7-7 (2017 bp; <i>lipA_mH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Schneidinger, 1997
pUCP1H8	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA 1H8 lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2001
pUCPL6A	pUCPKS (2308 bp; <i>lipAH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Liebeton <i>et al.</i> , 2000
pUCPL6A Q1	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA D20N lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2007
pUCPL6A Q2	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA S53P lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2007

Fortsetzung Tab. 2.2:

rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle / Referenz
pUCPL6A Q3	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA</i> S155M <i>lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2007
pUCPL6A Q5	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA</i> L162G <i>lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2007
pUCPL6A Q6	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA</i> T180I <i>lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2007
pUCPL6A Q7	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA</i> T234S <i>lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2007
pUCPL6A Q52	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA</i> S53P L162G <i>lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2007
pUCPL6A Q452	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA</i> S53P S155F L162G <i>lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	Reetz <i>et al.</i> , 2007
pUCPL6AGAT-RFA	pUCPKS (3901 bp; <i>lipA</i> mit integriertem <i>ccdB</i> und Cm ^R <i>lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R , Cm ^R	Hausmann, 2004
pUCPL6AS82A	pUCPKS (2308 bp; <i>lipA</i> S82A <i>lipH</i> P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pUCPL6A::HΔA	pUCPKS (2307 bp; <i>lipA</i> ::HΔA P _{T7} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pUCPLip1	pUCPKS (2830 bp; <i>lipAH</i> P _{lac} -kontrolliert), Amp ^R	Rosenau, 2001
pUCPLip1A::HΔA	pUCPKS (2830 bp; <i>lipA</i> ::HΔA P _{lac} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pUCPLip1 K223A	pUCPKS (2830 bp; <i>lipA</i> K223A <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pUCPLip1 K223E	pUCPKS (2830 bp; <i>lipA</i> K223E <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pUCPLip1 N224A	pUCPKS (2830 bp; <i>lipA</i> N224A <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pUCPLip1 N223D	pUCPKS (2830 bp; <i>lipA</i> N224D <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit
pUCPLip1 K223A N224A	pUCPKS (2830 bp; <i>lipA</i> K223A N224A <i>lipH</i> P _{lac} -kontrolliert), Amp ^R	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Merkmal
Asn224Ala FWD	5'- TCG TCG CTG ACC TTC AAG <u>GCC</u> GGC ACC GCC AAC - 3'	<i>lipA N224A</i>
Asn224Ala REV	5'- GTT GGC GGT GCC <u>GGC</u> CTT GAA GGT CAG CGA CGA - 3'	<i>lipA N224A</i>
Asn224Asp FWD	5'- TCG TCG CTG ACC TTC AAG <u>GAC</u> GGC ACC GCC AAC - 3'	<i>lipA N224D</i>
Asn224Asp REV	5'- GTT GGC GGT GCC <u>GTC</u> CTT GAA GGT CAG CGA CGA - 3'	<i>lipA N224D</i>
FusA	5'- CCG GCC GGG GTC <u>CAC</u> AGG CTG GCG T - 3'	<i>lipA::HΔA</i>
FusA FW	5'- CCA GCC TGT <u>GGA</u> CCC CGG CCG GGG CCT CGG CCC CGG CCC T - 3'	<i>lipA::HΔA</i>
LipA FW	5'- GGG <u>GCA</u> TAT <u>GAA</u> GAA GAA GTC TCT GCT - 3'	<i>NdeI</i>
LipA RC	5'- GTC GGC GAA GAA CGC CAC GTG CGC TTC G - 3'	
LipA-SS up	5'- AAA <u>AAC</u> <u>ATA</u> <u>TGA</u> CCT ACA CCC AGA CCA AAT ACC CCA TC - 3'	<i>NdeI</i>
LipC-SS up	5'- AAA <u>AAC</u> <u>ATA</u> <u>TGG</u> ACT ACA CCC GCA CGC GCT ATC CCA - 3'	<i>NdeI</i>
Lip-SS dwn	5'- GCT <u>AAG</u> <u>GAT</u> <u>CCT</u> CTT CAC GCG AGG GGG CTT C - 3'	<i>BamHI</i>
LipH RV	5'- GGG <u>GGG</u> <u>ATC</u> <u>CTC</u> AGC GCT GCT CGG CCT G - 3'	<i>BamHI</i>
LipH _r -CHis	5'- AAA <u>ACT</u> <u>CGA</u> <u>GGC</u> GCT GCT CGG CCT GGC GCA TC - 3'	<i>XhoI</i>
LipH-G1-up	5'- GGG GGA <u>CAT</u> <u>ATG</u> CTG GAA CCT TCG GAT CTC - 3'	<i>NdeI</i>
LipH-G5-C-dwn	5'- <u>AAG</u> <u>GAT</u> <u>CCT</u> CAC CGC TGC TCG GCC TG - 3'	<i>BamHI</i>
LipH-G5-C-up	5'- AAA AAA <u>CAT</u> <u>ATG</u> GCG CCT ACA TCG CCG C - 3'	<i>NdeI</i>
LipH-G5-N-dwn	5'- <u>AAG</u> <u>GAT</u> <u>CCT</u> CAG TAG TCG AAC AGG TTG C - 3'	<i>BamHI</i>
LipH-G5-N-up	5'- AAA AAA <u>CAT</u> <u>ATG</u> CTG GAA CCT TCC CCC G - 3'	<i>NdeI</i>
Lys223Ala FWD	5'- TCG TCG CTG ACC TTC <u>GCC</u> AAC GGC ACC GCC AAC - 3'	<i>lipA K223A</i>
Lys223Ala REV	5'- GTT GGC GGT GCC GTT <u>GGC</u> GAA GGT CAG CGA CGA - 3'	<i>lipA K223A</i>
Lys223Glu FWD	5'- TCG TCG CTG ACC TTC <u>GAG</u> AAC GGC ACC GCC AAC - 3'	<i>lipA K223E</i>
Lys223Glu REV	5'- GTT GGC GGT GCC GTT <u>CTC</u> GAA GGT CAG CGA CGA - 3'	<i>lipA K223E</i>
Lys223Ala Asn224Ala FWD	5'- TCG TCG CTG ACC TTC <u>GCC</u> <u>GCC</u> GGC ACC GCC AAC - 3'	<i>lipA K223A</i> <i>lipA N224A</i>

Fortsetzung Tab. 2.3:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Merkmal
Lys223Ala Asn224Ala REV	5' - GTT GGC GGT <u>GGC GGC</u> GGC GAA GGT CAG CGA CGA - 3'	<i>lipA K223A</i> <i>lipA N224A</i>
S82A	5' - TGA TCG GCC <u>ACG CCC</u> ACG GCG GG - 3'	<i>lipA S82A</i>
S82A RC	5' - CCC GCC GTG <u>GGC</u> GTG GCC GAT CA - 3'	<i>lipA S82A</i>

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

2.4 Anzucht von Bakterien

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

2.4.1 Nährmedien

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

Lösung I 40 g/L Glucose

Lösung II 20 g/L MgSO₄ x 7 H₂O

Lösung III 2 g/L CaCl₂ x 2 H₂O

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

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

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

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und in folgendem Verhältnis eingesetzt: 10% (v/v) Lsg. I; 1 % (v/v) Lsg. II; 1 % (v/v) Lsg. III; 10 % (v/v) Lsg. IV. Für Überexpressionen von Genen unter Kontrolle des T7-Promotors wurden zusätzlich 0,1 % (v/v) Lsg. V und 0,12 % (v/v) Lsg. 6 zugesetzt.

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

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

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

2.4.2 Indikatormedien

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

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

Tributyryn-Agar (Kok *et al.*, 1993)

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

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

2.4.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium. *P. putida* Kulturen wurden bei 30 °C in LB-Medium inkubiert. Dabei wurden Stämme mit plasmid- oder genomcodierten Resistenzmarkern unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (siehe Tab. 2.4). Übernachtskulturen (ÜK) wurden für mindestens 16 h inkubiert. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 mL wurden im Reagenzglas auf einem Brutroller angezogen, während größere Kulturen im Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: max. 1/5 bis 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Rundschüttler bei 200 UpM bebrütet wurden. Zur Überexpression heterologer Gene wurde, soweit nicht anders angegeben, die Expression der T7-RNA-Polymerase bei einer Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} von 0,5 entsprach, durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,4 mM für *E. coli* bzw. 1 mM für *P. aeruginosa*) induziert. Vorkulturen wurden entweder mit Einzelkolonien von Stamm- bzw. Transformationsplatten oder mit 1/500 Volumen aus einer Gefrierkultur inokuliert. Hauptkulturen wurden mit einer ÜK auf eine Zelldichte angeimpft, die einer O.D._{580 nm} von 0,05 entsprach. Die Zelldichte von Kulturen wurde turbidometrisch in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7 % (v/v) DMSO vermischt und bei -80 °C gelagert.

Tab. 2.4: Endkonzentrationen der zur Selektion verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	für <i>E. coli</i> [µg/mL]	für <i>P. aeruginosa</i> [µg/mL]	für <i>P. putida</i> [µg/mL]
Ampicillin (Amp)	100	---	---
Carbenicillin (Cb)	---	600	---
Chloramphenicol (Cm)	50	300	450
Tetracyclin (Tc)	50	100	25

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

Chromosomale DNA aus *P. aeruginosa* Zellen wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen isoliert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der von Birnboim & Doly (1979) beschriebene Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung des Minipräp-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) und des Midipräp-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

2.6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA sowie der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) in 0,6 - 2 %igen (w/v) Agarosegelen.

Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 × TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Größenstandards für die DNA-Gele wurden je nach erwarteten Fragmentgrößen die „1 kb-ladder“ von Invitrogen (Karlsruhe) sowie die 1 kb und 50 bp „GeneRuler™ Ladder“ von Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystem der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep® Gel cleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.7 *In vitro*-Rekombination von DNA

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

2.8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 mL einer ÜK des Plasmid-haltigen Donorstamms *E. coli* S17-1 mit 1 mL Zellen des jeweiligen Rezipientenstammes, die zuvor für 10 min bei 46 °C inkubiert wurden, gemischt und durch Zentrifugation (3 min; 5.000 g; RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für mindestens 4 h bei 37 °C auf einer LB-Agarplatte inkubiert, bevor diese in 1 mL LB-Medium resuspendiert und in Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁶ auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion von *E. coli* wurden 25 µg/mL Irgasan (Ciba Geigy, Basel, Schweiz) eingesetzt.

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.10.1 Standard-PCR

Die PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µL angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Pfu*- oder Turbo-*Pfu*-Polymerase im Reaktionspuffer des jeweiligen Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 × (10 min 98 °C); 30 × (1 min 95 °C; 0,5 min 55–65 °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 „Perfectprep[®] Gel cleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.10.2 Ortsspezifische Mutagenese

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

Polymerase aufgefüllt werden können, so dass als PCR-Produkt das mutagenisierte Gen entstand.

2.11 Sequenzierung von DNA

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

2.12 Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten (GZE)

Um die Expression plasmidcodierter Proteine in *E. coli* und *P. aeruginosa* nachzuweisen und den zeitlichen Verlauf zu analysieren, wurden Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte (GZE) hergestellt.

Aus den Expressionskulturen wurden Proben entnommen und die Zelldichte über Messung der O.D.₅₈₀ bestimmt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 6.000 UpM, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und im Bedarfsfall sterilfiltriert (Schleicher und Schüll, NC45 Membranfilter, 0,45 µm Porendurchmesser). Das Zellsediment wurde je nach weiterem Verwendungszweck entsprechend einer O.D._{580 nm} = 20 in Trispuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA) oder Equilibrierungspuffer für eine Ni-NTA-Reinigung (50 mM KPi, pH 8,0; 20 mM Imidazol; 300 mM NaCl) aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 2 × 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Die erhaltenen Proben wurden sofort verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.13 Herstellung von Sphäroblasten (Witholt *et al.*, 1976)

200 mg Zellen (Trockengewicht, exponentielle Wachstumsphase) wurden in 20 mL Puffer A (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20% (w/v) Saccharose) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 20 mL Puffer B (Puffer A + 5 mM EDTA) und 2 mg Lysozym zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert.

2.14 Herstellung der Periplasma-, Cytoplasma- und Membranfraktion (Pedrotta & Witholt, 1999)

Die generierten Sphäroblasten (2.13) wurden für 20 min zentrifugiert (10.000 x g) und der Überstand als Periplasmafraktion weiter verwendet. Die sedimentierten Sphäroblasten wurden in 15 mL Puffer C (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM MgCl₂) resuspendiert und DNase (0,01 mg/mL) zugefügt. Die Sphäroblasten wurden durch Ultraschall aufgeschlossen (Branson-Sonifier W250, 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt) und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 5.000 x g, 4 °C) entfernt. Gesamtmembranfraktionen wurden durch Zentrifugation (3 h, 17.000 x g, RT) sedimentiert und der resultierende Überstand als

Cytoplasmafraktion genutzt. Die Membranen wurden in 5 mL Puffer D (50 mM KP_i , pH 7,2) resuspendiert.

2.15 Membranfraktionierung

Präparierte Gesamtmembranfraktionen (2.14) wurden mit 2 % (w/v) Laurylsarcosine gemischt und 1 h bei RT inkubiert, um die innere Membran selektiv zu solubilisieren. Anschließend wurde die innere Membran durch Zentrifugation (3 h, 17.000 x g, RT) sedimentiert und der Überstand, der die innere Membran enthielt, abgenommen. Die innere Membran wurde in 50 mM KP_i (pH 7,2) resuspendiert.

2.16 Löslichkeitsanalyse von Proteinen

Um festzustellen, ob Proteine in Lösung oder als Präzipitat vorlagen, wurden die zu untersuchenden Proben zentrifugiert (15 min, 13.000 UpM, RT). Der Überstand wurde vorsichtig von dem evtl. aufgetretenen Sediment getrennt und die Proteinkonzentration beider Fraktionen mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kit“ der Firma Pierce (Rockford, USA) quantifiziert oder durch eine SDS-PAGE (2.26) untersucht.

2.17 Reinigung von Lipase „inclusion bodies“ (modifiziert nach Joly & Swartz, 1994)

Die $O.D._{580\text{ nm}}$ der „inclusion bodies“ enthaltenden Kultur wurde bestimmt und die Zellen sedimentiert (20 min, 9.000 UpM, 4 °C). Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen Zellaufschlusspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA) resuspendiert, so dass eine Zelldichte von $O.D._{580\text{ nm}} = 20$ erreicht wurde, und aufgeschlossen (Branson-Sonifier W250, 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 10.000 UpM, 4 °C) wurde das Sediment in Extraktionspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 1 % Laurylsarcosine) aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert. Dieser Extraktionsschritt wurde nach einer weiteren Zentrifugation (20 min, 10.000 UpM, 4 °C) wiederholt. Anschließend wurde die Probe noch einmal zentrifugiert und das Pellet, welches die gereinigten Lipase „inclusion-bodies“ enthielt, in 10 mL Puffer Zellaufschlusspuffer aufgenommen. Die Ausbeute und der Erfolg der Reinigung wurden durch eine SDS-PAGE (2.26) analysiert.

2.18 *In vitro* Renaturierung von Lipasen aus „inclusion bodies“

Die gereinigten „inclusion bodies“ wurden in 8 M Harnstoff aufgenommen und durch Inkubation für 1 h bei 37 °C vollständig denaturiert. Daraufhin wurden sie 1:10 im Rückfaltungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 3,5 mM $CaCl_2$; 0,7 mM Laurylmaltosid; 45 % (v/v) Glycerol) verdünnt, der, wenn nicht anders angegeben, eine äquimolare Menge

gereinigte Lipase-spezifische Foldase enthielt. Nach Inkubation für 3 h bei 30 °C wurde der Ansatz einem Enzymaktivitätstest (2.24.1) unterzogen, um den Erfolg der Rückfaltung zu überprüfen.

2.19 Reinigung von Proteinen als Poly-Histidin Fusionsprotein

Für die Reinigung von Poly-Histidin Fusionsproteinen wurde die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) angewendet. Hierfür wurde eine Chromatographie-Säule (XK₂₆, Pharmacia) mit Ni-NTA Superflow Gelmaterial (Qiagen, Hilden) benutzt, bei welchem der Ni-NTA-Komplex über einen Linker an eine Matrix aus Sepharose CL-6B gekoppelt ist. Diese Matrix besitzt die größte Selektivität für die in *E. coli* überexprimierten, rekombinanten Poly-Histidin-Fusionsproteine im Vergleich mit dem Hauptteil der Wirtsproteine (Lindner *et al.*, 1992).

Die Säule wurde über eine P1-Pumpe (Pharmacia Biotech, Freiburg) mit den jeweiligen Puffern bzw. der Probe beladen, wobei eine Flussgeschwindigkeit von 3 mL / min eingestellt wurde. Die Elution der Proteine wurde über die Detektion der Absorption bei $\lambda = 280$ nm und einen Schreiber verfolgt. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit mindestens 5 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer (20 mM Imidazol; 50 mM KP_i, pH 8,0; 300 mM NaCl) gespült. Anschließend wurde das Gesamtzellextrakt auf die Säule aufgetragen. Nachdem mit 3 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer gespült wurde, wurden unspezifisch gebundene Proteine durch Auftragen von 3 Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Imidazol; 50 mM KP_i, pH 8,0; 300 mM NaCl) entfernt. Nach der Elution des Poly-Histidin-Fusionsproteins mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol; 50 mM KP_i, pH 8,0; 300 mM NaCl) wurde die Säule mit 3 Volumen 0,5 M NaOH gespült und bis zur nächsten Benutzung in 20 % (v/v) Ethanol gelagert. Der Erfolg und die Qualität der Reinigung wurden über aufgefangene Aliquots von der Durchlauf- und Waschfraktion sowie dem Eluat kontrolliert, die mittels einer SDS-PAGE (2.26) analysiert wurden.

2.20 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden unter Verwendung der Zentrifugationskonzentratoren Vivaspin 20 (Vivascience, Hannover) mit jeweils für das Protein geeigneten Ausschlussgrößen in Ausschwingrotoren einer Kühlzentrifuge bei 3.000 \times g konzentriert. Zur Umpufferung wurden die Proteinlösungen nach dem Konzentrieren dreimal mit dem Zielpuffer auf das ursprüngliche Volumen der Probe aufgefüllt und erneut konzentriert. Der Erfolg der Umpufferung wurde jeweils durch eine Löslichkeitsanalyse (2.16) bestimmt.

2.21 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen von Lösungen wurden mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kits“ der Firma Pierce (Rockford, USA) ermittelt.

2.22 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) wurde zur Größenbestimmung von Proteinen und Proteinkomplexen eingesetzt. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden auf eine Konzentration von mindestens 1 mg / mL in GFC-Puffer (100 mM MES pH 6,5; 150 mM NaCl) eingestellt. Maximal 1 mL der Lösung wurde auf die Säule (Superdex G-200, Pharmacia Biotech, Freiburg) mit einer Flussrate von 1 mL / min über eine P1-Pumpe (Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Während der gesamten Chromatographie wurde die Elution von Proteinen durch Messung der Absorption bei $\lambda = 280$ nm und einen Schreiber verfolgt. Die eluierten Proteine wurden über einen Fraktionskollektor (Pharmacia Biotech, Freiburg) in jeweils 1 mL großen Fraktionen aufgefangen und durch SDS-PAGE (2.26) und Enzymaktivitätstests (2.24) analysiert.

2.23 Gekoppelte Ein-Schritt Reinigung und *in vitro* Aktivierung von Lipasen mit an Beads immobilisiertem Chaperon

Gesamtzellextrakte oder Lösungen, die schon gereinigtes LipH als Poly-Histidin-Fusionsprotein enthielten, wurden mit Equilibrierungspuffer (20 mM Imidazol; 50 mM KP_i , pH 8,0; 300 mM NaCl) eingestellt. Anschließend wurde das Chaperon durch Inkubation für 30 min bei RT mit zuvor equilibrierten Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) unter leichter Bewegung immobilisiert. Daraufhin wurden die magnetischen Beads durch eine Separationsvorrichtung an den Rand des Gefäßes gezogen, so dass der Überstand abgenommen werden konnte. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Inkubation mit Waschpuffer (50 mM Imidazol; 50 mM KP_i , pH 8,0; 300 mM NaCl) für 5 min bei RT entfernt. Lösungen, die Lipase enthielten, welche durch De- und Renaturierung ohne die Lipase-spezifische Foldase in den sog. „nahe nativen“, enzymatisch inaktiven Zustand überführt wurde, wurden anschließend mit den Beads für 3 h bei 30 °C unter leichter Bewegung inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand erneut abgenommen und unspezifisch gebundene Proteine durch Inkubation mit Rückfaltungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 3,5 mM $CaCl_2$; 0,7 mM Laurylmaltosid; 45 % (v/v) Glycerol) für 10 min bei RT entfernt. Die Dissoziation der Proteine von den Beads erfolgte mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol; 50 mM KP_i , pH 8,0; 300 mM NaCl) für 10 min bei RT. Nach Verwendung wurden die Beads dreimal mit 0,5 M NaOH gewaschen und in 20 % (v/v) EtOH bei 4 °C gelagert. Die gesammelten Fraktionen wurden durch Enzymaktivitätstests (2.24.1) und SDS-PAGE (2.26) analysiert.

2.24 Bestimmung von Lipaseaktivitäten

2.24.1 Spektralphotometrische Bestimmung von Lipaseaktivität

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

Für die qualitative und quantitative Bestimmung der Lipaseaktivität einer Lösung wurde das Substrat *p*NPP verwendet (nach Winkler & Stuckmann, 1979). Substratemulsion: 207 mg Natriumdesoxycholat; 100 mg Gummi arabicum; 90 mL Sørensen Phosphatpuffer pH 8,0 (Lösung A: 8,9 g/L Na_2HPO_4 ; Lösung B: 0,68 g/L KH_2HPO_4 [A:B \rightarrow 17:1]); 30 mg *p*NP-Palmitat in 10 mL Isopropanol. Für den Test in Mikrotiterplatten wurden je 200 μL der Substratemulsion mit 5 bis 40 μL Probe vermischt und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Während dieser Zeit wurde die $\text{O.D.}_{410 \text{ nm}}$ alle 30 s mit einem Spectramax Plus Spektralphotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bestimmt. Die Auswertung der Daten wurde mit der SOFTmax Pro 3.1.2 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) durchgeführt. Für die Durchführung des *p*NPP-Tests in größeren Volumina wurden je 2,5 mL Substratemulsion mit bis zu 50 μL Probe gut gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die $\text{O.D.}_{410 \text{ nm}}$ der einzelnen Ansätze im GENESYS 10 VIS Spektralphotometer (Thermo Scientific, Madison, USA) bestimmt. Eine Absorption von 1 bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ entspricht einer Lipaseaktivität von 0,161 nkat oder einer Lipasemenge von 0,212 ng.

Aktivitätstests, bei denen die Kettenlängenspezifität der Lipasen untersucht wurde, wurden im Allgemeinen wie der eben beschriebene *p*NPP Test durchgeführt. Die Substrate wurden in einer Konzentration von 800 μM in Isopropanol gelöst und mit Substratemulsion, die kein Gummi arabicum enthielt, vermischt.

2.24.2 Gaschromatographische Bestimmung der Lipaseaktivität

Für die Bestimmung der Enantioselektivität der Hydrolyse des 2-Methyldecansäure-*p*NP Esters durch lipolytische Aktivität wurden jeweils 50 μL der Substratlösung (10 mg / mL in DMSO) mit 350 μL Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5) und 100 μL der zu untersuchenden Probe vermischt und so lange bei 37 °C inkubiert, bis die $\text{O.D.}_{410 \text{ nm}}$ des Ansatzes einem Wert von 1 entsprach. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 Tropfen 10 % NaOH gestoppt und der pH-Umschlag mittels eines pH-Streifens kontrolliert. Daraufhin wurde die Probe mit 300 μL TBME versetzt und für 30 s gemischt. Die den nicht umgesetzten Ester enthaltende klare organische Phase wurde abgenommen und die Extraktion zweimal wiederholt.

Anschließend wurde die wässrige Phase durch Zugabe von 3 Tropfen 10 % HCl angesäuert und der pH erneut geprüft. Nach Zugabe von 300 μL TBME und Mischen für 30 s wurde die die Säure enthaltende organische Phase abgenommen und die Extraktion noch zweimal wiederholt.

Allen Proben wurde vor der Analyse durch die chirale Gaschromatographie das eventuell noch vorhandene Wasser durch Inkubation mit MgSO_4 entzogen. Die Trennung des Enantiomergemisches wurde auf einer chiralen Gaschromatographiesäule FS-Cyclodex β -IP (50 m x 0,32 mm) der Firma CS GmbH (Langerwehe) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 120 °C \rightarrow 195 °C; $m=5$ °C/ min; HOLD 5 min.

2.25 Präzipitation von Proteinen (Peterson, 1977)

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

2.26 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970), bestehend aus einem 5 %-igen Sammel- und einem 12 %-igen Trenngel. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und vor dem Auftragen 10 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merril (1990) mit „Coomassie Brilliant Blue R-250“ (Serva, Heidelberg) oder mittels „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese durch TCA-Fällung präzipitiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von weniger als 15 kDa und für analytische Gele, bei denen eine hohe Trennleistung erforderlich war, wurden diskontinuierliche Tricin-Gelsysteme mit 4 %-igen Sammel- und 15 %-igen Trenngelen verwendet (Schaeffer, 2006).

2.27 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch SDS-PAGE (2.26) aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung der Apparatur „Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, München) übertragen (Wilson & Yuan, 1989). Der Proteintransfer erfolgte für 15 min bei 150 mA und weitere 20 min bei 300 mA konstanter Stromstärke in Dunn-Carbonat-Puffer (10 mM NaHCO_3 , 3 mM Na_2CO_3 , 20 % (v/v) Methanol) (Dunn, 1986). Anschließend wurde die PVDF-Membran mindestens 1 h in TBST (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0,2 % (v/v) Tween 20) mit 2 % (w/v) Milchpulver blockiert.

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

2.28 Synthese des 2-Methyldecansäure-*p*NP Esters (Berglund *et al.*, 1993)

Da das Substrat, gegen welches die Lipase-Variante 1H8 eine Enantioselektivität von $E = 51$ aufweist, nicht kommerziell erhältlich ist, wurde es in einer Zwei-Schritt-Synthese chemisch hergestellt. Zunächst wurde die an der C₂-Position substituierte 2-Methyldecansäure (2-MDA) synthetisiert. Elementares Natrium wurde in getrocknetem Ethanol unter N₂-Atmosphäre und Eiskühlung gelöst. Das erhaltene Natriumethanolat wurde über einen Zeitraum vom 15 min zu einer äquimolaren Menge Methylmalonsäurediethylester in einem Rückflusskühler unter N₂-Gegenstrom gegeben. Der Lösung wurde bei einer Temperatur von 80 °C eine äquimolare Menge Bromoctan zugegeben und für 2,5 h inkubiert. Danach wurde der Kolben abgekühlt und das Ethanol mit einem Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Die verbliebenen unlösliche Salze wurden in Wasser gelöst und viermal mit jeweils 100 mL Et₂O extrahiert, mit MgSO₄ von Wasser befreit und mit einem Rotationsverdampfer eingengt. Die Reaktion wurde anschließend über Nacht mit KOH verseift. Durch Einstellung des pH Wertes auf 0 konnte die Säure präzipitiert werden. Der getrocknete Feststoff wurde durch Inkubation für 2,5 h bei 185 °C in einem Rückflusskühler decarboxyliert. Der Rückstand wurde in 600 mL 10 % (w/v) Sodalösung aufgenommen, filtriert und mit HCl auf pH 0,5 eingestellt. Daraufhin wurden die in dem Reaktionsgemisch vorhandenen Substanzen dreimal mit Diethylether extrahiert. Nach einer weiteren Trocknung wurde der Ansatz vakuumdestilliert und per NMR-Spektroskopie analysiert.

In einem zweiten Schritt wurde die Säure mit *para*-Nitrophenol verestert. Hierzu wurde 1 g der Säure mit 10 mL trockenem Dichlormethan verdünnt. Um die 2-MDA zu chlorieren, wurden anschließend 1 Tropfen Dimethylformamid sowie ein 15-facher molarer Überschuss Oxalylchlorid zugegeben und für 3 h bei RT gerührt. Überschüssiges Oxalylchlorid wurde mit einem Rotationsverdampfer entfernt, unter N₂-Atmosphäre äquimolare Mengen *p*NP und NEt₃ zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Dichlormethan (0 °C) verdünnt und für 3 h inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit gesättigtem Na₂CO₃ ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Daraufhin wurde der Ester aus dem Reaktionsgemisch über eine Kieselsäule mit Kühlelement in Chromatographiepuffer (Petrolether:Ethylacetat; 99,5:0,5) gereinigt und das Produkt mittels NMR (2.29) analysiert.

2.29 NMR-Spektroskopie der synthetisierten Stoffe

Die ^1H und ^{13}C -NMR-Spektren der Reaktionsprodukte aus 2.28 wurde mit einem 300 MHz Spektroskop der Firma Bruker BioSpin (Karlsruhe) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde CDCl_3 mit Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard verwendet.

2.30 Computerprogramme und Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software). Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997). Alignments wurden mit Bio-Edit (Hall, 1999) erstellt. Das Design von Primern wurde mit Hilfe des Primer3 Tools durchgeführt (Rozen & Skaletsky, 2000). DNA-Sequenzinformationen von *P. aeruginosa* wurden von dem „Pseudomonas-Genome Project“ bezogen (<http://www.pseudomonas.com>). Zur Identifizierung der Sekretionssignale der Lipasen für den Sec-Apparat wurde der „SignalP 3.0“ Algorithmus verwendet (Emanuelsson *et al.*, 2007). Sekundärstrukturvorhersagen anhand von Primärstrukturdaten wurden mittels des „PsiPred“ Servers erstellt (Jones, 1999).

Proteinstrukturdaten wurden von der „RCSB Protein Data Bank“ (<http://www.rcsb.org>) bezogen. Homologie-Modellierungen von Proteinen wurden mit „SWISS-MODEL“ durchgeführt (Peitsch, 1996) und die Qualität der Strukturen durch „WHAT IF“ überprüft (Vriend, 1990). Durchgeführte Energieminimierungen wurden mit Hilfe des „GROMOS 43B1“ Algorithmus (Scott *et al.*, 1999), der in der „Deep View / Swiss-PDB Viewer 3.7“ Software (Guex & Peitsch, 1997) implementiert ist, vorgenommen. Strukturvergleiche bezüglich des Tunnels zum aktiven Zentrum wurden mit „CAVER“ (Damborsky *et al.*, 2007), die Visualisierung der Tunnel mit „PyMol“ (DeLano Scientific, Palo Alto, USA) durchgeführt. Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit „UCSF Chimera“ (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt. Elektrostatische Eigenschaften von Proteinen wurden mit Hilfe des „APBS“ Programms (Baker *et al.*, 2001) mit PQR Dateien, die zuvor mit dem Programm „PDB2PQR“ (Dolinsky *et al.*, 2004) aus den jeweiligen PDB Dateien errechnet wurden, untersucht. Zur Visualisierung der elektrostatischen Felder wurde „PyMol“ (DeLano Scientific, Palo Alto, USA) verwendet.

Für nichtlineare Regressionsanalysen zur Ermittlung von Michaelis-Konstanten wurde „Prism 4“ (GraphPad Software, San Diego, USA) genutzt.

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

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der heterologen Überexpression und Reinigung von LipA und LipH

Da ein Großteil der im weiteren Verlauf der Arbeit durchgeführten Experimente gereinigte Lipase und Lipase-spezifische Foldase zur Grundlage hat, wurde zunächst versucht, die Expression und Reinigung dieser beiden Proteine zu optimieren, so dass eine ausreichende Proteinmenge in einer Charge gereinigt werden konnte, um sie für die gesamten Untersuchungen nutzen zu können. In einem schon etablierten homologen, auf der T7-Polymerase basierenden, Expressionssystem können mehrere 100 mg Lipase aus einem Liter Kulturüberstand gewonnen werden (Jaeger *et al.*, 1997; Schneidinger, 1997). Für Rückfaltungs- und Interaktionsstudien bezüglich der Lipase und des Chaperons war es jedoch essentiell, sie ohne Kontakt zu akzessorischen Proteinen zu exprimieren und zu reinigen. Aus diesem Grund wurde der heterologe Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet, um die Proteine separat voneinander zu exprimieren.

3.1.1 Optimierung der Expression in *E. coli* und Reinigung der Lipasen

Für die heterologe Überexpression von *lipA* aus *P. aeruginosa* in *E. coli* wurde bereits ein System etabliert, welches auf dem Plasmid pTMAH12 basiert (Schneidinger, 1997). Dieser Vektor trägt das Lipasegen unter Kontrolle des T7-Promotors und ermöglicht somit eine Expression in dem Stamm *E. coli* BL21(DE3), der eine chromosomal codierte T7-Polymerase trägt. In diesem Expressionssystem führt das Fehlen eines für die Sekretion aus der Zelle essentiellen Xcp-Apparats zur zellulären Aggregation der Lipase. Die entstehenden „inclusion bodies“ enthalten die katalytisch inaktive Lipase. Diese können nach vollständiger chemischer Denaturierung durch Rückfaltung in eine globuläre aber enzymatisch inaktive Form überführt werden, die sich mittels CD-Spektroskopie nicht von derjenigen aktiver Lipase aus dem Überstand unterscheiden lässt (El Khattabi *et al.*, 2000). Nachträglich kann diese, sich im sog. „nahe nativen“ Zustand befindende Lipase, *in vitro* durch Zugabe von LipH in den nativen, katalytisch aktiven Zustand überführt werden.

Zunächst sollte versucht werden, dieses System weiter zu optimieren, um die Ausbeute an aggregierter Lipase zu erhöhen. Das auf dem Plasmid pTMAH12 vorhandene Wildtyp-Gen für die Lipase trägt auch die Signalsequenz zur Translokation des Proteins in den periplasmatischen Raum, in dem fehlgefaltete und aggregierte Proteine Angriffspunkt von Proteasen werden. Aus diesem Grund, und aus Gründen der Vergleichbarkeit mit homolog exprimierter Lipase aus dem Kulturüberstand, wurde die Signalsequenz der Lipase mit Hilfe des „SignalP 3.0“ Algorithmus identifiziert und von *lipA* per PCR (2.10) mit den Primern „LipA-SS up“ und „Lip-SS dwn“ entfernt. Das entstandene PCR Produkt und der Vektor pET22b wurden mit den Endonukleasen *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert und ligiert. Nachfolgend wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem neu konstruierten Plasmid pLipA-SS, welches für die N-terminal verkürzte Lipase codiert, und pTMAH12 transformiert (2.8) und die Ausbeuten nach erfolgter Überexpression (2.4.3) in LB als Nährmedium durch eine SDS-PAGE (2.26) verglichen (Abb. 3.1).

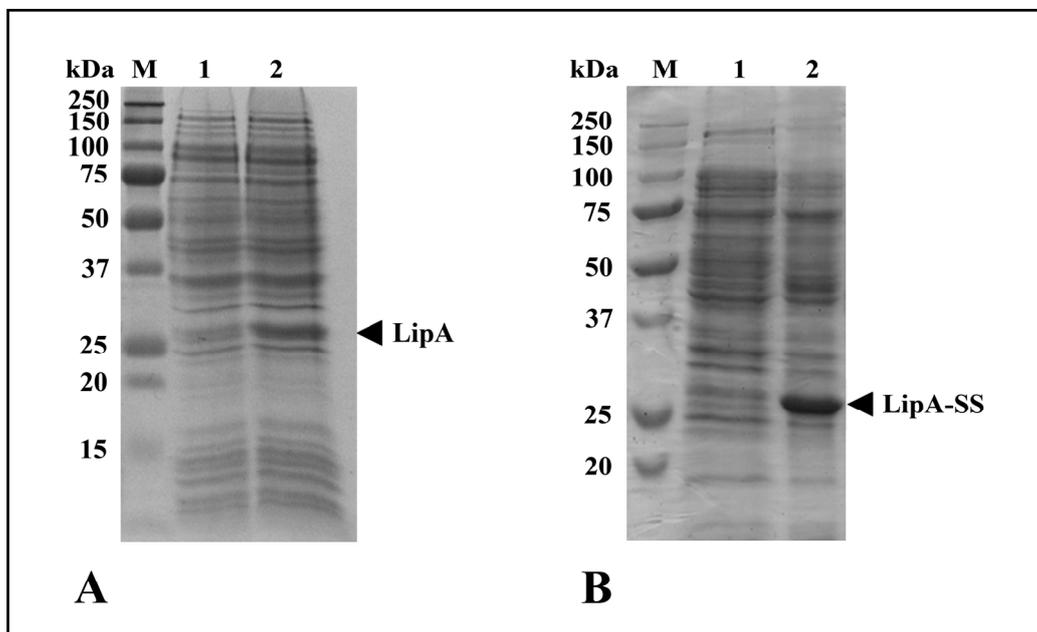


Abb. 3.1: SDS-PAGE zum Vergleich der Ausbeuten nach Überexpression der Lipase mit (A) und ohne Signalsequenz (B) in *E. coli* BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors in LB. M: Marker; 1: Gesamtzellextrakt (GZE) vor Induktion; 2: GZE nach Überexpression. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$). Zur Visualisierung der Banden wurden die 12 %igen Trenngele mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Die Intensität der die Lipase enthaltenden Bande bei einer Größe von etwa 29 kDa nahm bei Expression der Variante ohne Signalsequenz verglichen mit derjenigen des Wildtyp-Proteins deutlich zu, so dass in den folgenden Expressionsversuchen das Konstrukt pLipA-SS verwendet wurde. Nach erfolgter Expression wurde der Versuch unternommen, die aggregierte Lipase durch mehrere aufeinander folgende Zentrifugations- und Extraktionsschritte zu reinigen (2.17). Der Erfolg der Reinigung wurde durch eine SDS-PAGE (2.26) analysiert (Abb. 3.2).

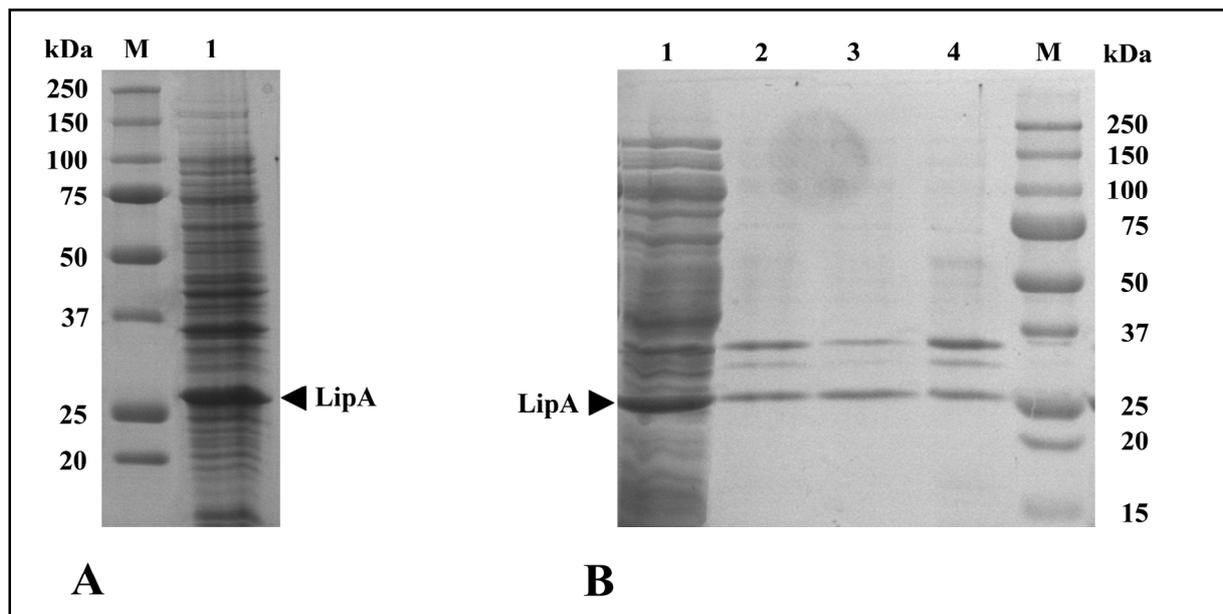


Abb. 3.2: (A) SDS-PAGE der Expression von LipA als „inclusion bodies“ in *E. coli* BL21(DE3)/pLipA-SS in LB. M: Marker; 1: GZE nach Überexpression. (B) SDS-PAGE Analyse des Reinigungserfolgs der LipA „inclusion bodies“. M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Pellet nach der ersten Zentrifugation; 3: Pellet nach der zweiten Zentrifugation; 4: Pellet nach der dritten Zentrifugation. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$). Die Trenngele (12 %ig) wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Wie nach der SDS-PAGE zu erkennen war, konnte die Lipase nicht in elektrophoretischer Homogenität gewonnen werden. Es traten zwei deutlich sichtbare kontaminierende Banden bei einer Größe von etwa 35 kDa und 32 kDa auf (Abb. 3.2 B). Deswegen wurde im Folgenden der Versuch unternommen, die Expression für das Minimalmedium M9 zu optimieren, in dem schon LipA „inclusion bodies“ in elektrophoretischer Homogenität gereinigt werden konnten (Hausmann, 2004). Da Bakterien bei einer Anzucht in Minimalmedium aufgrund der chemisch genau definierten Zusammensetzung alle von ihnen benötigten Makromoleküle selbst synthetisieren müssen, ist eine geringere Ausbeute an zu überexprimierendem Protein oft die Folge. In diesem Medium konnte die Ausbeute der Expression von LipA mit Signalsequenz durch Zugabe einer Spurenelement-Lösung und FeSO_4 verbessert werden (Hausmann, 2004). Um zu überprüfen, ob auch die Expression des LipA ohne Signalsequenz durch Zusatz der Additive gesteigert werden kann, wurde die Lipase in beiden M9 Varianten exprimiert (2.4.3). Die Ausbeute des Zielproteins wurde durch eine SDS-PAGE (2.26) verfolgt (Abb. 3.3). Durch Vergleich der Intensitäten der Banden der

Lipase war erkennbar, dass die Expressionsrate durch Zusatz der Spurenelemente und des FeSO_4 gesteigert werden konnte.

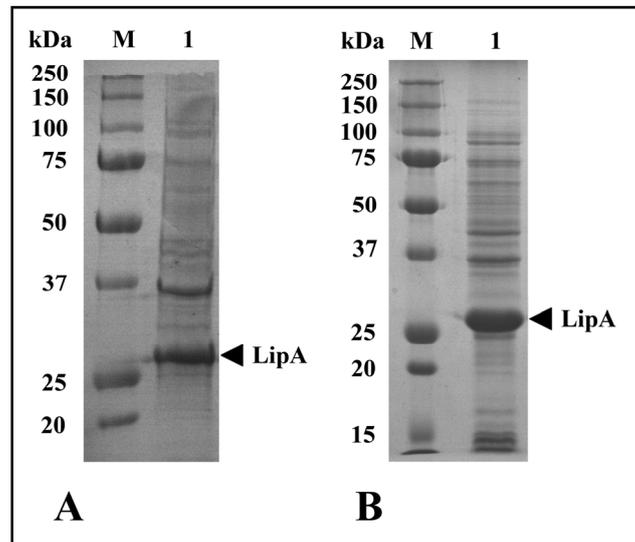


Abb. 3.3: SDS-PAGE zum Vergleich der Ausbeuten nach Überexpression der Lipase in M9 ohne (A) und mit Zusatz von Spurenelementen und FeSO_4 (B) in *E. coli* BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors. M: Marker; 1: GZE nach erfolgter Überexpression. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($\text{O.D.}_{580 \text{ nm}} = 0,15$). Das 12 %ige Trenngel wurde nach der Gelelektrophorese mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Im Anschluss wurde versucht, die Lipase „inclusion bodies“ zu reinigen (2.17). Der Verlauf der Reinigung wurde durch eine SDS-PAGE (2.26) überprüft (Abb. 3.4). Wie erkennbar war, konnten durch die Expression der Lipase in Minimalmedium und anschließende Aufarbeitung der Gesamtzellextrakte die Lipase Zelleinschluss-Körper in elektrophoretisch homogener Form gewonnen werden. Eine Proteinquantifizierung durch einen BCA-Assay gab Aufschluss über die gewonnene Menge Protein. Insgesamt wurden etwa 163 mg der LipA „inclusion-bodies“ aus 2 L Kultur für nachfolgende Experimente gereinigt.

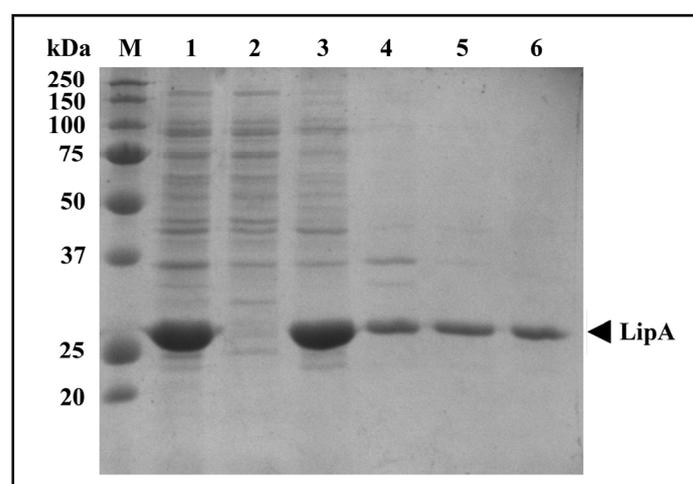


Abb. 3.4: SDS-PAGE Analyse des Reinigungserfolgs der LipA „inclusion bodies“ nach Expression in optimiertem Minimalmedium. M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt; 3: Pellet nach der ersten Zentrifugation; 4: Überstand nach dem zweiten Zentrifugationsschritt; 5: Pellet nach der zweiten Zentrifugation; 6: Pellet nach der dritten Zentrifugation. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($\text{O.D.}_{580 \text{ nm}} = 0,15$). Das Trenngel (12 %ig) wurde nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Die heterologe Expression und Reinigung der Lipase LipA konnte durch das Entfernen ihrer Signalsequenz für den Transport in das Periplasma und durch Nutzung von modifiziertem M9-Medium optimiert werden. Insgesamt wurden 163 mg elektrophoretisch homogenes Protein für nachfolgende Experimente gewonnen.

3.1.2 Expression in *E. coli* und Reinigung von LipH

Die Optimierung und Reinigung der heterologen Expression der Lipase-spezifischen Foldase LipH war bereits Gegenstand einer vorangegangenen Arbeit. Die Überexpression der Foldase LipH wurde mit dem Konstrukt pEHTHis19 als LipH_r-NHis durchgeführt. Diese Variante des LipH wurde um den Membrananker verkürzt, so dass sie löslich vorliegt, und trägt einen N-terminalen His-Tag, der die einfache Reinigung durch eine IMAC ermöglicht (Walter, 2003). Wie bereits für die Foldasen aus *P. aeruginosa* und *B. glumae* gezeigt werden konnte, wird die *in vitro* Funktionalität des Chaperons durch Entfernung des Membranankers nicht beeinträchtigt (Shibata *et al.*, 1998b; Quyen *et al.*, 1999; El Khattabi *et al.*, 2000). Der Erfolg der Expression (2.4.3) dieser LipH-Variante in *E. coli* BL21(DE3) sowie deren Reinigung (2.19) wurden mittels SDS-PAGE (2.26) verfolgt (Abb. 3.5).

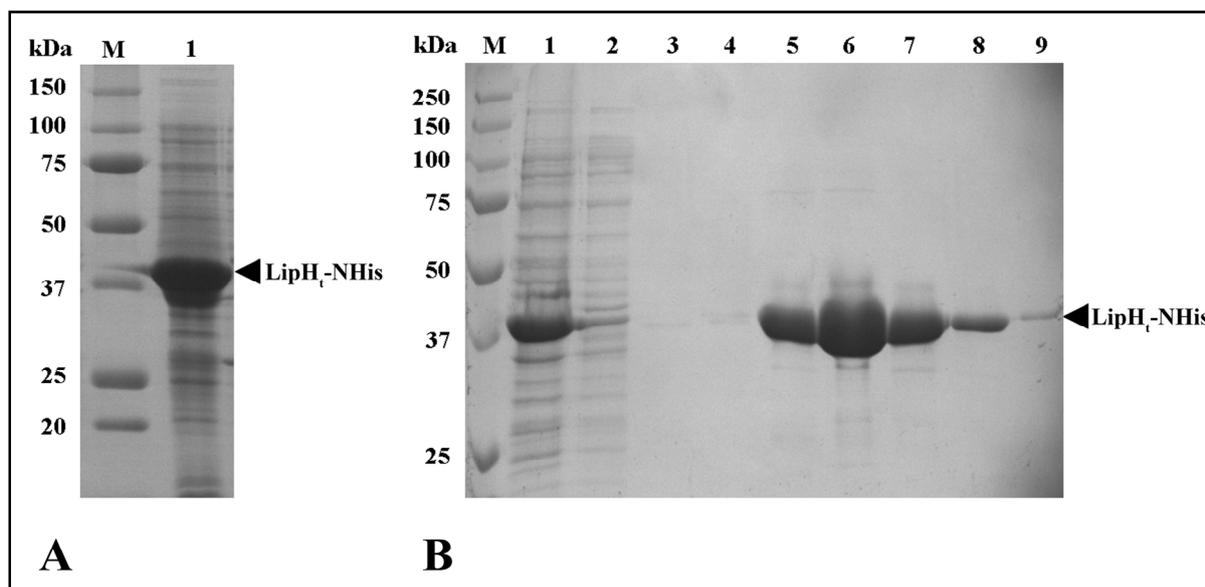


Abb. 3.5: (A) SDS-PAGE der Expression von LipH als LipH_r-NHis in *E. coli* BL21(DE3)/pEHTHis19. M:Marker; 1: GZE nach Überexpression. (B) SDS-PAGE der Reinigung von LipH_r-NHis durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Durchlauf; 3 & 4: Waschfraktionen; 5 bis 9: Elutionsfraktionen. Die aufgetragenen Volumina der GZE und Waschfraktionen wurden auf gleiche Zelldichten von $O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$ bezogen, während jeweils 20 μL der Elutionsfraktionen verwendet wurden. Die Trenngele (12 %ig) wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Die Analyse des GZE durch die Gelelektrophorese wies eine intensive Bande bei etwa 37 kDa auf, die auf eine starke Überexpression der Lipase-spezifischen Foldase zurückzuführen war

(Abb.3.5A). Das SDS-PAGE der Reinigung des Chaperons zeigte, dass der Durchlauf nahezu alle Proteine bis auf das LipH_r-NHis, das quantitativ an die Säule gebunden hat, enthielt (Abb. 3.5B). Anschließend wurde der Proteingehalt der Fraktionen, die während der Elution aufgefangen wurden, durch einen BCA-Assay quantifiziert. Die Proteinmenge, die aus 2 L Kultur gewonnen werden konnten, betrug insgesamt 254 mg.

LipH_r-CHis stellt eine weitere Variante der Lipase-spezifischen Foldase dar. Dieses Protein wurde auch um den Membrananker verkürzt, besitzt jedoch ein C-terminal lokalisiertes Poly-Histidin Peptid. Diese Variante wurde ebenfalls heterolog in *E. coli* BL21(DE3) mit dem Vektor pBR22LipH_r-CHis exprimiert (2.4.3) und über eine IMAC gereinigt (2.19). Der Verlauf der Reinigung wurde per SDS-PAGE (2.26) analysiert (Abb. 3.6).

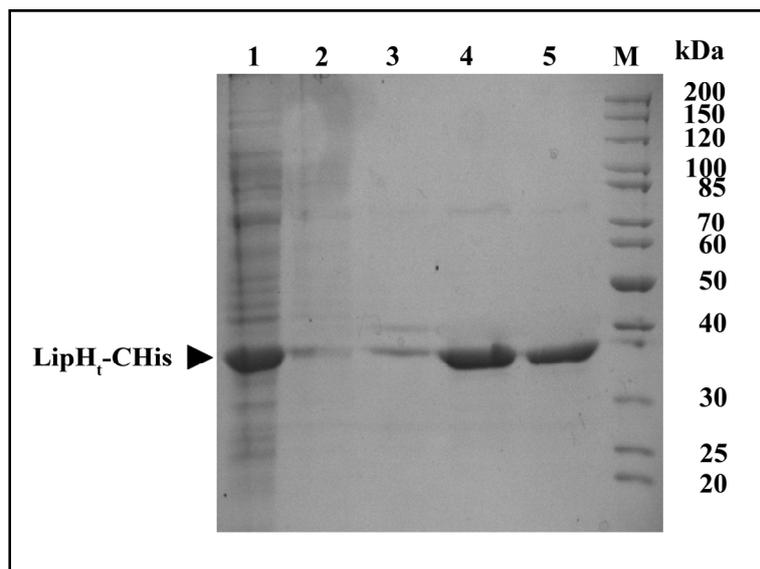


Abb. 3.6: SDS-PAGE der Reinigung von LipH_r-CHis durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Durchlauf; 3: Waschfraktion; 4 & 5: Elutionsfraktionen. Die aufgetragenen Volumina des GZE und der Waschfraktion wurden auf gleiche Zelldichten von $O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$ bezogen, während jeweils 20 μL der Elutionsfraktionen verwendet wurden. Die Trenngele (12 %ig) wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Wie anhand der SDS-PAGE zu erkennen war, band LipH_r-CHis selektiv an der Säulenmatrix und eluierte in nahezu elektrophoretischer Homogenität. Im Anschluss wurde der Proteingehalt der Elutionsfraktionen durch einen BCA-Assay bestimmt. Insgesamt konnten ca. 134 mg der Variante des Chaperons für anschließende Experimente aus 2 L Kultur gereinigt werden.

Es wurden insgesamt 254 mg LipH_r-NHis und 134 mg LipH_r-CHis für weiterführende Experimente gereinigt.

3.2 Klonierung, Expression, Reinigung, *in vitro* Rückfaltung und Charakterisierung der Lipase LipC

Neben der Triacylglycerollipase LipA besitzt *P. aeruginosa* als einziges bekanntes Gram-negatives Bakterium noch eine weitere annotierte Lipase des Typs I.1, welche jedoch als Besonderheit nicht in einem bicistronischen Operon mit einer Lipase-spezifischen Foldase vorliegt (Martinez *et al.*, 1999). Für diese Lipase LipC, die eine starke Ähnlichkeit zu LipA mit einer Identität von ~55 % aufweist, konnte durch genetische Experimente nachgewiesen werden, dass sie unter anderen physiologischen Bedingungen als LipA gebildet wird, während allerdings eine Beteiligung des Chaperons LipH, das zusammen mit LipA in einem bicistronischen Operon vorliegt, an der Faltung von LipC vermutet wurde (Martinez *et al.*, 1999). Bislang konnte jedoch kein direkter biochemischer Beweis geführt werden, dass LipH als erste Lipase-spezifische Foldase tatsächlich zwei Lipasen in seine katalytisch aktive Konformation überführt. Darüberhinaus wurde LipC aufgrund seiner geringen Expressivität in *P. aeruginosa* bislang nicht charakterisiert.

Für diese Fragestellungen wurde *lipC* analog wie unter 3.1.1 für *lipA* beschrieben ohne seine Signalsequenz für den Sec-Transport von pBBL7CH als Matrize mit den Primern „LipC-SS up“ und „Lip-SS dwn“ amplifiziert (2.10) und unter die Kontrolle des T7-Promotors in pET22b kloniert.

3.2.1 heterologe Expression und Reinigung von LipC

E. coli BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pLipC-SS, welches für LipC ohne seine Signalsequenz codiert, transformiert (2.8), um es in optimiertem M9-Minimalmedium zu überexprimieren (2.4.3) und zu reinigen (2.17). Der Nachweis der erfolgreichen Überexpression und Reinigung erfolgte mittels SDS-PAGE (Abb. 3.7). Wie zu erkennen war, konnte LipC in elektrophoretische Homogenität gewonnen werden (Abb. 3.7 B) und wurde mit Hilfe eines BCA-Assays quantifiziert. Aus 2 L Kultur konnten 89 mg als „inclusion bodies“ für die nachfolgenden Experimente gereinigt werden.

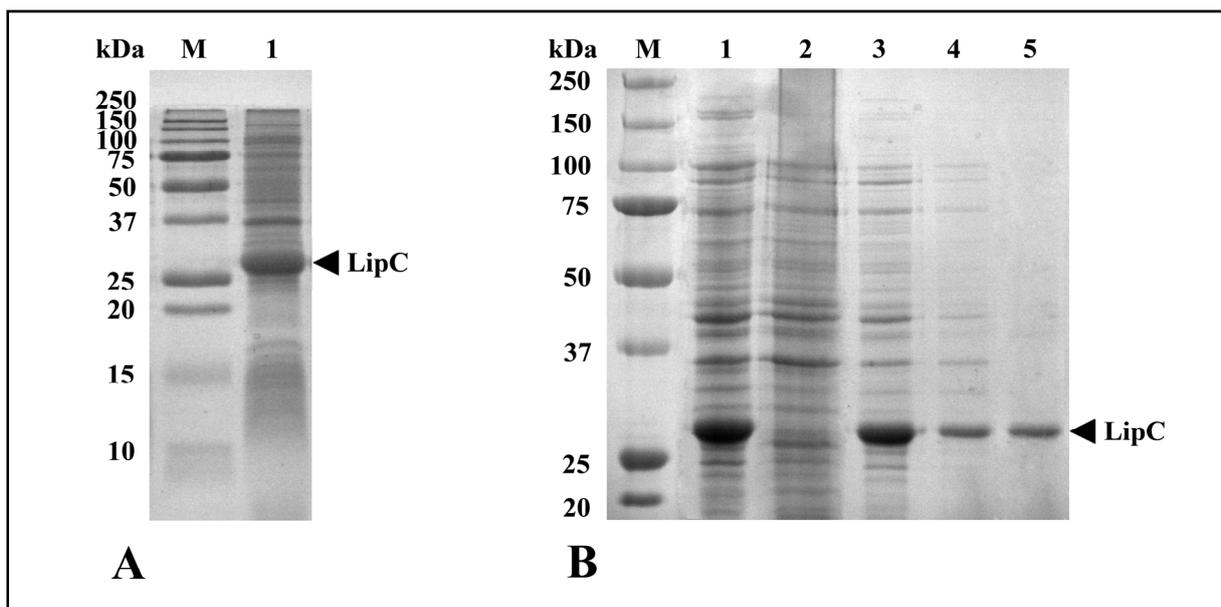


Abb. 3.7: (A) SDS-PAGE der Expression von LipC als „inclusion bodies“ in *E. coli* BL21(DE3)/pLipC-SS in optimiertem M9-Medium. M: Marker; 1: GZE nach Überexpression. (B) SDS-PAGE Analyse des Reinigungserfolgs der LipC „inclusion bodies“. M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt; 3: Pellet nach der ersten Zentrifugation; 4: Überstand nach dem zweiten Zentrifugationsschritt; 5: Pellet nach der zweiten Zentrifugation. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$). Die Trenngele (12 %ig) wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Es konnten 89 mg LipC „inclusion bodies“ in elektrophoretisch homogener Qualität für weiterführende Experimente gereinigt werden.

3.2.2 Die Rückfaltung von LipC ist von LipH, Glycerol und Ca²⁺ abhängig

Um aufzuklären, ob LipC durch LipH in seine aktive Konformation überführt werden kann, wurden *in vitro* Renaturierungsexperimente (2.18) durchgeführt. Durch die kürzlich gelöste 3D-Struktur des Proteinkomplex der Lipase und des Lif-Proteins aus *Burkholderia glumae* konnte direkt gezeigt werden, dass diese Proteine in einem 1:1 Verhältnis miteinander interagieren (Pauwels *et al.*, 2006). Weil auch für das Lipase-Lif System aus *P. aeruginosa* durch *crosslinking* Experimente ein 1:1 Komplex ermittelt werden konnte (Shibata *et al.*, 1998a; Shibata *et al.*, 1998b) wurden die Lipasen LipA und LipC mit äquimolaren Mengen LipH_r-NHis in Rückfaltungspuffer inkubiert. Es wurde bereits beschrieben, dass sich die Effizienz der *in vitro* Renaturierung der Lipasen aus *B. glumae* und *B. cepacia* unter Zusatz von Glycerol, möglicherweise durch Bildung von wasserfreien Mikroumgebungen, die hydrophobe Interaktionen stimulieren, erhöht (Rariy & Klivanov, 1997; Quyen *et al.*, 1999; El Khattabi *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurde der Rückfaltungspuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen Glycerol versetzt. Nach erfolgter *in vitro* Renaturierung wurde die Menge aktiver Lipase durch einen *p*NPP Test (2.24.1) bestimmt (Abb. 3.8). Wie bereits bekannt war, konnte LipA nur durch LipH in seine enzymatisch aktive Form überführt werden. Bei Rückfaltungen von LipA und LipC in Abwesenheit der Lipase-spezifischen Foldase konnte lediglich eine geringe Aktivität bei einer Glycerol-Konzentration von 45 % (v/v) nachgewiesen werden. Erst in Gegenwart von LipH konnten bei zunehmenden Konzentrationen Glycerol sowohl LipA als auch LipC renaturiert werden.

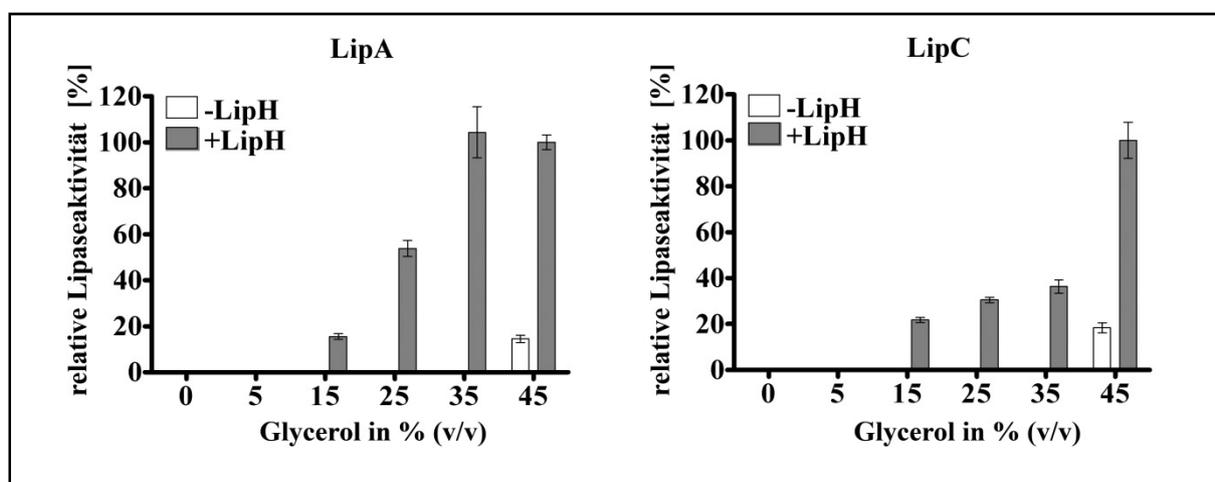


Abb. 3.8: Ausbeute der *in vitro* Aktivierung von LipA und LipC bei steigenden Konzentrationen Glycerol und in Ab- bzw. Anwesenheit der Lipase-spezifischen Foldase. Angegeben ist die relative lipolytische Aktivität der Proben nach Rückfaltung, wobei die Aktivität der Probe unter Zusatz von LipH und 45 % (v/v) Glycerol als 100 % gesetzt wurde, und sich bei LipA auf 34,1 nkat und bei LipC auf 36,9 nkat belief. Die gezeigten Aktivitäten wurden durch fünf voneinander unabhängig durchgeführte Experimente ermittelt. Die angezeigten Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

In korrekt gefaltetem und enzymatisch aktivem LipA trägt ein oktaedrisch koordiniertes Ca²⁺-Atom zur korrekten Ausbildung des aktiven Zentrums bei (Shibata *et al.*, 1998a; Liebeton *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). Um zu überprüfen, ob LipC ebenfalls ein für seine katalytisch aktive Konformation essentielles Ca²⁺-Ion als Heteroatom benötigt, wurden *in vitro* Rückfaltungsexperimente (2.18) mit LipA und LipC in Anwesenheit des Chelators EDTA

durchgeführt, und die Restaktivität mit einem *p*NPP Test (2.24.1) untersucht. Wie bereits für LipA aus *P. aeruginosa* TE3285 gezeigt werden konnte (Shibata *et al.*, 1998a), konnte in Renaturierungsexperimenten bei einer Konzentration von 10 mM EDTA keine lipolytische Aktivität mehr gemessen werden (ohne Abb.). Diese Beobachtung wies darauf hin, dass für die katalytische Aktivität von LipC ebenfalls ein bivalentes Kation essentiell ist.

Um zu klären, um welches Kation es sich bei dem für LipC essentiellen Heteroatom handelt, wurden weitere *in vitro* Rückfaltungsexperimente (2.18) durchgeführt. Nach einer Rückfaltung in Puffer ohne CaCl₂ konnte im Vergleich zu einer Positivkontrolle, die in Rückfaltungspuffer mit CaCl₂ inkubiert wurde, eine geringe lipolytische Aktivität gemessen werden, die auf eine gewisse Menge des Salzes zurückzuführen war (Abb. 3.9). Aus diesem Grund wurde der Puffer mit 10 mM EDTA und einem Überschuss an verschiedenen Salzen in einer Konzentration von 20 mM versetzt, die Lipasen darin renaturiert, und die lipolytische Aktivität mit einem *p*NPP Test (2.24.1) gemessen (Abb. 3.9). Während bei den unter Zusatz von CuSO₄ zurückgefalteten Lipasen keine Aktivität detektiert werden konnte, wurde bei den Ansätzen, die mit MgCl₂ und MnCl₂ versetzt wurden, Restaktivitäten von bis zu 39 % bezogen auf die Positivkontrolle gemessen. Nur durch den Zusatz von CaCl₂ konnte sowohl bei LipA als auch bei LipC die lipolytische Aktivität der Positivkontrolle wiederhergestellt werden. Dieser Befund deutet darauf hin, dass auch LipC wie LipA ein Ca²⁺-Atom koordiniert, welches essentiell für die katalytische Aktivität ist.

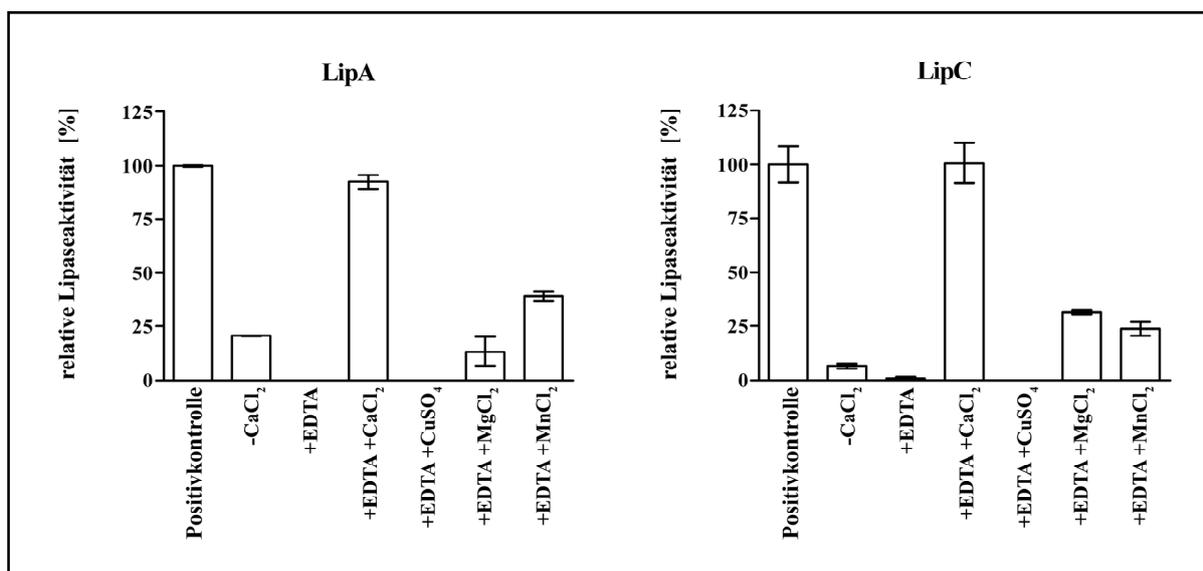


Abb. 3.9: Effizienz der *in vitro* Aktivierung von LipA und LipC unter Zusatz von EDTA und einem Überschuss verschiedener Salze. Angegeben ist die relative lipolytische Aktivität der Proben nach Rückfaltung, wobei die Aktivität der Probe bei Renaturierung mit Rückfaltungspuffer ohne weitere Zusätze als 100 % gesetzt wurde (LipA 19,8 nkat bzw. LipC 21,1 nkat). Die Aktivitäten wurden durch jeweils fünf voneinander unabhängig durchgeführte Experimente ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Die bisherigen Experimente bezüglich der *in vitro* Renaturierung von LipC wiesen durchweg ähnliche Befunde zu dem Verhalten von LipA auf und deuten auf eine hohe Ähnlichkeit der generellen biochemischen Eigenschaften hin. Um die Interaktion zwischen der Lipase-spezifischen Foldase und ihrer beiden Zielproteine weiter zu untersuchen, wurde der Einfluss verschiedener Detergenzien auf die *in vitro* Renaturierung untersucht. Die verwendeten Detergenzien stellen allesamt Beispiele verschiedener Klassen mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften dar. Sie wurden im Hinblick auf ihre kritische micellare Konzentration (CMC) in steigenden Konzentrationen in *in vitro* Rückfaltungen (2.18) eingesetzt und anschließend die relative lipolytische Aktivität, verglichen mit einer Kontrolle, die nicht mit Detergenz versetzt wurde, durch einen *p*NPP-Test (2.24.1) bestimmt (Abb. 3.10 bis 3.12).

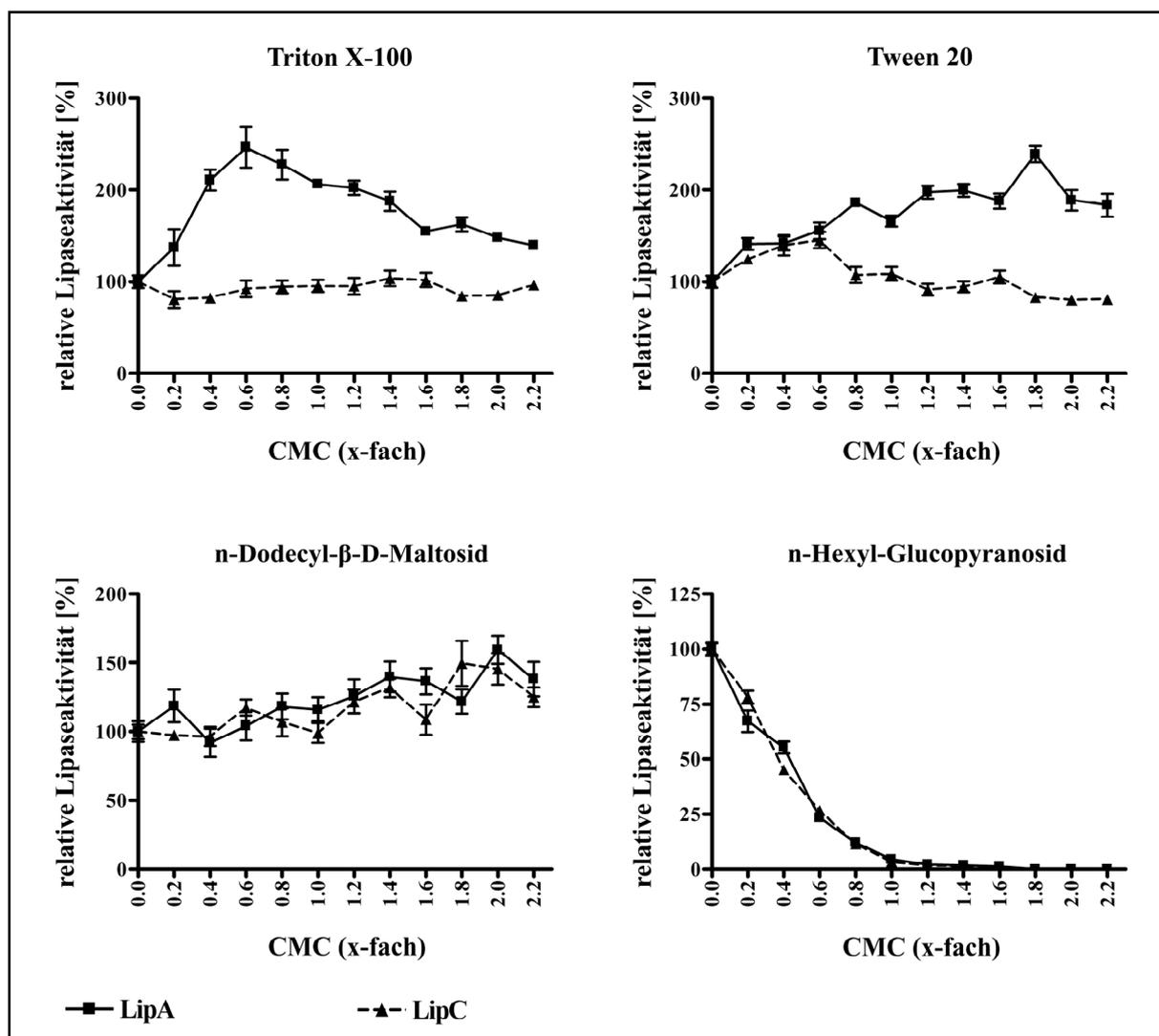


Abb. 3.10: Einfluss von nicht-ionischen Detergenzien auf die *in vitro* Rückfaltung von LipA und LipC mit LipH. Die Detergenzien wurden in die Rückfaltungen in steigenden Konzentrationen, bezogen auf ihre kritische micellare Konzentration (CMC), eingesetzt. Anschließend wurde die lipolytische Aktivität mit *p*NPP als Substrat bestimmt. Die gemessene Enzymaktivität wurde auf Proben, die ohne Zusatz eines Detergenz behandelt wurden, normiert (gemessene Aktivität bei LipA 4,5 nkat bzw. 5,1 nkat bei LipC). Die abgebildeten Aktivitäten repräsentieren Mittelwerte aus acht unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

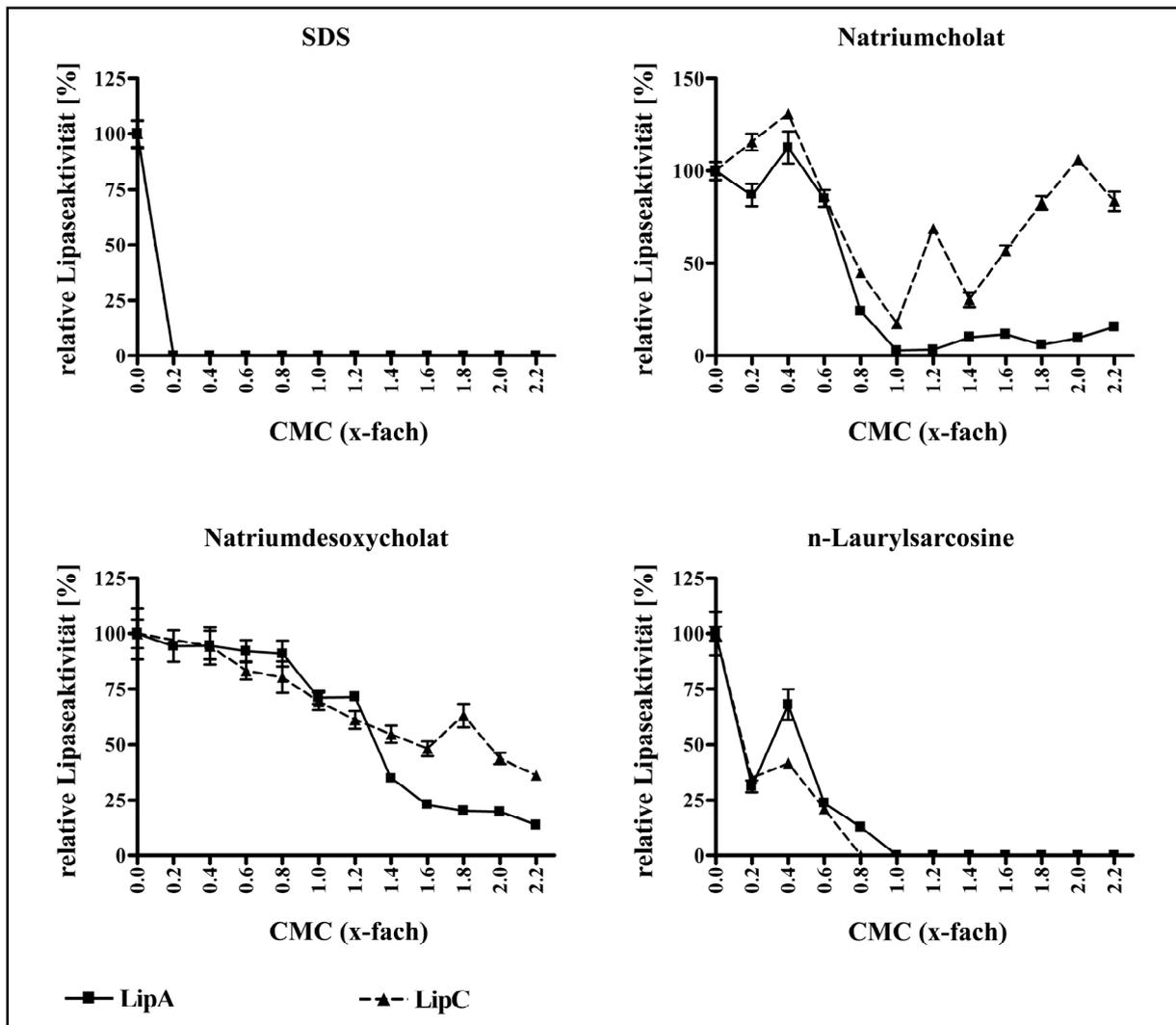


Abb. 3.11: Einfluss von ausgewählten anionischen Detergenzien auf die *in vitro* Aktivierung von LipA und LipC durch die Lipase-spezifische Foldase. Die Detergenzien wurden in unterschiedlichen Konzentrationen, relativ zu ihrer kritischen micellaren Konzentration (CMC), in das Experiment eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde unter Verwendung von *p*NPP als Substrat gemessen und auf Proben, die ohne Zusatz von Detergenz behandelt wurden, normiert (LipA 6,9 nkat bzw. LipC 6,3 nkat). Die gezeigte Aktivität stellt jeweils den Mittelwert aus acht unabhängig voneinander durchgeführten Messungen dar. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

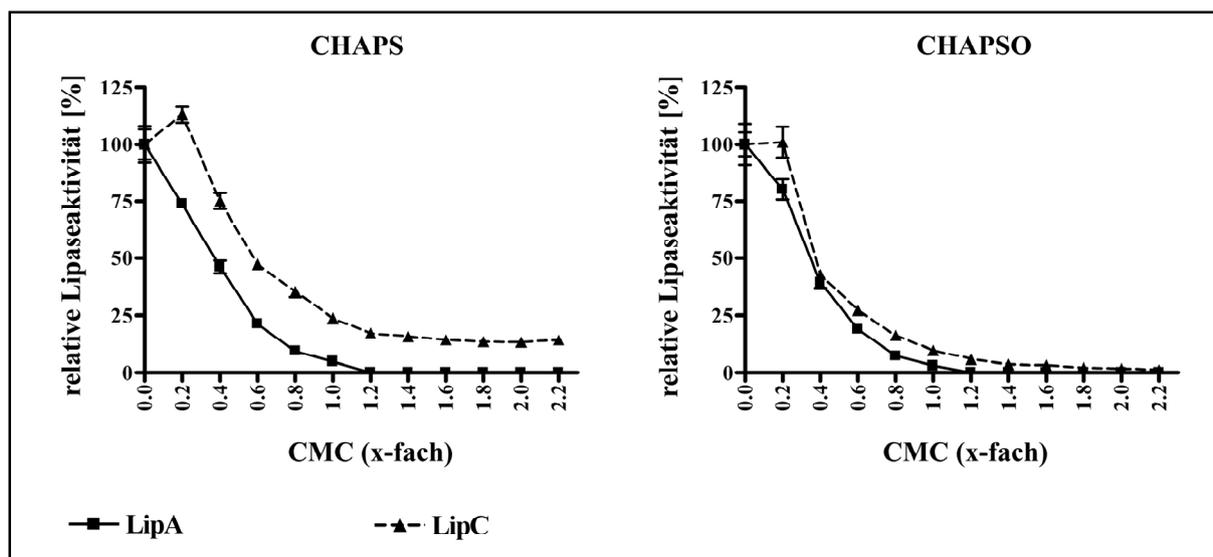


Abb. 3.12: Einfluss von zwitterionischen Detergenzien auf die *in vitro* Renaturierung der Lipasen durch die Lipase-spezifische Foldase. Die Detergenzien wurden in Konzentrationen relativ zu ihrer kritischen micellaren Konzentration (CMC) eingesetzt. Die Aktivität wurde mit *p*NPP als Substrat bestimmt. Die Enzymaktivität wurde anschließend auf Proben, die ohne Zusatz von Detergenz renaturiert wurden, normiert. 100 % entspricht einer Aktivität von 11 nkat (LipA) bzw. 10,5 nkat (LipC). Die gezeigten Aktivitäten stellen Mittelwerte aus acht unabhängig voneinander durchgeführten Messungen dar, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt ist.

Der Einfluss der verschiedenen Detergenzien auf die Rückfaltungseffizienz der Lipasen unterschied sich selbst innerhalb gleicher Klassen stark voneinander. Darüberhinaus verhielten sich LipA und LipC in Folge des Zusatzes der Detergenzien in einigen Fällen sehr ähnlich, während bei anderen Detergenzien sehr unterschiedliche Renaturierungseffizienzen gemessen werden konnten. Während die Ausbeute der *in vitro* Aktivierung bei LipA durch Zusatz von Triton[®] X-100 verglichen mit der unbehandelten Probe auf eine relative Aktivität von 250 % gesteigert konnte, konnte kein Effekt bei der Rückfaltung von LipC beobachtet werden (Abb. 3.10). Die *in vitro* Rückfaltung von LipC wurde durch n-Dodecyl- β -D-Maltosid mit einer relativen Aktivität von 150 % am stärksten positiv beeinflusst (Abb. 3.10). Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Abb. 3.13.

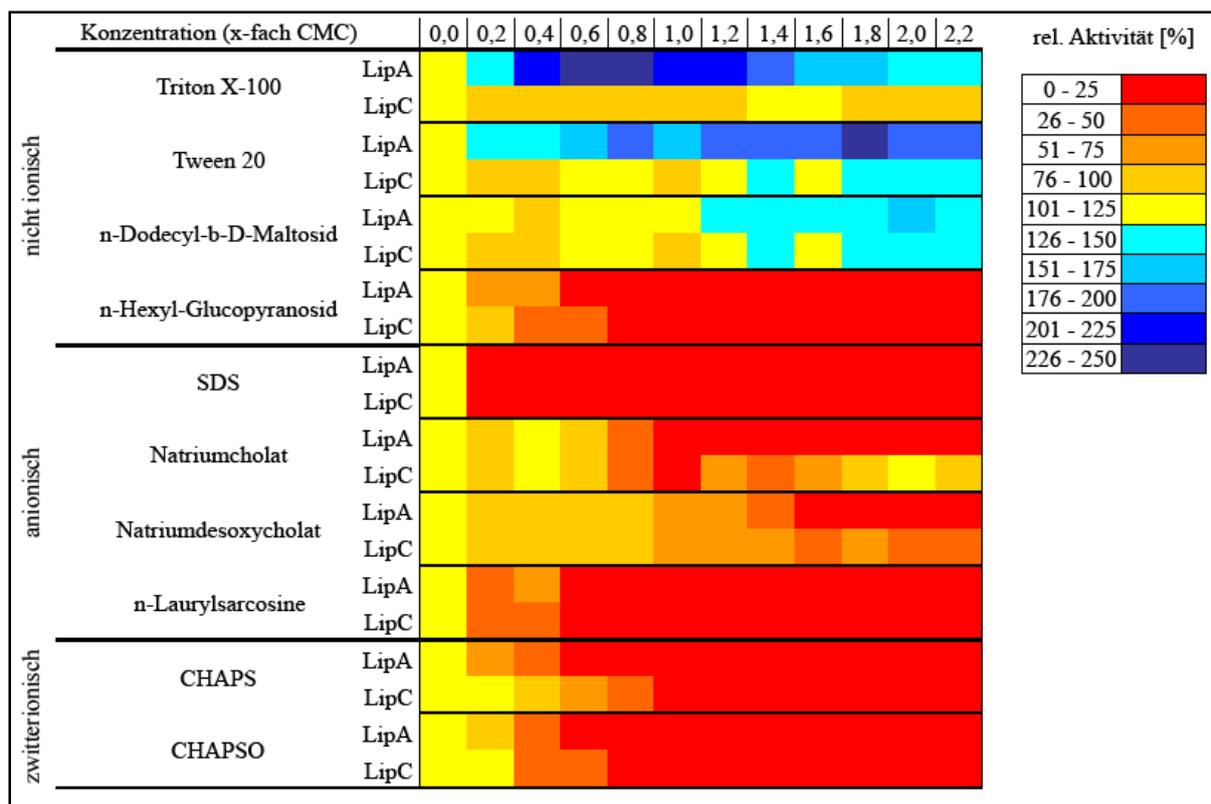


Abb. 3.13: Auswirkungen verschiedener Detergenzien auf die *in vitro* Aktivierung von LipA und LipC. Die Detergenzien wurden in steigenden Konzentrationen in Hinblick auf ihre kritische micellare Konzentration (CMC) zugesetzt. Nach erfolgter Renaturierung wurde die relative lipolytische Aktivität der Proben in Bezug auf eine Kontrolle, die ohne Detergenz inkubiert wurde, bestimmt.

Um zu unterscheiden, ob die beobachteten Auswirkungen der Detergenzien auf direkte Interaktionen mit dem schon fertig gefalteten Protein zurückzuführen sind, oder ob die Detergenzien Einfluss auf die Faltung nehmen, wurde ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt. Rückfaltungsansätze (2.18), die ohne Zusatz von Detergenz inkubiert worden waren, wurden nachträglich mit denjenigen Konzentrationen eines Detergenz inkubiert, die den stärksten Effekt auf die lipolytische Aktivität in dem vorangegangenen Experiment zeigten. Anschließend wurde die relative lipolytische Aktivität bezogen auf eine Kontrolle bestimmt, der kein Detergenz zugesetzt wurde. Im Fall von LipA konnten nur Effekte durch Inkubation mit CHAPS (1x CMC) und SDS (0,8x CMC) beobachtet werden. In diesen Ansätzen konnte keine Enzymaktivität nach Inkubation mit dem Detergenz nachgewiesen werden (ohne Abb.). Bei LipC hingegen führte die nachträgliche Inkubation mit Triton[®] X-100 (1,6x CMC) und Tween[®] 20 (1,8x CMC) zu einer geringen relativen lipolytischen Restaktivität von 3 % bzw. 17 %, wohingegen ein positiver Einfluss dieser Detergenzien beobachtet werden konnte, als sie direkt in der Renaturierung zugesetzt wurden. In allen anderen Fällen konnte keine Veränderung der relativen Aktivität festgestellt werden (ohne Abb.).

Es konnte auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass LipC von LipH aktiviert wird. Damit ist LipH die erste beschriebene bi-spezifische Lipase-spezifische Foldase.

LipC weist bezüglich seiner Eigenschaften während *in vitro* Renaturierungen starke Ähnlichkeiten zu LipA auf. Die Renaturierung ist ebenfalls Glycerol- und Ca^{2+} -abhängig. Lediglich unter Zusatz einiger Detergenzien verhalten sich LipA und LipC in Rückfaltungsexperimenten unterschiedlich.

3.2.3 LipC weist ein breiteres Substratspektrum als LipA auf

Die Lipase LipC aus *P. aeruginosa* konnte erstmals in ausreichenden Mengen gereinigt und *in vitro* aktiviert werden, um eine vergleichende Analyse des Substratspektrums mit *p*NP-Estern unterschiedlicher Kettenlänge durchzuführen (2.24.1). Hierzu wurden gereinigtes LipA und LipC mit der Lipase-spezifischen Foldase LipH renaturiert (2.18) und die relative lipolytische Aktivität gegen die Substrate bestimmt, wobei der höchsten gemessenen Aktivität ein Wert von 100 % zugeordnet wurde (Abb. 3.14). LipA zeigte eine Präferenz für langkettige Substrate mit einer Kettenlänge der Fettsäure von C₁₂ bis C₁₆ und einer maximalen Aktivität für den *p*NP-Palmitatester. LipC hingegen zeigte eine breite Akzeptanz aller verwendeten Substrate und keine Präferenz gegenüber einem der Substrate.

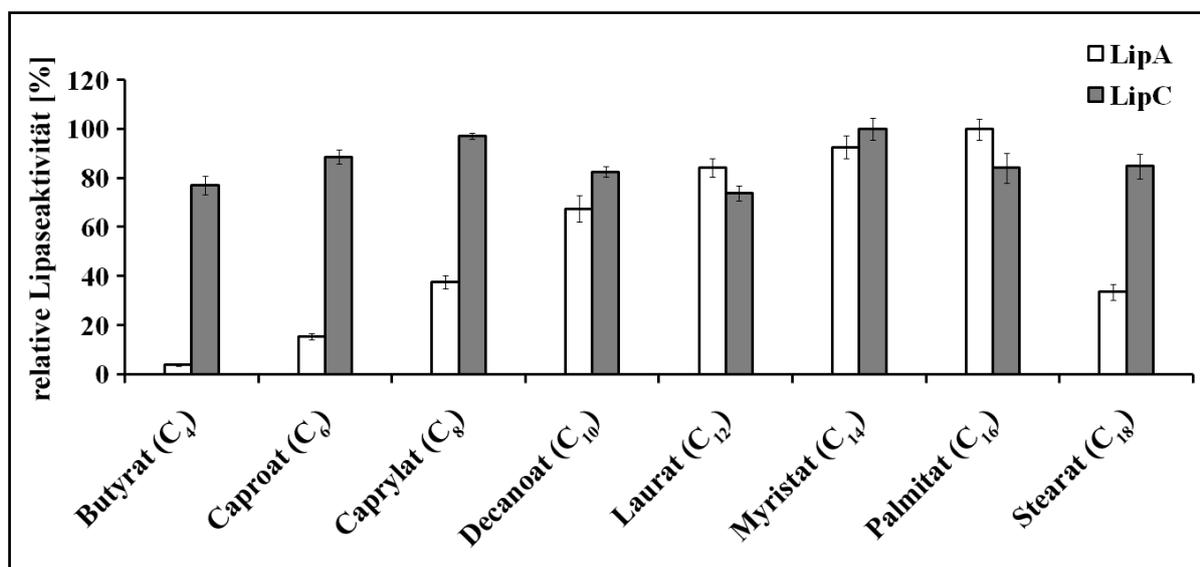


Abb. 3.14: Aktivität von *in vitro* aktiviertem LipA und LipC gegen *p*-Nitrophenolester mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge. Die gemessene lipolytische Aktivität, die in drei unabhängigen Experimenten bestimmt wurde, ist jeweils relativ angegeben. Die höchste lipolytische Aktivität wurde auf jeweils 100 % normiert (für LipA gegen *p*NP-Palmitat (25,2 nkat) bzw. für LipC gegen *p*NP-Myristat (28,9 nkat)). Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Nachfolgend wurde die Michaelis-Konstante K_m beider Lipasen für das Substrat *p*NPP mit der Fettsäurekettenlänge C_{16} bestimmt, welche die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat widerspiegelt. Die Aktivität der Lipasen wurde bei variierenden Substratkonzentrationen bestimmt (2.24.1) und K_m mit Hilfe der nichtlinearen Regression in Prism 4 (GraphPad Software) berechnet (Abb. 3.15). Für LipA konnte eine Michaelis-Konstante von 1,066 mM mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9797$ ermittelt werden, während LipC eine höhere Affinität gegenüber diesem Substrat mit einem K_m -Wert von 0,624 mM ($R^2 = 0,9586$) aufwies.

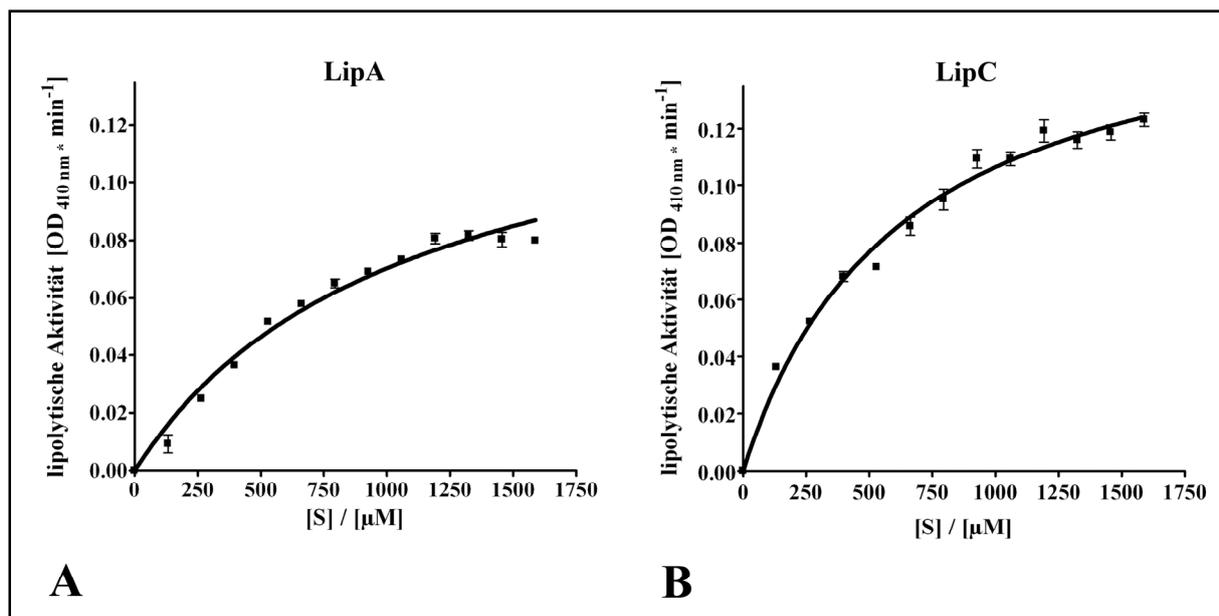


Abb. 3.15: Abhängigkeit der Substratkonzentration von *p*NPP auf die lipolytische Aktivität von LipA (A) und LipC (B) zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten. Die acht unabhängig voneinander ermittelten Datensätze wurden verwendet, um die Michaelis-Konstanten in Prism 4 durch nichtlineare Regression zu ermitteln. Die Standardabweichung innerhalb der gemessenen Aktivität ist als Fehlerbalken dargestellt.

**LipC weist keine Präferenz gegenüber *p*NP-Ester unterschiedlicher Kettenlänge auf, während LipA vorzugsweise Substrate mit Fettsäureketten von C_{12} bis C_{16} hydrolysiert.
LipC zeigt eine höhere Affinität gegenüber *p*NPP als LipA ($K_m = 0,624$ mM bzw. 1,066 mM).**

3.2.4 Der Tunnel zum aktiven Zentrum von LipC weist ein größeres Volumen auf als derjenige von LipA

LipA und LipC sind auf Primärstrukturebene mit etwa 55 % identischen und 69 % ähnlichen Resten stark homolog. Demzufolge konnte eine mögliche 3D-Struktur von LipC durch Homologiemodellierung mit der aufgeklärten Röntgenstruktur von LipA als Vorlage generiert werden, um mögliche Gründe für die breitere Substratakzeptanz von LipC zu finden (Abb. 3.16). Die freie Energie des kalkulierten Strukturmodells von LipC wurde mit der GROMOS-Kraftfeldmethode (Scott *et al.*, 1999) minimiert und das Modell mit Hilfe des “WHAT IF“-Algorithmus (Vriend, 1990) auf mögliche Fehler überprüft.

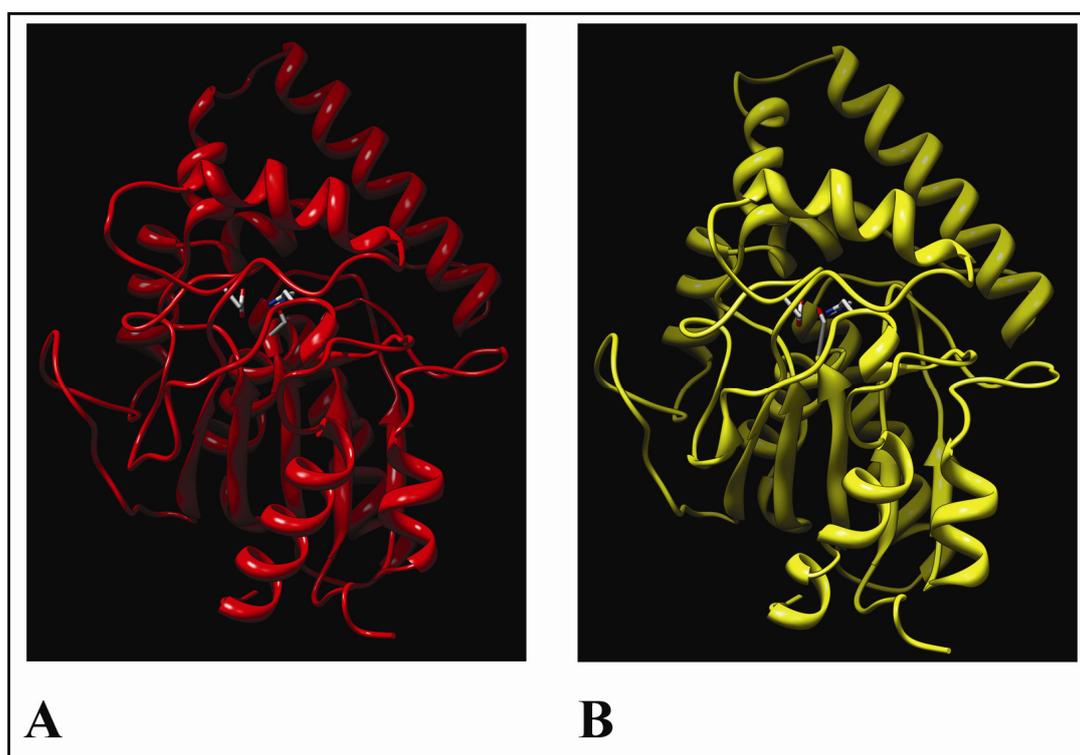


Abb. 3.16: (A) 3D-Struktur von LipA (PDB Code 1ex9, Nardini *et al.*, 2000). (B) Generiertes Modell der Struktur von LipC durch SWISS-MODEL (Peitsch, 1996). Beide Strukturen wurden in UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) in der *ribbon* Darstellung visualisiert, während die Reste der katalytischen Triaden (Ser⁸², Asp²²⁹, His²⁵¹) als *sticks* hervorgehoben wurden.

Um die geometrischen Eigenschaften der Bindetaschen von LipA und LipC zu vergleichen, wurden die LipA Struktur und das optimierte Strukturmodell nachfolgend mit dem Programm CAVER (Damborsky *et al.*, 2007) untersucht (Abb. 3.17). Die Analyse zeigte, dass der Tunnel, der zum katalytisch aktiven Zentrum von LipC führt, im Vergleich zu demjenigen von LipA ein etwa 1,5-fach größeres Volumen aufweist (997 Å³ im Fall von LipC bzw. 666 Å³ für LipA), jedoch in etwa gleich lang ist (25,2 Å bei LipC bzw. 25,8 Å bei LipA).

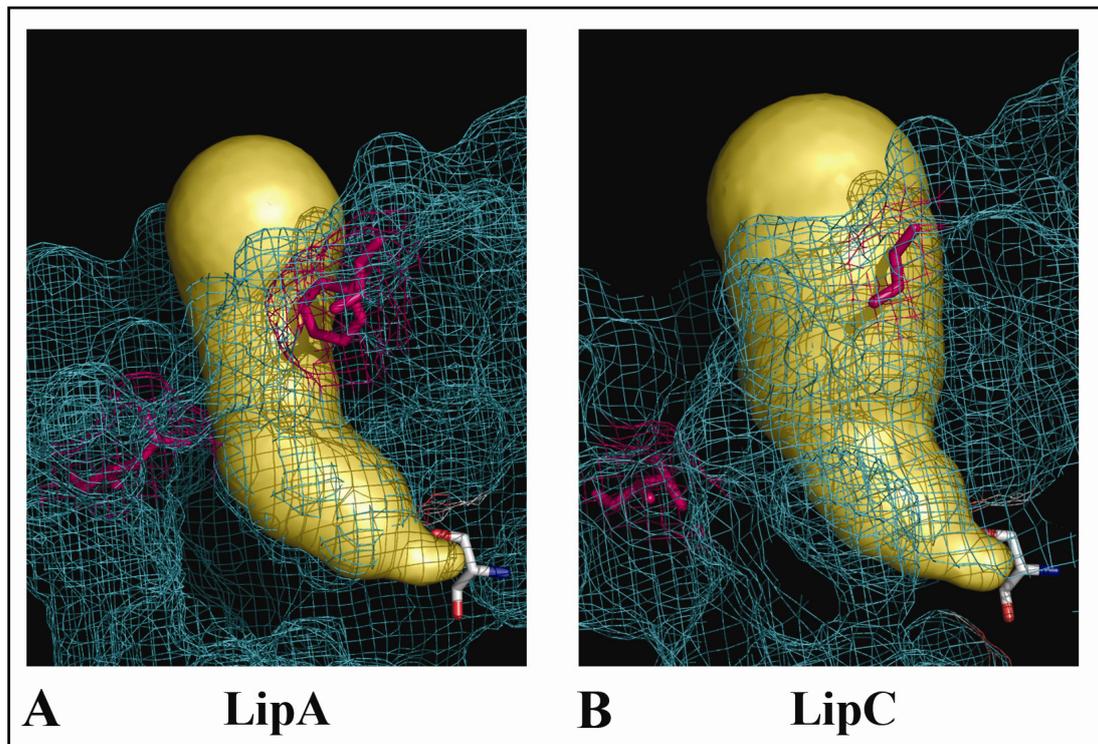


Abb. 3.17: Vergleich der zum aktiven Zentrum führenden Tunnel von LipA (A) mit LipC (B) mit dem CAVER Programm (Damborsky *et al.*, 2007). Die Abbildungen wurden mit PyMol (DeLano Scientific, Palo Alto, USA) erstellt und veranschaulichen die Geometrie der Tunnel (gelb), die zu den katalytisch aktiven Zentren führen. Die relevanten Oberflächen des Proteins sind in der Gitterdarstellung visualisiert, wobei die sich deutlich in den Strukturen unterscheidenden Reste Leu¹¹⁸ und Phe²¹⁷ des LipA bzw. Val¹¹⁸ und Gly²¹⁶ von LipC in Magenta als *sticks* dargestellt sind. Das katalytisch aktive Ser⁸² ist ebenfalls in der *stick* Darstellung hervorgehoben.

Strukturelle Gründe für diese Unterschiede liegen zum Teil in den Aminosäuren, die den Tunnel bei beiden Lipasen ausbilden. Während bei LipA die Reste Leu¹¹⁸ und Phe²¹⁷ an der Ausbildung der Bindetasche beteiligt sind, sind diese Reste durch Val¹¹⁸ und Gly²¹⁶ in dem LipC Strukturmodell substituiert (Abb. 3.17).

Trotz der hohen Homologie von LipA und LipC unterscheidet sich die Geometrie der Kavität beider Enzyme, die zum aktiven Zentrum führt. Sie weist aufgrund von Unterschieden einiger Reste, die die Bindetasche bilden, ein 1,5fach größeres Volumen als diejenige von LipA (997 Å³ bzw. 666 Å³) auf.

3.3 Identifizierung essentieller Reste für die Typ II-Sekretion anhand der Unterschiede der Tertiärstrukturen von LipA und LipC

In der Erkennung von Proteinen, deren Translokation in das Kulturmedium über den Typ II-Sekretionsapparat vorgenommen wird, scheint das in der äußeren Membran lokalisierte Porin XcpQ des „klassischen“ Xcp-Apparates eine essentielle Funktion einzunehmen. Für *Erwinia* Spezies konnte gezeigt werden, dass das XcpQ homologe Protein der untersuchten Stämme die Spezifität der Sekretion vermittelt (Lindeberg *et al.*, 1996). Die Lipase LipC wurde im Rahmen einer Arbeit identifiziert, in der durch Konjugation einer Cosmid-Bank in eine *P. aeruginosa xcpQ* Deletionsmutante alternative Faktoren gesucht wurden, die den in diesem Stamm beobachteten Sekretionsdefekt von LipA komplementieren konnten (Martinez *et al.*, 1999). Durch Expression von LipC in *P. aeruginosa ΔxcpQ* war der Stamm wieder in der Lage, auf Lipid-Agar Selektionsmedium zu wachsen. Daraus folgt, dass LipC möglicherweise nicht über den „klassischen“ Xcp-Sekretionsapparat, der von dem Gencluster bestehend aus *xcpP* bis *xcpZ* gebildet wird, sekretiert wird.

3.3.1 LipC wird nicht über den „klassischen“ Xcp-Apparat sekretiert

Um die Abhängigkeit der Sekretion von LipC von dem Porin XcpQ zu untersuchen, wurden die Plasmide pBBL7 und pBBL7CH, die das Wildtyp *lipAH*- bzw. ein konstruiertes *lipCH* Operon unter Kontrolle des in *P. aeruginosa* konstitutiv exprimierten *lac*-Promotors trugen, in verschiedene *P. aeruginosa* Stämme konjugiert (2.9). Danach wurden jeweils Einzelkolonien auf Tributyrinplatten transferiert und die Bildung von klaren Höfen um die Kolonie durch lipolytische Aktivität beobachtet (Abb. 3.18 A). Bei den Stämmen, die den entsprechenden Leervektor pBBR1MCS trugen, konnte nur eine leichte Hofbildung im Fall des Wildtyps PAO1 beobachtet werden, während sowohl die *lipAH* Deletionsmutante PABS1 als auch die Mutante, in der *xcpQ* fehlt, keine lipolytische Aktivität zeigten. Bei Expression des *lipAH* Operons konnte wie erwartet im Fall des Wildtyps und des Stamms PABS1 eine deutliche Hofbildung beobachtet werden, während die *xcpQ* Mutante keine Lipaseaktivität aufwies. Bei Expression des *lipCH* Operons konnte in allen Stämmen, auch in demjenigen in der das Porin XcpQ nicht mehr gebildet wird, eine vergleichbar starke, wenn auch geringere lipolytische Aktivität als bei Expression des *lipAH* Operons, nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Hofbildung auf intrazellulär akkumuliertes oder sekretiertes Enzym zurückzuführen war, wurden Flüssigkulturen der mit den unterschiedlichen Plasmiden ausgestatteten Stämmen angelegt (2.4.3). Die Kulturen wurden 2 h nach Erreichen einer $O.D._{580\text{ nm}}$ von 1 geerntet, damit sich die Zellen in der stationären Phase befanden und somit die Formation eines funktionellen Sekretionsapparates sichergestellt war. Daraufhin wurde die lipolytische Aktivität des Kulturüberstands und des präparierten Gesamtzellextraktes mit einem *pNPP* Test (2.24.1) bestimmt (Abb. 3.18 B). Wie sich zeigte, konnte ausnahmslos in allen Stämmen, bei denen eine Hofbildung auf den Tributyrinplatten beobachtet werden konnte, der größte Anteil lipolytischer Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

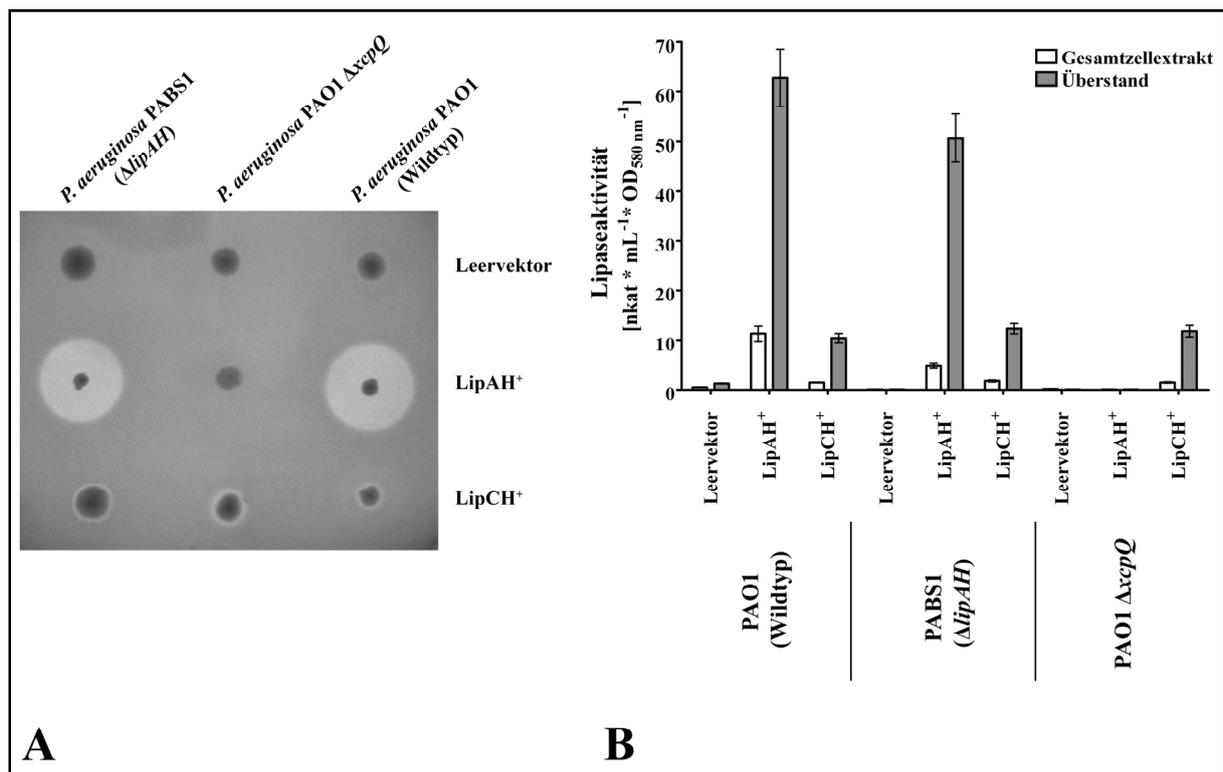


Abb. 3.18: Bestimmung der lipolytischen Aktivität bei Expression des *lipAH*- bzw. *lipCH* Operons in verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen durch Tributyrinplatten (A) und Messung der Enzymaktivität der Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte nach Anzucht in Flüssigmedium mit *pNPP* als Substrat (B). Die Hofbildung der Kulturen wurde durch Inkubation von jeweils drei unabhängig voneinander angezogenen Kulturen auf Indikatorplatten bestätigt. Die in (B) gezeigte lipolytische Aktivität gegen *pNPP* stellt den Mittelwert aus vier getrennt vorgenommenen Messungen dar, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken angezeigt ist.

Um die von XcpQ unabhängige Sekretion von LipC noch auf andere Art und Weise zeigen zu können, wurde der vollständige „klassische“ Xcp-Sekretionsapparat aus *P. aeruginosa* in dem verwandten Stamm *P. putida* rekonstituiert. Zwar codiert auch dieser Stamm für einen Sekretionsapparat für den Typ II-Sekretionsweg, jedoch verhindert die hohe Spezifität der Transportmaschinerie eine Translokation sekretierter Proteine anderer Organismen (Braun *et al.*, 2000; de Groot *et al.*, 2001), so dass eine Beeinflussung durch den chromosomal codierten Sekretionsapparat ausgeschlossen werden konnte. Das Cosmid pAX24, welches das vollständige Gencluster für den „normalen“ Xcp-Apparat trägt, und die Plasmide für die

Expression des *lipAH*- bzw. des *lipCH* Operons wurden in *P. putida* konjugiert (2.9), entstandene Einzelkolonien auf Tributyrinplatten überführt, und die Bildung von Höfen beobachtet (Abb. 3.19 A). Die korrekte Formation eines funktionellen Xcp-Apparates konnte durch die Hofbildung bei Expression des Xcp-Genclusters *in trans* zum *lipAH* Operon gezeigt werden. Im Fall von LipC konnte sowohl bei Ab- als auch bei Anwesenheit des Xcp-Apparates aus *P. aeruginosa* keine lipolytische Aktivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden durch Anzucht der Stämme in Flüssigmedium und einen anschließenden Aktivitätstest der Kulturüberstände und präparierten Gesamtzellextrakte bestätigt (Abb. 3.19 B). Lediglich die Lipase LipA wurde durch Koexpression der Gene für den Xcp-Apparat in das Medium sekretiert, während bei allen anderen Stämmen weder im Gesamtzellextrakt noch im Kulturüberstand lipolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte.

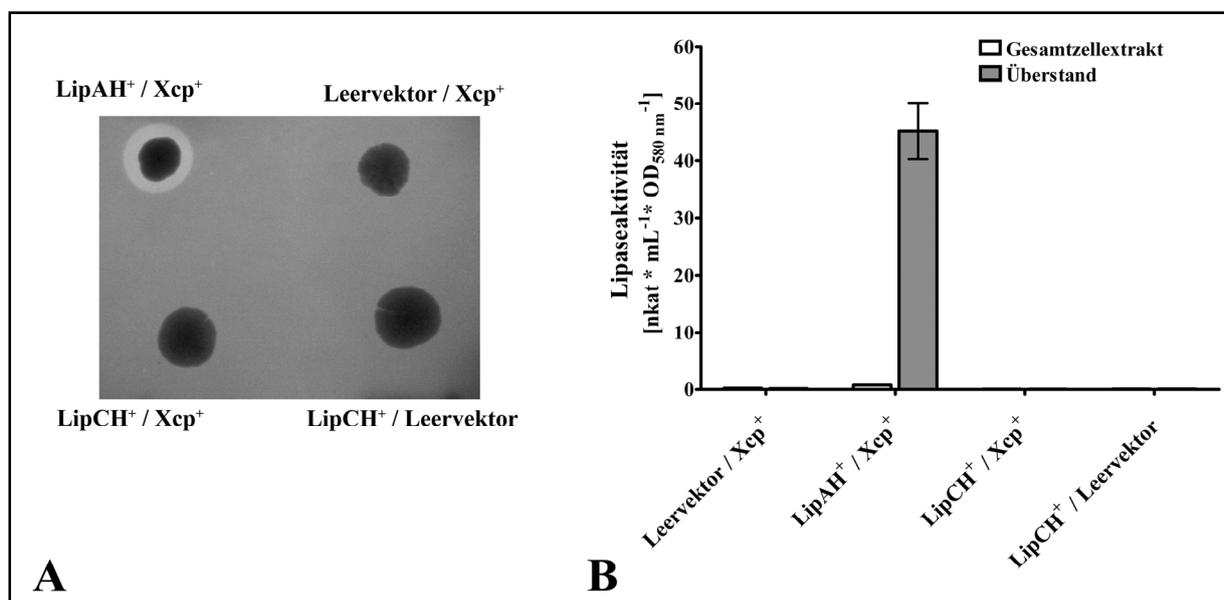


Abb. 3.19: Bestimmung der lipolytischen Aktivität bei Koexpression des *lipAH*- bzw. *lipCH* Operons und des *xcp*-Genclusters in *P. putida* durch Tributyrinplatten (A) und Messung der Enzymaktivität der Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte nach Anzucht in Flüssigmedium mit *pNPP* als Substrat (B). Als entsprechender Leervektor für das Cosmid pAX24 wurde pLAFR3 verwendet. Die in (A) gezeigte Hofbildung der Kulturen wurde durch vier unabhängig voneinander angezogenen Kulturen auf Indikatorplatten verifiziert. Die lipolytische Aktivität gegen *pNPP* stellt ebenfalls den Mittelwert aus vier getrennten Messungen dar, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken angezeigt ist.

Die Translokation von LipC in den Kulturüberstand während der Typ II-Sekretion wird im Gegensatz zu LipA nicht über den „klassischen“ Xcp-Apparat vermittelt.

3.3.2 Identifizierung von Resten in LipA, die potentiell die Typ-II abhängige Sekretion beeinflussen

In vorangegangenen Studien des Exotoxins A aus *P. aeruginosa*, welches ebenfalls über den Xcp-Apparat transportiert wird, konnten für die Sekretion dieses Proteins essentielle Sequenzbereiche identifiziert werden (McVay & Hamood, 1995; Lu & Lory, 1996; Voulhoux *et al.*, 2000). Da in diesen Bereichen jedoch keine Sequenzhomologien ermittelt werden konnten und aufgrund der Tatsache, dass native Proteine erkannt werden, wird ein in der Tertiärstruktur vorhandenes Signal diskutiert (Koster *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001). Jedoch ist es bislang nicht gelungen, ein gemeinsames Strukturmotiv für die über den Typ-II Transportweg sekretierten Proteine zu identifizieren. Da gezeigt werden konnte, dass LipA, nicht jedoch LipC über den „klassischen“ Xcp-Apparat sekretiert werden, wurde eine vergleichende Analyse anhand der Primär- und Tertiärstrukturen beider Proteine vorgenommen, um etwaige Unterschiede zu lokalisieren und einen Zusammenhang mit der Erkennung des Proteins durch die Sekretionsmaschinerie herzustellen. Wie bereits erwähnt weisen LipA und LipC eine hohe Sequenzhomologie auf Aminosäure-Ebene auf (55 % Identität / 69 % Ähnlichkeit), die es erlaubt, ein Alignment beider Proteine mit guter Übereinstimmung vorzunehmen (Abb. 3.20).

LipA	MKKKSLPLPLGLAIGLASLAAS - PLIQASTYTQTQKYPIVLAHGMLGFDNILGVDY
LipC	MNKNKTF - - - LAAALVALAASFPVHAATDYTRTRYPIVLSHGLFGFKSVGPVDY
Cons	*:*:. : ** .:.*:***** *: *: **:*:*****:*****:***. : **
LipA	WFGIPALRRDGAQVYVTEVSQLDTSEVRGEQLLQQVEEIVALSGQPKVNLIGH
LipC	WHAIVPALEKDGAKVFATSQS PVNSNEVRGEQLLAQVEEVLALTGAEKVNLIGH
Cons	*..* .**.:***:*.:. * :.:.***** *****:***: *****
LipA	SHGGPTIRYVAAVRPDLIASATSVGAPHKGS DTADFLRQIPP - - GSAGEAVLSG
LipC	SQGGMTVRYVAGVAPQLVASVTMTGTPHKGTPVADAVTGFSEFLGPIGTEVIAS
Cons	*:* *:*:***. * *:***:*. :.:*****: .** : :. * . * *:.:
LipA	LVNSLGLALISFLSSGSTGTQNSLGSLES LNSEGAARFN AKYPQGIPTSACGEGA
LipC	AVEALFSVVDIVDGGWVKGDALALNSLNTPGTARFNQRFPQAI PASACGQGA
Cons	*:.* :.:.:.:.*. . :.:***:***: ***** :***.***:*****:*
LipA	YKVNVSYSYWSGSSPLTNFLDPSDAFLGASSLTFKNGTANDGLVGTCS SHLGM
LipC	ETVAGVRYYSMSGTGS LTNALDPS SAGLAVTGLLF - - GEANDGLVGQCSSH LGS
Cons	. * * * * * :.:.*****. * .:.* * * * * * * * * * * *
LipA	VIRDNYRMNHLDEVNQVFLTSLFETSPVSVYRQHANRLKNASL
LipC	VVKDNYRMDHLDEVNQLLGLVSLFESDPTQVYRQHANRLRNVL
Cons	*:.*:*****:*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*

Abb. 3.20: Alignment der Primärstruktur von LipA und LipC durch den T-COFFEE Algorithmus (Notredame *et al.*, 2000). Dargestellt sind die Sequenzen von LipA und LipC sowie die ermittelte Identität („*“) sowie Ähnlichkeit („.“ bzw. „.“) an der entsprechenden Position. Deutliche Unterschiede in den Primärstrukturen wurden rot hinterlegt.

Weiterhin wurde auf das bereits schon generierte und optimierte Strukturmodell von LipC zurückgegriffen, um eventuell von der 3D-Struktur von LipA abweichende, vorzugsweise an der Proteinoberfläche gelegene Strukturmerkmale, zu identifizieren. Mit dem Strukturmodell

wurde zusammen mit der Röntgenstruktur von LipA ein strukturelles Alignment mit Hilfe des in UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) implementierten Algorithmus durchgeführt. Das Ergebnis der Superposition ist in Abb. 3.21 dargestellt.

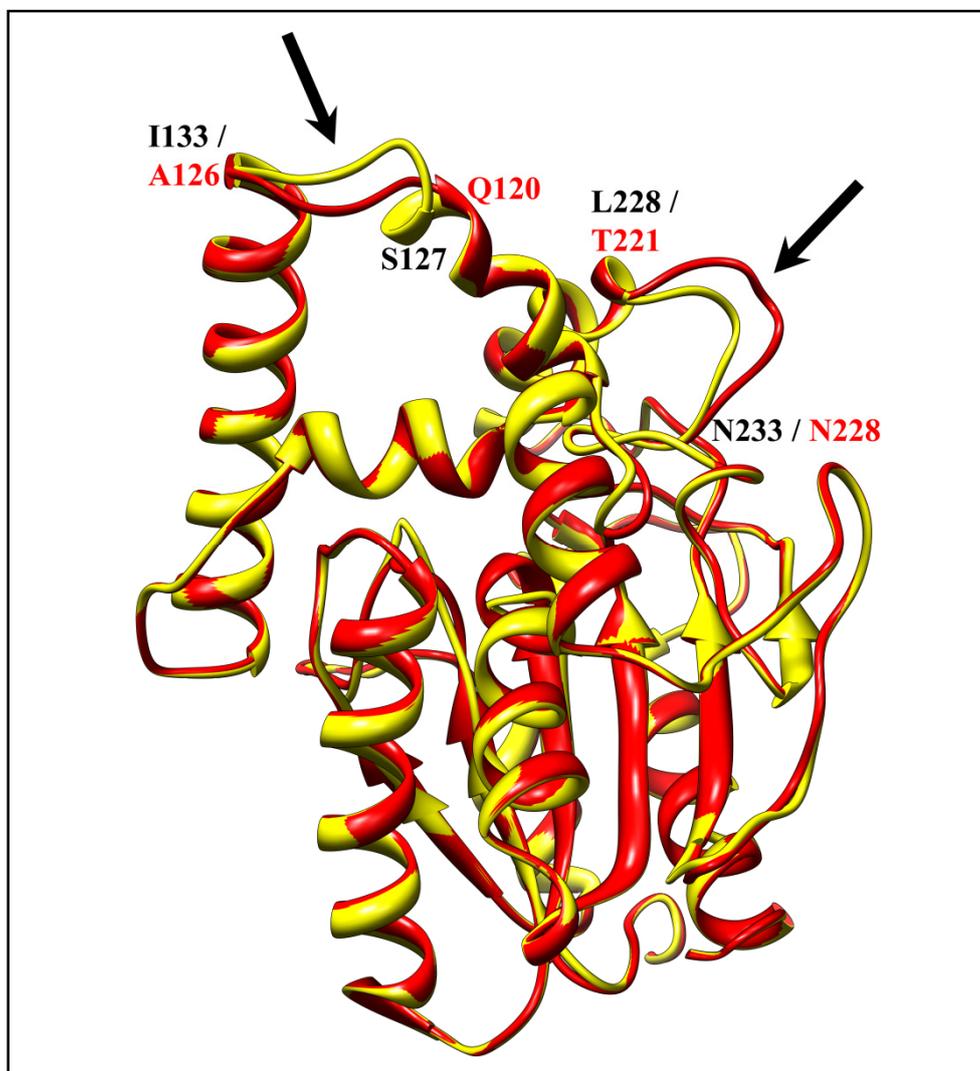


Abb. 3.21: Strukturelles Alignment der Röntgenstruktur von LipA (PDB Nummer 1ex9, rot) mit dem LipC Strukturmodell (gelb). Start- und Endpunkte deutlich voneinander abweichender Teilbereiche sind jeweils durch die Angabe ihrer Aminosäureposition (rot im Fall von LipA bzw. schwarz für LipC) definiert. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Wie anhand des Alignments der Primär- als auch der Tertiärstruktur ersichtlich ist, konnten zwei auf den Proteinoberflächen gelegene, voneinander getrennte Bereiche, identifiziert werden, die auf beiden Strukturebenen Heterogenität aufweisen, während die restlichen Elemente beider Proteine gute Deckung fanden. Der Bereich von T221 bis N228 ist in LipA deutlicher exponiert als in LipC, wohingegen der *coil*-Bereich S127 bis I133 in LipC, der ein Verbindungsstück mit der Helix, die den Deckel formt, ausbildet, stärker nach außen gerichtet ist (Abb. 3.21). Diese beiden Bereiche sind im Alignment der Primärstrukturen durch die Reste, zu denen keine passenden homologen Reste gefunden wurden (FL im Fall von LipC bzw. KN im Fall von LipA), definiert (Abb. 3.20).

Neben derjenigen von LipA existieren von zwei weitere in der PDB Datenbank hinterlegten Strukturen Typ-II sekretierter Proteine von *P. aeruginosa*; die des Exotoxin A (PDB Code 1ikQ, (Wedekind *et al.*, 2001)) und die der Elastase B (PDB Code 1u4g, (McKay *et al.*, 1992)). Unter der Annahme, dass diese beiden Proteine eine Ähnlichkeit in einem oder beiden der identifizierten Proteinbereiche, die sich deutlich in den Strukturen des LipA und LipC voneinander unterschieden, aufwiesen, wurde zunächst versucht, eine Sequenzhomologie der kurzen Proteinbereiche innerhalb der Elastase B und des Exotoxin A ausfindig zu machen. Auf Primärstrukturebene konnte jedoch keine signifikante Homologie zu den entsprechenden Sequenzabschnitten in LipA gefunden werden, was die Theorie eines in der Tertiärstruktur vorhandenen Sekretionsmotivs weiter unterstützt. Deswegen wurde der Versuch unternommen, in den 3D-Strukturen des Exotoxin A und der Elastase B homologe Bereiche zu finden, die sich in LipA und LipC voneinander unterschieden und denjenigen von LipA hinsichtlich von Ladungsverteilungen und Oberflächentopologien ähneln. Zu dem *coil*-Bereich in der Nähe der Deckelhelix (Q120 bis A126) konnten keine signifikant ähnlichen Bereiche auf den Oberflächen beider Proteine gefunden werden. Deswegen wurde der Bereich des LipA, der eine stärkere Exposition in der LipA- als in der LipC Struktur aufwies (T221 bis N228), näher untersucht. Dieser Proteinabschnitt unterschied sich in beiden Lipasen nicht nur hinsichtlich seiner Topologie, sondern auch in der Verteilung geladener Reste. Während das Strukturmodell von LipC dort vornehmlich ungeladene Reste aufweist, sind die beiden Reste K223 und N224 in LipA stark exponiert. Um die Suche ähnlicher Resteverteilungen in den Strukturen der Elastase B und des Exotoxin A einzugrenzen wurden die Bereiche, in denen positiv geladenen Reste (analog zu K223 in LipA), die zu mehr als 30 % lösungsmittlexponiert waren, näher untersucht. Zunächst wurden diese Bereiche auf das Vorhandensein einer ähnlichen Ladungsverteilung, die in der Struktur des LipA durch den Rest N224 bedingt wurde, untersucht. Wurde das Vorhandensein einer ähnlichen Oberflächenladung in Bereichen bestätigt, wurde die Oberflächentopologie in der unmittelbaren Nähe verglichen. Durch diese Vorgehensweise konnte sowohl in der Struktur des Exotoxin A als auch in der der Elastase B jeweils ein Bereich identifiziert werden, der sowohl in der Topologie als auch in der Oberflächenladung Ähnlichkeit aufwies (Abb. 3.22 A). Die beiden Reste K223 und N224 des LipA wurden in der 3D-Struktur der Elastase B mit den Aminosäuren K191 und dem zur Oberfläche des Proteins gekehrten Rückgrats des S194 wiedergefunden. Im Exotoxin A wies der Oberflächenabschnitt um die Reste K83 und E76 starke Ähnlichkeiten zu den Resten K223 und N224 des LipA auf. Interessanterweise wurden im Fall des Exotoxin A solche Reste identifiziert, die in der Domäne I des Proteins liegen. Mit dieser Domäne, die die Aminosäuren 60 bis 120 des Proteins umfasst, wurde bereits die erfolgreiche Sekretion von Hybridproteinen mit β -Lactamase bzw. Interleukin 4 gezeigt (Lu & Lory, 1996).

Die Proteinbereiche wurden daraufhin auf ihre elektrostatischen Feldeigenschaften weiter untersucht. Die PDB Dateien wurden mit Hilfe des PDB2PQR Programms (Dolinsky *et al.*, 2004) für die Berechnung der elektrostatischen Felder der Proteine mit Hilfe des APBS Programms (Baker *et al.*, 2001), dass die elektrostatischen Wechselwirkungen über Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung beschreibt, vorbereitet. Daraufhin wurden die elektrostatischen Oberflächeneigenschaften der Proteine in PyMol visualisiert und in den interessierenden Bereichen verglichen. (Abb. 3.22 B). Wie auffiel, waren alle drei Proteine in

Zentrum des Proteinbereichs, der die benannten Reste enthielt, positiv geladen, jedoch in der weiteren Umgebung in ähnlicher Art und Weise negativ.

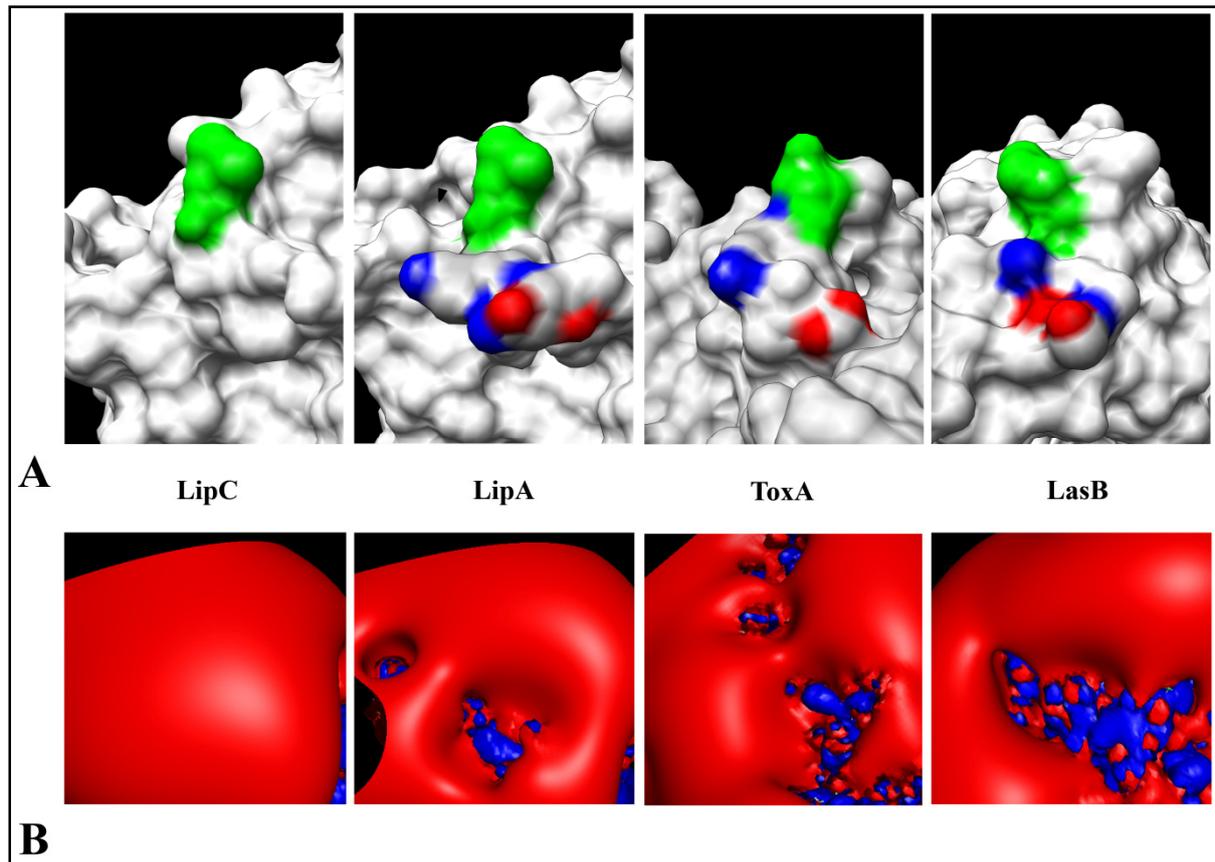


Abb. 3.22: Ansichten der Tertiärstrukturen der Lipasen C und A (LipC bzw. LipA), des Exotoxin A (ToxA) und der Elastase B (LasB). (A) Ansicht der Oberflächentopologie und lokalen Ladungsverteilungen in den als ähnlich identifizierten Proteinabschnitten. In den jeweiligen für die Atome konventionell gebräuchlichen Farben wurden die Ladungen von E76 (ToxA), N224 (LipA) und S194 (LasB) auf die Oberfläche projiziert (unterer Bildabschnitt). Gleiches gilt für die im mittleren Bildbereich hervorgehobenen Reste K83 (ToxA), K223 (LipA) und K191 (LasB). Der grün hervorgehobene Bereich markiert eine weitere Ähnlichkeit in der Oberflächentopologie. Die Bilder wurden mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt. (B) Elektrostatische Feldeigenschaften der Proteine in und um die in (A) gezeigten Bereiche. Der blau dargestellte und somit positiv geladene Bereich im unteren Bildabschnitt ist jeweils der in (A) farblich hervorgehobene. Die elektrostatischen Felder wurden aus den PDB Dateien mit Hilfe der PDB2PQR und APBS Programme berechnet und in PyMol als elektrostatische Isokonturen visualisiert, wobei die Konturfelder auf einen Bereich von +1 kT/e (blau) bzw. -1 kT/e (rot) festgelegt wurden.

In den Tertiärstrukturen LipA, Exotoxin A und der Elastase B konnte jeweils ein Abschnitt gefunden werden, der sowohl in der lokalen wie benachbarten Ladungsverteilung als auch in der Oberflächentopologie Ähnlichkeiten aufwies, sich aber in diesen Eigenschaften in dem entsprechenden Bereich von LipC unterschied. Dieser Bereich könnte in Zusammenhang mit dem Sekretionssignal für den Xcp-abhängigen Typ-II Weg stehen oder ein Teil dieses Motivs sein.

3.3.3 Die Sekretion der an K223 und N224 mutagenisierten Lipasevarianten ist beeinträchtigt

Um die Beteiligung des identifizierten Bereichs in LipA an der Erkennung des Proteins durch die Typ-II Sekretionsmaschinerie zu bestätigen, wurden die Reste K223 und N224 durch *overlap-extension* PCR (2.10.2) mutagenisiert. Hierbei wurden sie zum Einen mit der ungeladenen und kleinen Aminosäure Alanin (K223A bzw. N224A), zum Anderen mit einer strukturell ähnlichen aber gegensätzlich geladenen Aminosäure (K223E bzw. N224D) substituiert. Zusätzlich wurde eine Doppelmutante erstellt, in der beide Reste durch ein Alanin ersetzt wurden (K223A N224A). Die mutagenisierten Gene wurden analog zum Vektor pUCPLip1 kloniert, der das Wildtyp *lipAH* Operon unter Kontrolle des *lac*-Promotors trägt, um eine moderate, konstitutive Expression zu gewährleisten und eine mögliche, durch eine zu starke Expression hervorgerufene, intrazelluläre Akkumulation des LipA zu verhindern. Primer, die die jeweiligen einzuführenden Mutationen trugen und in 5'- sowie in 3'-Richtung des Gens banden, wurden zusammen mit den Primern „LipA FW“ bzw. „LipA RC“ mit dem Vektor pUCPLip1 als Matrizen-DNA in eine PCR-Reaktion (2.10.1) eingesetzt, um die die Mutationen tragenden Genfragmente zu generieren. Diese wurden gereinigt und in einer weiteren PCR-Reaktion zusammen mit den Primern „LipA FW“ und „LipA RC“ verwendet, um die vollständigen, die Substitutionen tragenden, Gene zu erhalten. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte und der Vektor pUCPLip1 mit den Endonukleasen *PaeI* und *PpuMI* hydrolysiert und die Wildtyp Sequenz des *lipA* mit den die Mutationen tragenden Fragmenten ausgetauscht.

Die neu konstruierten Plasmide sowie der Vektor pUCPLip1 und der entsprechende Leervektor pUCPKS wurden in den Lipase-defizienten Stamm PABS1 durch Transformation eingebracht (2.8), in dem eine Hintergrundaktivität durch chromosomal codierte Lipase ausgeschlossen werden konnte. Einzelkolonien der verschiedenen Stämme wurden auf Tributyrinplatten transferiert und die Bildung von Höfen durch Lipaseaktivität beobachtet (Abb. 3.23 B). Weiterhin wurden Expressionsversuche in Flüssigmedium durchgeführt, die erst 2 h nach Erreichen einer O.D._{580 nm} von 1 geerntet wurden, um eine korrekte Formation des Xcp-Apparats sicherzustellen. Die Kulturüberstände dieser Kulturen wurden abgenommen und Gesamtzellextrakte präpariert. Diese Proben wurden sowohl für die Bestimmung der lipolytischen Aktivität innerhalb und außerhalb der Zellen (2.24.1) als auch für einen immunologischen Nachweis der Lipase in den Kulturüberständen durch einen Western Blot verwendet (Abb. 3.23 A und C).

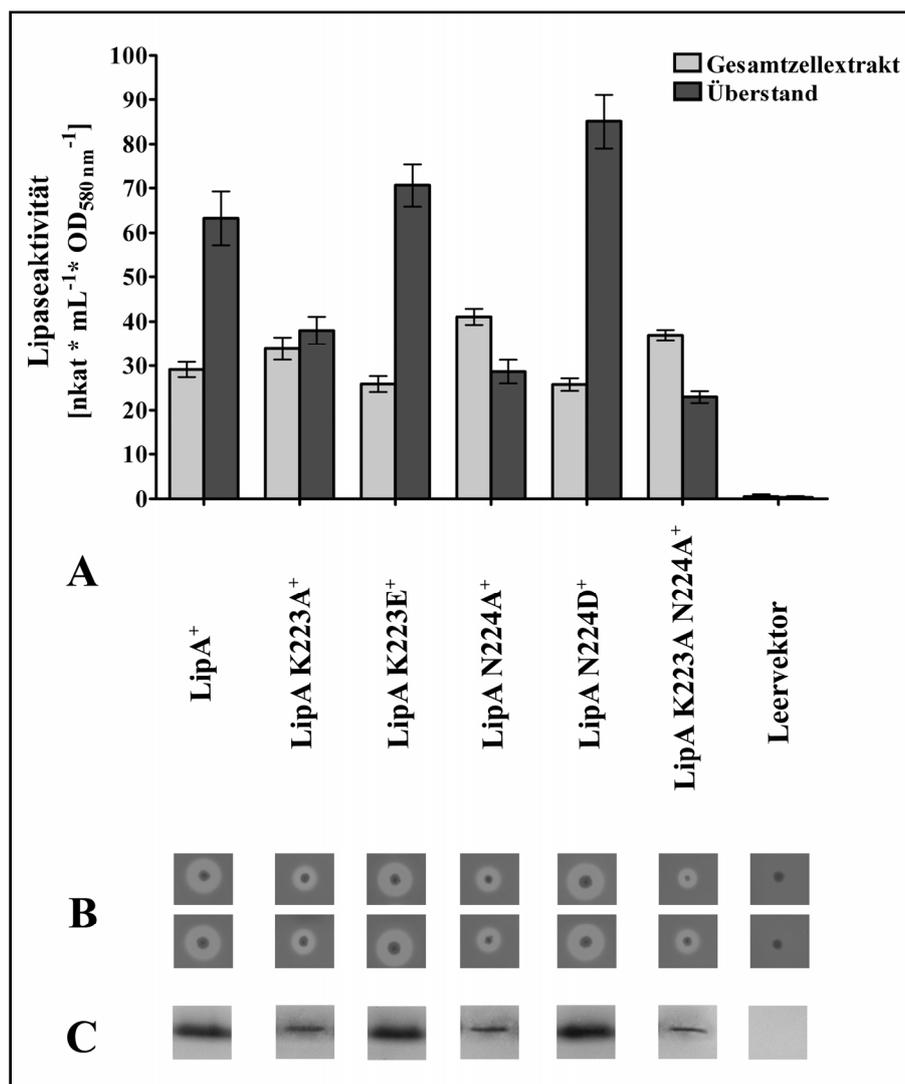


Abb. 3.23: Bestimmung der lipolytischen Aktivität und immunologischer Nachweis von LipA Varianten im Kulturüberstand nach Expression in *P. aeruginosa* PABS1. (A) Bestimmung der Lipaseaktivität der Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte mit dem Substrat *p*NPP nach Anzucht in Flüssigmedium. Die abgebildete Enzymaktivität repräsentiert den Mittelwert von jeweils vier voneinander unabhängig angezogenen Kulturen in Doppelbestimmung. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. (B) Nachweis der lipolytischen Aktivität per Tributyrinplatte. Die Größe der gebildeten Höfe der Kulturen wurde durch vier unabhängig voneinander angezogenen Kulturen auf Indikatorplatten bestätigt. (C) Immunologischer Nachweis von LipA in den Kulturüberständen nach Anzucht in Flüssigmedium. Die aufgetragenen Volumina der Kulturüberstände wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,6$). In der Abbildung ist jeweils der relevante Teil der Blotmembran gezeigt.

Um zu überprüfen, ob die eingefügten Punktmutationen in den Lipasevarianten unbeabsichtigte Änderungen der gesamten Tertiärstruktur bedingten, die die Enzymaktivität beeinträchtigten, wurden die Affinitäten zu dem Substrat *p*NPP bestimmt. Zu diesem Zweck wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit die lipolytische Aktivität der Überstände in einem vorangehenden Experiment bestimmt und auf etwa gleiche absolute Aktivitäten normiert. Daraufhin wurde die Aktivität der Lipasen bei variierenden Substratkonzentrationen bestimmt (Abb. 3.24).

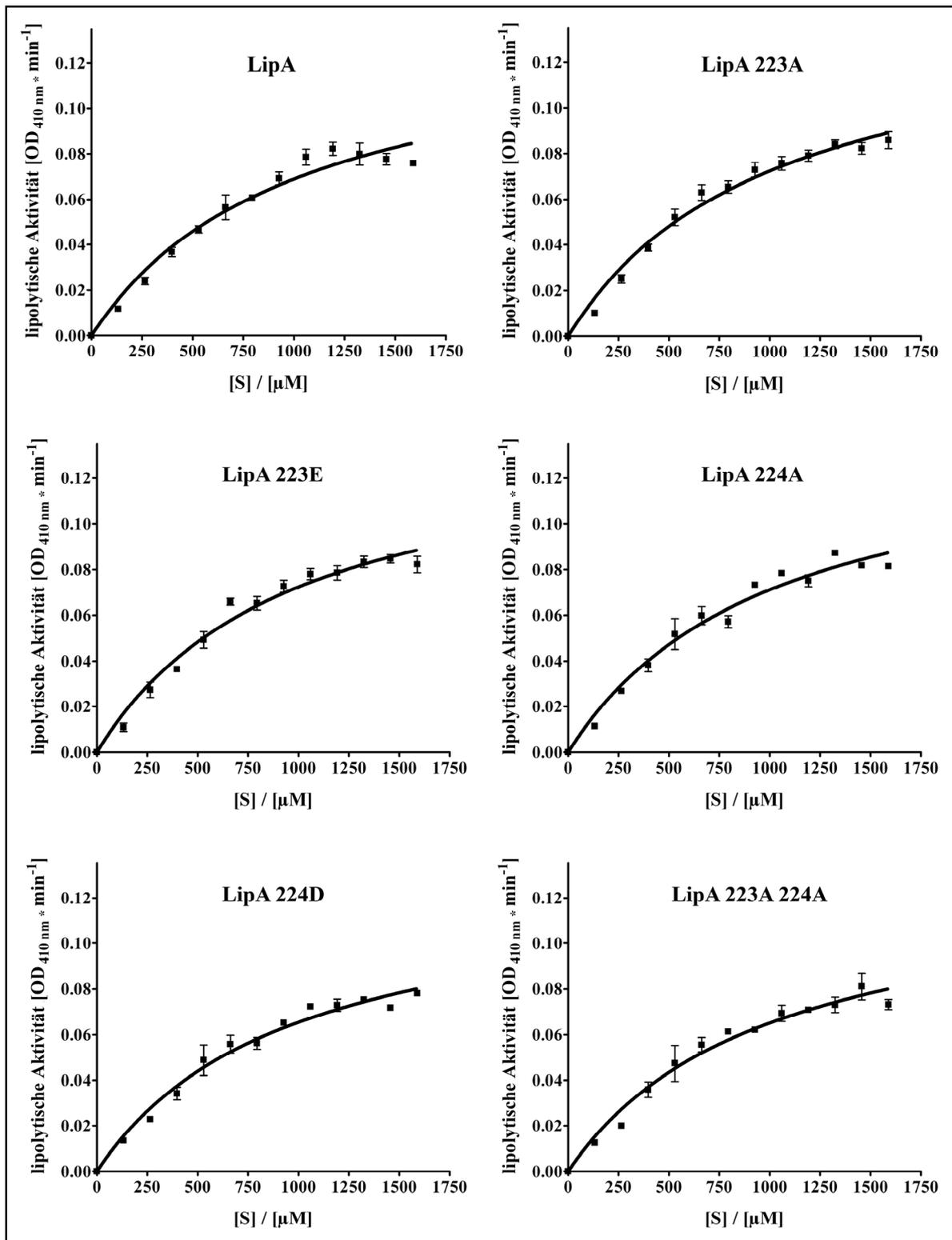


Abb. 3.24: Abhängigkeit der Substratkonzentration von *p*NPP auf die lipolytische Aktivität von LipA und deren Varianten zur Bestimmung der Michaelis-Konstante. Die acht jeweils unabhängig voneinander ermittelten Datensätze wurden verwendet, um die Michaelis-Konstanten in Prism 4 durch nichtlineare Regression zu ermitteln. Die Standardabweichung innerhalb der gemessenen Aktivität ist als Fehlerbalken dargestellt.

Aus diesen Daten wurden die Michaelis-Konstanten K_m mit Hilfe der nichtlinearen Regression in Prism berechnet. Ein Überblick über die ermittelten K_m -Werte gibt Tabelle 3.1.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der ermittelten Michaelis-Konstanten der LipA Varianten für *p*NPP.

Variante	K_m -Wert [mM]	Bestimmtheitsmaß
LipA (Wildtyp)	1,013	0,9715
LipA K223A	1,012	0,9854
LipA K223E	0,987	0,9800
LipA N224A	1,023	0,9769
LipA N224D	0,967	0,9833
LipA K223A N224A	1,002	0,9803

Die ermittelten Michaelis-Konstanten lagen alle im Bereich von derjenigen des Wildtyp-Proteins, so dass eine tiefgreifende Veränderung der Konformation durch die eingefügten Aminosäuresubstitutionen mit Einfluss auf die Funktionalität der Lipase ausgeschlossen wurde.

Die Mutagenese der identifizierten Reste, die potentiell Teil des Erkennungsmotivs für die Typ-II Sekretionsmaschinerie sind, bewirkte bei Substitution zu Alanin sowohl eine Verringerung der Menge von LipA als auch eine geringere lipolytische Aktivität im Überstand. Diese Befunde gingen mit einer leicht gesteigerten Akkumulation der Lipaseaktivität im Gesamtzellextrakt einher. Eine empfindliche Veränderung der Tertiärstruktur der gesamten Proteine wurde aufgrund der vergleichbaren Affinität zu ihrem Substrat *p*NPP ausgeschlossen.

3.4 Der Einfluss von Punktmutationen in der enantioselektiven Lipasevariante 1H8 auf ihre Sekretion

Aufgrund ihres biotechnologischen Potentials wurden verstärkt Anstrengungen unternommen, die biochemischen Eigenschaften von Lipasen zu optimieren. Hierbei zählt die Optimierung der Enantioselektivität von LipA aus *P. aeruginosa* zu den am besten untersuchten Beispielen. Für die Hydrolyse des Modells substrates 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol konnte durch Anwendung zahlreicher Methoden der gerichteten Evolution von Proteinen der E-Wert von 1,1 auf $E = 51$ durch Schaffung einer neuen Bindetasche für das (S)-Enantiomer gesteigert werden (Reetz *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 2002; Bocola *et al.*, 2004). Die auf diese Weise generierte Lipasevariante, LipA 1H8 genannt, weist sechs Aminosäuresubstitutionen auf (D20N, S53P, S155M, L162G, T180I und T234S), von denen durch Analyse der Enantioselektivität entsprechender Einzelmutanten drei Substitutionen identifiziert werden konnten, die die Enantioselektivität des Enzyms bedingen (S53P, S155M und L162G), wohingegen die anderen keinen Einfluss auf den E-Wert der Lipase nahmen (Reetz *et al.*, 2007).

In einer Überexpression des Wildtyp *lipAH* Operons mit dem Plasmid pUCPL6A unter Kontrolle des T7-Promotors in dem geeigneten Expressionsstamm *P. aeruginosa* PABST7.1 können mehrere 100 mg / L Kulturüberstand gewonnen werden (Jaeger *et al.*, 1997; Schneidinger, 1997). Dieses System wurde verwendet, um LipA 1H8 in dem zu pUCPL6A gleich konstruierten Plasmid pUCP1H8 zu exprimieren. Nach erfolgter Expression und Ernte der Kulturen wurde die lipolytische Aktivität des Kulturüberstands gemessen (2.24.1) und mit einer Expressionskultur verglichen, die das Wildtyp Operon exprimierte (Abb. 3.25).

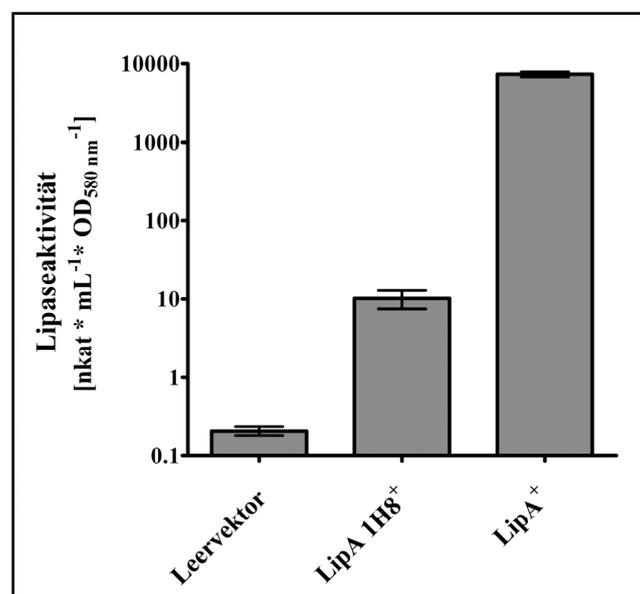


Abb. 3.25: Vergleich der lipolytischen Aktivität der Kulturüberstände der Expression von LipA und LipA 1H8 unter Kontrolle des T7-Promotors in PABST7.1 durch einen *p*NPP Test. Aufgrund der großen Unterschiede wurden die Daten, die durch jeweils drei voneinander unabhängig angezogene Kulturen in Doppelbestimmung ermittelt wurden, in logarithmischer Form aufgetragen. Die Standardabweichung dieser Messungen ist als Fehlerbalken dargestellt.

Während bei Expression der Wildtyp-Lipase eine lipolytische Aktivität von $10000 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{580 \text{ nm}}^{-1}$ gemessen werden konnte, konnte im Fall der Überexpression von LipA 1H8 lediglich eine geringe Lipaseaktivität von 0,1 % verglichen mit derjenigen von LipA nachgewiesen werden.

3.4.1 Die Ausbeute einer homologen Überexpression der Lipase 1H8 ist aufgrund einer verminderten Sekretion stark herabgesetzt

Da bereits für LipA 1H8 und ihre Varianten beschrieben wurde, dass sie in den Kulturüberständen stabil sind (Reetz *et al.*, 2007), konnte ein Aktivitätsverlust aufgrund erhöhter Instabilität und Degradation der Enzyme ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde hier der Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Sekretion von LipA 1H8 näher untersucht. Zu diesem Zweck wurde LipA und LipA 1H8 in *P. aeruginosa* PABST7.1 exprimiert und das Verhältnis der lipolytischen Aktivität des Gesamtzellextrakts und des Überstands bestimmt (Abb. 3.26).

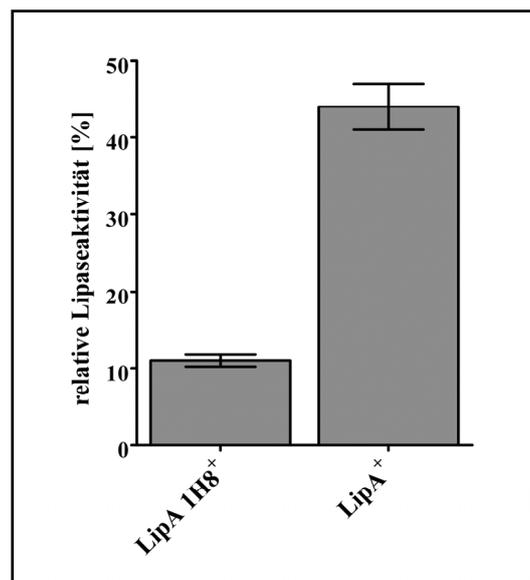


Abb. 3.26: Anteil der lipolytischen Aktivität von sekretiertem LipA 1H8 und LipA nach Expression in *P. aeruginosa* PABST7.1 in Bezug auf die Gesamtaktivität. Die gezeigten Daten wurden nach Messung der spezifischen lipolytischen Aktivität der Gesamtzellextrakte und der Kulturüberstände errechnet, und repräsentieren die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängig angezogenen Kulturen in Doppelbestimmung. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken gezeigt.

Während nur etwa 10 % der gesamten gemessenen Lipaseaktivität im Fall der Expression von LipA 1H8 im Kulturüberstand detektiert werden konnte, wurden bei Expression der Wildtyp Lipase ca. 45 % der lipolytischen Aktivität im Kulturmedium gemessen.

Desweiteren wurde die Proteinzusammensetzung der Kulturüberstände beider Kulturen auf das Vorhandensein der Lipasen per SDS-PAGE (Abb. 3.27 A) analysiert. Während der Kulturüberstand nach Überexpression der Wildtyp Lipase im Vergleich zur Leervektorkontrolle eine deutliche, zusätzliche Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 29 kDa aufwies, konnte bei Expression von LipA 1H8 keine zusätzliche Bande auf dieser Höhe detektiert werden. Durch einen immunologischen Nachweis der Lipasen in den Gesamtzellextrakten und den Kulturüberständen konnten die Ergebnisse des Enzymaktivitätstests bestätigt werden (Abb. 3.27 B). Die untersuchten Proben des Gesamtzellextrakts und des Überstands wiesen bei Überexpression der Wildtyp Lipase Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 29 kDa auf, während die enantioselektive Variante LipA 1H8 nur nach sehr langer Belichtung mit starkem Hintergrund detektiert werden konnte (ohne Abb.)

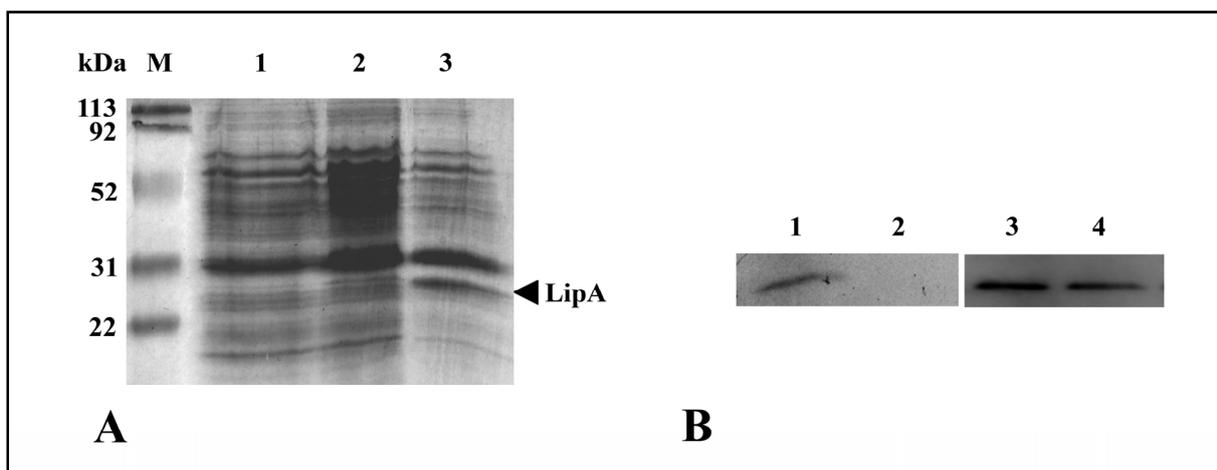


Abb. 3.27: (A) SDS-PAGE Analyse der Kulturüberstände der Überexpression von LipA und LipA 1H8 unter Kontrolle des T7-Promotors in *P. aeruginosa* PABST7.1. M: Marker; 1: Leervektorkontrolle; 2: LipA 1H8⁺; 3: LipA⁺. Die aufgetragenen Volumina der Kulturüberstände wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580 nm} = 0,6). Zur Visualisierung der Banden wurde das 12 %ige Trenngel mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt. (B) Immunologischer Nachweis von LipA und LipA 1H8 in den Gesamtzellextrakten und Überständen nach Expression unter Kontrolle des T7-Promotors in *P. aeruginosa* PABST7.1. 1: GZE LipA 1H8⁺; 2: Überstand LipA 1H8⁺; 3: GZE LipA⁺; 4: Überstand LipA⁺. Die aufgetragenen Volumina der Gesamtzellextrakte und der Kulturüberstände wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580 nm} = 0,6). In der Abbildung ist jeweils der relevante Teil der Blotmembran gezeigt.

Als Grund für die geringere lipolytische Aktivität im Kulturüberstand bei Expression von LipA 1H8 in *P. aeruginosa* PABST7.1 konnte eine verminderte Sekretion nachgewiesen werden. Während sich bei Expression unter Kontrolle des T7-Promotors ca. 45 % der gesamten Lipaseaktivität im Kulturüberstand befinden, sind es im Fall von LipA 1H8 nur ca. 10 %.

3.4.2 Die Lipase 1H8 besitzt die Fähigkeit eine Disulfidbrücke auszubilden

Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Resten Cys¹⁸³ und Cys²³⁵ stellt eine essentielle Voraussetzung für die Sekretion von LipA dar (Nardini *et al.*, 2000; Liebeton *et al.*, 2001). Die Aminosäuresubstitutionen T180I und T234S in LipA 1H8 befinden sich beide in der Nähe dieser beiden Cysteine (Abb. 3.30) so dass ein Einfluss dieser Austausch auf die Fähigkeit, eine Disulfidbrücke auszubilden, vermutet wurde. Um diese These zu untersuchen wurde *lipA 1H8* ohne seine Signalsequenz wie bereits für *lipA* beschrieben (3.1.1) mit den Primern „LipA-SS up“ und „Lip-SS dwn“ amplifiziert und in den Vektor pET22b kloniert, um die Lipase heterolog in *E. coli* BL21(DE3) mit dem neu konstruierten Vektor pLipA1H8-SS in optimiertem Minimalmedium zu exprimieren (2.4.3) und zu reinigen (2.17). Die elektrophoretische Homogenität der gereinigten Proteine wurde per SDS-PAGE verifiziert (Abb. 3.28 A) und die Lipasen LipA und LipA 1H8 in einem *in vitro* Rückfaltungsansatz unter Zusatz einer äquimolaren Menge LipH renaturiert (2.18). Proben dieser Rückfaltungen wurden entnommen und mit zwei SDS-Probenpuffern, die sich durch das Vorhandensein des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol (2 % (v/v)) voneinander unterschieden, versetzt. Das elektrophoretische Verhalten dieser Proben wurde auf einem SDS-PAGE (15 %iges Tricin Gel) untersucht (Abb. 3.28 B).

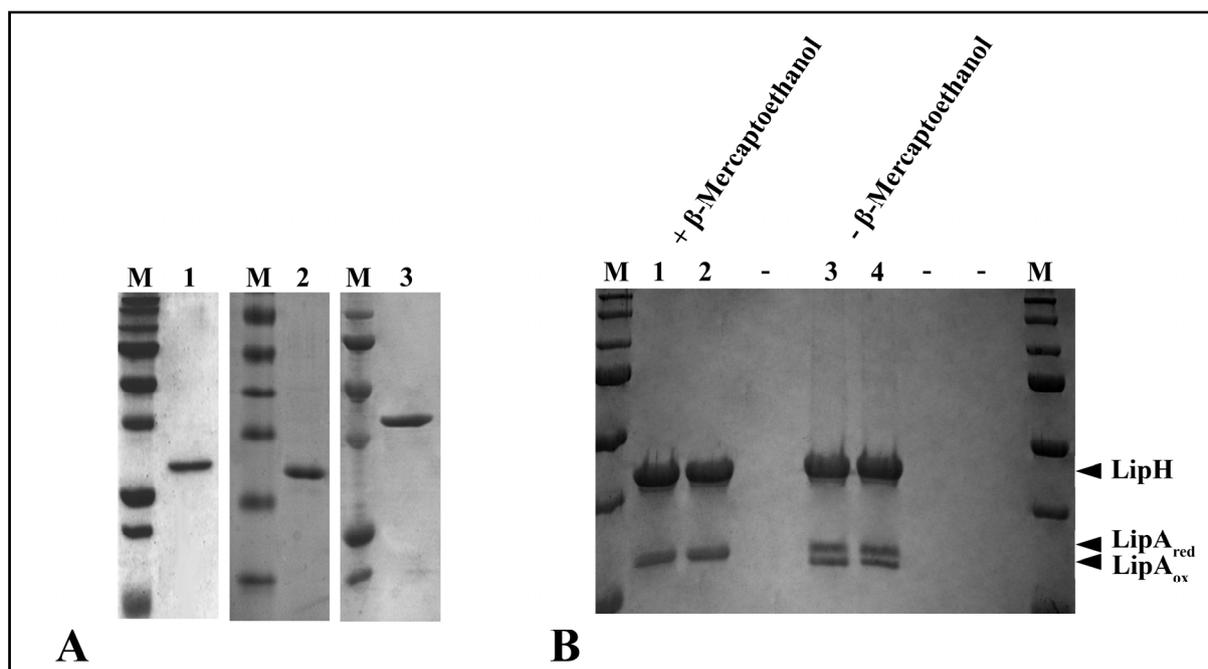


Abb. 3.28: (A) Analyse der elektrophoretischen Homogenität der in die *in vitro* Rückfaltung eingesetzten Proteine. M: Marker; 1: LipA; 2: LipA 1H8; 3: LipH_t-NH₂. Jeweils 5 μ g der gereinigten Proteine wurden aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das 12 %ige Trenngel mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt. (B) SDS-PAGE zur Untersuchung der Ausbildung von Disulfidbrücken in LipA und LipA 1H8 nach *in vitro* Renaturierung. Die Proben wurden mit Probenpuffer, der mit bzw. ohne β -Mercaptoethanol versetzt war, behandelt und auf einem 15 %igen Tricin Gel analysiert. M: Marker; 1 & 3: LipA mit LipH renaturiert; 2 & 4: LipA 1H8 mit LipH renaturiert. Die Spuren, mit einem – gekennzeichnet wurden, wurden nicht beladen, um Effekte durch Diffusion des β -Mercaptoethanols auszuschließen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Unter oxidierenden Bedingungen konnte sowohl für LipA als auch für LipA 1H8 eine zusätzliche Bande, die unter reduzierenden Bedingungen nicht auftrat, detektiert werden. Diese Bande ist auf die Anwesenheit einer Disulfidbrücke in beiden Proteinen zurückzuführen.

Die verringerte Sekretion von LipA 1H8 ist nicht durch eine Störung der Ausbildung einer Disulfidbrücke begründet.

3.4.3 die Mutationen D20N und T180I der Lipase 1H8 vermindern ihre Sekretion

Jeder der einzelnen Mutationen sowie ausgewählte Doppel- und Dreifachvarianten des LipA 1H8 wurden im Rahmen einer anderen Arbeit in *lipA* eingefügt (Reetz *et al.*, 2007). Diese Plasmide tragen die verschiedenen *lipA* Varianten unter Kontrolle des T7-Promotors. Um bei der Untersuchung der Sekretionseffizienz der verschiedenen Varianten den Sekretionsapparat nicht zu überlasten und eine intrazelluläre Akkumulation der Lipase zu vermeiden, wurden sie in den Vektor pBBR1MCS unter Kontrolle des *lac*-Promotors kloniert. Hierzu wurden die jeweiligen *lipAH* Operons durch Hydrolyse mit *PaeI* und *Eco72I* aus den entsprechenden Vektoren isoliert, und mit dem ebenfalls mit *PaeI* und *Eco72I* hydrolysierten Vektor pBBR1MCS ligiert. Die neu konstruierten Vektoren wurden in den Lipase-defizienten Stamm *P. aeruginosa* PABS1 durch Konjugation (2.9) übertragen. Einzelkolonien der verschiedenen Stämme wurden auf Tributyrinplatten transferiert und die Bildung von Höfen durch lipolytische Aktivität beobachtet (Abb. 3.29 B). Darüberhinaus wurden Expressionskulturen in Flüssigmedium angelegt, die erst 2 h nach Erreichen einer O.D._{580 nm} von 1 geerntet wurden, um eine korrekte Formation des Xcp-Apparats sicherzustellen. Die Kulturüberstände dieser Kulturen wurden abgenommen und Gesamtzellextrakte präpariert. Diese Proben wurden für die Bestimmung der intra- und extrazellulären Lipaseaktivität (2.24.1) und für einen immunologischen Nachweis der Lipase in den Kulturüberständen durch einen Western Blot verwendet (Abb. 3.29 A und C).

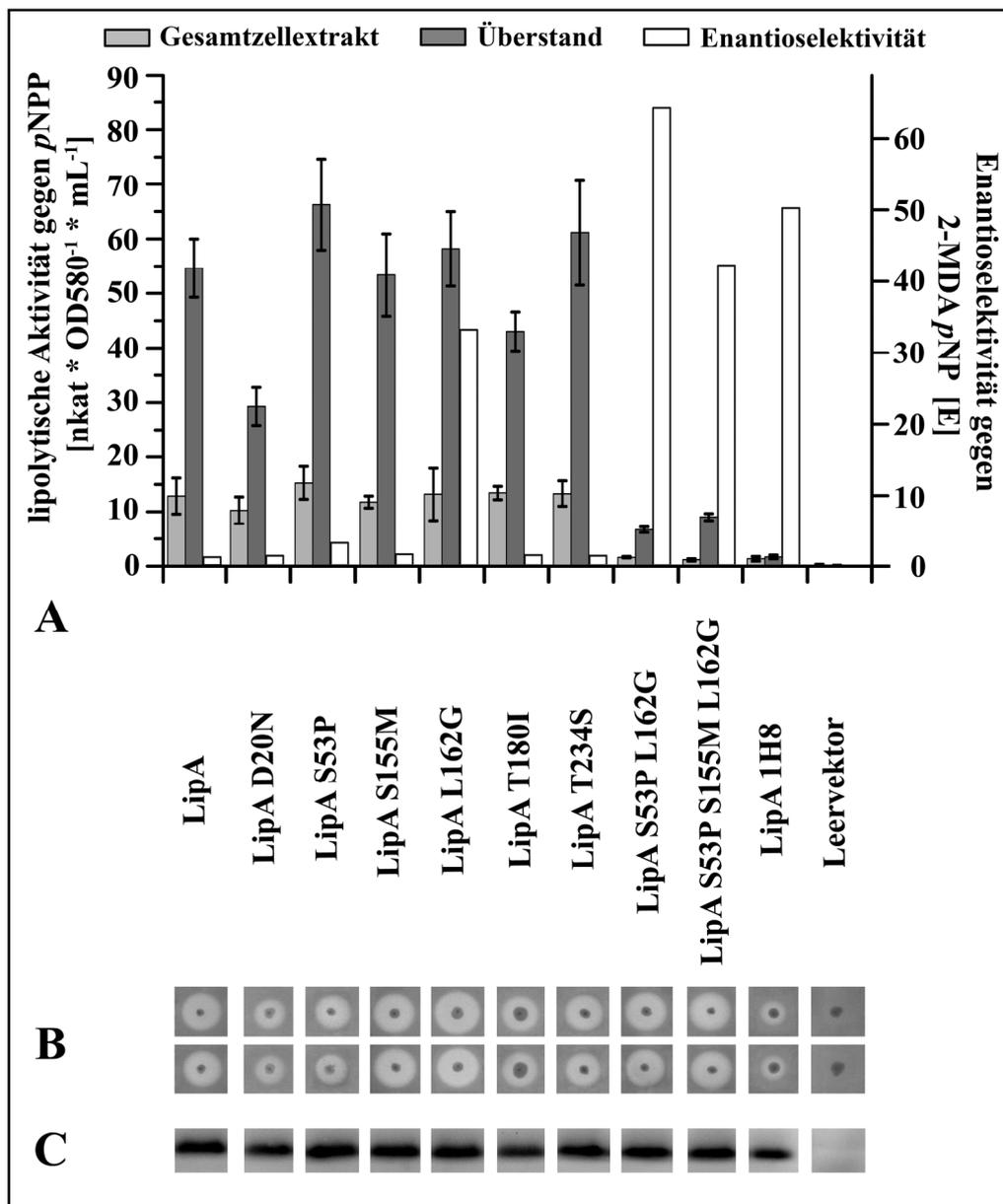


Abb. 3.29: Bestimmung der lipolytischen Aktivität und immunologischer Nachweis von LipA 1H8 und der entsprechenden Varianten mit einer bzw. mehreren Aminosäuresubstitutionen nach Expression in *P. aeruginosa* PABS1 unter Kontrolle des *lac*-Promotors. (A) Bestimmung der Lipaseaktivität der Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte mit dem Substrat pNPP nach Anzucht in Flüssigmedium. Die abgebildete Enzymaktivität repräsentiert den Mittelwert von jeweils vier voneinander unabhängig angezogenen Kulturen in Doppelbestimmung. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Weiterhin ist zur Übersicht die von Reetz *et al.* (2007) bestimmte Enantioselektivität in dem Diagramm auf einer zweiten Y-Achse aufgetragen. (B) Nachweis der lipolytischen Aktivität per Tributyrinplatte. Die Größe der gebildeten Höfe der Kulturen wurde durch vier unabhängig voneinander angezogenen Kulturen auf Indikatorplatten bestätigt. (C) Immunologischer Nachweis von LipA in den Kulturüberständen nach Anzucht in Flüssigmedium. Die aufgetragenen Volumina der Kulturüberstände wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,6$). In der Abbildung ist jeweils der relevante Teil der Blotmembran gezeigt.

Wie erwartet konnte in keinem der durchgeführten Experimente in dem Stamm, der den entsprechenden Leervektor besaß und als Negativkontrolle verwendet wurde, die Lipase oder deren Aktivität detektiert werden. Bei den Kulturen, die auf der Tributyrinplatte inkubiert wurden, zeigten sowohl die, die die Lipase 1H8 exprimierten als auch diejenigen mit den

Substitutionen D20N und T180I in *lipA* einen deutlich verringerten Hofdurchmesser. Diese beiden Mutanten zeigten weiterhin eine verringerte extrazelluläre lipolytische Aktivität von etwa 54 % bzw. 79 % in Bezug auf den Wildtyp. Die untersuchten Doppel- und Dreifachmutanten S53P / L162G und S53P / S155M / L162G, bei denen alle Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums liegen (Abb. 3.30), zeigten beide eine hohe Präferenz für die Hydrolyse des (S)-Enantiomers des 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol (Reetz *et al.*, 2007). Trotz ihrer geringen enzymatischen Aktivität gegen *p*NPP war die Hofbildung der Kulturen, die diese Varianten exprimierten, in ihrer Größe vergleichbar mit der der Wildtyp Lipase. Dies deutet darauf hin, dass die Abnahme der extrazellulären lipolytischen Aktivität eher auf eine verminderte Affinität gegenüber *p*NPP als auf einen Sekretionsdefekt zurückzuführen ist. Diese Vermutung wurde durch eine durchgeführte densitometrische Analyse der Signale der Lipase-Varianten im Western Blot bestätigt. Während bei den Kulturüberständen der Kulturen, die die Varianten LipA 1H8, D20N und T180I exprimierten, signifikant verringerte Signalintensitäten nachgewiesen werden konnten, waren diejenigen der übrigen Varianten vergleichbar mit denen der Kulturen, die Wildtyp LipA exprimierten. Eine Übersicht gibt Tabelle 3.2.

Tab. 3.2: Densitometrische Analyse der Signalintensitäten der immunologisch detektierten Lipase-Varianten. Angegeben sind jeweils der ermittelte Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Intensität der Signale in Bezug auf den Wildtyp, die durch Auswertung von 8 Western Blots ermittelt wurden.

Variante	relative Signalintensität [%]
LipA (Wildtyp)	100
LipA D20N	67 ± 7
LipA S53P	106 ± 12
LipA S155M	102 ± 13
LipA L162G	106 ± 9
LipA T180I	80 ± 6
LipA T234S	98 ± 11
LipA S53P L162G	98 ± 13
LipA S53P S155M L162G	98 ± 13
LipA 1H8	51 ± 8

Die verringerte Sekretion von LipA 1H8 wird durch die Mutationen D20N und T180I bedingt, die beide keinen Einfluss auf die Enantioselektivität der Lipase haben. Eine Übersicht über die Lage der Austausche in der 3D-Struktur von LipA und ihren Einfluss auf die Enantioselektivität bzw. Sekretion gibt Abbildung 3.30.

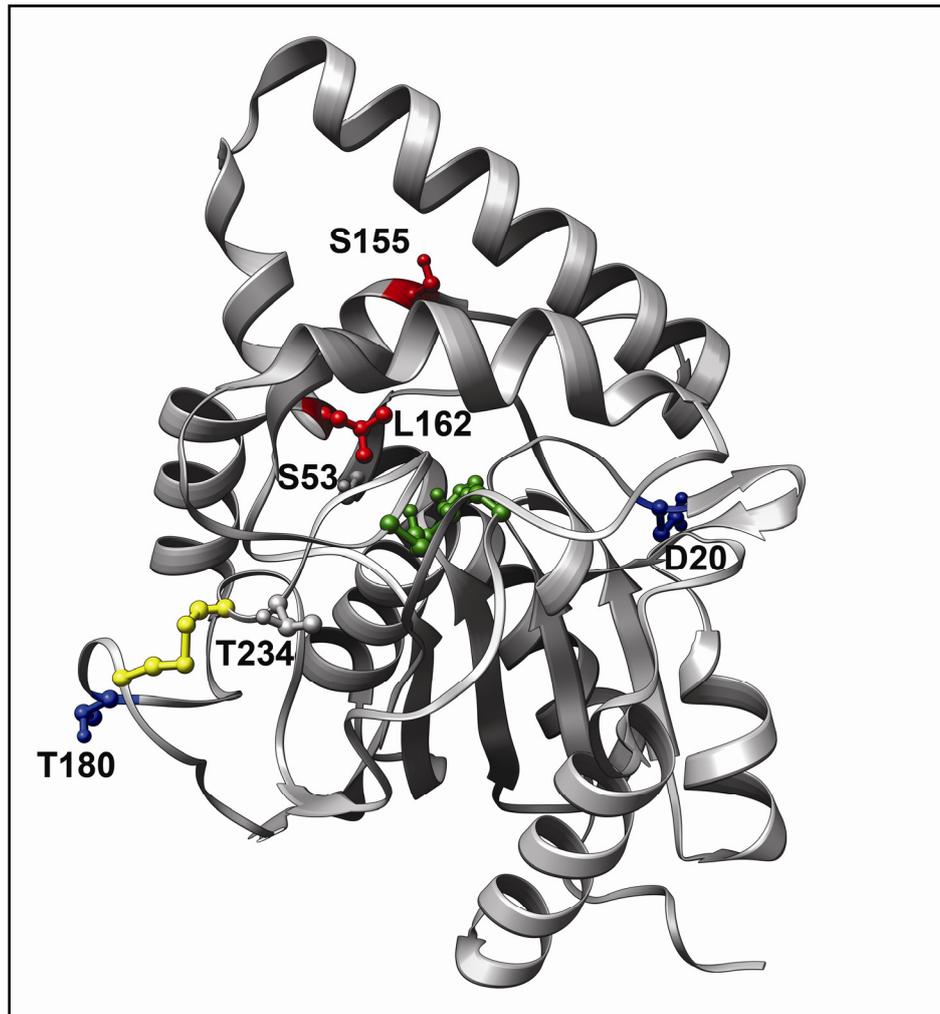


Abb. 3.30: Lokalisation der Lage der Mutationen von LipA 1H8 in der 3D-Struktur von LipA aus *P. aeruginosa*. Die in LipA 1H8 mutagenisierten Reste sind durch die *ball and stick* Darstellung und die Angabe ihrer Position in der Primärstruktur hervorgehoben. Die intramolekulare Disulfidbrücke ist in gelb gezeigt, die Reste, die das katalytisch aktive Zentrum bilden sind in grün als *ball and stick* hervorgehoben. In LipA 1H8 mutagenisierte und sich positiv auf die Enantioselektivität auswirkende Aminosäuren (Reetz *et al.*, 2007) sind rot, diejenigen die die Sekretion nachteilig beeinflussen in blau illustriert. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

3.5 Die Interaktion der Lipasen mit ihrem Chaperon und ihre biotechnologische Nutzung als „Ein- Schritt“ Affinitätsreinigung

Während bei homologer Überexpression mehrere 100 mg aktives LipA pro Liter Kulturüberstand gewonnen werden können (Jaeger *et al.*, 1997; Schneidinger, 1997), wurde für die Variante LipA 1H8 gezeigt, dass aufgrund ihres Sekretionsdefekts bei Expression in *P. aeruginosa* die Ausbeute stark herabgesetzt ist (3.4). Darüberhinaus sind LipA 1H8 und ihre Varianten nicht stabil, wenn sie aus dem Überstand gereinigt werden (Reetz *et al.*, 2007). Somit birgt die Optimierung von Lipasen hinsichtlich ihres biotechnologischen Potentials durch gerichtete Evolutionsmethoden gewisse Risiken, dass die verbesserten Biokatalysatoren nicht in zufriedenstellender Ausbeute für die Nutzung in industriellem Maßstab gewonnen werden können, wenn sie im homologen Wirt produziert werden sollen. Auf der anderen Seite resultiert die heterologe Expression in *E. coli* aufgrund des Fehlens einer geeigneten Sekretionsmaschinerie in einer intrazellulären Akkumulation des Zielproteins und der Bildung von „inclusion bodies“ oder der Degradation des Enzyms, wodurch die Erlangung aktiver und sauberer Lipase durch Notwendigkeit der zusätzlichen Reinigung des akzessorischen Lip-Proteins und *in vitro* Renaturierung erschwert wird. Weiterhin werden durch *in vitro* Aktivierungsansätze heterogene Gemische aus aktiver und inaktiver Lipase, die sich aufgrund von Fehlfaltung nicht mehr in den katalytisch aktiven Zustand überführen lässt, erzeugt. Lipase-spezifische Foldasen lassen sich mit hoher Ausbeute als Poly-Histidin Fusionsprotein heterolog exprimieren und reinigen. Die Lipasen werden von ihren entsprechenden Chaperonen mit hoher Spezifität und Affinität gebunden und aktiviert. Nach erfolgter *in vitro* Renaturierung wurde für das Lipase-Lip System von *B. glumae* die Bildung eines Proteinkomplexes aus beiden Proteinen beschrieben, der so stabil war, dass seine Struktur röntgenkristallographisch aufgeklärt werden konnte (Pauwels *et al.*, 2006). Im folgenden Teil der Arbeit wurde versucht, die hohe Affinität, die das Chaperon LipH gegenüber seinen Lipasen aufweist, für die Etablierung einer effizienten Reinigungsmethode unter Vermeidung der schon beschriebenen möglichen Komplikationen zu nutzen.

3.5.1 *In vitro* rückgefaltetes LipA geht mit seinem Chaperon LipH einen stabilen und aktiven Proteinkomplex ein

Zunächst wurde versucht, die Ausbildung eines stabilen Proteinkomplexes, wie er für die Lipase und die Foldase aus *B. glumae* beschrieben wurde, für LipA und LipH aus *P. aeruginosa* nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden jeweils Proben der einzelnen gereinigten Proteine und eine Probe, in der die Lipase mit äquimolaren Mengen LipH zurückgefaltet wurde, auf eine Konzentration von mindestens 1 mg / mL in GFC-Puffer (100 mM MES pH 6,5; 150 mM NaCl) eingestellt und über eine Gelfiltration (2.22) chromatographisch analysiert (Abb. 3.31).

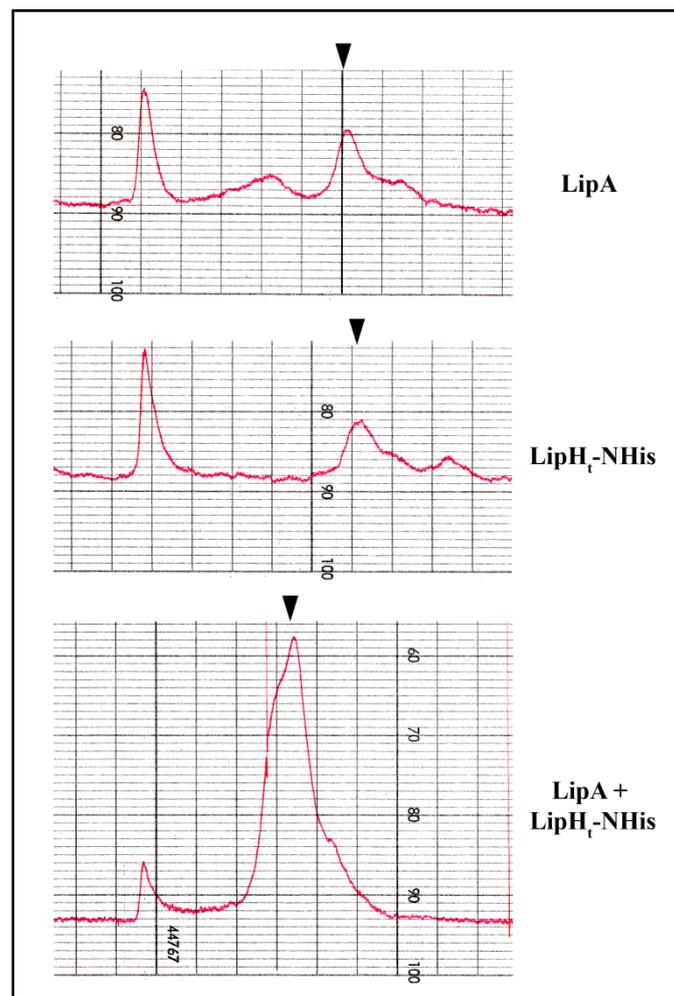


Abb. 3.31: Aufgenommenes Elutionsprofil der Proteine während der Gelfiltration durch kontinuierliche Messung der Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$. Die Chromatogramme sind von links nach rechts zu lesen. Die Pfeile kennzeichnen die Peaks, welche die aufgetragenen Proteine enthalten und vereinbar mit dem kalkulierten Molekulargewicht sind.

Die Chromatogramme aller untersuchten Proben wiesen 2 deutlich erkennbare Peaks auf. Einer der Peaks wies in allen Proben die gleiche Retentionszeit jenseits der Ausschlussgröße der Säule auf, der wahrscheinlich auf eine partielle Präzipitation der Proteine durch den Wechsel des Puffers zurückzuführen war. Im Fall der Gelfiltration von LipA und LipH₁-NHis befand sich der zweite Peak bei der erwarteten Retentionszeit, die in etwa einem

Molekulargewicht von 35 kDa entspricht. Die Probe, die durch LipH_r-NHis *in vitro* renaturiertes LipA enthielt, wies einen Peak bei einer Retentionszeit auf, die einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa entspricht.

Die während der Detektion der Peaks eluierten Fraktionen wurden zum Nachweis lipolytischer Aktivität für einen pNPP Test (2.24.1) verwendet. Die nachgewiesene Enzymaktivität konzentrierte sich auf die Fraktion bei etwa 70 kDa der Chromatographie der *in vitro* renaturierten Probe des Lipase-Chaperonkomplexes, während in allen anderen Fraktionen keine lipolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte (ohne Abb.).

Die Lipase LipA aus *P. aeruginosa* bildet mit ihrer Lipase-spezifischen Foldase LipH bei *in vitro* Renaturierung einen stabilen und aktiven Proteinkomplex aus.

3.5.2 Die Nutzung der Interaktion zwischen der Lipase und ihrem Chaperon als Ein-Schritt Affinitätsreinigung

Die grundlegende Idee dieser Methode basiert auf der hohen Affinität der Lipase-spezifischen Foldasen gegenüber ihren Lipasen. Für den Lipase-Lif Proteinkomplex aus *B. glumae* wurde eine Dissoziationskonstante von $K_d = 5$ nM beschrieben (Pauwels *et al.*, 2007). Dieser Wert ist vereinbar mit der großen Interaktionsfläche beider Proteine von insgesamt 5378 \AA^2 (Pauwels *et al.*, 2007). Eine Übersicht über die Vorgehensweise der Nutzung von LipH zur gekoppelten *in vitro* Aktivierung und Reinigung der Lipase gibt Abb. 3.32.

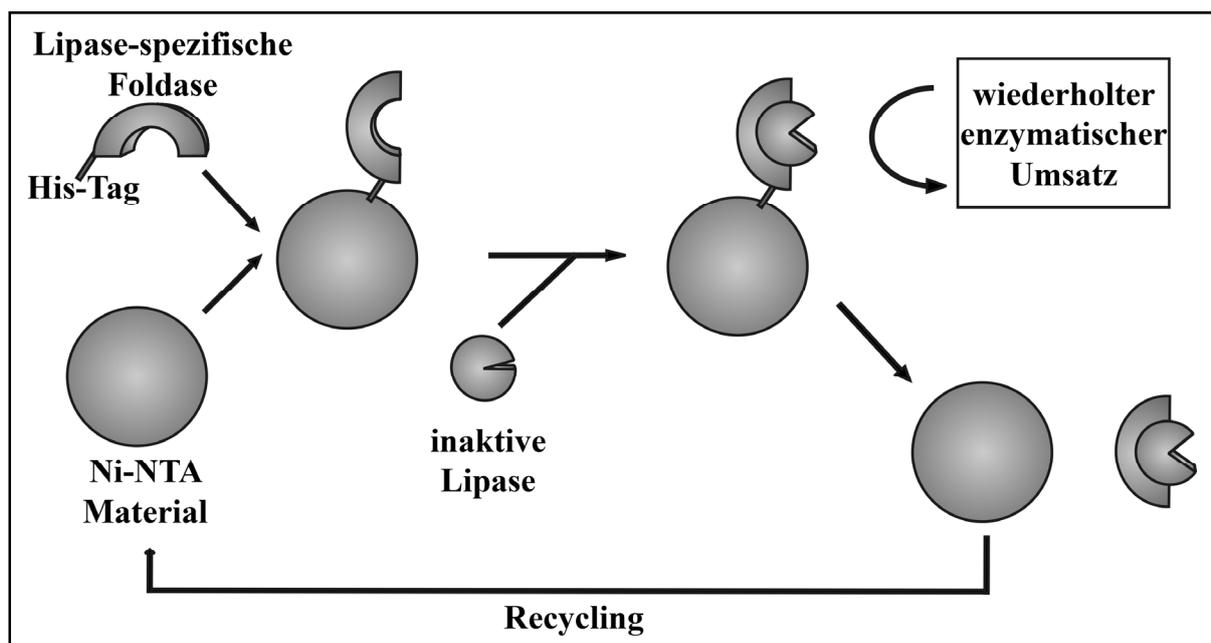


Abb. 3.32: Überblick über die kombinierte Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung der Lipase. Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise ist im Text gegeben.

Im ersten Schritt wird LipH als Poly-Histidin Fusionsprotein, welches um seinen N-terminal gelegenen Membrananker verkürzt wurde, heterolog exprimiert. Nach Inkubation des Gesamtzellextrakts, welches das Chaperon enthält, mit Ni-NTA Material und erfolgter Immobilisierung der Foldase wird ungebundenes Protein durch einen Waschschrift entfernt und Gesamtzellextrakt, welches durch De- und Renaturierung inaktive aufgelöste „inclusion bodies“ beinhaltet, mit der auf dem Ni-NTA Material gebundenen Lipase-spezifischen Foldase inkubiert, um einen stabilen immobilisierten Lipase-Lif Komplex zu bilden, der entweder direkt für Biotransformationen genutzt oder für weitere Zwecke eluiert werden kann.

Um zu prüfen, ob diese beschriebene Methode der kombinierten „Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ der Lipase generell möglich ist, wurden LipA und LipH heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (2.4.3) und die die Proteine enthaltenden präparierten Gesamtzellextrakte für diese Vorgehensweise (2.23) mit Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) als Chromatographiematerial eingesetzt. Nach der Inkubation des die Lipase enthaltenden Gesamtzellextraktes mit den Beads, an denen das Chaperon immobilisiert war, wurde das Ni-NTA Material einmal mit Rückfaltungspuffer gewaschen und ein *p*NPP Test (2.24.1) durchgeführt, in dem die lipolytische Aktivität der an die Beads gekoppelten Lipase nachgewiesen werden konnte (ohne Abb.). Die Proteinzusammensetzung der während der Reinigung gesammelten Fraktionen wurde durch eine SDS-PAGE (2.26) analysiert (Abb. 3.33).

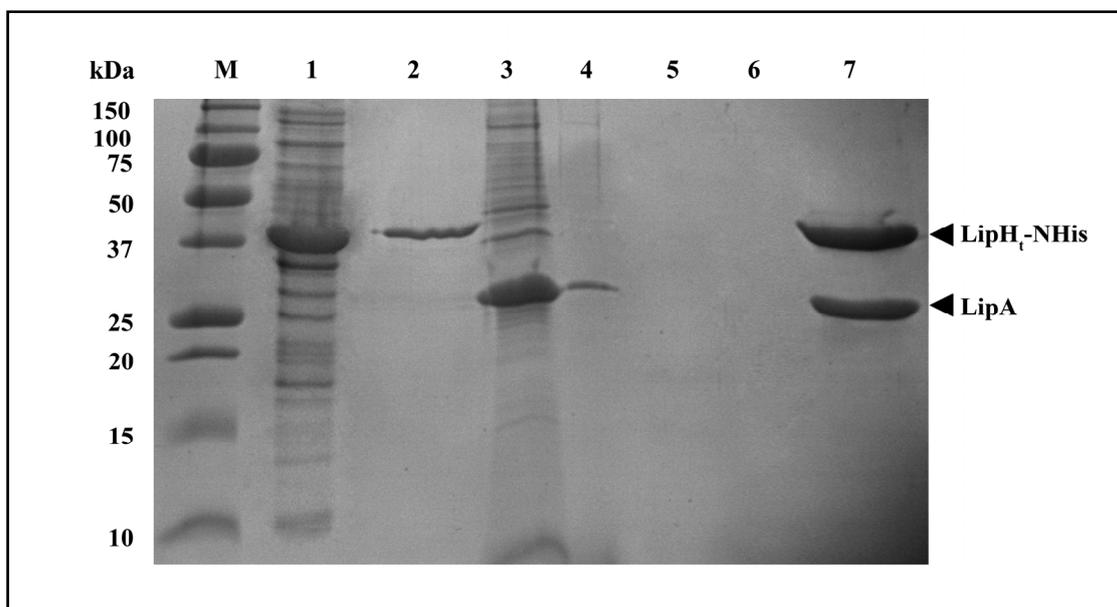


Abb. 3.33: SDS-PAGE Analyse der Proteinzusammensetzung der Fraktionen, die während der kombinierten „Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ gesammelt wurden. M: Marker; 1: Gesamtzellextrakt des überexprimierten LipH_t-NHis nach Inkubation mit den Beads; 2: Waschfraktion; 3: Gesamtzellextrakt des überexprimierten LipA nach Inkubation mit den Beads; 4: Waschfraktion; 5: Fraktion nach Hydrolyse des *p*NPP; 6: Waschfraktion; 7: Elutionsfraktion. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580 nm} = 0,15). Zur Visualisierung der Banden wurde das 12 %ige Trenngel mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Wie anhand der SDS-PAGE zu erkennen war, konnte die Foldase an die Beads gebunden werden und bildete mit der Lipase einen stabilen Proteinkomplex aus, dessen lipolytische

Aktivität nachgewiesen wurde. Dieser Proteinkomplex konnte im letzten Schritt der Reinigung mit hoher Ausbeute und elektrophoretischer Homogenität von dem Chromatographiematerial eluiert werden. Die Spezifität der Bindung der Lipase an die Foldase wurde in einem weiteren Experiment verifiziert, in dem LipA enthaltendes Gesamtzellextrakt mit Beads inkubiert wurde, an denen kein Chaperon immobilisiert wurde. In diesem Fall konnte in der Elutionsfraktion weder Lipase noch lipolytische Aktivität detektiert werden (ohne Abb.)

Ein Vorteil immobilisierter Biokatalysatoren ist die Möglichkeit, sie nach durchgeführter Katalyse aus dem Reaktionsgemisch entfernen und wiederverwenden zu können. Diese Eigenschaft wurde ebenfalls untersucht, indem an Beads immobilisierter LipAH Komplex mehrfach hintereinander in einen Enzymaktivitätstest (2.24.1) eingesetzt und die lipolytische Aktivität bestimmt wurde, um ihn anschließend wieder aus der Reaktion zu entfernen (Abb. 3.34).

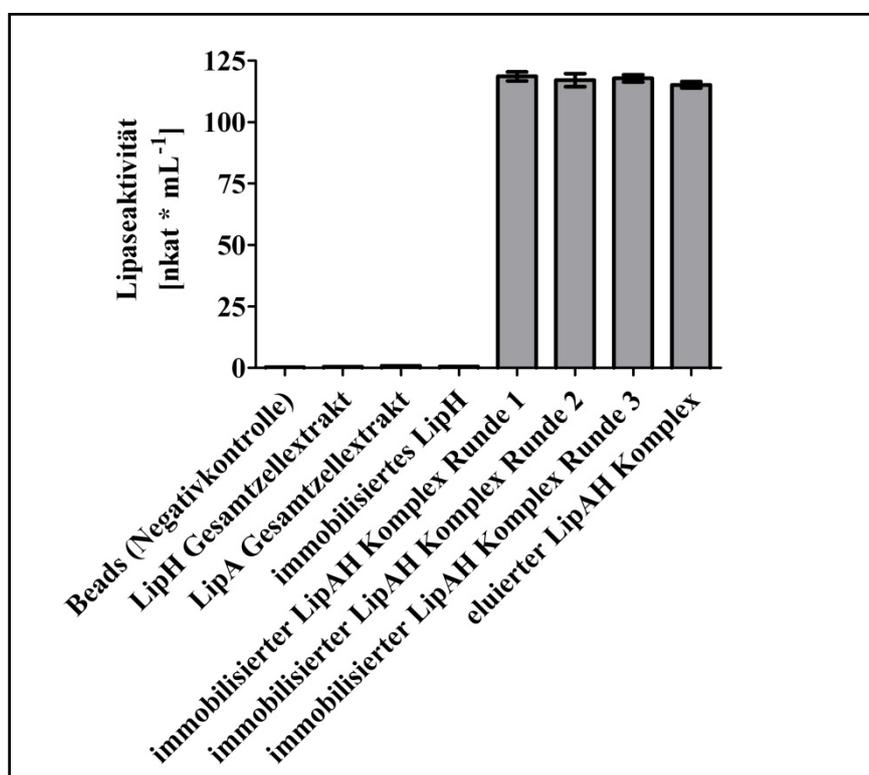


Abb. 3.34: Vergleich der lipolytischen Aktivität des immobilisierten LipAH Komplexes bei mehreren aufeinanderfolgenden Biotransformationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Bei Vergleich der aufeinanderfolgenden gemessenen Hydrolysen des *p*NPP konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt werden.

Es ist möglich, durch Nutzung der hohen Affinität der Lipase-spezifischen Foldase LipH aus *P. aeruginosa* eine gekoppelte „Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ von heterolog exprimiertem LipA durchzuführen. Der immobilisierte Proteinkomplex weist auch bei mehrmalig hintereinander durchgeführter Biotransformation keinen Verlust hinsichtlich seiner katalytischen Aktivität auf.

3.5.3 Der *in vitro* generierte LipAH Komplex weist vergleichbare Eigenschaften wie homolog exprimierte Lipase auf

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der gereinigte Lipase-Foldase Komplex katalytische Aktivität aufweist, wurde untersucht, ob die biochemischen Eigenschaften des Katalysators, wenn er an sein Chaperons gebunden vorliegt, mit denen freier Lipase aus einem Kulturüberstand nach homologer Expression vergleichbar sind. Auch wenn das katalytisch aktive Zentrum innerhalb des Proteinkomplexes funktionell zu sein scheint, konnten leichte Konformationsänderungen der Lipase durch die Interaktionen mit LipH, die sich über einen großen Teil der Enzymoberfläche erstrecken, nicht ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob die Eigenschaften des Enzyms bewahrt bleiben, wurde eine Auswahl biochemischer Parameter für den Lipase-LipH Komplex aufgenommen und denjenigen freier Lipase aus dem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* gegenübergestellt.

LipA weist eine Präferenz für die Hydrolyse von *p*-Nitrophenolestern mit gesättigten Fettsäuren der Kettenlängen von C₁₂ bis C₁₆ auf. Um die Kettenlängenspezifität der Lipase im Komplex mit der von freier Lipase zu vergleichen, wurden Substratspektren mit *p*NP-Derivaten, die mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge verestert waren, aufgenommen (2.24.1). Es konnten keine Unterschiede zwischen der Kettenlängenpräferenz freier und gebundener Lipase gegenüber den untersuchten Substraten beobachtet werden (Abb. 3.35 A).

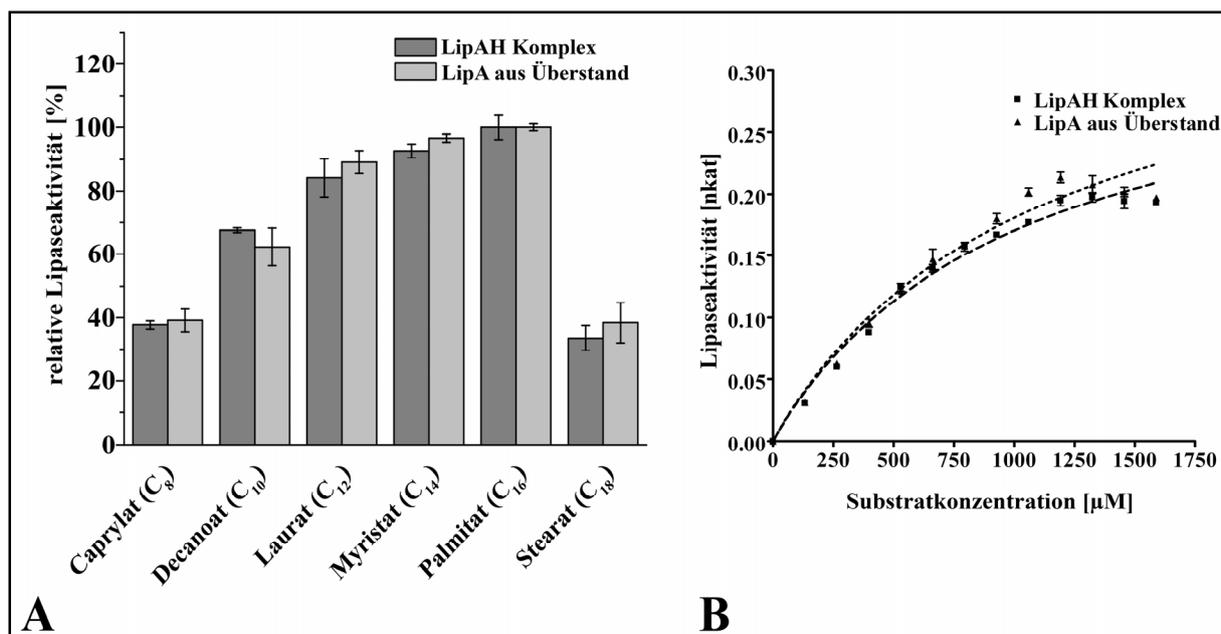


Abb. 3.35: (A) Spezifität von *in vitro* generiertem LipAH Komplex und freiem LipA aus dem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* gegen *p*-Nitrophenolester mit unterschiedlicher Kettenlänge. Die gemessene lipolytische Aktivität in fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist jeweils für die Proben relativ zu der Aktivität gegen *p*NPP angegeben (für LipA aus dem Kulturüberstand 42,2 nkat und für den LipAH Komplex 45,1 nkat). Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. (B) Abhängigkeit der Substratkonzentration von *p*NPP auf die lipolytische Aktivität des LipAH Komplex und freier Lipase zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten. Die acht jeweils unabhängig voneinander ermittelten Datensätze wurden verwendet, um K_m in Prism 4 durch nichtlineare Regression zu bestimmen.

Sowohl die an ihr Chaperon gebundene als auch die freie Lipase wiesen die stärkste Aktivität gegen das Substrat *p*NPP mit einer C₁₆-Fettsäure auf. Um sicherzustellen, dass die Affinität der Lipase im Komplex vergleichbar mit derjenigen von freier Lipase ist, wurden für dieses Substrat die Michaelis-Konstanten K_m bestimmt. Die Aktivität der Lipase wurde bei variierenden Substratkonzentrationen bestimmt (2.24.1) und K_m mit Hilfe der nichtlinearen Regression in Prism berechnet (Abb. 3.35 B). Für den LipAH-Komplex wurde bereits eine Michaelis-Konstante von 1,066 mM mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9797$ ermittelt (3.2.3). Für die Lipase aus dem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* wurde eine vergleichbare Michaelis-Konstante von $K_m = 1,104$ mM bestimmt ($R^2 = 0,9654$).

Als weiteres Charakteristikum wurde die Stabilität beider Biokatalysatoren gegenüber thermischer Inaktivierung analysiert. Hierzu wurden die Proben für 30 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und direkt im Anschluss die verbliebene Enzymaktivität durch einen *p*NPP Test bestimmt (Abb. 3.36).

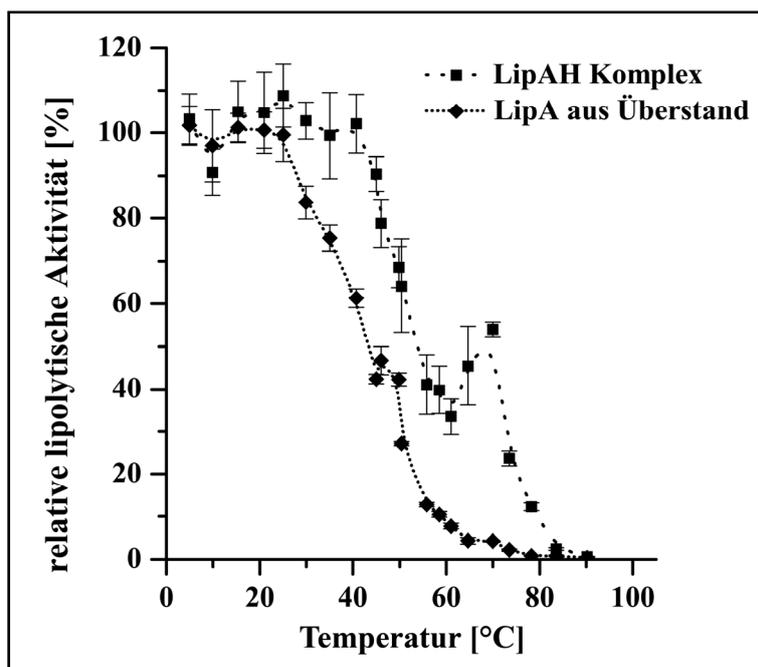


Abb. 3.36: Resistenz von LipAH und freiem LipA gegenüber thermischer Inaktivierung. Die Proben wurden jeweils für 30 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert und direkt im Anschluss deren relative lipolytische Aktivität in Bezug auf eine Kontrolle, die nicht thermisch behandelt wurde, bestimmt (spezifische Aktivität der Positivkontrollen im Fall von LipA aus dem Kulturüberstand 43 nkat, von LipA mit LipH komplexiert 41,6 nkat). Dargestellt ist der Mittelwert aus acht voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Bei den Proben der Lipase aus dem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* konnte bereits nach 30 minütiger Inkubation bei einer Temperatur von etwa 44 °C eine Abnahme der lipolytischen Aktivität um 50 % verglichen mit einer Probe, die nicht thermisch behandelt wurde, beobachtet werden. Dagegen zeigte der Lipase-LipH Komplex erst bei 54 °C einen vergleichbaren Aktivitätsverlust.

Der LipAH Komplex weist hinsichtlich der Kettenlängenspezifität gegenüber *p*NP-Derivaten und seiner Affinität für *p*NPP vergleichbare Eigenschaften wie freie Lipase aus dem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* auf. Der Komplex zeigt zudem eine erhöhte Resistenz gegen thermische Inaktivierung in Relation zu freiem LipA.

3.5.4 Die heterolog exprimierte Lipasevariante 1H8 zeigt die gleiche Enantiopräferenz im Komplex mit LipH wie homolog exprimierte Lipase

Die unter 3.5.3 untersuchten biochemischen Eigenschaften zeigen, dass sich freie Lipase und ein LipAH Komplex hinsichtlich eher grundlegender Eigenschaften vergleichbar verhalten. Wie schon unter 3.4 beschrieben wurde die Bindetasche der LipA Variante 1H8 durch Mutation von 6 Resten verändert, so dass die Enantioselektivität der Hydrolyse des chiralen Substrats 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol von $E = 1,1$ auf $E = 51$ gesteigert werden konnte (Reetz *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 2002; Bocola *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob LipA 1H8 in der *in vitro* aktivierten und mit LipH komplexierten Form die gleiche Enantioselektivität aufweist wie LipA 1H8 nach homologer Expression in *P. aeruginosa*, wurden die heterolog exprimierten und gereinigten Proteine LipA 1H8 und LipH_T-NHis dazu genutzt, eine homogene Lösung des entsprechenden Proteinkomplexes unter Verwendung von Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) zu generieren (2.23). Im Anschluss wurde die Enantioselektivität von freiem und an das Chaperon gebundenem LipA 1H8 untersucht.

Da das Modellsubstrat 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol jedoch nicht kommerziell erhältlich ist, wurde ein Enantiomeregemisch dieses Stoffes mit freundlicher Unterstützung des „Instituts für Bioorganische Chemie“ (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) synthetisiert (2.28) und seine Struktur und Reinheit per NMR verifiziert. Die mit dem Programm ChemDraw (CambridgeSoft, Cambridge, USA) kalkulierten und aufgenommenen chemischen Verschiebungen waren im ¹H NMR-Spektrum bis auf ein zusätzliches, durch das AB-System des Protons im chiralen Zentrum hervorgerufenen Signal mit einer chemischen Verschiebung von 1,78 ppm, welches nicht von ChemDraw berechnet wurde, identisch. (Abb. 3.37). Weiterhin konnten durch Integration der Signale die korrekte Anzahl an Protonen nachgewiesen werden.

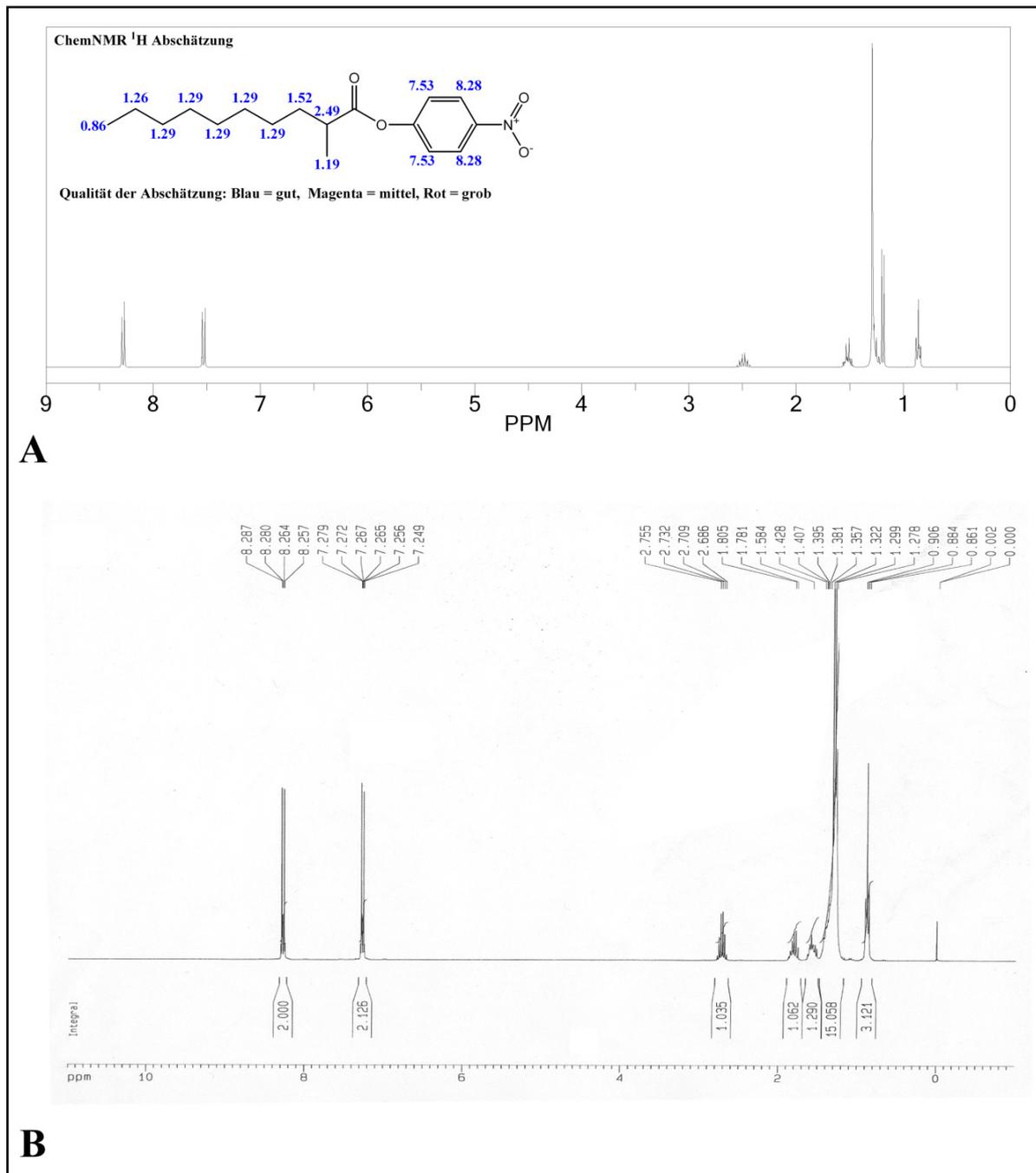


Abb. 3.37: NMR-Analyse des synthetisierten 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenols anhand der kalkulierten (A) und gemessenen (B) chemischen Verschiebung der Protonen im ^1H -Spektrum. Das theoretische Spektrum wurde mit ChemDraw berechnet. Die die verschiedenen Signale hervorrufenden Wasserstoffatome sind jeweils nach ihrer Lokalisation im Molekül und ihrer chemischen Verschiebung in der skizzierten Struktur vermerkt. Auf den x-Achsen ist jeweils die chemische Verschiebung der Protonen in ppm angegeben. Zwischen der x-Achse und den Signalen ist die durch Integration ermittelte Anzahl an Protonen dargestellt. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 0 ppm ist auf den internen Standard Tetramethylsilan (TMS) zurückzuführen.

Im Anschluss wurde versucht, das als Zwischenstufe synthetisierte racemische Gemisch des 2-Methyldecanoats, welches auch nach Hydrolyse durch die Lipasen entsteht, per Gaschromatographie zu trennen (Abb. 3.38).

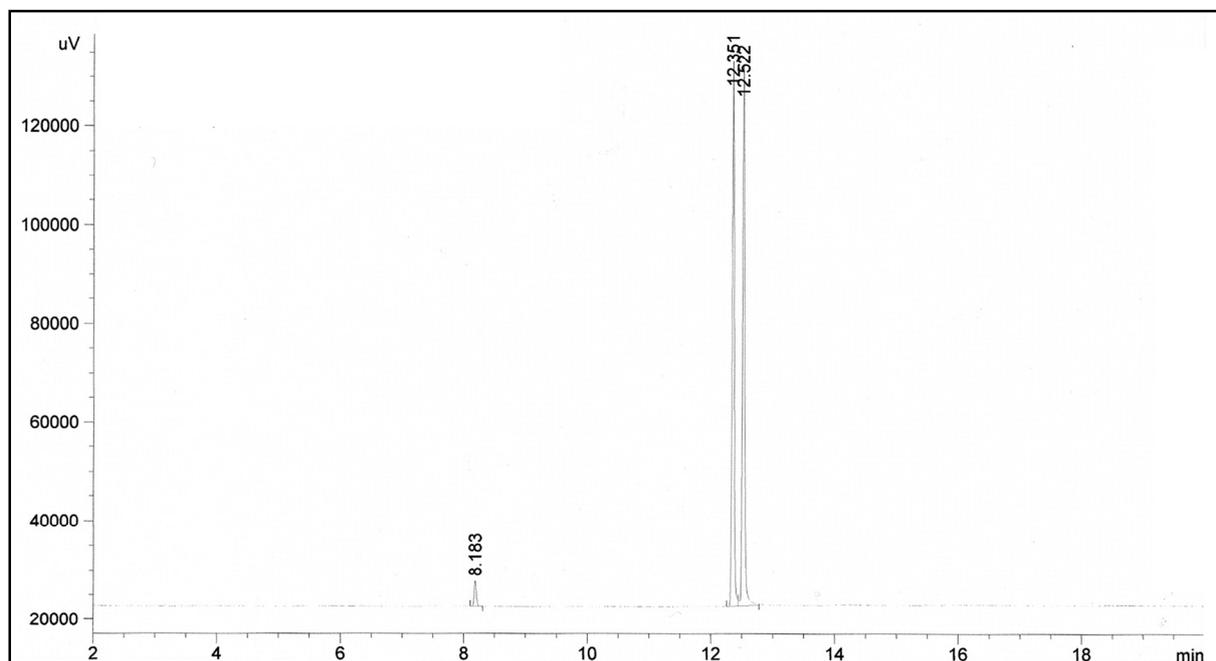


Abb. 3.38: Trennung der Enantiomere von 2-Methyldecanoat durch Gaschromatographie an chiraler Phase. Im Chromatogramm ist die gemessene Leitfähigkeit am Detektor (y-Achse) gegen die Retentionszeit (x-Achse) aufgetragen. Die Retentionszeit für das (R)-Enantiomer betrug 12,351 und die des (S)-Enantiomers 12,522 min. Die Trennung des Enantiomerengemisches wurde auf der Gaschromatographiesäule FS-Cyclodex β -IP (50 m x 0,32 mm) der Firma CS GmbH (Langerwehe) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 120 °C \rightarrow 195 °C; m = 5 °C/ min; HOLD 5 min.

Nach der erfolgreichen Etablierung eines geeigneten Programms für die Trennung des (S)- und (R)-Enantiomers des 2-Methyldecanoats wurde der enzymatische Umsatz des 2-Methyldecanoats mit den Lipasen LipA 1H8 und Wildtyp LipA, jeweils im Komplex mit seinem Chaperon und in freier Form nach Expression im homologen Wirt, durchgeführt. Die Reaktion wurde gestoppt und das Edukt sowie die entstandenen Produkte extrahiert (2.24.2), um sie per Gaschromatographie zu analysieren (Abb. 3.39).

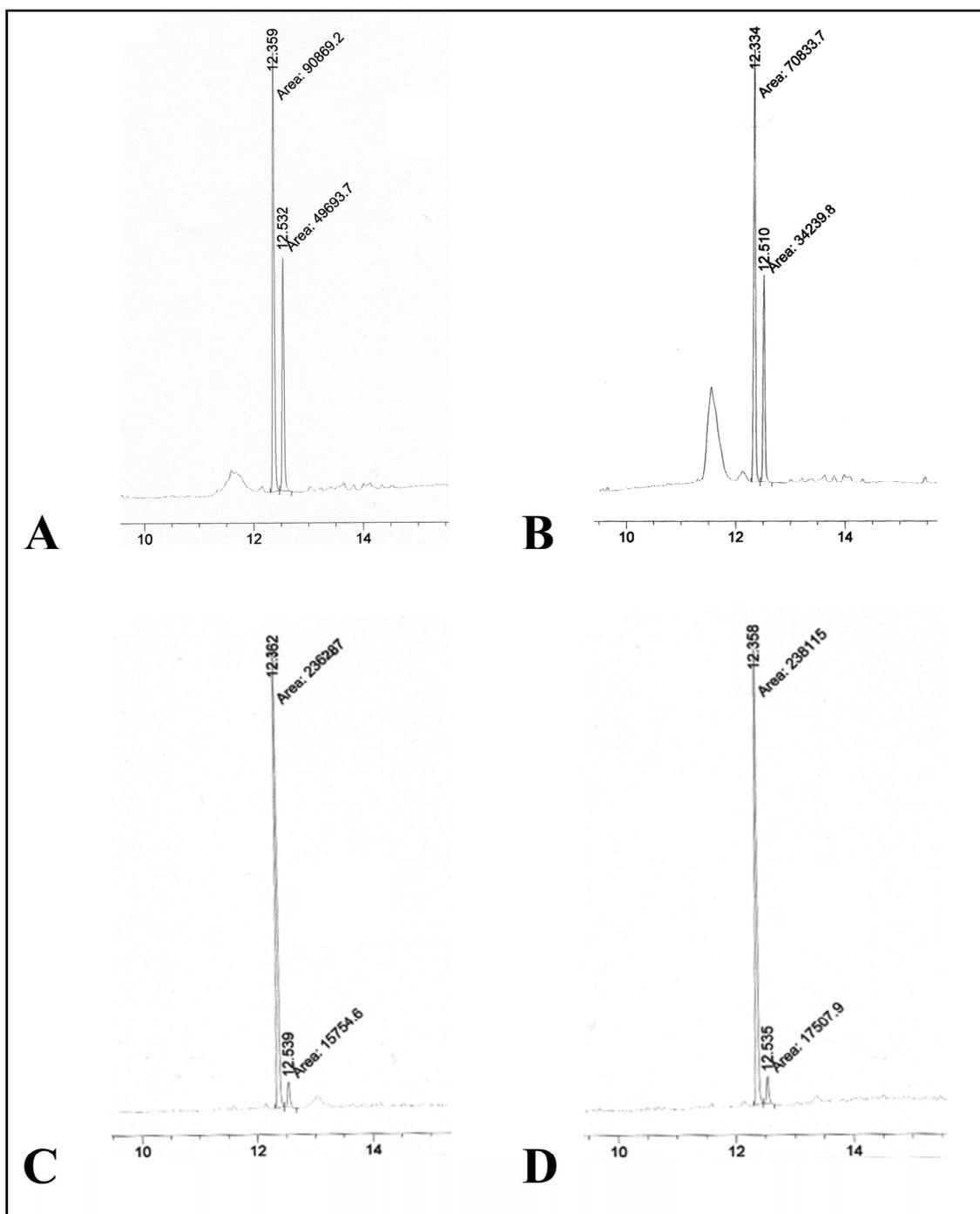


Abb. 3.39: Trennung der Enantiomere von 2-Methyldecanoat durch Gaschromatographie an chiraler Phase nach lipolytischer Spaltung von 2-Methyldecansäure-p-Nitrophenol. (A) freies LipA (B) LipAH Komplex (C) freies LipA 1H8 (D) Komplex aus LipA 1H8 und LipH. In den jeweils abgebildeten relevanten Teilen des Chromatogramms ist die gemessene Leitfähigkeit am Detektor (y-Achse) gegen die Retentionszeit (x-Achse) aufgetragen. Die Trennung des Enantiomerengemisches wurde auf der Gaschromatographiesäule FS-Cyclodex β -IP (50 m x 0,32 mm) der Firma CS GmbH (Langerwehe) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 120 °C \rightarrow 195 °C; m = 5 °C/min; HOLD 5 min.

Aus den Integralen der Flächen der detektierten Enantiomere des durch die lipolytische Aktivität entstandenen 2-Methyldecanoats und der synthetisierten Säure als Standard wurden die Umsatzraten der Reaktion und der E-Wert der Lipasen bestimmt (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Enantioselektivität der Hydrolyse von 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol, katalysiert durch Wildtyp LipA und LipA 1H8 aus Kulturüberständen nach homologer Expression und mit ihrem Chaperon LipH komplexiert.

Lipase	Quelle	Umsatzrate [%]	ee [%]	E-Wert
Wildtyp LipA	Kulturüberstand (frei)	26	29,3	2,0
Wildtyp LipA	„inclusion bodies“ (im Komplex mit LipH nach <i>in vitro</i> Aktivierung)	19	34,8	2,1
LipA 1H8	Kulturüberstand (frei)	46	87,5	33
LipA 1H8	„inclusion bodies“ (im Komplex mit LipH nach <i>in vitro</i> Aktivierung)	47	86,3	31

Hierbei konnte für die Wildtyp Lipase ein E-Wert von 2 bzw. 2,1 und für LipA 1H8 eine Enantioselektivität von E = 33 bzw. 31 bestimmt werden. Dadurch wurde die Unabhängigkeit der Enantioselektivität von LipA 1H8 von der Bindung zu seinem Chaperon und die volle Integrität der Bindetasche, auch im Lipase-LipH Komplex, gezeigt.

LipA 1H8 weist unabhängig von seiner Bindung zu LipH auch im Proteinkomplex die gleiche Enantioselektivität gegen 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol auf wie homolog exprimiertes, freies Enzym aus dem Kulturüberstand.

3.5.5 Der LipAH-Proteinkomplex kann nicht durch unterschiedliche physikalische, chemische oder biologische Methoden aufgelöst werden

Für einige Applikationen oder für die Wiederverwendung des immobilisierten Chaperons für eine erneute Reinigung von Lipase wäre es zweckmäßig, eine Möglichkeit zur Dissoziation des Lipase-Foldase Komplexes zu besitzen. Im Folgenden wurde ein Komplex aus LipA und LipH_T-NH₂ per kombinierter „Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ (2.23) generiert und überprüft, ob der an das Chromatographiematerial gebundene Proteinkomplex durch physikalische oder chemische Einflüsse aufgelöst werden kann. Zunächst wurde versucht, über Erhöhung der Salzkonzentration eine Dissoziation des LipAH-Komplexes zu bewirken. Der an Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) gebundene erstellte Proteinkomplex wurde zu diesem Zweck mit Rückfaltungspuffer (2.18), dem unterschiedliche Konzentrationen NaCl zugesetzt wurden, 30 min inkubiert. Daraufhin wurden die Beads mit Elutionspuffer behandelt und die beiden Fraktionen sowohl bezüglich ihres Anteils an LipA und LipH per SDS-PAGE (2.26) analysiert als auch deren lipolytische Aktivität bestimmt (2.24.1).

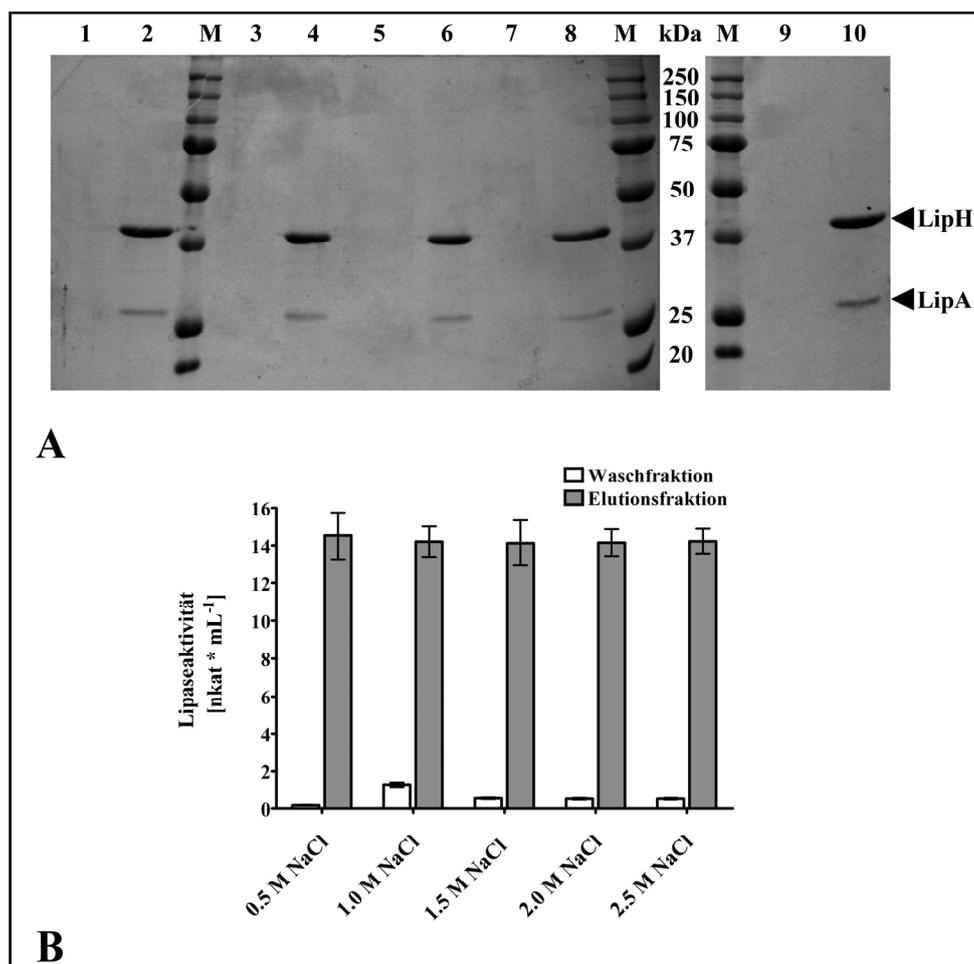


Abb. 3.40: Analyse der mit NaCl behandelten Fraktionen des immobilisierten LipAH Komplexes. (A) SDS-PAGE zur Analyse des LipA und LipH_T-NH₂ Gehalts der Fraktionen. In aufeinanderfolgenden Spuren wurden jeweils die Wasch- (links) und die Elutionsfraktionen (rechts) aufgetragen. M: Marker; 1 & 2: 0,5 M NaCl; 3 & 4: 1 M NaCl; 5 & 6: 1,5 M NaCl; 7 & 8: 2 M NaCl; 9 & 10: 2,5 M NaCl. Nach der Elektrophorese wurde das 12 %ige Trenngel mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt. **(B) Enzymaktivitätstest der Fraktionen mit pNPP als Substrat.** Die gezeigte Lipaseaktivität ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken gegeben ist.

Wie in Abb. 3.40 gezeigt, konnte keine Auflösung des LipAH Komplexes durch Erhöhung der NaCl-Konzentration ausgelöst werden. In den Proben, die nach Inkubation mit dem Rückfaltungspuffer mit den verschiedenen Salzkonzentrationen genommen wurden, konnte weder per SDS-PAGE noch durch Messung der lipolytischen Aktivität eine Anwesenheit von LipA nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob eventuell eine temporäre Erhöhung der Temperatur eine Dissoziation der Proteine zur Folge hat, wurden Proben von an Beads immobilisiertem LipAH Komplex für jeweils 5 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit Elutionspuffer behandelt und Proben beider Fraktionen per SDS-PAGE (2.26) und *p*NPP Test (2.24.1) analysiert (Abb. 3.41).

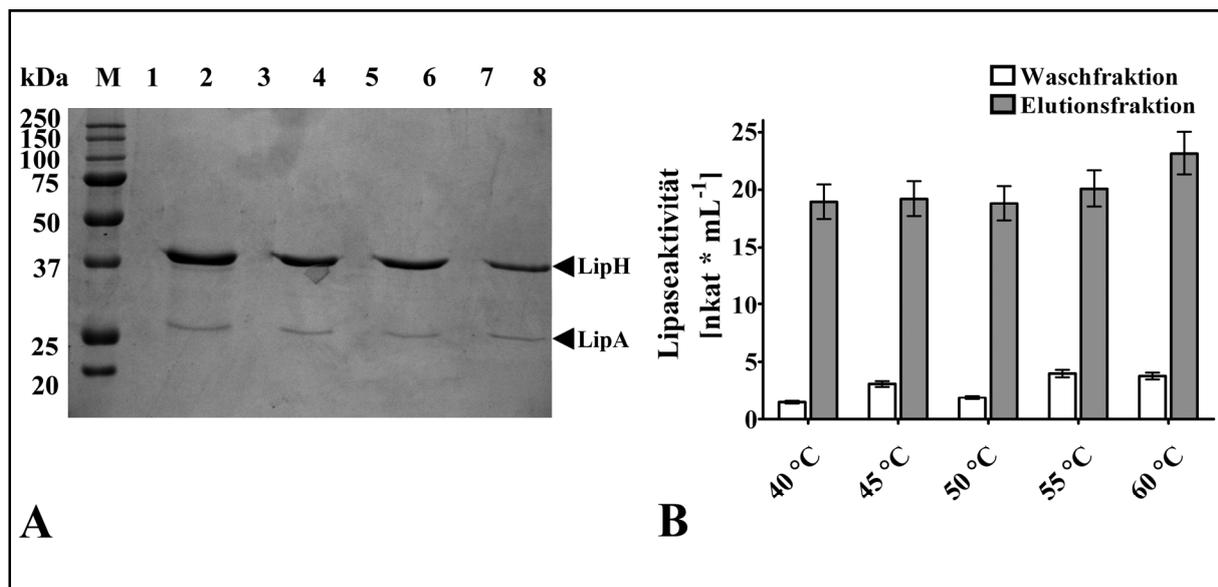


Abb. 3.41: Analyse der Fraktionen des bei verschiedenen Temperaturen inkubierten immobilisierten LipAH Komplexes. (A) SDS-PAGE zur Analyse des LipA und LipH₇-NHis Gehalts der Fraktionen. In aufeinanderfolgenden Spuren wurden jeweils die Fraktionen nach Temperaturexposition (links) und die Elutionsfraktionen (rechts) aufgetragen. M: Marker; 1 & 2: 45 °C; 3 & 4: 50 °C; 5 & 6: 55 °C; 7 & 8: 60 °C. Nach der Elektrophorese wurde das 12 %ige Trenngel mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt. **(B) Enzymaktivitätstest der Fraktionen mit *p*NPP als Substrat.** Die gemessene Lipaseaktivität in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten ist als Mittelwert dargestellt, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung repräsentiert.

Auch durch Erhöhung der Temperatur konnte keine Dissoziation des Proteinkomplexes bewirkt werden. In den bei den verschiedenen Temperaturen inkubierten Proben konnten keine Proteine oder eine signifikant erhöhte lipolytische Aktivität detektiert werden.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, die Proteine durch partielle Denaturierung durch Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen Urea zum Rückfaltungspuffer zu lösen. Nachträglich wurden die Beads wie bereits beschrieben mit Elutionspuffer inkubiert und die erhaltenen Fraktionen durch eine SDS-PAGE (2.26) und einen *p*NPP Test (2.24.1) untersucht.

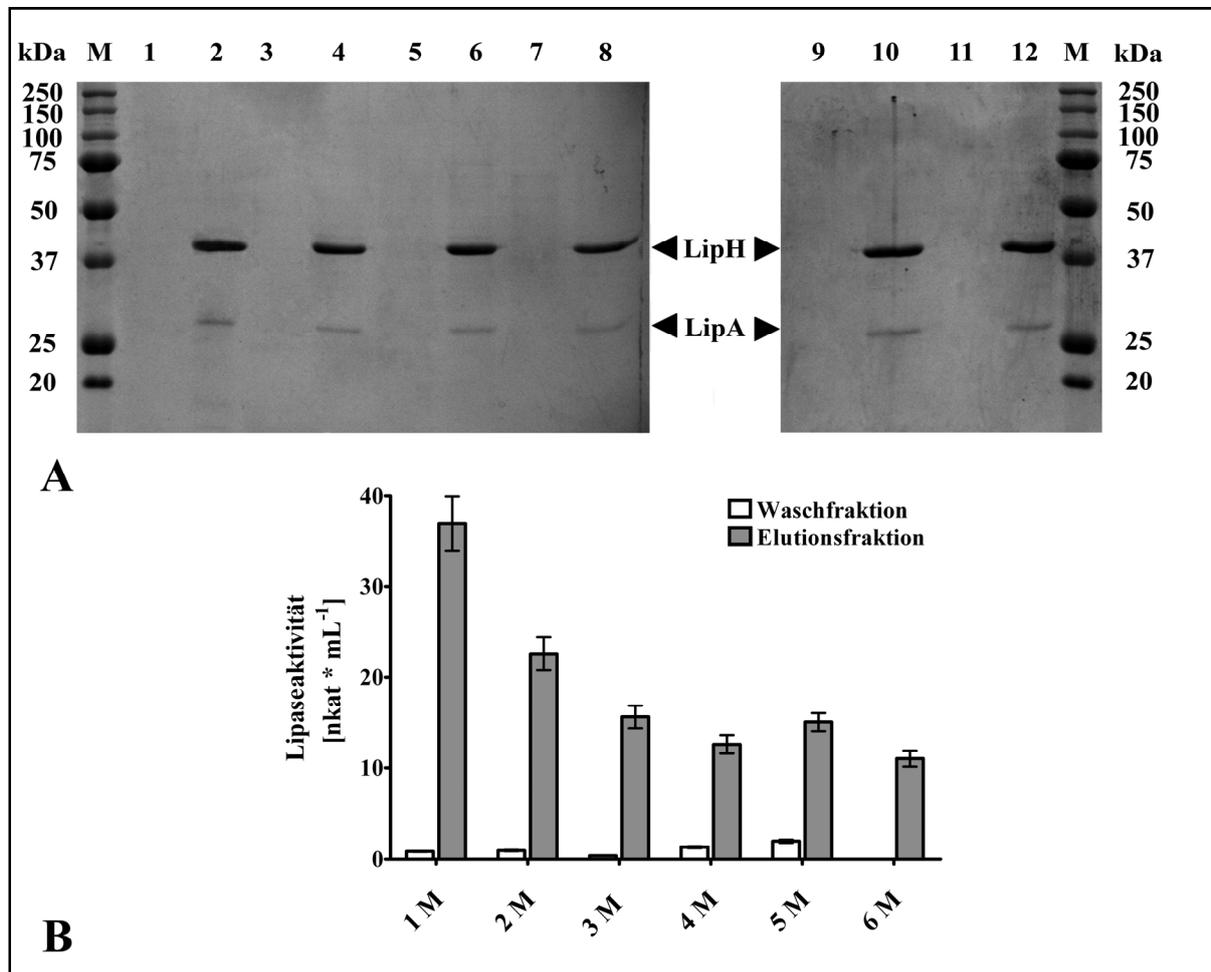


Abb. 3.42: Analyse der Fraktionen des mit steigenden Urea-Konzentrationen inkubierten immobilisierten LipAH Komplexes. (A) SDS-PAGE zur Analyse des LipA und LipH-NHis Gehalts der Fraktionen. In aufeinanderfolgenden Spuren wurden jeweils die Wasch- (links) und die Elutionsfraktionen (rechts) aufgetragen. M: Marker; 1 & 2: 1 M Urea; 3 & 4: 2 M Urea; 5 & 6: 3 M Urea; 7 & 8: 4 M Urea; 9 & 10: 5 M Urea; 11 & 12: 6 M Urea. Nach der Elektrophorese wurde das 12 %ige Trenngel mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt. (B) Enzymaktivitätstest der Fraktionen mit *p*NPP als Substrat. Die gemessene Enzymaktivität von drei durchgeführten Experimenten ist als Mittelwert gezeigt, wobei der Fehlerbalken jeweils die Standardabweichung repräsentiert.

Wie in Abb. 3.42 gezeigt, wies der Proteinkomplex auch bei Anwesenheit des Denaturans eine so hohe Stabilität auf, dass er nicht durch Zugabe von bis zu 6 M Urea aufgelöst werden konnte. Es konnte weder durch die SDS-PAGE noch durch Messung der lipolytischen Aktivität ein Vorhandensein von LipA in den Waschfraktionen, die nach der Inkubation mit Urea aufgefangen wurden, nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte jedoch in allen Elutionsfraktionen eine deutliche messbare Enzymaktivität detektiert werden. Ab einer in dem Rückfaltungspuffer enthaltenen Konzentration von 3 M Urea sank die lipolytische Aktivität der Elutionsfraktionen nicht mehr signifikant.

Da alle bisherigen Versuche, eine Lösung von LipA und LipH innerhalb des Proteinkomplexes zu induzieren erfolglos blieben, wurden im weiteren Verlauf der Experimente nach spezifischeren Möglichkeiten gesucht, die Dissoziation zu bewirken. Wie schon unter 3.4.2 beschrieben, stellt die korrekte Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke durch die Interaktion mit dem Dsb-System eine Notwendigkeit für die Sekretion von LipA dar (Nardini *et al.*, 2000; Liebeton *et al.*, 2001). Somit wäre es denkbar, dass eine durch die Ausbildung der kovalenten Bindung induzierte Konformationsänderung von LipA dazu beiträgt, die Lösung des Lipase-LipH Komplexes im Periplasma zu induzieren, um eine Sekretion durch die Typ-II Sekretionsmaschinerie zu ermöglichen und gleichzeitig sicherzustellen, dass nur fertig gefaltete und prozessierte Lipase in den Überstand abgegeben wird. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden Proben von an Ni-NTA Magnetbeads immobilisiertem LipAH Komplex mit Rückfaltungspuffer, der mit einem molaren Überschuss an oxidiertem bzw. reduziertem Glutathion versetzt wurde, für 20 min inkubiert, um die vollständige Bildung bzw. Auflösung der intramolekularen Disulfidbrücke des LipA *in vitro* zu erreichen. Danach wurden die Beads ein weiteres Mal mit Rückfaltungspuffer gewaschen und der restliche gebundene Anteil des Komplexes durch Behandlung der Beads mit Elutionspuffer entfernt. Im Anschluss wurde die lipolytische Aktivität aller Fraktionen durch einen pNPP Test (2.24.1) bestimmt (Abb. 3.43).

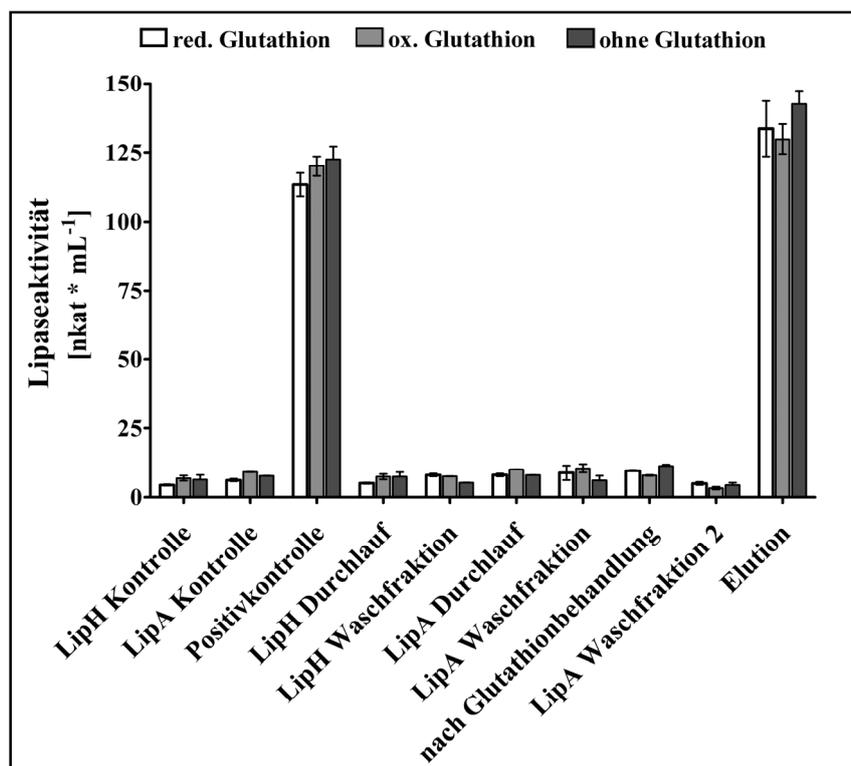


Abb. 3.43: Lipolytische Aktivität der Fraktionen vor und während der durchgeführten kombinierten „Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ von LipA durch LipH_r-NH₂ und Inkubation mit oxidiertem bzw. reduziertem Glutathion. Als Kontrolle wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der nach erfolgter Komplexbildung mit unverändertem Rückfaltungspuffer gewaschen wurde. Die Aktivität der Positivkontrolle bezieht sich auf Ansätze, in denen LipA „klassisch“ nach 2.18 *in vitro* in Rückfaltungspuffer mit reduziertem bzw. oxidiertem Glutathion renaturiert wurde. Die gezeigte Lipaseaktivität ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken gegeben ist.

Die Inkubation des immobilisierten Enzym-Chaperon Komplexes mit reduziertem bzw. oxidiertem Glutathion hatte keinen Einfluss auf die Protein-Protein Interaktion. Die lipolytischen Aktivitäten der Fraktionen aller durchgeführten Testreihen waren allesamt mit denjenigen der Kontrolle, die mit unverändertem Rückfaltungspuffer behandelt wurden, vergleichbar.

Um der Frage nachzugehen, ob der Komplex aus Lipase und Chaperon durch noch nicht gefaltetes Enzym aufgelöst werden kann, oder sich LipH während der *in vitro* Renaturierung wie ein *single turnover catalyst* verhält, wurde eine neue Lipasevariante erstellt, in der das für die Katalyse essentielle, im aktiven Zentrum lokalisierte, Ser⁸² durch ortsgerichtete Mutagenese (2.10.2) durch ein Alanin substituiert ist. Hierzu wurden zuerst zwei PCR-Reaktionen mit den Primern „S82A RC“ und „LipA FW“ bzw. „S82A“ und „LipA RC“ unter Verwendung des Vektors pUCPL6A, der das Wildtyp *lipAH* Operon trägt, als Matrizen-DNA durchgeführt, um zwei überlappende und die Mutation tragende Genfragmente zu generieren. Diese wurden gereinigt (2.6) und in etwa äquimolaren Mengen zusammen in einer weiteren PCR mit den Primern „LipA FW“ und „LipA RC“ eingesetzt, um das vollständige, die Mutation enthaltende, *lipA S82A* zu erhalten. Das entstandene PCR-Produkt sowie der Zielvektor pUCPL6AGAT-RFA wurden mit *PaeI* und *PpuMI* hydrolysiert, gereinigt und ligiert. Der neu konstruierte Vektor pUCPL6AS82A, der das mutagenisierte *lipAH* Operon unter Kontrolle des T7-Promotors enthält, wurde zur Expression in den Lipase-defizienten Stamm *P. aeruginosa* PABST7.1 durch Transformation (2.8) eingebracht und exprimiert (2.4.3). Danach wurde die Kultur geerntet und die lipolytische Aktivität des Überstand der Expressionskultur im Vergleich zu den Überständen von Kulturen, die das Wildtyp *lipAH* Operon bzw. den entsprechenden Leervektor pUCPKS exprimierten, bestimmt (Abb. 3.44 A). Wie erwartet konnte bei Expression der Lipasevariante, in der das katalytisch aktive Serin durch ein Alanin ausgetauscht wurde, keine lipolytische Aktivität detektiert werden. Um die erfolgreiche Expression von LipA S82A immunologisch nachzuweisen wurden präparierte Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände der Expressionskultur von LipA S82A und einer Kultur, die als Negativkontrolle verwendet wurde und den Leervektor exprimierte, für einen Western Blot verwendet (Abb. 3.44 B). Hierbei konnte die katalytisch inaktive Lipasevariante sowohl im Gesamtzellextrakt als auch im Überstand der Kultur nachgewiesen werden. Durch das detektierte Signals in der Probe des Kulturüberstands konnte davon ausgegangen werden, dass der eingeführte Austausch keinen erheblichen Einfluss auf die Tertiärstruktur der Lipase hat, da eine Interaktion mit den im homologen Wirt für die Prozessierung und Sekretion essentiellen akzessorischen Proteinen weiterhin gewährleistet war.

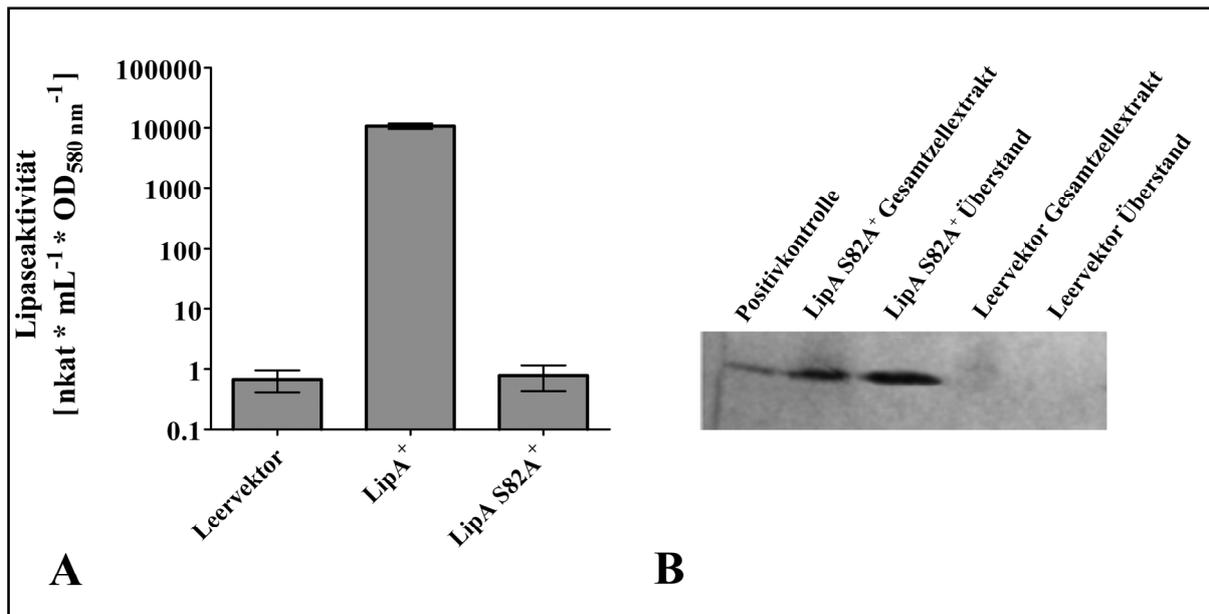


Abb. 3.44: (A) Lipolytische Aktivität von Kulturüberständen nach homologer Expression von LipA und LipA S82A unter Kontrolle des T7-Promotors sowie einer Kultur mit dem entsprechenden Leervektor pUCPKS. Die Daten wurden durch jeweils 3 voneinander unabhängig angezogene Kulturen in Doppelbestimmung ermittelt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Wegen der starken Unterschiede der lipolytischen Aktivität der Kulturen wurde eine logarithmische Skalierung der Y-Achse vorgenommen. **(B) Immunologischer Nachweis von LipA S82A im Gesamtzellextrakt und Kulturüberstand nach homologer Expression unter Kontrolle des T7-Promotors.** Die aufgetragenen Volumina der Proben der Kulturen wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580 nm} = 0,6). Als Kontrollen wurde zum Einen gereinigtes LipA (Positivkontrolle), zum Anderen Gesamtzellextrakt und Kulturüberstand einer Kultur, die mit dem Leervektor pUCPKS ausgestattet wurde, verwendet.

Daraufhin wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pUCPL6AS82A transformiert, um die Lipase heterolog zu überexprimieren (2.4.3). Durch das Fehlen des für die Sekretion notwendigen Xcp-Apparats war zu erwarten, dass LipA S82A bei heterologer Expression auch bei Anwesenheit von *lipH* bei starker Expression intrazellulär akkumuliert und in „inclusion bodies“ abgelagert wird. Dies wurde durch Löslichkeitsanalyse (2.16) des Gesamtzellextrakts nach erfolgter Expression durch eine SDS-PAGE (2.26) überprüft (Abb. 3.45 A). Nachdem sichergestellt werden konnte, dass LipA S82A in diesem Expressionssystem in „inclusion bodies“ vorlag, wurde die Lipase durch aufeinanderfolgende Zentrifugations- und Extraktionsschritte gereinigt (2.17). Der Erfolg der Reinigung wurde per SDS-PAGE (2.26) analysiert (ohne Abb.) und die gereinigte Proteinmenge mittels BCA-Assay quantifiziert. Insgesamt konnten aus 2 L einer Überexpressionskultur 43 mg der inaktiven Variante LipA S82A gewonnen werden.

Die gereinigte inaktive Lipase-Variante wurde verwendet, um zu überprüfen, ob eine Inkubation eines schon gebildeten Lipase-Chaperon Komplexes mit noch nicht gefalteter Lipase zur Dissoziation des aktivierten Enzyms und seiner Foldase führt. Dazu wurden Proben von an Ni-NTA Magnetbeads immobilisiertem LipAH Komplex mit Rückfaltungspuffer, der einen molaren Überschuss an denaturiertem und auf den „nahen nativen“ Zustand überführten LipA S82A enthielt, für 3 h inkubiert. Danach wurden die Beads ein weiteres Mal mit Rückfaltungspuffer gewaschen und noch einmal mit LipA S82A inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der restliche gebundene Anteil des Komplexes von den Beads durch Behandlung mit Elutionspuffer entfernt. Im Anschluss

wurde die lipolytische Aktivität aller Fraktionen durch einen *p*NPP Test (2.24.1) bestimmt (Abb. 3.45 B).

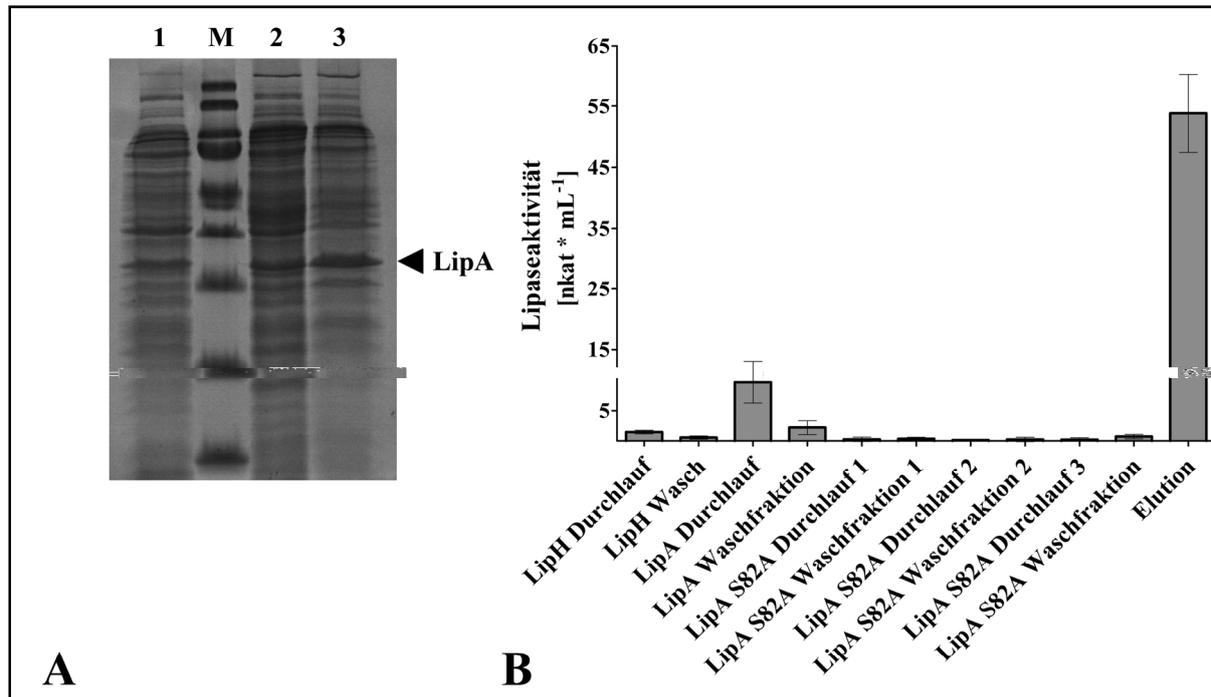


Abb. 3.45: (A) Löslichkeitsanalyse von LipA S82A nach heterologer Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors. M: Marker; 1: Gesamtzellextrakt von Induktion; 2: lösliche Fraktion des Gesamtzellextrakts nach Induktion; 3: unlösliche Fraktion des Gesamtzellextrakts nach Induktion. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$). Das 12 %ige Trenngel wurde nach der Elektrophorese mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt. (B) Lipolytische Aktivität der Fraktionen der durchgeführten kombinierten „Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ von LipA durch LipH_I-NHis und nachfolgende Inkubation mit gereinigtem LipA S82A. Die gezeigte Aktivität stellt den Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung repräsentieren.

Es konnte lediglich in dem Durchlauf, der die noch nicht gefaltete Lipase enthielt, und in der Elutionsfraktion eine deutlich messbare lipolytische Aktivität detektiert werden. Wäre LipA S82A in der Lage gewesen, bereits *in vitro* aktivierte Wildtyp Lipase von seinem gebundenen Chaperon zu verdrängen, so hätte sich in den jeweiligen Durchläufen enzymatische Aktivität nachweisen lassen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich ein bereits ausgebildeter Proteinkomplex aus LipA und LipH nicht durch Zugabe von weiterer noch nicht aktivierter Lipase auflösen lässt.

Im Rahmen einer anderen Arbeit wurde bei Koexpression eines Peptids *in trans*, welches das N-terminal gelegene Drittel der Lipase umfasst, eine Erhöhung der Ausbeute bei Überexpression des *lipAH* Operons um den Faktor 4 bis 5 beschrieben (Hacker, 2003). Als Grund für diese Beobachtung wurde eine Kompetition des als LA-1 bezeichneten Peptids um die Bindung an LipH, die eine schnellere Umsatzrate von Lipase bedingen könnte, diskutiert. Anhand eines Strukturmodells des Lipase-LipK Komplexes aus *P. aeruginosa*, welches aus der gelösten Struktur des homologen Proteinkomplexes aus *B. glumae* (Pauwels *et al.*, 2006) berechnet und freundlicherweise vom „Department of Molecular and Cellular Interactions“ (Freie Universität Brüssel, Belgien) zur Verfügung gestellt wurde, konnte die Lage des N-terminalen Drittels der Lipase im Komplex nachvollzogen werden (Abb. 3.46). Das Peptid LA-1 beinhaltet einen Großteil der Sequenz, der die Interaktionsfläche zwischen LipA und LipH im Komplex darstellt.

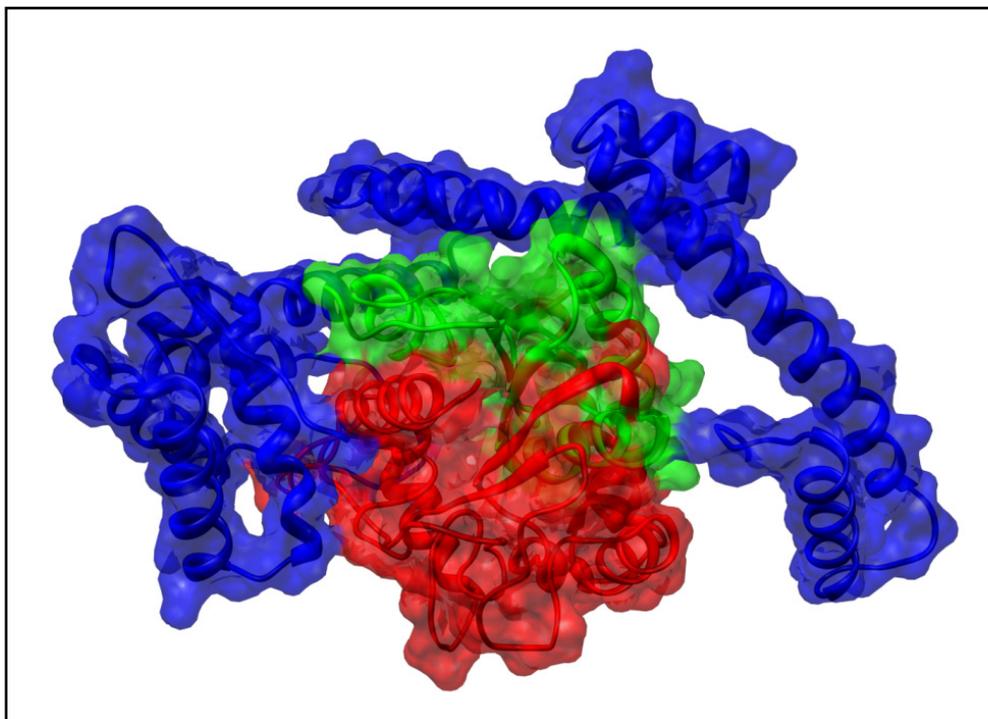


Abb. 3.46: Lokalisation des N-terminalen Drittels von LipA in dem Lipase-Chaperon Komplex anhand des 3D-Strukturmodells aus *P. aeruginosa*. Die Proteine sind in der *ribbon* Darstellung mit transparenten Oberflächen gezeigt. Die Proteine bzw. das N-terminale Drittel von LipA sind jeweils farblich markiert (LipH: blau; N-terminales Drittel von LipA: grün; restliche Struktur von LipA: rot). Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Um zu untersuchen, ob das Peptid *in vitro* die Dissoziation des an den Beads immobilisierten LipAH Komplexes bewirken kann, wurde der Vektor pBR22LA-1, der das Peptid LA-1 unter Kontrolle des T7-Promotors codiert, durch Transformation (2.8) in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht und überexprimiert (2.4.3). Es wurde gezeigt, dass das Peptid LA-1 bei heterologer Überexpression in *E. coli* wie LipA akkumuliert und intrazellulär in unlöslicher Form vorliegt (Hacker, 2003). Somit wurde nach Überexpression versucht, die entstandenen „inclusion bodies“ des 13,1 kDa großen Peptids mit dem für die Lipasen beschriebenen Protokoll (2.17) zu reinigen. Der Verlauf der Reinigung wurde durch eine SDS-PAGE (2.26) überprüft (Abb. 3.47).

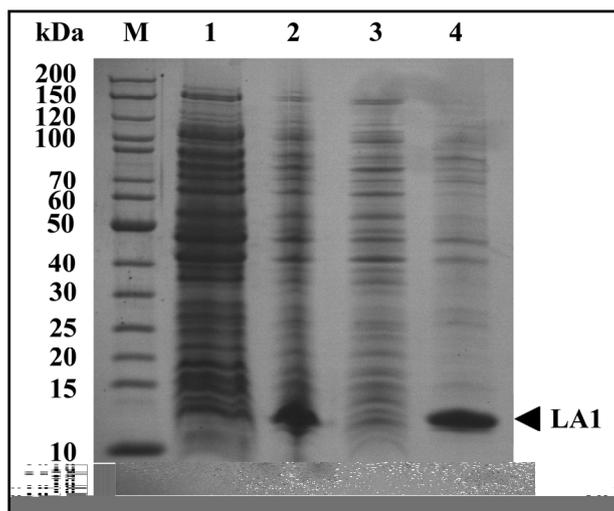


Abb. 3.47: SDS-PAGE Analyse des Reinigungserfolgs der LA-1 „inclusion bodies“. M: Marker; 1: Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt; 2: Pellet nach der ersten Zentrifugation; 3: Überstand nach dem zweiten Zentrifugationsschritt; 4: Pellet nach der zweiten Zentrifugation. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$). Das Trenngel (12 %ig) wurde nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Wie anhand der SDS-PAGE zu erkennen war, konnten die unlöslichen Aggregate des Peptids LA-1 nicht in elektrophoretischer Homogenität gewonnen werden. Durch densitometrische Analyse konnte ein kontaminierender Proteinanteil von etwa 13 % in Bezug auf das Zielprotein bestimmt werden. Da das Peptid für die weiteren Versuche nicht zwangsläufig vollständig von anderen Proteinen getrennt werden musste, wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet und der Proteingehalt durch einen BCA Assay abgeschätzt. Abzüglich des kontaminierenden Proteinanteils konnte eine Gesamtmenge von etwa 23 mg für die nachfolgenden Versuche aus dem Gesamtzellextrakt von 1 L Kultur gewonnen werden.

Nachfolgend wurde der Versuch unternommen, einen an Beads immobilisierten LipAH Komplex durch Inkubation (30 min) mit einem molaren Überschuss an de- und in Rückfaltungspuffer (2.18) renaturiertem LA-1 aufzulösen. Als Negativkontrolle wurde eine Probe von gleich behandeltem Gesamtzellextrakt einer Überexpressionskultur von *E. coli* BL21(DE3) mit dem entsprechenden Leervektor pBR22b verwendet. Nachfolgend wurde die lipolytische Aktivität der während des Versuchs gesammelten Fraktionen bestimmt (2.24.1) um nachzuvollziehen, ob der LipAH Komplex durch Wechselwirkungen mit dem Peptid LA-1 aufgelöst werden konnte (Abb. 3.48).

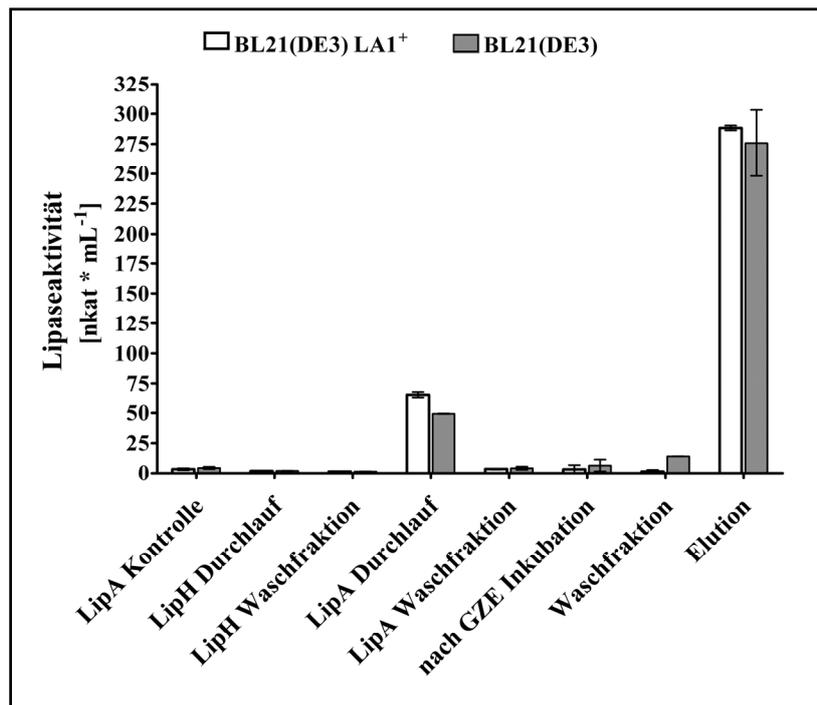


Abb. 3.48: Lipolytische Aktivität der Fraktionen der durchgeführten kombinierten „Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung, Affinitätsreinigung und Immobilisierung“ von LipA durch LipH_r-NHis und nachfolgende Inkubation mit gereinigtem LA-1 Peptid. Als Negativkontrolle wurde gleich behandeltes Gesamtzellextrakt einer Expressionskultur, die den Leervektor pBR22b trug, verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Auch bei diesem Versuch konnte die an das Chaperon gebundene Lipase nicht gelöst werden. Es konnten in dem Durchlauf, der die noch nicht gefaltete Lipase enthielt, und in der Elutionsfraktion eine deutliche messbare lipolytische Aktivität detektiert werden. Die Fraktion, die nach Inkubation mit LA-1 aufgefangen wurde, wies keine detektierbare lipolytische Aktivität auf.

Die hohe Affinität der Lipase-spezifischen Foldase zu ihrem Enzym und deren große Interaktionsflächen spiegeln sich in der Stabilität des Lipase-Lip Proteinkomplexes wider. Es konnte keine Möglichkeit gefunden werden, die Lipase von dem Chaperon nach erfolgter *in vitro* Aktivierung zu lösen. Es wurden sowohl chemische (Salzkonzentration, partielle Denaturierung), physikalische (Temperatur) als auch für die Eigenschaften des Komplex biospezifische Parameter (Glutathion, noch nicht gefaltete Lipase, Lipasefragmente) untersucht.

3.5.6 N- und C-terminal immobilisiertes LipH verhält sich unterschiedlich

In Versuchen, in denen *lipH* für ein Oberflächendisplay C-terminal mit *estA* translational fusioniert wurde, konnte gezeigt werden, dass der Lipase-Lip Komplex nach erfolgter Aktivierung der Lipase dissoziiert. In den bislang gezeigten Experimenten wurde ausschließlich LipH, welches ein N-terminal fusioniertes Poly-Histidin Peptid besitzt, verwendet.

Im Folgenden wurde untersucht, ob an Ni-NTA Material C-terminal immobilisiertes gereinigtes LipH (LipH_t-CHis, vgl. 3.1.2) ebenfalls in der Lage ist, LipA nach Aktivierung freizugeben. Zu diesem Zweck wurde zunächst kontrolliert, ob dieser Lipase-Lip Komplex schon in Lösung nach Aktivierung dissoziiert. Gereinigtes LipA wurde *in vitro* mit LipH_t-CHis renaturiert und die Probe per Gelfiltration (2.22) analysiert. Während der Chromatographie wurde die Absorption bei $\lambda = 280$ nm kontinuierlich aufgezeichnet (Abb. 3.49). Als Vergleich wurde das schon in Abb. 3.31 gezeigte Chromatogramm der Rückfaltung von LipA mit LipH_t-NHis, bei der ein stabiler LipAH Komplex gebildet wird, verwendet.

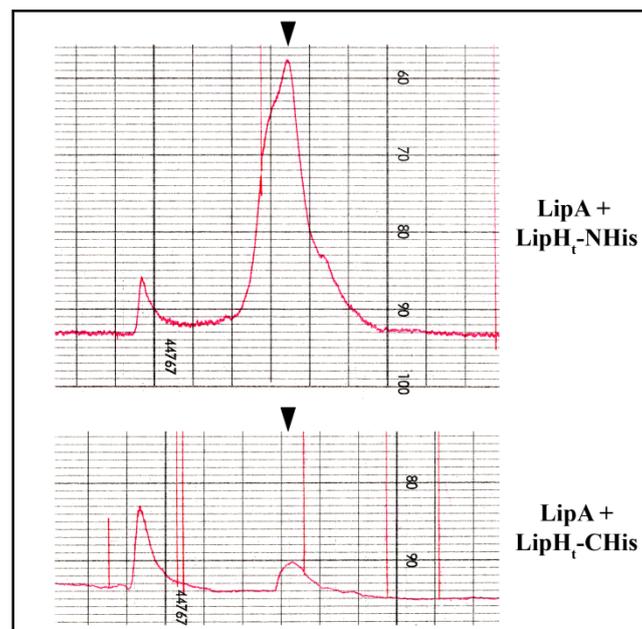


Abb. 3.49: Aufgenommenes Elutionsprofil der Proteine während der Gelfiltration durch kontinuierliche Messung des Absorption bei $\lambda = 280$ nm. Die Chromatogramme sind von links nach rechts zu lesen. Die Pfeile kennzeichnen die Peaks, welche die aufgetragenen Proteine enthalten und vereinbar mit dem kalkulierten Molekulargewicht sind.

Das Chromatogramm der untersuchten Probe der Renaturierung von LipA durch LipH_t-CHis wies die schon bei Rückfaltung durch LipH_t-NHis beobachteten Peaks bei den gleichen Retentionszeiten auf. Der zuerst von der Säule eluierte Peak mit einer Retentionszeit jenseits der Ausschlussgröße der Säule war wahrscheinlich auf eine partielle Präzipitation der Proteine durch den Wechsel des Puffers zurückzuführen. Der zweite Peak wurde bei einer Retentionszeit, die einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa und damit einem Komplex aus LipH_t-CHis und LipA entspricht, detektiert.

Die während der Detektion der Peaks eluierten Fraktionen wurden zum Nachweis lipolytischer Aktivität für einen *p*NPP Test (2.24.1) verwendet. Die nachgewiesene Enzymaktivität konzentrierte sich auf die Fraktion, die aufgrund der Retentionszeit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa entsprach (ohne Abbildung).

Im Anschluss wurde das Verhalten in *in vitro* Rückfaltungen von an Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) immobilisiertem LipH_t-CHis und LipH_t-NHis verglichen (2.23). Hierzu wurden beide Chaperone an das Ni-NTA Material gebunden und dreimal mit einer äquimolaren Menge LipA für 2 h inkubiert. Nachfolgend wurden noch an der Matrix gebundene Proteine eluiert und ein Enzymaktivitätstest (2.24.1) durchgeführt, um die lipolytische Aktivität der gesammelten Fraktionen zu bestimmen (Abb. 3.50).

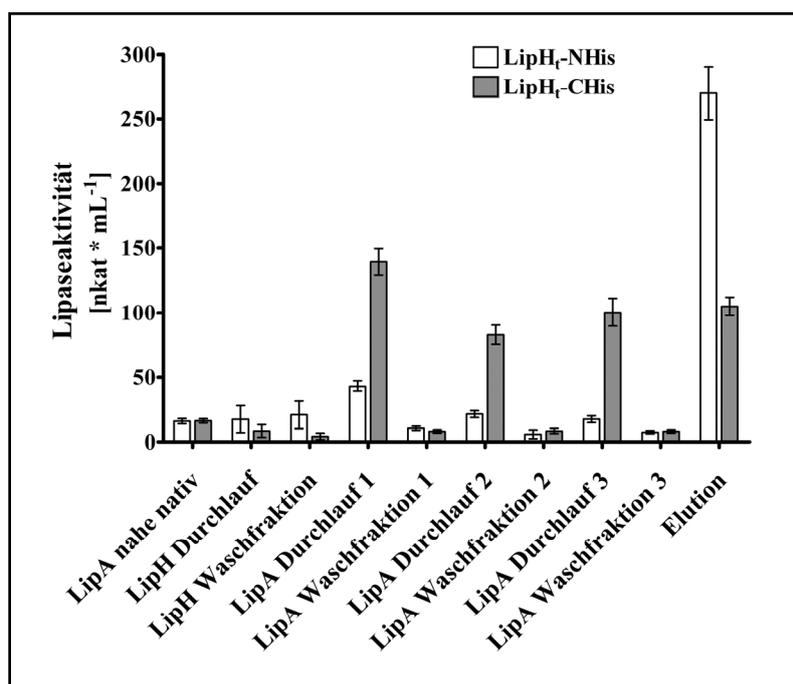


Abb. 3.50: Vergleich der lipolytischen Aktivität der Fraktionen vor und während der durchgeführten kombinierten „Ein-Schritt *in vitro* Aktivierung und Immobilisierung“ von LipA durch LipH_t-NHis bzw. LipH_t-CHis. Die Chaperone wurde an Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) immobilisiert und mit drei Chargen, die jeweils äquimolare Mengen LipA enthielten, inkubiert und vor der nächsten Inkubation einmal mit Rückfaltungspuffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Beads mit Elutionspuffer behandelt, um gebundenes Protein zu lösen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Messungen. Die gezeigten Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Wie erwartet befand sich der Großteil der gemessenen lipolytischen Aktivität bei *in vitro* Renaturierung durch LipH_t-NHis in der Elutionsfraktion. Das Chaperon band selektiv die Lipase, aktivierte sie und bildete mit ihr einen stabilen Proteinkomplex aus. Hingegen konnte bei der Inkubation des C-terminal immobilisierten LipH_t-CHis eine in etwa konstant hohe lipolytische Aktivität sowohl in allen Fraktionen, die nach Inkubation mit LipA aufgefangen wurden, als auch in der Elutionsfraktion bestimmt werden.

In einem weiteren Versuch wurde der Lipase-Lip Komplex vorher generiert (2.18), um anschließend die Möglichkeit einer Immobilisierung an Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) zu untersuchen (2.23). Die lipolytische Aktivität und der Proteingehalt aller während des Versuches aufgefangenen Fraktionen wurde durch einen *p*NPP Test bestimmt (2.24.1) und die Zusammensetzung durch eine SDS-PAGE (2.26) bestimmt (Abb. 3.51).

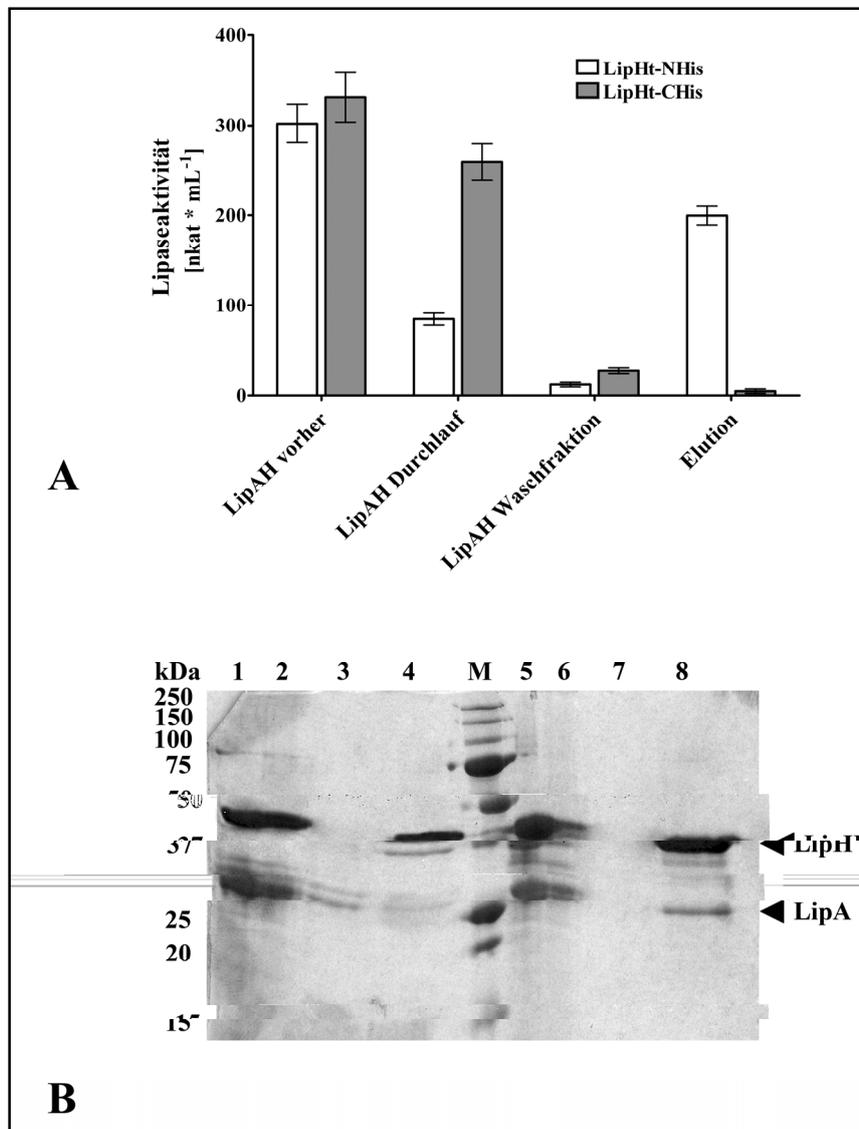


Abb. 3.51: (A) Vergleich der lipolytischen Aktivität der Fraktionen vor und während der Immobilisierung von LipA-LipH_T-CHis und LipA-LipH_T-NHis. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängig durchgeführten Messungen, wobei die Fehlerbalken der berechneten Standardabweichung entsprechen. **(B) SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen.** M: Marker; 1: LipA-LipH_T-CHis vor Inkubation mit Ni-NTA Material; 2: LipA-LipH_T-CHis Durchlauf; 3: LipA-LipH_T-CHis Waschfraktion; 4: LipA-LipH_T-CHis Elution; 5: LipA-LipH_T-NHis vor Inkubation mit Ni-NTA Material; 6: LipA-LipH_T-NHis Durchlauf; 7: LipA-LipH_T-NHis Waschfraktion; 8: LipA-LipH_T-NHis Elution. Es wurden jeweils 20 μ L aller Proben aufgetragen. Die Trenngele (12 %ig) wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Der Komplex aus LipH_T-NHis und LipA konnte an den Beads immobilisiert werden. Zwar konnte auch aufgrund der eingesetzten hohen Proteinkonzentration, die die Kapazität des Ni-NTA Materials überstieg, eine geringe lipolytische Aktivität im Durchlauf gemessen werden,

es befanden sich aber der Großteil der Enzymaktivität und auch des Proteins in der Elutionsfraktion. Im Fall des LipA-LipH_t-CHis Komplexes wurde die meiste Aktivität in der als Durchlauf gesammelten Fraktion gemessen. In der Elutionsfraktion war fast keine lipolytische Aktivität oder LipA detektierbar.

Sowohl LipH_t-NHis als auch LipH_t-CHis bilden in Lösung einen stabilen Komplex mit LipA aus. Dieser wird jedoch im Fall des LipH_t-CHis bei Immobilisierung durch den C-terminal vorhandenen His-Tag an Ni-NTA Material aufgelöst, während er bei N-terminaler Immobilisierung von LipH_t-NHis weiterhin intakt bleibt.

3.6 Charakterisierung einer translationalen Lipase-Foldase Fusion

Lipase-spezifische Foldasen weisen hinsichtlich ihrer Funktionalität einige Gemeinsamkeiten zu Propeptiden von Proteasen auf. Sie wirken mit hoher Spezifität als sterische Chaperone, indem sie dazu beitragen, dass eine energetische Barriere bei der Faltung der Enzyme überwunden werden kann. Es wurden sowohl N- als auch C-terminal lokalisierte Propeptide beschrieben (Sloma *et al.*, 1990; Goetz *et al.*, 1998; Conesa *et al.*, 2001). Darüberhinaus wird die Faltung mikrobieller Proteasen nicht grundsätzlich durch Propeptide katalysiert. Für eine Serin-Protease aus *Aeromonas sobria* konnte ein Gen identifiziert werden, welches ein für das Enzym essentielles Chaperon codiert und durch 22 bp getrennt stromabwärts lokalisiert ist (Okamoto *et al.*, 2000). Einen Überblick über Beispiele möglicher Lokalisationen bakterieller Chaperon-Strukturgene gibt Abb. 3.52.

Durch die stetig wachsende Zahl sequenzierter bakterieller Genome ist inzwischen eine Vielzahl von Strukturgenen, die für Lipasen und ihre spezifischen Foldasen codieren, bekannt. Diese Gene liegen im Allgemeinen als bicistronisches Operon auf dem Chromosom vor, wobei das 5'-lokalisierte Lipasegen entweder durch eine kurze intergenische Region von dem weiter stromabwärts gelegenen Strukturgen der Lipase-spezifischen Foldase getrennt wird (z. B. *P. aeruginosa*, 49 bp; , *B. cepacia*, 3 bp; *S. cellulosum*, 18 bp), oder beide Gene in anderen Fällen eine kurze Überlappung aufweisen. So stellt das Adenin des Stop-Codons TGA des Lipase-Strukturgens in *B. glumae* gleichzeitig das erste Nukleotid des Startcodons ATG des Chaperongens *lipB* dar. Die erste beschriebene Ausnahme zu dem bicistronischen Aufbau der Operons stellt LipC aus *P. aeruginosa* dar, welches durch die Foldase von LipA aktiviert wird.

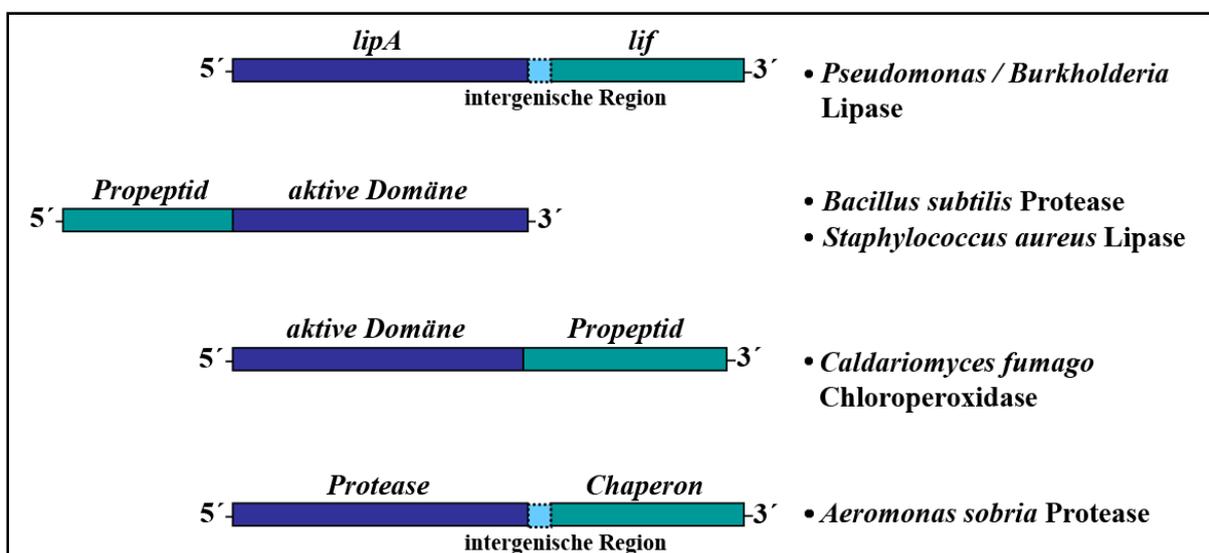


Abb. 3.52: Schematischer Überblick über Beispiele möglicher Lokalisationen der Gene bakterieller Chaperone in Relation zu den zu faltenden codierten Enzymen.

Bei genauerer Betrachtung der intergenischen Region des *lipAH* Operons in *P. aeruginosa* fällt auf, dass durch Deletion einer Base des Stop-Codons des *lipA* eine einfache Möglichkeit gegeben ist, eine translationale Fusion aus Lipase und Chaperon zu erstellen (Abb. 3.53).

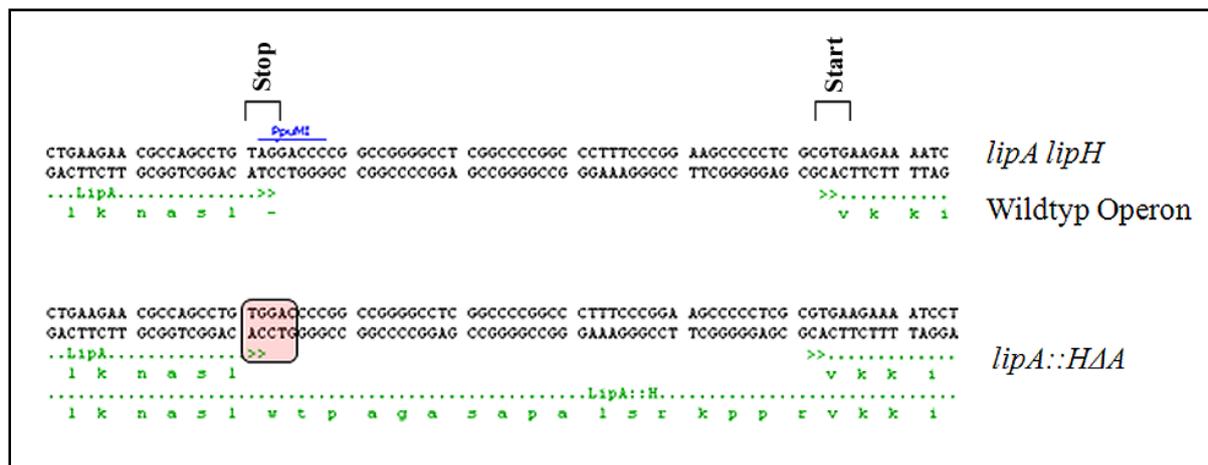


Abb. 3.53: Ausschnitt der Sequenzen des *lipAH* Operons und der *in silico* erstellten translationalen Fusion im Bereich der im Wildtyp Fall vorhandenen intergenischen Region. Die Fusion wurde durch Deletion des Adenins im Stop-Codon von *lipA* generiert. Der Bereich der mutagenisierten Region ist rot hinterlegt.

Im Anschluss wurde in dem Strukturmodell des LipAH Proteinkomplexes von *P. aeruginosa* überprüft, ob sich der C-Terminus des LipA in räumlicher Nähe zum N-Terminus von LipH befindet (Abb. 3.54). Auch wenn einige terminale Reste beider Proteine in der Struktur nicht sichtbar sind fällt auf, dass sich beide Termini in direkter Nachbarschaft befinden, und somit eine Interaktion zwischen der Lipase und dem Chaperon auch in einer translationalen Fusion potentiell möglich ist.

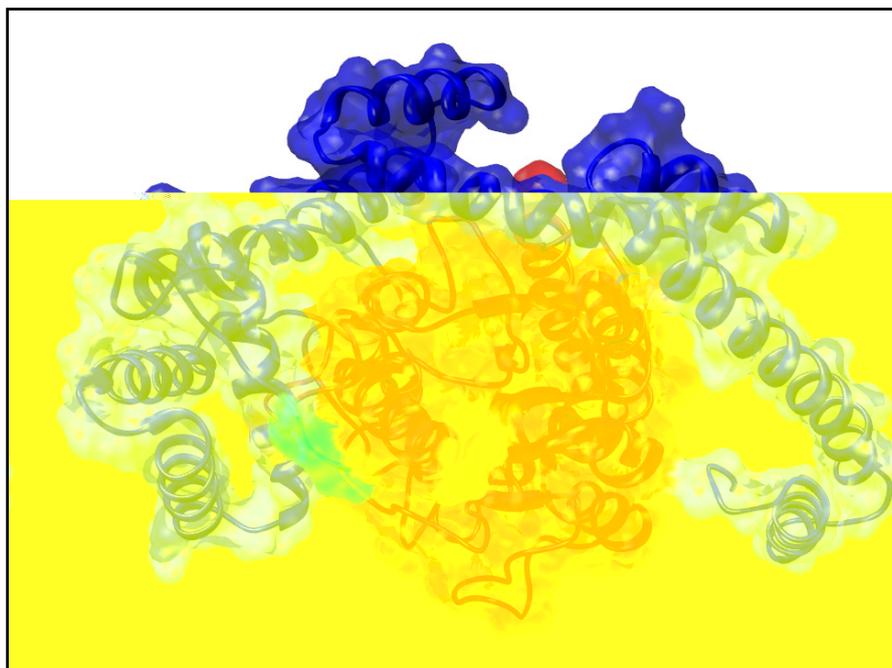


Abb. 3.54: Lage des C-Terminus von LipA und des N-Terminus von LipH in dem Strukturmodell des LipAH Proteinkomplexes aus *P. aeruginosa*. LipA (rot) und LipH (blau) sind beide als *ribbon* Modell mit transparenten Oberflächen dargestellt. Der C-Terminus von LipA ist in gelb, der N-Terminus von LipH in hellblau hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Mit der Primärstruktur der Fusion wurde für den Bereich der ehemaligen intergenischen Region des *lipAH* Operons eine Sekundärstrukturvorhersage mit Hilfe des PsiPred Servers erstellt. Diese Region zeichnet sich durch ihren hohen Alanin- und Prolinanteil von 25 % bzw. 20 % aus und wurde als ein *coil* bildender Bereich vorhergesagt (Abb. 3.55), der eine vorteilhafte Sekundärstruktur für die funktionelle Verbindung der beiden Proteine besäße.

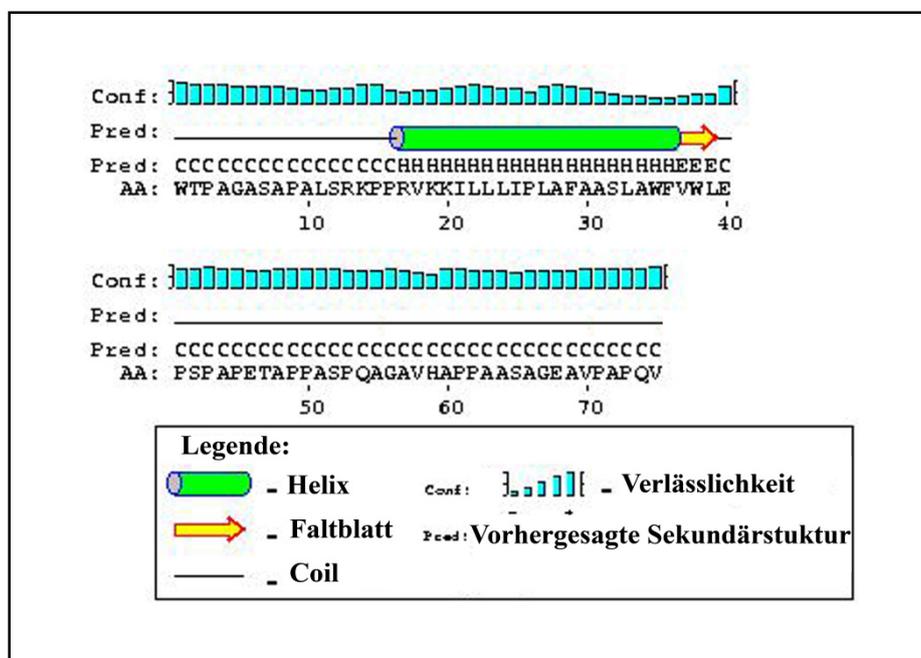


Abb. 3.55: Sekundärstrukturvorhersage der *in silico* generierten Fusion im Bereich der ehemaligen intergenischen Region des *lipAH* Operons. Die Vorhersage wurde unter Verwendung des PsiPred Servers erstellt. Die Höhe der in blau dargestellten Balken ist direkt proportional zu der Verlässlichkeit der Vorhersage an der entsprechenden Position.

Um zu überprüfen, ob eine translationale Fusion aus Lipase und Lipase-spezifischer Foldase auch in anderen Organismen *in silico* in einfacher Art und Weise durchgeführt werden kann, wurden die Sequenzen weiterer Operons, die eine Lipase und ein Lip-Protein codieren, per Datenbanksuche ermittelt und versucht, sie ebenfalls *in silico* zu mutagenisieren. Einen Überblick gibt Tab. 3.4.

Tab. 3.4: Übersicht über relevante Eigenschaften der Lipase-Foldase Operons verschiedener Organismen, die während der *in silico* Fusion betrachtet wurden sowie die zur Fusion führenden eingefügten Mutationen. Die obere Sequenz ist jeweils die des Wildtyps, die untere die der erstellten Fusion. Unterstrichen sind jeweils das Stop-Codon des Lipasegens und das Start-Codon des Foldasegens. Punkte deuten nicht dargestellte Basen der intergenischen Region (IR) an.

Organismus	relative Lage der Gene der Lipase und der Foldase	Wildtyp Nukleotidsequenz / Nukleotidsequenz nach translationaler Fusion	Beschreibung
<i>Burkholderia cepacia</i>	IR (3 bp)	<u>TAA</u> TCG <u>ATG</u>	Substitution von A zu T
		TAT TCG ATG	
<i>Burkholderia cepacia</i> R18194	IR (3 bp)	<u>TAA</u> TCG <u>ATG</u>	Substitution von A zu T
		TAT TCG ATG	

Fortsetzung Tab. 3.4:

Organismus	relative Lage der Gene der Lipase und der Foldase	Wildtyp Nukleotidsequenz / Nukleotidsequenz nach translationaler Fusion	Beschreibung
<i>Burkholderia glumae</i> PG1	überlappend (1 bp)	<u>GTG A TG</u>	Insertion von A
		GAT GAT G	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	IR (3 bp)	<u>TGA TCG ATG</u>	Substitution von A zu T
		TGT TCG ATG	
<i>Chromobacterium violaceum</i>	IR (1 bp)	<u>TAA GAT G</u>	Deletion von T
		AAG ATG	
<i>Listonella anguillarum</i>	IR (15 bp)	<u>TGA ... ATG</u>	Substitution von A zu T
		TGT ... ATG	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	IR (50 bp)	<u>TAG ... GTG</u>	Insertion von T
		TAT G ... GTG	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	IR (49 bp)	<u>TAG G... GTG</u>	Deletion von A
		TGG ... GTG	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	IR (63 bp)	<u>TGA ... ATG</u>	Substitution von A zu T
		TGT ... ATG	
<i>Pseudomonas profundum</i>	IR (2 bp)	<u>TAA TCA TG</u>	Insertion von T
		TAT ATC ATG	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	IR (52 bp)	<u>TGA G ... GTG</u>	Deletion von A
		TGG ... GTG	
<i>Pseudomonas spec.</i> KFCC10818	überlappend (1 bp)	<u>TAATG</u>	Insertion von T
		TAT ATG	
<i>Pseudomonas spec.</i> KWI-56	IR (3 bp)	<u>TAA TCG ATG</u>	Substitution von A zu T
		TAT TCG ATG	
<i>Ralstonia metallidurans</i>	IR (157 bp)	<u>TGA G ... ATG</u>	Deletion von A
		TGG ... ATG	
<i>Ralstonia sp.</i> M1	IR (9 bp)	<u>TAA ... ATG</u>	Substitution von A zu T
		TAT ... ATG	
<i>Sorangium cellulosum</i>	IR (18 bp)	<u>TGA ... GTG</u>	Substitution von A zu T
		TGT ... GTG	
<i>Vibrio cholerae</i>	IR (9 bp)	<u>TAG ... ATG</u>	Substitution von G zu T
		TAT ... ATG	
<i>Vibrio fulnifucus</i> CMCP6	IR (16 bp)	<u>TAG C ... ATG</u>	Deletion von G
		TAC ... ATG	
<i>Vibrio fulnifucus</i> YJ016	IR (16 bp)	<u>TAG C ... ATG</u>	Deletion von G
		TAC ... ATG	
<i>Vibrio haemolyticus</i>	IR (12 bp)	<u>TAA ... ATG</u>	Substitution von A zu T
		TAT ... ATG	
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	angrenzend	<u>TGA GTG</u>	Substitution von A zu T
		TGT GTG	
<i>Xylella fastidiosa</i> Temecula-1	angrenzend	<u>TGA GTG</u>	Substitution von A zu T
		TGT GTG	

Innerhalb der in Tab. 3.4 zusammengefassten Sequenzen konnten alle Lipase-Foldase Operons durch Einfügen einer Punktmutation translational fusioniert werden. Weiterhin fiel auf, dass bei etwa 27 % der untersuchten Operons das alternative Start-Codon GTG für das Chaperon-Gen auftrat.

Um der Frage nachzugehen, ob es möglich ist, ein enzymatisch funktionelles Fusionsprotein aus Lipase und Lipase-spezifischer Foldase zu erstellen, und ob die Gene der bicistronischen Lipase-Lip Operons möglicherweise im Laufe der Evolution getrennt wurden, wurde eine translationale Fusion des *lipAH* Operons von *P. aeruginosa* durchgeführt. In dieser ist der Genanteil des Chaperons analog zu dem in der Chloroperoxidase von *Caldariomyces fumago* beschriebenen C-terminalen Propeptid lokalisiert. Im Fall des *P. aeruginosa* Operons wäre eine Separation beider Gene im Laufe der Evolution für die effiziente Verwaltung der zweiten Lipase LipC, deren Aktivierung ebenfalls durch LipH vorgenommen wird, essentiell gewesen. Die Deletion des Adenins des Stop-Codons von *lipA* wurde durch ortsgerichtete Mutagenese per PCR (2.10.2) eingeführt. Hierzu wurden zuerst zwei PCR-Reaktionen mit den Primern „FusA“ und „LipA FW“ bzw. „FusA FW“ und „LipH RV“ mit präparierter chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* durchgeführt, um zwei überlappende und die Mutation tragende Genfragmente zu generieren. Diese wurden gereinigt (2.6) und in etwa äquimolaren Mengen zusammen in einer weiteren PCR mit den Primern „LipA FW“ und „LipH RV“ eingesetzt, um das vollständige, die Mutation enthaltende, *lipA::HΔA* zu erhalten. Das entstandene PCR-Produkt sowie der Zielvektor pET22b wurden mit *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert, gereinigt und ligiert, um den Vektor pET22A::HΔA zu erhalten, der *lipA::HΔA* unter Kontrolle des T7-Promotors trug. Nachfolgend wurde ein die Mutation tragendes Genfragment der Fusion aus pET22A::HΔA durch Hydrolyse mit *Eco72I* und *PaeI* aus dem Vektor excisiert, welches verwendet wurde, um die in den Vektoren pUCPL6A und pUCPLip1 vorhandenen Wildtyp *lipAH* Sequenzen auszutauschen, so dass die translationale Fusion in den konstruierten Vektoren pUCPL6A::HΔA und pUCPLip1A::HΔA unter Kontrolle des T7- bzw. des *lac*-Promotors stand. Darüberhinaus wurde der Vektor pBR22bLipA::HΔA-CHis erstellt, bei dem *lipA::HΔA* als C-terminales Poly-Histidin Fusionsprotein unter Kontrolle des T7-Promotors stand. Zu diesem Zweck wurde *lipA::HΔA* mit den Primern „LipA FW“ und „LipH_r-CHis“ unter Verwendung von pUCPL6A::HΔA als Matrizen-DNA amplifiziert, um das Stop-Codon des Gens zu entfernen und eine Erkennungsschnittstelle für *XhoI* einzuführen. Nachfolgend wurde das gereinigte PCR-Produkt und das Plasmid pBR22b mit den Endonukleasen *NdeI* und *XhoI* hydrolysiert und die Fragmente ligiert, um den Vektor zu konstruieren.

3.6.1 LipA::H ist in *E. coli* nur bei schwacher Expression aktiv

Zunächst wurde untersucht, ob LipA::H in einer lipolytisch aktiven Form heterolog in *E. coli* exprimiert werden kann. Hierfür wurden der Vektor pET22A::H Δ A und der entsprechende Leervektor pET22b als Kontrolle durch Transformation (2.8) in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht, um dann Einzelkolonien auf Tributyrinplatten, denen einmal IPTG (0,4 mM Endkonzentration) und einmal kein Galaktose-Analogen zugesetzt wurden, zu überführen (Abb. 3.56).

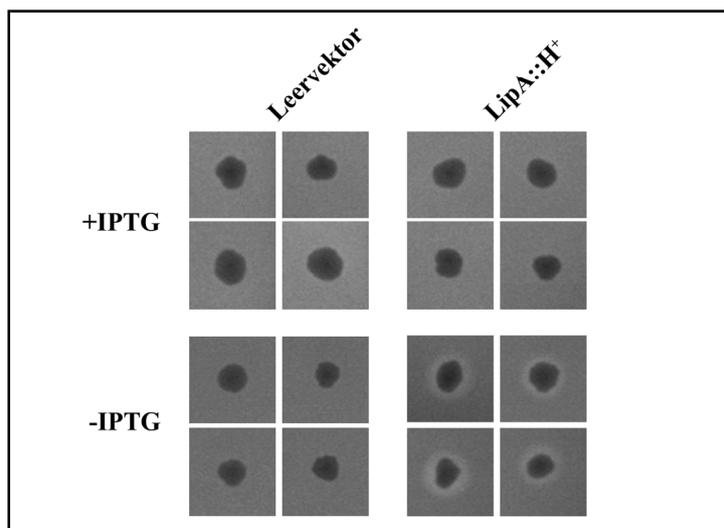


Abb. 3.56: Tributyrinplatten von Kulturen, die LipA::H unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen unter Kontrolle des T7-Promotors exprimieren. Als Negativkontrolle wurde der dem Expressionsplasmid entsprechende Leervektor pET22b verwendet.

Auf lipolytische Aktivität beruhende klare Höfe um die Kolonien konnten nur bei denen beobachtet werden, bei denen die Expression von LipA::H nicht durch Zugabe von IPTG induziert wurde. Bei allen anderen Kulturen, auch bei denjenigen, bei denen eine stärkere Expression durch Induktion T7 Polymerase vorgenommen wurde, konnte keine Hofbildung festgestellt werden. Um die erfolgreiche Expression von LipA::H zu prüfen, wurden Flüssigkulturen von *E. coli* BL21(DE3)/pET22A::H Δ A angelegt (2.4.3). Jeweils vor und 2 h nach Induktion der Expression des Fusionsproteins wurden Proben der Kultur genommen, deren Gesamtzellextrakte durch eine SDS-PAGE (2.26) untersucht wurden (Abb. 3.57).

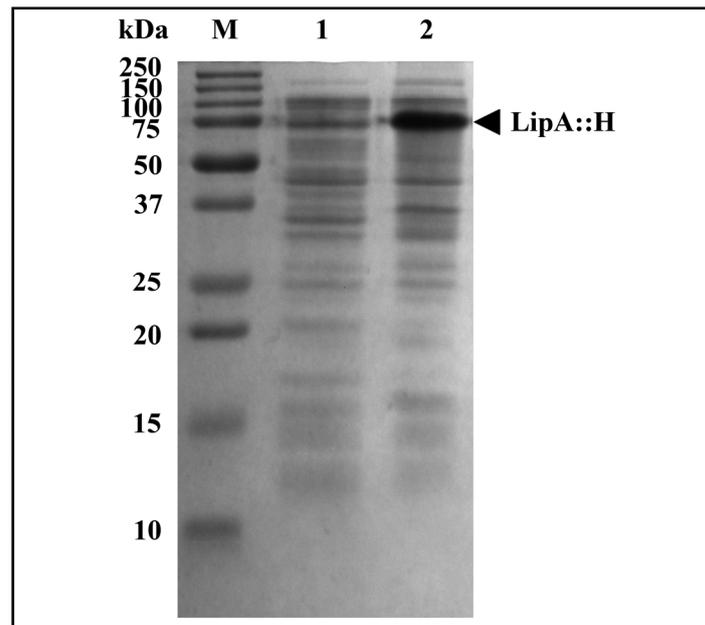


Abb. 3.57: SDS-PAGE Analyse der Proteinzusammensetzung von *E. coli* BL21(DE3) pET22A::HAA vor und 2 h nach Induktion. M: Marker; 1: GZE vor Induktion; 2: 1: GZE nach Induktion. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$). Das Trenngele (12 %ig) wurden nach erfolgter Elektrophorese der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Ein Vergleich der Proteinzusammensetzung der Proben der Gesamtzellextrakte, die vor und nach Induktion entnommen wurden, zeigte, dass LipA::H, welches ein Molekulargewicht von etwa 72 kDa besitzt, überexprimiert wurde.

Die translationale Fusion aus Lipase und Lipase-spezifischer Foldase wird heterolog in *E. coli* BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert. Lipolytische Aktivität konnte jedoch nur unter nicht-induzierenden Bedingungen nachgewiesen werden.

3.6.2 LipA::H ist in *P. aeruginosa* nur bei schwacher Expression aktiv

Um die Expression und Funktionalität von LipA::H bei homologer Expression zu untersuchen, wurde das Plasmid pUCPL6A::H Δ A, bei dem die translationale Fusion unter Kontrolle des T7-Promotors steht, in die *lipAH* Mutante *P. aeruginosa* PABST7.1, die zusätzlich eine chromosomal codierte T7 Polymerase besitzt, durch Transformation (2.8) eingebracht. Als Positivkontrolle wurde das plasmidcodierte Wildtyp *lipAH* Operon des Vektors pUCPL6A exprimiert, als Negativkontrolle der Leervektor pUCPKS verwendet. Einzelkolonien dieser Kulturen wurden auf Tributyrinplatten mit und ohne IPTG (1 mM Endkonzentration) überführt und die Bildung von Höfen beobachtet (Abb. 3.58 A). Analog der Ergebnisse der heterologen Expression von LipA::H konnte nur unter nicht-induzierenden Bedingungen lipolytische Aktivität gemessen werden, die jedoch geringer als die der Positivkontrolle war. Somit schien eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der Stärke der Expression und der lipolytischen Aktivität zu bestehen. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wurde die *lipAH* Mutante *P. aeruginosa* PABS1 mit dem Vektor pUCPLip1A::H Δ A, der *lipA::H Δ A* unter Kontrolle des in *P. aeruginosa* konstitutiv exprimierten *lac*-Promotors trägt, transformiert (2.8). Nachfolgend wurde die lipolytische Aktivität dieses Stammes im Vergleich zu einer Positivkontrolle, die analog zu pUCPLip1A::H Δ A das Wildtyp *lipAH* Operon exprimiert, auf Tributyrinplatten untersucht (Abb. 3.58 B).

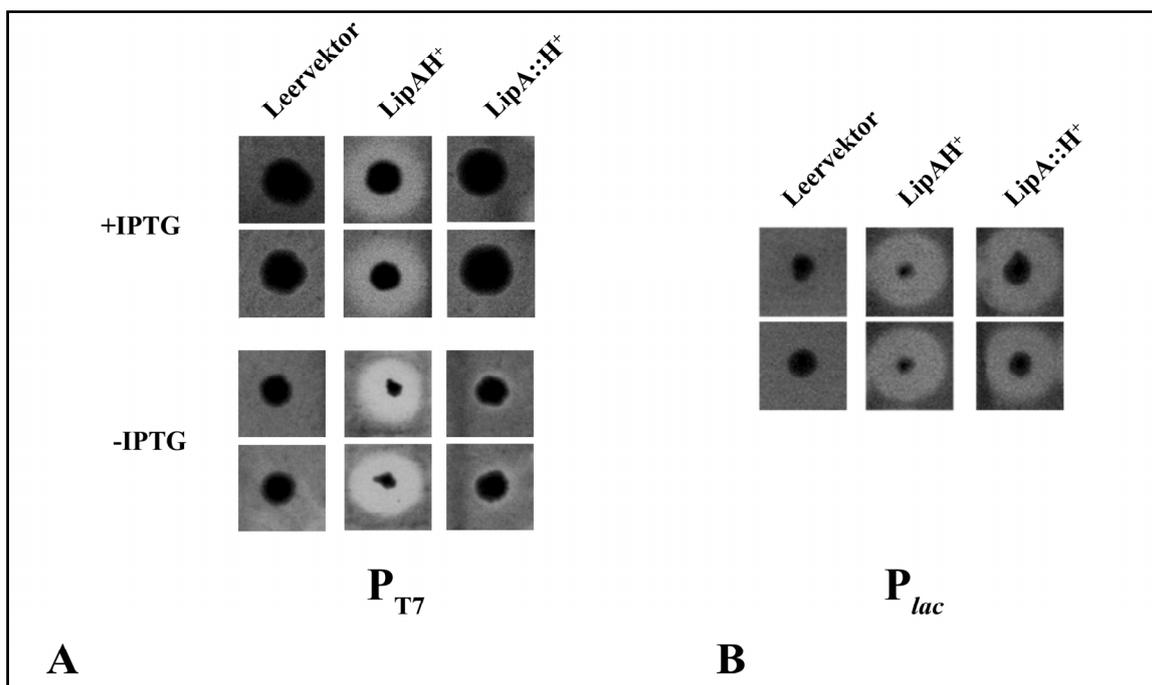


Abb. 3.58: Vergleich der lipolytischen Aktivität von Kulturen, die *lipA::H* bzw. *lipAH* unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen unter Kontrolle des T7-Promotors (A) und des *lac*- Promotors (B) exprimierten, auf Tributyrinplatte. (A) **Homologe Expression in PABST7.1 unter Kontrolle des T7-Promotors.** Als Positivkontrolle wurde pUCPL6A, als Negativkontrolle pUCPKS verwendet. (B) **Homologe Expression in PABS1 unter Kontrolle des *lac*-Promotors.** Als Positivkontrolle wurde pUCPLip1, als Negativkontrolle pUCPKS verwendet. Die Hofbildung wurde durch acht voneinander unabhängig angezogene Kulturen bestätigt.

Die Hofbildung dieser beiden Stämme unterschied sich nicht signifikant voneinander. Während der Stamm, der mit dem Leervektor pUCPKS transformiert wurde, wie erwartet keine lipolytische Aktivität aufwies, waren die Durchmesser der gebildeten Höfe der Kulturen, die LipA::H bzw. LipA und LipH separat voneinander exprimierten, annähernd identisch. Nachfolgend wurde die lipolytische Aktivität der Kulturen des Stammes *P. aeruginosa* PABS1, der die Gene unter Kontrolle des *lac*-Promotors exprimierte, nach einer Anzucht in Flüssigmedium (2.4.3) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Kulturen geerntet und die präparierten Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände in einen pNPP Test (2.24.1) eingesetzt (Abb. 3.59).

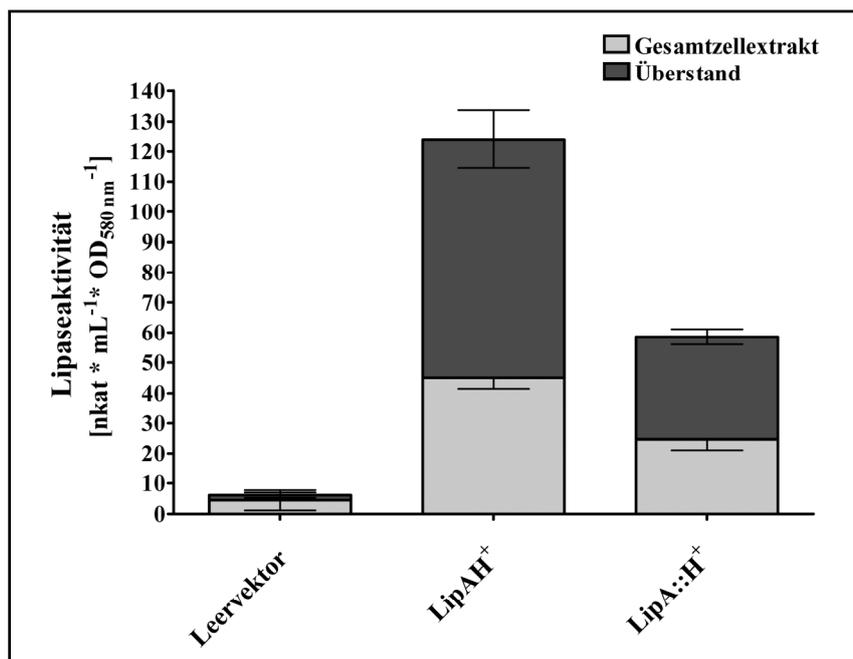


Abb. 3.59: Lipolytische Aktivität der Gesamtzellextrakte und Überstände von Kulturen, die *lipA::H* bzw. *lipAH* unter Kontrolle des *lac*-Promotors exprimierten. Als Positivkontrolle wurde pUCPLip1, als Negativkontrolle pUCPKS verwendet. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängig angezogenen Kulturen in Doppelbestimmung, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt ist.

Im Gegensatz zu der auf den Tributyrinplatten beobachteten Enzymaktivität, die im Fall der Expression von *lipA::H* und *lipAH* vergleichbar war, wurde nach Anzucht in Flüssigmedium bei Expression der Fusion sowohl im Gesamtzellextrakt als auch im Kulturüberstand eine um etwa 50 % geringere lipolytische Aktivität als bei Expression des Wildtyp Operons gemessen.

Auch bei homologer Expression der translationalen Fusion aus Lipase und Lipase-spezifischer Foldase unter Kontrolle des T7-Promotors konnte nur unter nicht-induzierenden Bedingungen eine geringe lipolytische Aktivität nachgewiesen werden.

Bei Expression von *lipA::H* unter Kontrolle des *lac*-Promotors konnte auf Tributyrinplatten eine lipolytische Aktivität gemessen werden, die mit derjenigen von *lipAH* vergleichbar war. Bei Anzucht in Flüssigmedium war die Enzymaktivität jedoch um 50 % geringer als bei Expression des Wildtyp Operons.

3.6.3 Die LipA-LipH Fusion ist bei starker Expression ausschließlich als vollständiges Protein detektierbar

In einem weiteren Versuch wurde das Fusionsprotein in Gesamtzellextrakten von *P. aeruginosa* Kulturen, die die Fusion unter Kontrolle der beiden verschiedenen Promotoren exprimierten, immunologisch mit einem gegen LipH gerichteten Antikörper per Western Blot nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden die Expressionskulturen auf eine O.D._{580 nm} von 0,15 eingestellt und die Expression von *lipA::H* unter Kontrolle des T7-Promotors bei einer O.D._{580 nm} von 1 durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) vorgenommen. Alle Kulturen wurden 2 h nach Induktion der T7 Expressionskulturen geerntet und die Gesamtzellextrakte präpariert. Anschließend wurde der immunologische Nachweis per SDS-PAGE (2.26) und Western Blot (2.27) durchgeführt (Abb. 3.60).

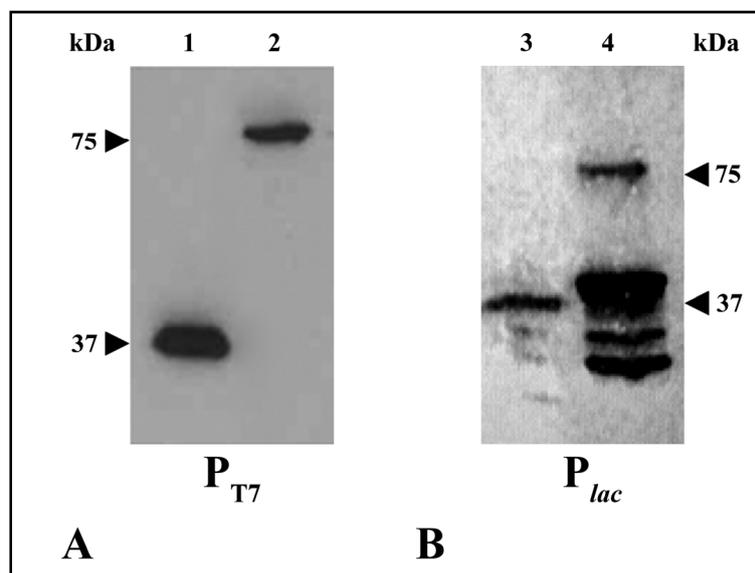


Abb. 3.60: Immunologischer Nachweis von LipA::H nach homologer Expression in *P. aeruginosa* unter Kontrolle des T7-Promotors (A) und des *lac*-Promotors (B) in den Gesamtzellextrakten mit dem gegen LipH gerichteten Antikörper. 1 & 3: gereinigtes LipH_r-NH_{is} (Positivkontrolle); 2: GZE nach Expression von *lipA::H* unter Kontrolle des T7-Promotors; 4: GZE nach Expression von *lipA::H* unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580 nm} = 0,15). In der Abbildung sind die relevanten Teile der Western Blots gezeigt.

Im Fall der T7 Expressionskultur konnte im Gesamtzellextrakt ein Signal auf Höhe von LipA::H bei etwa 75 kDa detektiert werden. Bei Expression von *lipA::H* unter Kontrolle des *lac*-Promotors hingegen traten neben dem Signal bei etwa 75 kDa noch weitere Signale auf. Das Signal mit der stärksten Intensität der gesamten Probe konnte bei einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa detektiert werden und lag damit über dem der Positivkontrolle bei etwa 37 kDa.

Nach starker Expression von *lipA::H* unter Kontrolle von P_{T7} konnte im Gesamtzellextrakt ausschließlich das vollständige Fusionsprotein detektiert werden, während bei Expression unter Kontrolle von P_{lac} weitere Signale auftraten; das Intensivste bei einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa.

3.6.4 Zelluläre Lokalisation der LipA- und LipH-Anteile der Fusion

Um die zelluläre Lokalisation von LipA::H bei homologer Expression zu analysieren, wurden *lipAH* und *lipA::H* unter Kontrolle des *lac*-Promotors in der *lipAH* Mutante *P. aeruginosa* PABS1 exprimiert. Die Expressionskulturen wurden auf eine O.D._{580 nm} von 0,15 eingestellt und 2 h nach Erreichen einer O.D._{580 nm} von 1 geerntet. Im Anschluss wurden die zellulären Kompartimente fraktioniert (2.13 & 2.14). Proben dieser Fraktionen wurden für den immunologischen Nachweis von LipA und LipH durch SDS-PAGE (2.26) und Western Blot (2.27) verwendet (Abb. 3.61).

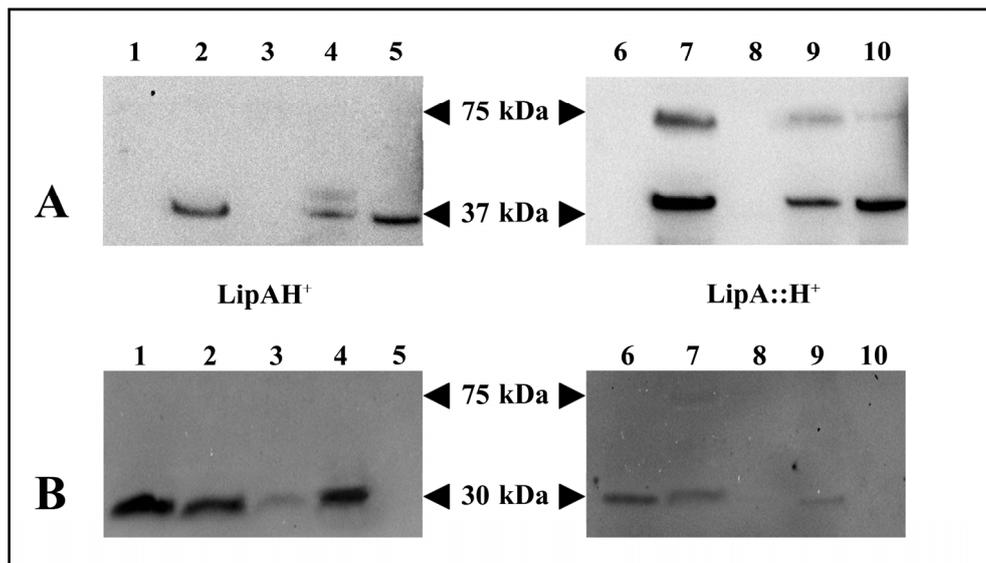


Abb. 3.61: Immunologischer Nachweis von LipH (A) und LipA (B) nach homologer Expression von *lipAH* und *lipA::H* unter Kontrolle des *lac*-Promotors und Fraktionierung. 1 & 6:Überstand; 2 & 7: Gesamtzellextrakt; 3 & 8:Periplasmafraktion; 4 & 9: Cytoplasmafraktion; 5 & 10: Membranfraktion. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580 nm} = 0,4). In der Abbildung sind die relevanten Teile der Western Blots gezeigt.

Bei immunologischem Nachweis von LipH bzw. seiner Proteinanteile in der Fusion konnten in beiden Fällen Signale in den Gesamtzellextrakten sowie in den Cytoplasma- und Membranfraktionen detektiert werden. Während in der Kultur, die das Wildtyp Operon exprimiert, Signale bei einer dem Molekulargewicht von LipH entsprechenden Größe von etwa 37 kDa auftraten, konnten bei der das *lipA::H* exprimierenden Kultur Signale bei einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa und 40 kDa detektiert werden, wobei das intensivere jeweils bei 40 kDa nachgewiesen wurde. Die Western Blots, die mit dem LipA Antikörper behandelt wurden, wiesen jeweils Signale in den Kulturüberständen, den Gesamtzellextrakten und der Cytoplasmafraktion sowie schwache Signale in der Periplasmafraktion bei einer Höhe auf, die dem Molekulargewicht des Wildtyp LipA entspricht. In dem Gesamtzellextrakt der Kultur, die die translationale Fusion exprimiert, konnte darüberhinaus ein schwaches Signal auf Höhe von LipA::H detektiert werden.

Somit konnten in allen Fraktionen, in denen LipA bzw. LipH nach Expression von *lipAH* nachgewiesen werden konnte, auch in den Fraktionen der Kultur, die *lipA::H* exprimiert, das Fusionsprotein bzw. seine entsprechenden Anteile nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob LipA::H bzw. der LipH-Anteil des Proteins, wie schon für Wildtyp LipH beschrieben, in

der inneren Membran lokalisiert ist, wurde die präparierte Membranfraktion der Fusion weiter behandelt, um die Proteine der inneren und der äußeren Membran voneinander zu separieren (2.15). Im Anschluss wurde LipH per SDS-PAGE (2.26) und Western Blot (2.27) in beiden Fraktionen nachgewiesen (Abb. 3.62).

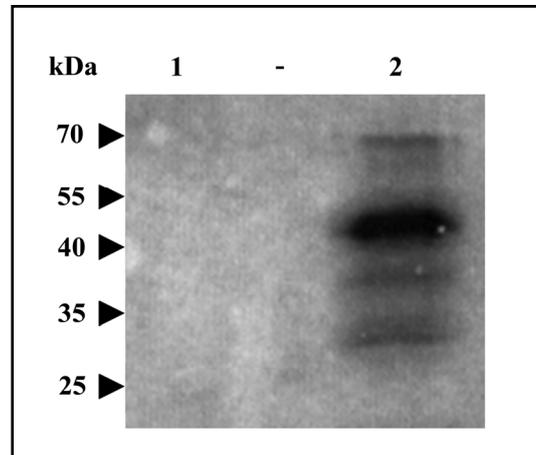


Abb. 3.62: Immunologischer Nachweis von LipH nach homologer Expression von *lipA::H* unter Kontrolle des *lac*-Promotors und Fraktionierung der inneren und äußeren Membran. 1: äußere Membranfraktion; 2: innere Membranfraktion. In der mit – gekennzeichneten Spur wurde keine Probe aufgetragen, um eine Vermischung der Proben während des Auftragens zu vermeiden. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,4$). In der Abbildung ist der relevante Teil des Western Blots dargestellt.

In der Fraktion, die die Proteine der inneren Membran enthielt, konnten die Signale, die auch schon nach Präparation der Gesamtmembran auftraten, wieder detektiert werden. Die äußere Membranfraktion wies keine Signale auf.

LipA::H ist bei Expression unter Kontrolle von P_{lac} nur zu geringen Anteilen als vollständiges Protein detektierbar. Stattdessen weisen die im Western Blot aufgetretenen Signale eine größere Intensität bei einem Molekulargewicht von Wildtyp LipA bzw. einem etwas größeren als Wildtyp LipH auf. Dabei entspricht die zelluläre Lokalisation dieser Anteile derjenigen bei Expression von *lipAH*.

3.6.5 Der LipH-Anteil weist in das Periplasma

Bei sekretierten Proteinen, die vom Sec-Apparat in das Periplasma geschleust werden, ist die für die Erkennung essentielle Signalsequenz, die als erstes die von SecYEG gebildete Pore des Sec-Apparates betritt, N-terminal lokalisiert (Watson, 1984). Im Fall des LipH liegt dort die hydrophobe Helix, die LipH in der inneren Membran fixiert. Nach gängiger Vorstellung wird auch diese Helix zuerst in die Pore geschleust, verbleibt dann aber dort, während der übrige Proteinteil in das Periplasma überführt wird. Im Anschluss verlässt die hydrophobe Helix die Pore durch laterale Diffusion.

Wie unter 3.6.4 gezeigt werden konnte, ist der LipH-Anteil von LipA::H in der inneren Membran lokalisiert. Aufgrund des Aufbaus der translationalen Fusion ist jedoch *lipH* am 3'-Ende des Gens und somit der LipH-Teil C-terminal gelegen. Somit ist der im Wildtyp Fall N-terminal lokalisierte Membrananker in der Mitte des Fusionsproteins, was eine korrekte Lokalisation der Fusion, in der der LipH-Anteil in das Periplasma weist, nicht selbstverständlich erscheinen lässt. Um dies zu überprüfen, wurden Sphäroplasten des Stammes *P. aeruginosa* PABS1 präpariert (2.13, ohne Lysozyminkubation), die *lipAH* bzw. *lipA::H* plasmidcodiert unter Kontrolle des *lac*-Promotors exprimierten. Als Negativkontrolle wurde eine Kultur mit dem entsprechenden Leervektor pUCPKS transformiert (2.8) und gleich behandelt. Nachfolgend wurden die Sphäroplasten für 30 min mit unterschiedlichen Konzentrationen Trypsin (0 µg, 20 µg, 50 µg) bei 30 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Inkubation von 20 min bei 95 °C durch Denaturierung gestoppt. Diese Proben wurden für eine SDS-PAGE (2.26) und einen anschließenden Western Blot (2.27) verwendet, in dem LipH bzw. die Teile von LipA::H, die LipH enthalten, immunologisch nachgewiesen wurden (Abb. 3.63)

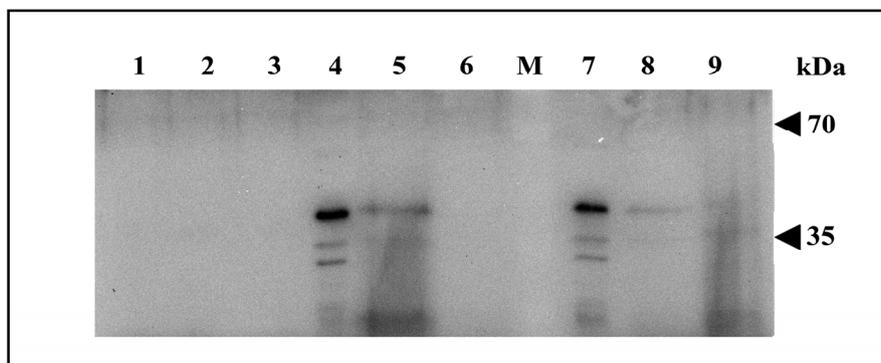


Abb. 3.63: Immunologischer Nachweis der Lipase-spezifischen Foldase mit einem gegen LipH gerichteten Antikörper nach Trypsinverdau präparierter Sphäroplasten von *P. aeruginosa* PABS1 Kulturen, die *lipAH* bzw. *lipA::H* unter Kontrolle von P_{lac} exprimierten. In drei aufeinanderfolgenden Spuren sind jeweils die Proben der gleichen Sphäroblastenpräparation gezeigt, die mit unterschiedlichen Trypsinmengen (0 µg, 20 µg, 50 µg) inkubiert wurden. M: Marker; 1, 2 & 3: Leervektor (Negativkontrolle); 4, 5 & 6: *lipAH* Expressionskultur; 7, 8 & 9: *lipA::H* Expressionskultur. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,4$). In der Abbildung ist der relevante Teil des Western Blots gezeigt.

Bei den als Negativkontrolle verwendeten Sphäroplasten konnten wie erwartet keine Signale detektiert werden. Im Fall der Sphäroplasten der *lipAH* und *lipA::H* Expressionskulturen konnten mit steigender Menge eingesetztem Trypsin eine Abnahme der Signale auf einer

Höhe, die in etwa einem Molekulargewicht von LipH entspricht, beobachtet werden. Somit wurden in beiden Fällen das LipH Protein bzw. der entsprechende Anteil von LipA::H exponiert, so dass die Proteolyse durch das Trypsin erfolgen konnte.

Das LipH-Fragment von LipA::H weist in das Periplasma.

3.6.6 Reinigung von LipA::H mit C-terminalem His-Tag unter nativen und denaturierenden Bedingungen aus *E. coli*

Für weitere *in vitro* Versuche wurde versucht, vollständiges Fusionsprotein zu reinigen. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pBR22bLipA::HΔA-CHis verwendet, der für LipA::H codiert, welches mit einem C-terminal lokalisierten Poly-Histidin Peptid für eine Affinitätsreinigung versehen wurde. Um im Vorfeld zu überprüfen, ob die Fusion in diesem Fall noch enzymatisch funktionell ist, wurde der Stamm *P. aeruginosa* PABST7.1 mit dem Vektor transformiert und Einzelkolonien auf Tributyrinplatten übertragen. Die Bildung von auf lipolytische Aktivität beruhenden Höfen wurde unter nicht-induzierenden Bedingungen mit der von Kulturen verglichen, die mit den Vektoren pBBL7 (Positivkontrolle) und pBR22b (Negativkontrolle) transformiert wurden (Abb. 3.64).

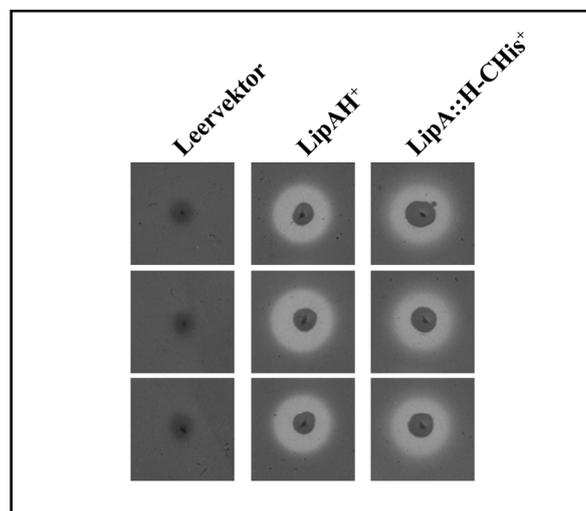


Abb. 3.64: Nachweis der Funktionalität von LipA::H als Poly-Histidin Fusionsprotein unter nicht-induzierenden Bedingungen in *P. aeruginosa* PABST7.1 auf Tributyrinplatte. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pBR22b, als Positivkontrolle pBBL7 verwendet. Die Hofbildung wurde durch fünf voneinander unabhängig angelegte Kulturen bestätigt.

Nachdem durch Bildung von Höfen um die Kolonien, die *lipA::H-CHis* exprimierten, die enzymatische Funktionalität des Proteins sichergestellt wurde, wurde der Vektor pBR22bLipA::HΔA-CHis in *E. coli* BL21(DE3) durch Transformation (2.8) eingebracht und

versucht, eine Überexpression von LipA::H-CHis durchzuführen. Hierzu wurde die Kultur 2 h nach Induktion geerntet und die Löslichkeit des Zielproteins in dem Gesamtzellextrakt analysiert (2.16). Im Anschluss wurde eine SDS-PAGE (2.26) für die Analyse der Proteinzusammensetzung der Fraktionen durchgeführt (Abb. 3.65).

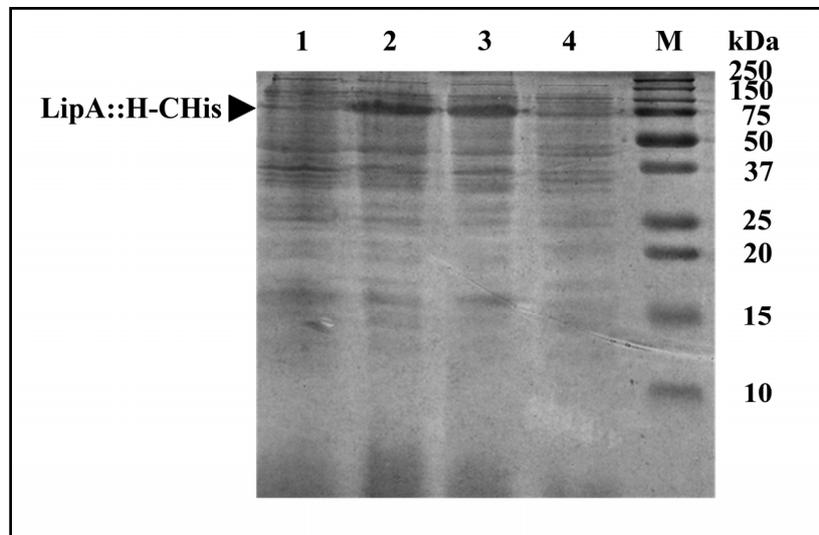


Abb. 3.65: Analyse der Löslichkeit von LipA::H-CHis nach heterologer Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors. M: Marker; 1: GZE vor Induktion; 2: GZE nach Induktion; 3: unlösliches Protein des GZE nach Induktion; 4: lösliches Protein des GZE nach Induktion. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$). Das Trenngel (12 %ig) wurde nach erfolgter Elektrophorese der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Wie zu erkennen war, war die Expression des intakten LipA::H-CHis in *E. coli* BL21(DE3) erfolgreich. Das Protein befand sich jedoch vollständig in der Fraktion, die das unlösliche Protein, inklusive den Proteinen, die in der Membran inseriert sind, enthalten. Im Folgenden wurde versucht, LipA::H-CHis durch Affinitätschromatographie per IMAC (2.19) zu reinigen. Zum Einen wurde eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen, bei der dem Gesamtzellextrakt und allen für die Reinigung verwendeten Puffern Urea (8M Endkonzentration) zugesetzt wurde, durchgeführt und die aufgefangenen Fraktionen per SDS-PAGE (2.26) analysiert (Abb. 3.66 A). Zum Anderen wurde versucht, dass möglicherweise in der Membran inserierte Protein zu solubilisieren, indem das Gesamtzellextrakt mit Laurylmaltosid (2 % (w/v)) für 1 h inkubiert wurde. Daraufhin wurde eine Reinigung unter nativen Bedingungen durchgeführt und die Proteinzusammensetzung der Fraktionen ebenfalls mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.26) untersucht (Abb. 3.66 B).

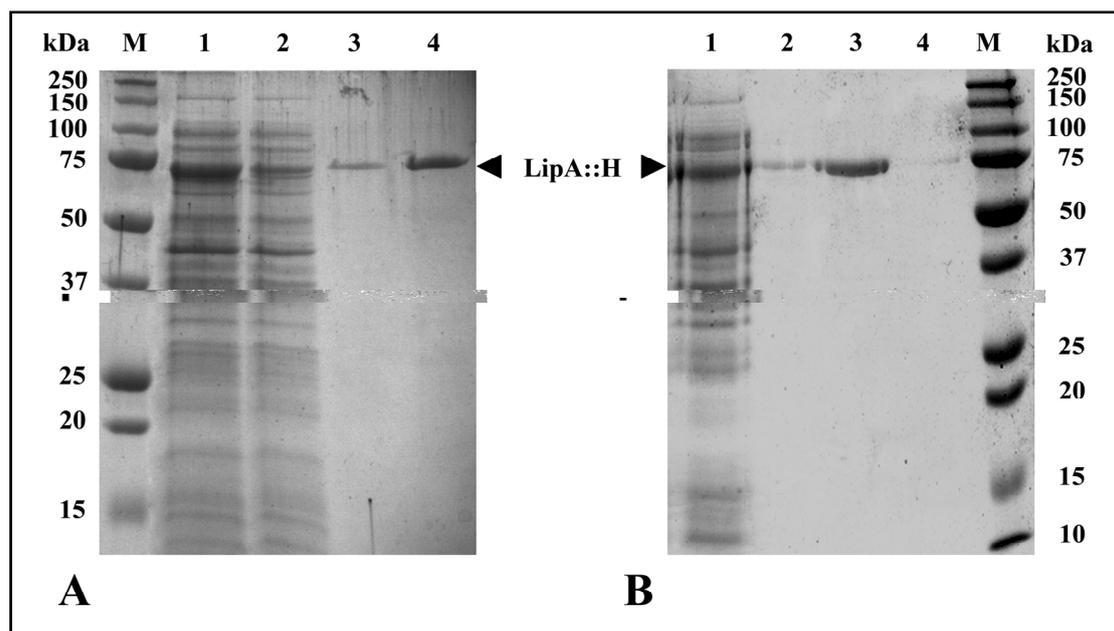


Abb. 3.66: (A) SDS-PAGE der Fraktionen der Reinigung von LipA::H-CHis durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen nach heterologer Expression in *E. coli* BL21(DE3). M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Durchlauf; 3: Waschfraktion; 4: Elutionsfraktion. (B) SDS-PAGE der Fraktionen der Reinigung von LipA::H-CHis durch eine IMAC unter nativen Bedingungen nach heterologer Expression in *E. coli* BL21(DE3) und Inkubation mit Laurylmaltosid (2% (w/v)). M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Waschfraktion; 3: Elutionsfraktion. Die aufgetragenen Volumina der GZE, Durchlauf- und Waschfraktionen wurden auf gleiche Zelldichten von $O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$ bezogen, während jeweils 20 μL der Elutionsfraktionen verwendet wurden. Die Trenngele (12 %ig) wurden nach der Elektrophorese mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Anhand der SDS-PAGE war zu erkennen, dass LipA::H-CHis sowohl unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen nach Inkubation mit Laurylmaltosid in elektrophoretischer Homogenität gereinigt werden konnte. In einer weiteren Reinigung, in der auf die Inkubation mit Detergenz verzichtet wurde, war kein Protein in der Elutionsfraktion detektierbar (ohne Abb.)

LipA::H-CHis kann als vollständiges Protein heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden. Es lag zwar nicht in löslicher Form vor, konnte jedoch per IMAC unter denaturierenden und unter nativen Bedingungen nach Solubilisierung durch Inkubation mit Detergenz gereinigt werden.

3.6.7 Rückfaltungsexperimente mit der Fusion

Als vollständige Fusion exprimiertes LipA::H weist keine lipolytische Aktivität auf (vgl. 3.6.1). Deswegen wurde überprüft, ob intaktes gereinigtes LipA::H-CHis in der Lage ist, LipA *in vitro* zu aktivieren oder durch Lipase-spezifische Foldase selbst in eine enzymatisch aktive Konformation überführt werden kann. Zu diesem Zweck wurden äquimolare Mengen der jeweiligen gereinigten Proteine in *in vitro* Renaturierungen (2.18) eingesetzt. Hierbei wurde die Rückfaltung jeweils einmal in 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) und einmal in dem beschriebenen Rückfaltungspuffer durchgeführt. Im Anschluss wurde die lipolytische Aktivität der Proben durch einen *p*NPP-Test (2.24.1) bestimmt (Abb. 3.67).

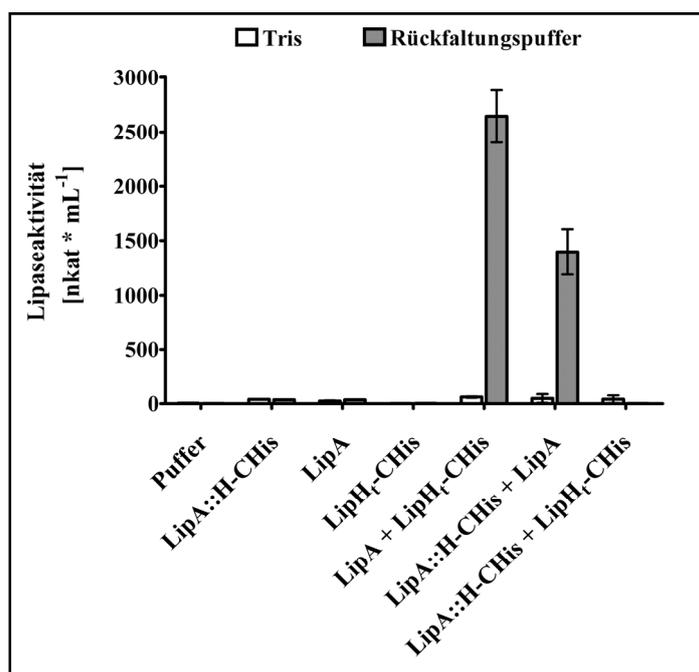


Abb. 3.67: Lipolytische Aktivität nach *in vitro* Renaturierung von LipA::H-CHis mit LipA bzw. LipH_r-CHis. Als Negativkontrollen wurden die einzelnen Proteine in die *in vitro* Aktivierung eingesetzt, als Positivkontrolle wurde LipA mit LipH_r-CHis inkubiert. Die dargestellten Aktivitäten stellen die Mittelwerte aus sechs Experimenten dar, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken abgegeben ist.

Die Negativkontrollen, bei denen die Rückfaltung in 100 mM Tris (pH 8,0) durchgeführt wurde, und die Proben der einzelnen Proteine zeigten erwartungsgemäß in keinem Fall lipolytische Aktivität. Auch in den Proben, in denen versucht wurde, LipA::H-CHis durch Lipase-spezifische Foldase zu aktivieren, konnten keine lipolytischen Aktivitäten nachgewiesen werden. Die Ansätze, in denen LipA::H-CHis mit LipA inkubiert wurde, wiesen jedoch nach *in vitro* Renaturierung eine enzymatische Aktivität auf, die in etwa 50 % der Positivkontrolle, in der LipA durch LipH_r-CHis aktiviert wurde, entsprach.

Inaktives vollständiges LipA::H-CHis kann *in vitro* nicht durch Zugabe Lipase-spezifischer Foldase aktiviert werden. LipA::H-CHis ist jedoch seinerseits in der Lage, etwa die Hälfte des LipA, welches durch Zugabe von LipH zurückgefaltet werden kann, *in vitro* zu renaturieren.

3.6.8 Prozessierungsexperimente von heterolog gereinigter Fusion mit Zelllysaten

In der intergenischen Region zwischen *lipA* und *lipH* befindet sich ein Promotor, der die transkriptionelle Kontrolle des *lipH* Gens vermittelt (Rosenau, 2001). Um zu überprüfen, ob die Aktivität dieses Promotors das bei etwa 40 kDa auftretende Fragment des LipA::H bei homologer Expression bedingt, oder ob eine spezifische Prozessierung des Fusionsproteins zu diesem Fragment führt, wurden weitere Experimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde *P. aeruginosa* PABST7.1 mit dem Vektor pBR22bLipA::H Δ A-CHis transformiert (2.8). Anschließend wurde eine Expressionskultur angelegt, die nicht induziert wurde, sondern nach Erreichen einer O.D._{580 nm} von 1 weitere 2 h inkubiert und dann geerntet wurde. Das präparierte Gesamtzellextrakt wurde mit Laurylmaltosid (2 % (w/v)) für 1 h inkubiert und eine IMAC durchgeführt (2.19). Die nach homologer Expression des LipA::H-CHis auftretenden C-terminalen Fragmente wurden durch eine SDS-PAGE (2.26) bestimmt (Abb. 3.68 A). Wie in der Spur, in der eine Probe der Elutionsfraktion aufgetragen wurde, zu erkennen war, war eine Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa, die dem kompletten LipA::H-CHis entspricht, zu erkennen. Eine weitere Bande war bei etwa 40 kDa detektierbar und entsprach dem schon beschriebenen LipH-Fragment der Fusion.

Im weiteren Verlauf wurde überprüft, ob die im Western Blot nachgewiesenen Fragmente der Fusion bei homologer Expression auf spezifische posttranslationale Prozessierung zurückzuführen sind. Dafür wurde das nach heterologer Expression nativ gereinigte und intakte LipA::H-CHis (vgl. 3.6.6) mit Gesamtzellextrakten von *P. aeruginosa* PABS1 und *E. coli* DH5 α für 1 h bei 30 °C inkubiert, um zu überprüfen, ob die Prozessierung *in vitro* mit den in den Extrakten vorhandenen Proteasen nachgestellt werden kann. Nach erfolgter Inkubation wurden die Fusion und eventuell auftretende C-terminalen Fragmente über eine IMAC mit Hilfe des „Ni-NTA Spin Kit“ (Qiagen, Hilden) von den Gesamtzellextrakten getrennt und die Fraktionen über eine SDS-PAGE (2.26) analysiert. Zum Vergleich wurde eine Probe der gereinigten Fusion, die nicht mit Gesamtzellextrakt inkubiert wurde, ebenfalls auf das SDS-PAG aufgetragen (Abb. 3.68 B und C).

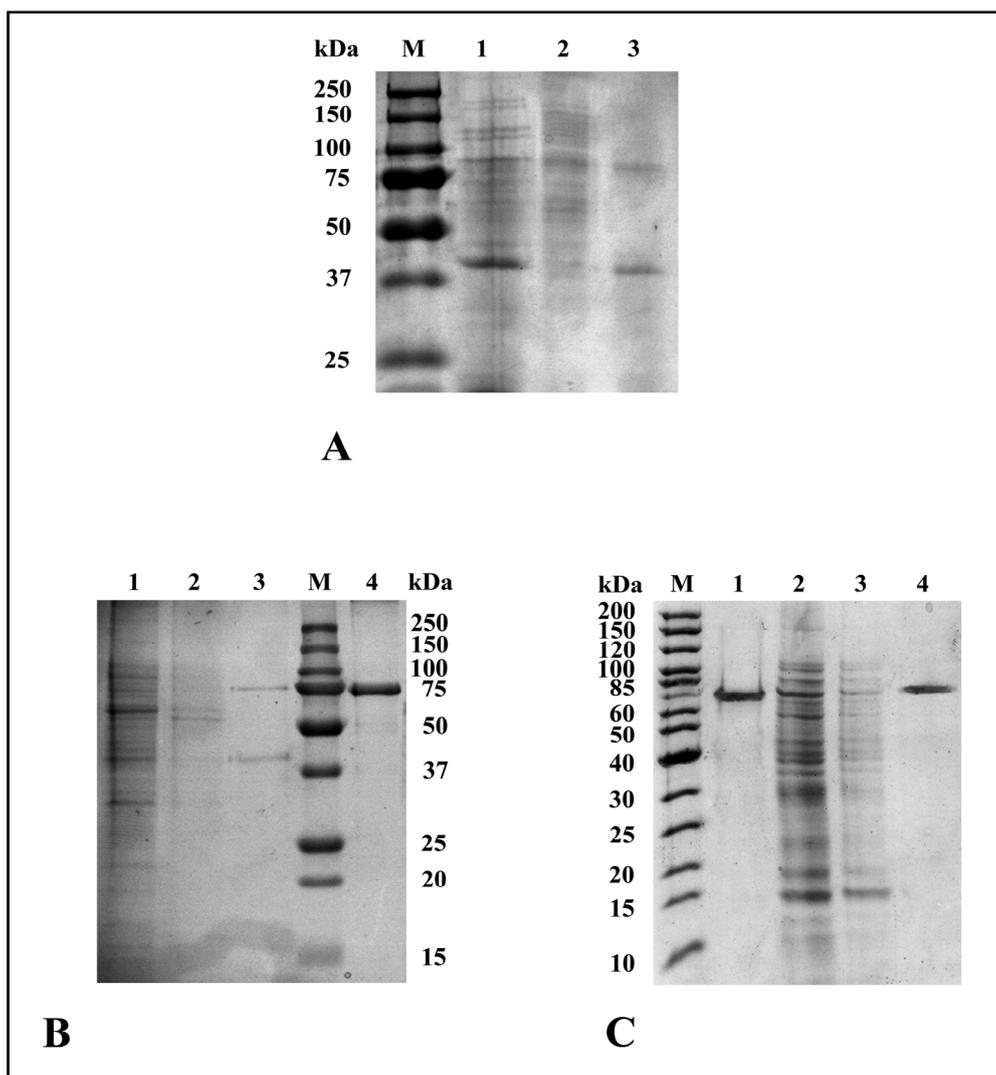


Abb. 3.68: (A) SDS-PAGE der Fraktionen einer IMAC nach Expression von LipA::H-CHis im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABS1. M: Marker; 1: Gesamtzellextrakt; 2: Durchlauf; 3: Elutionsfraktion. (B) SDS-PAGE der Fraktionen der IMAC nach Inkubation von gereinigter, intakter Fusion mit Gesamtzellextrakt von *P. aeruginosa* PABS1. M: Marker; 1: Durchlauf; 2: Waschfraktion; 3: Elutionsfraktion; 4: gereinigtes LipA::H-CHis. (C) SDS-PAGE der Fraktionen der IMAC nach Inkubation von gereinigter, intakter Fusion mit Gesamtzellextrakt von *E. coli* DH5 α . M: Marker; 1: gereinigtes LipA::H-CHis; 2: Durchlauf; 3: Waschfraktion; 4: Elutionsfraktion. Die aufgetragenen Volumina der GZE, Durchlauf- und Waschfraktionen wurden auf gleiche Zelldichten von O.D._{580 nm} = 0,15 bezogen, während jeweils 20 μ L der Elutionsfraktionen verwendet wurden. Die Trenngele (12 %ig) wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Wie anhand der Elutionsfraktionen zu erkennen war, trat nach Inkubation des Fusionsproteins mit Gesamtzellextrakt von *P. aeruginosa* PABS1 die Bande, die auch schon bei homologer Expression von *lipA::H-CHis* zu erkennen war, bei einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa auf. Die Proben, die nicht oder mit Gesamtzellextrakten von *E. coli* DH5 α inkubiert wurden, wiesen hingegen die Bande bei einer Größe von etwa 75 kDa auf, nicht aber das Fragment bei 40 kDa. Somit konnte gezeigt werden, dass das Fragment bei 40 kDa nicht auf die Aktivität des in der intergenischen Region vorhandenen Promotors vor *lipH*, sondern auf spezifische Proteolyse zurückzuführen ist.

Um dies noch einmal zu überprüfen wurde das Experiment, in dem die gereinigte Fusion mit Gesamtzellextrakten inkubiert wurde, unter Zusatz des Protease-Inhibitors „Complete“ (Roche Diagnostics, Penzberg) wiederholt. Zu diesem Zweck wurde Gesamtzellextrakt von *P. aeruginosa* PABS1 für 30 min mit dem Protease-Inhibitor inkubiert, bevor das Fusionsprotein zugegeben wurde. Die Inkubationszeit der Fusion mit den Gesamtzellextrakten betrug bei dieser Versuchsreihe 90 min. Im Anschluss wurden die Proben per SDS-PAGE (2.26) und Western Blot (2.27) unter immunologischem Nachweis des C-terminalen Anteils der Fusion mit einem gegen LipH gerichteten Antiserum analysiert (Abb. 3.69).

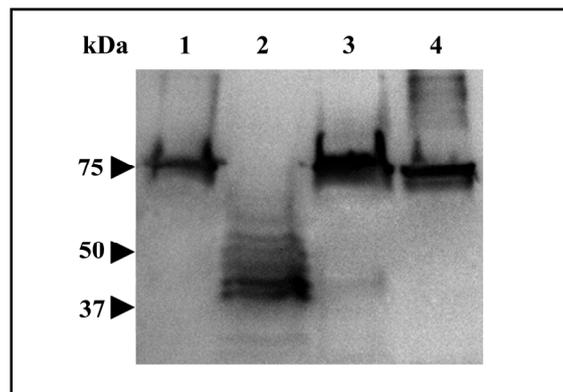


Abb. 3.69: Immunologischer Nachweis von LipA::H-CHis bzw. seiner C-terminalen Fragmente nach Inkubation von gereinigter, intakter Fusion mit Gesamtzellextrakten von *P. aeruginosa* PABS1 und *E. coli* DH5 α . 1: gereinigtes LipA::H-CHis; 2: LipA::H-CHis nach Inkubation mit *P. aeruginosa* PABS1 GZE; 3: LipA::H-CHis nach Inkubation mit *P. aeruginosa* PABS1 GZE und Protease-Inhibitor; 4: LipA::H-CHis nach Inkubation mit *E. coli* DH5 α GZE. Die Volumina der Proben wurden so eingestellt, dass jeweils 2 μ g des LipA::H-CHis aufgetragen wurden. In der Abbildung ist der relevante Teil des Western Blots gezeigt.

Das Fusionsprotein wird in *P. aeruginosa* posttranslational durch Proteolyse in Fragmente mit reproduzierbarem Molekulargewicht gespalten, so dass der LipA- und der LipH-Anteil von LipA::H wieder voneinander getrennt vorliegen. Somit ist eine spezifische Prozessierung des Fusionsproteins in *P. aeruginosa* wahrscheinlich.

3.7 Die Nutzung der Ein-Schritt Reinigung für die Präparation einer noch nicht fertig gefalteten Lipase für die Strukturaufklärung

Die genauen molekularen Ereignisse während der Aktivierung der Lipase durch seine Lipase-spezifische Foldase sind bislang nicht verstanden. Es existieren Röntgenstrukturen sowohl von nativer Lipase aus dem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* und *B. glumae* (Lang *et al.*, 1996; Nardini *et al.*, 2000) als auch von dem Lipase-Lip Komplex aus *B. glumae* (Pauwels *et al.*, 2006). In allen diesen Fällen wurde die Lipase jedoch schon durch ihr Chaperon aktiviert, so dass ausschließlich der Zustand nach der Faltung betrachtet werden kann. Eine heterolog als „inclusion bodies“ gereinigte Lipase LipA aus *P. aeruginosa*, die nachträglich in ihren „nahen nativen“ Zustand überführt wurde und somit die Konformation vor der Bindung und Aktivierung durch LipH aufweisen sollte, lieferte hingegen in NMR ^{15}N - ^1H -Einbindungskorrelationsanalysen keine auswertbaren Spektren (Hausmann, 2004). Dies war wahrscheinlich auf die starke Heterogenität der unterschiedlichen Faltungszustände der Lipase innerhalb der Präparation zurückzuführen. Eine auf diese Weise präparierte Lipase aus „inclusion bodies“ scheint keine einheitliche Struktur aufzuweisen, da sich nur etwa 18 % des Enzyms erfolgreich *in vitro* durch Zugabe von LipH aktivieren lassen (Hausmann, 2004). Deswegen wurde versucht, die Lipase vor ihrer Aktivierung durch ihre Foldase auf andere Art und Weise mit höherer Homogenität bezüglich ihrer Konformation zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde eine Mutante des Chaperons LipH gesucht, die in der Lage sein sollte, LipA zwar noch zu binden, aber nicht mehr zu aktivieren. Eine solche Variante könnte dazu verwendet werden, einen einheitlichen Faltungszustand von LipA durch eine Ein-Schritt Affinitätsreinigung mit an Beads immobilisiertem Chaperon zu gewinnen, um die Struktur der Lipase vor ihrer Aktivierung aufklären zu können. In diesem Rahmen wurde eine *lipH* Mutagenesebank durch fehlerhafte PCR erstellt, die in Kooperation mit dem „Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie“ (Darmstadt) in einem Oberflächendisplaysystem mit dem Autotransporter EstA aus *P. aeruginosa* per „*fluorescence activated cell sorting*“ (FACS) auf die beschriebenen Eigenschaften untersucht wurde (Buest, 2006; Wilhelm *et al.*, 2007). Dabei konnten zwei Varianten des LipH gefunden werden, die in der Lage waren, die Lipase zu binden, aber nicht mehr zu aktivieren. Eine Sequenzierung der *lipH* Gene lieferte Aufschluss über die Primärstruktur der beiden als „LipH G1“ und „LipH G5“ bezeichneten Varianten. Über ein Alignment mit der Sequenz des Wildtyp Chaperons konnte ermittelt werden, dass in beiden Genvarianten große Teile deletiert waren. Während in LipH G5 der mittlere Teil des Chaperons, der als sogenannter Bügel die beiden N- und C-terminal gelegenen Minidomänen verbindet, und für den eine essentielle Rolle bei der Aktivierung der Lipase diskutiert wird (Pauwels *et al.*, 2006), deletiert war (Abb. 3.70), wies die Primärstruktur des stark verkürzten LipH G1 nur noch eine sehr kurze Sequenz auf, die gewisse Homologie zu der von Wildtyp LipH zeigte (Abb. 3.71).

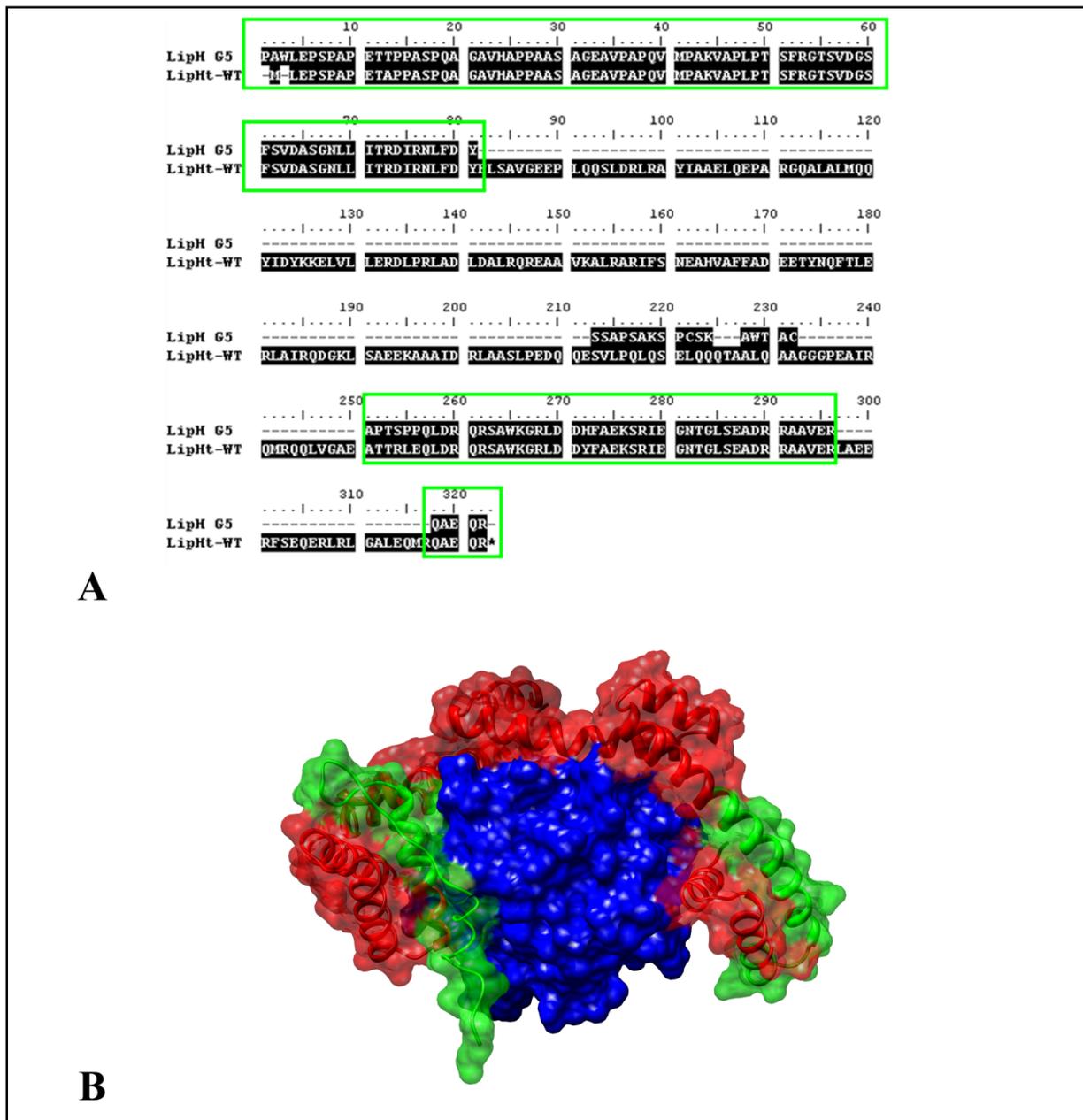


Abb. 3.70: (A) Alignment der Primärstruktur von LipH G5 und LipH durch den ClustalW Algorithmus (Myers & Miller, 1988). Die homologen N- und C-terminal lokalisierten Bereiche sind grün umrandet. (B) Lage der homologen Bereiche des LipH G5 in dem Strukturmodell des LipAH Komplexes von *P. aeruginosa*. Die Oberfläche der Lipase ist blau dargestellt. Die homologen Anteile von LipH G5 sind innerhalb der Struktur des LipH grün gezeigt, während die deletierten Bereiche rot markiert sind. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

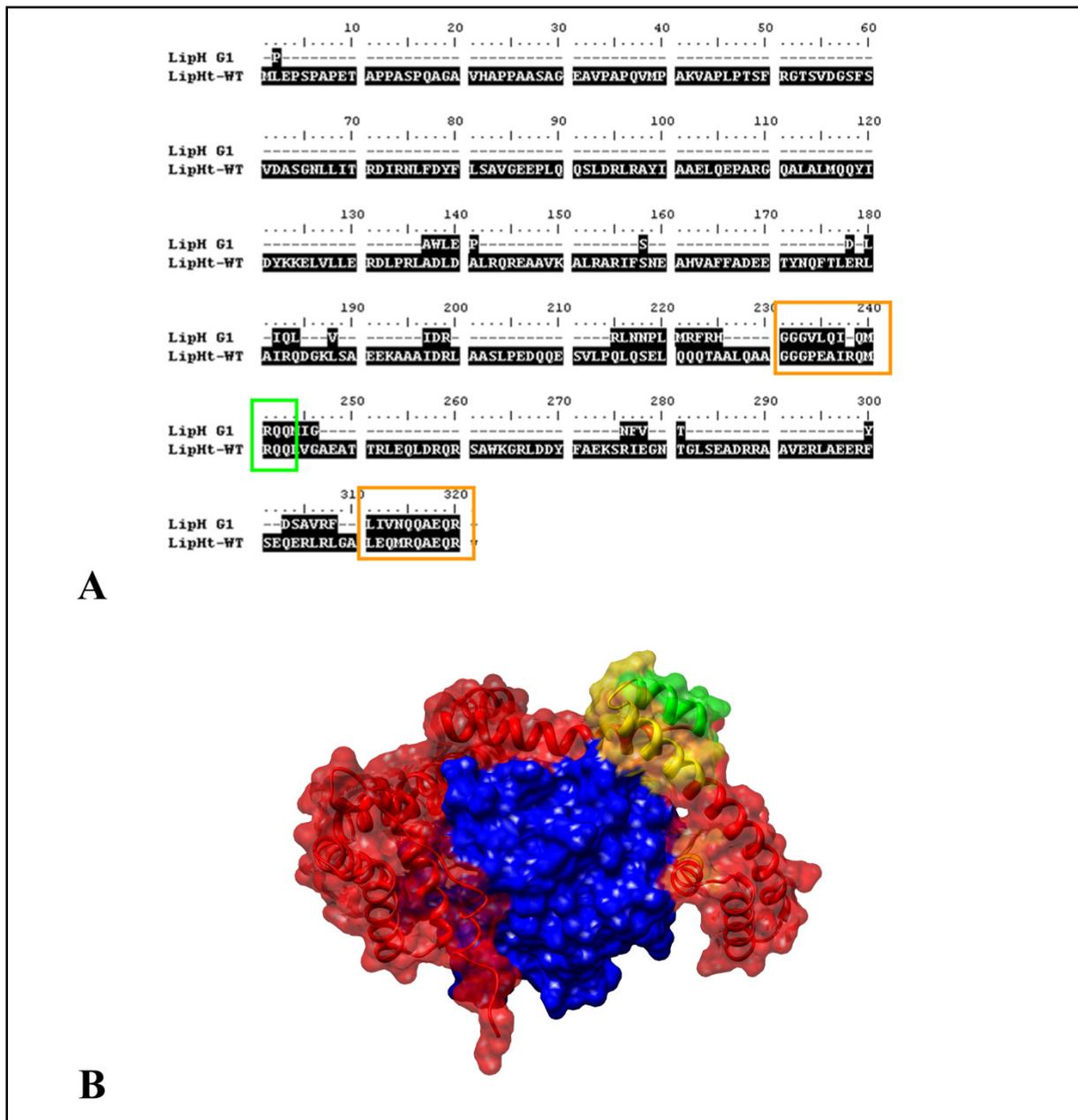


Abb. 3.71: (A) Alignment der Primärstruktur von LipH G1 und LipH durch den ClustalW Algorithmus (Myers & Miller, 1988). Die homologen Bereiche sind grün und orange umrandet. (B) Lage der homologen Bereiche des LipH G5 in dem Strukturmodell des LipAH Komplexes von *P. aeruginosa*. Die Oberfläche der Lipase ist blau dargestellt. Die homologen Anteile von LipH G1 sind innerhalb der Struktur des LipH in grün bzw. gelb gezeigt, während die deletierten Bereiche rot markiert sind. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

LipH G5 bestand hauptsächlich aus den zwei für die Bindung des Chaperons putativ essentiellen N- und C-terminalen Domänen. LipH G1 wies nur noch einen kleinen Bereich von 23 Aminosäuren des insgesamt 63 Aminosäuren großen Peptids auf, der gewisse Homologie zu Wildtyp LipH zeigte. Nachfolgend wurden die für die Proteine codierenden Sequenzen aus den Vektoren pEST100-LipHG5 bzw. pET100-LipHG1 für das Oberflächendisplay, in dem sie als translationale Fusion mit *estA* vorlagen, per PCR mit den Primern „LipH-G5-N-up“ und „LipH-G5-C-dwn“ bzw. „LipH-G1-up“ und „LipH-G5-C-

dwn“ amplifiziert (2.10). Weiterhin wurden die im LipH G5 vorhandenen, für die N- und C-terminal lokalisierten Minidomänen codierenden, Nukleotidabschnitte jeweils einzeln mit den Primern „LipH-G5-N-up“ und „LipH-G5-N-dwn“ bzw. „LipH-G5-C-up“ und „LipH-G5-C-dwn“ amplifiziert (2.10). Die erhaltenen gereinigten PCR-Produkte und der Zielvektor pET19b wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert und ligiert. Die konstruierten Plasmide mit den Bezeichnungen pETLipHG5-NHis, pETLipHG1-NHis, pETLipHG5N-NHis und pETLipHG5C-NHis trugen die mit der für ein Poly-Histidin-Peptid codierenden Sequenz fusionierten Varianten unter Kontrolle des T7-Promotors. Sie wurden in *E. coli* BL21(DE3) durch Transformation (2.8) eingebracht, um sie anschließend zu überexprimieren (2.4.3). Proben der Gesamtzellextrakte der Kulturen vor und nach Induktion wurden durch eine SDS-PAGE (2.26) zur Beurteilung des Überexpressionserfolgs verglichen (Abb. 3.72).

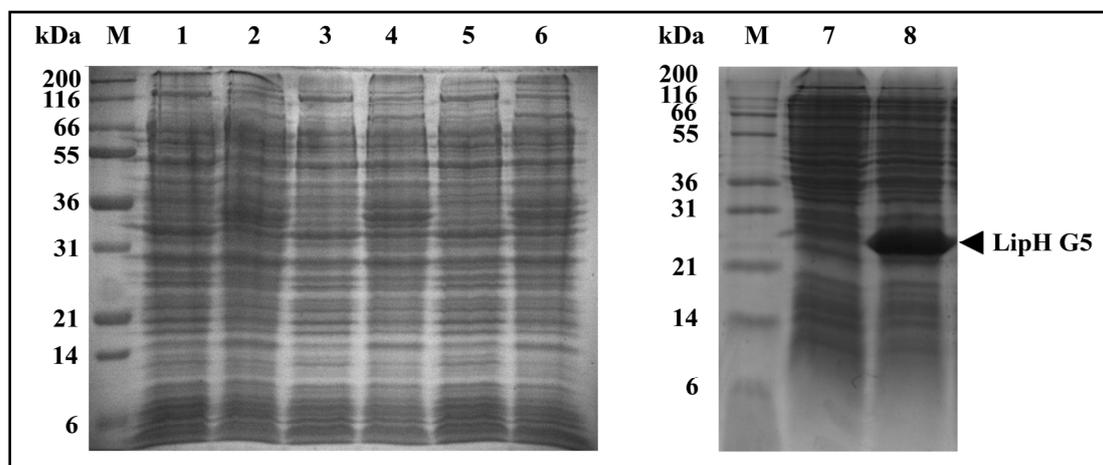


Abb. 3.72: SDS-PAGE der Gesamtzellextrakte der Kulturen nach heterologer Überexpression von LipH G5, LipH G5N, LipHG5C und LipH G1 in *E. coli* BL21(DE3) in LB. M: Marker; 1: LipH G1⁺ vor Induktion; 2: LipH G1⁺ nach Induktion; 3: LipH G5N⁺ vor Induktion; 4: LipH G5N⁺ nach Induktion; 5: LipH G5C⁺ vor Induktion; 6: LipH G5C⁺ nach Induktion; 7: LipH G5⁺ vor Induktion; 8: LipH G5⁺ nach Induktion. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580 nm} = 0,15). Die Trenngele (15 %ig) der Tricin-Gele wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

Es konnte lediglich eine starke zusätzliche Bande bei Expression des LipH G5 (kalkulierte molekulare Masse 18,2 kDa) bei einem Molekulargewicht von etwa 24 kDa detektiert werden. Die Gesamtzellextrakte der Überexpressionskulturen für LipH G1 (9,9 kDa) und die N- bzw. C-terminale Domäne des LipH G5, die im Folgenden als LipH G5N (10,8 kDa) bzw. LipH G5C (8,7 kDa) bezeichnet werden, wiesen nach Induktion und Ernte keine deutlichen zusätzlichen Banden auf. Trotzdem wurde eine Reinigung der Proteine durch immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) aus diesen Gesamtzellextrakten versucht. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen der Reinigung wurde nachfolgend mit einem BCA Test bestimmt. Insgesamt befanden sich nach Reinigung aus jeweils 1 L einer Überexpressionskultur in den Elutionsfraktionen 253 µg (LipH G5N), 84 µg (LipH G5C), 2390 µg (LipH G5) und 79 µg (LipH G1) Protein. Aufgrund der sehr schwachen Proteinkonzentration der Fraktionen wurden sie auf 10 % ihres ursprünglichen Volumens

konzentriert (2.20). Anschließend wurde der Reinigungserfolg auf 15 %igen Tricin-Gelen analysiert (Abb. 3.73).

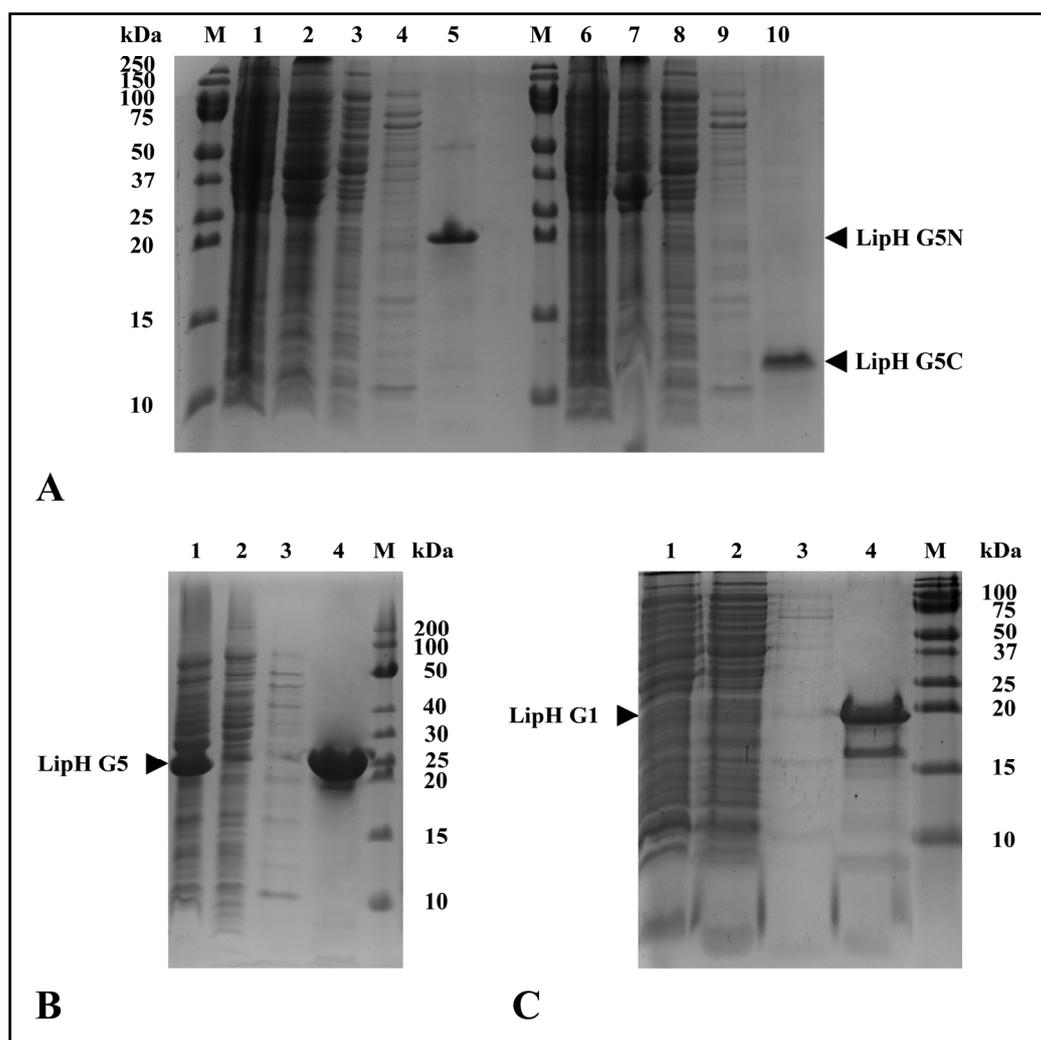


Abb. 3.73: Analyse des Reinigungserfolgs der verschiedenen LipH Varianten durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) per SDS-PAGE. (A) Reinigung von LipH G5N und LipH G5C. M: Marker; 1: GZE von LipH G5N⁺ vor Überexpression; 2: GZE von LipH G5N⁺ nach Überexpression; 3: Durchlauf von LipH G5N; 4: Waschfraktion von LipH G5N; 5: Elution von LipH G5N. 6: GZE von LipH G5C⁺ vor Überexpression; 7: GZE von LipH G5C⁺ nach Überexpression; 8: Durchlauf von LipH G5C; 9: Waschfraktion von LipH G5C; 10: Elution von LipH G5C. **(B) Reinigung von LipH G5.** M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Durchlauf; 3: Waschfraktion; 4: Elution. **(C) Reinigung von LipH G1.** M: Marker; 1: GZE nach Überexpression; 2: Durchlauf; 3: Waschfraktion; 4: Elution. Die aufgetragenen Volumina der GZE und der Waschfraktionen wurden auf gleiche Zelldichten von $O.D._{580\text{ nm}} = 0,15$ bezogen, während jeweils 15 μL der konzentrierten Elutionsfraktionen verwendet wurden. Die Trenngele der Tricin-Gele (15 %ig) wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

In den Elutionsfraktionen war jeweils eine Bande mit deutlicher Intensität vorhanden. Jedoch entsprach das Molekulargewicht in allen Fällen nicht den theoretischen Massen der Proteinvarianten, sondern war durchweg größer. Nichtsdestotrotz wurde die Interaktion der Proteine mit Gesamtzellextrakt, der LipA enthielt, welches zuvor in seine „nahe native“ Konformation durch De- und Renaturierung überführt worden war, durch ein Experiment mit Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) untersucht (2.23). Die während des

Experiments aufgefangenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE auf 15 %igen Tricin Gelen untersucht. (Abb. 3.74).

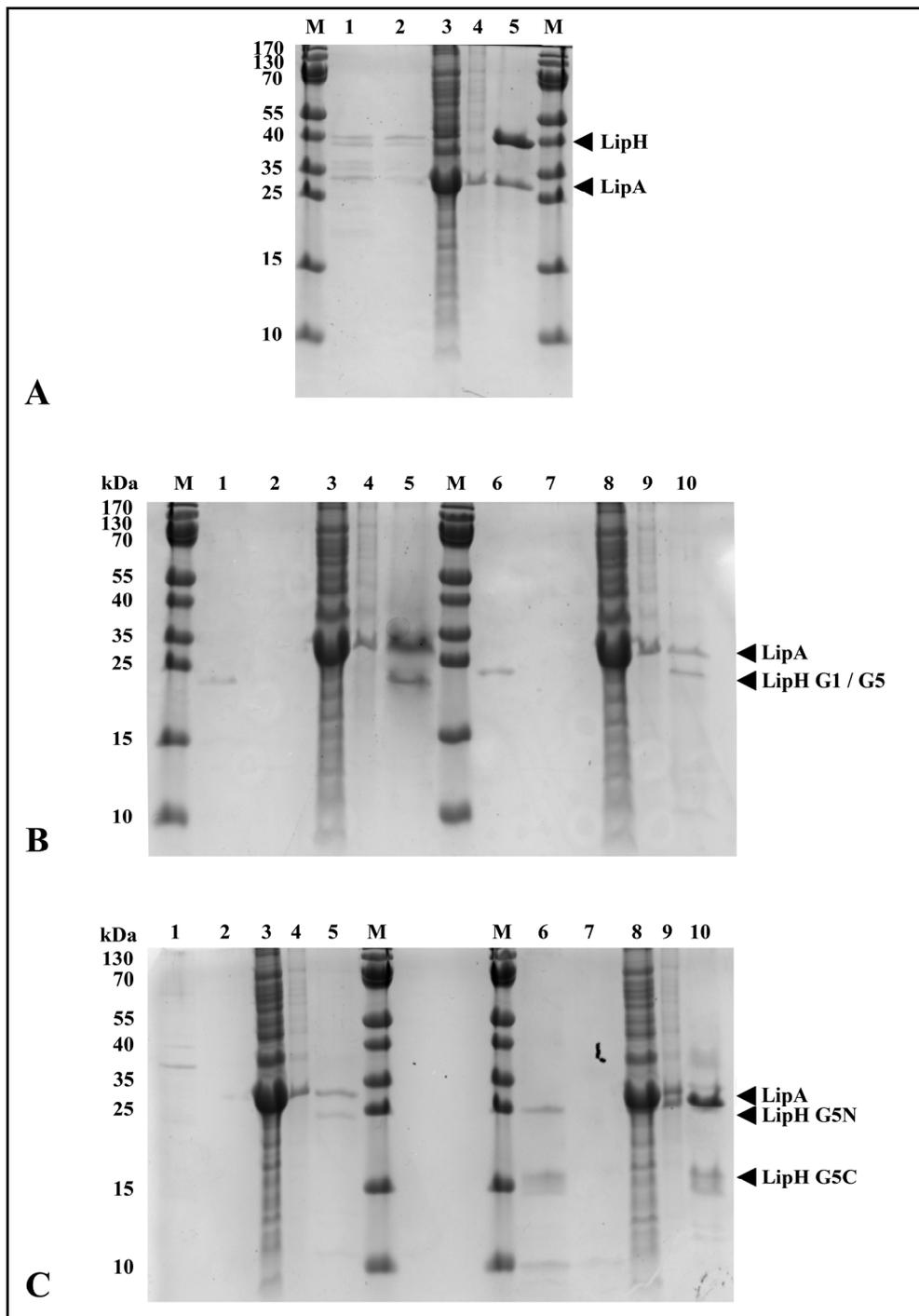


Abb. 3.74: SDS-PAGE Analyse der Interaktionsexperimente der in den Elutionsfraktionen enthaltenen Proteine mit Gesamtzellextrakt, das „nahe natives“ LipA enthielt. (A) Positivkontrolle, in der LipH_r-NHis an den Beads immobilisiert wurde. M: Marker; 1: Durchlauf LipH_r-NHis; 2: Waschfraktion LipH_r-NHis; 3: Durchlauf LipA⁺ GZE; 4: Waschfraktion LipA; 5: Elution. (B) Interaktionsexperimente mit den Elutionsfraktionen von LipH G1 und LipH G5. M: Marker; 1: Durchlauf LipH G1; 2: Waschfraktion LipH G1; 3: Durchlauf LipA⁺ GZE; 4: Waschfraktion LipA; 5: Elution; 6: Durchlauf LipH G5; 7: Waschfraktion LipH G5; 8: Durchlauf LipA⁺ GZE; 9: Waschfraktion LipA; 10: Elution. (C) Interaktionsexperimente mit den Elutionsfraktionen von LipH G5N und LipH G5C. M: Marker; 1: Durchlauf LipH G5N; 2: Waschfraktion LipH G5N; 3: Durchlauf LipA⁺ GZE; 4: Waschfraktion LipA; 5: Elution; 6: Durchlauf LipH G5C; 7: Waschfraktion LipH G5C; 8: Durchlauf LipA⁺ GZE; 9: Waschfraktion LipA; 10: Elution. Die Trenngele der Tricin-Gele (15 %ig) wurden nach der Elektrophorese der Proteine mit „SimplyBlue SafeStain“ gefärbt.

In den Elutionsfraktionen waren in allen Fällen sowohl die LipA Bande als auch die Banden der Proteine wiederzufinden, die im Vorfeld aus dem Überexpressionskulturen der LipH Varianten gereinigt wurden. Somit banden alle selektiv an die Ni-NTA Matrix der Beads und immobilisierten die Lipase. Nachfolgend wurde die lipolytische Aktivität der gesammelten Fraktionen bestimmt (2.24.1). Es konnte jedoch nur in der Elutionsfraktion der Positivkontrolle, in der LipH_r-NHis verwendet wurde, enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Somit konnte gezeigt werden, dass die gereinigten Proteine aus den Überexpressionen der LipH Varianten fähig waren, die Lipase LipA zu binden, aber nicht mehr zu aktivieren.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den gereinigten Proteinen um die LipH Varianten handelte, die sich durchweg in ihrer elektrophoretischen Mobilität von dem kalkulierten theoretischen Molekulargewicht unterschieden, wurde ein immunologischer Nachweis des LipH und LipA mit der für das Beadexperiment eingesetzten Fraktion und der Elutionsfraktion, die nach Interaktion mit LipA aufgefangen wurde, durchgeführt (Abb. 3.75).

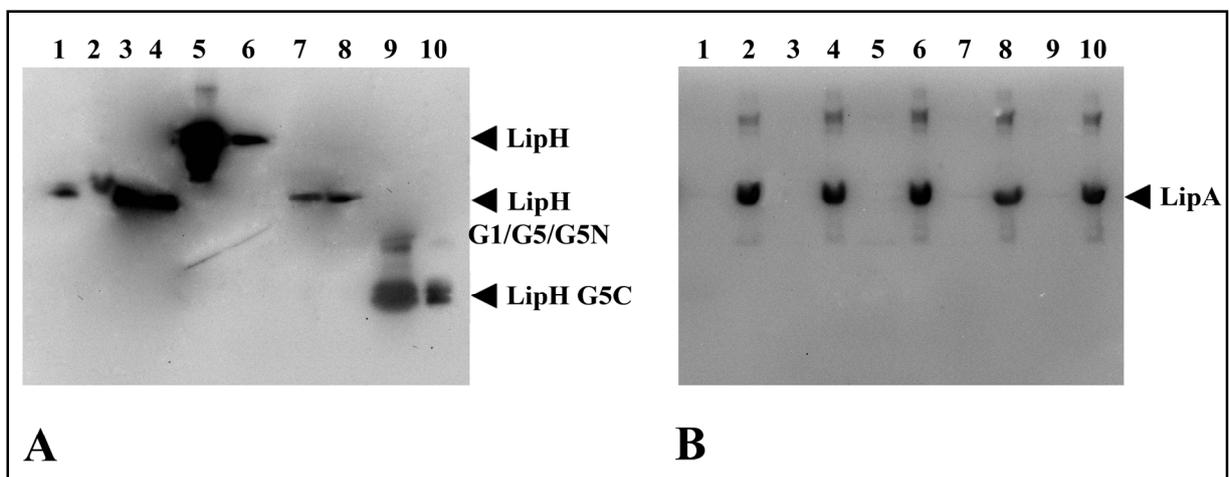


Abb. 3.75: Immunologischer Nachweis von LipH (A) und LipA (B) mit den für das Beadexperiment eingesetzten Fraktion und der Elution des Interaktionsexperiments per Western Blot. In aufeinanderfolgenden Spuren wurden jeweils die für das Beadexperiment eingesetzte Probe (links) und die Elutionsfraktion (rechts) aufgetragen. 1 & 2: LipH G1; 3 & 4: LipH G5; 5 & 6: LipH_r-NHis; 7 & 8: LipH G5N; 9 & 10: LipH G5C. Es wurden jeweils 15 µL der Proben aufgetragen. In der Abbildung sind die relevanten Teile der Blots gezeigt.

Während des immunologischen Nachweises von LipH konnten in allen Fraktionen auf Höhe der Proteine, die in den Elutionsfraktionen der immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie nach der SDS-PAGE auftraten, Signale detektiert werden (Abb. 3.75 A). Sogar LipH G1, das aufgrund seiner stark veränderten Primärstruktur keine hohe Homologie zu Wildtyp LipH aufweist, wurde von dem Antikörper erkannt und gebunden. Im Fall des immunologischen Nachweises von LipA konnten in allen Spuren, die Proben der Elutionsfraktionen der Interaktionsexperimente enthielten, Signale der Lipase detektiert werden.

Die LipH Varianten G1, G5N und G5C können nur in sehr geringen Mengen gewonnen werden. Die elektrophoretische Mobilität aller untersuchten Varianten unterscheidet sich zum Teil deutlich von der durch ihr theoretisches Molekulargewicht erwarteten. Alle betrachteten Varianten binden LipA, aktivieren es jedoch nicht. Somit ist durch sie eine Möglichkeit gegeben, noch nicht gefalteter Lipase für die Strukturaufklärung homogen zu präparieren, um den molekularen Mechanismus der Aktivierung von Lipasen durch ihre Foldasen besser zu verstehen.

4. Diskussion

4.1 Optimierung der heterologen Expression und Reinigung von LipA und LipH

Bei homologer Expression der Lipase LipA wird das Enzym unter Mitwirkung von etwa 30 akzessorischen Proteinen in das Medium transportiert (Rosenau & Jaeger, 2000; Rosenau & Jaeger, 2004). Die enge Verknüpfung von Faltung und Sekretion bei diesem Prozess erschwert die Aufklärung der genauen molekularen Mechanismen dieses Vorgangs *in vivo*. Um einzelne Schritte dieses Prozesses genauer zu analysieren, können die Proteine alternativ in *E. coli* exprimiert, gereinigt und ihre Interaktion *in vitro* charakterisiert werden. Hierbei sollten die Ergebnisse jedoch mit Umsicht auf die physiologischen Bedingungen übertragen werden, da das experimentelle System die potentiell Einfluss nehmenden Faktoren innerhalb der Zelle nicht komplett oder korrekt widerspiegelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion der Lipasen und der Lipase-spezifischen Foldase LipH unter physiologischen und biotechnologischen Aspekten näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden beide Proteine, die in *P. aeruginosa* chromosomal in einem bicistronischen Operon codiert sind, separat voneinander heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und gereinigt, um im Folgenden ihre Interaktion analysieren zu können.

Während das Enzym aufgrund seiner N-terminal lokalisierten Signalsequenz über den Sec-Apparat in das Periplasma transportiert werden kann, bedingt das Fehlen des für die Typ-II Sekretion entsprechenden Proteinkomplexes in *E. coli* die Aggregation der Lipase und die Bildung von „inclusion bodies“. Diese sind wahrscheinlich sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma lokalisiert und kommen vermutlich durch Interaktion hydrophober und exponierter Bereiche der ungefalteten Proteine zustande (Villaverde & Carrio, 2003). Die Lipasevariante ohne Signalsequenz akkumulierte ausschließlich cytoplasmatisch und war im Gegensatz zum Wildtyp LipA keiner weiteren proteolytischen Degradation im Periplasma ausgesetzt, wodurch die Ausbeute an Zielprotein gesteigert werden konnte (Abb. 3.1).

Nachfolgend konnten die Proteinaggregate durch Zentrifugations- und Extraktionsschritte von kontaminierendem Protein gereinigt werden. Jedoch konnten die „inclusion bodies“ während der Reinigung nach Expression in Vollmedium nicht vollständig von den Wirtsproteinen befreit werden. Neben der Bande der gereinigten Lipase aus „inclusion bodies“ bei etwa 29 kDa konnten mehrere kontaminierende Banden detektiert werden (Abb. 3.2). In Bakterienzellen werden unlösliche Proteinaggregate durch molekulare Chaperone in Lösung gebracht, um eine korrekte Faltung zu vermitteln oder die proteolytische Degradation zu ermöglichen. Bei der Reinigung von „inclusion bodies“ konnten Faltungsmediatoren isoliert werden, die an den unlöslichen Proteinpartikeln assoziiert waren, wie zum Beispiel die „inclusion body proteins“ IbpA und IpbB, aber auch generelle Chaperone wie DnaK und GroEL (Georgiou & Valax, 1996; Tomoyasu *et al.*, 2001; Carrio & Villaverde, 2002). Bei Reinigung der „inclusion bodies“ nach Anzucht in M9-Minimalmedium konnte LipA in elektrophoretischer Homogenität gewonnen werden (Abb. 3.4). In definierten Minimalmedien sind die Bakterienzellen aufgrund der chemischen Zusammensetzung gezwungen, alle von ihnen benötigten Makromoleküle selbst zu synthetisieren. Die Veränderung der physiologischen Bedingungen schien in diesem Fall einen für die Reinigung der „inclusion bodies“ positiven Einfluss auf die Expression oder Assoziation von kontaminierendem

Protein an den Proteinaggregaten zur Folge zu haben. Allerdings resultiert die Überexpression in Minimalmedien wegen der zusätzlich aufzubringenden Syntheseleistung im Vergleich zu Vollmedium oftmals in einer geringeren Proteinexpression (Tao *et al.*, 1999). Auch limitierende Bedingungen in Bezug auf Spurenelemente haben direkten Einfluss auf die Syntheseleistung der Zellen. Bei Anzucht von *Brevibacterium ammoniagenes* konnte in Mn^{2+} -limitierten Kulturen eine erhebliche Beeinträchtigung der DNA-Synthese beobachtet werden (Oka *et al.*, 1968). Unter Zusatz einer Spurenelement-Lösung und $FeSO_4$ konnte die Expression von LipA in Minimalmedium deutlich gesteigert werden (Abb. 3.3).

Die Lipase-spezifische Foldase LipH wurde als N-terminal verkürzte Variante ohne ihren dort lokalisierten Membrananker exprimiert, um sie anschließend in löslicher Form reinigen zu können. Wie schon mehrfach beschrieben wurde, wird die *in vitro* Funktionalität von Lip Proteinen durch die Entfernung des ersten N-terminalen Drittels nicht beeinträchtigt (Shibata *et al.*, 1998b; Quyen *et al.*, 1999; El Khattabi *et al.*, 2000). In neueren Untersuchungen, in denen einzelne Aminosäuren des Membranankers von LipH mutagenisiert wurden, wurde jedoch in *in vivo* Experimenten eine verringerte Lipaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp LipH nachgewiesen (Sadtler, 2007). Demgegenüber wies eine um die 63 N-terminal lokalisierten Aminosäuren verkürzte Foldasevariante eine gesteigerte Faltungseffizienz *in vitro* auf, während jedoch bei homologer Expression gezeigt werden konnte, dass das Vorhandensein des N-Terminus für die Sekretion aktiver Lipase über die Typ-II Maschinerie essentiell ist (Sadtler, 2007). Somit scheint der N-Terminus der Foldase *in vivo* für weitere Prozesse über die reine Aktivierung der Lipase hinaus eine physiologische Bedeutung zu besitzen, während ihm für den Faltungsmechanismus des Enzyms in den angestrebten *in vitro* Experimenten keine besondere Bedeutung zukommt.

4.2 Charakterisierung von LipC und Untersuchung der LipH-abhängigen Faltung

Substratspezifität und Physiologie der Lipasen aus *P. aeruginosa*

LipC wurde analog zu LipA ohne seine Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport exprimiert und gereinigt, um es anschließend *in vitro* untersuchen zu können. Das mit *pNP*-Ethern unterschiedlicher Kettenlänge bestimmte Substratspektrum weist deutliche Unterschiede zu demjenigen von LipA auf. Trotz der hohen Homologie von LipA und LipC akzeptierte LipC jedes untersuchte Substrat von einer Kettenlänge zwischen C₄ und C₁₈, während LipA eine deutliche Präferenz für die Substrate mit Kettenlängen von C₁₂, C₁₄ und C₁₆ aufwies (Abb. 3.11). Darüberhinaus wies LipC eine höhere Affinität von K_m = 0,624 mM zu *pNPP* auf als LipA (K_m = 1,066 mM; Abb. 3.12). Die Vielfalt akzeptierter Substrate eines Enzyms ist direkt proportional zu seinem evolutionären Potential (Yuan *et al.*, 2005). Somit qualifiziert die hohe Akzeptanz von Substraten die Lipase LipC als idealen Startpunkt für Optimierung der Substratspezifität durch Methoden der gerichteten Evolution.

Die hohe Sequenzidentität von LipA und LipC erlaubte die Homologie-Modellierung der Struktur von LipC unter Verwendung der bekannten LipA Struktur (Nardini *et al.*, 2000) als Vorlage. Mit einer Identität von 55 % auf Primärstrukturebene können in der Regel verlässliche Modelle mit hoher Qualität generiert werden (Forster, 2002). In dem Vergleich der Tunnel von LipA und LipC, die zum katalytisch aktiven Zentrum führen, konnten mit dem Programm CAVER (Damborsky *et al.*, 2007) signifikante geometrische Unterschiede identifiziert werden. Der Tunnel von LipC weist einen größeren Radius als derjenige von LipA auf, was sich in einem 1,5-fach größeren Volumen der Kavität widerspiegelt (997 Å³ und 666 Å³; Abb. 3.13). Auch diese Beobachtung könnte für einen erfolgreichen Ansatz der gerichteten Evolution von Vorteil sein, da LipC eine größere Akzeptanz gegenüber verzweigten und damit sperrigeren Substraten aufweisen könnte. Die Kettenlängenspezifität der Lipase aus *Candida rugosa* konnte bereits durch Substitution von Resten, die an der Bildung des Tunnels beteiligt sind, mit Aminosäuren größerer Seitenketten geändert werden. Auf diese Weise konnte die Substratspezifität durch Punktmutationen verändert werden, indem der Tunnel an unterschiedlichen Stellen verjüngt wurde (Schmitt *et al.*, 2002). In einer anderen Arbeit wurde ein Leucin, welches den Tunnel einer Haloalkan Dehalogenase aus *Sphingomonas paucimobilis* teilweise versperrte, in einer Sättigungsmutagenese verändert. In diesem Fall konnte die stärkste Zunahme an Aktivität bei Substitutionen zu Aminosäuren mit kleineren Seitenketten wie Alanin, Methionin und Glycin erreicht werden, wodurch der Tunnel besser zugänglich war (Chaloupkova *et al.*, 2003).

Auch wenn die physiologische Funktion beider Enzyme noch ungeklärt ist, weist die deutlich unterschiedliche Substratspezifität darauf hin, dass die Lipasen unterschiedliche physiologische Aufgaben haben. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass die Enzyme in *P. aeruginosa* unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen exprimiert werden (Martinez *et al.*, 1999; Rosenau & Jaeger, 2000).

P. aeruginosa befällt als fakultativ pathogener, opportunistischer Organismus immundefiziente bzw. immunsupprimierte und an cystischer Fibrose (Mukoviszidose) erkrankte Menschen (Bodey *et al.*, 1983; Govan & Deretic, 1996; Kipnis *et al.*, 2006). Bei

Patienten, die an der autosomal rezessiven Erbkrankheit Mukoviszidose leiden, ist die Haupttodesursache eine *P. aeruginosa*-Infektion der Atemwege (Winkler *et al.*, 1985; Jaeger, 1994b; Banerjee & Stableforth, 2000; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2006). In der Lunge stellt Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) einen der Hauptbestandteile der oberflächenaktiven Substanz (Surfactant) dar, der die Oberflächenspannung reduziert und ähnlich wie ein Detergenz wirkt, um die aufzuwendende Kraft während der Atmung zu reduzieren (Schmidt *et al.*, 2007). Die Degradation von DPPC durch das Zusammenspiel von Phospholipase C und einer Lipase von *P. aeruginosa* wurde bereits beschrieben, und resultierte in der Bildung von Palmitat und Dipalmitoylglycerol (DPG), während die Lipase alleine keine Aktivität gegen DPPC aufwies (Beatty *et al.*, 2005). Infektiöse *P. aeruginosa* Zellen weisen in ihrem Lipopolysaccharid (LPS) eine unter keinen anderen physiologischen Bedingungen beschriebene Zusammensetzung des Lipid A auf. In einem klinischen *P. aeruginosa*-Isolat eines Patienten mit cystischer Fibrose konnte verändertes Lipid A nachgewiesen werden, in dem mehr als 33 % des Lipid A Palmitatreste aufwies, obwohl diese Fettsäure bis zu diesem Zeitpunkt nicht als Bestandteil des Lipid A in *P. aeruginosa* beschrieben wurde. Diese Modifikation konnte nicht mehr nachgewiesen werden, nachdem der isolierte Stamm in LB angezogen wurde (Ernst *et al.*, 1999). *Salmonella*, welche mit Palmitat substituiertes Lipid A besitzen, zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden (CAMPs) und werden aufgrund der veränderten LPS-Struktur schlechter vom Immunsystem erkannt (Guo *et al.*, 1998; Tanamoto & Azumi, 2000). Somit könnten die Lipasen an der Freisetzung von Palmitat aus DPPC beteiligt sein, um zum Einen eine leichtere Kolonisierung des Respirationstraktes durch Abbau der Oberflächenspannung zu ermöglichen, während zum Anderen die Fettsäure zur Substitution des Lipid A verwendet werden kann, um eine erhöhte Resistenz gegenüber den Abwehrmechanismen des Wirts zu erlangen.

LipH vermittelt die Faltung von LipA und LipC

Neben LipA besitzt *P. aeruginosa* als einziges bekanntes Gram-negatives Bakterium noch eine weitere Typ I.1 Lipase. Während Lipasen in der Regel in einem bicistronischen Operon zusammen mit ihrem Lif-Protein codiert sind, konnte stromabwärts von *lipC* kein entsprechendes Gen identifiziert werden (Martinez *et al.*, 1999). Eine Interaktion mit LipH für die Faltung von LipC wurde diskutiert (Martinez *et al.*, 1999), jedoch wurde bislang kein direkter biochemischer Beweis für diese These erbracht. Da LipC unter anderen physiologischen Bedingungen als LipA exprimiert wird (Martinez *et al.*, 1999; Rosenau & Jaeger, 2000), muss eine Möglichkeit gegeben sein, auch bei vollständiger Repression von LipA die Expression der Lipase-spezifischen Foldase unabhängig regulieren zu können. Ein Promotor, der diese Notwendigkeit bestätigt, konnte in der intergenischen Region zwischen *lipA* und *lipH* identifiziert werden (Rosenau, 2001). Lipase-spezifische Foldasen erkennen und falten die Lipase, mit der sie zusammen codiert werden, mit hoher Spezifität, so dass nach *in vitro* Rückfaltungen von Lipasen mit Lif-Proteinen nahe verwandter Spezies nur geringe lipolytische Aktivitäten detektiert werden konnten (El Khattabi *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob LipH als erstes Lif-Protein in der Lage ist, zwei Lipasen in ihre aktive Konformation zu überführen, wurden die Proteine separat voneinander exprimiert und in gereinigter Form in *in vitro* Renaturierungsexperimenten charakterisiert. Im Rahmen dieser

Experimente konnte zum ersten Mal auf Proteinebene gezeigt werden, dass LipH nicht nur LipA, sondern auch LipC faltet. Nur nach Zugabe von LipH konnte eine deutliche Lipaseaktivität gemessen werden (Abb. 3.8). Eine Vielzahl Lipase-Lif Systeme verschiedener Spezies wurde bereits beschrieben. Bislang wurde angenommen, dass Lif-Proteine monospezifische Faltungsmediatoren darstellen, die nur die Lipasen aktivieren, die mit ihnen zusammen in einem Operon codiert werden. Es ist noch nicht geklärt, warum die Faltung dieser Lipasen Chaperon-abhängig ist. Die Lipase von *P. spec.* KFCC10818 konnte durch Substitution einer einzelnen Aminosäure dahingehend verändert werden, dass sie sich selbst, unabhängig von ihrem Lif-Protein, in die aktive Konformation faltet (Kim *et al.*, 2001). In einem Versuch, in dem diese Punktmutation in die Lipase LipA aus *P. aeruginosa* eingeführt wurde, konnte der Befund für dieses Enzym jedoch nicht bestätigt werden (Wendorff, persönliche Mitteilung). Darüberhinaus scheint die Notwendigkeit eines speziellen Modulators für die alleinige Faltung unter diesem Aspekt nur schwer nachvollziehbar, wenn sich die Funktion der Lif-Proteine auf die Aktivierung der Lipasen beschränkt. Unter anderem wurde eine Beteiligung von Strukturelementen der Lif-Proteine an der Erkennung durch den Typ-II Sekretionsapparat nach erfolgter Komplexierung mit ihrer Lipase wiederholt diskutiert (Sandkvist, 2001; Rosenau & Jaeger, 2004).

Vergleich der *in vitro* Rückfaltung von LipA und LipC

Das Verhalten von LipA und LipC in den durchgeführten *in vitro* Rückfaltungsexperimenten ähnelt sich stark. Die Effizienz der Aktivierung nahm stark bei Erhöhung der in die Rückfaltung eingesetzten Konzentration an Glycerol zu (Abb. 3.8). Es wurde bereits für die Lipase-Lif Systeme von *B. glumae* und *B. cepacia* beschrieben, dass die *in vitro* Renaturierung unter Zusatz von Glycerol verbessert werden konnte (Rariy & Klibanov, 1997; Quyen *et al.*, 1999). Dies wurde auf die Bildung von wasserfreien Mikroumgebungen, die hydrophobe Interaktionen stimulieren, zurückgeführt (Rariy & Klibanov, 1997; Quyen *et al.*, 1999; El Khattabi *et al.*, 2000). Tatsächlich sind 63 % der Interaktionen zwischen der Foldase und der Lipase aus *B. glumae* nicht polar (Pauwels *et al.*, 2007). Darüberhinaus konnte eine geringe, aber detektierbare, lipolytische Aktivität bei Rückfaltung beider Lipasen in Abwesenheit des Chaperons bei 45 % (v/v) Glycerol gemessen werden (Abb. 3.8). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion und Aktivierung sowohl von LipA als auch von LipC durch LipH *in vitro* ähnliche chemische Umgebungen erfordert.

Wie bereits für die Lipase von *P. aeruginosa* TE3285 gezeigt wurde, konnte nach *in vitro* Aktivierung von LipA und LipC unter Anwesenheit des Chelators EDTA in einer Konzentration von 10 mM keine lipolytische Aktivität mehr detektiert werden (Shibata *et al.*, 1998a). Bei Zusatz von EDTA und einem Überschuss zweiwertiger Kationen konnte die enzymatische Aktivität nur durch CaCl₂ völlig wiederhergestellt werden (Abb. 3.9). Dies deutet darauf hin, dass LipC, wie auch LipA, ein für die Katalyse essentielles Ca²⁺-Ion koordiniert (El Khattabi *et al.*, 2000; Liebeton *et al.*, 2000; Nardini *et al.*, 2000). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der *in vitro* Aktivierung der Lipase von *B. glumae*, die auch unter Anwesenheit von EDTA ohne Aktivitätsverlust zurückgefaltet werden konnte (El Khattabi *et al.*, 2003).

Es wurde bereits für verschiedene Proteine beschrieben, dass die Effizienz von Renaturierungen aus „inclusion bodies“ durch Zugabe von Detergenzien gesteigert werden konnte (Tandon & Horowitz, 1988; Sunitha *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2005). Dennoch geschieht der Einsatz von Detergenzien zur Verbesserung der Rückfaltungseffizienz nach dem Prinzip von „Versuch und Irrtum“. Im Fall von chemisch denaturierter Rhodanase wurden verschiedene Detergenzien unterschiedlicher Klassen auf ihr Potential, das Protein zu renaturieren, hin überprüft. Es konnten einige Detergenzien verschiedener Klassen ermittelt werden, die einen positiven Effekt auf die Rückfaltung ausübten, während jedoch Additive derselben Klasse nicht zwangsläufig ähnliche Auswirkungen hatten (Tandon & Horowitz, 1986). Andere Arbeiten belegen, dass die Zugabe von Detergenzien nicht nur der Erhöhung der Löslichkeit von Faltungsintermediaten dient, sondern auch den Faltungsprozess selbst unterstützen können (Stockel *et al.*, 1997). Hierbei variiert die Konzentration, bei der die Additive die Rückfaltung positiv beeinflussen, von Fall zu Fall (Arakawa & Kita, 2000; Mogensen *et al.*, 2005). Selbst bei Rückfaltungen von Isoenzymen, die Aspartat-Aminotransferaseaktivität aufwiesen und in hohem Maße Sequenz- und Strukturhomologien aufwiesen, konnten die Proteine *in vitro* am Besten unter unterschiedlichen Bedingungen renaturiert werden (Donate *et al.*, 1998). Auch LipA und LipC weisen hinsichtlich ihres Verhaltens bei *in vitro* Renaturierung Unterschiede bei Zusatz der verschiedenen Detergenzien auf, obwohl sie eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, von derselben Foldase aktiviert werden, und in allen anderen Rückfaltungsexperimenten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten (Abb. 3.10). Dennoch scheinen in der *in vitro* Aktivierung von LipA und LipC durch LipH Unterschiede zu bestehen, die sich während der Rückfaltung unter Zusatz von Detergenz verdeutlichen. Möglicherweise liegt dies in der Ausprägung unterschiedlicher Mikroumgebungen während der Faltung von LipA und LipC begründet, die durch leichte strukturelle Unterschiede hervorgerufen und durch die Zugabe der verschiedenen Detergenzien in unterschiedlicher Weise positiv oder negativ beeinflusst werden

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die korrekte Renaturierung von Proteinen unter Einsatz von Detergenzien eine empirische Vorgehensweise nach „Versuch und Irrtum“ darstellt. Es existieren mehrere kommerziell erhältliche Renaturierungskits, die verschiedene Detergenzien beinhalten, um experimentell die Bedingungen zu ermitteln, bei denen die höchste Ausbeute an nativ gefaltetem Protein gewonnen werden kann. In Zeiten von automatisierten Hochdurchsatzverfahren ist es möglich, große Bibliotheken verschiedener Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre Verwendbarkeit zu testen, ein Protein von Interesse zurückzufalten. Solche Ansätze sollten nicht nur mit jeweils einem Detergenz, sondern mit einer Mischung verschiedener Substanzen in unterschiedlicher Konzentration durchgeführt werden, um Schlüsse darauf ziehen zu können, wie eine erfolgreiche Rückfaltung von Proteinen durch Detergenzien rational designt werden kann.

4.3 Identifizierung essentieller Reste für die Typ-II abhängige Sekretion durch die Xcp-Maschinerie

Bislang konnte, trotz intensiver Bemühungen, kein gemeinsames Signal auf Primär- oder Tertiärstrukturebene identifiziert werden, welches die Typ-II abhängige Sekretion durch den Xcp-Apparat oder homologe Proteinkomplexe anderer Organismen vermittelt. Die von *P. aeruginosa* gebildeten Exoproteine, wie zum Beispiel das Exotoxin A, die Lipase A und die Elastase B weisen eine hohe Diversität auf. Sie besitzen keine Sequenzähnlichkeit, die ein gemeinsames Sekretionssignal auf Primärstrukturebene vermuten lassen (Voulhoux *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass bereits gefaltete Polypeptide von der Sekretionsmaschinerie erkannt werden, wird vermutet, dass ein gemeinsames Sekretionssignal in der Tertiärstruktur vorhanden ist (Koster *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001).

Die Ergebnisse von bisher durchgeführten Studien am Exotoxin A aus *P. aeruginosa* bezüglich der Sekretion sind sehr unterschiedlich. Eine Exotoxin A Variante, die sich aus den ersten 30 N-terminal lokalisierten Aminosäuren und den C-terminalen 305 Aminosäuren zusammensetzte, konnte bei homologer Expression im Kulturüberstand nachgewiesen werden, während die Expression der C-terminalen Aminosäuren ohne den N-Terminus zu einer Akkumulation des Proteins führten (Hamood *et al.*, 1989). In einer späteren Arbeit wurde vermutet, dass sich das Sekretionssignal in zwei separaten Proteinregionen befindet, die sich in den ersten 30 Aminosäuren und im Carboxyterminus wiederfinden (McVay & Hamood, 1995). Diesen Ergebnissen steht gegenüber, dass eine Proteinvariante, in der die Reste 48 bis 226 deletiert wurden, nicht mehr sekretiert wurde (Voulhoux *et al.*, 2000). Weiterhin konnten durch Deletionen von Sequenzabschnitten innerhalb der Domäne II (AS 252 bis 366) des Exotoxin A aus *P. aeruginosa* Proteinvarianten identifiziert werden, die nicht mehr oder schlechter sekretiert wurden, während jedoch gleichzeitig eine Erhöhung des Stokes-Radius und somit des apparenten Molekülradius der Varianten beobachtet wurde, die auf eine Änderung der Tertiärstruktur des Proteins hindeutete (Voulhoux *et al.*, 2000). In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fusionsproteine, bei denen die N-terminalen Reste 1 bis 3 und 60 bis 120 des Exotoxin A mit β -Lactamase und Interleukin 4 fusioniert wurden, erfolgreich sekretiert werden konnten (Lu & Lory, 1996).

Der Xcp-Apparat wird in *P. aeruginosa* aus mindestens 12 verschiedenen Genprodukten gebildet, welche oligomerisieren und sich von der äußeren bis zur inneren Membran erstrecken (Tommasen *et al.*, 1992; Filloux *et al.*, 1998; Koster *et al.*, 2000). Die Pore für den Durchtritt der Proteine wird aus 12 XcpQ-Untereinheiten gebildet (Bitter *et al.*, 1998; Brok *et al.*, 1999; Bitter, 2003) und vermitteln zusammen mit XcpP die Spezifität des Sekretionsapparates (Lindeberg *et al.*, 1996; Bouley *et al.*, 2001). Es konnten jedoch auch bereits mit XphA und XqhA homologe Proteine identifiziert werden, die ebenfalls die Funktionen von XcpP und XcpQ übernehmen können (Martinez *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 2007). Durch diesen modularen Aufbau scheint eine Möglichkeit gegeben zu sein, die Spezifität der Sekretion an die physiologischen Gegebenheiten anzupassen.

Die Sekretion von LipC wird nicht durch den „klassischen“ Xcp-Apparat vermittelt

Die Lipase LipC wurde im Rahmen einer Arbeit identifiziert, in der durch Konjugation einer Cosmid-Bank in eine *P. aeruginosa xcpQ* Deletionsmutante alternative Faktoren gesucht wurden, die den in diesem Stamm beobachteten Sekretionsdefekt von LipA komplementieren konnten (Martinez *et al.*, 1999). Durch Expression von LipC in *P. aeruginosa ΔxcpQ* war der Stamm wieder in der Lage, auf Lipid-Agar Selektionsmedium zu wachsen. Somit wurde vermutet, dass LipC möglicherweise nicht über den „klassischen“ Xcp-Sekretionsapparat, der von dem Gencluster bestehend aus *xcpP* bis *xcpZ* gebildet wird, sekretiert wird, sondern durch XcpP bzw. XcpQ-homologe Proteine erkannt wird. Diese Hypothese konnte auf zwei verschiedene Weisen bestätigt werden. In einer *P. aeruginosa xcpQ* Deletionsmutante konnte bei Expression des *lipAH* Operons keine lipolytische Aktivität auf Indikatorplatten oder bei Anzucht in Flüssigmedium detektiert werden, während bei Expression im Wildtyp und in dem Stamm *P. aeruginosa* PABS1, in dem das *lipAH* Operon chromosomal deletiert ist, der Großteil der lipolytischen Aktivität extrazellulär detektiert werden konnte (Abb. 3.18). Die Beobachtung, dass im Fall der *lipAH* Expression in *P. aeruginosa ΔxcpQ* keine lipolytische Aktivität, auch nicht intrazellulär, nachgewiesen werden konnte, ist wahrscheinlich auf verstärkte proteolytische Degradation des intrazellulär akkumulierenden Enzyms zurückzuführen. Bei Expression eines konstruierten *lipCH* Operons konnte in allen Fällen, auch in der *xcpQ* Deletionsmutante, eine konstante lipolytische Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Somit konnte die XcpQ-Unabhängigkeit der Sekretion von LipC in diesem Versuch bestätigt werden.

Die bei Expression von *lipCH* gemessene Enzymaktivität betrug zwar nur etwa 17 % der Aktivität bei Expression von *lipAH*, das Verhältnis von intra- und extrazellulärer Enzymaktivität, das in etwa eins zu sechs betrug, war jedoch in allen Fällen vergleichbar (Abb. 3.18 B). Somit konnte die Funktionalität des Xcp-Apparates in diesen Versuchen nachgewiesen werden. Die Kulturen wurden erst 2 h nach Erreichen einer O.D._{580 nm} von 1 geerntet, da die Synthese der Sekretionsmaschinerie zelllichteabhängig über *Quorum sensing* reguliert ist (Chapon-Herve *et al.*, 1997). Bei diesem Kommunikationssystem, bei dem die Bakterien physiologische Prozesse in Abhängigkeit der Populationsdichte regulieren können, wird die zelluläre Antwort konzentrationsabhängig über niedermolekulare Signalmoleküle wie N-Acyl-L-Homoserinlactone vermittelt (Camara *et al.*, 2002). Der Transport dieser Signalmoleküle aus und in *P. aeruginosa*-Zellen erfolgt über eine langsame Diffusion sowie einen aktiven Export über die MexAB-OprM Pumpe (Pearson *et al.*, 1999). Bei Überschreiten einer intrazellulären kritischen Konzentration binden die Signalmoleküle an die entsprechenden Transkriptionsaktivatoren. Die Synthese von XcpP und XcpR wird in *P. aeruginosa* durch das Rhl- und das Las-*Quorum sensing*-System reguliert (Chapon-Herve *et al.*, 1997).

In einem weiteren Experiment, in dem der vollständige Xcp-Apparat in *Pseudomonas putida* funktionell rekonstituiert wurde, konnte auf andere Weise gezeigt werden, dass LipC nicht über die „klassischen“ Xcp-Sekretionsmaschinerie in den Kulturüberstand transportiert wird. Zwar konnte auch in diesem Stamm ein Gencluster identifiziert werden, welches einen Sekretionsapparat für den Typ II-Sekretionsweg codiert, jedoch verhindert die hohe Spezifität der Transportmaschinerie eine Translokation sekretierter Proteine anderer Organismen (Braun

et al., 2000; de Groot *et al.*, 2001), so dass ein Effekt durch den chromosomal codierten Sekretionsapparat ausgeschlossen werden konnte. In den Versuchen konnte bei Koexpression des „normalen“ Xcp-Genclusters und des *lipAH* Operons lipolytische Aktivität, die hauptsächlich im Kulturüberstand detektiert wurde, nachgewiesen werden (Abb. 3.19), wodurch die korrekte Ausbildung der Sekretionsmaschinerie verifiziert werden konnte. Bei Expression des *lipCH* Operons *in trans* konnte sowohl intra- als auch extrazellulär keine lipolytische Aktivität detektiert werden (Abb. 3.19), was darauf hindeutet, dass in diesem Fall LipC, welches nicht sekretiert werden konnte, auch in diesem Experiment durch Proteasen degradiert wurde, wie es auch schon im vorangegangenen Experiment für LipA in *P. aeruginosa aeruginosa* $\Delta xcpQ$ beschrieben wurde.

Wie bereits erwähnt, konnten zu XcpP und XcpQ homologe Proteine identifiziert werden, die die Funktion der Vermittlung der Spezifität übernehmen können und zusammen in einem bicistronischen Operon codiert werden, wodurch die Modulation der Spezifität der vom Xcp-Apparat sekretierten Proteine in Abhängigkeit der physiologischen Erfordernisse ermöglicht wird (Martinez *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 2007). Somit besteht die Möglichkeit, dass die Sekretion von LipC durch diese alternativen Proteine XphA und XqhA vermittelt wird. Eine Koexpression dieser Proteine in *P. putida* zusätzlich zum Xcp-Gencluster und zu *lipCH* könnte den dort beobachteten Sekretionsdefekt der Lipase komplementieren, und zeigen, dass die Anwesenheit der zu XcpP und XcpQ homologen Proteine essentiell für die Translokation von LipC über die äußere Membran ist.

Vergleich der Primär- und Tertiärstruktur von Typ-II abhängig sekretierten Proteinen zur Identifizierung von essentiellen Resten

Die beiden von *P. aeruginosa* gebildeten Lipasen LipA und LipC weisen eine hohe Sequenzhomologie auf Aminosäure-Ebene auf (55 % Identität, 69 % Ähnlichkeit). Trotzdem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Sekretion von LipC nicht über den „klassischen“ Xcp-Apparat vorgenommen wird. Somit liegt in den Unterschieden der beiden Lipasen ein Teil des Sekretionssignals für die Xcp-abhängige Translokation der Exoproteine. Weiterhin scheint dieser Teil des Sekretionssignals die Spezifität von XcpP und XcpQ bzw. ihrer homologen Proteine zu bedingen.

Wenn, wie wiederholt diskutiert, Motive der Tertiärstruktur für die Erkennung der gefalteten Proteine durch den Xcp-Apparat verantwortlich sind, muss das Sekretionssignal auf der Proteinoberfläche liegen (Koster *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001). Die hohe Homologie von LipC und LipA erlaubte es, ein Strukturmodell von LipC durch Homologiemodellierung mit der aufgeklärten Struktur von LipA (Nardini *et al.*, 2000) als Vorlage mit guter Übereinstimmung (Forster, 2002) generieren zu können. Um Unterschiede zwischen den beiden Lipasen möglichst umfassend benennen zu können, wurde sowohl in den Primär- als auch in den Tertiärstrukturen nach Abweichungen gesucht. Anhand des erstellten Alignments der Aminosäuresequenzen (Abb. 3.20) und der Überlagerung der Struktur von LipA mit dem Strukturmodell von LipC (Abb. 3.21) konnten zwei Bereiche identifiziert werden, die sich auf beiden Strukturebenen voneinander unterscheiden und beide auf der Oberfläche der Proteine lokalisiert sind (Q120 bis A126 und T221 bis N228 in LipA). LipA wird, wie auch die

Elastase B und das Exotoxin A, über den „klassischen“ Xcp-Apparat, der von dem Gencluster von *xcpP* bis *xcpZ* gebildet wird, sekretiert. Die Strukturen dieser Exoproteine sind ebenfalls aufgeklärt (McKay *et al.*, 1992; Wedekind *et al.*, 2001). Protein-Protein Interaktionen werden durch Komplementarität der wechselwirkenden Proteinoberflächen und elektrostatische Eigenschaften vermittelt (Comeau *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurde versucht, zu den in LipA identifizierten Oberflächenabschnitten ähnliche Bereiche in diesen Strukturen hinsichtlich der Oberflächentopologie, sowie der Ladungs- und Resteverteilung zu ermitteln. Es konnten in den Strukturen der Elastase B und des Exotoxin A ähnliche Strukturelemente zu dem Bereich, der in der LipA 3D-Struktur deutlich stärker exponiert wird als im Fall von LipC (T221 bis N228 bzw. L228 bis N233), identifiziert werden. Diese Abschnitte der Proteinoberflächen wiesen nicht nur exponierte Aminosäuren mit gleichen Ladungseigenschaften auf, sondern waren auch hinsichtlich der Oberflächentopologie durch die umgebenden lösungsmittel-exponierten Aminosäuren ähnlich (Abb. 3.22 A). Die Reste K223 und N224 in der Struktur des LipA entsprechen den Resten K83 und E76 des Exotoxin A und K191 und S194 der Elastase B, wobei im letzten Fall die Ladung durch das zur Oberfläche des Proteins gekehrte Rückgrat hervorgerufen wird. Während sich die Topologie der Oberfläche von LipC derjenigen von LipA zwar in den umgebenden Bereichen ähnelt, wies sie signifikante Unterschiede in dem Bereich auf, der durch die Aminosäuren K223 und N224 in der LipA Struktur gebildet wird (Abb. 3.22 A). Als weiteres Kriterium wurden die elektrostatischen Feldeigenschaften der Proteine in diesem Strukturbereich verglichen. Während im Fall von LipC in diesem Oberflächenbereich eine negatives elektrostatisches Potential vorhanden ist, ist der Bereich, der die Aminosäuren K223 und N224 des LipA, K191 und S194 der Elastase B und K83 und E76 des Exotoxin A umgibt, positiv geladen, und stellt somit einen weiteren signifikanten Unterschied der verglichenen Strukturen zu derjenigen von LipC dar. Der ermittelte Sequenzabschnitt des Exotoxin A befindet sich interessanterweise genau in dem Bereich, der die N-terminalen Reste 60 bis 120 umfasst, und für den die Sekretion von Fusionsproteinen des Exotoxin A Fragments mit β -Lactamase und Interleukin 4 beschrieben wurde (Lu & Lory, 1996).

Die Reste K223 und N224 beeinflussen die Typ-II abhängige Sekretion

Um die Beteiligung der Aminosäuren K223 und N224 des LipA an der Typ-II Sekretion zu untersuchen, wurden sie jeweils durch ein Alanin und einen Rest mit gegensätzlicher Ladung substituiert. Darüberhinaus wurde eine Variante, in der beide Aminosäuren durch ein Alanin ersetzt wurden, erstellt. Die Experimente wurden mit Plasmiden durchgeführt, bei denen die Gene unter Kontrolle des *lac*-Promotors standen, der in *P. aeruginosa* konstitutiv exprimiert wird. Im Gegensatz zu einem T7-Expressionssystem konnte das Risiko einer möglichen, durch eine zu starke Expression hervorgerufenen, intrazellulären Akkumulation der Lipasevarianten vermindert werden. Die Zellen wurden, wie auch schon für vorige Experimenten erläutert, erst nach Erreichen der stationären Phase geerntet, um die korrekte Formation eines funktionellen Xcp-Apparats, dessen Bildung *Quorum sensing*-abhängig reguliert ist, sicherzustellen.

Bei den Varianten der Lipase, die die Mutationen K223E und N224D trugen, konnte eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte lipolytische Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen

werden. Dieser Effekt war im Fall der Substitution N224D deutlicher. Während dort bei etwa gleichbleibender intrazellulärer Aktivität die Enzymaktivität im Kulturüberstand um etwa 35 % in Relation zur Aktivität bei Expression des Wildtyp Operons zunahm, wurde bei LipA K223E eine Erhöhung von etwa 12 % beobachtet (Abb. 3.23 A). Genau gegensätzlich verhielt es sich bei den LipA Varianten, bei denen K223 und N224 durch ein Alanin ersetzt wurde. Bei diesen Varianten konnte eine signifikant geringere Sekretion nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall war der Effekt bei Mutation des Restes N224 deutlicher. Während sich bei LipA K223A die intrazelluläre lipolytische Aktivität um 17 % erhöhte, nahm die extrazelluläre Aktivität auf 60 % des Wildtyp LipA Niveaus ab. Im Fall der Substitution N224A konnte eine um 33 % erhöhte Enzymaktivität im Zellinneren gemessen werden, während sich die Aktivität im Kulturüberstand auf 48 % verringerte. Die LipA Variante, bei der beide Reste durch ein Alanin ausgetauscht wurden, zeigte einen kumulativen Effekt beider einzeln eingefügten Mutationen. Hier nahm die Aktivität des Gesamtzellextrakts um etwa 28 % zu, während nur noch 33 % der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand, die bei Expression von Wildtyp LipA bestimmt wurde, detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse konnten sowohl in einem Aktivitätstest mit Tributyrinplatten (Abb. 3.23 B) als auch auf Proteinebene durch einen Western Blot (Abb. 3.23 C) bestätigt werden. Der immunologische Nachweis der LipA Varianten in den Kulturüberständen spiegelte die Ab- bzw. Zunahme der extrazellulär gemessenen lipolytischen Aktivität wider.

In bereits durchgeführten Studien bezüglich der Sekretion des Exotoxins A aus *P. aeruginosa* wurden ganze Strukturelemente deletiert (Voulhoux *et al.*, 2000). Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob die Varianten aufgrund des Fehlens der Strukturelemente oder durch eine durch die Deletion hervorgerufene, stark veränderte Tertiärstruktur nicht mehr sekretiert wurden. Dagegen ist es eher unwahrscheinlich, dass durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Punktmutationen, bei denen einzelne lösungsmittel exponierte Aminosäuren substituiert wurden, die Konformation des Gesamtproteins stark verändert wurde. Weiterhin wurde die Integrität der Proteinvarianten durch Bestimmung der K_m -Werte überprüft, in dem keine signifikanten Unterschiede zur Wildtyp Lipase festgestellt wurden. Somit scheint die Tertiärstruktur durch die Punktmutationen nicht in einer Weise beeinträchtigt zu sein, die die beobachteten Veränderungen der Sekretionseffizienz bedingen könnte.

Die eingefügten Mutationen resultierten zwar in deutlich verändertem Sekretionsverhalten, doch keine der untersuchten Proteinvarianten konnte ausschließlich intrazellulär nachgewiesen werden, so dass alle konstruierten LipA Varianten in unterschiedlicher Effizienz in das Medium sekretiert wurden. Dies ist potentiell darauf zurückzuführen, dass zwar ein essentieller Teil des Sekretionssignals in diesem Oberflächenbereich durch die eingefügten Mutationen identifiziert und verändert wurde, das Signal jedoch nicht einzig durch diesen Proteinabschnitt gestellt wird. Die Sekretion der Cellulase Cel5 aus *Erwinia chrysanthemi* wird wahrscheinlich nicht durch eine einzige Region, sondern durch einen Bereich, der sich über die gesamte Oberfläche des Proteins erstreckt, vermittelt (Py *et al.*, 1993). Für ein weiteres Exoprotein, PelC, dieses Organismus wird diskutiert, dass das Sekretionssignal zwar C-terminal lokalisiert ist, seine korrekte Positionierung aber über zwei Domänen, die im Proteininneren vorhanden sind, vorgenommen wird (Lindeberg *et al.*, 1998). Im Strukturmodell des LipAH Komplexes aus *P. aeruginosa* kommt der im LipA

ermittelte Proteinbereich in räumlicher Nähe zu dem N-Terminus von LipH, der noch sichtbar ist, zu liegen (Abb. 4.1).

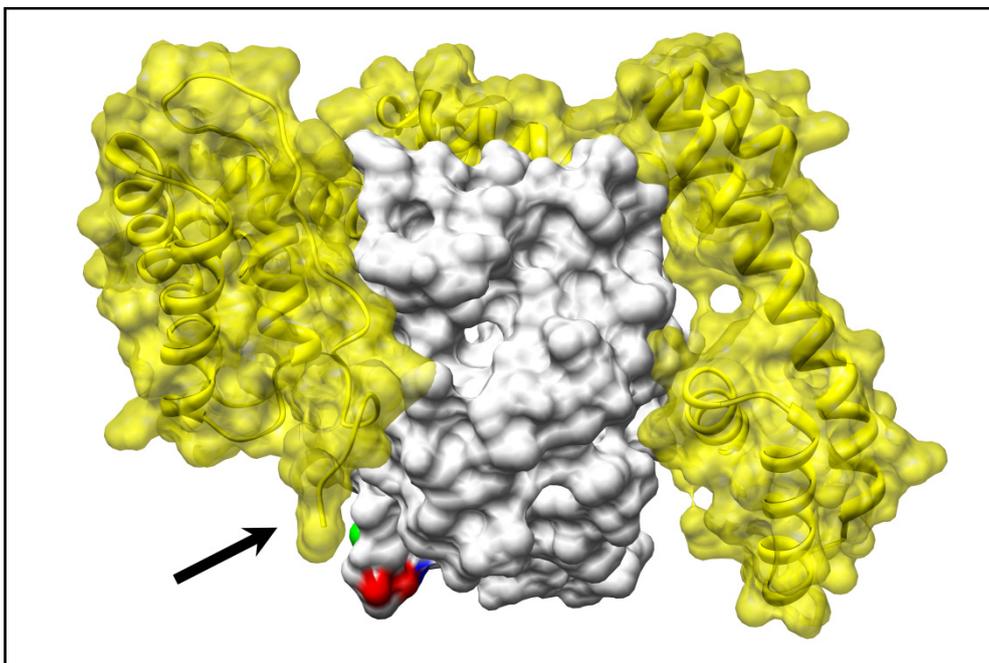


Abb. 4.1: 3D-Strukturmodell des LipAH Komplexes aus *P. aeruginosa*. Die Foldase ist gelb in der *ribbon* Darstellung mit transparenter Oberfläche gezeigt. Die Lage des N-Terminus von LipH, der noch sichtbar ist, ist mit einem Pfeil markiert. Die Oberfläche der Lipase ist weiß dargestellt. Die Reste K223, N224 sind analog zur Abbildung 3.22 gefärbt. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Der N-terminale Beginn der Lipase-spezifischen Foldase ist in diesem Strukturmodell nicht vollständig sichtbar, da für die Kristallisation des Lipase-Lif Komplexes aus *B. glumae* ebenfalls eine Foldase gereinigt wurde, deren Membrananker entfernt wurde, und die Struktur des restlichen Anteils aufgrund von hoher Flexibilität nicht aufgelöst werden konnte (Pauwels *et al.*, 2006). Somit fehlen in diesem Modell die ersten 60 Aminosäuren. Wie gezeigt werden konnte, ist das Vorhandensein des N-Terminus von LipH bei homologer Expression Voraussetzung für die Sekretion aktiver Lipase (Sadtler, 2007). Somit könnte das Sekretionssignal, wie wiederholt diskutiert, gemeinsam aus Strukturelementen von LipA und LipH gestellt werden (Sandkvist, 2001; Rosenau *et al.*, 2004). Eventuell sind in dem N-terminalen Bereich, der in dem Modell nicht dargestellt ist, weitere Strukturelemente vorhanden, die in der Nähe der mutagenisierten Reste K223 und N224 zu liegen kommen, und essentielle Motive für die Sekretion bereitstellen, aber in diesem Ansatz nicht identifiziert werden konnten.

Um zu zeigen, dass die in der Elastase und dem Exotoxin A identifizierten Proteinbereiche, die ähnliche Eigenschaften wie K223 und N224 in LipA aufweisen (Abb. 3.22), essentiell für die Sekretion sind, werden sie momentan im Rahmen einer weiteren Studie in gleicher Weise mutagenisiert und die Sekretionsfähigkeit der Varianten charakterisiert. Eine weitere interessante Vorgehensweise wäre, den entsprechenden Proteinbereich von LipC in einer Weise zu verändern, so dass er demjenigen von LipA ähnelt, um zu überprüfen, ob die Lipase dann ebenfalls über den „klassischen“ Xcp-Apparat sekretiert werden kann.

4.4 Der Einfluss von Punktmutationen in der enantioselektiven Lipasevariante 1H8 auf ihre Sekretion

Die Veränderung von Proteinen durch gerichtete Evolution hat sich zu einer effizienten Methode entwickelt, biotechnologisch relevante Eigenschaften von Enzymen wie Stabilität, Substratspezifität und Enantioselektivität zu optimieren (Reetz *et al.*, 2006a; Reetz *et al.*, 2006b; Schmidt *et al.*, 2006; Carballeira *et al.*, 2007; Reetz & Carballeira, 2007). Dennoch lautet der Leitsatz bei Entwicklung eines Experiments, um Biokatalysatoren durch gerichtete Evolution zu optimieren „*You get what you screen for*“ (Kuchner & Arnold, 1997). Dies deutet an, dass die Optimierung eines Enzyms hinsichtlich einer gewünschten Eigenschaft gleichzeitig andere Charakteristika des Proteins auch negativ beeinflussen kann.

Die gerichtete Evolution der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* hinsichtlich ihrer Enantioselektivität gegenüber dem Modellsubstrat 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol zählt zu den bekanntesten Beispielen einer erfolgreichen Optimierung der Enantioselektivität eines Biokatalysators. Die Kombination zahlreicher verschiedener Ansätze resultierte in der Isolation einer Variante, die LipA 1H8 genannt wurde. Dieses Enzym weist eine Enantiopräferenz für das (S)-Enantiomer des Substrats mit einem E-Wert von 51 auf, während der Wildtyp nahezu keine Enantiopräferenz gegenüber diesem Substrat zeigt (Reetz *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 2002). Die optimierte Lipase trägt 6 Aminosäuresubstitutionen (D20N, S53P, S155M, L162G, T180I und T234S), wobei die Enantioselektivität durch Bildung einer neuen Bindetasche für das (S)-Enantiomer durch die Mutationen S53P, S155M und L162G vermutet wurde (Bocola *et al.*, 2004). Aufgrund der Analyse der Enantioselektivität entsprechender Einzelvarianten konnte diese Hypothese bestätigt werden, während gleichzeitig gezeigt werden konnte, dass die anderen Mutationen keinen Einfluss auf die Enantioselektivität nahmen (Reetz *et al.*, 2007).

Bei homologer Expression des Wildtyp *lipAH*-Operons unter Kontrolle des T7-Promotors können mit einem geeigneten Produktionsstamm mehrere 100 mg / L aktive Lipase aus dem Kulturüberstand gewonnen werden (Jaeger *et al.*, 1997). Bei Überexpression der Lipase 1H8 in diesem System und anschließender Bestimmung der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand mit *p*NPP als Substrat konnten lediglich 0,1 % der Aktivität, die bei Expression des Wildtyp-Operons gemessen wurden, detektiert werden (Abb. 3.25). Da für LipA 1H8 und die Einzelvarianten bereits beschrieben wurde, dass sie im Kulturüberstand stabil sind (Reetz *et al.*, 2007), konnte ein Aktivitätsverlust aufgrund erhöhter Instabilität und Degradation der Biokatalysatoren ausgeschlossen werden. Für die Produktion aktiver, extrazellulärer Lipase in *P. aeruginosa* ist das koordinierte Zusammenwirken verschiedener akzessorischer Komponenten essentiell, wobei die periplasmatische Faltung und nachfolgende Translokation über die äußere Membran als komplexester Vorgang angesehen wird (Rosenau & Jaeger, 2000; Filloux, 2004; Rosenau *et al.*, 2004). Die Interaktion von LipA 1H8 mit der Lipase-spezifischen Foldase wurde anscheinend nicht beeinträchtigt, da vergleichbare Mengen Wildtyp LipA und LipA 1H8 vom Chaperon gebunden und *in vitro* aktiviert werden konnten (3.5.4). Aufgrund dessen wurde die Sekretion der Lipasevariante näher untersucht. Bei einem Vergleich der intra- und extrazellulären Anteile der Lipaseaktivität konnte gezeigt werden, dass nur etwa 10 % der Gesamtaktivität bei Expression von LipA 1H8 im Kulturüberstand zu finden waren, während etwa 45 % des Wildtyp Proteins

sekretiert wurden (Abb. 3.23). Die Beeinträchtigung der Sekretion konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Während bei homologer Überexpression des Wildtyp *lipAH* Operons die Lipase im Kulturüberstand sowohl durch SDS-PAGE als auch immunologisch nachgewiesen werden konnte, konnte LipA 1H8 ausschließlich im Gesamtzellextrakt detektiert werden (Abb. 3.27).

Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Resten Cys¹⁸³ und Cys²³⁵ ist eine Notwendigkeit für die Produktion aktiver, extrazellulärer Lipase (Nardini *et al.*, 2000; Liebeton *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2001). Bei Expression von Lipasevarianten, bei denen die Cysteine einzeln oder beide durch Serin substituiert wurde, konnte eine signifikant geringere Menge sekretierter Lipase nachgewiesen werden (Liebeton *et al.*, 2001). Die Aminosäuresubstitutionen T180I und T234S in LipA 1H8 befinden sich beide in der Nähe dieser beiden Cysteinreste (Abb. 3.30) so dass ein Einfluss dieser Austausch auf die Fähigkeit, eine Disulfidbrücke auszubilden, vermutet wurde. Es konnte jedoch in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass LipA 1H8 die Fähigkeit besitzt, eine intramolekulare Disulfidbrücke auszubilden (Abb. 3.28). Somit schien die Beeinträchtigung der Sekretion nicht durch das Fehlen der Disulfidbrücke, sondern in einer gestörten Translokation der Lipase über die äußere Membran durch den Xcp-Apparat begründet zu sein.

Um die Sekretion der Lipase 1H8 und der entsprechenden Einzelmutanten untersuchen zu können, wurden die jeweiligen *lipAH* Operons unter Kontrolle des *lac*-Promotors kloniert, um eine moderatere Expression als unter P_{T7} zu erreichen, und einen Einfluss des Xcp-Apparats auf die Sekretion durch Sättigung mit zu transportierendem Protein auszuschließen. Darüberhinaus wurden die Zellen, wie schon unter 4.3 erläutert, erst in der stationären Phase geerntet, um die korrekte Formation des *Quorum-sensing* abhängig regulierten Proteinkomplexes zu gewährleisten. Bei starker Expression unter Kontrolle des T7-Promotors konnte etwa die Hälfte des Wildtyp Enzyms intrazellulär nachgewiesen werden, während sich bei Expression unter Kontrolle des *lac*-Promotors lediglich 17 % der lipolytischen Aktivität im Gesamtzellextrakt befanden (Abb. 3.27 und Abb. 3.29). Weiterhin nahm die bestimmte Gesamtaktivität bei Expression unter P_{lac} um den Faktor 100 ab (Abb. 3.27 und Abb. 3.29). Aufgrund dessen wurde eine Sättigung der Sekretionsmaschinerie ausgeschlossen, die in einer unbeabsichtigten intrazellulären Akkumulation der zu untersuchenden Lipasevarianten geführt hätte. Interessanterweise konnte eine um 550 % höhere Ausbeute von LipA 1H8 im Kulturüberstand bei Expression unter dem *lac*-Promotor nachgewiesen werden, die darauf hindeutet, dass die Überexpression der Lipase 1H8 unter dem starken T7-Promotor zu einer Störung der Xcp-Maschinerie führt.

Wie auch unter Kontrolle von P_{T7} konnte auch bei Expression unter P_{lac} eine Beeinträchtigung der Sekretion von LipA 1H8 sowohl auf Aktivitäts- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 3.29 und Tab. 3.2). Auch die Lipase Varianten mit den Substitutionen D20N und T180I zeigten in allen Experimenten eine verringerte Sekretionsfähigkeit. Durch die Mutation D20N konnte eine um 50 % geringere Menge aktiver Lipase im Kulturüberstand detektiert werden, während die Sekretion von LipA T180I um etwa 20 % abnahm (Abb. 3.29 und Tab. 3.2). Die Doppel- und Dreifachmutanten S53P / L162G und S53P / S155M / L162G zeigen eine hohe Enantioselektivität bei Hydrolyse von 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol, wobei alle eingefügten Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert sind (Reetz *et al.*, 2007). Trotz der geringen Aktivität, die im Kulturüberstand bei Expression dieser

Varianten mit dem Substrat *p*NPP gemessen werden konnte, bildeten die entsprechenden Kolonien auf Tributyrinplatten Höfe, deren Durchmesser mit denen bei Expression der Wildtyp Lipase vergleichbar waren (Abb. 3.29). Somit schien die geringe gemessene Aktivität im Kulturüberstand bei Anzucht im Flüssigmedium eher auf eine verminderte Affinität gegenüber *p*NPP als auf einen Sekretionsdefekt zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird durch die densitometrische Analyse der immunologisch detektierten Lipase bestätigt. Während die Signalintensität von LipA D20N, LipA T180I und LipA 1H8 deutlich abnahmen, waren die Intensitäten aller anderen untersuchten Varianten mit derjenigen von Wildtyp LipA vergleichbar (Tab. 3.2).

Vergleicht man die Lage der Reste, die die Sekretion von LipA 1H8 vermindern, mit derjenigen der Aminosäuren, die unter 3.3 als Teil des Sekretionssignals identifiziert wurden, so fällt auf, dass der Rest T180 in räumlicher Nähe zu K223 und N224 lokalisiert ist und in ähnlichem Maß lösungsmittlexponiert vorliegt (Abb. 4.2). Somit ist die Möglichkeit gegeben, dass die Erkennung der Lipase durch den Xcp-Apparat über einen größeren Bereich, der außer den Resten K223 und N224 ebenfalls die Aminosäure T180 beinhaltet, vermittelt wird. Der Rest D20 liegt hingegen auf der gegenüberliegenden Seite des Enzyms. Möglicherweise ist die Auswirkung der Mutation dieses Restes auf die Sekretion durch *remote* Effekte zu erklären, die die Konformation des Proteins verändern. Weiterhin wurde bereits für die Cellulase Cel5 aus *Erwinia chrysanthemi* vermutet, dass das Sekretionssignal nicht nur in einem Bereich vorliegt, sondern sich über die gesamte Proteinoberfläche erstreckt (Py *et al.*, 1993). Auch für das Exotoxin A aus *P. aeruginosa* wird die Lokalisation des Sekretionssignals in zwei separaten Proteinregionen, den ersten 30 Aminosäuren und denen des C-Terminus, diskutiert (McVay & Hamood, 1995), so dass die entfernte Lage des Restes D20 zu den anderen identifizierten Aminosäuren, die essentiell für die Sekretion sind, keinen Widerspruch darstellt.

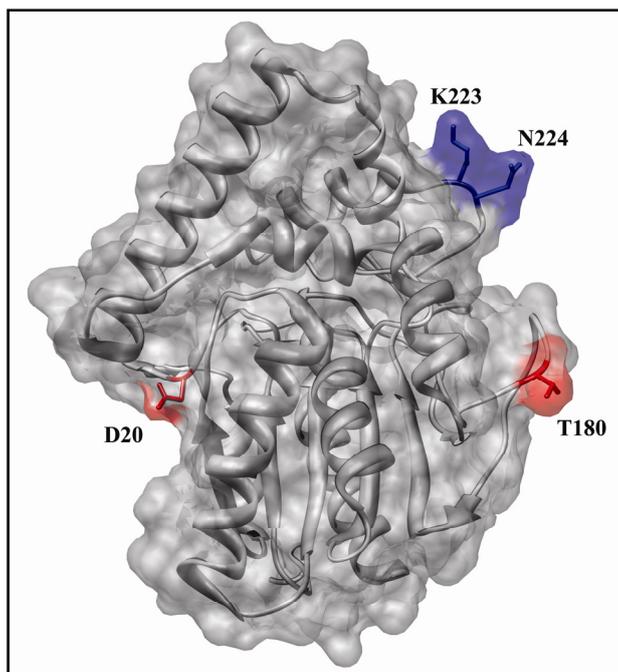


Abb. 4.2: Lage der Mutationen, die die Sekretion nachteilig beeinflussen, in der 3D-Struktur von LipA (nach Nardini *et al.*, 2000). Das Protein ist in der *ribbon* Darstellung mit transparenten Oberflächen gezeigt. Die Reste, die in LipA 1H8 die Sekretion vermindern, sind rot hervorgehoben. Die Reste, die unter 3.3 mutagenisiert wurden, sind blau dargestellt. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Der Bedarf an Enzymen, die in industriellem Maßstab für die Synthese enantiomerenreiner Stoffe eingesetzt werden können, steigt ständig. Jedoch müssen die Biokatalysatoren gewöhnlich für den Einsatz in der Industrie hinsichtlich ihrer Eigenschaften optimiert werden, wie zum Beispiel durch Methoden der *in vitro* Evolution. Die hier gezeigten Ergebnisse stellen ein Beispiel dafür dar, dass das Einfügen von Mutationen in Enzyme die Gefahr birgt, sog. *bottlenecks* für einen angemessenen Produktionsmaßstab zu schaffen, und somit das industrielle Potential eines Katalysators stark einzuschränken. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass einige der Aminosäuresubstitutionen, die in LipA eingefügt wurden, um ihre Enantioselektivität zu verbessern, die Sekretion des Biokatalysators in signifikantem Ausmaß verminderten. Demzufolge sollte bei Einsatz von gerichteter Evolution für die Optimierung eines Enzyms für biotechnologische Applikationen nicht nur auf die gewünschte Eigenschaft, sondern auch auf die Sekretion bzw. andere für die effiziente Produktion essentielle Charakteristika selektioniert werden.

4.5 Die Interaktion der Lipasen mit ihrem Chaperon und ihre biotechnologische Nutzung als „Ein-Schritt“ Affinitätsreinigung

Wie das Beispiel der Lipase 1H8 aus *P. aeruginosa* demonstriert, können optimierte Biokatalysatoren nicht grundsätzlich mit guten Ausbeuten im homologen Wirt produziert werden, selbst wenn die Expression des Wildtyp Enzyms mit hoher Effizienz durchgeführt werden kann (3.4). Die Produktion aktiver extrazellulärer Lipase ist in *P. aeruginosa* von dem Vorhandensein und korrektem Zusammenspiel von etwa 30 akzessorischen Proteinen abhängig (Rosenau & Jaeger, 2000; Rosenau & Jaeger, 2004). Durch die Vielzahl an spezifischen Protein-Protein Interaktionen während dieses Vorgangs wird das Risiko erhöht, dass die Optimierung von Lipasen durch gerichtete Evolutionsmethoden in verminderten Ausbeuten resultiert, so dass die verbesserten Biokatalysatoren nicht in zufriedenstellender Ausbeute für die Nutzung in industriellem Maßstab gewonnen werden können, wenn sie im homologen Wirt produziert werden sollen. Weiterhin wurde beschrieben, dass LipA 1H8 und die entsprechenden Varianten mit Einzelaustauschen zwar im Kulturüberstand stabil sind, nicht jedoch nach Reinigung diesem (Reetz *et al.*, 2007).

Die heterologe Expression in *E. coli* führt aufgrund des Fehlens einer geeigneten Sekretionsmaschinerie zur intrazellulären Akkumulation des Zielproteins in katalytisch inaktiven „inclusion bodies“ oder zu einer verstärkten Degradation. Zwar können „inclusion bodies“ relativ einfach durch Zentrifugation von kontaminierendem Protein gereinigt werden, doch ist bei dieser Strategie eine nachträgliche *in vitro* Renaturierung essentiell. In Folge dessen ist die Reinigung eines weiteren Proteins, der entsprechenden Lipase-spezifischen Foldase, zur Erlangung des aktiven Enzyms notwendig. Darüberhinaus werden bei *in vitro* Aktivierung heterogene Gemische aus aktiver und inaktiver Lipase, die sich aufgrund von falsch eingenommenen Konformationszuständen nicht mehr in die katalytisch aktive Form überführen lassen, erzeugt, wobei der Anteil an korrekt zurückgefaltetem Protein etwa 18 % beträgt (Hausmann, 2004).

Lipase-spezifische Foldasen lassen sich mit hoher Ausbeute als Poly-Histidin Fusionsprotein heterolog exprimieren und reinigen. Sie erkennen und binden ihre Lipase mit hoher Spezifität und Affinität. Nach erfolgter *in vitro* Renaturierung wurde für das Lipase-Lip System von *B. glumae* die Bildung eines Proteinkomplexes aus beiden Proteinen beschrieben, der so stabil war, dass seine Struktur röntgenkristallographisch aufgeklärt werden konnte (Pauwels *et al.*, 2006). Somit wurde versucht, das Chaperon LipH für eine Affinitätsreinigung aktiver Lipase nach heterologer Expression in einer biotechnologisch anwendbaren Weise zu nutzen.

Die Lipasen gehen mit ihrem Chaperon einen stabilen und katalytisch aktiven Proteinkomplex ein

Die Ausbildung eines stabilen Proteinkomplexes aus Lipase und Lipase-spezifischer Foldase konnte für LipA und LipH aus *P. aeruginosa* per Gelfiltrationschromatographie nachgewiesen werden. Bei der Probe, die *in vitro* zurückgefaltete Lipase enthielt, konnte eine Verschiebung der Retentionszeit zu einem höheren Molekulargewicht beobachtet werden, welches etwa der Summe der Molekulargewichte der Lipase und des Chaperons entspricht. (Abb. 3.31). In allen

untersuchten Proben konnte ein weiterer Peak beobachtet werden, der jenseits der Ausschlussgröße der Säule detektiert wurde, und wahrscheinlich auf partielle Präzipitation der Proteine bei dem verwendeten Puffer (100 mM MES pH 6,5; 150 mM NaCl) zurückzuführen war. Der kalkulierte isoelektrische Punkt (pI) von LipH beträgt 5,49 und derjenige von LipA wurde mit 6,37 bestimmt (Schneidinger, 1997). Bei einem pH, der in der Nähe des pI liegt, ist die Nettoladung und somit auch die Löslichkeit eines Proteins gering, wodurch die Präzipitation begünstigt wird.

Die katalytische Aktivität der Lipase im Komplex konnte durch einen anschließenden pNPP Test bestätigt werden, bei dem ausschließlich die Fraktion, die nach *in vitro* Rückfaltung von der Säule eluierte, lipolytische Aktivität zeigte. Für den Lipase-Lif Komplex aus *B. glumae* wurde beschrieben, dass er sogar in kristalliner Form katalytische Aktivität aufweist, ohne die Diffraktion zu beeinträchtigen. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Helix, die den sog. Deckel ausbildet und das katalytisch aktive Zentrum erst bei Kontakt mit Substrat freigibt, auch in dem Proteinkomplex genug Raum zur Bewegung besitzt (Pauwels *et al.*, 2006).

Die Nutzung der Interaktion zwischen Lipase und Foldase als Ein-Schritt Affinitätsreinigung

Es konnte gezeigt werden, dass das Chaperon LipH mit der Lipase LipA einen stabilen, aktiven Komplex eingeht, wie es auch schon für *B. glumae* beschrieben wurde (Pauwels *et al.*, 2006). Die hohe Affinität und Stabilität dieses Komplexes spiegelt sich in der niedrigen Dissoziationskonstanten von $K_d = 5$ nM und der großen Interaktionsfläche beider Proteine von insgesamt 5378 \AA^2 wider (Pauwels *et al.*, 2007), die etwa 3,3-mal so groß ist wie die durchschnittliche Fläche bei Interaktion von zwei Proteinen mit 1600 \AA^2 (Wodak & Janin, 2002).

Unter Ausnutzung dieser hohen Affinität und Spezifität, mit der Lif-Proteine ihre Lipase binden, konnte eine robuste Strategie entwickelt werden, um inaktive Lipase nach heterologer Expression nicht nur in einem Schritt zu reinigen, sondern gleichzeitig auch zu renaturieren. Die als Poly-Histidin Fusionsprotein exprimierte Lipase-spezifische Foldase konnte an das Ni-NTA Material gebunden werden, um anschließend selektiv mit inaktiver Lipase aus einem Gesamtzellextrakt einen immobilisierten und katalytisch aktiven Proteinkomplex auszubilden (Abb. 3.33).

Die Lipase A aus *P. aeruginosa* konnte in aktiver Form mit guter Ausbeute und Reinheit durch die Verwendung von LipH als Affinitätsmaterial gereinigt werden. Diese robuste und einfache Strategie gibt die Möglichkeit einer effizienten Ein-Schritt Reinigung, die mit der gleichzeitigen Aktivierung der Lipase nach heterologer Expression gekoppelt ist. Andere Vorgehensweisen für die Reinigung von Lipasen umfassen mehrere Schritte wie Präzipitation durch Ammoniumsulfat und anschließende Ionen-Austausch Chromatographie (Saeed *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu diesen klassischen Reinigungsverfahren wie Größenausschluss- oder Ionen-Austausch Chromatographie, bei denen es nötig ist, die Reinigung für jedes Protein auf die biochemischen Eigenschaften anzupassen und zu optimieren, können bei Affinitätsreinigung von Lipasen durch die Lipase-spezifischen Foldasen, die nur auf der Spezifität der Protein-Protein Interaktion beruht, andere biochemische Parameter außer Acht gelassen werden.

Weiterhin ist es durch diese Rückfaltungsstrategie möglich, eine homogenere Präparation *in vitro* aktivierter Lipase zu erreichen als bei der herkömmlichen Weise, bei der einfach beide Proteine in Lösung vermischt werden. Fehlgefaltete Lipase, die nicht mehr von ihrem Chaperon erkannt und aktiviert werden kann, wird nicht an dem Chromatographiematerial immobilisiert und dementsprechend aus der Präparation ausgeschlossen.

Neben dem offensichtlichen Vorteil immobilisierter Biokatalysatoren, die nach erfolgter Reaktion aus dem Ansatz entfernt werden können, wurden zahlreiche weitere Beispiele beschrieben, in denen immobilisierte Enzyme verbesserte Eigenschaften aufwiesen. Die Lipasen aus *Candida rugosa* wiesen nach Immobilisierung an Nano-Röhren aus Kohlenstoff eine erhöhte Stabilität und Aktivität in organischen Lösungsmitteln auf (Shah *et al.*, 2007). Eine andere immobilisierte Lipase konnte nach erfolgter Biotransformation sieben Mal ohne Aktivitäts- oder Enantioselektivitätsverlust in einer weiteren Reaktion wiederverwendet werden (Zhang *et al.*, 2008), wie es in ähnlicher Weise für den LipAH Komplex aus *P. aeruginosa* in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abb. 3.34). Weiterhin konnte die Thermostabilität der unter dem Namen Glucavamorin kommerziell erhältlichen Glucoamylase durch Immobilisierung 1000fach gesteigert werden (Kovalenko *et al.*, 2007), während eine Haloalkan-Dehalogenase nach Immobilisierung eine erhöhte Resistenz sowohl gegenüber organischem Lösungsmittel als auch thermischer Inaktivierung zeigte (Dravis *et al.*, 2001). Hierbei scheint die Immobilisierung dieser Enzyme eine erhöhte Stabilität von Proteinbereichen zu vermitteln, welche in Lösung anfällig gegenüber Inaktivierung durch äußere Einflüssen sind. Die Vorteile immobilisierter Biokatalysatoren sind so signifikant, dass zahlreiche Enzyme in immobilisierter Form kommerzialisiert wurden. Ein bekanntes Beispiel stellt die Produktfamilie der Lipozyme und Novozyme der Firma Novozymes dar, die verschiedene immobilisierte Esterasen, Lipasen und Proteasen umfasst.

Der LipAH Komplex zeigt vergleichbare Eigenschaften wie homolog exprimierte Lipase

Es konnte gezeigt werden, dass das katalytisch aktive Zentrum der Lipase funktionell ist, wenn das Enzym mit dem Chaperon gebunden vorliegt. Jedoch konnte nicht mit Bestimmtheit davon ausgegangen werden, dass das Enzym vergleichbare biochemische Eigenschaften wie freie Lipase aufweist, wenn es seine Bindung mit LipH eingegangen war. Die Interaktionsfläche beider Proteine umfasst große Bereiche, so dass geringe Konformationsänderungen, die potentiell Einfluss auf die katalytischen oder biochemischen Eigenschaften nehmen, nicht ausgeschlossen werden konnten. Bei Vergleich von relevanten Charakteristika stellte sich aber heraus, dass kein signifikanter Unterschied zwischen freier, homolog exprimierter Lipase aus dem Kulturüberstand, und im Komplex gefunden werden konnte, der eine nachteilige Auswirkung auf die untersuchten Eigenschaften des Enzyms ausübte.

LipA wies, ungeachtet seiner Bindung zu seinem Chaperon, die gleiche Spezifität gegen *p*NP-Ester mit unterschiedlicher Kettenlänge auf. In beiden Fällen konnte eine starke Präferenz für die Ester mit Seitenketten von Längen von C₁₂ bis C₁₆ nachgewiesen werden (Abb. 3.35 A). Somit konnte eine potentielle Veränderung der Kettenlängenspezifität aufgrund sterischer Behinderung ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde die Affinität des Enzyms gegen das

Substrat *p*NPP bestimmt, welches im vorangegangenen Versuch am Besten hydrolysiert wurde (Abb. 3.35 B). Die Berechnung der Michaelis-Konstanten von freier und an das Chaperon gebundener Lipase durch nichtlineare Regression zeigte, dass die Affinität gegen dieses Substrat fast identisch war ($K_m = 1,06$ mM für den LipAH-Proteinkomplex bzw. 1,10 mM für freies LipA).

Diese Untersuchungen bezüglich der Kettenlängenspezifität und Affinität bieten einen generellen Eindruck über die Vergleichbarkeit der katalytischen Eigenschaften von freier und an LipH gebundener Lipase. Um genauer zu untersuchen, ob die Konformation, die das Enzym bei Bindung an sein Chaperon besitzt, derjenigen von Lipase aus dem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* entspricht, wurde die Enantioselektivität der LipA Variante 1H8 nach homologer sowie nach heterologer Expression und *in vitro* Renaturierung verglichen. Die Enantioselektivität des mutagenisierten Proteins gegen 2-Methyldecansäure-*p*-Nitrophenol (2-MDA-*p*NP) beruht auf geringfügigen Änderungen der Konformation in der Nähe des aktiven Zentrums, die durch drei der insgesamt sechs vorhandenen Aminosäuresubstitutionen bedingt ist (Bocola *et al.*, 2004). Während dieses Protein bei homologer Expression nur mit verminderter Ausbeute aufgrund eines Sekretionsdefektes gewonnen werden kann (3.4), konnte bei heterologer Expression und Ein-Schritt Reinigung durch LipH der Biokatalysator mit einer Ausbeute von 91 mg pro Liter Kultur in elektrophoretischer Homogenität gewonnen werden. Bei der anschließenden Ermittlung der Enantioselektivitäten von Wildtyp LipA und LipA 1H8 konnte gezeigt werden, dass die Bindung an das Chaperon keinen Einfluss auf die Enantiopräferenz der Enzyme ausübte, auch wenn der E-Wert im Gegensatz zu dem bereits beschriebenen Wert von $E=51$ mit $E=33$ (LipA 1H8 aus Kulturüberstand) bzw. $E=31$ (LipA 1H8 im Komplex mit dem Chaperon) geringer ausfiel (Abb. 3.39 bzw. Tab. 3.2). Alle diese Werte wurden durch Integration der Peakflächen nach chiraler Gaschromatographie bestimmt, um die durch Enzymaktivität entstandenen Enantiomere der Säure zu quantifizieren. Die Abweichungen der Enantioselektivität sind potentiell durch unterschiedliche Integration der Flächen der Enantiomere bedingt. Gerade bei hoher Enantioselektivität führt die geringe Peakfläche des schlechter hydrolysierten Substrats zu schwachen, schwer zu integrierenden Signalen. Geringe Unterschiede in der Quantifizierung durch Integration dieser Signale bedingen jedoch starke Abweichungen in der Bestimmung der Enantiopräferenz. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass selbst die geringe Änderung der Konformation, die bei LipA 1H8 zu der erhöhten Enantioselektivität führt, auch bei Bindung des Chaperons vorhanden ist, und somit die Tertiärstruktur der Lipase unabhängig von dem Bindungszustand von LipH zu sein scheint.

Für eine Vielzahl verschiedenster immobilisierter Enzyme wurde eine erhöhte Resistenz gegen thermische Inaktivierung beschrieben. Darunter zählen unter anderem Glucoamylasen, Glucose-Oxidasen, α -Amylasen, Haloalkan-Dehalogenasen und Lipasen (Dravis *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2006; Kovalenko *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Shewale & Pandit, 2007). Auch für den immobilisierten LipAH Komplex konnte eine leicht erhöhte Thermostabilität im Vergleich zu freier Lipase nachgewiesen werden. Während die Restaktivität von freier Lipase nach 30 minütiger Inkubation bei 44 °C nur noch 50 % einer Positivkontrolle, die nicht hitzebehandelt wurde, betrug, konnte der gleiche Aktivitätsverlust bei dem immobilisiertem Lipase-Foldase Komplex erst bei 54 °C beobachtet werden (Abb. 3.36). Da direkt im Anschluss nach der thermischen Inkubation die Aktivität gemessen wurde, die Rückfaltung

der Lipase durch das Chaperon jedoch mehrere Stunden dauert, konnte eine Renaturierung des Enzyms im Fall des LipAH Komplexes ausgeschlossen werden. Stattdessen scheint das Chaperon aufgrund der großen Interaktionsfläche, die den Biokatalysator in großen Bereichen umhüllt, eine schützende Rolle einzunehmen. Im Vergleich zu anderen beschriebenen Thermostabilitäten immobilisierter Enzyme fällt die beobachtete Resistenz gegen thermische Inaktivierung eher gering aus. Die Reaktionstemperatur einer Lipase aus *Bacillus coagulans* konnte durch Immobilisierung um mehr als 15 °C erhöht werden, ohne nennenswerte Aktivitätsverluste aufzuweisen (Kumar *et al.*, 2006). Jedoch scheint das Ausmaß der Erhöhung der Stabilität am größten zu sein, wenn das Enzym an der Region immobilisiert wird, wo die Denaturierung beginnt (Mansfeld *et al.*, 1999). Die Immobilisierung des LipAH Komplexes wurde in diesem Fall durch das Poly-Histidin Peptid, das sich am N-Terminus des Chaperons befindet, erreicht. Somit könnte potentiell die Immobilisierung eines anderen Proteinbereichs vorteilhaft sein, um die Thermostabilität des Biokatalysators weiter zu erhöhen.

Die Größe des Sequenzraums stellt ein Maß für das Potential dar, Proteine durch gerichtete Evolution optimieren zu können (Voigt *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass der stabile Lipase-Lif Komplex eine katalytische Aktivität aufweist, die sich nicht von freier Lipase unterscheidet, selbst im Fall der Enantiopräferenz der Lipasevariante 1H8. Durch die Stabilität der Interaktion des Chaperons mit seiner Lipase und der großen Interaktionsfläche besteht die Möglichkeit, dass eingefügte Aminosäuresubstitutionen im LipH durch sogenannte *remote* Effekte eine Veränderung der katalytischen Eigenschaften des LipA hervorrufen können. Für das Propeptid der Protease Subtilisin E, welches als intramolekulares Chaperon die Faltung der reifen Enzyms vermittelt und nachträglich proteolytisch entfernt und degradiert wird, wurde beschrieben, dass Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Sequenz des Propeptids die Substratspezifität der reifen Protease veränderten (Takagi & Takahashi, 2003). Dieser als „*protein memory*“ bezeichnete Effekt (Shinde *et al.*, 1997) könnte Möglichkeiten bieten, durch gerichtete Evolution veränderte Lipase-spezifische Foldasen zu generieren, deren Faltungseigenschaften eine Veränderung von relevanten katalytischen Eigenschaften der Lipase bedingen.

Die Stabilität des Lipase-Lif Proteinkomplexes gegen chemische, physikalische und biologische Einflüsse

Die Dissoziationskonstante von 5 nM und die Interaktionsfläche von 5378 Å² (Pauwels *et al.*, 2007), die etwa 3,3-mal so groß ist wie die durchschnittliche Grenzfläche einer Protein-Protein Interaktion mit 1600 Å² (Wodak & Janin, 2002), spiegelt sich in der Stabilität des LipA-LipH Komplexes aus *P. aeruginosa* wider. Es konnte keine Möglichkeit gefunden werden, durch verschiedene äußere Einflüsse die Dissoziation der aktivierten Lipase von der Foldase zu initiieren. Die Bindung der Lipase durch die Lipase-spezifische Foldase wird bei *B. glumae* über nicht-kovalente Bindungen vermittelt, die hauptsächlich nicht polar sind. Es konnten lediglich 20 intermolekulare Wasserstoffbrücken in dem Bereich der Grenzflächen beider Proteine gefunden werden (Pauwels *et al.*, 2006). Eine der Bindungen zwischen Lipase und Foldase, die auch in den Proteinkomplexen anderer Organismen konserviert zu sein

scheint und die potentiell die Spezifität der Bindung zwischen den Interaktionspartnern vermittelt, stellt die Salzbrücke dar, die zwischen Glu⁶³ der Lipase und Arg³⁴³ der Foldase ausgebildet wird und durch Interaktion des Glu⁶³ mit Trp²⁹⁹ über „ π -stacking“ stabilisiert wird (Abb. 4.3 A; Pauwels *et al.*, 2006). Dieses konservierte Motiv konnte in dem Strukturmodell des Lipase-Lif Komplexes aus *P. aeruginosa* mit den Resten Glu⁵⁸ in LipA und Arg³²⁷ sowie Trp²⁸³ in LipH wiedergefunden werden (Abb. 4.3 B).

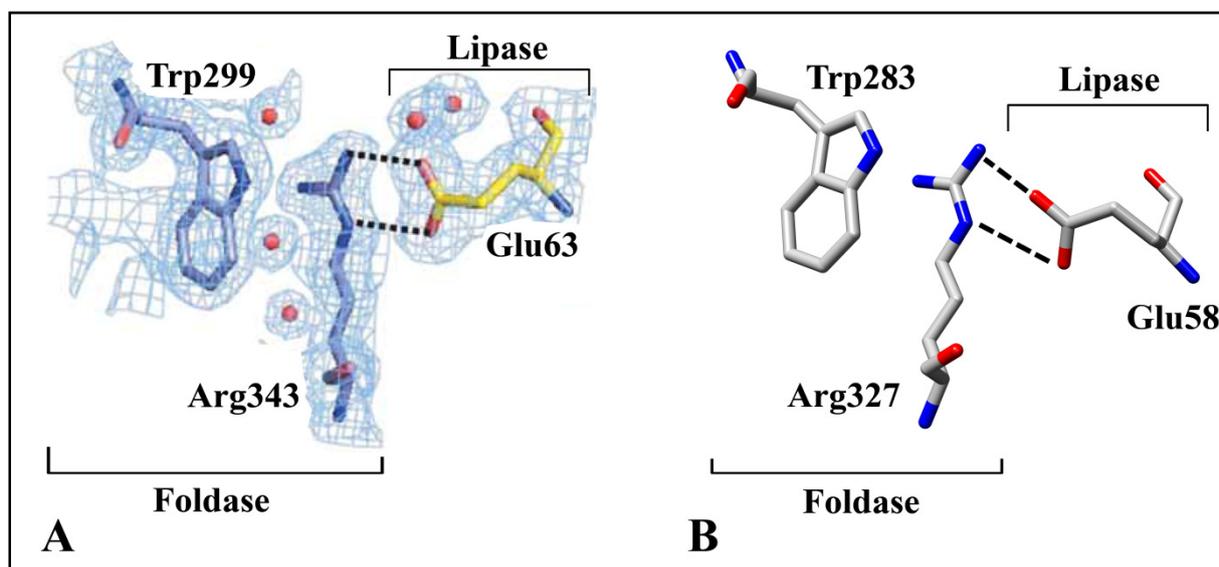


Abb. 4.3: Darstellung der intermolekularen Salzbrücke zwischen dem C-Terminus der Foldase und der Lipase anhand der Struktur des Proteinkomplexes aus *B. glumae* (A, modifiziert nach Pauwels *et al.*, 2006) und des Strukturmodells aus *P. aeruginosa* (B). (A) Superposition der Elektronendichte und der die Salzbrücke bildenden Reste der Lipase (gelb) und der Foldase (blau). Wassermoleküle sind rot dargestellt. Die Abbildung wurde nach Pauwels *et al.* (2006) modifiziert. (B) Salzbrücke im Strukturmodell des LipAH Komplexes aus *P. aeruginosa*. Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Die Verhinderung der Ausbildung einer intakten Salzbrücke durch die Aminosäuresubstitution E324G in LipH von *P. aeruginosa* resultierte in einer verstärkten Degradation der Foldase und in einer geringeren Lipaseaktivität (Sadler, 2007). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die Ausbildung der Salzbrücke für die Stabilität des Lipase-Foldase Komplexes essentiell ist. Aus diesem Grund wurde versucht, die Dissoziation des LipAH Komplexes über Erhöhung der Polarität durch steigende NaCl-Konzentrationen und Störung der in der Foldase C-terminal gelegenen Salzbrücke zu erreichen. Der LipAH Komplex konnte jedoch nicht durch eine erhöhte Salzkonzentration aufgelöst werden. Selbst bei einer Konzentration von 2,5 M NaCl verblieb der an Magnetbeads immobilisierte Proteinkomplex vollständig und intakt an dem Chromatographiematerial (Abb. 3.40), so dass gezeigt werden konnte, dass eine reine Störung der ausgebildeten Salzbrücken nicht ausreicht, um das Enzym von seinem Chaperon trennen zu können.

Aufgrund der ausgedehnten α -helicalen Struktur, die LipH aufweist, wurde vermutet, dass eine partielle thermische Denaturierung in diesem Protein schneller erfolgen würde als bei der globulären und kompakt gefalteten Lipase. Jedoch konnte bei dem Versuch, die Interaktionen zwischen den Proteinen durch partielle Zerstörung der Tertiärstruktur der Lipase-spezifischen

Foldase aufzulösen, keine Dissoziation der Lipase von ihrem Chaperon beobachtet werden. Bis zu einer Temperatur von 60 °C konnte keine lipolytische Aktivität detektiert werden, die auf freigesetzte Lipase zurückzuführen gewesen wäre (Abb. 3.41 B). Auch auf Proteinebene konnte keine von ihrem Chaperon freigegebene Lipase nachgewiesen werden, so dass eine potentielle Denaturierung von Lipase, die nicht mehr an ihr Chaperon gebunden vorlag, ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.40 A). Eine weitere Steigerung der Temperatur war bei diesem Experiment nicht möglich, da sonst das aus Agarose bestehende Chromatographiematerial aufgelöst worden und somit die Immobilisierung des intakten LipAH-Komplexes verlorengegangen wäre, wodurch freie und komplexierte Lipase nicht mehr zu unterscheiden gewesen wären.

Um eine stärkere Denaturierung zu erreichen wurde versucht, die Dissoziation des Proteinkomplexes durch steigende Konzentrationen Harnstoff zu initiieren. Neben einer partiellen Denaturierung vermindert Urea hydrophobe Effekte (Zou *et al.*, 1998), die in beträchtlichem Maß die Bindung zwischen LipA und LipH vermitteln (Pauwels *et al.*, 2006). Jedoch konnte durch eine Inkubation des Komplexes mit bis zu 6 M Urea keine Auflösung der Protein-Protein Interaktion beobachtet werden (Abb. 3.42). Stattdessen wurde ein Aktivitätsverlust der Lipase gemessen, der jedoch ab einer Konzentration von 3 M Harnstoff nicht weiter zunahm (Abb. 3.42 B). Diese Beobachtung ist vereinbar mit den Ergebnissen von Fluoreszenzspektroskopien mit dem Farbstoff 8-Anilino-1-Naphtalen-Sulfonsäure (ANS), in der die Denaturierung der Lipase durch Inkubation mit steigenden Konzentrationen Harnstoff verfolgt wurde (Hausmann, 2004). ANS bindet mit hoher Spezifität an die exponierten hydrophoben Flächen teilweise entfalteter globulärer Proteine, jedoch nicht an komplett gefaltetes oder denaturiertes Protein (Mann & Matthews, 1993), wodurch Konformationsänderungen in Proteinen erfasst werden können (Semisotnov *et al.*, 1987). Nach Bildung eines ANS-Proteinkomplexes nimmt die Intensität der Emission bei einem Maximum von $\lambda = 490$ nm bei pH 8 um den Faktor 40 verglichen mit freiem ANS in Lösung zu (Saucier *et al.*, 1985). So konnten bereits Zwischenzustände der Faltung von Apomyoglobin und Prosubtilisin E nachgewiesen werden (Shinde *et al.*, 1995; Shinde & Inouye, 1995b; Sirangelo *et al.*, 1998). Die Fluoreszenzspektren zeigten, dass eine partielle Denaturierung der Lipase bereits bei einer Konzentration von 1 M Urea einsetzt, und die Exposition hydrophober Bereiche bei 2 M Harnstoff am stärksten ausgeprägt ist. Ab einer Konzentration von 3 M Harnstoff konnte jedoch keine weitere signifikante Änderung der Konformation beobachtet werden, während eine vollständige Denaturierung aufgrund der Stärke der relativen Intensität der Fluoreszenz ausgeschlossen werden konnte (Abb. 4.4).

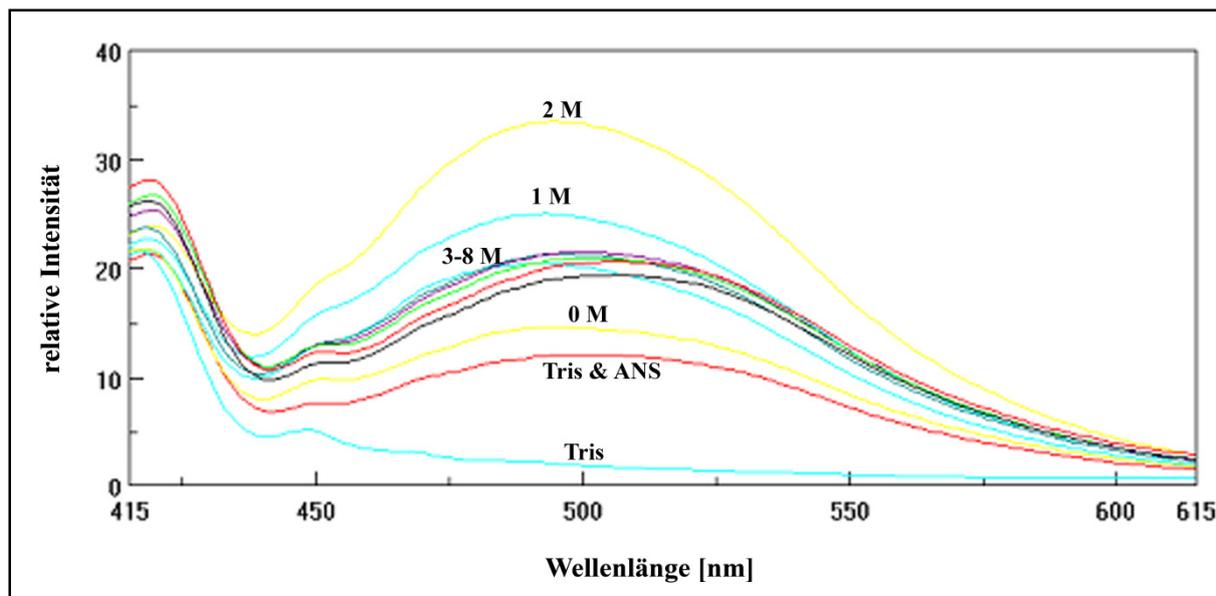


Abb. 4.4: Fluoreszenzspektren von mit unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff versetztem LipA unter Verwendung des Farbstoffs 8-Anilino-1-Naphtalen-Sulfonsäure (Hausmann, 2004). Die Spektren wurden in 25 mM Tris pH 7,5 mit einer Proteinkonzentration von 10 μ M aufgezeichnet.

Die Dissoziation des Proteinkomplexes konnte nicht durch die genutzten unspezifischen Methoden zur Lösung von Protein-Wechselwirkungen bewirkt werden. Unter dem Aspekt der hohen Affinität und Fläche der Interaktion scheint es wahrscheinlich, dass die Freigabe der Lipase aus dem Komplex *in vivo* durch spezifische Mechanismen, wie zum Beispiel durch Wechselwirkung mit akzessorischen Proteinen, vermittelt wird. Deswegen wurden im Folgenden versucht, den Lipase-Lip Komplex durch spezifischere Mechanismen aufzulösen. Die korrekte Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke ist für die Sekretion von LipA essentiell (Nardini *et al.*, 2000; Liebeton *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die durch das Dsb-System eingefügte zusätzliche kovalente Bindung eine Konformationsänderung der Lipase bedingt, die die Lösung der Interaktion mit der Foldase zur Folge hat. Jedoch konnte kein Unterschied in dem Bindungszustand der Lipase zu ihrer Foldase nachgewiesen werden, der auf den Oxidationszustand der Cysteine zurückzuführen gewesen wäre. Die Proben des immobilisierten LipAH Komplexes, die mit oxidiertem und reduziertem Glutathion behandelt wurden, verhielten sich genau wie diejenigen, die nicht mit Glutathion inkubiert wurden (Abb. 3.43). In allen Fällen konnte keine lipolytische Aktivität, die auf Lösung der Lipase von ihrer Foldase zurückzuführen gewesen wäre, detektiert werden. Somit scheint die Ausbildung der Disulfidbrücke selbst keine Änderung der Tertiärstruktur zu bewirken, die die Dissoziation des Proteinkomplexes vermittelt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion mit Proteinen des Dsb-Systems, welches die Disulfidbrücke *in vivo* in das Protein einführt, einen Einfluss auf die Bindung des Chaperons und der Lipase nimmt.

Die Frage, ob Lipase-spezifische Foldasen nur einmal in der Lage sind, eine Lipase zu falten und danach degradiert werden, oder ob sie an der Faltung mehrerer Lipase-Moleküle beteiligt sind, ist noch nicht geklärt. Zwar sind die Gene für die Lipasen und ihre Lipase-spezifischen Foldasen gewöhnlich in einem Operon codiert, die eine äquimolare Stöchiometrie der Interaktion vermuten lässt. Jedoch konnte durch Northern Blot Experimente gezeigt werden,

dass das Primärtranskript der Operons aus *P. aeruginosa* und *B. glumae* nachträglich prozessiert wurde, wodurch der Bereich des Transkripts, welcher für die Foldase codiert, degradiert zu werden scheint (Frenken *et al.*, 1993a; Schneidinger, 1997). Weiterhin konnte auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass die Foldasen aus *B. glumae*, *P. aeruginosa* und *P. alcaligenes* in geringeren Mengen als die Lipasen gebildet werden, wodurch die Vermutung, dass Lif-Proteine in der Lage sind, mehr als einmal die Faltung zu katalysieren, bekräftigt wurde (Gerritse *et al.*, 1998a; El Khattabi *et al.*, 1999). Es wurde jedoch auch beschrieben, dass bei heterologer Expression von getrennt induzierbaren Genen, die für die Lipase und die Foldase aus *B. glumae* codierten, nur lipolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte, wenn zuerst die Expression der Foldase und anschließend die der Lipase induziert wurde (Aamand *et al.*, 1994). Bei nachträglicher Repression der Expression der Foldase konnte ein sigmoidaler Verlauf bezüglich der Aktivierung der Lipase gemessen werden, der auf einen Verbrauch der Foldase hinwies (Aamand *et al.*, 1994). Diese gegensätzlichen Beobachtungen sind möglicherweise auf die Bildung eines intrazellulären stabilen Lipase-Foldase Komplexes zurückzuführen, der nur durch Interaktion mit akzessorischen Proteinen wie der Sekretionsmaschinerie getrennt werden kann. Demnach verbleibt die Lipase bei Expression in *E. coli*, da der entsprechenden Typ-II Sekretionsapparat in diesem Expressionssystem nicht vorhanden ist, an die Foldase assoziiert, so dass das Chaperon in diesem Fall „verbraucht“ wird.

Um überprüfen zu können, ob der Komplex aus Lipase und Chaperon durch noch nicht gefaltetes Enzym aufgelöst werden kann, oder sich LipH während der *in vitro* Renaturierung wie ein *single turnover catalyst* verhält, wurde eine inaktive Lipasevariante konstruiert, in der das im aktiven Zentrum lokalisierte, essentielle Ser⁸² durch ein Alanin substituiert wurde. Bei homologer Expression in einer *lipA* Deletionsmutante konnte keine lipolytische Aktivität detektiert werden (Abb. 3.44 A), obwohl die Lipasevariante sowohl im Gesamtzellextrakt als auch im Kulturüberstand immunologisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.44 B). Durch diese Experimente konnte nachgewiesen werden, dass LipA S82A durch die eingeführte Aminosäuresubstitution wie gewünscht keine Enzymaktivität mehr aufweist, die Tertiärstruktur jedoch intakt ist, so dass die Interaktion mit den für die Prozessierung und Sekretion essentiellen akzessorischen Proteinen weiterhin gewährleistet war. In *in vitro* Experimenten, in denen der Versuch unternommen wurde, fertig gefaltete Lipase aus einem immobilisierten LipAH-Komplex durch Zugabe von gereinigtem LipA S82A zu verdrängen, konnte jedoch keine Enzymaktivität in den Proben detektiert werden, die nach Inkubation des Proteinkomplexes mit der inaktivierten Lipase entnommen wurden (Abb. 3.45). Somit konnte nachgewiesen werden, dass das immobilisierte Chaperon *in vitro* nur einmal in der Lage ist, Lipase zu binden und zu aktivieren, und die Dissoziation des Komplexes nicht durch weitere Lipase vermittelt werden kann.

Im Rahmen einer anderen Arbeit wurde bei Koexpression des N-terminalen Drittels der Lipase *in trans* sowohl in *P. aeruginosa* als auch in *E. coli* eine Erhöhung der Lipaseproduktion bei Überexpression des *lipAH* Operons um den Faktor 4 bis 5 beschrieben (Hacker, 2003). Als Grund für diese Beobachtung wurde eine Konkurrenz des als LA-1 bezeichneten Peptids um die Bindung an LipH, die eine schnellere Umsatzrate der Lipase bedingen könnte, diskutiert. Anhand des Strukturmodells des Lipase-Lif Komplexes aus *P. aeruginosa* konnte nachgewiesen werden, dass dieses Peptid einen Großteil der Sequenz

beinhaltet, der die Interaktionsfläche zwischen LipA und LipH im Komplex darstellt (Abb. 3.46). Deswegen wurde versucht, die Freigabe der Lipase aus dem Komplex durch Konkurrenz um die Bindung mit dem Peptid LA-1 zu bewirken. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine nachträgliche Inkubation eines ausgebildeten Lipase-Lif Komplexes mit diesem Peptid keine Lösung der Lipase zur Folge hat, da die gemessene lipolytische Aktivität nicht in der Fraktion detektiert wurde, die nach Inkubation mit dem Peptid genommen wurde, sondern in derjenigen, die den intakten Komplex nach Elution von dem Chromatographiematerial enthielt (Abb. 3.48).

Zusammenfassend konnte keine Möglichkeit gefunden werden, die Lipase aus dem Proteinkomplex durch unspezifische chemische, physikalische oder biospezifische Parameter freizugeben. Die molekularen Mechanismen, die die Freigabe der Lipase aus dem Komplex mit ihrer Foldase induzieren, sind nicht verstanden. Durch die Stärke der Interaktion liegt die Möglichkeit einer spezifischen Lösung der Lipase aus dem Komplex nahe. Es wurde wiederholt vermutet, dass die Dissoziation des Komplexes über Teile der Sekretionsmaschinerie vermittelt wird (Rosenau *et al.*, 2004; Pauwels *et al.*, 2006). Sequenzanalysen ergaben, dass sowohl die carboxyterminale Domäne des LipH als auch das für die Spezifität des Xcp-Apparates verantwortliche XcpP α -helicale Strukturen enthält, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Bestandteil sog. "coiled-coils" sind, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln können (Rosenau, 2001).

Eine Dissoziation des Komplexes wäre vorteilhaft, um das gereinigte Chaperon im Rahmen einer weiteren Ein-Schritt Affinitätsreinigung erneut zu nutzen oder um die reine Lipase in weiteren Experimenten charakterisieren zu können. Allerdings scheint die Bindung des Chaperons keinen großen Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften der Lipase zu nehmen, so dass es nicht zwingend notwendig ist, das Chaperon von dem Enzym zu entfernen. Darüberhinaus liefert die nachgewiesene Stabilität der Protein-Protein Interaktion eine elegante Möglichkeit, den Biokatalysator spezifisch zu immobilisieren, ohne ihn selbst biochemisch modifizieren zu müssen. Bei anderen Vorgehensweisen zur Immobilisation, bei der die Bindung von spezifischen Proteinteilen an Trägermaterialien vorgenommen wurde, wurden lösungsmittel-exponierte Resten durch Cysteine substituiert (Mansfeld *et al.*, 1999), wodurch das Risiko der Veränderung der Tertiärstruktur und damit potentiell auch der katalytischen Eigenschaften des Enzyms erhöht wird.

Der LipAH Komplex dissoziiert bei C-terminaler Immobilisierung der Foldase

Während im Fall des N-terminal immobilisierten LipAH Komplexes die Stabilität auf verschiedene Weisen gezeigt wurde, konnte in Versuchen, in denen *lipH* für ein bakterielles Oberflächendisplay C-terminal mit *estA* translational fusioniert wurde, gezeigt werden, dass der Lipase-Lif Komplex nach erfolgter Aktivierung der Lipase dissoziiert (Wilhelm *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob an Ni-NTA Material C-terminal immobilisiertes gereinigtes LipH *in vitro* ebenfalls in der Lage ist, LipA nach erfolgter Aktivierung freizugeben. Im Vorfeld wurde zunächst untersucht, ob der Proteinkomplex im Fall der C-terminal mit einem Poly-Histidin Peptid fusionierten LipH-Variante in Lösung ebenso stabil ist wie im Fall von N-terminal modifiziertem LipH, oder ob der Komplex schon in Lösung nach Aktivierung dissoziiert. Die Stabilität der in Lösung vorliegenden Lipase-Lif

Komplexe konnte durch Gelfiltrationsexperimente bestätigt werden. Ungeachtet der Lokalisation des Histidin-Peptids konnte die Bildung von stabilen Proteinkomplexen nachgewiesen, die in der Chromatographie bei einem Molekulargewicht eluierten, das auf einen intakten LipAH-Komplex zurückzuführen war (Abb. 3.49). Wurde die Foldase jedoch vor mehrmaliger Inkubation mit Lipase über das Poly-Histidin Peptid an Ni-NTA Material gebunden, so konnte nur für N-terminal immobilisiertes LipH der Hauptanteil der lipolytischen Aktivität in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden. Im Fall von C-terminal gebundenem LipH wiesen hingegen sämtliche Durchläufe nach erfolgter Inkubation mit rückzufaltendem LipA sowie die Elutionsfraktion Lipaseaktivität auf, die insgesamt in etwa mit derjenigen vergleichbar war, die in der Elutionsfraktion bei N-terminaler Immobilisierung gemessen wurde (Abb. 3.50). Darüberhinaus konnte, wenn die vorher präparierten Lipase-Lip Komplex nachträglich an Chromatographiematerial immobilisiert wurden, im Fall einer N-terminalen Bindung, wie bereits beschrieben, der intakte LipAH Komplex immobilisiert werden, während bei C-terminaler Lokalisation des Histidin-Peptids der größte Teil der lipolytischen Aktivität und auch der Lipase im Durchlauf detektiert werden, wobei lediglich das Chaperon an das Ni-NTA Material band (Abb. 3.51). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lipase im Fall von C-terminaler Immobilisierung des Proteinkomplexes freigegeben wird, während der LipAH Komplex bei Bindung des N-Terminus des Chaperons weiterhin intakt bleibt. Vermutlich liegt diese Beobachtung darin begründet, dass die Bindung des C-Terminus und die dadurch auf den Komplex übertragene mechanische Energie eine Konformationsänderung induziert, die potentiell die Dissoziation des Komplexes bewirkt. Es ist wahrscheinlich, dass zuerst das carboxyterminale Ende des LipH *in vivo* abgestreift wird, um die Lipase freizugeben. In diesem Bereich befindet sich nicht nur die schon beschriebene intermolekulare konservierte Salzbrücke, sondern ebenfalls die durch Sequenzanalysen identifizierte potentielle „coiled-coil“ Domäne, die möglicherweise mit derjenigen von XcpP interagieren könnte, um die Freisetzung der Lipase zu induzieren. Weitere Interaktionsversuche mit diesem Protein könnten Aufschluss darüber geben, ob die Dissoziation des Lipase-Lip Komplexes aus *P. aeruginosa* über die Wechselwirkung mit dem Porin des Xcp-Apparates vermittelt wird.

4.6 Charakterisierung einer translationalen Fusion aus Lipase und Foldase

In silico Betrachtungen

Lipase-spezifische Foldasen weisen Analogien zu Propeptiden von Proteasen auf. Sie falten wie diese intramolekularen, sterischen Chaperone ihr Zielprotein mit hoher Spezifität, indem sie dazu beitragen, dass eine energetische Barriere bei der Faltung der Enzyme überwunden werden kann. Es konnten bereits N- und C-terminal lokalisierte Propeptide identifiziert werden (Sloma *et al.*, 1990; Goetz *et al.*, 1998; Conesa *et al.*, 2001). Weiterhin katalysieren nicht grundsätzlich Propeptide die Faltung mikrobieller Proteasen. Eine Serin-Protease aus *Aeromonas sobria* erlangt ihre aktive Konformation durch Beteiligung eines Chaperons, dessen Gen durch 22 bp getrennt stromabwärts lokalisiert ist (Okamoto *et al.*, 2000).

Durch die stetig wachsende Zahl sequenzierter bakterieller Genome konnten eine Vielzahl Strukturgene, die für Lipasen und ihre Lip Proteine codieren, identifiziert werden (Iizumi *et al.*, 1991; Joergensen *et al.*, 1991; Frenken *et al.*, 1993a; Frenken *et al.*, 1993b; Kok *et al.*, 1995; Ogierman *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001). Beide Gene bilden im Allgemeinen ein bicistronisches Operon, wobei das Lipasegen stets 5'-lokalisiert vorliegt und entweder durch eine kurze intergenische Region von dem stromabwärts gelegenen Strukturgen der Lipase-spezifischen Foldase getrennt wird (z. B. in *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *S. cellulosum*), oder beide Gene eine kurze Überlappung aufweisen. So stellt zum Beispiel das Adenin des Stop-Codons TGA des Lipase-Strukturgens in *B. glumae* nicht nur das letzte Nukleotid dieses Gens, sondern auch gleichzeitig das erste Nukleotid des Start-Codons ATG des Chaperogens *lipB* dar. LipC aus *P. aeruginosa* besitzt, als einzige beschriebene Ausnahme zu dieser Genorganisation, kein eigenes Chaperon (Martinez *et al.*, 1999), sondern wird, wie im Rahmen dieser Arbeit zuerst gezeigt werden konnte, durch die Foldase von LipA gefaltet.

Während durchgeführter *in silico* Betrachtungen fiel auf, dass LipA aus *P. aeruginosa* durch Deletion einer Base des Stop-Codons mit seinem Chaperon auf einfachem Weg translational fusioniert werden kann (Abb. 3.53). Anhand des Strukturmodells des LipAH Komplexes aus *P. aeruginosa* konnte nachgewiesen werden, dass der C-Terminus von LipA innerhalb des Komplexes in räumlicher Nähe des N-Terminus von LipH lokalisiert ist, und somit möglicherweise diese Tertiärstruktur auch bei translationaler Fusion eingenommen werden könnte (Abb. 3.54). Diese Hypothese wurde dadurch bestärkt, dass laut Vorhersage-Algorithmen der Sekundärstruktur die ehemalige intergenische Region als Verbindungsstück ein „*random coil*“ ausbildet, welches aufgrund seiner Flexibilität vorteilhafte Eigenschaften aufweist, beide Proteine in potentiell funktioneller Weise zu verbinden (Abb. 3.55).

Bei weiteren Sequenzanalysen von Lipase-Lip Operons anderer Organismen fiel auf, dass auch in diesen Fällen ausnahmslos eine einfache Möglichkeit gefunden werden konnte, eine translationale Fusion beider Gene durch Punktmutationen wie Insertionen und Deletionen zu konstruieren. Das Wildtyp-Startcodon der Lip-Proteine stellte in 27 % der untersuchten Sequenzen das zu ATG alternative Codon GTG dar (Tab. 3.4). Dieser Wert ist, verglichen mit der ermittelten durchschnittlichen Häufigkeit dieses Start-Codons von 15,7 % in vollständig sequenzierten Genomen verschiedener Prokaryoten (Tab. 4.1), signifikant erhöht. Im Fall von

P. aeruginosa beginnen nur 9,8 % der Gene mit diesem Start-Codon (Ma *et al.*, 2002), darunter auch jenes, welches für die Lipase-spezifische Foldase codiert.

Tab. 4.1: Absolute und relative Häufigkeit der Start-Codons ATG, GTG und TTG in verschiedenen Organismen. Die absoluten Daten wurden Ma *et al.* (2002) entnommen und die daraus resultierenden relativen Häufigkeiten berechnet.

Organismus	Häufigkeit des Startcodons ATG		Häufigkeit des Startcodons GTG		Häufigkeit des Startcodons TTG	
	absolut	relativ [%]	absolut	relativ [%]	absolut	relativ [%]
<i>Escherichia coli</i>	3544	82,7	612	14,3	130	3,0
<i>Haemophilus influenzae</i>	1523	88,8	192	11,2	0	0,0
<i>Vibrio cholerae</i>	3248	91,6	161	4,5	136	3,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4938	88,7	548	9,8	78	1,4
<i>Campylobacter jejuni</i>	1426	86,6	92	5,6	128	7,8
<i>Helicobacter pylori</i>	1285	82,2	152	9,7	126	8,1
<i>Rickettsia prowazekii</i>	774	93,5	54	6,5	0	0,0
<i>Neisseria meningitidis</i>	1880	94,5	66	3,3	43	2,2
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	865	82,3	110	10,5	76	7,2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	777	52,7	667	45,2	31	2,1
<i>Borrelia burgdorferi</i>	588	69,2	79	9,3	183	21,5
<i>Treponema pallidum</i>	600	58,2	346	33,6	85	8,2
<i>Bacillus subtilis</i>	3185	78,0	387	9,5	512	12,5
<i>Mycobacterium genitalium</i>	430	92,3	36	7,7	0	0,0
<i>Mycobacterium pneumoniae</i>	626	92,9	30	4,5	18	2,7
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	565	92,5	28	4,6	18	2,9
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2387	61,4	1312	33,7	189	4,9
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	2617	82,7	548	17,3	0	0,0
<i>Deinococcus radiodurans</i>	1887	60,8	839	27,0	377	12,1
<i>Aquifex aeolicus</i>	1251	82,2	159	10,5	111	7,3
<i>Thermotoga maritima</i>	1230	66,6	421	22,8	195	10,6
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1526	90,8	152	9,0	2	0,1
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	1172	66,3	420	23,8	175	9,9
<i>Archeoglobus fulgidus</i>	1828	75,9	523	21,7	56	2,3
<i>Pyrococcus abyssi</i>	1315	74,7	286	16,2	160	9,1
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1470	71,4	588	28,6	0	0,0
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	979	66,2	267	18,1	232	15,7
<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	2055	99,9	3	0,1	0	0,0
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	1881	63,2	543	18,2	552	18,5
<i>Pyrococcus aerophilum</i>	1617	62,1	883	33,9	103	4,0
Mittelwert		78,4		15,7		5,9

All diese Beobachtungen sind Indizien dafür, dass es potentiell möglich ist, dass die Gene, die für die Lipase und die Foldase codieren, früher ein Gen waren, und im Lauf der Evolution getrennt wurden. Dies könnte in einer besseren Regulationsmöglichkeit und verminderten aufzubringenden Syntheseleitung im Fall eines Chaperons, welches mehrfach für die Faltung der Lipase genutzt werden kann, begründet liegen. Im Fall von *P. aeruginosa* wäre die Trennung sogar zwingend notwendig gewesen, da LipC, welches unter vollständig anderen physiologischen Bedingungen als LipA gebildet wird (Rosenau *et al.*, unveröffentlicht), ebenfalls von LipH aktiviert wird, und somit die Notwendigkeit einer getrennten Regulation von LipA besteht.

LipA::H ist im homologen Wirt nur bei moderater Expression aktiv

Nach Konstruktion der translationalen Fusion aus Lipase und Foldase durch Deletion des Adenins des Stop-Codons von *lipA* wurde zunächst untersucht, ob die Expression von LipA::H in lipolytisch aktivem Protein resultiert. Es konnte gezeigt werden, dass die gemessene Enzymaktivität in Abhängigkeit der Stärke der Expression stand. Je stärker das Gen, welches für das Fusionsprotein codiert, exprimiert wurde, umso weniger Aktivität konnte detektiert werden (Abb. 3.58). Während unter Kontrolle des T7-Promotors eine geringe lipolytische Aktivität unter nicht-induzierenden Bedingungen beobachtet wurde, resultierte die Induktion der Genexpression in dem Verlust der Lipaseaktivität (Abb. 3.58 A). Bei Expression von *lipA::H* unter Kontrolle des *lac*-Promotors, die im Fall der Expression des Wildtyp *lipAH* Operons etwa 100-fach geringer war als diejenige unter P_{T7} (Abb. 3.27 und Abb. 3.29), konnte auf Tributyrinplatten lipolytische Aktivität nachgewiesen werden, die in etwa derjenigen bei Expression des Wildtyp Operons entsprach (Abb. 3.58 B). Diese Beobachtung konnte bei Anzucht in Flüssigmedium nicht bestätigt werden. Bei Expression von LipA::H konnte sowohl im Gesamtzellextrakt als auch im Kulturüberstand eine um etwa 50 % geringere lipolytische Aktivität als bei Expression des Wildtyp-Operons detektiert werden (Abb. 3.59). Ähnliche Beobachtungen wurden jedoch auch schon in anderen Experimenten gemacht, in denen versucht wurde, die Proteine XcpP und XcpQ aus *P. alcaligenes* in *P. aeruginosa* *xcpPQ*-Deletionsmutanten zu exprimieren. In diesen Komplementationstests wurden Unterschiede in der Sekretion der Elastase und der Lipase von *P. alcaligenes* beobachtet, je nachdem, ob die Bakterien in Flüssigkulturen oder auf Agarplatten angezogen wurden, was in diesem Fall auf eine Veränderung der Physiologie der Bakterien zurückgeführt wurde (de Groot *et al.*, 2001).

Nachfolgend wurde die Expression des Fusionsproteins unter Kontrolle von P_{T7} und P_{lac} immunologisch nachgewiesen. In diesem Versuch fiel auf, dass in beiden Expressionssystemen das Fusionsprotein gebildet wurde, auch unter Kontrolle des T7-Promotors nach erfolgter Induktion (Abb. 3.60), obwohl in diesem Fall keine lipolytische Aktivität detektiert wurde (Abb. 3.58 A). Bei Expression von LipA::H unter Kontrolle von P_{lac} konnten im Western Blot weitere Signale bei niedrigerem Molekulargewicht detektiert werden (Abb. 3.60). Das aufgetretene Bandenmuster, in dem neben dem Signal des Fusionsproteins bei 70 kDa ein weiteres intensives bei etwa 40 kDa auftrat, schien nicht auf eine unspezifische Degradation des Fusionsproteins zurückzuführen sein, da keine Signale

zwischen den eben erwähnten Banden detektiert werden konnten, die auf terminale Proteolyse hingedeutet hätten. Stattdessen schien eine spezifische Prozessierung des Fusionsproteins durch Proteasen wahrscheinlicher. Weiterhin konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die immunologische Detektion des LipH Anteils der Fusion auf die Aktivität des vor *lipH* lokalisierten Promotors in der ehemaligen intergenischen Region (Rosenau, 2001), deren Sequenz nicht verändert wurde, zurückzuführen war. Wie jedoch anhand der aufgetragenen Positivkontrolle und des Molekulargewicht Standards ersichtlich war, lag das Signal etwas über der Masse der Wildtyp Foldase von 37,5 kDa, so dass eine posttranslationale proteolytische Prozessierung des Fusionsproteins wahrscheinlicher erschien.

Die LipA- und LipH-Fragmente der prozessierten Fusion sind zellulär lokalisiert wie nach Expression des Wildtyp *lipAH*-Operons

Nach homologer Expression des Fusionsproteins in Flüssigmedium konnte lipolytische Aktivität im Kulturüberstand detektiert werden (Abb. 3.59). Um die zelluläre Lokalisation des Fusionsproteins bzw. seiner Fragmente zu überprüfen, wurde *lipA::H* unter Kontrolle des *lac*-Promotors exprimiert und die Zellen nachfolgend fraktioniert. Bei dem durchgeführten immunologischen Nachweis des Fusionsproteins mittels Antikörpern, die gegen LipA und LipH gerichtet waren, wurde erneut beobachtet, dass neben dem Signal des Fusionsproteins bei 70 kDa weitere intensive Signale auf Höhe des Wildtyp LipA bzw. bei einem etwas größeren Molekulargewicht als Wildtyp LipH auftraten (Abb. 3.61). Während das intakte Fusionsprotein im Gesamtzellextrakt, dem Cytoplasma und zu geringen Anteilen auch in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte, konnten die Fragmente des Fusionsproteins in den Kompartimenten detektiert werden, in denen die Proteine nach Expression des Wildtyp Operons lokalisiert waren. Durch Nachweis des LipA Fragments des Fusionsproteins schien es zunehmend unwahrscheinlich, dass das schon vorher detektierte LipH Fragment auf die Aktivität des in der intergenischen Region gelegenen Promotors zurückzuführen war. Stattdessen schien das intakte Fusionsprotein bereits im Cytoplasma oder während der Translokation über die innere Membran proteolytisch prozessiert zu werden.

Bei Expression von *lipAH* inseriert das Chaperon durch eine N-terminal lokalisierte α -Helix in die innere Membran, wobei der C-terminale Rest der Foldase, der die Faltung der Lipase katalysiert, in das Periplasma weist. Durch eine Separation der inneren und äußeren Membran nach erfolgter Fraktionierung und einen immunologischen Nachweis des LipH Anteils von *LipA::H* konnte nachgewiesen werden, dass auch bei Expression des Fusionsproteins das Fragment, welches die Foldase beinhaltet, in der inneren Membran lokalisiert ist (Abb. 3.62). Dieser Befund warf jedoch erneute Fragen auf, da die für die Erkennung von über die innere Membran transportierten Proteine durch den Sec-Apparat essentielle Signalsequenz, die zuerst die von SecYEG gebildete Pore der Transportmaschinerie betritt, N-terminal lokalisiert ist (Watson, 1984). Nach üblicher Vorstellung wird die hydrophobe Helix des LipH, die die Fixierung des Proteins in der inneren Membran vermittelt, ebenfalls zuerst in die Pore geschleust, verbleibt dann aber dort, während der C-terminale Rest des Proteins in das Periplasma überführt wird, so dass das Chaperon, mit dem faltungsaktiven Anteil in das Periplasmaweisend, die Pore im Anschluss durch laterale Diffusion verlassen kann. Durch

den Aufbau der konstruierten Fusion ist der Membrananker in diesem Fall jedoch in der Mitte des Proteins lokalisiert, so dass nicht sichergestellt ist, dass das die Faltung der Lipase vermittelnde LipH-Fragment der Fusion in das Periplasma gerichtet ist. Aus diesem Grund wurden Sphäroblasten von *P. aeruginosa* Zellen, die *lipAH* und *lipA::H* exprimierten, hergestellt. Durch diese Präparation sind in das Periplasma exponierte Anteile von Proteinen, die in der inneren Membran lokalisiert sind, für einen proteolytischen Abbau durch Trypsin frei zugänglich. Nach Trypsinbehandlung wurde ein immunologischer Nachweis mit einem gegen LipH gerichteten Antikörper durchgeführt (Abb. 3.63). Bei diesem Experiment konnte die Abnahme der Signalintensität in Abhängigkeit der eingesetzten Trypsinmenge sowohl im Fall des Wildtyp LipH als auch im Fall des LipH-Fragments der Fusion nachgewiesen werden. Somit schien das Foldase-Fragment der Fusion in der richtigen Orientierung, nämlich in das Periplasma weisend, vorzuliegen. Weiterhin schien es nach diesem Experiment wahrscheinlich, dass, wenn das LipH-Fragment durch eine posttranslationale Proteolyse des intakten Fusionsproteins entstanden wäre, diese Prozessierung bereits im Cytoplasma erfolgt.

LipA::H wird posttranslational durch Proteolyse spezifisch prozessiert

Die Hypothese, dass das intakte Fusionsprotein durch spezifische Proteolyse wieder in ein LipA- und ein LipH-Fragment gespalten wird, konnte durch Inkubation von gereinigtem, intaktem Fusionsprotein aus *E. coli* mit verschiedenen Gesamtzellextrakten aus *E. coli* und *P. aeruginosa* bestätigt werden. LipA::H wurde mittels eines angefügten C-terminalen Poly-Histidin Peptids als Volllängenprotein aus *E. coli* BL21(DE3) gereinigt. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit Gesamtzellextrakten des *lipAH* Deletionsstamms *P. aeruginosa* PABS1 und *E. coli* inkubiert, um es anschließend erneut zu reinigen. Nach Inkubation von LipA::H mit dem *P. aeruginosa* Lysat konnte eine neu auftretende Bande bei etwa 40 kDa identifiziert werden, die der Bande entsprach, die schon in den vorherigen Experimenten beschrieben wurde, und dem LipH Anteil des Fusionsproteins entsprach (Abb. 3.68 B). Diese Bande konnte auch detektiert werden, wenn die Reinigung nach homologer Expression des Fusionsproteins durch Ni-NTA Chromatographie erfolgte (Abb. 3.68 A), während das Fusionsprotein durch Inkubation mit Gesamtzellextrakt von *E. coli* nur in intakter Form nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.68 C). In diesem Experiment konnte das Auftreten des LipH-Fragmentes durch die Aktivität des in der ehemaligen intergenischen Region lokalisierten Promotors ausgeschlossen werden, so dass die Resultate erneut auf eine spezifische Prozessierung durch Proteasen, die nur im homologen Wirt, nicht jedoch in *E. coli* erfolgt, hindeuteten. Somit schienen die an der Prozessierung beteiligten Faktoren ausschließlich im homologen Wirt vorhanden zu sein.

Die Beteiligung von Proteasen an der Prozessierung der Fusion konnte in einem weiteren Experiment, in dem die Inkubation des Fusionsproteins mit Gesamtzellextrakt aus *P. aeruginosa* unter Zusatz von Proteaseinhibitor durchgeführt wurde, bestätigt werden. Während nach Inkubation von LipA::H mit dem Gesamtzelllysat aus *P. aeruginosa* die Prozessierung durch einen immunologischen Nachweis des LipH-Fragments erneut nachgewiesen wurde, konnte sowohl unter Zusatz des Proteaseinhibitors als auch bei Inkubation mit Gesamtzellextrakt aus *E. coli* ausschließlich das intakte Fusionsprotein

detektiert werden (Abb. 3.39). Somit konnte eine klare Abhängigkeit der posttranslationalen Prozessierung von proteolytischer Aktivität gezeigt werden. In diesem Versuch konnten in Fall der Inkubation mit GZE aus *P. aeruginosa* neben Signalen bei etwa 75 kDa und 40 kDa, die auf das intakte Fusionsprotein bzw. den spezifisch prozessierten LipH-Anteil zurückzuführen waren, weitere Signale schwächerer Intensität detektiert werden, die auf eine zusätzliche Degradation hindeuteten (Abb. 3.69, Spur 2). Dies ist darauf zurückzuführen, dass in dem erstellten Lysat sämtliche Proteasen, die normalerweise im Cytoplasma bzw. im Periplasma lokalisiert sind, zusammen mit dem Fusionsprotein inkubiert wurden. Somit hatten auch Proteasen, die normalerweise *in vivo* nicht mit dem vollständigen, cytoplasmatisch lokalisierten Fusionsprotein in Kontakt kommen würden, Gelegenheit, proteolytisch aktiv zu werden. Die Degradation des LipH-Anteils scheint spezifisch in *P. aeruginosa* vorgenommen zu werden, denn nach Inkubation mit Gesamtzellextrakt aus *E. coli* konnte sie nicht beobachtet werden (Abb. 3.69, Spur 4). Somit könnten die zusätzlichen Fragmente auf periplasmatisch lokalisierte Proteasen zurückzuführen sein, die *in vivo* nicht mehr benötigtes Chaperon degradieren. Dass diese Fragmente nur in diesem Versuch auftraten und nicht in demjenigen, in dem die Proben nachträglich erneut über eine Chromatographie gereinigt wurden, liegt potentiell darin begründet, dass Fragmente, die nach C-terminaler Degradation des Volllängenproteins entstanden, in dem einen Fall durch die chromatographische Reinigung entfernt wurden und somit nicht detektiert wurden.

Durch diese Experimente konnte nachgewiesen werden, dass eine translationale Fusion der Lipase und der Foldase bei homologer Expression spezifisch durch Proteasen prozessiert wird. Somit ergibt sich aus diesen Beobachtungen eine weitere Analogie zu den Propeptiden von Proteasen, die ebenfalls durch Proteolyse entfernt werden. Eine genaue Identifizierung der Prozessierungsstelle könnte potentiell Aufschluss darüber geben, welche Protease an der Prozessierung beteiligt ist, und auf andere Weise zeigen, dass die Foldase nicht durch die Aktivität des in der ehemaligen intergenischen Region lokalisierten Promotors gebildet wurde. Hierzu könnte der nach der Prozessierung entstehende LipH-Anteil über eine IMAC gereinigt und N-terminal ansequenziert werden.

Die heterologe Expression von LipA::H in *E. coli* resultiert in intaktem, aber inaktivem Protein

Es konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein unter Kontrolle des T7-Promotors im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) nach Induktion gebildet wurde (Abb. 3.57), während eine geringe Enzymaktivität jedoch nur unter nicht-induzierenden Bedingungen detektiert werden konnte (Abb. 3.56). Nach starker Expression konnte das mit einem Poly-Histidin Peptid versehene Fusionsprotein nicht unter nativen Bedingungen gereinigt werden (ohne Abb.). Da gezeigt werden konnte, dass LipA::H nicht löslich vorlag (Abb. 3.65), wurde vermutet, dass das intakte Fusionsprotein bei heterologer Expression entweder in die Membran inserierte, oder in „inclusion bodies“ abgelagert wurde. Erst nach Denaturierung oder nach Inkubation mit Laurylmaltosid konnte das Fusionsprotein gereinigt werden (Abb. 3.66). Für dieses Detergenz wurde beschrieben, dass es in der Lage ist, effizient Membranproteine zu solubilisieren (Luche *et al.*, 2003). Unter Verwendung von

Laurylmaltosid konnten bereits zahlreiche Proteine aus der Membran gelöst und in aktiver Form gereinigt werden, darunter das Photosystem I von *Chlamydomonas reinhardtii* und der Glucose-Transporter der menschlichen Leber (Lachaal *et al.*, 2000; Ramesh & Webber, 2004).

Bei heterologer Expression konnte eine geringe lipolytische Aktivität bei schwacher Expression detektiert werden, welche bei Induktion einer stärkeren Expression vollständig verloren ging (Abb. 3.56). Diese Beobachtung weist auf die Bildung von inaktivem Protein, welches in „inclusion bodies“ aggregierte, bei starker Expression des Fusionsproteins hin. Bei schwächerer Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen unter Kontrolle von P_{T7} könnte die unspezifische Degradation von löslichem LipA::H zu teilweise korrekt getrennter Lipase und Foldase geführt haben, so dass eine geringe Lipaseaktivität detektiert werden konnte (Abb. 3.56). Allerdings wurde bislang nicht beschrieben, dass Laurylmaltosid in der Lage ist, Proteine aus „inclusion bodies“ zu solubilisieren. Darüberhinaus konnte in Rückfaltungsexperimenten mit gereinigtem Fusionsprotein gezeigt werden, dass der Foldase-Anteil von intaktem LipA::H in der Lage ist, zugegebene Lipase zu aktivieren (Abb. 3.67). Durch Harnstoff denaturierte Wildtyp Foldase ist jedoch nicht imstande, sich spontan unter Zusatz von Rückfaltungspuffer mit Laurylmaltosid in ihre aktive Konformation zurückzufalten (ohne Abb.), so dass nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, ob LipA::H sich nach heterologer Expression in der Membran oder in „inclusion bodies“ befindet.

LipA::H kann *in vitro* Lipase aktivieren, wird jedoch nicht durch Foldase aktiviert

Das Fusionsprotein scheint nur nach erfolgter Prozessierung, in der die Lipase und die Foldase voneinander getrennt werden, katalytische Aktivität zu erlangen. Um zu überprüfen, ob intaktes, gereinigtes LipA::H-CHis in der Lage ist, LipA *in vitro* zu aktivieren oder der LipA-Anteil durch Zugabe von LipH selbst in eine enzymatisch aktive Konformation überführt werden kann, wurden die gereinigten Proteine in *in vitro* Renaturierungen in äquimolaren Mengen eingesetzt und anschließend der Erfolg der Rückfaltung über Messung der lipolytischen Aktivität verfolgt (Abb. 3.67). Bei diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass der Foldase-Anteil der Fusion in der Lage ist, LipA in eine katalytisch aktive Konformation zu falten, wenngleich mit geringerer Effizienz als gereinigtes LipH selbst. Dagegen konnte nach Inkubation von LipA::H in Rückfaltungspuffer keine lipolytische Aktivität des LipA-Anteils gemessen werden. Somit scheint eine intramolekulare Faltung des lipolytischen Anteils des Fusionsproteins, potentiell durch sterische Gründe bedingt, verhindert, auch wenn anhand des Strukturmodells des LipAH Komplexes aus *P. aeruginosa* ersichtlich war, dass der C-Terminus von LipA in räumlicher Nähe zu dem N-Terminus von LipH lokalisiert ist. Auch durch Zugabe von gereinigter Foldase konnte der LipA-Teil des Fusionsproteins nicht *in vitro* aktiviert werden, so dass es scheint, als wenn der LipH-Anteil von LipA::H inhibierend auf die Faltung und somit auf die Enzymaktivität des LipA-Anteils wirkt, ähnlich den Propeptiden von Proteasen. Demzufolge kann das lipolytische Fragment des Fusionsproteins *in vivo* erst nach erfolgter proteolytischer Trennung der Foldase- und der Lipase-Anteile in seine katalytisch aktive Konformation überführt werden.

4.7 Die Nutzung der Ein-Schritt Affinitätsreinigung für die homogene Präparation noch nicht aktivierter Lipase

Bislang sind die molekularen Ereignisse, die zur Aktivierung der Lipasen durch die Lipase-spezifischen Foldasen führen, nicht verstanden. Durch Rückfaltungsstudien, in denen die Faltung der Lipase aus *B. glumae* mittels CD-Spektroskopie *in vitro* verfolgt wurde, konnte gezeigt werden, dass das Enzym auch schon ohne Zugabe der Foldase einen „nahen nativen“ Zustand einnimmt. Durch Zugabe des Chaperons konnte diese Lipase in die katalytisch aktive Form überführt werden, die jedoch in den CD-Spektren keine Unterschiede zu der inaktiven Form aufwies (El Khattabi *et al.*, 2000). Somit scheinen schon alle Sekundärstrukturelemente spontan und ohne Einwirkung eines Chaperons ausgebildet zu werden, was darauf schließen lässt, dass die Lipase schon weitestgehend fertig gefaltet ist und eher geringe Änderungen der Konformation durch die Foldase vermittelt werden, um die Aktivität des Enzyms herzustellen. Die Tertiärstrukturen von nativ gefalteter Lipase aus den Kulturüberständen von *P. aeruginosa* und *B. glumae* konnten durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden (Lang *et al.*, 1996; Nardini *et al.*, 2000), und es gelang sogar, den Proteinkomplex aus Lipase und Foldase aus *B. glumae* zu kristallisieren und dessen Struktur zu bestimmen (Pauwels *et al.*, 2006). Jedoch liegt die Lipase in all diesen Strukturen schon in enzymatisch aktiver, fertig gefalteter Form vor, so dass die Konformation, die die Lipase vor der Faltung einnimmt, und Aufschlüsse über die durch das Chaperon vermittelte Strukturinformation geben könnte, noch nicht strukturell erfasst ist. In Versuchen, heterolog als „inclusion bodies“ exprimierte Lipase aus *P. aeruginosa* in ihre „nahen nativen“ Konformation zurückzufalten und deren Struktur per NMR-Spektroskopie zu bestimmen, konnten keine auswertbaren Spektren aufgezeichnet werden (Hausmann, 2004). Da nur etwa 18 % des solubilisierten LipA aus „inclusion bodies“ durch Zugabe von LipH katalytische Aktivität erlangt, scheint sich nur ein geringer Anteil der auf diese Weise präparierten Lipase in einem Faltungszustand zu befinden, der von der Foldase gebunden und aktiviert werden kann, so dass die Heterogenität der Konformationszustände des Enzyms eine Strukturaufklärung verhinderte (Hausmann, 2004). Somit scheint es essentiell, die noch nicht fertig gefaltete Lipase mit höherer Homogenität in Hinblick auf den Faltungszustand für die erfolgreiche Strukturaufklärung gewinnen zu können.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode der Ein-Schritt Affinitätsreinigung von heterolog exprimierter Lipase durch die Lipase-spezifische Foldase wird nur solches Enzym gereinigt, welches sich in einer Konformation befindet, die durch das Chaperon erkannt und gebunden wird. Somit sollte diese Reinigung in einem homogenem Lipase-Foldase Komplex resultieren. Allerdings wird die Lipase bei dieser Methode gleichzeitig aktiviert, so dass die Konformation der noch nicht fertig gefalteten Lipase nicht aufgeklärt werden könnte. Deswegen wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar des „Clemens-Schöpf-Instituts für Organische Chemie und Biochemie“ (Darmstadt) eine Mutante des Chaperons LipH gesucht, die in der Lage sein sollte, LipA zwar noch zu binden, aber nicht mehr zu aktivieren. Eine solche Variante ist dazu geeignet, einen einheitlichen Faltungszustand der noch nicht gefalteten Lipase durch die Ein-Schritt Affinitätsreinigung zu gewinnen.

Zu diesem Zweck wurde eine *lipH* Mutantenbibliothek in einem Oberflächendisplaysystem auf die gewünschten Eigenschaften durch „*fluorescence activated cell sorting*“ (FACS) durchmustert (Buest, 2006; Wilhelm *et al.*, 2007). In diesem Screening konnten zwei Varianten des LipH identifiziert werden, die zwar die Lipase banden, aber nicht mehr in der Lage waren, die Faltung des Enzyms zu vermitteln. In beiden der als LipH G1 und LipH G5 bezeichneten Varianten waren große Teile der Foldase deletiert. Die Primärstruktur des LipH G5 wies einen großen fehlenden Bereich im mittleren Teil des Proteins auf, der im Wildtyp-Fall die beiden N- und C-terminal lokalisierten Minidomänen, die wahrscheinlich für die Bindung der Lipase essentiell sind (Pauwels *et al.*, 2006), als sog. „Bügel“ verbindet (Abb. 3.70). Für diesen Bügel wird eine Beteiligung an der Aktivierung der Lipase durch einen Übergang von einer langgestreckten, nicht definierten Sekundärstruktur in eine α -Helix diskutiert, da in *in vitro* Renaturierungen, die durch CD-Spektroskopie analysiert wurden, eine Zunahme von α -helicalen Strukturen nachgewiesen werden konnte (El Khattabi *et al.*, 2000). Da in dieser Proteinvariante zwei potentielle Bindungsdomänen für die Lipase vorhanden waren, war durch Nutzung von LipH G5 für die Ein-Schritt Affinitätsreinigung von LipA im „nahen nativen“ Zustand nicht sichergestellt, dass eine homogene Präparation erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Proteinvarianten, LipH G5N und LipH G5C, erstellt, in der die N- und C-terminalen Minidomänen voneinander getrennt wurden.

In der stark verkürzten Sequenz des LipH G1, welche nur noch 63 Aminosäuren umfasst, konnte nur ein kleiner Bereich von 23 Aminosäuren identifiziert werden, der gewisse Homologie zu Wildtyp LipH zeigte und C-terminal lokalisiert war (Abb. 3.71). Somit waren beide Varianten des Chaperons, die per FACS gefunden wurden, stark verändert. Wie durch Sequenzierung einiger Varianten der *lipH* Mutantenbibliothek ermittelt wurde, lag die durchschnittliche Fehlerrate, die durch die durchgeführte *error-prone* PCR erreicht wurde, bei 2,37 Nukleotidsubstitutionen pro 1000 bp (Buest, 2006). Die aufgetretenen Deletionen großer Bereiche innerhalb der Chaperonvarianten, die die Lipase zwar binden, aber nicht mehr falten, sind jedoch nicht durch Substitution von zwei oder drei Nukleotiden begründet. Stattdessen scheinen diese beiden Varianten innerhalb der Mutagenesebank Teil einer kleinen Population von Genvarianten mit signifikant zahlreicheren Mutationen zu sein, die nur in einem Hochdurchsatzverfahren mit hoher Effizienz wie FACS gefunden werden können.

Die Expression der Chaperonvarianten erfolgt nur im Fall von LipH G5 mit hoher Effizienz

Nach heterologer Expression der LipH Varianten konnte nur im Fall von LipH G5 eine deutliche Bande, die auf eine gute Überexpression zurückzuführen war, in dem Gesamtzellextrakt durch SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 3.72). Bei Expression der anderen Varianten konnte keine zusätzliche Bande nach Induktion detektiert werden, die Rückschluss auf eine erfolgreiche Expression der Foldase-Varianten erlaubt hätte. Durch anschließende Reinigungen der Proteine mittels des N-terminal fusionierten Poly-Histidin Peptids konnten jedoch in allen Fällen Proteine im Eluat nachgewiesen werden, die jedoch teilweise deutlich von der erwarteten elektrophoretischen Mobilität der Foldase-Varianten aufgrund ihres theoretischen Molekulargewichts abwichen, so dass sie bei höherer Masse

detektiert wurden (Abb. 3.73). Es konnten keine überzeugenden Gründe für das elektrophoretische Verhalten der Proteine gefunden werden. Zwar ist für Membranproteine beschrieben, dass sie aufgrund der hydrophoben Domänen durchschnittlich mehr SDS binden als lösliche Proteine, was in einer höheren elektrophoretischen Mobilität resultiert, so dass die Proteine während einer SDS-PAGE bei deutlich geringerem Molekulargewicht nachweisbar sind (Banker & Cotman, 1972), doch es wurde bislang nicht beschrieben, dass eine spezifische Aminosäurezusammensetzung eines Proteins zu einer verringerten elektrophoretischen Mobilität führt. Darüberhinaus konnte keine Auffälligkeit in der Zusammensetzung der Aminosäuren in den LipH Varianten identifiziert werden, die Rückschlüsse auf eine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der Proteine erlaubten (ohne Abb.). Weiterhin sind in der Variante LipH G5 zwar zwei Cysteine vorhanden, die potentiell intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden könnten, wohingegen Wildtyp LipH keine Cysteinreste aufweist, so dass bei unvollständiger Reduktion Teile des Proteins bei höherem Molekulargewicht nachgewiesen werden könnten. Doch gerade diese Variante zeigte keine deutliche Abweichung bezüglich der elektrophoretischen Mobilität während der SDS-PAGE. Es ist bekannt, dass nicht-globuläre Proteine eine geringere elektrophoretische Mobilität aufweisen können als globuläre Proteine gleicher molekularer Masse (Furthmayr & Timpl, 1971). Da jedoch bei der Elektrophorese von Wildtyp LipH, welches ebenfalls keine globuläre Struktur einnimmt, keine Abweichungen von der Mobilität und dem Molekulargewicht beobachtet werden können, erscheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich.

Da in nachfolgenden Experimenten die LipH-Varianten in allen Fällen immunologisch mit einem LipH Antikörper bei den Molekulargewichten nachgewiesen werden konnten, die in den Eluaten auftraten (Abb. 3.75), konnte gezeigt werden, dass die mutagenisierten Foldasen in allen Fällen exprimiert wurden, auch wenn sich ihre elektrophoretische Mobilität teils signifikant von der erwarteten unterschied.

Somit schienen die LipH Varianten G1, G5N und G5C nur mit geringer Ausbeute exprimiert worden zu sein. In Relation zu LipH G5 mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 18,2 kDa sind die übrigen Varianten des Chaperons signifikant kleiner (LipH G5N: 10,8 kDa; LipH G5C: 8,7 kDa; LipH G1: 9,9 kDa). Es ist bekannt, dass die heterologe Expression von Peptiden mit geringem Molekulargewicht in *E. coli* meist in schlechten Ausbeuten resultiert, die in der Instabilität und Degradation der Peptide, die oft ungefaltet und somit anfällig gegen Proteolyse sind, begründet ist (Marston, 1986). Die Ausbeuten der Foldase-Varianten G1, G5N und G5C liegen im µg Bereich pro Liter Kulturvolumen und sind damit so gering, dass mit diesen Proteinen eine Präparation der Lipase durch Ein-Schritt Affinitätsreinigung für die Strukturaufklärung durch Kristallographie nicht aussichtsreich ist. Lediglich die Variante LipH G5 des Chaperons, welche im mg Maßstab exprimiert und gereinigt werden konnte, ist für nachfolgende Experimente in rationalen Mengen verfügbar. Diese Variante besitzt jedoch beide Minidomänen, die wahrscheinlich die Bindung der Lipase vermitteln (Pauwels *et al.*, 2006), so dass bei Nutzung dieser Variante die Homogenität der Präparation aufgrund der unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten des Enzyms an die Foldase nicht gewährleistet ist.

Alle untersuchten Chaperonvarianten binden die Lipase, aktivieren sie jedoch nicht

Trotz der begrenzten Menge der gereinigten Foldase-Varianten, die exprimiert und gereinigt werden konnte, konnte die Fähigkeit der Proteine, die Lipase zu binden, bestätigt werden. In der nach Ein-Schritt Affinitätsreinigung durchgeführten SDS-PAGE konnte die Banden der verschiedenen Varianten des Chaperons und der Lipase im Eluat detektiert und immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 3.74 und 3.75). Zwar wurde auch in allen Waschfraktionen nach Inkubation mit LipA enthaltendem Gesamtzellextrakt Lipase detektiert, diese war jedoch in dem Experiment, in dem Wildtyp LipH verwendet wurde, inaktiv und wurde somit nicht von der Foldase gebunden und in den katalytisch aktiven Zustand überführt. Da bereits gezeigt wurde, dass LipA keinerlei Affinität gegenüber dem Chromatographiematerial aufweist, beruht das Vorhandensein der Lipase in dem Eluat auf der spezifischen Bindung des Enzyms durch sein Chaperon, wie auch in der Elutionsfraktion nach Inkubation mit Wildtyp LipH durch die vorhandene lipolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte.

In den anschließenden Enzymaktivitätstests konnte nachgewiesen werden, dass alle konstruierten Varianten nicht mehr in der Lage sind, die Lipase in den katalytisch aktiven Zustand zu überführen (ohne Abbildung). Somit ist durch die Verwendung dieser die Faltung nicht mehr vermittelnden Varianten der Foldase die Möglichkeit gegeben, die Lipase in ihrem „nahen nativen“ Konformationszustand in homogener Weise präparieren zu können, um die Tertiärstruktur von der Aktivierung durch die Lipase-spezifische Foldase aufzuklären. Diese Daten wären von großer Bedeutung, um ein besseres Verständnis für den molekularen Mechanismus, durch den das Enzym in seine katalytisch aktive Form überführt wird, zu erlangen. Allerdings konnte, wie schon diskutiert, lediglich LipH G5 in ausreichenden Mengen für weiterführende Experimente gewonnen werden. Dieses Protein ist aufgrund des Vorhandenseins der beiden die Lipase bindenden Minidomänen jedoch nicht unbedingt geeignet ist, eine homogene Präparation des Lipase-Lif Komplexes zu erreichen. Eine potentielle Möglichkeit, die gute Expressivität von LipH G5 dennoch für weitere Experimente nutzen zu können, wird im Folgenden vorgestellt. Sequenzanalysen des LipH G5 durch das Peptide-Cutter Programm (Gasteiger *et al.*, 2005) ergaben, dass in dem Bereich, der die N- und C-terminal gelegene Minidomäne miteinander verknüpft, Aminosäuren lokalisiert sind, die eine selektive chemische Spaltung des Proteins in diesem Bereich erlauben. Das Reagenz 2-Nitro-5-Thiocyanobenzoat (NTCB) erlaubt eine effiziente Spaltung von Peptiden an der P1' Position von Cysteinresten durch Cyanylierung der Sulfhydrylgruppe (Degani & Patchornik, 1974). In LipH G5 sind zwei Cysteine genau zwischen den beiden Minidomänen lokalisiert, so dass eine Trennung des N- und C-terminalen Proteinbereichs, die jeweils in der Lage sind, die Lipase zu binden, nach Expression und Reinigung ermöglicht wird (Abb. 4.5).

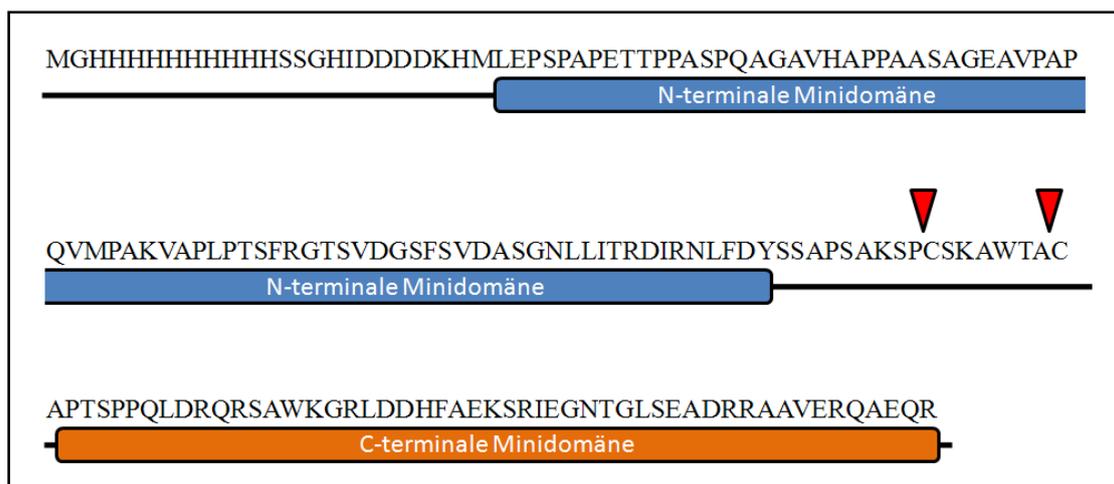


Abb. 4.5: Lokalisation der Minidomänen (blau bzw. orange) und der Spaltstellen durch Behandlung mit 2-Nitro-5-Thiocyanobenzoat (rote Pfeilspitzen) in LipH G5.

Im Anschluss kann die N-terminale Domäne, deren Bindungsfähigkeit bereits durch die Variante LipH G5N gezeigt wurde, über eine IMAC erneut immobilisiert und von dem C-terminalen Rest des Proteins befreit werden, der keine Affinität zum Chromatographiematerial aufweist. Durch dieses Vorgehen wird eine homogene Präparation der N-terminal lokalisierten Bindedomäne mit besserer Ausbeute als bei direkter Expression und Reinigung ermöglicht, die in genügenden Mengen gewonnen werden könnte, um die Ein-Schritt Affinitätschromatographie der Lipase durchzuführen um sie in strukturaufklärenden Verfahren weiter untersuchen zu können.

Die molekularen Ereignisse, die zur Aktivierung der Lipase durch ihre spezifische Foldase führen, sind bis heute noch nicht verstanden. In allen bekannten Tertiärstrukturen von Lipasen wurde das Enzym bereits durch sein Chaperon aktiviert, so dass die Konformation der Lipasen, die sie vor der Faltung einnehmen, bislang nicht bekannt ist. In bisher durchgeführten Experimenten, in denen versucht wurde, die Struktur von heterolog als „inclusion bodies“ exprimierter und in den „nahen nativen“ Zustand überführten Lipase aus *P. aeruginosa* durch NMR-Spektroskopie zu bestimmen, konnten keine auswertbaren Spektren aufgezeichnet werden (Hausmann, 2004). Da während der *in vitro* Aktivierung von solubilisiertem LipA aus „inclusion bodies“ weniger als ein Fünftel des Enzyms katalytische Aktivität erlangt, scheint nur ein geringer Anteil der als „inclusion bodies“ exprimierten Lipase in einer Konformation vorzuliegen, die durch die Foldase erkannt und aktiviert wird. Somit verhinderte die Heterogenität der Probe höchstwahrscheinlich die erfolgreiche Strukturaufklärung des inaktiven Enzyms. Durch eine Ein-Schritt Affinitätsreinigung von heterolog exprimierter, inaktiver Lipase mit den hier vorgestellten LipH Varianten ist eine Möglichkeit gegeben, nur solche Konformationszustände des Enzyms in katalytisch inaktiver Form zu reinigen, die von dem Chaperon erkannt werden. Somit kann durch diese Vorgehensweise die Homogenität der Präparation und damit die Erfolgsaussicht einer anschließenden Aufklärung der Struktur deutlich erhöht werden.

5. Zusammenfassung

Mikrobielle Lipasen finden in der organischen Chemie und in der Biotechnologie durch ihre Stabilität in organischen Lösungsmitteln und aufgrund der Tatsache, dass sie keine Cofaktoren benötigen, breite Verwendungsmöglichkeiten. Sie katalysieren eine Vielfalt von Reaktionen. Zum Beispiel werden sie neben der Verwendung als Detergenzersatz in Waschmitteln dazu eingesetzt, mehrfach ungesättigte Fettsäuren für die Lebensmittelindustrie, Biopolymere, Biodiesel aus Pflanzenölen und enantiomerenreine Grundbausteine für die Pharmaindustrie herzustellen.

Aufgrund der definierten industriellen Reaktionsbedingungen werden häufig Anstrengungen unternommen, die Enzyme hinsichtlich ihrer Stabilität, Aktivität und Enantioselektivität z. B. durch das Prinzip der gerichteten Evolution zu optimieren. Der Sequenzraum, in dem diese für Lipasen durchgeführt werden kann, wenn eine homologe Expression aktiver und extrazellulärer Lipase angestrebt wird, ist jedoch aufgrund der essentiellen Interaktionen mit der Vielzahl akzessorischer Proteine begrenzt. Hingegen gestaltet sich die heterologe Expression von Lipasen durch die Komplexität der zellulären Ereignisse im homologen Wirt kompliziert. Durch das Fehlen der akzessorischen Komponenten aggregieren die Enzyme intrazellulär und bilden inaktive „inclusion bodies“ aus, die eine Renaturierung unter Einsatz der jeweiligen Lipase-spezifischen Foldase nötig machen.

Aus diesen Gründen sollte die Effizienz der Expression und Reinigung aktiver *P. aeruginosa* Lipase nach heterologer Expression gesteigert werden. Durch die Entfernung des für die Translokation über die innere Membran essentiellen Signalpeptids und die Optimierung des verwendeten Mediums konnte die Ausbeute und Reinheit der Lipase LipA erhöht werden.

In diesem Expressionssystem gelang es erstmals, die zweite in *P. aeruginosa* identifizierte Lipase LipC in für eine Charakterisierung des Enzyms geeigneten Mengen zu gewinnen. Die vermutete Interaktion der Lipase-spezifischen Foldase LipH mit LipC konnte erstmalig *in vitro* nachgewiesen werden. Somit stellt LipH das erste Lip-Protein dar, für das beschrieben werden konnte, dass es mehr als eine Lipase in die aktive Konformation überführen kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Lipase, trotz ihrer hohen Homologie zu LipA und ähnlicher Eigenschaften während der *in vitro* Faltung wie Ca^{2+} - und Glycerol-Abhängigkeit, ein breiteres Spektrum an Substraten als LipA akzeptiert, und dass die Kavität, die zum aktiven Zentrum führt, im Strukturmodell ein größeres Volumen aufweist.

Das Signal, welches die Sekretion von Proteinen über die äußere Membran während der Typ-II Sekretion vermittelt, konnte trotz intensiver Forschung aufgrund der großen Diversität der sekretierten Proteine bislang nicht identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Translokation von LipC in das Medium, trotz der hohen Homologie zu LipA, nicht über die „klassische“ Transportmaschinerie durchgeführt wird. Aufgrund der hohen Homologie von LipA und LipC konnten durch vergleichende Analysen Strukturbereiche identifiziert werden, die in LipA und den weiteren aufgeklärten, über diese Transportmaschinerie sekretierten Proteinen, vorhanden sind, aber in LipC Unterschiede aufweisen. Eine Mutagenese dieses putativen Teils des Sekretionssignals in LipA resultierte in einer Veränderung der Effizienz der Sekretion der Enzyms, so dass mit diesen Resten potentiell ein Teil des gemeinsamen Sekretionssignals, welches den Typ-II abhängigen Transport in das Medium vermittelt, identifiziert werden konnte.

Die Lipasevariante 1H8, deren Enantiopräferenz gegen 2-MDA-*p*NP durch gerichtete Evolution von E=1.1 auf E=51 für das (S)-Enantiomer verändert wurde, konnte im homologen Wirt nicht mit zufriedenstellender Ausbeute produziert werden. Als Grund konnte eine Beeinträchtigung der Sekretion ermittelt werden. Durch Untersuchung der Sekretionseffizienz der entsprechenden Einzelvarianten konnten zwei der insgesamt sechs Mutationen als für den Sekretionsdefekt verantwortlich identifiziert werden, die beide nicht in der Enantioselektivität der Lipasevariante involviert sind.

Die hohe Affinität, die Lipasen gegenüber ihren spezifischen Foldasen aufweisen, konnte dazu genutzt werden, eine neue Strategie für die Reinigung heterolog exprimierter Lipase aus „inclusion bodies“ zu etablieren. Dieses Vorgehen vereint die Vorzüge einer Affinitätsreinigung mit der gleichzeitigen *in vitro* Renaturierung und Immobilisierung des Biokatalysators, und ermöglicht erstmals eine einfache Reinigung, die unabhängig von den jeweiligen Eigenschaften der zu produzierenden Lipase ist. Dabei sind die katalytischen Eigenschaften des Enzyms unabhängig von dem Bindungszustand zu seinem Chaperon. So konnte auch LipA 1H8, das bei homologer Expression nicht in großen Mengen produziert werden konnte, durch dieses Verfahren nach heterologer Expression in elektrophoretischer Homogenität mit guter Ausbeute gereinigt werden, wobei es weiterhin die gleiche Enantioselektivität wie LipA 1H8 aus dem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* aufwies. Durch die hohe Affinität und die große Interaktionsfläche von LipA und LipH konnte keine Möglichkeit gefunden werden, die Dissoziation des Proteinkomplexes zu initiieren.

Lip-Proteine weisen starke Analogien zu intramolekularen Chaperonen, sog. Propeptiden, von Proteasen auf. *In silico* Untersuchungen ergaben, dass in allen betrachteten Operons eine translationale Fusion aus Lipase und Foldase durch eine Punktmutation generiert werden kann. Diese Fusion wurde für *lipAH* aus *P. aeruginosa* erstellt und homolog exprimiert, wobei lipolytische Aktivität im Kulturüberstand detektiert werden konnte. Diese beruhte jedoch auf spezifischer Proteolyse, wobei die entstandenen LipA- und LipH-Fragmente des prozessierten Fusionsproteins wie nach Expression von Wildtyp *lipAH* lokalisiert waren. In *E. coli* hingegen trat diese Prozessierung nicht auf. Somit erscheint es weiterhin denkbar, dass die Gene der Lipase und der Foldase früher ein Gen waren und erst im Laufe der Evolution getrennt wurden.

Bislang sind die molekularen Ereignisse, die zur Aktivierung der Lipasen durch ihre spezifischen Foldasen führen, nicht verstanden. Es existieren aufgrund der Heterogenität der Faltungszustände von heterolog exprimierter Lipase keine Strukturdaten des Enzyms, bevor es durch sein Chaperon in den katalytisch aktiven Zustand überführt wurde. Durch eine Mutagenesebank von *lipH* konnten durch ein Oberflächendisplaysystem und anschließendes FACS solche Varianten isoliert werden, die fähig sind, die Lipase zu binden, jedoch nicht mehr zu aktivieren. Durch *in vitro* Interaktionsexperimente dieser Varianten und der Lipase konnte dieser Befund bestätigt werden, so dass durch Nutzung der Varianten in einer Affinitätsreinigung der Lipase die Möglichkeit gegeben ist, nur solche Konformationszustände einer heterolog exprimierten Lipase in Homogenität zu reinigen, die von den Varianten des Chaperons erkannt werden. Dadurch ist es potentiell möglich, den Faltungszustand der Lipase vor Aktivierung durch die Foldase aufzuklären, wodurch wichtige Informationen bezüglich des molekularen Mechanismus der Aktivierung der Lipase durch ihr Chaperon gewonnen werden könnten.

Summary

Due to their stability in organic solvents and the independency of essential cofactors, microbial lipases are extensively used in biotechnological applications and organic chemistry. Because of the diverse reactions they catalyze, they are utilized as substitute for detergents in washing agents and for the production of polyunsaturated fatty acids, biopolymers, biodiesel and enantiomerically pure building blocks for pharmaceuticals.

For industrial applications, the reactions have to be performed under well-defined conditions. As a result, extensive efforts were conducted to adapt the desired biocatalysts concerning stability, activity and enantioselectivity. Directed evolution has emerged as an efficient method to carry out this tailoring of the enzymes. Homologous expression of secreted enzymatically active microbial lipases is a highly complex process involving various accessory proteins, thus restricting sequence space to carry out directed evolution. On the other hand, heterologous expression is hampered due to the complexity mentioned above. As a consequence, lipases tend to aggregate and form inactive inclusion bodies. Therefore, subsequent *in vitro* renaturation of the lipase by the aid of its lipase-specific foldase is inevitable.

On this account, the efficiency of heterologous expression and consecutive purification of active *P. aeruginosa* lipase had to be increased. By construction of an N-terminal truncated lipase variant lacking the signal peptide for the translocation across the inner membrane and optimization of the used media, the yield and purity of heterologously produced lipase was significantly enhanced.

By making use of this expression system, the second lipase LipC identified in *P. aeruginosa* was obtained in sufficient yield for the first time, allowing a characterization of the enzyme and making it accessible for biotechnological applications. The long-proposed interaction of the lipase-specific foldase LipH with LipC was proved in *in vitro* assays, characterizing LipH being the first Lif protein with more than one lipase as a substrate. Despite the similarity of both enzymes in *in vitro* renaturation like Ca^{2+} - and glycerol dependency and the high homology of LipA and LipC, LipC revealed to possess a larger cavity leading to the active site and showed relaxed substrate specificity.

Despite extensive research, the signal mediating type-II dependent protein secretion across the outer membrane has not yet been identified. It was shown that LipC, although being highly homologous to LipA, is not secreted by the “classical” Xcp-apparatus. Comparative structural analyses of the two lipases and other type II secreted proteins revealed surface patches that are significantly different in LipA and LipC. A mutagenesis of this putative secretion signal in LipA influenced indeed secretion of the enzyme. This suggests that these patches, which are shared also by LasB and ToxA, mediate the recognition between the exoproteins and the Xcp type II machinery.

The lipase variant LipA 1H8 was derived from a directed evolution approach that showed increased enantiopreference of $E=51$ compared to $E=1.1$ against the (S)-enantiomer of the substrate 2-MDA-*p*NP. However, this variant could not be produced with satisfying yield in the homologous host. As reason, a secretion defect for this lipase could be observed. Comparative analysis of the secretion of LipA 1H8 and variants carrying the respective single

mutations revealed that just two of the six mutations are responsible for the impairment in secretion, which are not involved in the enhanced enantioselectivity.

The high affinity that lipases exhibit towards their cognate foldases was successfully utilized for establishing a novel purification strategy of heterologously expressed lipase. This approach combines the advantages of one-step affinity purification with simultaneous *in vitro* activation and immobilization of the biocatalyst. The strategy enables to perform a purification independent of the biochemical properties of the lipase to obtain. Although the lipase remains bound to its chaperone in a stable complex, it shows the same catalytic properties compared with active lipase produced in the homologous host. With this approach, it was also possible for the first time to purify lipase 1H8 in high amounts and homogeneity, circumventing the secretion defect in the homologous host. Moreover, this lipase variant exhibited the same enantioselectivity like free LipA 1H8 from *P. aeruginosa* supernatant.

Due to the large interface the lipase and the foldase share and the high affinity of the interaction, no possibility of inducing the dissociation of the LipAH complex could be determined.

Lif-proteins show strong analogies compared with propeptides of proteases that act as intramolecular chaperones. In performed *in silico* analyses, all bicistronic operons coding for a lipase and a foldase could be translationally fused by a single point mutation. Such a fusion was constructed for the *lipAH* operon of *P. aeruginosa*, resulting in lipolytic activity in the supernatant after homologous expression. However, the enzymatic activity observed relied on specifically proteolytically processed fusion protein, with the arisen LipA- and LipH fragments localized correctly as in the wild type case. Because of the fact that this processing was not observed in *E. coli*, a specific mechanism for that task seems to exist in *P. aeruginosa*, suggesting that it is possible that *lipA* and *lipH* were former one gene, being subsequently separated in evolution.

Up to now, the molecular backgrounds that lead to the activation of lipases by their cognate specific foldases are not completely understood. Due to the heterogeneity of the conformational states of heterologously expressed inactive lipase, no structural data of lipases are available that describe their folding state before the Lif-based activation. Therefore, a library of cell-surface displayed *lipH* mutants was screened by FACS in order to identify variants that bind LipA but are not capable of activating it. Interaction assays of the identified foldase variants with LipA confirmed this finding. These Lif-proteins could prove useful for obtaining a homogenous preparation of heterologously produced inactive lipase by affinity purification, possibly allowing to solve the structure of inactive bound lipase before the chaperone binds and folds the lipase. This structure could reveal important information concerning the molecular mechanism of the activation of the lipases by their specific foldases.

6. Literatur

- Aamand, J. L., Hobson, A. H., Buckley, C. M., Joergensen, S. T., Diderichsen, B. & McConnell, D. J. (1994).** Chaperone-mediated activation *in vivo* of a *Pseudomonas cepacia* lipase. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 556-564.
- Aizawa, S. I. (2001).** Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 157-164.
- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K. & Shibatani, T. (1995).** The three genes *lipB*, *lipC*, and *lipD* involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *J. Bacteriol.* **177**, 6381-6389.
- 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. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Anfinsen, C. B. (1973).** Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
- Aragon, V., Rossier, O. & Cianciotto, N. P. (2002).** *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology* **148**, 2223-2231.
- Arakawa, T. & Kita, Y. (2000).** Protection of bovine serum albumin from aggregation by Tween 80. *J. Pharm. Sci.* **89**, 646-651.
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K.-E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343**, 177-183.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. (2001).** Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10037-10041.
- Ball, G., Chapon-Herve, V., Bleves, S., Michel, G. & Bally, M. (1999).** Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 382-388.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2002).** A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **43**, 475-485.
- Balsalobre, C., Silvan, J. M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E. & Wai, S. N. (2006).** Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **59**, 99-112.
- Banerjee, D. & Stableforth, D. (2000).** The treatment of respiratory pseudomonas infection in cystic fibrosis: what drug and which way? *Drugs* **60**, 1053-1064.
- Banker, G. A. & Cotman, C. W. (1972).** Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis. A method to validate molecular weight estimates. *J. Biol. Chem.* **247**, 5856-5861.
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K. M. & McKay, D. B. (1993).** Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.* **12**, 3357-3364.
- Beatty, A. L., Malloy, J. L. & Wright, J. R. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* degrades pulmonary surfactant and increases conversion *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **32**, 128-134.
- Beck, K., Wu, L. F., Brunner, J. & Muller, M. (2000).** Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J.* **19**, 134-143.
- Berglund, P., Holmquist, M., Hedenstroem, E., Hult, K. & Hoegberg, H.-E. (1993).** 2-Methylalkanoic acids resolved by esterification catalysed by Lipase from *Candida rugosa*: Alcohol chain length and enantioselectivity. *Tetrahedron: Asymm.* **4**, 1869-1878.
- Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000).** The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35**, 260-274.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P. & Wandersman, C. (1997).** Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters - A review. *Gene* **192**, 7-11.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.

- Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., de, C. H. & Tommassen, J. (1998).** Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **27**, 209-219.
- Bitter, W. (2003).** Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch. Microbiol.* **179**, 307-314.
- Blow, D. (1990).** Enzymology. More of the catalytic triad. *Nature* **343**, 694-695.
- Bochkareva, E. S., Lissin, N. M. & Girshovich, A. S. (1988).** Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature* **336**, 254-257.
- Bocola, M., Otte, N., Jaeger, K.-E., Reetz, M. T. & Thiel, W. (2004).** Learning from directed evolution: theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *Chembiochem* **5**, 214-223.
- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983).** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 279-313.
- Borgström, B. & Brockmann, H. L. (2004).** *Lipases*. Elsevier, Amsterdam.
- Bouley, J., Condemine, G. & Shevchik, V. E. (2001).** The PDZ domain of OutC and the N-terminal region of OutD determine the secretion specificity of the type II out pathway of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.* **308**, 205-219.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B. & Norskov, L. (1990).** A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-770.
- Braun, P., Tommassen, J. & Filloux, A. (1996).** Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **19**, 297-306.
- Braun, P., de Groot, A., Bitter, W. & Tommassen, J. (1998).** Secretion of elastolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**, 3467-3469.
- Braun, P. & Tommassen, J. (1998).** Function of bacterial propeptides. *Trends Microbiol.* **6**, 6-8.
- Braun, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000).** Activation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase in *Pseudomonas putida* by triggering dissociation of the propeptide-enzyme complex. *Microbiology* **146**, 2565-2572.
- Brenner, S. (1988).** The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* **334**, 528-530.
- Brockerhoff, J. & Jensen, R. G. (1974).** *Lipolytic Enzymes*. New York: Academic Press.
- Brok, R., Van Gelder, P., Winterhalter, M., Ziese, U., Koster, A. J., de Cock, H., Koster, M., Tommassen, J. & Bitter, W. (1999).** The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity. *J. Mol. Biol.* **294**, 1169-1179.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A. & Thim, L. (1991).** A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**, 491-494.
- Buest, S. (2006).** Expression und Oberflächendisplay einer Esterase aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Buettner, C. R., Sorg, I., Cornelis, G. R., Heinz, D. W. & Niemann, H. H. (2008).** Structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion translocator chaperone SycD. *J. Mol. Biol.* **375**, 997-1012.
- Camara, M., Williams, P. & Hardman, A. (2002).** Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 667-676.
- Carballeira, J. D., Krumlinde, P., Bocola, M., Vogel, A., Reetz, M. T. & Backvall, J. E. (2007).** Directed evolution and axial chirality: optimization of the enantioselectivity of *Pseudomonas aeruginosa* lipase towards the kinetic resolution of a racemic allene. *Chem. Commun. (Camb.)*, 1913-1915.
- Carrío, M. M. & Villaverde, A. (2002).** Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* **96**, 3-12.

- Chaloupkova, R., Sykorova, J., Prokop, Z., Jesenska, A., Monincova, M., Pavlova, M., Tsuda, M., Nagata, Y. & Damborsky, J. (2003).** Modification of activity and specificity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 by engineering of its entrance tunnel. *J. Biol. Chem.* **278**, 52622-52628.
- Chang, S. Y., Tsai, P. C., Tseng, C. S. & Liang, P. H. (2001).** Refolding and characterization of a yeast dehydrolipase diphosphate synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **23**, 432-439.
- Chapon-Herve, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A. & Bally, M. (1997).** Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **24**, 1169-1178.
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. & Camacho, C. J. (2004).** ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* **20**, 45-50.
- Conesa, A., Weelink, G., van den Hondel, C. A. & Punt, P. J. (2001).** C-terminal propeptide of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase: an intramolecular chaperone? *FEBS Lett.* **503**, 117-120.
- Cornelis, G. R. & Wolf-Watz, H. (1997).** The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **23**, 861-867.
- Damborsky, J., Petrek, M., Banas, P. & Otyepka, M. (2007).** Identification of tunnels in proteins, nucleic acids, inorganic materials and molecular ensembles. *Biotechnol. J.* **2**, 62-67.
- de Groot, A., Koster, M., Gerard-Vincent, M., Gerritse, G., Lazdunski, A., Tommassen, J. & Filloux, A. (2001).** Exchange of Xcp (Gsp) secretion machineries between *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes*: species specificity unrelated to substrate recognition. *J. Bacteriol.* **183**, 959-967.
- Degani, Y. & Patchornik, A. (1974).** Cyanylation of sulfhydryl groups by 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid. High-yield modification and cleavage of peptides at cysteine residues. *Biochemistry* **13**, 1-11.
- den Blaauwen, T. & Driessen, A. J. (1996).** Sec-dependent preprotein translocation in bacteria. *Arch. Microbiol.* **165**, 1-8.
- Derewenda, Z. S. & Derewenda, U. (1991).** Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem. Cell. Biol.* **69**, 842-851.
- Dittmann, S., Schmid, A., Richter, S., Trulzsch, K., Heesemann, J. & Wilharm, G. (2007).** The *Yersinia enterocolitica* type three secretion chaperone SycO is integrated into the Yop regulatory network and binds to the Yop secretion protein YscM1. *BMC Microbiol.* **7**, 67.
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. & Baker, N. A. (2004).** PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucl. Acids Res.* **32**, 665-667.
- Donate, F., Artigues, A., Iriarte, A. & Martinez-Carrion, M. (1998).** Opposite behavior of two isozymes when refolding in the presence of non-ionic detergents. *Protein Sci.* **7**, 1811-1820.
- Dravis, B. C., Swanson, P. E. & Russell, A. J. (2001).** Haloalkane hydrolysis with an immobilized haloalkane dehalogenase. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 416-423.
- Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F., Wilhelm, S. & Jaeger, K.-E. (2006).** Novel biocatalysts for white biotechnology. *Biotechnol. J.* **1**, 777-786.
- Driessen, A. J., Fekkes, P. & van der Wolk, J. P. (1998).** The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 216-222.
- Duefel, H. (2000).** Untersuchungen zur Regulation der Lipase-Genexpression in *Pseudomonas*. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum.
- Dunn, S. D. (1986).** Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **157**, 144-153.
- Duong, F. & Wickner, W. (1997).** Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* **16**, 2756-2768.

- Economou, A. (1998).** Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol. Microbiol.* **27**, 511-518.
- Eder, J. & Fersht, A. R. (1995).** Pro-sequence-assisted protein folding. *Mol. Microbiol.* **16**, 609-614.
- Eijkman, C. (1901).** Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Cbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr.* **29**, 841-848.
- El Khattabi, M., Ockhuijsen, C., Bitter, W., Jaeger, K.-E. & Tommassen, J. (1999).** Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 770-776.
- El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000).** Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *J. Biol. Chem.* **275**, 26885-26891.
- El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2003).** Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **22**, 329-338.
- Ellis, R. J. (1997).** Do molecular chaperones have to be proteins? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 687-692.
- Ellis, R. J. (1998).** Steric chaperones. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 43-45.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2007).** Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* **2**, 953-971.
- Erdmann, H., Fritsche, K., Kordel, M., Lang, S., Lokotsch, W., Markweg, M., Schneider, M., Syldatk, C. & Wagner, F. (1990).** Ausgewählte Beispiele für die Anwendung von Lipasen in der organisch präparativen Chemie. In *Jahrbuch Biotechnologie*, pp. 353-378. Edited by P. Präve.
- Ernst, R. K., Yi, E. C., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M. & Miller, S. I. (1999).** Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**, 1561-1565.
- Fekkes, P. & Driessen, A. J. (1999).** Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 161-173.
- Filloux, A., Bally, M., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J. & Lazdunski, A. (1990).** Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *EMBO J.* **9**, 4323-4329.
- 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.
- Filloux, A. (2004).** The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 163-179.
- Flickinger, B. D. (2007).** Utilizing biotechnology in producing fats and oils with various nutritional properties. *J. AOAC Int.* **90**, 1465-1469.
- Forster, M. J. (2002).** Molecular modelling in structural biology. *Micron* **33**, 365-384.
- Frenken, L. G., Bos, J. W., Visser, C., Mueller, W., Tommassen, J. & Verrips, C. T. (1993a).** An accessory gene, lipB, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. *Mol. Microbiol.* **9**, 579-589.
- Frenken, L. G., de Groot, A., Tommassen, J. & Verrips, C. T. (1993b).** Role of the lipB gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol. Microbiol.* **9**, 591-599.
- Furthmayr, H. & Timpl, R. (1971).** Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis. *Anal. Biochem.* **41**, 510-516.
- Galan, J. E. (1996).** Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**, 263-271.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005).** Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In *The Proteomic Protocols Handbook*. Edited by J. M. Walker: Humana Press.
- Georgiou, G. & Valax, P. (1996).** Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 190-197.
- Gerritse, G., Hommes, R. W. & Quax, W. J. (1998a).** Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2644-2651.

- Gerritse, G., Ure, R., Bizoullier, F. & Quax, W. J. (1998b).** The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production. *J. Biotechnol.* **64**, 23-38.
- Gill, I. & Valivety, R. (1997).** Polyunsaturated fatty acids, Part I: Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* **15**, 401-409.
- Godfrey, T. & West, S. (1996).** *Industrial Enzymology*. Basingstoke Hampshire, England: Macmillan Press.
- Goetz, F., Verheij, H. M. & Rosenstein, R. (1998).** *Staphylococcal* lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chem. Phys. Lipids* **93**, 15-25.
- Gotor, V. (2002).** Lipases and (*R*)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. *J. Biotechnol.* **96**, 35-42.
- Govan, J. R. & Deretic, V. (1996).** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**, 539-574.
- Gross, R. A., Kalra, B. & Kumar, A. (2001).** Polyester and polycarbonate synthesis by *in vitro* enzyme catalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 655-660.
- Gruetzmacher, S. (2003).** Physiologische Charakterisierung des periplasmatischen, proteolytischen Systems aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997).** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Guo, L., Lim, K. B., Poduje, C. M., Daniel, M., Gunn, J. S., Hackett, M. & Miller, S. I. (1998).** Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**, 189-198.
- Gupta, S. K. & Ghosh, T. C. (2001).** Gene expressivity is the main factor in dictating the codon usage variation among the genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **273**, 63-70.
- Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A. & Murgier, M. (1991).** *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.* **173**, 5290-5297.
- Hacker, S. (2003).** Heterologe Expression der sekretionsrelevanten Proteine XcpP und XphA aus *Pseudomonas aeruginosa* und Untersuchungen zur Lipase/Foldase-Interaktion. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- Hall, T. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hamood, A. N., Olson, J. C., Vincent, T. S. & Iglewski, B. H. (1989).** Regions of toxin A involved in toxin A excretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **171**, 1817-1824.
- Hanada, M., Nishiyama, K. I., Mizushima, S. & Tokuda, H. (1994).** Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecE (p12). *J. Biol. Chem.* **269**, 23625-23631.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hartl, F. U. (1996).** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. (2002).** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-1858.
- Hauser, A. R., Kang, P. J. & Engel, J. N. (1998).** PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol. Microbiol.* **27**, 807-818.
- Hausmann, S. (2004).** Expression und Reinigung von Proteinen des lipolytischen Systems aus *Pseudomonas aeruginosa* für strukturaufklärende Verfahren und Interaktionsexperimente. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- Heckmann, S. (2001).** Einfluss des lipolytischen Systems aus *Pseudomonas aeruginosa* auf die Biofilmbildung. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.

- 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.
- Hendrick, J. P. & Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hobson, A. H., Buckley, C. M., Aamand, J. L., Jorgensen, S. T., Diderichsen, B. & McConnell, D. J. (1993). Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5682-5686.
- Hobson, A. H., Buckley, C. M., Jorgensen, S. T., Diderichsen, B. & McConnell, D. J. (1995). Interaction of the *Pseudomonas cepacia* DSM3959 lipase with its chaperone, LimA. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**, 575-581.
- Holland, I. B., Kenny, B. & Blight, M. (1990). Haemolysin secretion from *E. coli*. *Biochimie* **72**, 131-141.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **43**, 73-102.
- Hong, K. H., Jang, W. H., Choi, K. D. & Yoo, O. J. (1991). Characterization of *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase: cloning and expression of the esterase gene in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2839-2845.
- Houde, A., Kademi, A. & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**, 155-170.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379-433.
- Ihara, F., Okamoto, I., Akao, K., Nihira, T. & Yamada, Y. (1995). Lipase modulator protein (LimL) of *Pseudomonas sp.* strain 109. *J. Bacteriol.* **177**, 1254-1258.
- Iizumi, T., Nakamura, K., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y. & Fukase, T. (1991). Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator genes from *Pseudomonas sp.* KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2349-2357.
- Iso, M., Chen, B. X., Eguchi, M., Kudo, T. & Shrestha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **16**, 53-58.
- Jaeger, K.-E., Kharazmi, A. & Hoiby, N. (1991). Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function *in vitro*. *Microb. Pathog.* **10**, 173-182.
- Jaeger, K.-E., Adrian, F. J., Meyer, H. E., Hancock, R. E. W. & Winkler, U. K. (1992a). Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 315-321.
- Jaeger, K.-E., Kinscher, D. A., Koenig, B. & Koenig, W. (1992b). Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemistry and potential role as a virulence factor In *Cystic fibrosis, Basic and Clinical research*. Edited by N. Høiby & S. S. Pedersen. Amsterdam: Elsevier.
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Koch, H. B., Ferrato, F. & Dijkstra, B. W. (1993). Topological Characterization and Modeling of the 3D Structure of Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **332**, 143-149.
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994a). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 29-63.
- Jaeger, K.-E. (1994b). Extracellular enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* as virulence factors. *Immun. Infekt.* **22**, 177-180.
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Liebeton, K., Haas, D., Reetz, M. T., Philippou, S., Gerritse, G., Ransac, S. & Dijkstra, B. W. (1996). Lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular biology and biotechnological application. In *Molecular Biology of Pseudomonads*, pp. 319-330. Edited by T. Nakazawa. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Schimossek, K., Zonta, A. & Reetz, M. T. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **3**, 3-12.

- Jaeger, K.-E. & Reetz, M. T. (1998).** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 396-403.
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W. & Reetz, M. T. (1999).** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 315-351.
- Jaeger, K.-E., Eggert, T., Eipper, A. & Reetz, M. T. (2001).** Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 519-530.
- Jaeger, K.-E. & Eggert, T. (2002).** Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 390-397.
- Jaeger, K.-E., Reetz, M. T. & Dijkstra, B. W. (2002).** Directed evolution to create enantioselective biocatalysts. *ASM News* **68**, 556-562.
- Joergensen, S., Skov, K. W. & Diderichsen, B. (1991).** Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J. Bacteriol.* **173**, 559-567.
- Joly, J. C. & Swartz, J. R. (1994).** Protein folding activities of *Escherichia coli* protein disulfide isomerase. *Biochemistry* **33**, 4231-4236.
- Jones, D. T. (1999).** Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**, 195-202.
- Jose, J., Jahng, F. & Meyer, T. F. (1995).** Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol. Microbiol.* **18**, 378-380.
- Kenny, B., Haigh, R. & Holland, I. B. (1991).** Analysis of the haemolysin transport process through the secretion from *Escherichia coli* of PCM, CAT or beta-galactosidase fused to the Hly C-terminal signal domain. *Mol. Microbiol.* **5**, 2557-2568.
- Kessler, E. & Safrin, M. (1988).** Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Bacteriol.* **170**, 5241-5247.
- Kim, E. K., Jang, W. H., Ko, J. H., Kang, J. S., Noh, M. J. & Yoo, O. J. (2001).** Lipase and its modulator from *Pseudomonas sp.* strain KFCC 10818: proline-to-glutamine substitution at position 112 induces formation of enzymatically active lipase in the absence of the modulator. *J. Bacteriol.* **183**, 5937-5941.
- Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. (2006).** Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.* **36**, 78-91.
- Klauser, T., Kramer, J., Oetzberger, K., Pohlner, J. & Meyer, T. F. (1993).** Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J. Mol. Biol.* **234**, 579-593.
- Koenig, B., Jaeger, K.-E., Sage, A. E., Vasil, M. L. & Koenig, W. (1996).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect. Immun.* **64**, 3252-3258.
- Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B. & Hellingwerf, K. J. (1993).** Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2329-2342.
- Kok, R. G., van Thor, J. J., Nugteren-Roodzant, I. M., Vosman, B. & Hellingwerf, K. J. (1995).** Characterization of lipase-deficient mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: identification of a periplasmic lipase chaperone essential for the production of extracellular lipase. *J. Bacteriol.* **177**, 3295-3307.
- Koster, M., Bitter, W. & Tommassen, 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, R. M. & Peterson, K. M. (1994).** pBRR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-802.
- Kovalenko, G. A., Perminova, L. V., Terent'eva, T. G. & Plaksin, G. V. (2007).** Catalytic properties of glucoamylase immobilized on synthetic carbon material Sibunit. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **43**, 412-418.

- Krisch, J. (1971).** Carboxylic ester hydrolases. In *The Enzymes Vol. V, third edition*, pp. 43-69. Edited by P. D. Boyer. New York and London Academic Press
- Krzyszlak, J., Gerritse, G., van Merkerk, R., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2008).** Lipase Expression in *Pseudomonas alcaligenes* is under Control of a Two-Component Regulatory System. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1402-1411.
- Kuchner, O. & Arnold, F. H. (1997).** Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* **15**, 523-530.
- Kuehn, M. J., Normark, S. & Hultgren, S. J. (1991).** Immunoglobulin-like PapD chaperone caps and uncaps interactive surfaces of nascently translocated pilus subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10586-10590.
- Kumar, S., Pahujani, S., Ola, R. P., Kanwar, S. S. & Gupta, R. (2006).** Enhanced thermostability of silica-immobilized lipase from *Bacillus coagulans* BTS-3 and synthesis of ethyl propionate. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **53**, 219-231.
- Lachaal, M., Rampal, A. L., Ryu, J., Lee, W., Hah, J. & Jung, C. Y. (2000).** Characterization and partial purification of liver glucose transporter GLUT2. *Biochim. Biophys. Acta* **1466**, 379-389.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lang, D., Hofmann, B., Haalck, L., Hecht, H. J., Spener, F., Schmid, R. D. & Schomburg, D. (1996).** Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* **259**, 704-717.
- Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. & Finch, J. T. (1978).** Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**, 416-420.
- Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M. & Murgier, M. (1990).** Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **72**, 147-156.
- Lazdunski, A., Filloux, A., Michel, G., Foglino, M., Murgier, M., Latifi, A., Chapon, V., Blèves, S. & Bally, M. (1996).** The general secretion pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular mechanisms and regulation. In *Molecular Biology of Pseudomonads*, pp. 427-437. Edited by T. Nakazawa. Washington DC ASM Press
- Lecker, S., Lill, R., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., Bassford, P. J., Jr., Kumamoto, C. A. & Wickner, W. (1989).** Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli*--SecB, trigger factor and GroEL--form soluble complexes with precursor proteins *in vitro*. *EMBO J.* **8**, 2703-2709.
- Lee, C. A. (1997).** Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol.* **5**, 148-156.
- Lesuisse, E., Schanck, K. & Colson, C. (1993).** Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216**, 155-160.
- Létoffé, S., Redeker, V. & Wandersman, C. (1998).** Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol. Microbiol.* **28**, 1223-1234.
- Li, D., He, Q., Cui, Y., Duan, L. & Li, J. (2007).** Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 488-493.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. & Jaeger, K.-E. (2000).** Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.* **7**, 709-718.
- Liebeton, K., Zacharias, A. & Jaeger, K.-E. (2001).** Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.* **183**, 597-603.
- Lindeberg, M., Salmond, G. P. & Collmer, A. (1996).** Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* *out* genes with *Erwinia carotovora* *out* homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. *Mol. Microbiol.* **20**, 175-190.

- Lindeberg, M., Boyd, C. M., Keen, N. T. & Collmer, A. (1998).** External loops at the C terminus of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase C are required for species-specific secretion through the *out* type II pathway. *J. Bacteriol.* **180**, 1431-1437.
- Lindner, P., Guth, B., Wuelfing, C., Krebber, C., Steipe, B., Mueller, F. & Plueckthun, A. (1992).** Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and histidine tails: A comparison of proteins and protocols. In *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* pp. 41-56.
- Liu, P. V. (1979).** Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Clinical manifestations of infection and current therapy*, pp. 63-88. Edited by R. G. Doggert. New York: Academic Press.
- Loveless, B. J. & Saier, M. H., Jr. (1997).** A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol. Membr. Biol.* **14**, 113-123.
- Lu, H. M. & Lory, S. (1996).** A specific targeting domain in mature exotoxin A is required for its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* **15**, 429-436.
- Luche, S., Santoni, V. & Rabilloud, T. (2003).** Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3**, 249-253.
- Ma, J., Campbell, A. & Karlin, S. (2002).** Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J. Bacteriol.* **184**, 5733-5745.
- 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.
- Mann, C. J. & Matthews, C. R. (1993).** Structure and stability of an early folding intermediate of *Escherichia coli* trp aporepressor measured by far-UV stopped-flow circular dichroism and 8-anilino-1-naphthalene sulfonate binding. *Biochemistry* **32**, 5282-5290.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Van den Burg, B., Eijsink, V. G. & Ulbrich-Hofmann, R. (1999).** Probing the unfolding region in a thermolysin-like protease by site-specific immobilization. *Biochemistry* **38**, 8240-8245.
- Marston, F. A. (1986).** The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**, 1-12.
- Martinez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D. N. (1998).** Identification of an additional member of the secretin superfamily of proteins in *Pseudomonas aeruginosa* that is able to function in type II protein secretion. *Mol. Microbiol.* **28**, 1235-1246.
- Martinez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D. N. (1999).** LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. *Mol. Microbiol.* **34**, 317-326.
- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H. & Kondo, A. (2001).** Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 515-520.
- McKay, D. B., Thayer, M. M., Flaherty, K. M., Pley, H. & Benvegnu, D. (1992).** Crystallographic structures of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Matrix Suppl.* **1**, 112-115.
- McVay, C. S. & Hamood, A. N. (1995).** Toxin A secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of the first 30 amino acids of the mature toxin. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 515-525.
- Merril, C. R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods Enzymol.* **182**, 477-488.
- Michel, G. P., Durand, E. & Filloux, A. (2007).** XphA/XqhA, a novel GspCD subunit for type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**, 3776-3783.
- Missiakas, D. & Raina, S. (1997).** Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* **179**, 2465-2471.
- Mogensen, J. E., Tapadar, D., Schmidt, M. A. & Otzen, D. E. (2005).** Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *Biochemistry* **44**, 4533-4545.
- Mullen, T., Markey, K., Murphy, P., McClean, S. & Callaghan, M. (2007).** Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 869-877.

- Myers, E. W. & Miller, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Comput. Appl. Biosci.* **4**, 11-17.
- Nardini, M. & Dijkstra, B. W. (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 732-737.
- Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K.-E. & Dijkstra, B. W. (2000). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275**, 31219-31225.
- Neyt, C. & Cornelis, G. R. (1999). Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol. Microbiol.* **31**, 143-156.
- Nguyen, L., Paulsen, I. T., Tchieu, J., Hueck, C. J. & Saier, M. H., Jr. (2000). Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 125-144.
- Nishijyo, T., Haas, D. & Itoh, Y. (2001). The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **40**, 917-931.
- Noble, M. E., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. & Frenken, L. G. (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**, 123-128.
- Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**, 205-217.
- O'Toole, P. W., Austin, J. W. & Trust, T. J. (1994). Identification and molecular characterization of a major ring-forming surface protein from the gastric pathogen *Helicobacter mustelae*. *Mol. Microbiol.* **11**, 349-361.
- 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. USA* **99**, 8312-8317.
- Ogierman, M. A., Fallarino, A., Riess, T., Williams, S. G., Attridge, S. R. & Manning, P. A. (1997). Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon *lipAB* and a protease gene downstream of the *hly* region. *J. Bacteriol.* **179**, 7072-7080.
- Oka, T., Udagawa, K. & Kinoshita, S. (1968). Unbalanced growth death due to depletion of Mn²⁺ in *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Bacteriol.* **96**, 1760-1767.
- Okamoto, K., Nomura, T., Hamada, M., Fukuda, T., Noguchi, Y. & Fujii, Y. (2000). Production of serine protease of *Aeromonas sobria* is controlled by the protein encoded by the gene lying adjacent to the 3' end of the protease gene. *Microbiol. Immunol.* **44**, 787-798.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I. & Schrag, J. (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. *EMBO J.* **23**, 1257-1266.
- Paetzel, M., Strynadka, N. C., Tschantz, W. R., Casareno, R., Bullinger, P. R. & Dalbey, R. E. (1997). Use of site-directed chemical modification to study an essential lysine in *Escherichia coli* leader peptidase. *J. Biol. Chem.* **272**, 9994-10003.
- Pan, J. C., Wang, J. S., Cheng, Y., Yu, Z., Rao, X. M. & Zhou, H. M. (2005). The role of detergent in refolding of GdnHCl-denatured arginine kinase from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: the solubilization of aggregate and refolding in detergent solutions. *Biochem. Cell. Biol.* **83**, 140-146.
- Panova, A. A. & Kaplan, D. L. (2003). Mechanistic limitations in the synthesis of polyesters by lipase-catalyzed ring-opening polymerization. *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 103-113.
- Parsot, C. & Sansonetti, P. J. (1996). Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **209**, 25-42.

- Patel, R. N. (2001).** Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 587-604.
- Patel, R. N. (2006).** Biocatalysis: synthesis of chiral intermediates for drugs. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **9**, 741-764.
- Pauwels, K., Loris, R., Vandenbussche, G., Ruyschaert, J. M., Wyns, L. & Van Gelder, P. (2005).** Crystallization and crystal manipulation of a steric chaperone in complex with its lipase substrate. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 791-795.
- Pauwels, K., Lustig, A., Wyns, L., Tommassen, J., Savvides, S. N. & Van Gelder, P. (2006).** Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 374-375.
- Pauwels, K., Van Molle, I., Tommassen, J. & Van Gelder, P. (2007).** Chaperoning Anfinsen: the steric foldases. *Mol. Microbiol.* **64**, 917-922.
- 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.
- Pedrotta, V. & Witholt, B. (1999).** Isolation and characterization of the cis-trans-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *J. Bacteriol.* **181**, 3256-3261.
- Peitsch, M. C. (1996).** ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 274-279.
- Pelletier, I. & Altenbuchner, J. (1995).** A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* **141**, 459-468.
- Peterson, G. L. (1977).** A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004).** UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T. F. (1987).** Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**, 458-462.
- Pugsley, A. P. (1992).** Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 12058-12062.
- Pugsley, A. P. (1993).** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 50-108.
- Pugsley, A. P., Francetic, O., Possot, O. M., Sauvonnnet, N. & Hardie, K. R. (1997).** Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria--a review. *Gene* **192**, 13-19.
- Py, B., Chippaux, M. & Barras, F. (1993).** Mutagenesis of cellulase EGZ for studying the general protein secretory pathway in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **7**, 785-793.
- Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C. & Schmid, R. D. (1999).** High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid *in vitro* refolding. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 787-794.
- Ramesh, V. M. & Webber, A. N. (2004).** Rapid isolation and purification of photosystem I chlorophyll-binding protein from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods Mol. Biol.* **274**, 19-28.
- Rariy, R. V. & Klibanov, A. M. (1997).** Correct protein folding in glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13520-13523.
- Reetz, M. T., Wilensek, S., Zha, D. & Jaeger, K.-E. (2001).** Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 3589-3591.
- Reetz, M. T. & Jaeger, K.-E. (2002).** Directed evolution as a means to create enantioselective enzymes for use in organic chemistry. In *Directed molecular evolution of proteins*, pp. 245-279. Edited by S. Brakman & K. Johnson. Weinheim: Wiley-VCH.

- Reetz, M. T., Carballeira, J. D., Peyralans, J., Hobenreich, H., Maichele, A. & Vogel, A. (2006a).** Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by CASTing. *Chemistry* **12**, 6031-6038.
- Reetz, M. T., Carballeira, J. D. & Vogel, A. (2006b).** Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 7745-7751.
- Reetz, M. T. & Carballeira, J. D. (2007).** Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.* **2**, 891-903.
- Reetz, M. T., Puls, M., Carballeira, J. D., Vogel, A., Jaeger, K.-E., Eggert, T., Thiel, W., Bocola, M. & Otte, N. (2007).** Learning from directed evolution: Further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *Chembiochem* **8**, 106-112.
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2000).** Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**, 1023-1032.
- Rosenau, F. (2001).** Überexpression der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* und physiologische Charakterisierung der Foldasefunktion. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum.
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2003).** Overexpression of biocatalysts in *Pseudomonas*. In *Enzyme Functionality: Design, Engineering, and Screening*. Edited by A. Svendsen. New York, USA: Marcel Dekker.
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2004).** *Overexpression and Secretion of Pseudomonas Lipases*. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishes.
- Rosenau, F., Tommassen, J. & Jaeger, K.-E. (2004).** Lipase-specific foldases. *Chembiochem* **5**, 152-161.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000).** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**, 365-386.
- Russel, M. (1998).** Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* **279**, 485-499.
- Sabikhi, L. (2007).** Designer milk. *Adv. Food Nutr. Res.* **53**, 161-198.
- Sadtler, S. (2007).** Die Rolle des Chaperons LipH bei der Produktion aktiver Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*: Struktur- und Funktionsuntersuchung mit Methoden der "Directed Evolution". Dissertation. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Saeed, H. M., Zaghloul, T. I., Khalil, A. I. & Abdelbaeth, M. T. (2005).** Purification and characterization of two extracellular lipases from *Pseudomonas aeruginosa* Ps-x. *Pol. J. Microbiol.* **54**, 233-240.
- Saier, M. H., Jr. (2006).** Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J. Membr. Biol.* **214**, 75-90.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salameh, M. & Wiegel, J. (2007).** Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Adv. Appl. Microbiol.* **61**, 253-283.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: A laboratory manual*.
- Sandkvist, M. (2001).** Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **40**, 271-283.
- Sarda, L. & Desnuelle, P. (1958).** Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 513-521.
- Saucier, A. C., Mariotti, S., Anderson, S. A. & Purich, D. L. (1985).** Ciliary dynein conformational changes as evidenced by the extrinsic fluorescent probe 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. *Biochemistry* **24**, 7581-7585.
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B. & Davidson, W. S. (2003).** Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods* **52**, 1-18.
- Schaegger, H. (2006).** Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16-22.

- Schmidt, M., Hasenpusch, D., Kahler, M., Kirchner, U., Wiggenhorn, K., Langel, W. & Bornscheuer, U. T. (2006). Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block. *Chembiochem* **7**, 805-809.
- Schmidt, R., Markart, P., Ruppert, C., Wygrecka, M., Kuchenbuch, T., Walmrath, D., Seeger, W. & Guenther, A. (2007). Time-dependent changes in pulmonary surfactant function and composition in acute respiratory distress syndrome due to pneumonia or aspiration. *Respir. Res.* **8**, 55.
- Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R. D. & Pleiss, J. (2002). Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein Eng.* **15**, 595-601.
- Schneidinger, B. (1997). Überexpression und transkriptionelle Regulation des Lipaseoperons von *Pseudomonas aeruginosa* und funktionelle Charakterisierung der Lipase-spezifischen Foldase LipH. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum.
- Schrag, J. D., Li, Y. G., Wu, S. & Cygler, M. (1991). Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**, 761-764.
- Scott, W. R. P., Huenenberger, P. H., Tironi, I. G., Mark, A. E., Billeter, S. R., Fennen, J., Torda, A. E., Huber, T., Krueger, P. & van Gunsteren, W. F. (1999). The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A* **103**, 3596-3607.
- Scotti, P. A., Valent, Q. A., Manting, E. H., Urbanus, M. L., Driessen, A. J., Oudega, B. & Luirink, J. (1999). SecA is not required for signal recognition particle-mediated targeting and initial membrane insertion of a nascent inner membrane protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 29883-29888.
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Kutysenko, V. P., Ebert, B., Blanck, J. & Ptitsyn, O. B. (1987). Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B. *FEBS Lett.* **224**, 9-13.
- Sermet-Gaudelus, I., Ferroni, A., Vrielinck, S., Lebourgeois, M., Chedevergne, F. & Lenoir, G. (2006). Anti *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic therapy in cystic fibrosis (exclusion of macrolides). *Arch. Pediatr.* **13**, S30-43.
- Shah, S., Solanki, K. & Gupta, M. N. (2007). Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes. *Chem. Cent. J.* **1**, 30.
- Shewale, S. D. & Pandit, A. B. (2007). Hydrolysis of soluble starch using *Bacillus licheniformis* alpha-amylase immobilized on superporous CELBEADS. *Carbohydr. Res.* **342**, 997-1008.
- Shibata, H., Kato, H. & Oda, J. (1998a). Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB. *J. Biochem.* **123**, 136-141.
- Shibata, H., Kato, H. & Oda, J. (1998b). Molecular properties and activity of amino-terminal truncated forms of lipase activator protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 354-357.
- Shibata, H., Kato, H. & Oda, J. (1998c). Random mutagenesis on the *Pseudomonas* lipase activator protein, LipB: exploring amino acid residues required for its function. *Protein Eng.* **11**, 467-472.
- Shinde, U., Li, Y. & Inouye, M. (1995). Propeptide mediated protein folding: Intramolecular chaperones. In *Intramolecular chaperones and protein folding*, pp. 1-9. Edited by U. Shinde & M. Inouye: R.G. Landes Company.
- Shinde, U. & Inouye, M. (1995a). Folding mediated by an intramolecular chaperone: autoprocessing pathway of the precursor resolved via a substrate assisted catalysis mechanism. *J. Mol. Biol.* **247**, 390-395.
- Shinde, U. & Inouye, M. (1995b). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: characterization of the structural changes in pro-subtilisin E coincident with autoprocessing. *J. Mol. Biol.* **252**, 25-30.
- Shinde, U. P., Liu, J. J. & Inouye, M. (1997). Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature* **389**, 520-522.
- Sirangelo, I., Bismuto, E., Tavassi, S. & Irace, G. (1998). Apomyoglobin folding intermediates characterized by the hydrophobic fluorescent probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 69-77.

- Sloma, A., Rufo, G. A., Jr., Rudolph, C. F., Sullivan, B. J., Theriault, K. A. & Pero, J. (1990). Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: purification of the protein and cloning of the gene. *J. Bacteriol.* **172**, 5520-5521.
- Soberon-Chavez, G. & Palmeros, B. (1994). *Pseudomonas* lipases: molecular genetics and potential industrial applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 95-105.
- St Geme, J. W., III & Cutter, D. (2000). The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J. Bacteriol.* **182**, 6005-6013.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. & Napoli, C. (1987). Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* **169**, 5789-5794.
- Steinhauer, J., Agha, R., Pham, T., Varga, A. W. & Goldberg, M. B. (1999). The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Mol. Microbiol.* **32**, 367-377.
- Stockel, J., Doring, K., Malotka, J., Jahnig, F. & Dornmair, K. (1997). Pathway of detergent-mediated and peptide ligand-mediated refolding of heterodimeric class II major histocompatibility complex (MHC) molecules. *Eur. J. Biochem.* **248**, 684-691.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L. & other authors (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Stroud, R. M. & Walter, P. (1999). Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 754-759.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Suhr, M., Benz, I. & Schmidt, M. A. (1996). Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA_c and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* **22**, 31-42.
- Sullivan, E. R., Leahy, J. G. & Colwell, R. R. (1999). Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, and redefinition of a proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family. *Gene* **230**, 277-286.
- Sunitha, K., Chung, B. H., Jang, K. H., Song, K. B., Kim, C. H. & Rhee, S. K. (2000). Refolding and purification of *Zymomonas mobilis* levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **18**, 388-393.
- Takagi, H. & Takahashi, M. (2003). A new approach for alteration of protease functions: pro-sequence engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 1-9.
- Tamm, L. K., Arora, A. & Kleinschmidt, J. H. (2001). Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 32399-32402.
- Tanamoto, K. & Azumi, S. (2000). *Salmonella*-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells. *J. Immunol.* **164**, 3149-3156.
- Tandon, S. & Horowitz, P. (1986). Detergent-assisted refolding of guanidinium chloride-denatured rhodanese. The effect of lauryl maltoside. *J. Biol. Chem.* **261**, 15615-15618.
- Tandon, S. & Horowitz, P. (1988). The effects of lauryl maltoside on the reactivation of several enzymes after treatment with guanidinium chloride. *Biochim. Biophys. Acta* **955**, 19-25.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R. & Conway, T. (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J. Bacteriol.* **181**, 6425-6440.
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **9**, 73-90.
- Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P. & Bukau, B. (2001). Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol. Microbiol.* **40**, 397-413.

- Turner, L. R., Lara, J. C., Nunn, D. N. & Lory, S. (1993). Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**, 4962-4969.
- Tyndall, J. D., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L. A., Taylor, P. & Walkinshaw, M. D. (2002). Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J. Mol. Biol.* **323**, 859-869.
- Upton, C. & Buckley, J. T. (1995). A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 178-179.
- Urban, A. (2000). Die Rolle der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen DsbA und DsbC bei der Proteinsekretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum.
- Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T. & Jaeger, K.-E. (2001). DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 587-596.
- Valent, Q. A., Scotti, P. A., High, S., de Gier, J. W., von, H. G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B. & Luirink, J. (1998). The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J.* **17**, 2504-2512.
- van Geest, M. & Lolkema, J. S. (2000). Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 13-33.
- van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.-E. & Dijkstra, B. W. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* **309**, 215-226.
- van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. & Cambillau, C. (1993). Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **362**, 814-820.
- Verger, R. (1997). „interfacial activation“ of lipases: facts and artifacts. *Tibtech.* **15**, 32-38.
- Villaverde, A. & Carrio, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1385-1395.
- Voigt, C. A., Kauffman, S. & Wang, Z. G. (2000). Rational evolutionary design: the theory of in vitro protein evolution. *Adv. Protein Chem.* **55**, 79-160.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J. Membr. Biol.* **115**, 195-201.
- Voulhoux, R., Taupiac, M. P., Czjzek, M., Beaumelle, B. & Filloux, A. (2000). Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**, 4051-4058.
- 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.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52-56, 29.
- Walter, P. (2003). Heterologe Expression und präparative Reinigung der lipasespezifischen Foldase aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Warren, S. M. & Young, G. M. (2005). An amino-terminal secretion signal is required for YplA export by the Ysa, Ysc, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *J. Bacteriol.* **187**, 6075-6083.
- Watson, A. A., Alm, R. A. & Mattick, J. S. (1996). Construction of improved vectors for protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **172**, 163-164.
- Watson, M. E. (1984). Compilation of published signal sequences. *Nucl. Acids Res.* **12**, 5145-5164.
- Wattiau, P. & Cornelis, G. R. (1993). SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* **8**, 123-131.
- Wedekind, J. E., Trame, C. B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T. M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R. J. & McKay, D. B. (2001). Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *J. Mol. Biol.* **314**, 823-837.

- Wild, J., Altman, E., Yura, T. & Gross, C. A. (1992). DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **6**, 1165-1172.
- Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K.-E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 6977-6986.
- Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H. & Jaeger, K.-E. (2007). Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem* **8**, 55-60.
- Wilson, K. J. & Yuan, P. M. (1989). Protein and peptide purification. In *Protein sequencing, a practical approach*. Edited by J. B. C. Findley & M. J. Geisow. Oxford: IRL Press.
- Windgassen, M. (2000). Proteinsekretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Untersuchung der Rolle periplasmatischer Proteasen durch Insertionsmutagenese. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- Winkler, U., Wingender, J. & Jaeger, K.-E. (1985). Infections of the respiratory tract with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Klin. Wochenschr.* **63**, 490-498.
- Winkler, U. K. & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **138**, 663-670.
- Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., Heerikhuizen, H. V. & Leij, L. D. (1976). An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **74**, 160-170.
- Wodak, S. J. & Janin, J. (2002). Structural basis of macromolecular recognition. *Adv. Protein Chem.* **61**, 9-73.
- Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. & Winkler, U. K. (1992). Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1325-1335.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids Res.* **17**, 3469-3478.
- Yahr, T. L., Goranson, J. & Frank, D. W. (1996). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol. Microbiol.* **22**, 991-1003.
- Yahr, T. L., Mende-Mueller, L. M., Friese, M. B. & Frank, D. W. (1997). Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* **179**, 7165-7168.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13899-13904.
- Yang, J., Kobayashi, K., Iwasaki, Y., Nakano, H. & Yamane, T. (2000). *In vitro* analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas sp.* strain KWI-56 lipase. *J. Bacteriol.* **182**, 295-302.
- Yuan, L., Kurek, I., English, J. & Keenan, R. (2005). Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 373-392.
- Zha, D., Wilensek, S., Hermes, M., Jaeger, K.-E. & Reetz, M. T. (2001). Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chem. Commun.* **2001**, 2664-2665.
- Zhang, Y., Li, J., Han, D., Zhang, H., Liu, P. & Li, C. (2008). An efficient resolution of racemic secondary alcohols on magnetically separable biocatalyst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 609-613.
- Zhao, X., El-Zahab, B., Brosnahan, R., Perry, J. & Wang, P. (2007). An organic soluble lipase for water-free synthesis of biodiesel. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **143**, 236-243.
- Zou, Q., Habermann-Rottinghaus, S. M. & Murphy, K. P. (1998). Urea effects on protein stability: hydrogen bonding and the hydrophobic effect. *Proteins* **31**, 107-115.

7. Anhang

Tab. 7.1: Übersicht über relevante Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine und ihrer Varianten

Bezeichnung	Molekulargewicht [kDa]	Beschreibung
LipA	32,7	Wildtyp-Lipase
LipA-SS	30,2	LipA ohne Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport
LipA 1H8	32,7	Enantioselektive LipA Variante
LipA 1H8-SS	30,2	LipA 1H8 ohne Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport
LipC	32,3	Wildtyp Lipase
LipC-SS	29,8	LipC ohne Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport
LipH	37,5	Wildtyp Lipase-spezifische Foldase
LipH _T -NHis	38	N-terminal verkürzte LipH Variante ohne Membrananker und mit N-terminal lokalisiertem Poly-Histidin Peptid
LipH _T -CHis	36,3	N-terminal verkürzte LipH Variante ohne Membrananker und mit C-terminal lokalisiertem Poly-Histidin Peptid
LipA::H	72,1	LipA-LipH Fusionsprotein
LipA::HCHis	73	LipA-LipH Fusionsprotein mit C-terminal lokalisiertem Poly-Histidin Peptid
LA-1	11,2	N-terminales Drittel von LipA
LipH G1-NHis	9,9	Verkürzte LipH Variante ohne Chaperonaktivität mit N-terminal lokalisiertem Poly-Histidin Peptid
LipH G5-NHis	18,2	Verkürzte LipH Variante ohne Chaperonaktivität mit N-terminal lokalisiertem Poly-Histidin Peptid
LipH G5N-NHis	10,8	N-terminaler Bereich von LipH G5 mit N-terminal lokalisiertem Poly-Histidin Peptid
LipH G5C-NHis	8,7	C-terminaler Bereich von LipH G5 mit N-terminal lokalisiertem Poly-Histidin Peptid

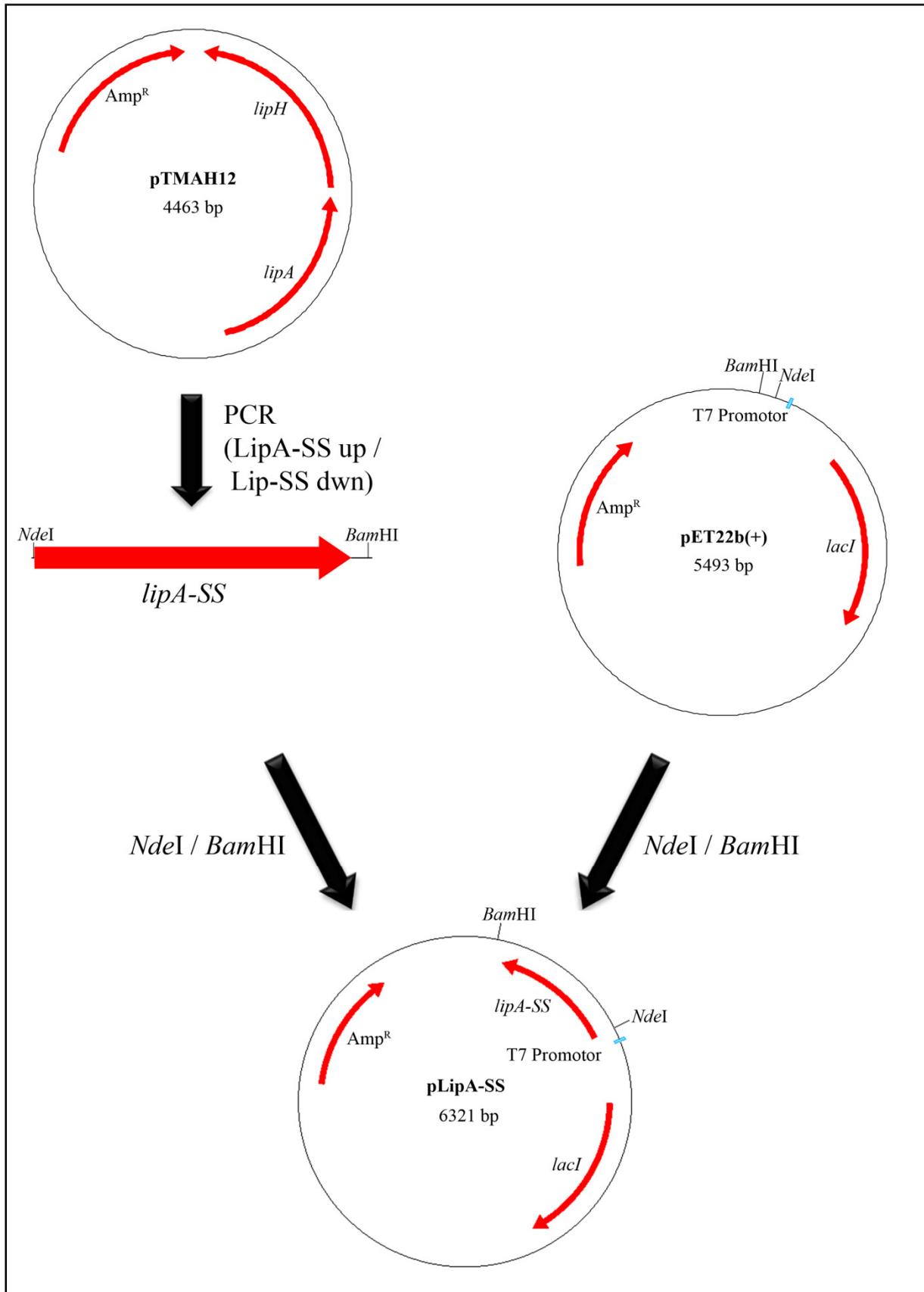


Abb. 7.1: Klonierung von LipA ohne Signalsequenz in pLipA-SS. Das für die Lipase codierende Gen wurde in seiner verkürzten Form ohne den Bereich, der für die N-terminale Signalsequenz für die Translokation über die innere Membran codiert, mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden das PCR-Fragment und der Vektor pET22b mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert und ligiert.

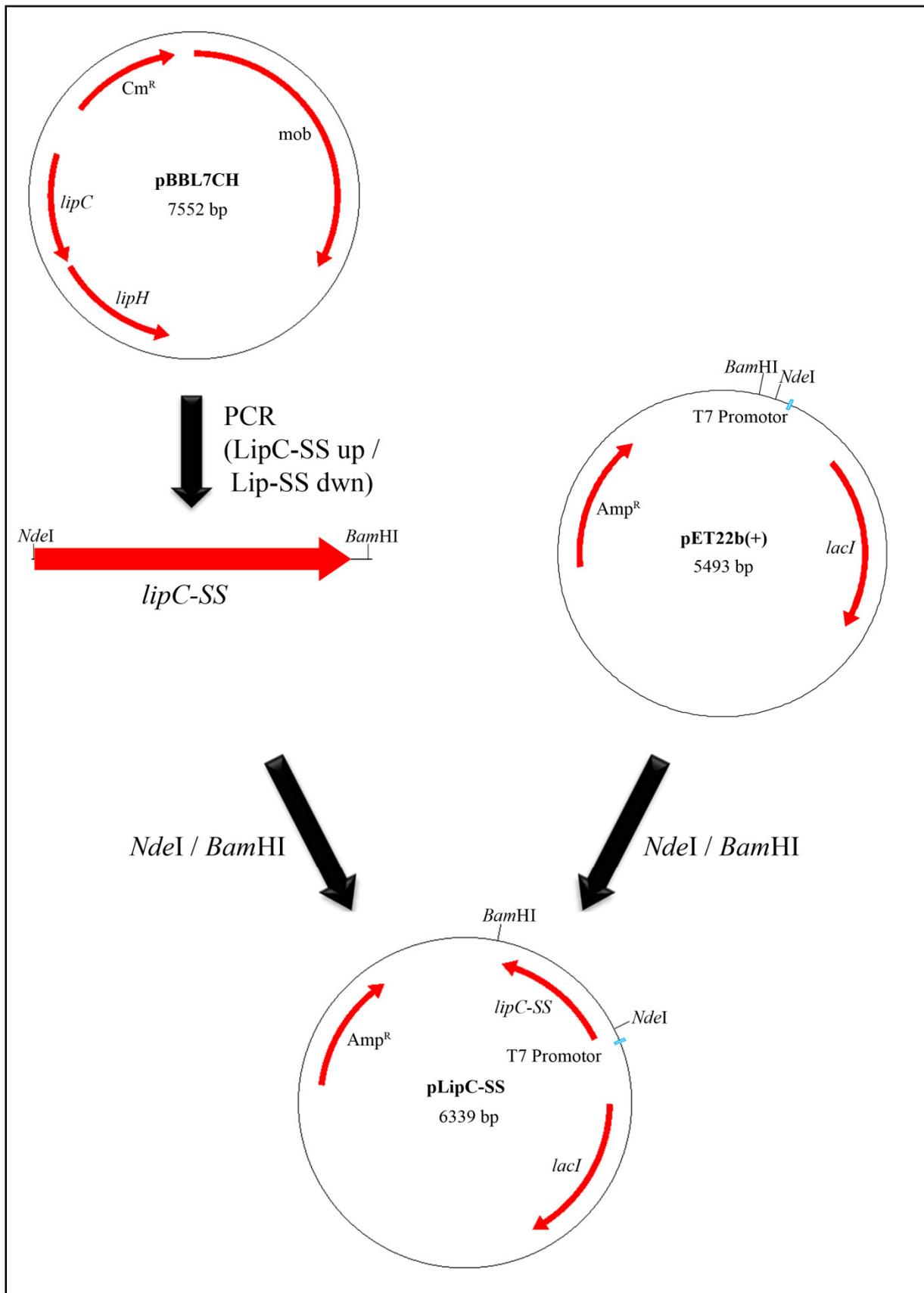


Abb. 7.2: Schema der Konstruktion von pLipC-SS. Das für das Enzym codierende Gen wurde ohne den Bereich, welcher die Erkennungssequenz für den Sec-Apparat beinhaltet, durch PCR amplifiziert. Durch Restriktion mit den Endonukleasen *NdeI* und *BamHI* und anschließende Ligation des PCR-Fragments und des Plasmids pET22b wurde das Plasmid pLipC-SS generiert.

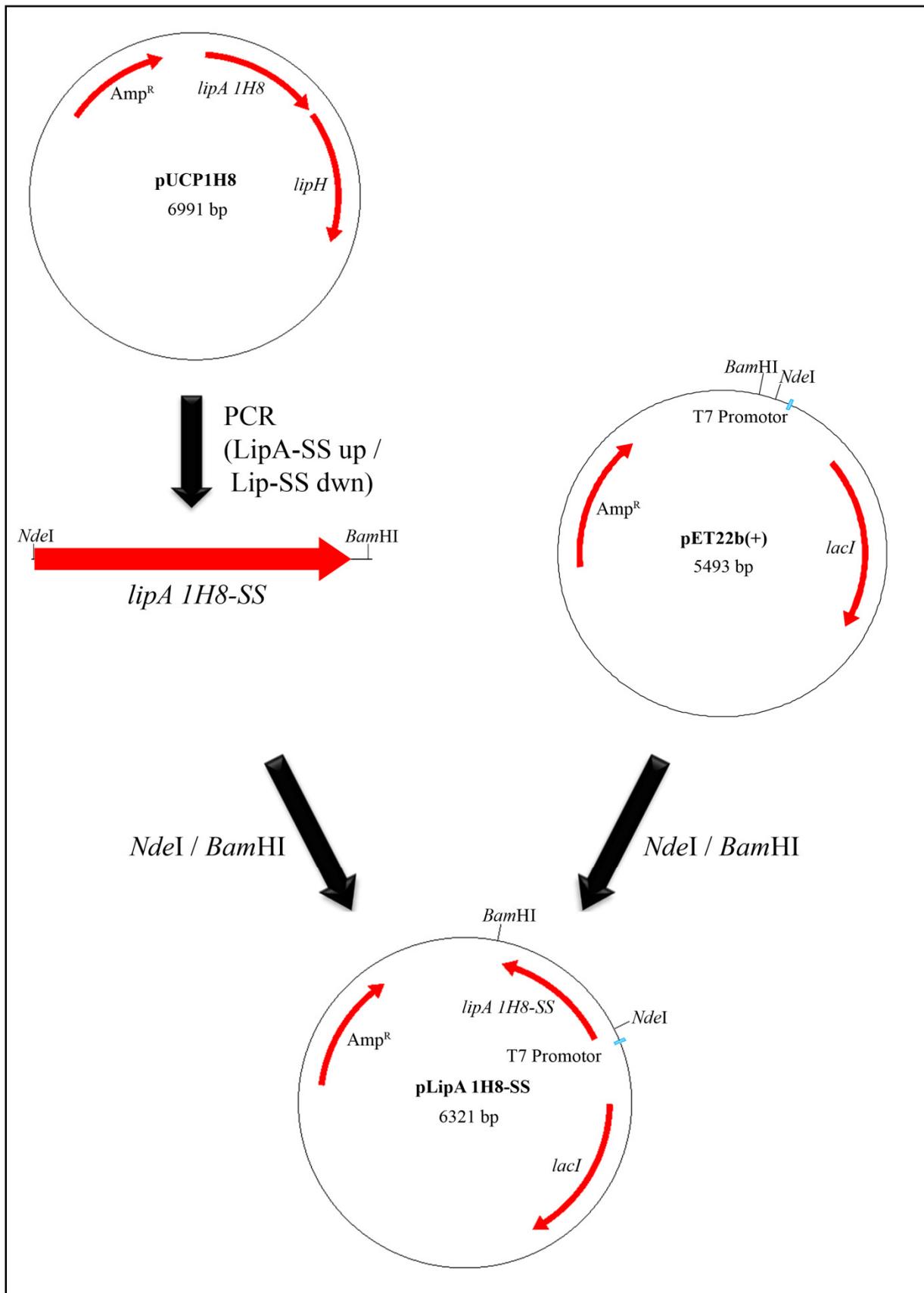


Abb. 7.3: Klonierungsschema der enantioselektiven Lipasevariante LipA 1H8 ohne ihre Signalsequenz in pLipA 1H8-SS. Das Gen *lipA 1H8* wurde analog zu *lipA* um den Bereich, der die Signalsequenz für die Translokation über die innere Membran durch den Sec-Apparat beinhaltet, per PCR verkürzt. Anschließend wurde durch Restriktion mit *NdeI* und *BamHI* und nachfolgende Ligation des Amplifikats und des Plasmids pET22b der Vektor pLipA 1H8-SS konstruiert.

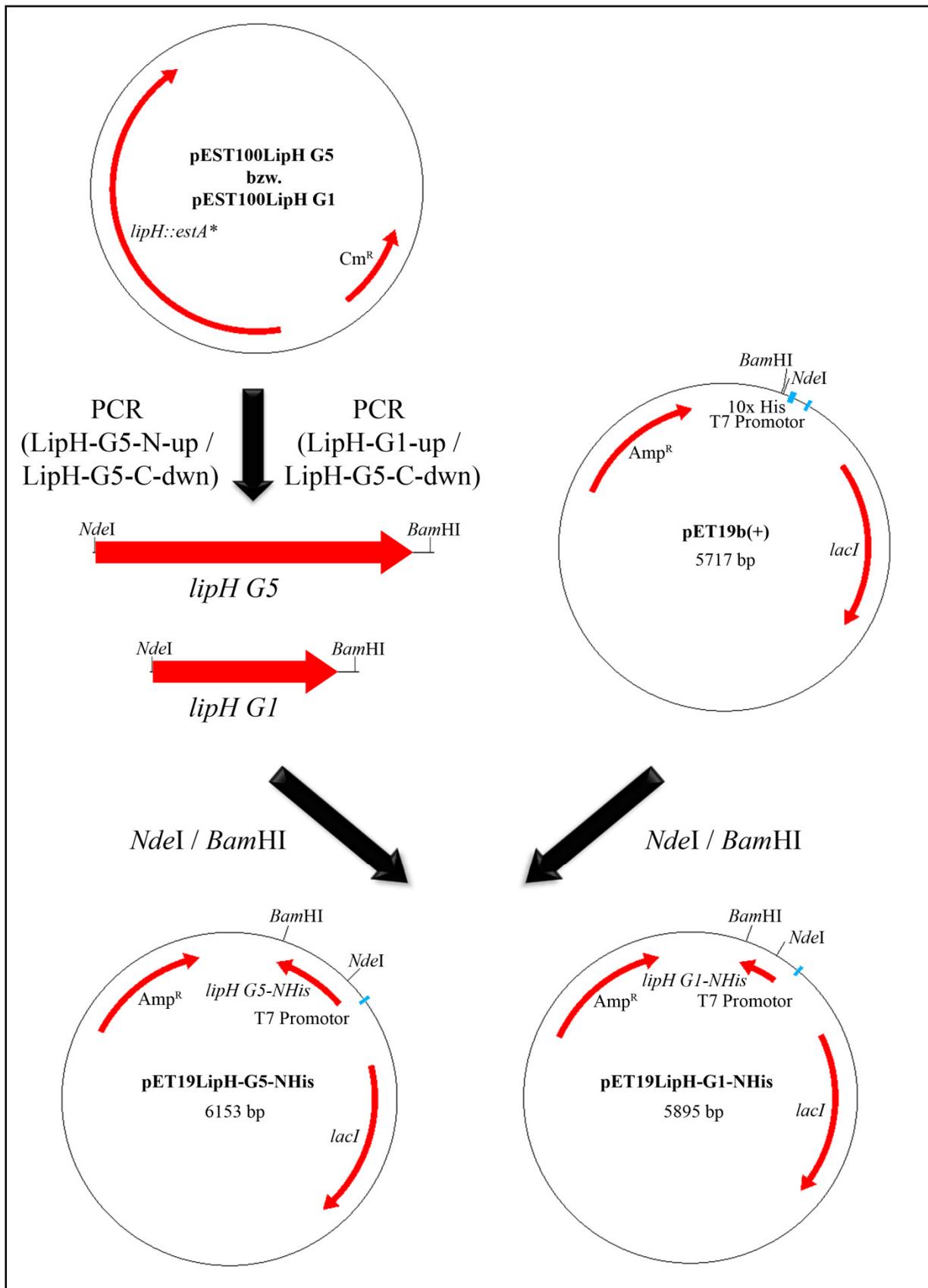


Abb. 7.4: Schema der Klonierung der Foldasevarianten LipH G5 und LipH G1 mit N-terminalem Poly-Histidin-Peptid. Die Varianten des *lipH* wurden per PCR mit den angegebenen Oligonukleotiden amplifiziert, um ein Stop-Codon an das 3' Ende des LipH sowie Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* anzufügen. Nachfolgend wurden die generierten PCR Produkte sowie der Vektor pET19b mit den genannten Enzymen hydrolysiert und ligiert.

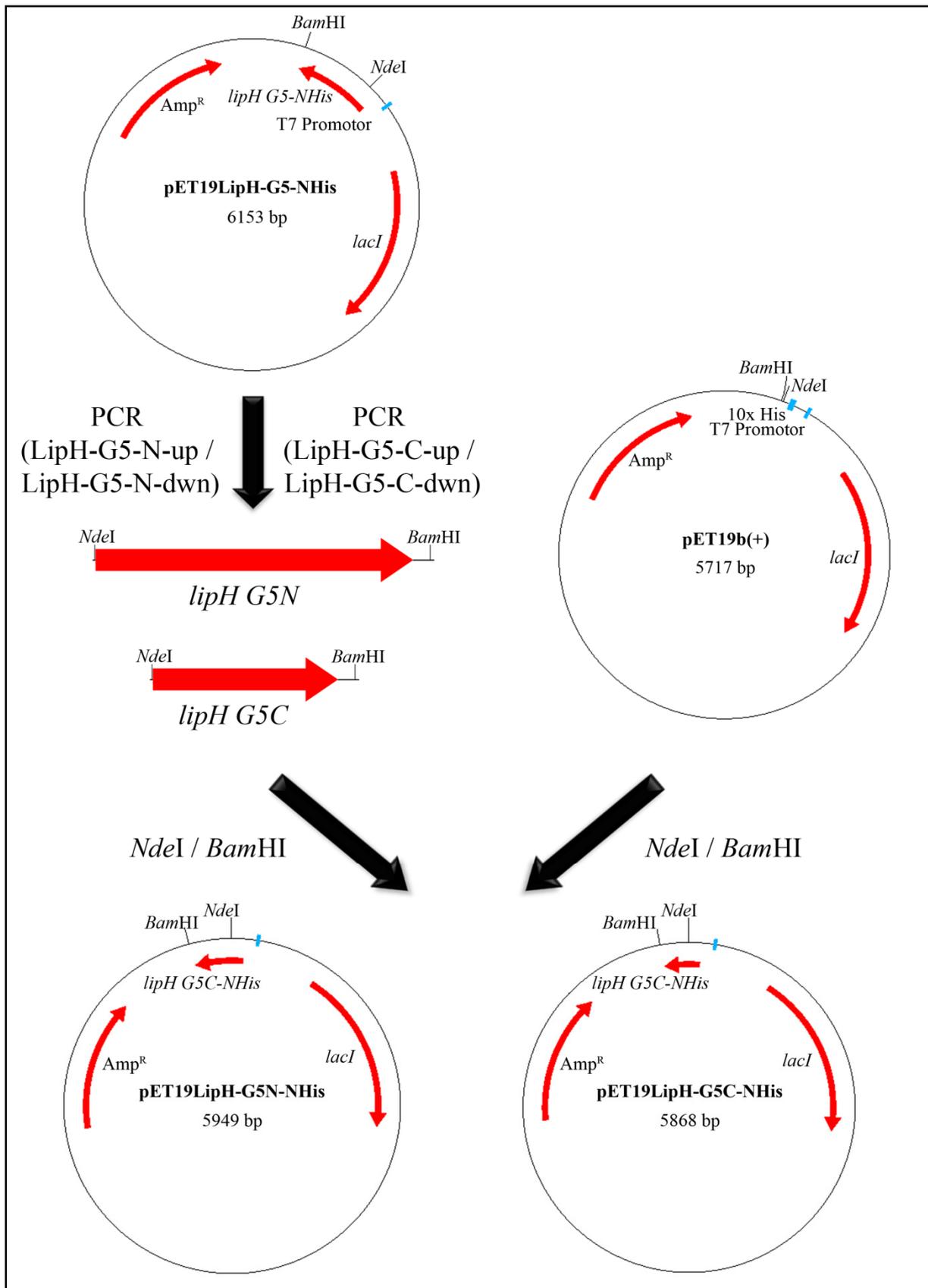


Abb. 7.5: Schema der Subklonierung der N- und C-terminal lokalisierten Minidomänen von LipH G5. Die entsprechenden 5' und 3' gelegenen Bereiche des *lipH G5* wurden mittels PCR amplifiziert und, wo erforderlich, ein Start- bzw. Stop-Codon eingefügt. Anschließend wurden die PCR-Fragmente unter Verwendung der angefügten terminalen Erkennungssequenzen für *Nde*I und *Bam*HI hydrolysiert, um die danach mit dem gleich hydrolysierten Vektor pET19b zu ligieren.

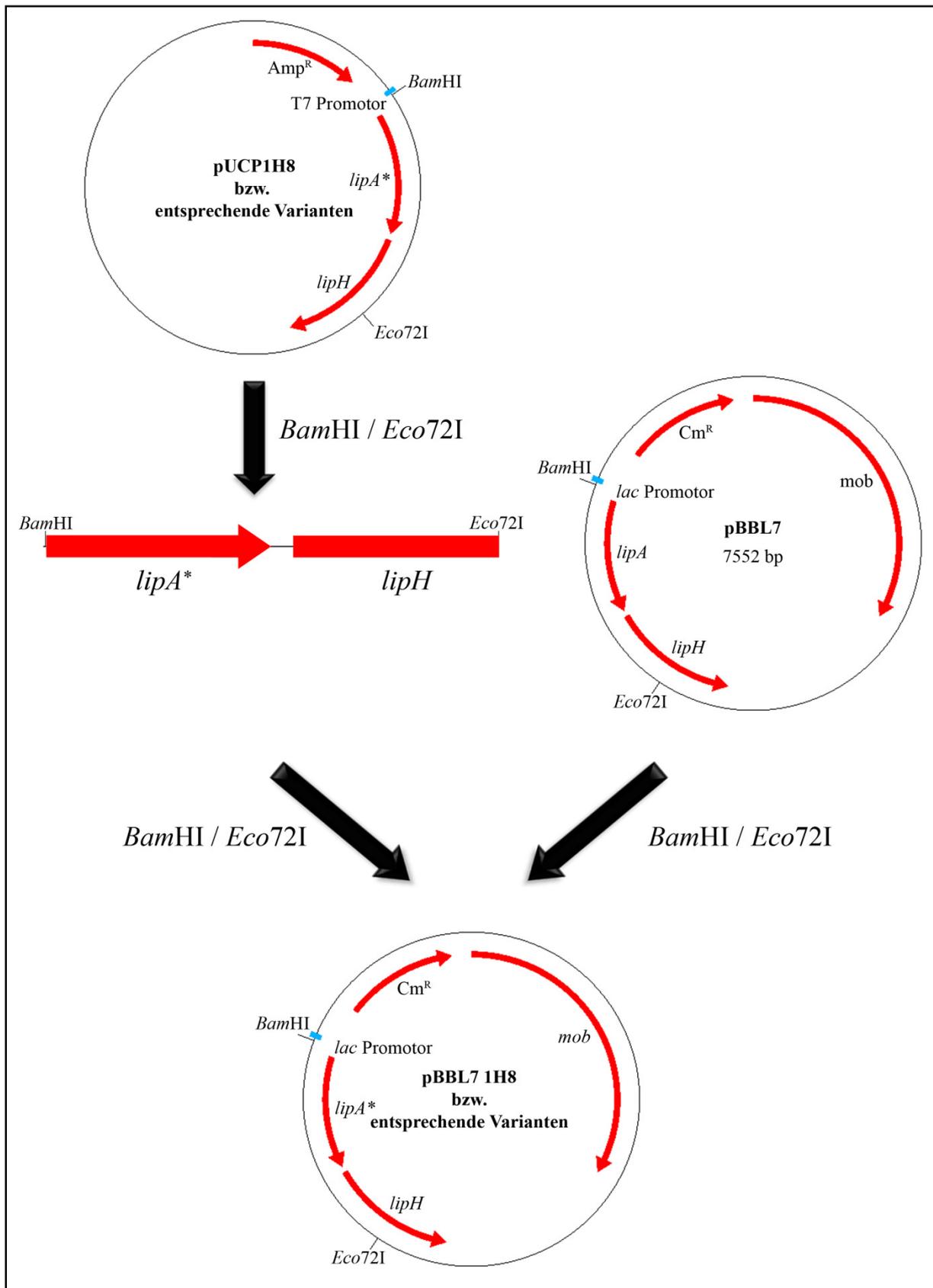


Abb. 7.6: Schema der Umklonierung von *lipA* 1H8 bzw. der entsprechenden Einzel- und Mehrfachvarianten unter Kontrolle des *lac* Promotors. Die verschiedenen Lipasegene und Teile des *lipH*, die unter Kontrolle des T7 Promotors auf den entsprechenden Plasmiden standen, wurden durch Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*72I isoliert. Anschließend wurde die im Plasmid pBBL7 vorhandene Wildtyp *lipAH* Sequenz auf die gleiche Weise excisiert und durch die verschiedenen Varianten durch Ligation substituiert.

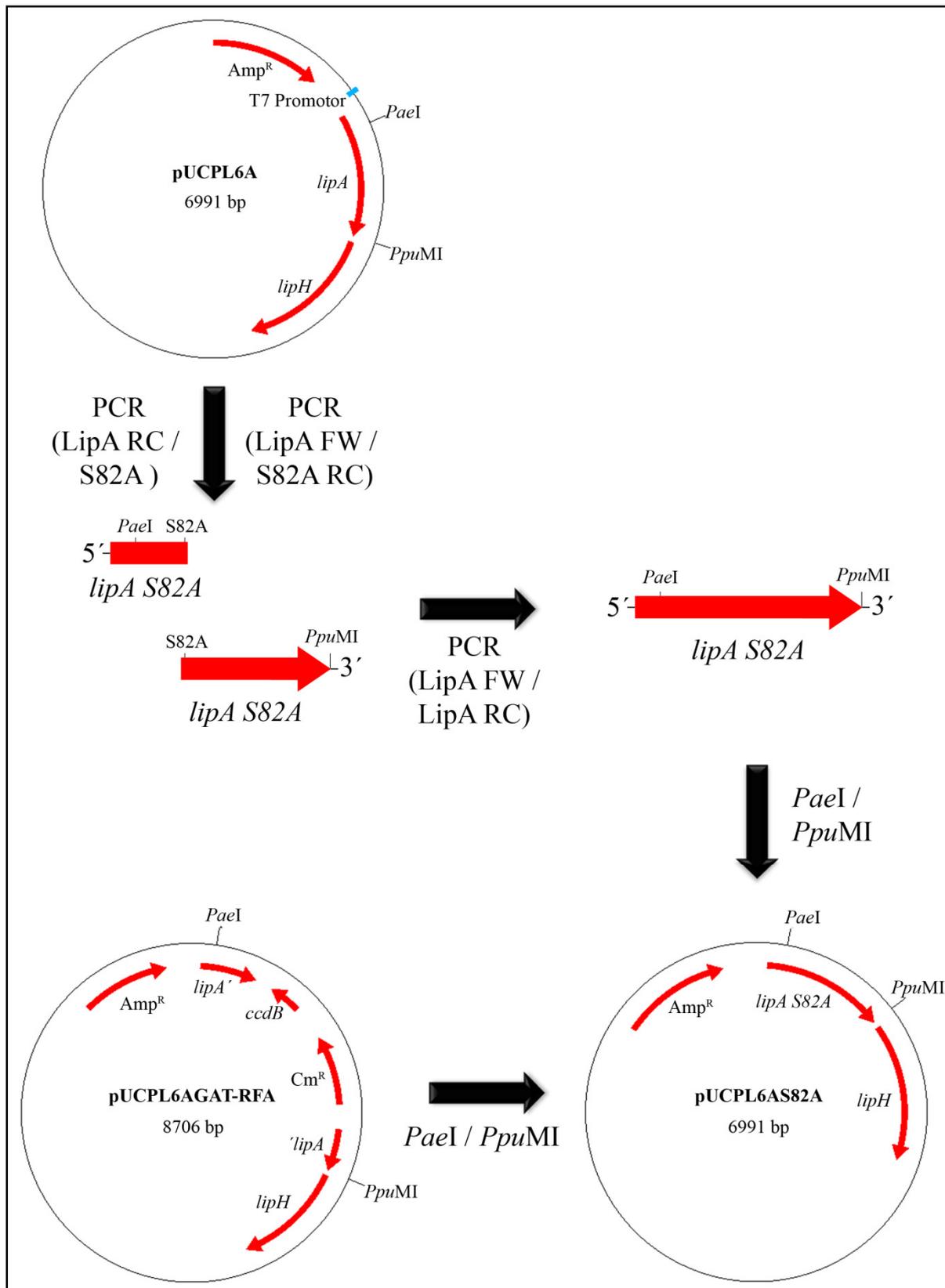


Abb. 7.7: Klonierungsschema des Gens der inaktivierten LipA Variante S82A. In einem ersten Schritt wurden durch PCR überlappende Genfragmente von *lipA* amplifiziert, die für die gewünschte Mutation S82A codierten. In der nachfolgenden PCR wurden *lipA* S82A unter Nutzung dieser Genfragmente und das Gen flankierenden Oligonukleotiden generiert. Nachfolgend wurde der Zielvektor pUCPL6AGAT-RFA und *lipA* S82A mit den Endonukleasen *PaeI* und *PpuMI* hydrolysiert, um durch Ligation das Plasmid pUCPL6AS82A zu konstruieren.

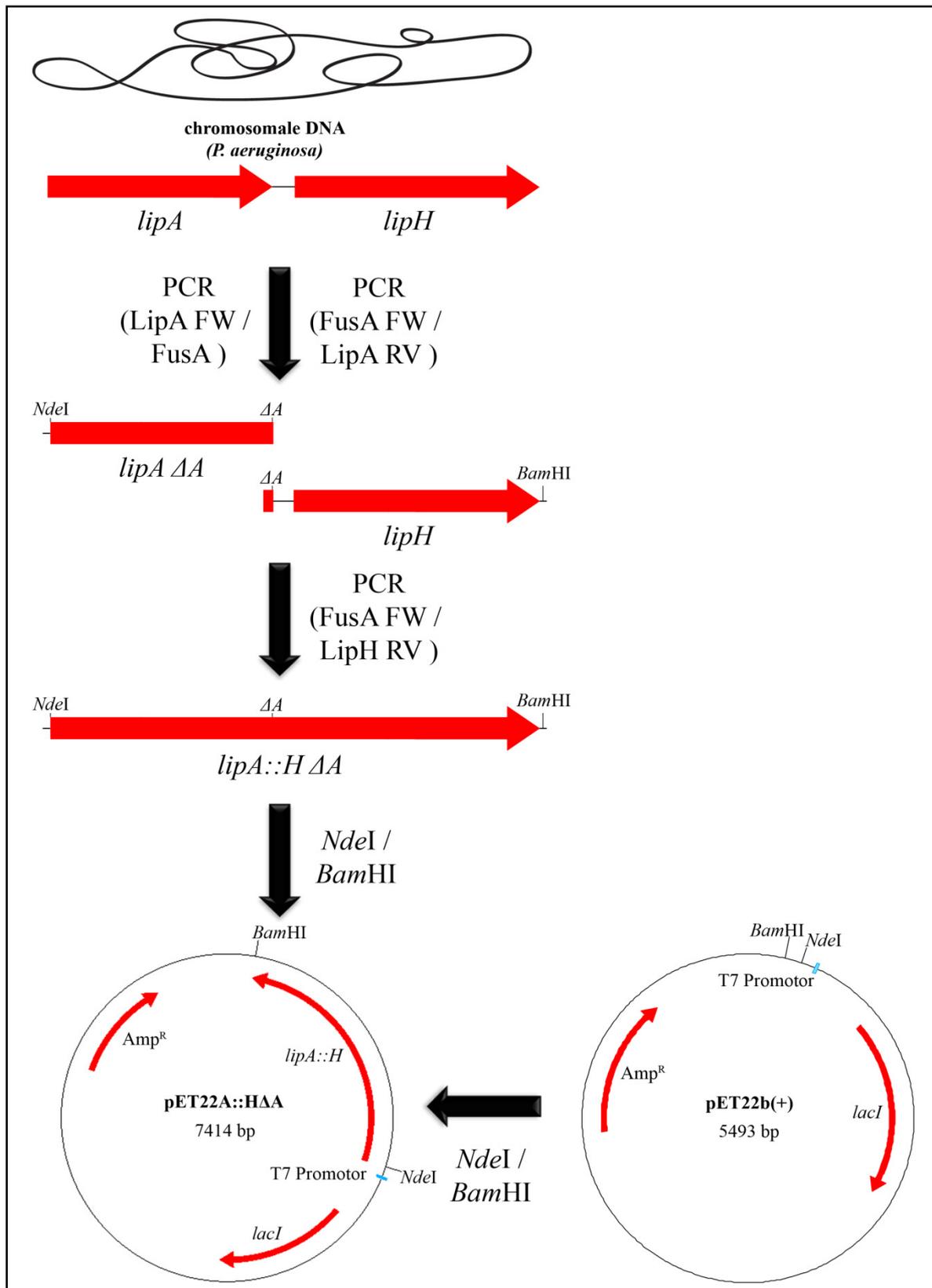


Abb. 7.8: Schema der Konstruktion und Klonierung von *lipA::H* in das Plasmid pET22A::HΔA. Chromosomale DNA von *P. aeruginosa* wurde dazu genutzt, mutagenisierte Fragmente des *lipAH* Operons zu generieren, die terminale Erkennungssequenzen für *NdeI* und *BamHI*, sowie die für die Fusion essentielle Deletion des Adenins im Stop-Codon des *lipA* trugen. Diese Fragmente wurden dazu verwendet, um mit flankierenden Oligonukleotiden *lipA::HΔA* zu amplifizieren. Nachfolgend wurden das Plasmid pET22b und die generierte Fusion durch Restriktion mit *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert um die DNA Fragmente zu ligieren und den Vektor pET22A::HΔA zu erstellen.

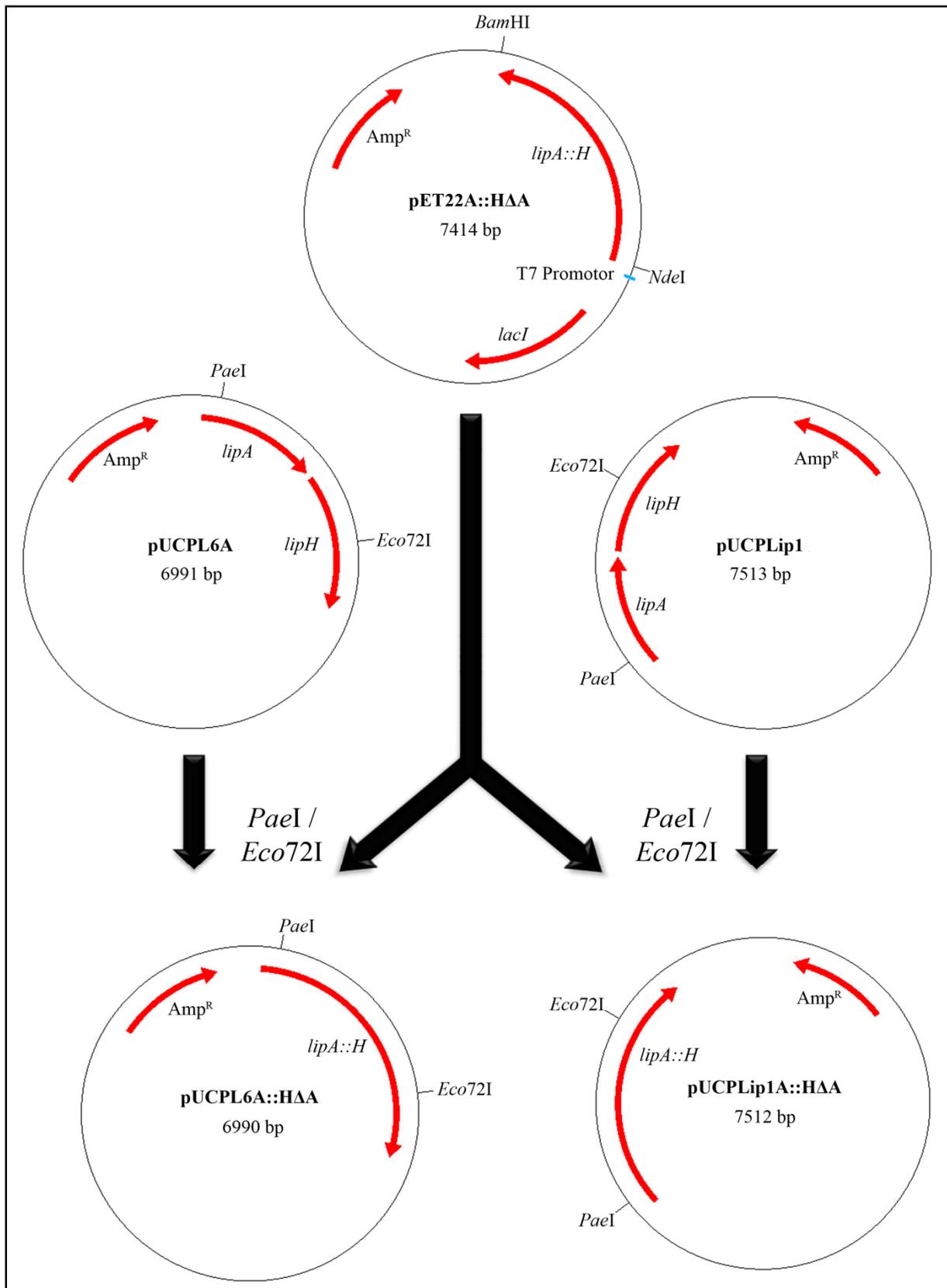


Abb. 7.9: Schema der Umklonierung von *lipA::H* in die pUCPKS Derivate pUCPL6A und pUCPLip1. Der für LipA::H codierende Vektor pET22A::HΔA sowie die Plasmide pUCPL6A und pUCPLip1 wurden mit den Endonukleasen *Pae*I und *Eco*72I hydrolysiert und ligiert, um die in den Zielvektoren vorhandene Wildtyp Sequenz durch den mutagenisierten Sequenzbereich, der für die Fusion codiert, zu substituieren.

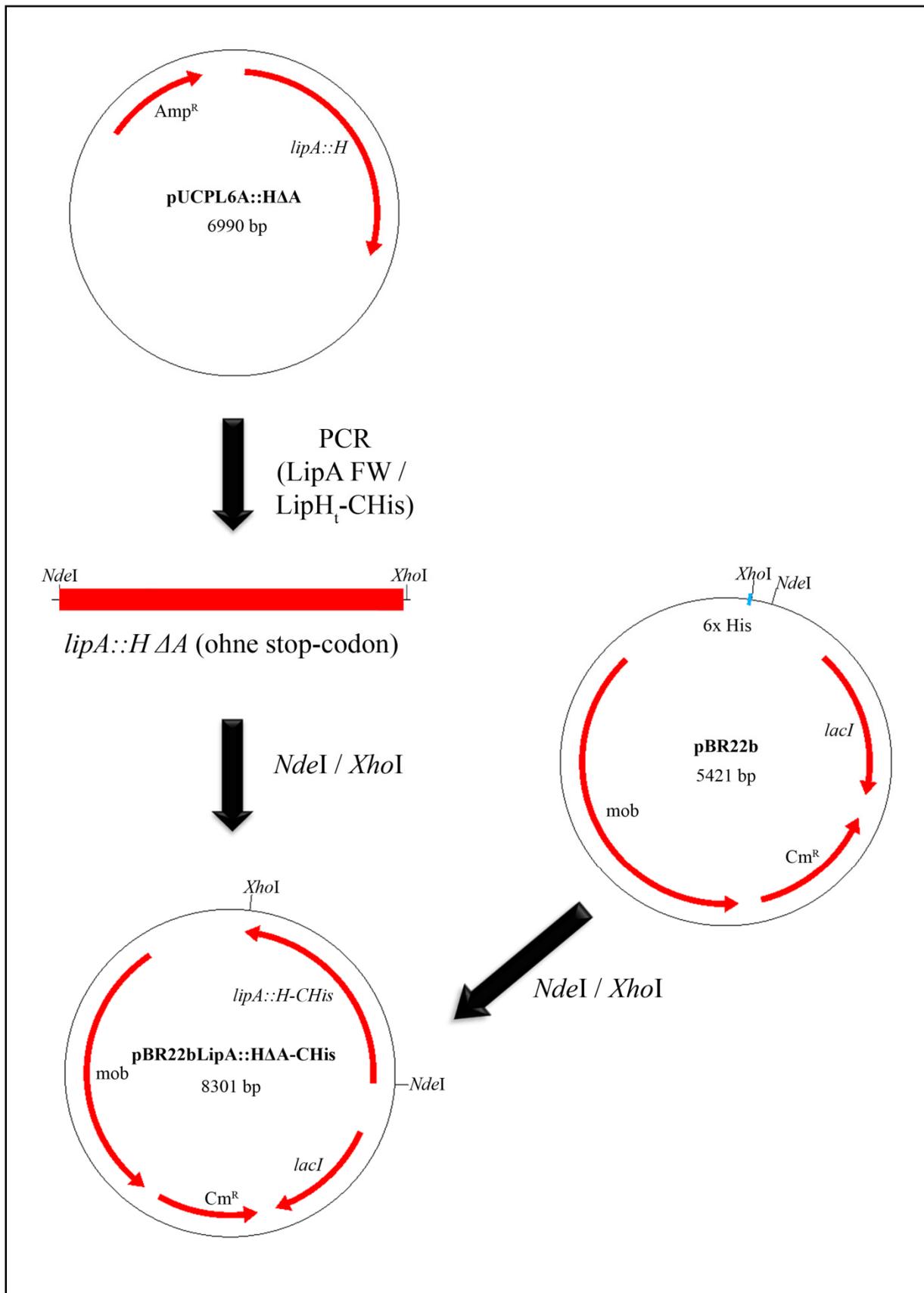


Abb. 7.10: Schema der Klonierung von *lipA::H* in pBR22b für die Konstruktion von *lipA::H-CHis*. Das für LipA::H codierende Gen wurde durch PCR ohne sein Stop-Codon amplifiziert und Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* terminal angefügt. Anschließend wurde der Zielvektor pBR22b und das amplifizierte *lipA::H* mit den Endonukleasen hydrolysiert, um sie zu ligieren und das Plasmid pBR22bLipA::HΔA-CHis zu konstruieren.

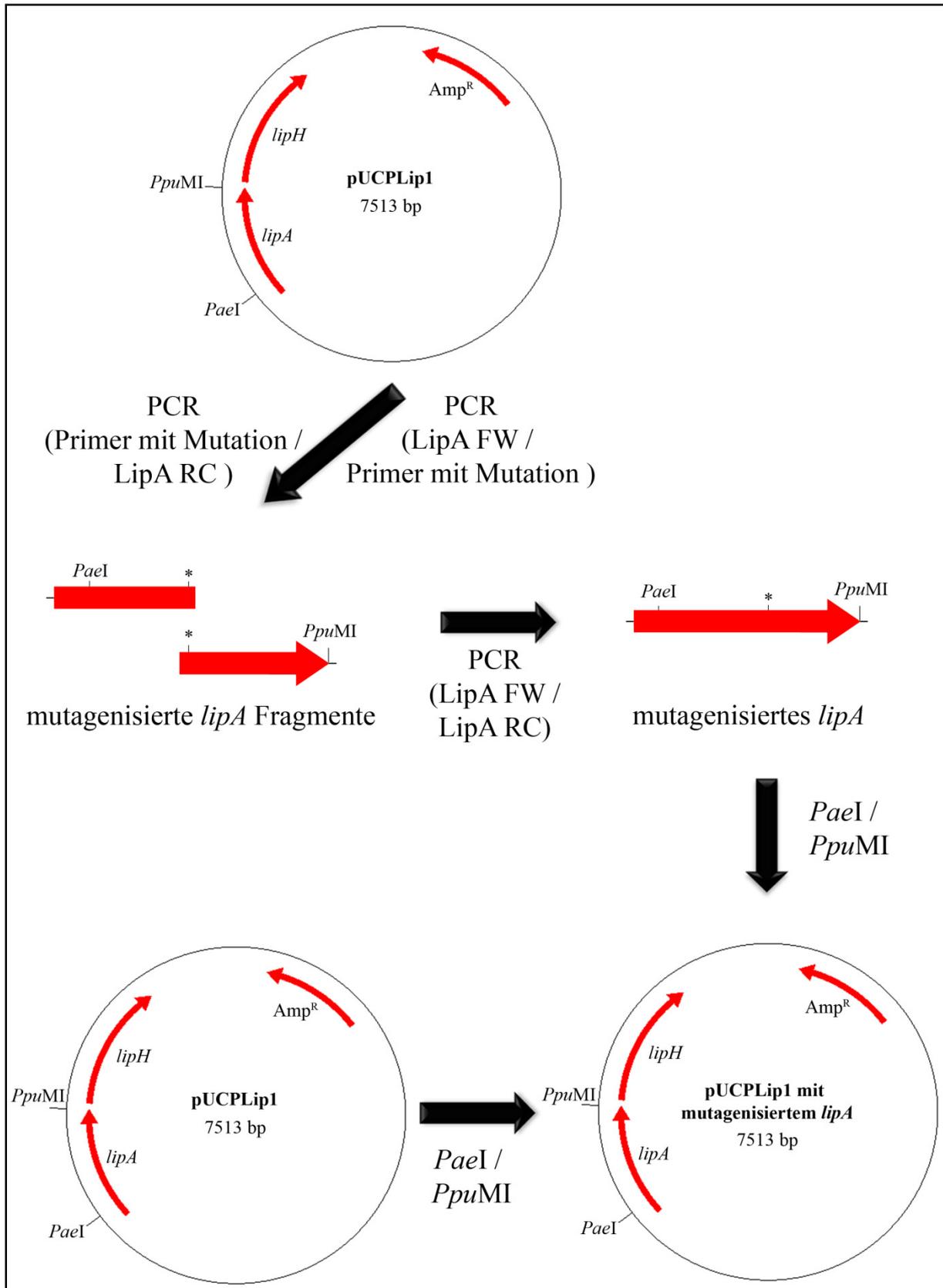


Abb. 7.11: Klonierungsschema der an den Positionen K223 und N224 mutagenisierten LipA Varianten. In einer ersten PCR wurden überlappende Genfragmente der Lipase mittels PCR generiert, die die gewünschte Mutation (*) trugen. Anschließend wurden diese Genfragmente und flankierende Oligonukleotide dazu verwendet, um in einer weiteren PCR die vollständigen mutagenisierten *lipA* Varianten zu erhalten. Diese wurden, wie auch der Zielvektor pUCPLip1, mit *PaeI* und *PpuMI* hydrolysiert, um in einer nachfolgenden Ligation den Bereich des Wildtyp *lipA* mit den erstellten Varianten zu ersetzen.

Name: Sascha Hausmann
geboren am: 27.09.1978
in: Mülheim a. d. Ruhr
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985 – 1988 Grundschule Tackenbergstraße in Oberhausen
1989 – 1998 Freiherr-vom-Stein Gymnasium in Oberhausen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/1999 – 04/2004 **Biologie-Studium** an der Ruhr-Universität Bochum

Schwerpunkte: Mikrobiologie
Biotechnologie
Physiologische Chemie
Tierphysiologie

2004 Abschluss des Studiums mit Diplom
Thema: „Expression und Reinigung von Proteinen des lipolytischen Systems aus *Pseudomonas aeruginosa* für strukturaufklärende Verfahren und Interaktionsexperimente“
am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen,
Ruhr-Universität Bochum

seit 06/2004 Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: „Einfluss des Lipase-spezifischen Chaperons LipH auf die Faltung und Sekretion der Lipasen LipA und LipC von *Pseudomonas aeruginosa*“

Anstellungen:

08/2004-10/2007 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** im „Institut für molekulare Enzymtechnologie“ (IMET) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

06/2004 – 07/2004 **Wissenschaftliche Hilfskraft** im „Institut für molekulare Enzymtechnologie“ (IMET) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Düsseldorf, den 15.04.2008

Sascha Hausmann

