

ZUSAMMENFASSUNG

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistisches bakterielles Pathogen, das durch seine intrinsische Antibiotikaresistenz heute immer noch für eine hohe Sterblichkeit bei immunkompromitierten Patienten verantwortlich ist. *P. aeruginosa* produziert eine große Anzahl verschiedener Virulenzfaktoren, unter denen sich auch das blaue Phenazinderivat Pyocyanin befindet. Der lateinische Name “aeruginosa”, übersetzt Grünspan, wurde wegen der charakteristischen blau-grünen Färbung von *P. aeruginosa*-Kulturen gewählt, die aus der Sekretion von Pyocyanin und dem gelben Metaboliten Pyoverdin resultiert. Die physiologische Bedeutung von Pyocyanin erscheint dabei äußerst komplex: es dient als respiratorisches Pigment, besitzt antibiotische Eigenschaften gegen andere Mikroorganismen, vermittelt transkriptionale Signale innerhalb von *P. aeruginosa* und ist zudem ein prominenter Virulenzfaktor in der Pathogenese.

In dieser Arbeit wurden PqsE und PA0803, zwei Proteine aus *P. aeruginosa* mit unbekannter molekularer Funktion, auf der in-vivo- und in-vitro-Ebene mit einem breiten Spektrum von Arbeitstechniken untersucht. Kristallstrukturen beider Proteine allein und im Komplex mit Liganden oder Substraten wurden bei hoher Auflösung bestimmt und zusammen mit anderen Methoden auf mögliche molekulare Funktionen untersucht. Die dabei gewonnenen strukturellen und funktionellen Erkenntnisse legen eine Basis für die zukünftige Suche nach den nativen Liganden bzw. Substraten beider Proteine.

Molekulare Funktion von PqsE

Im ersten Projekt wurde ein molekularer Mechanismus untersucht, mit dem *P. aeruginosa* die Biosynthese von Pyocyanin und einige andere Virulenzfaktoren durch das spezifische Signalmolekül *Pseudomonas*-Chinolon-Signal (PQS) kontrolliert. Dafür wurde im Besonderen das Genprodukt von *pqsE*, einem Teil des PQS-Biosyntheseoperons *pqsABCDE*, näher betrachtet, da vorhergehende Studien gezeigt hatten, dass *pqsE* für die PQS-Biosynthese nicht gebraucht wird, seine Deletion aber trotzdem zum Verlust der Virulenzproduktion einschließlich von Pyocyanin führt. Dies legt nahe, dass *pqsE* einen potentiellen Angriffspunkt für die Therapie von *P. aeruginosa*-Infektionen darstellt. Es ist daher interessant, sich mit der Funktion des Genprodukts auf der molekularen Ebene zu beschäftigen.

Seit seiner Entdeckung 1999 hat PqsE viel Aufmerksamkeit in der bakteriologischen Forschung auf sich gezogen. Viele Arbeiten in der Literatur haben gezeigt, dass PqsE eine kritische Verbindung zwischen Quorum Sensing und der Virulenz herstellt. Dennoch ist es trotz allen Fortschritts zum Verständnis des PQS-Systems bisher nicht gelungen, die molekulare Funktion von PqsE zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde rekombinantes PqsE kloniert, exprimiert, gereinigt und schließlich charakterisiert. Überraschenderweise interagiert PqsE nicht mit PQS und ist deswegen kein PQS-Antwort-Protein, wie es ursprünglich in der Literatur vorgeschlagen wurde. Da vorausgehende, vorwiegend mit genetischen Methoden durchgeführte Arbeiten keinen offensichtlichen Startpunkt lieferten, wurde zunächst die Kristallstruktur von PqsE bei 1.6 Å Auflösung in der Hoffnung bestimmt, dass sich hieraus Hinweise für einen molekularen Mechanismus ableiten lassen.

PqsE ist eine binukleare Metallohydrolase mit einem gemischten Fe(III)M(II)-Aktivitätszentrum. Ein aus der Aufreinigung stammender Ligand wurde als Benzoat identifiziert und könnte anzeigen, dass PqsE seinen regulatorischen Effekt durch Umwandlung eines von Chorismat abgeleiteten Moleküls ausübt. Weiterhin wurde beobachtet, dass PqsE Phosphodiester einschließlich ein- und zweisträngiger DNA und RNA ebenso wie den Thioester S-(4-Nitrobenzyl)-mercaptoethan sehr langsam hydrolysieren kann. Höhere Aktivität wurde nach der Inkubation mit Co^{2+} und, zu einem niedrigeren Grad, Mn^{2+} beobachtet, was darauf hinweist, dass es sich bei dem zunächst in rekombinantem PqsE gefundenen Fe(III)/Fe(II)-Zentrum um ein Artefakt der Aufreinigung handeln könnte. Die Kristallstruktur eines Komplexes der E182A-Mutante von PqsE mit bis-pNPP wurde bestimmt und ermöglicht die Ableitung eines hypothetischen Hydrolysemechanismus. Ferner wurden Transkriptomanalysen eines PqsE-deletierten und eines PqsE-komplementierten *P. aeruginosa*-Stammes durchgeführt. Diese Daten legen es nahe, dass das natürliche Substrat von PqsE eine Verwandtschaft zu Anthranilsäure oder Catechol besitzt.

Pyocyanin-Bindungsaktivität des hypothetischen Proteins PA0803

Das ca. 6 Megabasenpaare große Genom von *Pseudomonas aeruginosa* enthält etwa 5500 Gene, von denen ein Großteil nicht untersucht ist und als "hypothetische Proteine" annotiert wurde. Die Unkenntnis eines Zusammenhangs mit bekannten biochemischen Auf- oder Abbauwegen bedeutet jedoch nicht, dass diese hypothetischen Proteine eine weniger wichtige Rolle für die Bakterien spielen.

Im zweiten hier vorgestellten Projekt wurde das Gen PA0803 aus *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. PA0803 besitzt niedrige Sequenzhomologie zum Phenazin-Resistenzprotein EhpR aus *Pantoea agglomerans*, es ist im Genom allerdings nicht in der Nähe eines der beiden Phenazinbiosynthesecluster lokalisiert. Um herauszufinden, ob PA0803 Phenazine binden kann, wurde das Gen kloniert, exprimiert, gereinigt und charakterisiert, ebenso wurde die Kristallstruktur bei einer Auflösung von 1.6 Å bestimmt. Experimente mit isothermer Titrationskalorimetrie und die Kristallstruktur eines PA0803:Pyocyanin-Komplexes bestätigen, dass PA0803 Pyocyanin mit mikromolarer Affinität binden kann. Dies legt nahe, dass PA0803, zusammen mit anderen Genprodukten, als ein Transportprotein für kleine aromatische Moleküle dient.