

Quantitative Proteomanalyse von  
*Pseudomonaden* zur Aufklärung  
biotechnologisch relevanter  
Stoffwechselwege

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim

Institut für Physiologie  
Fachgebiet Biosensorik

Vorgelegt von:  
M. Sc. Oliver Simon  
aus  
Villingen  
2013



Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer  
1. berichtende Person: Prof. Dr. Armin Huber  
2. berichtende Person: Prof. Dr. Bernhard Hauer

eingereicht am: 20. Mai 2013  
Tag der Disputation: 7. Oktober 2013



# Veröffentlichungen

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist an den folgenden Stellen veröffentlicht worden:

## Artikel

Björn Mückschel, **Oliver Simon**, Janosch Klebensberger, Nadja Graf, Bettina Rosche, Jens Pfannstiel, Josef Altenbuchner, Armin Huber and Bernhard Hauer (2012). Ethylene Glycol Metabolism of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol*.

## Kongressbeiträge

**Oliver Simon**, Jens Pfannstiel and Armin Huber (2012). A Proteomics View on Vanillin Degradation. BMBF-Workshop „*Applied Biotechnology and Systems Biology of Pseudomonas*“

**Oliver Simon**, Jens Pfannstiel and Armin Huber (2010). Quantitative Proteomics in *Pseudomonas putida*. CSB-Symposium, Universität Stuttgart.

Björn Mückschel, **Oliver Simon**, Janosch Klebensberger, Nadja Graf, Josef Altenbuchner, Jens Pfannstiel, Armin Huber and Bernhard Hauer (2011). Biochemical and Genetic Characterization of Ethylene Glycol Metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440 and JM37. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*.

Björn Mückschel, **Oliver Simon**, Janosch Klebensberger, Nadja Graf, Josef Altenbuchner, Jens Pfannstiel, Armin Huber and Bernhard Hauer (2011). Biochemical and Genetic Characterization of Ethylene Glycol Metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440 and JM37. *13th International Conference on Pseudomonas*, Sydney Australia.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
3.1	Systembiologie in <i>Pseudomonas putida</i>	6
3.1.1	<i>Pseudomonas putida</i>	6
3.1.2	Systembiologie	7
3.1.3	Proteomics	8
3.2	Biotransformationen	10
3.2.1	Synthese von Glyoxylsäure aus Ethylenglycol	10
3.2.2	Lösungsmitteltoleranz in Mikroorganismen	13
3.2.3	Biotechnologische Herstellung von Butanol	15
3.2.4	Biotechnologische Herstellung von Vanillin	17
3.2.5	Biotransformation von Terpenoiden	20
3.3	Massenspektrometrie und quantitative Proteomanalyse	21
3.3.1	Reversed Phase-HPLC und Massenspektrometrie	21
3.3.2	Elektrospray-Ionisation (ESI)	24
3.3.3	Massenanalysatoren	25
3.3.4	Proteinidentifizierung (Datenbanksuche)	28
3.3.5	Quantitative Proteomanalyse	28
3.3.6	Zweidimensionale Gelelektrophorese und 2D-DIGE	29
3.3.7	Labelfreie massenspektrometrische Quantifizierung	32
3.3.8	Selected reaction monitoring (SRM)	34
3.4	Zielsetzung	36
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>38</b>
4.1	Verwendete Materialien	38
4.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmittel und Geräte	38
4.2	Kultivierung	43
4.2.1	Verwendete Bakterienstämme	43
4.2.2	Kulturmedien	43

4.2.3	Kultivierung im Schüttelkolben . . . . .	45
4.2.3.1	Kultivierung Ethylenglycol- und Glyoxylsäure- Metabolismus . . . . .	46
4.2.3.2	Kultivierung Butanol-Metabolismus . . . . .	46
4.2.3.3	Kultivierung Vanillin-Metabolismus . . . . .	47
4.2.3.4	Kultivierung Terpen-Metabolismus . . . . .	47
4.2.4	Kultivierung im Bioreaktor . . . . .	48
4.3	Probenvorbereitung . . . . .	49
4.3.1	Aufschluss von Bakterienzellen . . . . .	49
4.3.2	Probenvorbereitung für die 2D-DIGE-Analyse . . . . .	49
4.3.3	Probenvorbereitung der Membranprotein-Proben . . . . .	49
4.3.4	Probenvorbereitung GeLCMSMS-Analyse . . . . .	50
4.3.5	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford . . . . .	50
4.4	Gelelektrophorese . . . . .	50
4.4.1	1D-SDS-PAGE . . . . .	50
4.4.2	Proteinfärbung . . . . .	52
4.4.2.1	Coomassie-Färbung . . . . .	52
4.4.2.2	Silberfärbung . . . . .	52
4.4.3	2D-DIGE . . . . .	52
4.4.3.1	Herstellung der Gele . . . . .	53
4.4.3.2	Markierung der 2D-DIGE-Proben . . . . .	53
4.4.3.3	Die 1. Dimension (IEF) . . . . .	54
4.4.3.4	Die 2. Dimension (SDS-PAGE) . . . . .	55
4.4.3.5	Auswertung mittels Progenesis SameSpots . . . . .	56
4.4.3.6	Spot Picking . . . . .	58
4.5	Massenspektrometrie . . . . .	59
4.5.1	In-Gel-Verdau . . . . .	59
4.5.2	Identifizierung von Proteinen . . . . .	60
4.5.3	Labelfreie massenspektrometrische Quantifizierung . . . . .	61
4.5.3.1	Quantitative Analyse von Membranproteinen . . . . .	62
4.5.3.2	Quantitative Analyse der GeLCMSMS-Daten . . . . .	63
4.5.4	Datenbanksuche . . . . .	64
4.5.5	Datenanalyse und Annotierung . . . . .	66
4.5.6	Quantifizierung von Proteinen mittels SRM (Selected Reaction Monitoring) . . . . .	67
4.5.6.1	Probenvorbereitung . . . . .	67
4.5.6.2	SRM-Analyse und quantitative Auswertung . . . . .	67
4.6	Quantifizierung der Metabolite des Vanillinstoffwechsels . . . . .	69

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>71</b>
5.1	Untersuchungen zum Abbau von Ethylenglycol . . . . .	71
5.1.1	Analyse der zytosolischen Fraktionen durch 2D-DIGE . . . . .	73
5.1.1.1	Der Metabolismus von EG und GXS in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 . . . . .	73
5.1.1.2	Der Metabolismus von EG und GXS in <i>Pseudomonas putida</i> GN187 . . . . .	79
5.1.1.3	Der Metabolismus von EG und GXS in <i>Pseudomonas putida</i> GN259 . . . . .	80
5.1.1.4	Der Metabolismus von EG und GXS in <i>Pseudomonas putida</i> JM37 . . . . .	81
5.1.2	Analyse des Membranproteoms . . . . .	82
5.1.2.1	Untersuchung der Membranproteinfraktion in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 . . . . .	85
5.1.2.2	Untersuchung der Membranproteinfraktion in <i>Pseudomonas putida</i> GN259 . . . . .	86
5.1.2.3	Untersuchung der Membranproteinfraktion in <i>Pseudomonas putida</i> JM37 . . . . .	88
5.1.3	Der Abbau von Ethylenglycol in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 und JM37 . . . . .	91
5.2	Untersuchungen zum Butanol-Metabolismus . . . . .	96
5.2.1	Proteomanalyse der aus dem Schüttelkolben erhaltenen Proben . . . . .	96
5.2.1.1	Analyse der zytosolischen Fraktion durch 2D-DIGE . . . . .	97
5.2.1.2	Analyse des Membranproteoms . . . . .	101
5.2.1.3	Abbauwege und Toleranzmechanismen . . . . .	106
5.2.2	Transkriptom- und Proteomanalyse im Vergleich . . . . .	108
5.2.3	Proteomanalyse der aus dem Bioreaktor erhaltenen Proben . . . . .	110
5.2.3.1	Analyse der zytosolischen Fraktion durch 2D-DIGE . . . . .	113
5.2.3.2	Analyse des Membranproteoms . . . . .	114
5.2.3.3	1D-Fraktionierung (GeLCMSMS-Analyse) . . . . .	116
5.2.3.4	Der Metabolismus von Butanol in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 . . . . .	122
5.3	Untersuchungen zum Vanillin-Metabolismus . . . . .	140
5.3.1	Analyse der zytosolischen Fraktion durch 2D-DIGE . . . . .	142
5.3.1.1	Differentielle Regulation von Proteinen in <i>P. putida</i> KT2440 bei Wachstum auf 0,1% Vanillin . . . . .	142
5.3.1.2	Differentielle Regulation von Proteinen in <i>P. putida</i> GN235 bei Wachstum auf 0,1% Vanillin . . . . .	142

5.3.2	Analyse des Membranproteoms . . . . .	143
5.3.2.1	Differentielle Regulation von Proteinen in <i>P. putida</i> KT2440 bei Wachstum auf 0,1% Vanillin . . .	144
5.3.2.2	Differentielle Regulation von Proteinen in <i>P. putida</i> GN235 bei Wachstum auf 0,1% Vanillin . . .	144
5.3.3	1D-Fraktionierung . . . . .	145
5.3.4	Regulierte Stoffwechselwege in <i>P. putida</i> KT2440 unter 0,1% Vanillin . . . . .	148
5.3.5	Metabolitenanalysen . . . . .	175
5.4	Untersuchungen zum Metabolismus von Terpenen . . . . .	177
5.4.1	1D-Fraktionierung (GeLCMSMS-Analyse) . . . . .	178
5.4.1.1	Differenzielle Regulation von Proteinen in <i>P. aeruginosa</i> im Vergleich zwischen Glucose und Citronellol . . . . .	179
5.4.1.2	Differenzielle Regulation von Proteinen in <i>P. aeruginosa</i> im Vergleich zwischen Glucose und Oktansäure . . . . .	185
5.4.1.3	Der Abbau von Terpenen . . . . .	188
5.5	Validierung von 2D-DIGE-Experimenten mittels Selected Reaction Monitoring (SRM) . . . . .	195
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>201</b>
6.1	Ethylenglycol und Glyoxylsäure . . . . .	201
6.2	Butanol . . . . .	207
6.2.1	Vergleich der aus dem Schüttelkolben und dem Bioreaktor erhaltenen Daten . . . . .	208
6.2.2	GeLCMSMS-Analyse der aus dem Bioreaktor entnommenen Proben . . . . .	210
6.2.3	Differentiell regulierte Proteine des Membran Auf- und Umbaus	211
6.2.4	Transporter und Efflux-Systeme . . . . .	212
6.2.5	Das PedR1 Regulon . . . . .	213
6.3	Vanillin . . . . .	214
6.3.1	Vanillin-Dehydrogenase . . . . .	215
6.3.2	PedR1-Regulon . . . . .	217
6.3.3	Glucose Metabolismus . . . . .	218
6.3.4	Regulation des Vanillin-Abbaus . . . . .	219
6.3.5	Am Transport von Vanillin oder dessen Intermediaten beteiligte Transportsysteme . . . . .	220
6.3.6	Lösungsmittelstress . . . . .	221
6.3.7	Stabilisierung und Anpassung der Zellmembran und Zellwand . .	224

6.3.8	Export toxischer Substanzen über Efflux-Systeme . . . . .	225
6.3.9	Porine . . . . .	226
6.4	Vergleich der eingesetzten Methoden . . . . .	227
6.5	Terpene . . . . .	232
<b>Literatur</b>		<b>236</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>255</b>
<b>Anhang</b>		<b>260</b>

# Abbildungsverzeichnis

3.1	Oxidation von Ethylenglycol zu Glyoxylsäure. . . . .	10
3.2	Glyoxylat-Zyklus . . . . .	12
3.3	Abbau von Glyoxylat über den so genannten Glycerat-Weg . . . . .	12
3.4	Biotechnologische Herstellung von Butanol . . . . .	16
3.5	Geplante Synthese von Vanillin . . . . .	17
3.6	Biotechnologische Herstellung von Vanillin . . . . .	19
3.7	Graphische Darstellung einer LC-ESI MS Analyse . . . . .	23
3.8	Aufbau einer ESI-Ionenquelle . . . . .	25
3.9	Aufbau der verwendeten Hybrid-Massenspektrometer . . . . .	27
3.10	Vereinfacht dargestellter Ablauf eines 2D-DIGE-Experiments . . . . .	31
3.11	Vereinfachte Darstellung der labelfreien Quantifizierung . . . . .	33
3.12	Schematische Darstellung der Analyse eines SRM-Übergangs . . . . .	35
4.1	1D-SDS-PAGE . . . . .	51
4.2	Normalisierung 2D-DIGE . . . . .	57
4.3	Berechnung der Peptid-Wahrscheinlichkeit . . . . .	66
5.1	Übersicht Proteomics-Experimente EG und GXS . . . . .	72
5.2	Gelbilder von <i>P. putida</i> KT240 und JM37 . . . . .	77
5.3	Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente . . . . .	83
5.4	Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie ( <i>P. putida</i> GN259 GXS) . . . . .	88
5.5	Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie ( <i>P. putida</i> JM37 GXS) . . . . .	90
5.6	Postulierter Abbauweg von EG zu GXS in <i>P. putida</i> KT2440 und JM37	92
5.7	Unter GXS induzierte Abbauwege in <i>P. putida</i> JM37 und KT2440 . . . . .	94
5.8	Das PedR1-Regulon und dessen Induktion unter EG . . . . .	95
5.9	Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente (Butanol- Kolben) . . . . .	103
5.10	Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie ( <i>P. putida</i> KT2440 Butanol-Kolben) . . . . .	104

---

5.11	Postulierter Abbauweg für Butanol in <i>P. putida</i> KT2440 . . . . .	107
5.12	Vergleich der Transkriptom- und Proteomanalyse. . . . .	110
5.13	Durchgeführte Proteomics-Experimente zum Metabolismus von Butanol (Bioreaktor) . . . . .	111
5.14	Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente (Membran-Bioreaktor) . . . . .	115
5.15	1D-Gel-Fraktionierung der aus dem Bioreaktor gewonnenen Proben . .	117
5.16	Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente (GeLCMSMS-Bioreaktor) . . . . .	118
5.17	Kontamination der Fermenter III und IV . . . . .	120
5.18	Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie ( <i>P. putida</i> KT2440 Butanol-Bioreaktor) . . . . .	121
5.19	Das PedR1-Regulon unter Butanol . . . . .	124
5.20	Postulierter Abbauweg für Butanol . . . . .	126
5.21	Regulation des Citratzyklus nach Behandlung mit Butanol . . . . .	129
5.22	Regulation des Kohlenhydrat-Metabolismus nach Behandlung mit Butanol . . . . .	136
5.23	Wachstumskurven von <i>P. putida</i> KT2440 und GN235 . . . . .	141
5.24	Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente (Membran- Vanillin) . . . . .	143
5.25	Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie ( <i>P. putida</i> KT2440 GeLCMSMS-Vanillin) . . . . .	147
5.26	Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente (GeLCMSMS-Vanillin) . . . . .	148
5.27	Differentiell regulierte Proteine des $\beta$ -Ketoacidat-Weges . . . . .	155
5.28	Unter Vanillin differentiell regulierte Transport-Proteine . . . . .	159
5.29	Differentiell regulierte Proteine des Putrescin-Metabolismus . . . . .	164
5.30	Differentiell regulierte Proteine des Trehalose-Metabolismus . . . . .	168
5.31	Differentiell regulierte Proteine des Fettsäure-Metabolismus . . . . .	170
5.32	Quantitative Analyse der Vanillin-Metabolite . . . . .	176
5.33	Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie (Citronellol) . . . . .	179
5.34	Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente . . . . .	180
5.35	Differentiell regulierte Proteine des Terpen-Abbaus . . . . .	181
5.36	Das <i>liu</i> - und <i>atu</i> -Gencluster . . . . .	183
5.37	Differentielle Regulation der Enzyme des Citratzyklus . . . . .	184
5.38	Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente . . . . .	185

5.39 Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie (Oktansäure) . . . . .	186
5.40 Differentielle Regulation der Enzyme der $\beta$ -Oxidation . . . . .	187
5.41 Präferenz der Terpene . . . . .	192
5.42 Gelbild des 2D-DIGE-Experiments „Glucose vs. 0,1% Vanillin“ . . . . .	196
5.43 SRM-Übergänge . . . . .	197
6.1 Vergleich des PedR1-Genclusters . . . . .	206
6.2 Abbaupfade aromatischer Verbindungen in <i>P. putida</i> . . . . .	223
6.3 Methodenvergleich . . . . .	229

# Tabellenverzeichnis

4.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien . . . . .	38
4.2	Verwendete Geräte. . . . .	39
4.3	Verwendete Softwarepakete. . . . .	40
4.4	Häufig verwendete Lösungen. . . . .	41
4.5	Verwendete Bakterienstämme . . . . .	43
4.6	Eingesetzte Kulturmedien . . . . .	43
4.7	Zusammensetzung 1D-Gele . . . . .	51
4.8	Übersicht über die für vier 12% SDS-Gele benötigten Substanzen. . . . .	53
4.9	IEF-Parameter . . . . .	55
4.10	Anregungs- und Emissionswellenlängen . . . . .	56
4.11	30 min UPLC-Gradient . . . . .	60
4.12	240 min UPLC-Gradient . . . . .	61
4.13	UPLC-Gradienten der GeLCMSMS-Analysen . . . . .	62
4.14	HPLC-Gradient der SRM-Analysen . . . . .	68
4.15	HPLC-Gradient der Metaboliten-Analyse . . . . .	70
5.1	2D-DIGE Statistik EG und GXS . . . . .	75
5.2	Regulierte Proteine unter EG und GXS . . . . .	76
5.3	Membran-Statistik EG und GXS . . . . .	83
5.4	Regulierte Proteine in der Membranfraktion unter EG und GXS . . . . .	85
5.5	2D-DIGE Statistik Butanol-Kolben . . . . .	97
5.6	Regulierte Proteine unter Butanol (2D-DIGE-Kolben) . . . . .	98
5.7	Membran-Statistik Butanol-Kolben . . . . .	101
5.8	Regulierte Proteine unter Butanol (Membran-Kolben) . . . . .	101
5.9	Vergleich Proteom vs. Transkriptom bei 0,5 g/l Butanol . . . . .	108
5.10	Vergleich Proteom vs. Transkriptom bei 3 g/l Butanol . . . . .	109
5.11	Übersicht Proben Bioreaktor . . . . .	112
5.12	2D-DIGE Statistik Butanol Bioreaktor . . . . .	113
5.13	Membran-Statistik Butanol Bioreaktor . . . . .	115
5.14	GeLCMSMS-Statistik Steady-State I vs. Steady-State II . . . . .	119
5.15	GeLCMSMS Statistik Steady-State I vs. Steady-State III . . . . .	120

5.16	Differentiell regulierte Proteine aus dem Genbereich	
	PP_2662 bis PP_2683 . . . . .	122
5.17	Differentiell regulierte Proteine der $\beta$ -Oxidation . . . . .	127
5.18	Differentiell regulierte Proteine der LPS-Biosynthese . . . . .	128
5.19	Differentiell regulierte Proteine des Citrat-Zyklus . . . . .	130
5.20	Differentiell regulierte Proteine der Atmungskette . . . . .	132
5.21	Differentiell regulierte Transporter und Efflux-Systeme . . . . .	133
5.22	Differentiell regulierte Proteine des Aminosäure-Metabolismus . . . . .	134
5.23	Differentiell regulierte Proteine des Glucose-Metabolismus . . . . .	137
5.24	Differentiell regulierte Proteine des Trehalose-Metabolismus . . . . .	139
5.25	Differentiell regulierte Stressproteine . . . . .	140
5.26	2D-DIGE Statistik Vanillin . . . . .	142
5.27	Membran-Statistik Vanillin . . . . .	144
5.28	GeLCMSMS-Statistik Vanillin . . . . .	146
5.29	Differentiell regulierte Proteine des Glucose-Metabolismus . . . . .	150
5.30	Unter Glucose induzierte Transporter, Porine und Efflux-Systeme . . . . .	152
5.31	Differentiell regulierte Proteine des Citrat-Zyklus . . . . .	153
5.32	Differentiell regulierte Proteine des <i>pca</i> -Clusters . . . . .	157
5.33	Unter Vanillin induzierte Transporter, Porine und Efflux-Systeme . . . . .	161
5.34	Differentiell regulierte Proteine des Putrescin-Metabolismus . . . . .	165
5.35	Differentiell regulierte Proteine des Aminosäure-Metabolismus . . . . .	167
5.36	Sequenzvergleich des Trehalose-Metabolismus . . . . .	168
5.37	Differentiell regulierte Proteine des Trehalose-Metabolismus . . . . .	169
5.38	Differentiell regulierte Proteine des Lipid-Metabolismus . . . . .	172
5.39	Differentiell regulierte Stress-Proteine . . . . .	174
5.40	Acyl- und Acetyl-CoA Synthetasen . . . . .	182
5.41	Unterschiede zwischen Terpenen und Oktansäure in der $\beta$ -Oxidation . . . . .	188
5.42	Regulation der Atu- und Liu-Proteine . . . . .	193
5.43	Differentiell regulierte Dehydrogenasen . . . . .	194
5.44	Vergleich 2D-DIGE und SRM . . . . .	198
6.1	Sequenzvergleich zwischen verschiedenen Proteinen des PedR1-Regulons	203
6.2	Vergleich Schüttelkolben und Bioreaktor . . . . .	209
6.3	Kandidaten für die Umsetzung von Vanillin zu Vanillinsäure . . . . .	217
6.4	Differentiell regulierte Transporter des Vanillin-Metabolismus . . . . .	220
6.5	Untersuchungen zur Lösungsmitteltoleranz in verschiedenen <i>Pseudomonaden</i> . . . . .	221

# 1 Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der quantitativen Analyse des Proteoms verschiedener *Pseudomonaden* im Hinblick auf die biotechnologische Synthese der wirtschaftlich interessanten Basischemikalien Glyoxylsäure, Butanol und Vanillin. Des Weiteren wurde auch der Metabolismus des Terpens Citronellol in *P. aeruginosa* PAO1 untersucht. Im Rahmen einer möglichen Synthese von Glyoxylsäure wurde neben Glyoxylsäure selbst auch das Edukt eines möglichen Syntheseweges (Ethylenglycol) sowohl in dem Stamm *P. putida* KT2440 als auch in dem Stamm *P. putida* JM37 mittels 2D-DIGE und labelfreier massenspektrometrischer Quantifizierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass *P. putida* JM37 drei unterschiedliche Wege zum Abbau von Glyoxylsäure verwendet, während *P. putida* KT2440 nur einen dieser Wege nutzen kann. Zudem konnte sowohl für *P. putida* KT2440 als auch *P. putida* JM37 gezeigt werden, dass die beiden Alkohol-Dehydrogenasen PedE und PedH sowie die Aldehyd-Dehydrogenase PedI beim Abbau von Ethylenglycol zu Glyoxylsäure eine entscheidende Rolle spielen. Dabei weisen alle drei Proteine eine starke Homologie zu den entsprechenden Enzymen in *P. aeruginosa* und *P. putida* U auf. Darüber hinaus waren auch einige Proteine (PedR1, PedS1), welche zu Proteinen des PedR1-Regulons (Ethanol-Abbau) in *P. aeruginosa* homolog sind, in *P. putida* KT2440 und JM37 unter Ethylenglycol induziert. Dies deutet auf eine Regulation des Ethylenglycol-Abbaus über das PedR1-Regulon in *P. putida* KT2440 hin.

Im Rahmen der Proteomanalysen zum Butanol-Metabolismus und der Butanol-Toleranz von *P. putida* KT2440 wurden sowohl aus Schüttelkolben als auch aus Bioreaktoren entnommene Proben untersucht. In beiden Ansätzen waren die bereits unter Ethylenglycol induzierten Alkohol-Dehydrogenasen PedE und PedH, die Aldehyd-Dehydrogenase PedI sowie Proteine des PedR1-Regulons induziert. Zudem konnte eine deutliche Induktion der  $\beta$ -Oxidation nach Butanol-Behandlung nachgewiesen werden. Die Induktion der  $\beta$ -Oxidation deckt sich mit dem von Rühl et al. (Rühl *et al.* (2009) *Appl. Environ. Microbiol.*) aufgrund einer  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse postulierten Abbauweg von Butanol. Auf Ebene des Citrat-Zyklus konnte eine Induktion von Enzymen des „Glyoxylat-Shunts“ gezeigt werden. Zusätzlich konnte in *P. putida* KT2440 eine Induktion verschiedener Transport-Systeme nach Butanol-Behandlung nachgewiesen werden. Eine von Rühl et al. (Rühl *et al.* (2012) *Microb. Biotechnol.*) unter Butanol beobachtete

Induktion der Fettsäurebiosynthese konnte hingegen nicht bestätigt werden.

Im Rahmen der Proteomanalyse des Vanillin-Metabolismus in *P. putida* KT2440 konnte eine Induktion des  $\beta$ -Ketoacid-Weges, über welchen Protocatechuat zu Succinyl- und Acetyl-CoA abgebaut wird, gezeigt werden. Zudem fanden sich deutliche Hinweise, dass das Enzym „Vanillin-Dehydrogenase“ für den initialen Schritt des Vanillin-Abbaus, der Umsetzung von Vanillin zu Vanillinsäure, in *P. putida* KT2440 nicht essentiell ist, sondern auch alternative Enzyme diese Reaktion katalysieren können. Als mögliche Kandidaten hierfür konnten die Enzyme Coniferylaldehyd-Dehydrogenase (PP\_5120) und Benzaldehyd-Dehydrogenase (PP\_1948) sowie weitere Aldehyd-Dehydrogenasen (PP\_2680, PP\_0545) identifiziert werden. Wie die verbesserte Akkumulation von Vanillin in den von Nadja Graf (AG Altenbuchner, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart) auf Basis der Proteomdaten erzeugten *P. putida* KT2440-Mutanten zeigte (nicht veröffentlichte Ergebnisse, Graf und Altenbuchner), können diese Daten wertvolle Hinweise für die gezielte genetische Manipulation von Bakterien und damit für die Optimierung biotechnologischer Prozesse liefern. Zudem konnte gezeigt werden, dass neben den unspezifischen Efflux-Systemen TtgABC und MexE, MexF, OprN auch für Intermediate des Vanillin-Metabolismus spezifische Transporter wie PcaK/PcaP und PP\_3739/PP\_3740 beim Wachstum auf Vanillin induziert sind.

Die Untersuchung des Terpenmetabolismus erfolgte im Gegensatz zu den übrigen in dieser Arbeit vorgestellten Analysen nicht in *P. putida*, sondern in *P. aeruginosa*, da nur dieser Organismus über die für den Terpenabbau nötige genetische Ausstattung verfügt. Im Rahmen der durchgeführten GeLCMSMS-Experimente wurde der Metabolismus des Terpens Citronellol dem der Oktansäure sowie dem von Glucose gegenübergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass der Abbau von Citronellol über die durch das *atu*- und *liv*-Gencluster kodierte Enzyme sowie über die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren verläuft. Dabei wurde einzig das Enzym „Very-long chain Acyl-CoA Synthetase“ (AtuH) nicht identifiziert. Die Proteomanalyse offenbarte jedoch eine Reihe möglicher alternativer unter Citronellol regulierter Acyl- und Acetyl-CoA-Synthetasen, welche diesen Schritt katalysieren könnten. Die Analyse verschiedener, der  $\beta$ -Oxidation zugeordneter Enzyme zeigte zudem, dass einige Enzyme möglicherweise eine Präferenz für Terpene (Citronellol) im Gegensatz zu unverzweigten Carbonsäuren (Oktansäure) aufweisen.

Neben den quantitativen Proteomanalysen im Rahmen der biotechnologischen Teilprojekte, beinhaltete diese Arbeit auch die Etablierung von geeigneten Analysemethoden. So konnten insbesondere für die Quantifizierung von Membranproteinen und des Gesamtproteoms geeignete Methoden der Probenvorbereitung und Quantifizierung etabliert werden. Mit Hilfe einer Carbonatextraktion und anschließender labelfreier massenspektrometrischer Quantifizierung konnte eine Vielzahl von, in 2D-DIGE-Analysen nur schwer zu erfassenden, Membranproteinen identifiziert und quantifiziert

---

werden. Des Weiteren konnte für die Analyse des Gesamtproteoms ein GeLCMSMS-Ansatz, welcher die Identifizierung und Quantifizierung von etwa 30% aller in *P. putida* KT2440 kodierter Proteine erlaubt, etabliert werden. Verschiedene Methoden der Proteomanalyse können somit einen wertvollen Beitrag zur biotechnologischen Stammentwicklung und zum Verständnis zellulärer Netzwerke leisten.

## 2 Summary

The main focus of this work was a quantitative proteome analysis of a variety of *Pseudomonas* strains with respect to the biotechnological synthesis of the base chemicals glyoxylic acid, butanol and vanillin. In addition, effects of the terpene citronellol on the proteome of *P. aeruginosa* were investigated.

In a first set of experiments, the effects of glyoxylic acid and ethylene glycol, the educt of a possible biotechnological route to glyoxylic acid, on the proteome of *P. putida* KT2440 and JM37 were analysed. Using a 2D-DIGE and a label-free MS-based quantification approach it could be demonstrated that *P. putida* JM37 metabolizes glyoxylic acid via three different catabolic routes, whereas *P. putida* KT2440 appeared to be restricted to a single pathway. Furthermore, it was shown that the alcohol dehydrogenases PedE and PedH as well as the aldehyde dehydrogenase PedI play a crucial role in the conversion of ethylene glycol to glyoxylic acid in both *P. putida* KT2440 and JM37. All three enzymes exhibit a high degree of homology to the respective proteins in *P. aeruginosa* and *P. putida* U. Moreover, the increased expression of the regulatory proteins PedR1 and PedS1 indicates a role of the conserved PedR1-regulon in the degradation of ethylene glycol in *P. putida* KT2440 and JM37.

Samples for the proteome analysis of butanol metabolism were either obtained from shaking-flask cultures or from cultivation in a bioreactor. In both samples, an increased expression of the alcohol and aldehyde dehydrogenases (PedE, PedH, PedI) as well as an induction of several regulatory proteins of the PedR1-Regulon was observed. This result is consistent with the findings from the ethylene glycol experiment and suggests a role of this regulon in the degradation of both substances. In addition, an induction of the  $\beta$ -oxidation pathway was detected upon treatment with butanol. This finding is in line with the biodegradation pathway of butanol that was suggested by Rühl et al. (Rühl et al. (2009) *Appl. Environ. Microbiol.*) based on a  $^{13}\text{C}$ -flux analysis. Moreover, an induction of several membrane transport systems like the ABC-Transporter PedA, B, C and the porin PP\_2662 was observed. However, an increased biogenesis of fatty acids as shown by Rühl et al. (Rühl et al. (2012), *Microb. Biotechnol.*) could not be confirmed since no up-regulation of corresponding proteins was detected.

After growth on vanillin, *P. putida* KT2440 showed an increased expression of almost all enzymes involved in the multistep conversion of protocatechuate to succinyl-

---

and acetyl-CoA ( $\beta$ -keto adipate pathway). An exclusive role of vanillin dehydrogenase (Vdh) in the first step of the vanillin degradation pathway, the conversion of vanillin to vanillic acid, was not supported by the proteomics data as Vdh was not up-regulated in vanillin grown cells. Other aldehyde dehydrogenases that were significantly induced in the presence of vanillin, like conifer aldehyde dehydrogenase (PP\_5120), a potential benzaldehyde dehydrogenase (PP\_1948), and the aldehyde dehydrogenases PP\_2680 and PP\_0545, might also catalyze this reaction. Besides the induction of the solvent extrusion systems TtgABC and MexE, MexF, OprN, an induction of transporters specific for vanillin and its degradation intermediates was observed. Among these transporters were the proteins PcaK/PcaP (protocatechuate and 4-hydroxy benzoate transport) and PP\_3739/PP\_3740 (putative vanillic acid transport-system). The potential of proteomics to contribute to biotechnological strain development was demonstrated by the accumulation of vanillin in *P. putida* KT2440 mutants, which were generated by Nadja Graf (AG Altenbuchner, Institut für Industrielle Genetik, University of Stuttgart) on the basis of these proteomics data.

Since *P. putida* lacks several essential genes for the degradation of terpenes, the analysis of the terpene metabolism was carried out in *P. aeruginosa*. In this analysis, the proteome response of cells grown in the presence of citronellol was compared to the proteome of cells grown in the presence of octanoic acid or glucose. The obtained data indicate that the degradation of citronellol is catalyzed by enzymes encoded by the *liu*- and *atu*-gene clusters and by enzymes involved in the  $\beta$ -oxidation of fatty acids. Only one enzyme postulated to be part of the terpene degradation pathway, the “putative very-long chain acyl-CoA synthetase” (PA2893), eluded identification in this study. Instead, several acetyl- and acyl-CoA dehydrogenases could be identified, which were up-regulated in cells grown in the presence of citronellol and might be able to catalyze this reaction. Differences in the regulation pattern of enzymes involved in  $\beta$ -oxidation between cells grown on terpenes and the ones grown on the straight chain fatty acid octanoic acid suggest a preference of several of these enzymes for terpenes.

A second key aspect of this work involved the establishment of proteomics methods for the analysis of complex samples, especially for the analysis of membrane proteins. Using carbonate extraction followed by label-free MS-based quantification allowed the identification and quantification of a significant number of hydrophobic proteins which were not covered by the 2D-DIGE approach. In addition, the GeLCMSMS workflow was found to be a simple and efficient method for the analysis of total bacterial lysates. Using this method, about 30% of all proteins encoded by the *P. putida* KT2440 genome could be identified and quantified. In conclusion, this work demonstrated that different proteomics methods can substantially contribute to biotechnological strain development and the understanding of cellular networks.

## 3 Einleitung

### 3.1 Systembiologie in *Pseudomonas putida*

#### 3.1.1 *Pseudomonas putida*

*Pseudomonaden* sind gram-negative, chemoorganotrophe, aerobe, stäbchenförmige Proteobakterien, welche insbesondere aufgrund ihres anpassungsfähigen Metabolismus von großem biotechnologischem Interesse sind. Angehörige der Art *Pseudomonas putida* sind in einer Vielzahl von Habitaten, darunter Boden, Süßwasser und Rhizosphäre beheimatet, wo sie meist saprotroph leben (Timmis, 2002). Aufgrund dieser Diversität sind sie in der Lage, eine große Zahl unterschiedlicher Kohlenstoffquellen zur Energiegewinnung und zum Aufbau von Biomasse zu erschließen. Ihre Eignung für biotechnologische Prozesse verdanken sie neben ihrem breiten metabolischen Spektrum auch ihrer guten Kultivierbarkeit sowie der molekularbiologischen Zugänglichkeit (Review: Poblete-Castro *et al.* 2012).

Bakterien der Gattung *Pseudomonas* zeichnen sich zudem durch einige Besonderheiten in ihrem Zentralstoffwechsel aus. Wie auch andere in der industriellen Biokatalyse verwendete Bakterienstämme verfügen *Pseudomonaden* über ein ausgeklügeltes System katabolischer Repression (Ng *et al.*, 1967; Hylemon *et al.*, 1972), welches bestimmte Kohlenstoffquellen priorisiert. Im Gegensatz zu *E.coli* stellt jedoch nicht Glucose sondern Succinat (oder andere Intermediate des Citratzyklus) die bevorzugte Kohlenstoffquelle dar (Tiwari *et al.*, 1969). Der hierfür verantwortlichen Regulator (Crc) wurde von Wolff *et al.* (1991) identifiziert.

Die Aufnahme von Glucose über die äußere Membran erfolgt über das Porin OprB, der Transport über die innere Membran durch den „Sugar ABC Transporter“ oder über den Umweg von Gluconat bzw. 2-Ketogluconat und den zugehörigen Transportern GntP bzw. KguT. Ein Phosphotransferase System existiert nicht. Da *Pseudomonas putida* nicht über das für den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP-Weg) essentielle Enzym 6-Phosphofruktokinase (Pfk) verfügt (Sawyer *et al.*, 1977; Tiwari *et al.*, 1969; Wood *et al.*, 1954), wird Glucose über den Entner-Doudoroff Weg abgebaut. Im Gegensatz hierzu sind alle Enzyme (Fructose 1,6 bisphosphatase, etc.) für den Ablauf des reversen EMP-Weges und damit für die Gluconeogenese in *Pseudomonaden* vorhanden. Neben Glucose und Intermediaten des Citratzyklus können *Pseudomonaden* noch eine Vielzahl

weiterer aliphatischer und aromatischer Verbindungen als Kohlenstoffquelle nutzen. Für umfangreiche systembiologische Analysen wurde der in dieser Arbeit vorwiegend verwendete Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 durch die Sequenzierung des Gesamtgenoms im Jahr 2002 durch Nelson *et al.* (2002) zugänglich. Basierend auf einer Analyse des Genoms, sagten Jiménez *et al.* (2002) vier zentrale Abbaupfade für Aromaten über Protocatechuat (*pca*-Gene), Catechol (*cat*-Gene), Homogentisat (*hmg*-Gene) oder Phenylacetat (*pha*-Gene) vorher. Zusätzlich postulierten sie noch weitere in diese Wege mündende Stoffwechselwege. Eine erste umfangreiche Proteomics-Studie beleuchtete Änderungen des Proteoms in *Pseudomonas putida* KT2440 und *Pseudomonas aeruginosa* PA01 unter Ionenmangel-Stress (Heim *et al.*, 2003). Es folgten weitere Proteomics-Studien zur Lösungsmitteltoleranz gegenüber Phenol (Santos *et al.*, 2004) und Toluol (Segura *et al.*, 2005; Wijte *et al.*, 2010) sowie eine kombinierte Transcriptomics- und Proteomics-Studie zum Abbau von p-Hydroxybenzoat (Verhoef *et al.*, 2010). Die von Jiménez *et al.* (2002) postulierten Abbaupfade für aromatische Verbindungen konnten von Kim *et al.* (2006) auf Proteomebene bestätigt und ergänzt werden. Der Mechanismus der katabolischen Repression wurde im Rahmen einer Co-Metabolisierung von Toluol und Glucose von Del Castillo und Ramos (Del Castillo *et al.*, 2007b) untersucht und beschrieben. Eine Modellierung des Metabolismus von *Pseudomonas putida* KT2440, welche auf Genomdaten basiert, wurde von Puchałka *et al.* (2008) veröffentlicht.

### 3.1.2 Systembiologie

Den Begriff „Systembiologie“ eindeutig und universell zu definieren, erscheint aufgrund der verschiedenen Herangehensweisen an dieses Forschungsgebiet und dessen interdisziplinärer Ausrichtung äußerst schwierig. Neben verschiedenen Definitionen, die aus konkreten systembiologischen Fragestellungen abgeleitet werden können, bietet sich auch eine historische Betrachtung des Begriffs an. Die Anfänge der Systembiologie lassen sich auf die Arbeiten von Ludwig von Bertalanffy und dessen Buch „General Systems Theory“ zurückführen (Bertalanffy, 1968). Die darin beschriebene Systemtheorie ist als Gegenentwurf zu der nach Bertalanffys Meinung vorherrschenden isolierten Betrachtung verschiedener Phänomene zu verstehen und rückt die Betrachtung von Zusammenhängen und der Gesamtheit eines Systems in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Diese generelle Systemtheorie bezieht sich dabei nicht nur auf die Natur-, sondern gleichermaßen auf die Sozial- und Rechtswissenschaften. Der zur gleichen Zeit von N. Wiener geprägte Begriff der Kybernetik (engl. Cybernetics) überträgt zudem die technischen Begriffe der Steuerung und Regelung auf biologische Systeme und setzt damit einzelne Teile in „regulatorischen Netzwerken“ zueinander in Bezug (Wiener,

1948). Beide Autoren begründen damit eine neue systemische Betrachtung in der Biologie. Die große Zeitspanne, die zwischen der zu dieser Zeit begründeten Theorie und der heutigen, praktischen Anwendung liegt, lässt sich vornehmlich durch die benötigte Menge an Information, die zu einer umfassenden systemischen Beschreibung notwendig ist, erklären. Erst durch die in der „Post Genomic Era“ entwickelten Hochdurchsatz-Technologien und der gleichzeitigen rasanten Entwicklung der Informationstechnologie ist es möglich, umfangreiche Daten über ein System zu sammeln und auszuwerten.

Eine aktuelle und generalistische Definition der Systembiologie wurde von Ideker *et al.* (2001) aufgestellt: Darin wird die Systembiologie als ein Wissenschaftszweig beschrieben, der durch gezielte Perturbation eines biologischen Systems und der anschließenden Beobachtung der Reaktion auf Gen-, Protein- und Netzwerkebene, Daten über die Struktur dieses Systems erhebt und anschließend zur mathematischen Modellierung des Systems einsetzt. Als Arbeitsdefinition erscheint jedoch die Betrachtung der Systembiologie von Kitano (Kitano, 2002) als geeigneter. Das Wissen über ein System begründet sich demnach auf dem Verständnis der Struktur, der Dynamik sowie der Kontrollmechanismen des Systems. Das Genom (und teilweise auch das Proteom) stellt hierbei lediglich eine Liste von Bauteilen dar. Erst durch die Analyse der räumlichen und zeitlichen Verhältnisse dieser Teile zueinander kann das System beschrieben werden.

#### 3.1.3 Proteomics

Eine Möglichkeit, die oben erwähnten Zusammenhänge zu analysieren, stellt die in dieser Arbeit verwendete Technik der Proteomanalyse (Proteomics) dar. Der Begriff Proteom leitet sich von Genom, der Bezeichnung für die Gesamtheit aller Gene in einer Zelle, ab. Somit beschreibt der Begriff des Proteoms die Gesamtheit aller Proteine (Wilkins *et al.*, 1996; Wasinger *et al.*, 1995) und Proteomics das OMICS-Feld, welches sich der Analyse des Proteoms widmet. Im Vergleich zum Genom ist die Gesamtheit aller Proteine über die Zeit deutlich variabler und somit um ein vielfaches komplexer als das zugrundeliegende Genom. Je nach Umgebungsbedingung, Zell- und Gewebetyp oder auch dem Alter eines Organismus unterscheidet sich das „spezifische“ Proteom teils dramatisch. Durch alternatives Splicing (Eukaryoten) sowie einer Vielzahl verschiedener posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glycosylierungen wird die Gesamtzahl möglicher Proteine bzw. Proteinisoformen weiter erhöht. Zusätzlich zur Komplexität des Proteoms spielt auch die stark variable Anzahl der möglichen Kopien eines Proteins in der Zelle für die Analyse eine entscheidende Rolle. Während in der Regel lediglich ein bis zwei Kopien eines jeden Gens in einer Zelle vorliegen, kann die Anzahl an Kopien der daraus resultierenden Proteine um mehrere Größenordnungen schwanken.

So vielgestaltig wie das Proteom selbst, sind daher die Methoden, die in den letzten Jahren zu dessen Analyse entwickelt wurden. Neben der reinen Identifizierung von Proteinen gewinnen quantitative Analysen zunehmend an Bedeutung (Review: Schulze *et al.* 2010). So wurde die zu Beginn vorherrschende 2D-Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975; Klose, 1975) seit ihren Anfängen weiterentwickelt und für quantitative Fragestellungen optimiert.

Die 1997 von Unlü *et al.* (1997) publizierte DIGE-Methode (Difference Gel Electrophoresis) ermöglicht erstmals die Quantifizierung zweier, mittels Fluoreszenzfarbstoffen markierter Proben auf einem Gel (siehe Abschnitt 3.3.6). Als Alternative zur 2D-Elektrophorese wurden Methoden zur Fraktionierung und Analyse von Proteinen entwickelt, die auf eine vorherige Gelelektrophorese gänzlich verzichten. Da diese Methoden auf der Analyse von Peptiden und nicht auf der Analyse von unverdauten Proteinen basieren, werden sie häufig unter dem Begriff „Shotgun Proteomics“ zusammengefasst. Im Bereich der Shotgun Proteomics wurden verschiedene Quantifizierungsverfahren entwickelt, welche sich grob in die drei Bereiche der metabolischen Markierung ( $^{15}\text{N}$  und „Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture“ (SILAC)), der chemischen Markierung („Isotope-Coded Affinity Tag“ (ICAT), „Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)“) sowie der labelfreien Quantifizierung („Extracted Ion Chromatogram“ (XIC), Spectral Counting) einteilen lassen. Die beiden bekanntesten Techniken der metabolischen Markierung ( $^{15}\text{N}$  und SILAC) basieren auf den chemisch identischen Eigenschaften „leichter“ und „schwerer“ Peptide, welche sich lediglich in ihrer Masse unterscheiden. Da die Markierung der „Proben“ bereits *in vivo* erfolgt, können technische Varianzen stark reduziert werden ( $^{15}\text{N}$ = Oda *et al.* 1999, SILAC= Ong *et al.* 2002). Bei Verfahren zur chemischen Markierung werden Proteine oder Peptide mittels eines „Tags“ markiert und anhand desselben auf MS- oder MS/MS-Ebene quantifiziert. Dabei erfolgt die Vereinigung der Proben erst vor der eigentlichen MS-Analyse (ICPL= Schmidt *et al.* 2005, ICAT= Gygi *et al.* 1999, iTRAQ= Ross *et al.* 2004), was eine im Vergleich zur metabolischen Markierung erhöhte technische Varianz nach sich zieht. Im Bereich der labelfreien Ansätze haben sich zwei unterschiedliche Quantifizierungsstrategien etabliert. Neben der Quantifizierung der Peakflächen des Elutionsprofils eines Peptids (XIC), kann auch die Anzahl der aufgenommenen Fragmentierungsspektren für eine labelfreie Quantifizierung herangezogen werden (XIC= Bondarenko *et al.* 2002; Chelius *et al.* 2002; Spectral Count= Liu *et al.* 2004). Da bei labelfreien Methoden die Analyse der zu vergleichender Proben in separaten MS- bzw. MS/MS-Messungen erfolgt, stellen diese Methoden die höchsten Anforderungen an die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung und der Analytik. Ist diese gegeben, sind labelfreie Ansätze leicht zu handhaben und vor allem kosteneffizient.

Die Entwicklung dieser Methodenvielfalt ist eng mit dem rasanten technischen Fort-

schritt im Bereich der MS-Geräte und bioinformatischer Applikationen verknüpft. Welche der oben erwähnten Methoden für eine bestimmte Fragestellung oder biologische Proben geeignet ist, hängt von vielerlei Faktoren ab. Die in dieser Arbeit angewandten Techniken werden daher in Abschnitt 3.3 genauer erläutert.

## 3.2 Biotransformationen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind anhand der untersuchten Substanzen in die vier Teilprojekte „Ethylenglycol/Glyoxylsäure“, „Butanol“, „Vanillin“ und „Terpene“ untergliedert.

In den folgenden Abschnitten werden die für diese Arbeit relevanten Biotransformationen kurz vorgestellt. Dabei wird auf die bereits auf diesen Gebieten publizierten, sowie die geplanten biotechnologischen Synthesewege eingegangen.

### 3.2.1 Synthese von Glyoxylsäure aus Ethylenglycol

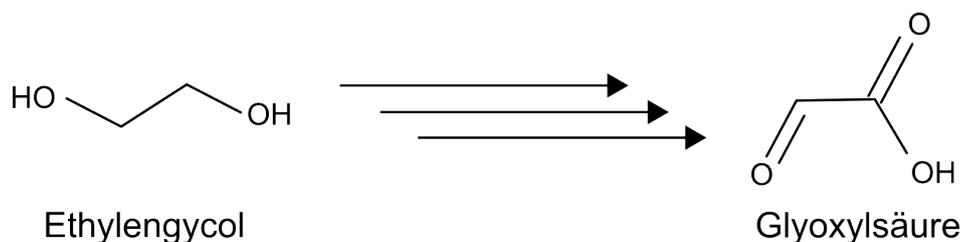


Abbildung 3.1: Oxidation von Ethylenglycol zu Glyoxylsäure.

Ziel dieses Teilprojektes war es, einen biotechnologischen Weg zur Gewinnung von Glyoxylsäure aus Ethylenglycol mit industrierelevanten Produktausbeuten zu etablieren. Als Basischemikalie ist Glyoxylsäure von großem wirtschaftlichem Interesse, da sie einen wichtigen Grundstoff für die Synthese von Antibiotika, Aromastoffen und Pharmaka darstellt. Die chemische Synthese von Glyoxylsäure erfolgt durch Oxidation von Glyoxal durch saure Katalyse mit Salpetersäure (Mattioda, 2000). Glyoxal wird großtechnisch meist durch kupfer-katalytische Oxidation von Ethylenglycol gewonnen, kann aber auch durch die Oxidation von Acetaldehyd mit Salpetersäure hergestellt werden. Alle chemischen Synthesewege weisen jedoch geringe Ausbeuten sowie eine hohe Zahl an Nebenprodukten auf (Sajtos, 1991; Mattioda, 2000).

Neben diesen chemischen Synthesewegen sind auch einige biotechnologische Wege in der Literatur beschrieben. Ein 1995 publizierter biotechnologischer Ansatz beschreibt die Herstellung von Glyoxylsäure durch enzymatische Oxidation von Glycolsäure (Gavagan *et al.*, 1995). Darin wurde das Enzym Glycolatoxidase aus Spinat rekombinant

in *Hansenula polymorpha* und *Pichia pastoris* exprimiert. Die anschließende Umsetzung mit permeabilisierten Zellen ergab eine Ausbeute von über >98% (Gavagan *et al.*, 1995).

Ein zweiter enzymatischer Syntheseweg beschreibt die Umsetzung von Glycolsäure zu Glyoxylsäure durch das Enzym Glyceroloxidase aus *Aspergillus japonicus* (Isobe, 1995). Aufgrund der kompetitiven Hemmung des Enzyms durch Glyoxylsäure konnten jedoch keine hohen Ausbeuten erzielt werden. Eine chemisch-enzymatische Synthese wurde von Yadav *et al.* (2000) publiziert. Hierbei wurde in einem ersten chemischen Schritt Glyoxal zu Glycolsäure umgesetzt und diese im Anschluss enzymatisch durch das Enzym Glycolatoxidase zu Glyoxylsäure oxidiert. Nachteile dieses Weges waren wiederum die geringe Ausbeute (20%) sowie die durch Überoxidation entstandenen Nebenprodukte Oxalat und Formiat.

Der in diesem Projekt verfolgte Ansatz sollte, im Gegensatz zum chemisch-enzymatischen System, die Umsetzung von Ethylenglycol zu Glyoxylsäure in einem Ganzellsystem ermöglichen. Mikroorganismen, welche Ethylenglycol als einzige Kohlenstoffquelle nutzen und somit die nötige Enzymausstattung besitzen, sind bereits aus der Literatur bekannt (Fincher *et al.*, 1962; Gaston *et al.*, 1963; Gonzalez *et al.*, 1972; Child *et al.*, 1978; Kataoka *et al.*, 2001). Innerhalb der Gattung *Pseudomonas* können einige Arten Ethylenglycol als einzige Kohlenstoffquelle nutzen, andere sind lediglich zur Co-Metabolisierung von Ethylenglycol befähigt. Neben der Synthese ist auch der Abbau von Glyoxylsäure in Mikroorganismen für eine biotechnologische Herstellung von Glyoxylsäure von Bedeutung. Eine Abwandlung des Citratzyklus, welche beim Wachstum auf Acetat über Glyoxylsäure als Intermediat verläuft, wurde erstmals 1957 von Kornberg und Krebs in *Pseudomonas sp.* beschrieben und als „Glyoxylatzyklus“ bzw. „Glyoxylat-Bypass“ bezeichnet (Kornberg *et al.*, 1957) (Abb. 3.2).

Wie Kornberg und Krebs (Kornberg *et al.*, 1957) feststellten, ermöglicht dieser Stoffwechselweg eine Synthese von C<sub>4</sub>-Körpern auch dann, wenn Acetat als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Vier Jahre später zeigten Kornberg und Sadler (Kornberg *et al.*, 1961b) in *E. coli*, dass Glycolsäure über Glyoxylsäure vollständig metabolisiert werden kann. Der hierfür postulierte Weg stellt eine Abwandlung des Glyoxylatzyklus dar und wurde als „Dicarboxylic Acid Cycle“ beschrieben. Hierbei wird Oxaloacetat über Pyruvat in Acetyl-CoA umgewandelt und erneut mit Glyoxylat zu Malat umgesetzt (Kornberg *et al.*, 1961b). Da dieser Zyklus zwei Decarboxylierungsschritte enthält ist eine zusätzliche Bereitstellung von Acetyl-CoA für das Wachstum auf Glycolat bzw. Glyoxylat nötig. Ein Stoffwechselweg, welcher Wachstum auf Glyoxylat als einziger Kohlenstoffquelle erlaubt, verläuft über Glycerat, welches aus zwei Molekülen Glyoxylat gebildet und über Pyruvat in Acetyl-CoA bzw. Oxaloacetat umgewandelt wird (Kornberg *et al.*, 1961b; Ornston *et al.*, 1969) (Abb.: 3.3).

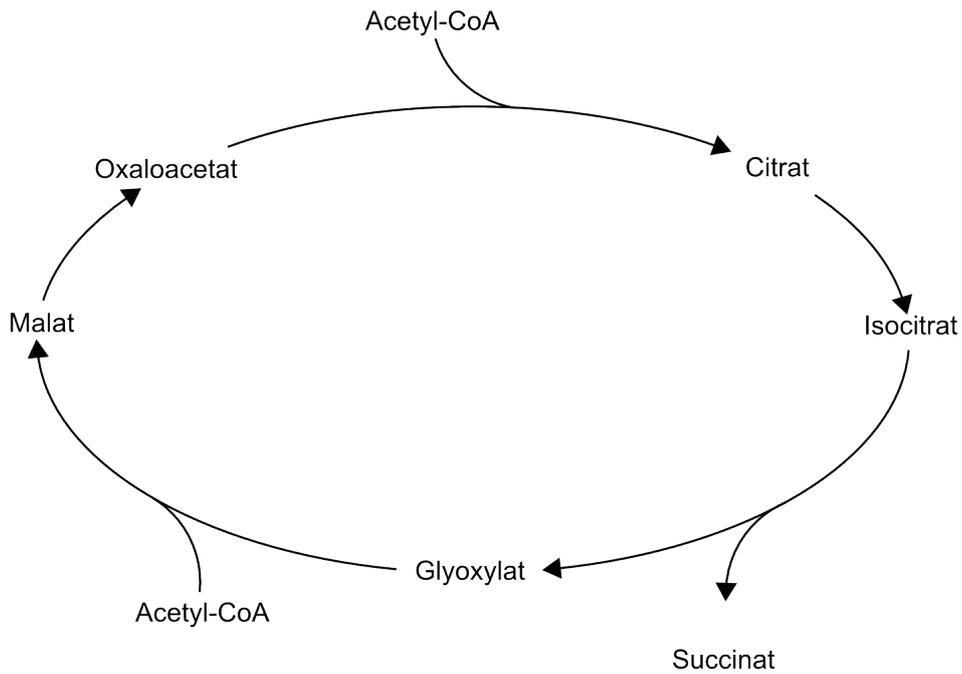


Abbildung 3.2: Glyoxylat-Zyklus nach Kornberg *et al.* (1957).

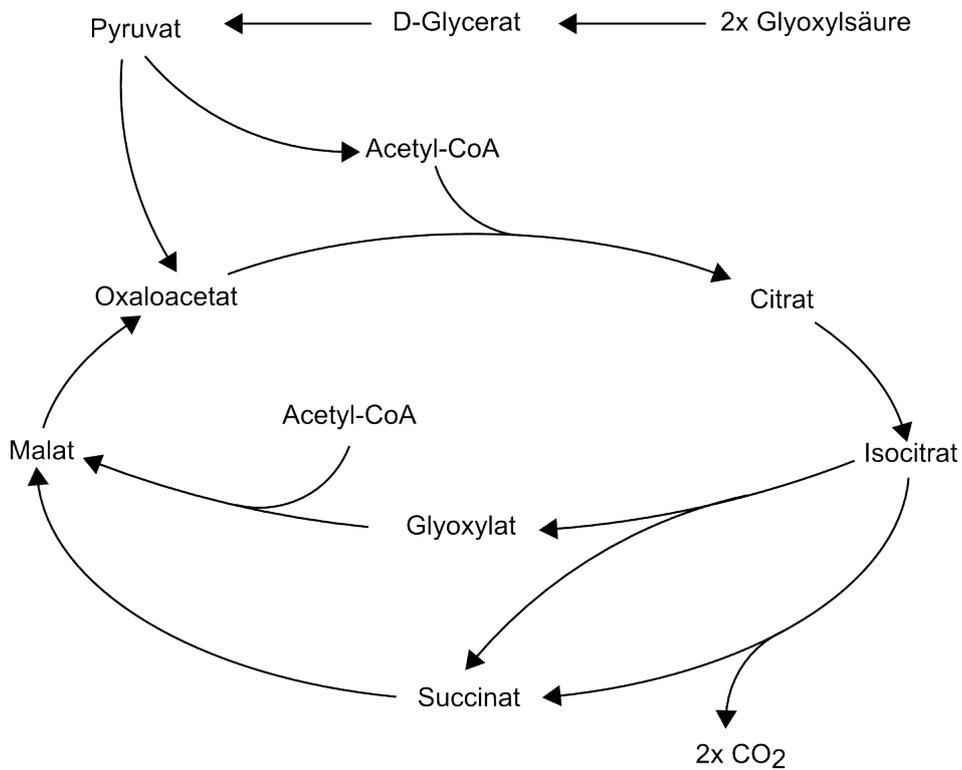


Abbildung 3.3: Abbau von Glyoxylat über den so genannten Glycerat-Weg (Kornberg *et al.*, 1961b; Ornston *et al.*, 1969).

Aufbauend auf diesem Modell postulierten Gonzalez *et al.* (1972), den Abbau von Ethylenglycol über Glycolat in einem nicht näher charakterisierten Wildtypisolat (ATCC 27042). Child *et al.* (1978) zeigten in *Flavobacterium* NCIB 11171, dass der Abbau von Ethylenglycol über das Zwischenprodukt Glycolaldehyd verläuft. Zudem stellten sie eine Überoxidation von Glyoxylsäure zu Oxalat fest (Child *et al.*, 1978). Insgesamt konnten in *Pseudomonas sp.* drei unterschiedliche Wege zum Abbau von Glyoxylat identifiziert werden, wovon einzig der Weg über Glycerat ein Wachstum auf Glyoxylat als einziger Kohlenstoffquelle erlaubte (Kornberg *et al.*, 1959; Kornberg *et al.*, 1961a; Bailey *et al.*, 1966).

Die Relevanz dieser drei Wege für die Umsetzung von Glyoxylsäure wurde durch Inaktivierung der maßgeblichen Enzyme von Li *et al.* (2010) in *Pseudomonas putida* JM37 untersucht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit *Pseudomonas putida* KT2440 auf seine Eignung für die Biokatalyse von Glyoxylsäure aus Ethylenglycol untersucht.

### 3.2.2 Lösungsmitteltoleranz in Mikroorganismen

In den im Folgenden vorgestellten Teilprojekten „Biotechnologische Herstellung von Butanol“ und „Biotechnologische Herstellung von Vanillin“ kommt der Resistenz der verwendeten Mikroorganismen gegenüber den Syntheseprodukten (aber auch Edukten) eine zentrale Bedeutung zu. Sowohl Butanol als auch Vanillin wirken in höheren Konzentrationen stark toxisch auf Mikroorganismen, was in direktem Zusammenhang mit dem jeweiligen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $\log P_{O/W}$ ) steht. Entscheidend für die Toxizität ist dabei die Einlagerung des Lösungsmittels in die Plasmamembran und deren daraus resultierenden Veränderungen (Sikkema *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1996). Diese reichen von einer Änderung der Membranpermeabilität über einen möglichen Zusammenbruch des Protonengradienten bis hin zu Änderungen des Ladungszustandes der Zelle. Ein Anstieg des  $\log P_{O/W}$  führt jedoch nur in einem engen Bereich (zwischen 1 und 4) auch zu einem Anstieg der Toxizität. Substanzen, die einen höheren  $\log P_{O/W}$  aufweisen (wie z.B. Dodecanol 5,3), erreichen aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in wässrigen Lösungen keine ausreichend hohe Konzentration in der Membran. Substanzen mit einem geringen  $\log P_{O/W}$  wie Ethanol ( $\log P_{O/W}$  0,32) sind nicht ausreichend lipophil, um bevorzugt in Membranen zu akkumulieren (Weber *et al.*, 1996) und wirken ggf. nur in hohen Konzentrationen toxisch. Dieser Zusammenhang zwischen  $\log P_{O/W}$  und Toxizität gilt für Alkanole und Aromaten gleichermaßen. Sowohl Butanol ( $\log P_{O/W}$  0,9) als auch Vanillin ( $\log P_{O/W}$  1,2) sind daher als für Mikroorganismen toxisch anzusehen. Um eine Akkumulation dieser Substanzen in der Membran zu verringern bzw. die hierdurch ausgelösten Effekte zu kompensieren, greifen Mikroorganismen auf eine Reihe

verschiedener Mechanismen zurück (Ramos *et al.*, 2002). Die meisten Anpassungen beruhen auf einer verstärkten Abschottung der Zelle, welche durch eine Verfestigung der Membran und/oder einer Änderung der Membranladung erreicht wird. Eine unmittelbare Anpassung erfolgt hierbei durch den Mechanismus der „*cis-trans*-Isomerisierung“, welcher die in der Membran eingebauten *cis*-Fettsäuren in den *trans*-Zustand überführt und damit für eine dichtere Packung der Membran sorgt (Heipieper *et al.*, 1992). Einen vergleichbaren Effekt hat die unter Lösungsmittelstress vermehrte Synthese gesättigter Fettsäuren, welche im Rahmen einer längerfristigen Adaption eintritt (Pinkart *et al.*, 1996). Auch eine Veränderung des Verhältnisses der Kopfgruppen der Phospholipide kann stabilisierend auf die Membran wirken (Weber *et al.*, 1996). Da die letztgenannten Anpassungen nur durch Neusynthese von Phospholipiden erreicht werden können, zeigen Organismen, welche diese Form der Anpassung beherrschen, einen erhöhten Umsatz von Phospholipiden und eine erhöhte Fettsäuresynthese. Bei gram-negativen Bakterien kann die Hydrophobizität der Membran zusätzlich durch eine Veränderung des Lipopolysaccharids (LPS) verringert und damit die Resistenz gegenüber hydrophoben Substanzen erhöht werden (Pinkart *et al.*, 1996; Aono *et al.*, 1997).

Von der Tatsache abgesehen, dass ein großer Teil der oben beschriebenen Veränderungen durch spezifische Enzyme katalysiert wird, lassen Analysen des Proteoms und hierbei insbesondere des Membranproteoms, noch weitere Veränderungen erkennen. So zeigen *Pseudomonaden* unter lösungsmittelinduziertem Stress eine vermehrte Expression von Chaperonen und Antioxidanzien, wie sie aus anderen Studien zur Lösungsmitteltoleranz bekannt sind (Santos *et al.*, 2004). In speziellen Fällen, in denen eine organische Substanz intrazellulär metabolisiert oder als Kohlenstoffquelle genutzt werden kann (Vanillin, Butanol), ist eine Verringerung der Toxizität auch auf diesem Weg möglich. Laut Isken *et al.* (1998) spielt die Metabolisierung toxischer Substanzen in *Pseudomonaden* jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Weitere Anpassungsvorgänge betreffen das Membranproteom, wobei sowohl in der äußeren als auch der inneren Membran starke Veränderungen in der Proteinexpression zu beobachten sind. Während die äußere Membran durch die Regulation verschiedener Porine (Roma-Rodrigues *et al.*, 2010) ihre Permeabilität für bestimmte Substanzen verändert, werden in der inneren Membran vor allem Transportproteine, welche aktiv organische Substanzen aus der Zelle transportieren, verstärkt exprimiert (Segura *et al.*, 2003). Ein großer Teil dieser Transporter weist ein breites Substratspektrum sowohl für aliphatische als auch aromatische Substanzen auf. Die für diese Arbeit relevanten organischen Substanzen sowie deren Metabolismus werden in den beiden folgenden Abschnitten näher beschrieben.

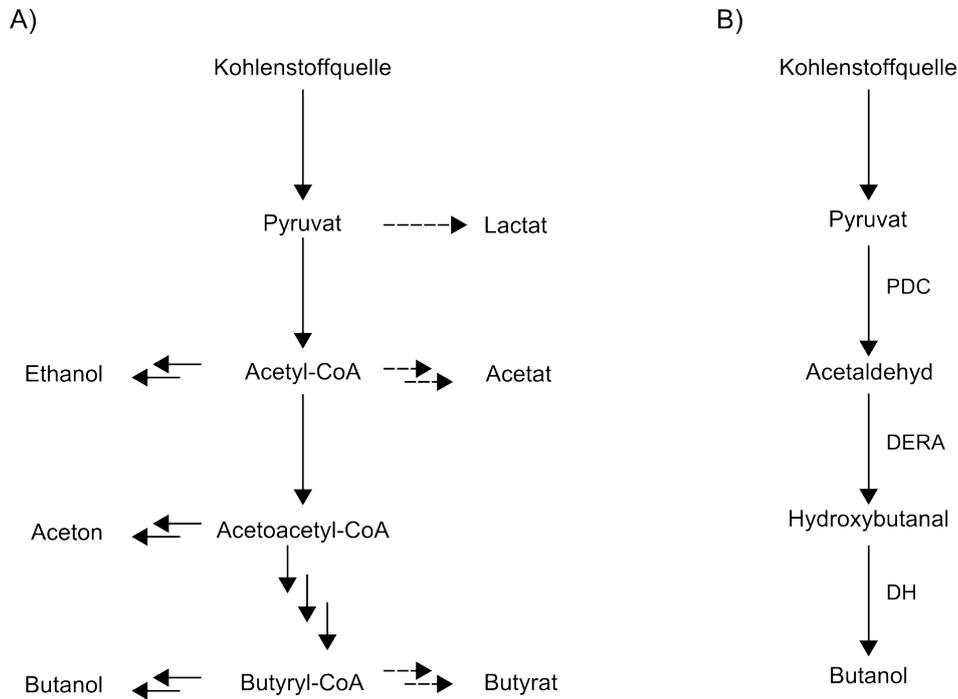
### 3.2.3 Biotechnologische Herstellung von Butanol

Ziel dieses Teilprojekts ist es, einen neuartigen biotechnologischen Weg zur Gewinnung von n-Butanol aus Glucose zu etablieren. Die mikrobiologische Herstellung von Butanol wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts in *Clostridien* realisiert und großtechnisch angewandt. Das von Weizmann (1915) isolierte Bakterium, welches von McCoy *et al.* (1926) als *Clostridium acetobutylicum* charakterisiert wurde, synthetisiert sowohl Aceton als auch Butanol und Ethanol. Im Gegensatz zum heutigen wirtschaftlichen Interesse an Butanol war seinerzeit das in diesem Prozess synthetisierte Aceton von großer wirtschaftlicher Bedeutung, da es für die Herstellung von Kordit benötigt wurde. Butanol fiel im Rahmen der Herstellung von Aceton lediglich als Nebenprodukt an und wurde erst später als Lösungsmittel in Lacken industriell relevant (Dürre, 1998). In den 1950er Jahren wurde die mikrobielle Herstellung von Butanol zunehmend durch die petrochemische Herstellung verdrängt. Das erneute Interesse an „Biobutanol“ in der heutigen Zeit ist eng mit der Suche nach regenerativen Energieträgern, großen Fortschritten in der synthetischen Biologie (und Biotechnologie) sowie steigenden Preisen für petrochemische Produkte verknüpft. Aus wirtschaftlicher Sicht bringt die noch heute in China und Brasilien praktizierte klassische ABE-Fermentation (Hauptprodukte der Synthese: Aceton, Butanol, Ethanol) jedoch einige Nachteile mit sich (Dürre, 2011). Neben hohen Kosten für die benötigten Edukte wie Zucker oder Stärke, auf welche *Clostridien* als Kohlenstoffquelle angewiesen sind, fallen auch die niedrigen Ausbeuten (max. 2% (w/v)), die hohe Anzahl an Nebenprodukten sowie die energieintensive Abtrennung des Butanols wirtschaftlich ins Gewicht (Green, 2011). Zusätzliche Probleme bereiten die schlechte genetische Zugänglichkeit sowie der sporenbildende Lebenszyklus der obligat anaeroben gram-positiven *Clostridien*.

Neben diversen Ansätzen, welche entweder durch prozesstechnische Optimierung (Beimischung von Glycerol (Vasconcelos *et al.*, 1994) oder durch biotechnologische Eingriffe (Mermelstein *et al.*, 1993) versuchten, die Ausbeuten der klassischen ABE-Fermentation zu erhöhen, gab es in den vergangenen Jahren vermehrt Versuche, die für die Butanol-Synthese entscheidenden Enzyme heterolog in einfacher zugänglichen Organismen zu exprimieren. Die Expression des Butanol-Synthesewegs aus *Clostridium acetobutylicum* in *Escherichia coli* wurde 2008 erstmals von Inui und Atsumi *et al.* publiziert (Inui *et al.*, 2008; Atsumi *et al.*, 2008a), die Expression dieser Gene in *Saccharomyces cerevisiae* von Steen *et al.* (2008). Ein alternativer Ansatz, welcher die Synthese des Butanols an den Aminosäurestoffwechsel koppelt, wurde von Shen und Atsumi *et al.* (Shen *et al.*, 2008; Atsumi *et al.*, 2008b) vorgestellt. Bis heute konnten jedoch mit keinem dieser Ansätze nennenswerte Butanolausbeuten erzielt werden.

Der im Rahmen dieses Projektes angestrebte Syntheseweg verläuft von Glucose über

Pyruvat zu Acetaldehyd. Die anschließende Synthese von 1-Butanol erfolgt über die Zwischenprodukte 3-Hydroxy-1-Butanal und 1,3-Butandiol, welche über eine klonierte „2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphat-Aldolase“ (DERA) synthetisiert werden. Dieser Syntheseweg sowie die klassischen ABE-Fermentation sind in Abbildung 3.4 zusammengefasst.



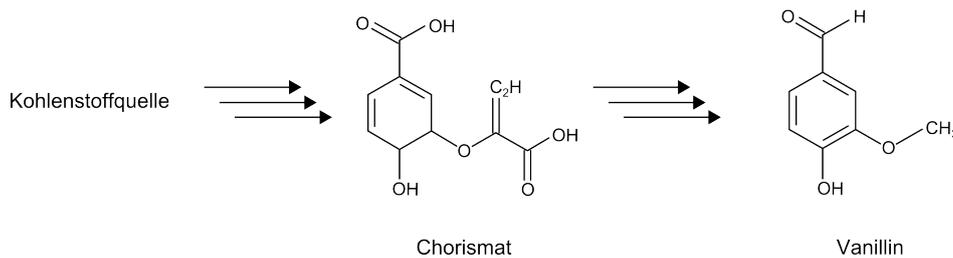
**Abbildung 3.4:** Biotechnologische Herstellung von Butanol.

A) Vereinfachte Darstellung der klassischen ABE Fermentation in *Clostridium acetobutylicum* (Dürre, 1998). Während des exponentiellen Wachstums werden vor allem Säuren (gestrichelte Pfeile), beim Übertritt in die Stationäre Phase vor allem Lösungsmittel synthetisiert. Neben Butanol werden auch Aceton und Ethanol (Verhältnis: 6:3:1) gebildet. B) Der angestrebte Syntheseweg in *Pseudomonas putida* verläuft über die Transgene Pyruvatdecarboxylase (PDC) aus *Zymomonas mobilis* und 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphat-Aldolase (DERA) aus *E. coli*. Eine Dehydrogenase (DH) welche die Umsetzung von Hydroxybutanal zu Butanol katalysiert wurde noch nicht identifiziert.

Über die eigentliche Synthese hinaus ist auch die Toleranz der verwendeten Mikroorganismen gegenüber Edukten und Produkten der angestrebten Synthese für die Produktion von Biobutanol entscheidend. So wirken Butanolkonzentrationen jenseits von 2% (v/v) auf *Clostridien* stark wachstumshemmend, bei *E. coli* tritt eine Wachstumshemmung bereits bei einer Konzentration von 0.8% (v/v) Butanol ein (Dürre, 2011; Rutherford *et al.*, 2010). Die Verwendung lösungsmittelresistenter *Pseudomonaden* zur biotechnologischen Produktion von Butanol stellt daher eine vielversprechende Alternative dar. Die Realisierbarkeit der Butanolproduktion in *Pseudomonas putida* (mit Hilfe heterolog exprimierter Gene aus *C. acetobutylicum*) wurde bereits von Nielsen *et al.* (2009) gezeigt.

Ziel der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten systembiologischen Arbeiten war es daher, die zugrundeliegenden Mechanismen der Butanolresistenz in *Pseudomonas putida* zu verstehen und damit einen Beitrag zur Entwicklung eines Produktionsstammes zu leisten. Anknüpfend an die Studien von Rühl und Rutherford et al. (Rühl *et al.*, 2009; Rutherford *et al.*, 2010) wurden die grundlegenden Mechanismen der Lösungsmitteltoleranz und der Metabolismus von Butanol in *Pseudomonas putida* KT2440 auf Proteomebene untersucht.

### 3.2.4 Biotechnologische Herstellung von Vanillin



**Abbildung 3.5:** Geplante Synthese von Vanillin.

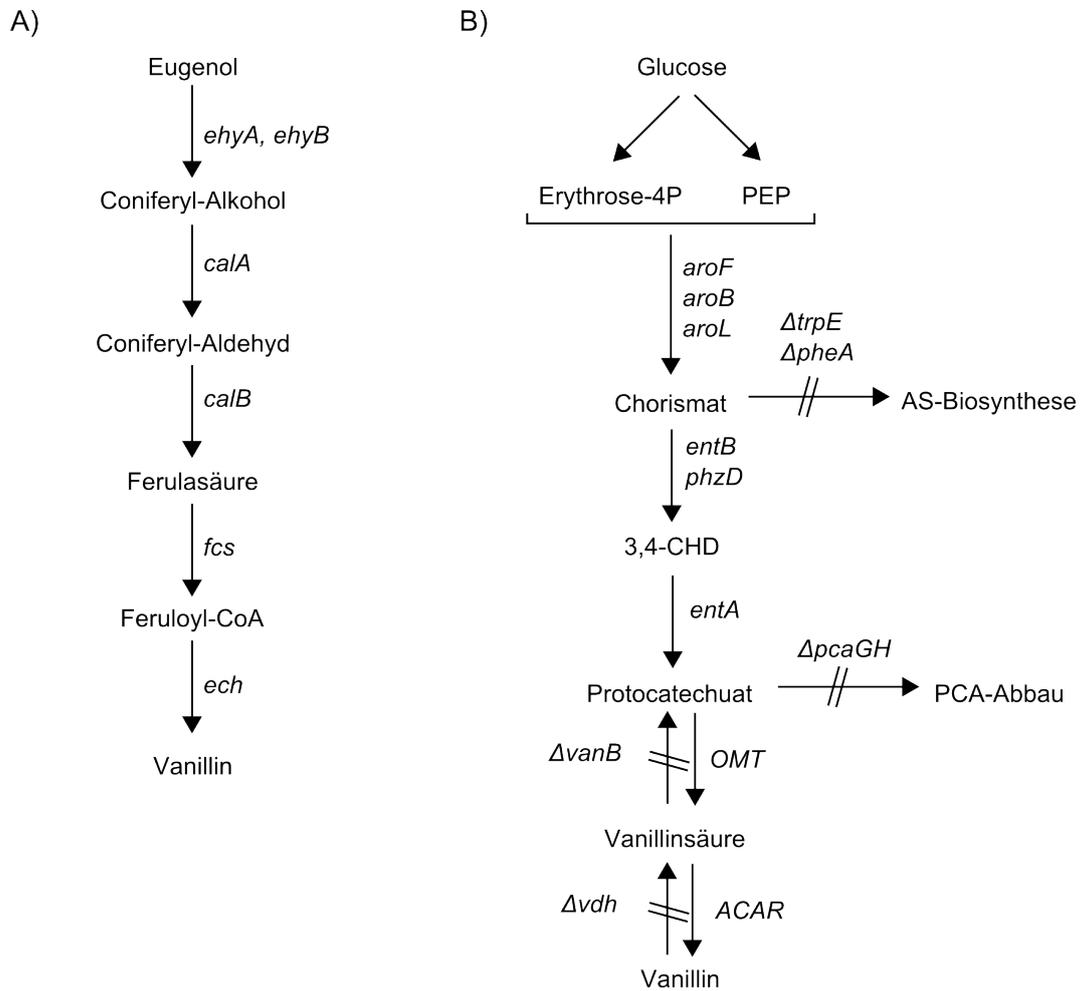
Vanillin ist mit einer jährlichen Produktion von 10.000-12.000 Tonnen einer der wichtigsten Aromastoffe, der seine Hauptabnehmer in der Nahrungsmittelindustrie, aber auch der pharmazeutischen Industrie findet. Der aus der Vanille-Pflanze (*Vanilla planifolia*) gewonnene Anteil, welcher auch als „echte Vanille“ bezeichnet wird, beträgt dabei weniger als 1% (20-50 t) (Walton *et al.*, 2003). Die geringen Ausbeuten sowie die zeitintensive Fermentation der Früchte, welche für die Bildung des Vanillins aus Vanillin- $\beta$ -Glucosiden verantwortlich ist, sind neben klimatischen, geographischen und politischen Einflüssen für den hohen Preis dieses Rohstoffs verantwortlich (1.200-4.000 \$/kg)(Walton *et al.*, 2003). Ein Großteil des weltweit verarbeiteten Vanillins wird daher synthetisch, meist aus Guajacol, hergestellt und ist mit einem Marktpreis von unter 15 \$/kg deutlich preiswerter. Die Herstellung aus Lignin ist stark zurückgegangen und liegt heute lediglich bei 20% der Gesamtproduktion (Silva *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zum natürlichen Vanillin, welches bis zu 200 verschiedene zusätzliche Stoffe enthält, ist das aus Guajacol synthetisch hergestellte Vanillin fast rein. Um „natürliches“ Vanillin in größeren Mengen herstellen zu können, wurden in den letzten Jahren verschiedene biotechnologische Ansätze untersucht. Ein generelles Problem der biotechnologischen Herstellung von Vanillin besteht in dessen antimikrobieller Wirkung sowie dessen Reaktionsfreudigkeit (Zaldivar *et al.*, 1999)(s. Abschnitt 3.2.2). Um toxische Effekte zu verhindern wird Vanillin von *Pseudomonaden* offenbar sehr schnell zu Vanillinsäure oder Vanillylalkohol metabolisiert (Overhage *et al.*, 1999a).

Wie auch bei der Herstellung von Biobutanol spielen der Marktpreis sowie die Verfügbarkeit der für die biotechnologische Synthese benötigten Ausgangsstoffe, aber auch die Resistenz der verwendeten Mikroorganismen, eine entscheidende Rolle. Den am besten untersuchten Weg zur biotechnologischen Synthese von Vanillin stellt jener von Eugenol über Ferulasäure zu Vanillin dar, welcher in *Pseudomonas putida* HR199 untersucht wurde (Priefert *et al.*, 1999; Overhage *et al.*, 1999b; Overhage *et al.*, 1999a) (Abb.: 3.6 A). Der Ausgangsstoff Eugenol kann kostengünstig aus Nelkenöl hergestellt werden. Die Ausbeuten dieser Synthese in *Pseudomonas putida* HR199 blieben jedoch hinter den von Muheim *et al.* (1999) in *Streptomyces setonii* erzielten zurück. Als Ausgangsstoff für die Umsetzung verwendeten Muheim *et al.* (1999) allerdings Ferulasäure ( $\log P_{O/W} = 1,4$ ), welche auf Bakterien weit weniger toxisch wirkt als das kostengünstigere Eugenol ( $\log P_{O/W} = 2,7$ ). Bei hohen Ferulasäurekonzentrationen baute *S. setonii* im Gegensatz zu *P. putida* Vanillin nicht weiter zu Vanillinsäure ab. Worauf diese regulatorische Besonderheit beruht, ist nicht geklärt.

Neben der Synthese von Vanillin in *P. putida* HR199 wurde auch dessen Abbau über Vanillinsäure und Protocatechuat untersucht (Priefert *et al.*, 1997; Overhage *et al.*, 1999b; Overhage *et al.*, 1999c). Dabei wurden die Enzyme Vanillat-O-Demethylase (VanA/VanB) und Protocatechuat 3,4-Dioxygenase (PcaG/H) als essentiell für den Vanillinabbau beschrieben. Das Enzym Vanillin-Dehydrogenase (Vdh) war zwar ebenfalls für den Abbau entscheidend, seine Funktion konnte aber teilweise durch ein als Coniferyl-Aldehyd-Dehydrogenase identifiziertes Enzym übernommen werden (Overhage *et al.*, 1999b). Basierend auf diesen Erkenntnissen postulierten Overhage *et al.* (1999c) einen Abbau von Vanillin zu Protocatechuat und eine anschließenden Metabolisierung über den  $\beta$ -Ketoacid-Weg zu Succinyl-CoA.

Eine gänzlich andere Strategie wird bei der Herstellung von Vanillin aus Glucose verfolgt. Dieser Ansatz wurde in einem transgenen *E. coli* Stamm realisiert (Li *et al.*, 1998) und basiert auf der Synthese aromatischer Aminosäuren über den so genannten Shikimatweg (Berg *et al.*, 2003). Dabei wurde die Reduktion von 3-Dehydroshikimat zu Shikimat durch einen Knockout der Shikimat-Dehydrogenase (AroE) unterbunden und der Weg zu Protocatechuat (katalysiert durch das in das Genom integrierte *aroZ*) favorisiert. Die Umsetzung zu Vanillinsäure erfolgte mittels einer plasmidkodierten Catechol-O-Methyltransferase. Im Anschluss wurde Vanillinsäure durch das Enzym Aryl-Aldehyd Dehydrogenase aus *Neurospora crassa* in vitro zu Vanillin reduziert. Der in diesem Projekt verfolgte Ansatz zur Herstellung von Vanillin aus Glucose beruhte ebenfalls auf dem Aromatenstoffwechsel und verläuft von Glucose über Chorismat zu Protocatechuat (Abb. 3.6 B). *P. putida* KT2440 soll hierbei als Basis dienen und durch heterologe Expression von Genen aus *E. coli* und anderen Organismen zur Synthese von Vanillin auf diesem Wege befähigt werden. Das Verständnis des Vanillinabbaus in



**Abbildung 3.6:** Biotechnologische Herstellung von Vanillin über die Intermediate A) Ferulasäure und B) Chorismat.

A) Die Synthese von Vanillin wie sie für *Pseudomonas putida* HR199 postuliert wurde (Priefert *et al.*, 1999; Overhage *et al.*, 1999b; Overhage *et al.*, 1999a). B) Für die geplante Synthese von Vanillin über Chorismat wurden verschiedene Transgene in *P. putida* KT2440 eingebracht: (phzD: Isochorismatase (*P. aeruginosa*); EntB: Isochorismatase (*E. coli*); EntA: 2,3-Dihydroxybenzoatsynthase (*E. coli*); ACAR: Aromatic Carboxylic Acid Reductase (*Nocardia sp.*); OMT: O-Methyltransferase (*Synechocystis sp.*). Zudem wurden unerwünschte Rückreaktionen und der Abfluss von Intermediaten durch die Inaktivierung entsprechender Gene unterbunden.

*Pseudomonas putida* KT2440 und dessen Blockade spielen dabei eine entscheidende Rolle. Hierbei rückt auch die generelle Regulation des Kohlenstoffstoffwechsels von *P. putida* in den Fokus des Interesses.

### 3.2.5 Biotransformation von Terpenoiden

Terpene stellen eine umfangreiche Stoffklasse (mehr als 10.000 verschiedene Substanzen), deren Namen auf Pinienöl ( $\alpha$ -Pinen) zurückzuführen ist, dar. Sie sind Hauptbestandteil von ätherischen Ölen und werden vor allem als Duft- und Geschmacksstoffe sowie zu pharmakologischen Zwecken eingesetzt. Terpene können sowohl in azyklischer als auch in zyklischer Struktur vorliegen. Die Namen der einzelnen Substanzen leiten sich meist vom Namen des Organismus ab, aus welchem die erste Isolation erfolgte (Citronellol, Geraniol, etc.). Ein Großteil der Terpene ist der Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe zuzuordnen. Die biologische Klassifizierung dieser Gruppe gelang mit der Formulierung der Isoprenregel durch Wallach und Ruzicka (Wallach, 1885; Ruzicka, 1953). Terpene setzen sich demnach aus einem Grundgerüst von Isopreneinheiten ( $C_5$ -Körpern) zusammen, wobei Monoterpene aus zwei, Sesquiterpene aus drei dieser Einheiten bestehen. Tragen Terpene funktionelle Gruppen, werden sie als Terpenoide bezeichnet. Die Biosynthese von Terpenen, welche von Bloch und Lynen (Bloch, 1964; Lynen, 1964) aufgeklärt wurde (Mevalonat-Weg), offenbarte, dass nicht Isopren sondern Isopentenylpyrophosphat den Grundbaustein der Terpene bei deren Synthese darstellte. Isopentenylpyrophosphat wird über Mevalonat aus Acetyl-CoA in mehreren Schritten synthetisiert (Chaykin *et al.*, 1958; Lynen *et al.*, 1958).

Der Abbau von Terpenoiden durch Mikroorganismen wurde erstmals von Seubert (1960) in *Pseudomonas citronellolis* beschrieben. Außer *Pseudomonas citronellolis* sind noch einige weitere *Pseudomonaden* wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens* zum Wachstum auf Terpenoiden befähigt. Ein Großteil der bekannten Stämme verfügt jedoch nicht über diese Fähigkeit, weshalb im Rahmen dieses Teilprojekts *Pseudomonas aeruginosa* anstelle des Referenzstammes *Pseudomonas putida* KT2440 verwendet wurde. In *P. aeruginosa* erfolgt der Abbau von Citronellol durch dessen Oxidation zu Citronellsäure und anschließender Aktivierung mittels Acetyl-CoA. Das so gebildete Citronellyl-CoA wird über den „Acyclic Terpene Utilization (*atu*)“-Weg und anschließender  $\beta$ -Oxidation zu 3-Methyl-Crotonyl-CoA metabolisiert, welches wiederum in den Leucin/ Isovaleriansäure-Stoffwechsel eingeschleust und zu Acetyl-CoA abgebaut wird (Díaz-Pérez *et al.*, 2004; Höschle *et al.*, 2005; Förster-Fromme *et al.*, 2006). Die für einen Großteil dieser Schritte verantwortlichen Gene befinden sich im *atu*- bzw. *liu*-Gencluster und konnten bereits entsprechenden Enzymen zugeordnet werden (Höschle *et al.*, 2005). Um weitere, am Abbau von Terpenoiden

beteiligte, Enzyme zu identifizieren und die Eignung von *Pseudomonas aeruginosa* zur Synthese von zyklischen Terpenoiden zu evaluieren, wurden im Rahmen dieses Teilprojektes unterschiedliche Proteomanalysen durchgeführt. Neben dem Abbau von Citronellol und Citronellsäure wurde auch der Abbau von Oktansäure als Beispiel für einen nicht-methylierten Kohlenwasserstoff untersucht.

## 3.3 Massenspektrometrie und quantitative Proteomanalyse

### 3.3.1 Reversed Phase-HPLC und Massenspektrometrie

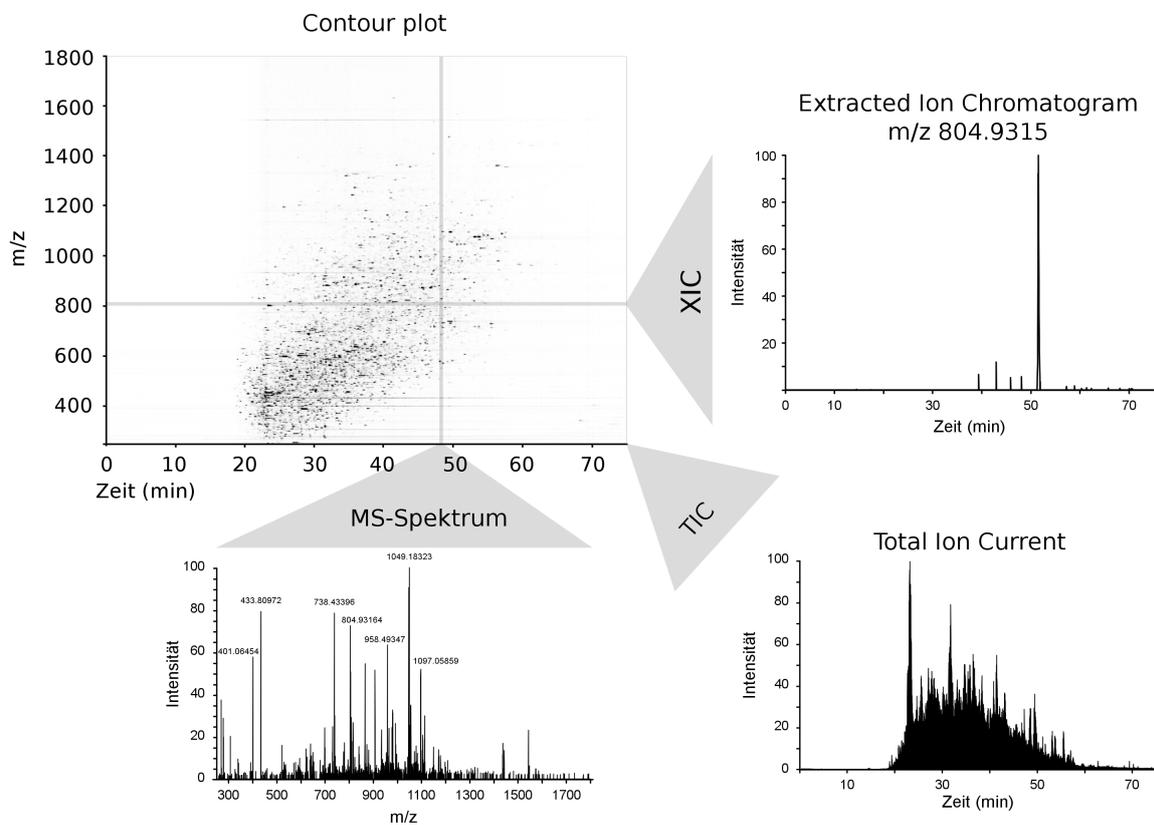
Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, war und ist die Massenspektrometrie eine zentrale Technologie der modernen Proteomforschung und Systembiologie. Im Gegensatz zu immunologischen Detektionsmethoden ermöglicht sie eine kostengünstige und schnelle Identifizierung von Proteinen, deren Sequenz aus Genom-Sequenzierungsprojekten bekannt ist. Für unbekannte Proteine stellt sie in vielen Fällen eine schnelle und robuste Alternative zur N-terminalen Sequenzierung (Edman-Abbau) (Edman, 1949) dar. Dabei hat sich mit der Weiterentwicklung des Forschungsfeldes der Fokus vom einzelnen biologisch relevanten Protein, hin zur Gesamtheit aller Proteine verschoben. Patterson *et al.* (2003) beschreiben dies als den so genannten „Reversen Ansatz“. Anstatt von einem Phänotyp auf ein Protein oder Gen zu schließen, wird der entgegengesetzte Weg, der von Gen- oder Proteininformationen auf den Phänotyp schließt, eingeschlagen. Hierdurch kommt der Identifizierung und Quantifizierung einer großen Anzahl von Proteinen aus komplexen Gemischen sowie der Charakterisierung verschiedener post-translationaler Modifikationen eine zentrale Bedeutung zu (s. Abschnitt 3.3.5). Bedingt durch die hieraus resultierenden breiten Anforderungen an die Methodik, haben sich in den letzten Jahren verschiedene Massenspektrometer für unterschiedliche Proteomics-Anwendungen etabliert. Der grundlegende Aufbau sowie das Grundprinzip der Messung sind jedoch für alle Geräte identisch. So besteht jedes Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem oder mehreren Massenanalytoren sowie einem Detektor und liefert als Ergebnis das Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) des Analyten.

Obwohl es in jüngerer Zeit vermehrt Bestrebungen gibt, ganze Proteine massenspektrometrisch zu analysieren (sog. „top-down“-Ansätze), weist dieser Ansatz noch einige technische Limitierungen auf (Armirotti *et al.*, 2010). So sind viele Massenanalytoren nur bedingt für die Analyse großer Moleküle ( $> 20.000$  Da) geeignet oder zeigen in diesem Bereich nur ein stark vermindertes Auflösungsvermögen. Auch die chromatographische Trennung von Proteinen ist aufgrund ihrer Hydrophobizität und Größe

schwierig. Substanzen, welche die Solubilisierung von Proteinen verbessern (Detergenzien, Salze) sind wiederum nicht mit massenspektrometrischen Analysen kompatibel oder würden deren Sensitivität stark reduzieren. Daher werden in Ansätzen, welche die Identifizierung von Proteinen in komplexen Proben zum Ziel haben, durch eine spezifische Protease erzeugte Peptide anstelle ganzer Proteine analysiert (sog. „bottom-up“ Ansatz).

Als Protease wird aufgrund seiner Spezifität, Stabilität und Aktivität (geringe Anzahl an Fehlschnitten) häufig Trypsin verwendet. Trypsin, welches C-terminal von Lysin und Arginin schneidet, erzeugt in der Regel Peptide in einer für die Massenspektrometrie geeigneten Größe, welche neben der N-terminalen Aminogruppe an den Seitenketten von Lysin und Arginin noch eine zweite Aminogruppe tragen. Dies ist im Hinblick auf Ionisation und Fragmentierung der Peptide ideal (Lottspeich, 2012). Neben der Bestimmung des  $m/z$ -Verhältnisses eines Peptides sind für eine präzise Identifizierung auch Informationen über die Aminosäuresequenz des Peptides von großem Vorteil. Diese Information kann im Rahmen einer massenspektrometrischen Analyse durch eine Fragmentierung von Peptiden mittels verschiedener Verfahren (CID, ETD, HCD) erhalten werden und wird als MS/MS oder MS<sup>2</sup>-Analyse bezeichnet.

Die Analyse von Peptiden anstelle ganzer Proteine bringt jedoch auch eine weitere Steigerung der Komplexität der Probe mit sich. Besonders bei im Vorfeld nicht fraktionierten Proben, können auch moderne Massenspektrometer nicht alle in einer Probe vorhandenen Peptide erfassen. Um die Komplexität der Probe zu reduzieren, wird der eigentlichen massenspektrometrischen Analyse ein chromatographisches Trennverfahren vorangestellt. Da sich die Anforderungen im Hinblick auf die Trennung je nach Fragestellung unterscheiden, wurden auch in diesem Bereich eine Vielzahl von Methoden und Geräten entwickelt. Einen Überblick gibt der Review von Sandra *et al.* (2008). Die gängigste Methode zur Trennung von Peptiden ist die RP-HPLC (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography) bei der die einzelnen Peptide aufgrund ihrer Hydrophobizität voneinander getrennt werden. Nach der initialen Bindung der Peptide an ein hydrophobes Säulenmaterial erfolgt deren sukzessive Elution. Durch die Erhöhung des Anteils an organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase werden die Peptide, nach steigender Hydrophobizität geordnet, von der Säule gelöst. Da für die Elution flüchtige Lösungsmittel verwendet werden, die keine für das MS störenden Substanzen wie z.B. Salze enthalten, kann die Reversed-Phase Chromatographie direkt („online“) an ein mit einer entsprechenden Ionen-Quelle ausgestattetes Massenspektrometer gekoppelt werden. Wie Abbildung 3.7 zeigt, erhält die Analyse durch die Online-Kopplung zusätzlich zum ermittelten  $m/z$ -Verhältnis eine zeitliche Dimension (Contour-Plot, X-Achse). Der Contour-Plot ist eine Darstellung, welche alle Informationen eines LC-MS-Experiments (nicht MS/MS) in einer Grafik zusammenfasst. Dabei



**Abbildung 3.7:** Übersicht über die während einer LC-ESI MS Analyse erhobenen Daten (nach Lovric (2011)).

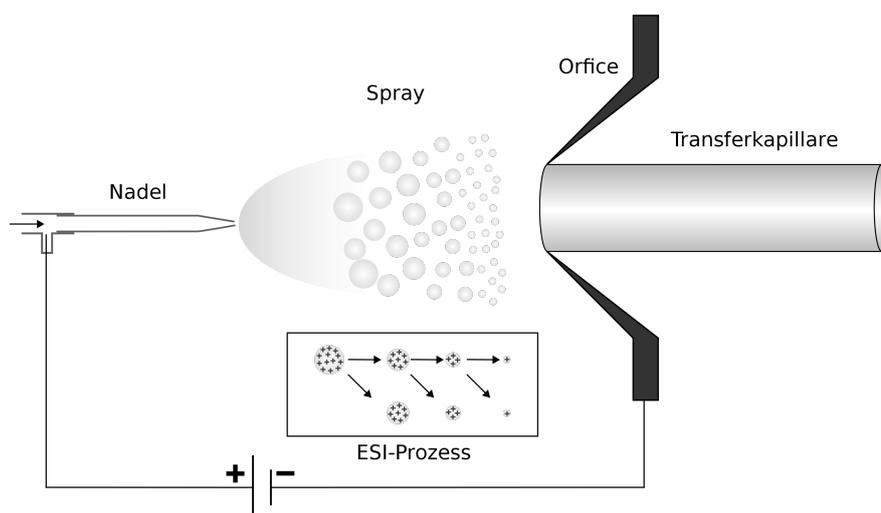
Der Contour-Plot stellte alle während einer LC-ESI-MS Analyse erhobenen Daten wie Elutionszeit,  $m/z$ -Verhältnis und Intensität in einer einzigen Grafik dar. Die drei übrigen Darstellungen (MS-Spektrum, TIC und XIC) geben jeweils einen Ausschnitt dieser Informationen wieder. So werden in einem MS-Spektrum das  $m/z$ -Verhältnis und die Intensität aller Ionen zu einem bestimmten Zeitpunkt abgebildet. Der zeitliche Verlauf der Intensität aller Ionen wird über die „Total Ion Current“ abgebildet. Dabei stellt die Intensität (y-Achse) zu einem bestimmten Zeitpunkt die Summe der Intensitäten der einzelnen Ionen dar. Das „Extracted Ion Chromatogram“ kann als Filter betrachtet werden, welcher den zeitlichen Verlauf der Intensität für ein einziges  $m/z$ -Verhältnis wiedergibt.

werden die Zeit und das  $m/z$ -Verhältnis auf der x- und y-Achse aufgetragen, die Intensität wird über eine „Heatmap“ kodiert. Daraus abgeleitet, gibt ein MS-Spektrum die Intensität sowie das  $m/z$ -Verhältnis aller Ionen zu einem gegebenen Zeitpunkt wieder. Das „Extracted Ion Chromatogram“ (XIC) stellt im Gegensatz hierzu den zeitlichen Verlauf der Intensität eines ausgewählten  $m/z$ -Verhältnisses und damit eines Ions dar. Die Summe der Intensitäten aller  $m/z$ -Verhältnisse über die Zeit kann über die so genannte „Total Ion Current“ (TIC) dargestellt werden.

### 3.3.2 Elektrospray-Ionisation (ESI)

Für die Analyse von Biomolekülen war die Entwicklung zweier Ionenquellen, welche erstmals die „sanfte“ Ionisation großer Moleküle ermöglichten, von zentraler Bedeutung. Sowohl die „Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization“ (MALDI, Karas *et al.* 1987; Tanaka *et al.* 1988) als auch die „Elektrospray Ionisation“ (Dole *et al.*, 1968; Fenn *et al.*, 1989), ermöglichen erstmals die Ionisation und damit die massenspektrometrische Analyse großer Biomoleküle. Obwohl beide Ionisationsmethoden im Bereich Proteomics eine breite Anwendung finden, soll hier nur auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendete „Elektrospray Ionisation“ (ESI) eingegangen werden. Einer der größten Vorteile der Elektrospray-Ionisation liegt in der bereits im vorherigen Abschnitt beschriebenen Möglichkeit eine chromatographische Trennung „online“ mit einem Massenspektrometer zu verbinden. Die Ionisation der Peptide erfolgt aus dem Flüssigkeitsstrom der HPLC heraus, wobei die für die Überführung der Ionen in die Gasphase benötigte Energie über ein elektrisches Feld zwischen der Nadel und der Öffnung des Massenspektrometers zugeführt wird. Abbildung 3.8 zeigt schematisch den Ablauf dieses Ionisationsprozesses an einer nano-ESI Quelle.

Im positiven Modus befindet sich die Kathode an der Nadel, die Anode am Massenspektrometer. Hierdurch werden die positiv geladenen Peptide in die Richtung des Massenspektrometers beschleunigt und bilden an der Spitze der Nadel kleine, hochgeladene Tröpfchen. Während ihrer Wanderung im elektrischen Feld kommt es zu einem kontinuierlichen Verlust von Lösungsmittel, wodurch sich die Ladungsdichte an der Oberfläche der Tröpfchen erhöht. Beim Erreichen des so genannten Rayleigh-Limits, kann die Oberflächenspannung die Abstoßungstendenz gleicher Ladungen nicht mehr ausgleichen und es kommt zu einem Zerfall des Tröpfchens (Coulomb-Explosion). Dieser Prozess setzt sich kaskadenartig fort, bis eine vollständige Desolvatisierung aller Ionen erreicht ist. Die Desolvatisierung kann technisch durch die Verwendung von „Curtain-Gas“ oder einer geheizten Transferkapillare unterstützt werden. Die bei der Elektrospray Ionisation gebildeten Ionen sind, im Vergleich zur MALDI, überwiegend mehrfach geladen (Lottspeich, 2012).



**Abbildung 3.8:** Aufbau einer ESI-Ionenquelle (nach Lottspeich 2012).

Geladene Teilchen werden in einem elektrischen Feld in die Richtung der Öffnung des Massenspektrometers beschleunigt. Dabei kommt es durch einen kontinuierlichen Verlust von Lösungsmittel zu einer Reihe so genannter Coulomb-Explosion (siehe Text), was zu einer Vereinzelung der Analyten führt. Noch vorhandenes Lösungsmittel wird in der beheizten Transferkapillare entfernt.

### 3.3.3 Massenanalysatoren

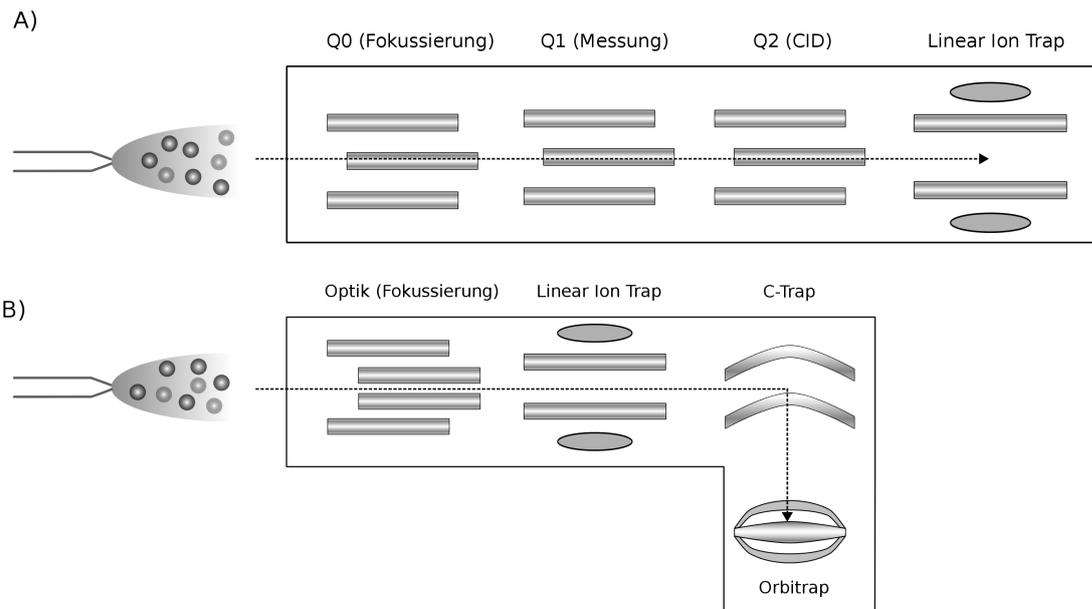
Die Kernaufgabe eines jeden Massenspektrometers, die Bestimmung des  $m/z$ -Wertes für ein bestimmtes Molekül, kann von einer Vielzahl von Massenanalysatoren bewerkstelligt werden. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktionsweise als auch in den für die Messung entscheidenden Parametern wie dem Auflösungsvermögen, der Massengenauigkeit, dem dynamischen Bereich, der (Scan-) Geschwindigkeit und der erreichten Sensitivität. Zum Einsatz kommen dabei neben TOF (Time of Flight-Analysatoren) auch Quadrupol-Analysatoren, klassische Ionenfallen (Pauli Traps und lineare Ionenfallen) und nicht zuletzt Orbitrap Ionenfallen. Hinzu kommen FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)-Analysatoren, welche aufgrund ihrer hohen Betriebskosten inzwischen nur noch selten eingesetzt werden (Für eine tabellarische Übersicht siehe Zhang bzw. Domon et al. (Zhang *et al.*, 2010; Domon *et al.*, 2006)). Hybrid-Massenspektrometer kombinieren mehrere Analysatoren in einem einzigen Gerät und damit auch die individuellen Vorteile dieser Analysatoren. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Analysatoren und Geräte werden im Folgenden kurz vorgestellt. Für eine umfangreiche Übersicht über die einzelnen Analysatoren sei auf Lovric (2011) verwiesen.

Ein Charakteristikum von Quadrupol –Analysatoren besteht in deren Eignung als Massenfilter. Bedingt durch die am Quadrupol anliegende Spannung, können Ionen eines

definierten Massenbereichs den Quadrupol auf einer stabilen Bahn passieren. Ionen, welche ein anderes  $m/z$ -Verhältnis aufweisen, kollidieren mit den quadratisch angeordneten Metallstäben des Quadrupols. Durch die schrittweise Variation der an den Stäben anliegenden Spannung, kann der gesamte Massenbereich sukzessive gescannt werden. Mit der Verringerung der Schrittgröße erhöhen sich dabei die Massengenauigkeit und das Auflösungsvermögen. Dies geschieht jedoch auf Kosten der Sensitivität. Meist werden Quadrupol-Analysatoren in Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (drei in Reihe geschaltete Quadrupole) oder QTraps (Zwei Quadrupole + lineare Ionenfalle) eingesetzt, wo ihre Stärken besonders zum Tragen kommen.

Wie auch bei Quadrupolen basiert das Prinzip der Ionenfalle darauf, Ionen auf stabilen Bahnen in einem elektrischen Feld zu halten. Hierfür werden Ionen eines möglichst breiten Massenbereichs in der Falle „eingefangen“ und entsprechend ihres  $m/z$ -Verhältnisses aus der Falle „ausgescannt“. In heutigen Hybrid-Massenspektrometern kommen dabei überwiegend lineare Ionenfallen zum Einsatz, welche durch ihre erhöhte Ionenkapazität eine höhere Sensitivität und auch Massengenauigkeit erreichen als klassische Pauli-Traps. Kritisch sind auch hier die Größe des abgedeckten Massenbereichs sowie die Beschränkungen für sehr kleine und sehr große Ionen zu bewerten (high und low mass cut-off). Die Stärken von Ionenfallen liegen in ihrer hohen Scangeschwindigkeit sowie der Möglichkeit, neben MS/MS-Daten auch MS<sup>n</sup> Daten zu erzeugen (Lovric, 2011).

Eine weitere Ionenfalle stellt der Orbitrap-Analysator dar. Obwohl das zugrundeliegende Prinzip dieser Ionenfalle seit den 1920er Jahren bekannt ist, wurde dieser Analysator erst in den letzten Jahren zur Marktreife entwickelt und hierdurch für die Analyse von Biomolekülen verfügbar (Makarov, 2000; Makarov *et al.*, 2006). Der größte Vorteil des Orbitrap-Analysators liegt in seinem außerordentlich hohen Auflösungsvermögen sowie seiner hohen Massengenauigkeit, welche nur von FTICR-Analysatoren übertroffen werden. Für die Messung werden Ionen auf stabilen Umlaufbahnen um eine Zentralelektrode gehalten. Dabei oszillieren diese seitlich zwischen den beiden Enden der Zentralelektrode mit einer von ihrem  $m/z$ -Wert abhängigen Frequenz. Die Messung dieser Frequenz erfolgt über den an der äußeren Elektrode während der Oszillation induzierten Strom. Der bei der zeitgleichen Analyse unterschiedlicher Ionen (MS-Spektrum) gemessene Strom stellt eine Überlagerung der Frequenzen der einzelnen Ionen dar. Die Einzelfrequenzen und damit die  $m/z$ -Werte der in der Falle enthaltenen Ionen werden mittels Fourier-Transformation berechnet. Die in dieser Arbeit verwendeten Hybrid-Massenspektrometer sind in Abbildung 3.9 schematisch dargestellt. Dabei wurden lediglich die Analysatoren nicht jedoch die verbindende Ionenoptik berücksichtigt.



**Abbildung 3.9:** Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten Hybrid-Massenspektrometer A) QTrap 5500 und B) LTQ-Orbitrap-XL.

A) Die QTrap 5500 besteht aus zwei Mess-Quadrupolen und einer linearen Ionenfalle. Die Fragmentierung der Peptid-Ionen erfolgt in Q2. Die lineare Ionenfalle kann zudem auch als Quadrupol betrieben werden, was beim „Selective Reaction Monitoring (SRM)“ genutzt wird. B) Auch die LTQ-Orbitrap XL besitzt zwei Massenanalytoren, eine lineare Ionenfalle und den Orbitrap-Analysator. MS-Spektren werden mit hoher Massengenauigkeit in der Orbitrap aufgenommen, MS/MS-Spektren in der linearen Ionenfalle. Der gestrichelte Pfeil gibt den Ionengang wieder.

### 3.3.4 Proteinidentifizierung (Datenbanksuche)

Die Identifizierung von Proteinen erfolgt meist, wie bereits beschrieben, auf Basis der durch einen tryptischen Verdau erzeugten Peptide. Um das gemessene  $m/z$ -Verhältnis einem Peptid und damit einem Protein zuordnen zu können, muss dessen Aminosäuresequenz bekannt und in einer Datenbank hinterlegt sein. Diese Aminosäuresequenz kann dabei von der Genomsequenz abgeleitet werden, welche seit dem Abschluss vieler großer und kleiner Sequenzierungsprojekte für eine Vielzahl von Organismen zur Verfügung steht. Zur Erstellung der Datenbank werden die Proteine eines Organismus einem theoretischen Verdau unterzogen und die Massen der Peptide in der Datenbank hinterlegt.

Die Identifizierung eines Peptides erfolgt durch den Abgleich der experimentell ermittelten Masse mit der Datenbank. Bei reinen MS-Experimenten wird dabei lediglich die Masse des Peptids mit der Datenbank abgeglichen (Peptide Mass Fingerprint). Bei MS/MS-Experimenten wird zusätzlich die durch die Fragmentierung gewonnene Information verwendet. Hierzu werden die in der Datenbank hinterlegten Peptide einer theoretischen Fragmentierung unterzogen und die dabei erzeugten Spektren mit den MS/MS-Spektren der Probe verglichen. Die Güte der dabei erzielten Übereinstimmung sowie die Qualität der Zuordnung werden durch entsprechende Algorithmen mit einem Scoring-System bewertet. Dies ermöglicht die statistische Auswertung der gewonnenen Ergebnisse, was insbesondere bei großen Datenmengen entscheidend ist.

Für die Datenbanksuche wurde eine Vielzahl von Algorithmen entwickelt, welche sich in ihrer Funktionsweise und damit auch in der Bewertung der Suchergebnisse unterscheiden. Mascot (Perkins *et al.*, 1999) stellt dabei den derzeit wohl am häufigsten verwendeten Algorithmus und den aktuellen Goldstandard dar. Neben Mascot kam in dieser Arbeit auch die *Open Source* Suchmaschine *X!Tandem* (Craig *et al.*, 2004) zum Einsatz. Diese wurde vor allem zur Validierung und zur Ergänzung der mit Mascot erzeugten Ergebnisse genutzt.

Über die Identifizierung der in der Probe enthaltenen Proteine hinaus können Informationen über den biologischen Kontext eines Proteins von großem Interesse sein. Hierzu zählen Informationen über die subzelluläre Lokalisation sowie die Funktion der identifizierten Proteine. Diese Informationen können über weitere Datenbanken mit den Ergebnissen verknüpft werden.

### 3.3.5 Quantitative Proteomanalyse

Während noch vor wenigen Jahren ein Großteil der erhobenen Proteomdaten rein qualitativer Natur war, wurde vor allem mit der Etablierung der in Abschnitt 3.1.3 vorgestellten gelfreien Quantifizierungsmethoden der Schwerpunkt in Richtung quantitativer

Studien verschoben. Dies ist vor allem für die Systembiologie von großem Interesse, da die Betrachtung quantitativer Veränderungen des Proteoms auch Rückschlüsse auf die Funktion und Regulation des untersuchten Netzwerkes zulässt. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewandten Quantifizierungsmethoden kurz beschrieben. Für eine umfangreiche Zusammenfassung aktueller Quantifizierungsmethoden sei auf Schulze bzw. Bantscheff et al. (Schulze *et al.*, 2010; Bantscheff *et al.*, 2007) verwiesen.

### 3.3.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese und 2D-DIGE

Bei dieser Technik erfolgt die Auftrennung eines Proteingemisches in zwei Schritten. Während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt und anschließend in einer SDS-PAGE aufgrund ihres Molekulargewichts separiert. Das hohe Auflösungsvermögen der 2D-SDS-PAGE sowie die Vielseitigkeit der möglichen Anwendungen (verschiedene pH-Bereiche, Blots, Färbemethoden, etc.) machen diese Technik zu einer der weitverbreitetsten Anwendungen bei der Analyse komplexer Protein-Proben. Die 2D-SDS-PAGE erlaubt die reproduzierbare Auftrennung komplexer Proteingemische in mehr als 2.000 Spots, wobei auch Proteinisofomern und posttranslationale Modifikationen (PTMs) separiert werden können. Ein aktueller Review, welcher den gegenwärtigen Stand der 2D-SDS-PAGE beleuchtet, wurde von Görg *et al.* (2009) verfasst.

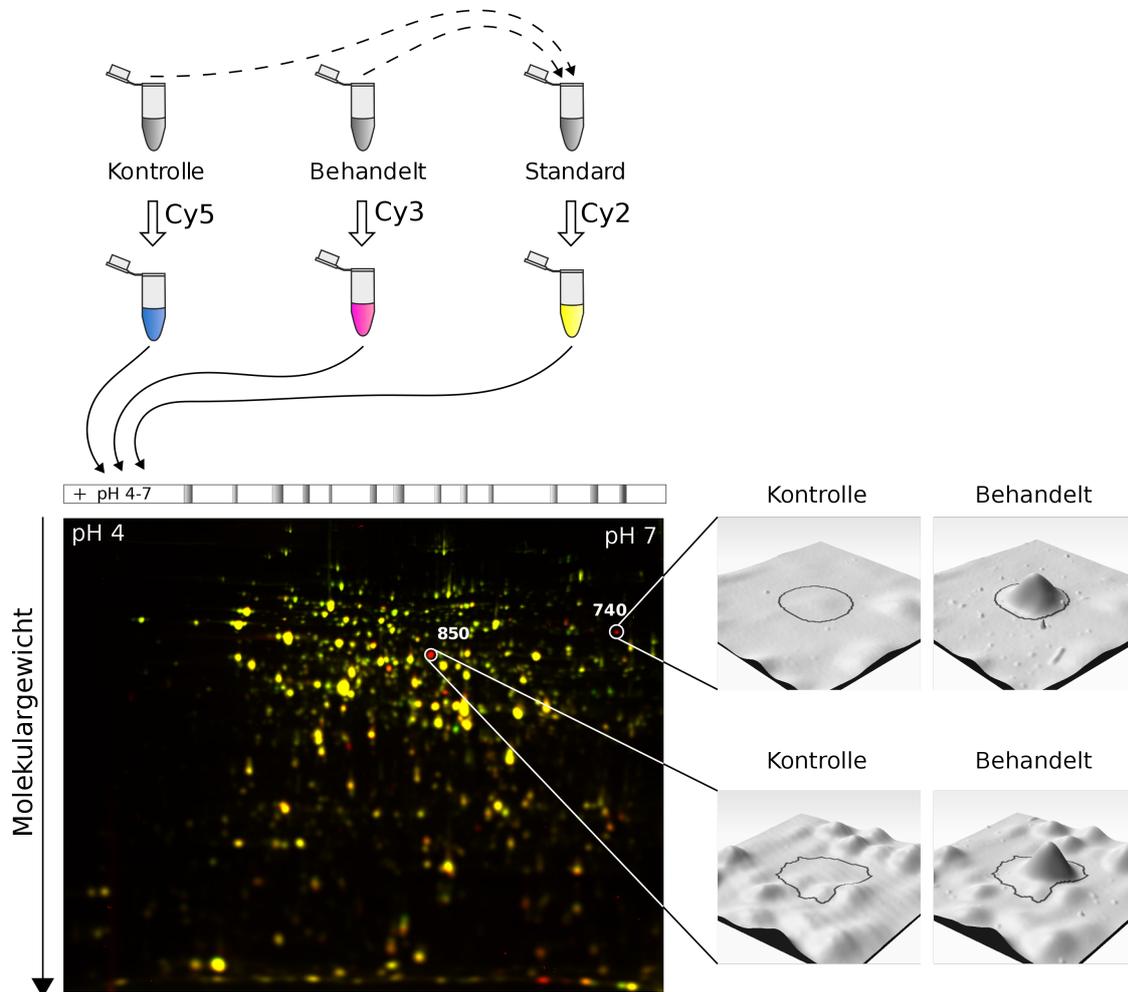
Die Verbindung der isoelektrischen Fokussierung in durch Trägerampholyte aufgebauten pH-Gradienten mit der von Laemmli (1970) entwickelten SDS-PAGE wurde 1975 von O'Farrell vorgestellt (Svensson *et al.*, 1961; Vesterberg *et al.*, 1966; O'Farrell, 1975). Während bei der „klassischen“ IEF die Ampholyte frei in dem verwendeten Polyacrylamidgel vorliegen und erst in einem elektrischen Feld einen pH-Gradienten aufbauen, ist bei den so genannten immobilisierten pH-Gradienten (IPG) der Gradient bereits vor dem Anlegen der Spannung vorhanden (Bjellqvist *et al.*, 1982; Görg *et al.*, 1988). Dieser pH-Gradient basiert auf sauren und basischen Acrylamidderivaten (Immobiline), welche bei der Herstellung des IPG-Streifens in den Gelstreifen einpolymerisiert werden. Durch eine Derivatisierung der Proteine im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung wird der Übergang der Proteine in die zweite Dimension sowie deren quantitative Beladung mit SDS ermöglicht (Görg *et al.*, 1987).

Die Detektion der Proteine im Gel erfolgt im Anschluss durch verschiedene Färbemethoden. Diese Methoden unterscheiden sich dabei sowohl in ihrer Sensitivität als auch in ihrem linearen Bereich. Letzteres sowie die häufig geringe Reproduzierbarkeit der Färbungen erschweren oft eine quantitative Betrachtung der Ergebnisse. Hinzu kommen technische Varianzen zwischen den einzelnen Gelen eines Experimentes. Fluoreszenzfarbstoffe wie Sypro Ruby (Berggren *et al.*, 2000) zeigen zwar eine der klassischen

Silberfärbung überlegene Sensitivität, einen größeren dynamischen Bereich sowie eine erhöhte Kompatibilität mit massenspektrometrischen Analysen, können jedoch die Vergleichbarkeit verschiedener Gele nicht verbessern. Diese konnte erst durch die Einführung der DIGE<sup>TM</sup>-Technik (Unlü *et al.*, 1997), welche die parallele Analyse zweier zu vergleichender Proben in einem einzigen Gel ermöglicht, erreicht werden. Durch die Erweiterung dieser Technik um einen internen Standard, der aus einer Mischung aller zu analysierenden Proben besteht, konnte die Robustheit der Quantifizierung weiter verbessert werden (Alban *et al.*, 2003).

Bei der 2D-DIGE-Technik werden zwei zu vergleichende Proben sowie ein interner Standard mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, welche über einen NHS-Ester an primäre Amine (vor allem Lysin-Seitenketten) binden, markiert. Durch die Auftrennung der zu analysierenden Proben in einem einzigen Gel, kann die technische Varianz dabei deutlich reduziert werden. Der aus allen Proben gemischte interne Standard erlaubt zudem die Normalisierung mehrerer Gele und damit mehrerer biologischer Replikate. Der Verlust der positiven Ladung der Aminogruppe durch die Esterbindung wird durch eine positive Ladung des Farbstoffmoleküls kompensiert. Die verwendeten Cyanin-Farbstoffe verfügen über ein ähnliches Molekulargewicht, unterscheiden sich jedoch in ihrem Emissionsspektrum. Aufgrund des identischen Molekulargewichts und der identischen Ladung verhalten sich die differenziell markierten Proteine in der anschließenden zweidimensionalen Trennung identisch und können im gleichen Spot detektiert werden. Um eine Mehrfachmarkierung von Proteinen zu verhindern, kommt bei DIGE-Experimenten in der Regel das so genannte „minimal-labelling“ zum Einsatz. Bei diesem Verfahren werden lediglich 3-5% der Proteine markiert, was einer starken Änderung des Molekulargewichts der Proteine sowie einer Zunahme der Hydrophobizität durch den Farbstoff entgegenwirkt. Durch den geringen Anteil markierter Lysin-Seitenketten stehen zudem genügend Schnittstellen (Lys/Arg) für den nachfolgenden Verdau der Proteine mit der Protease Trypsin zur Verfügung. Die quantitative Analyse der Gele erfolgt softwarebasiert auf Basis der normalisierten Spotvolumina der zu vergleichenden Proben (Timms *et al.*, 2008; Lottspeich, 2012). Der Aufbau eines DIGE-Experiments ist in Abbildung 3.10 skizziert.

Um die Sensitivität der Technik zu erhöhen, können Proben mit geringen Proteinkonzentrationen mittels „Saturation-Labeling“ markiert werden. Dabei werden Cysteine über eine Maleimid-Gruppe mit Cy3 oder Cy5 quantitativ markiert. Da Cysteine seltener als Lysine auftreten, führt die Markierung aller Cysteine eines Proteins nicht zu den oben beschriebenen negativen Effekten.



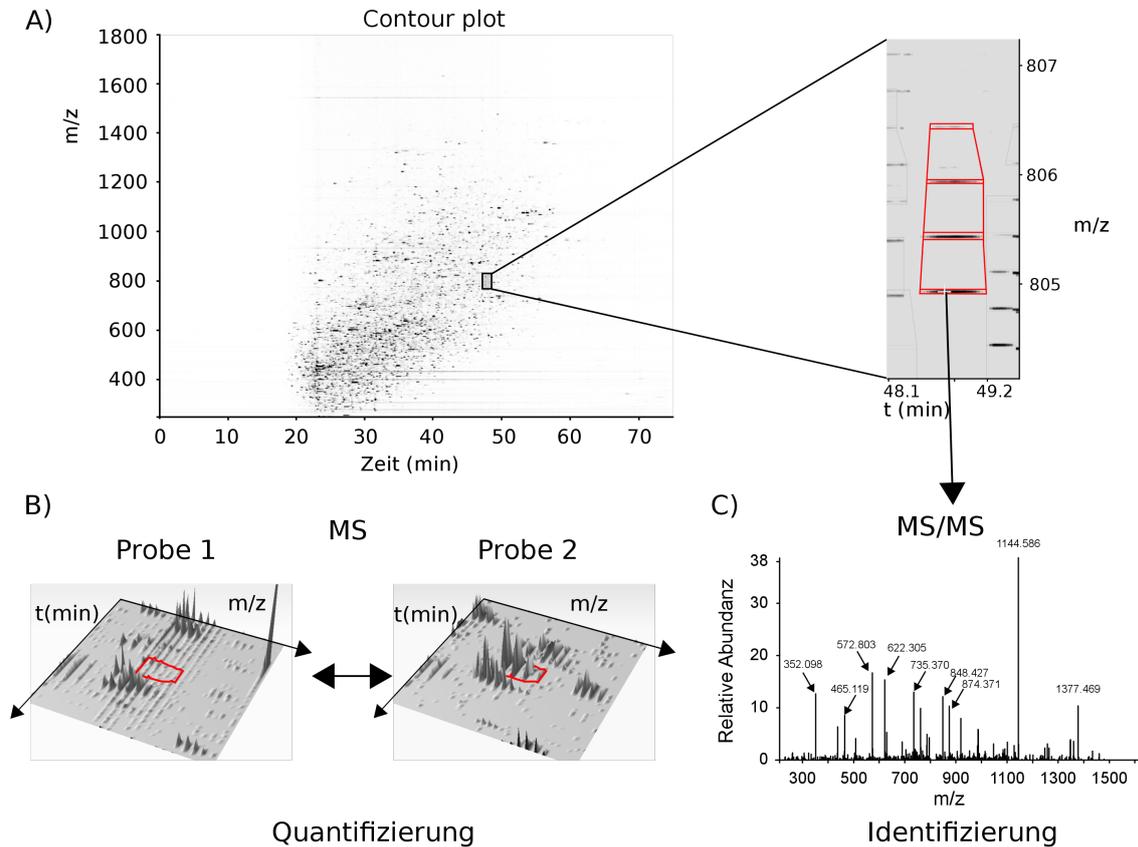
**Abbildung 3.10:** Vereinfacht dargestellter Ablauf eines 2D-DIGE-Experiments.

Nach dem Mischen des internen Standards und der Markierung der Proben werden die Proteine auf einen IPG-Streifen geladen und nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. In der zweiten Dimension erfolgt dann eine Trennung nach dem Molekulargewicht der Proteine über eine SDS-PAGE. Durch Anregung der einzelnen Farbstoffe in einem Fluoreszenzscanner werden für die beiden Proben und den internen Standard individuelle Gelbilder erzeugt. Diese Bilder werden nach erfolgter Normalisierung auf den internen Standard mittels einer Software verglichen und die Unterschiede zwischen den analysierten Proben quantitativ erfasst.

### 3.3.7 Labelfreie massenspektrometrische Quantifizierung

Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 erläutert, werden bei diesem Ansatz Peptide anstelle von Proteinen quantifiziert. Dabei kann die Quantifizierung sowohl auf MS- als auch auf MS/MS-Ebene erfolgen. Obwohl bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode die Quantifizierung auf MS-Ebene erfolgte, werden die aus den MS/MS-Daten gewonnenen Informationen für die Identifizierung der Peptide und damit der Proteine benötigt. Zur Quantifizierung der Proben kam der in der Software Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics) implementierte Algorithmus zum Einsatz. Das Grundprinzip der Quantifizierung ist in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt und wird im Folgenden kurz beschrieben. In einem ersten Schritt werden die in einem LC-MS Lauf detektierten  $m/z$ -Werte (Features) auf einer dreidimensionalen Karte dargestellt. Jedes Peptid wird dabei durch sein Isotopenmuster repräsentiert, wobei die Intensität der Signale auf der y-Achse, der  $m/z$ -Wert und die Retentionszeit auf x- und z-Achse aufgetragen werden. Ähnlich dem Vorgehen in 2D-Gel-Experimenten (s. Kapitel 4) basiert das folgende „Alignment“ auf dem graphischen Übereinanderlegen der einzelnen LC-MS-Analysen. Für die Quantifizierung wird die „Fläche“ des Isotopenmusters eines Peptids über seine gesamte Elutionszeit herangezogen. Dabei erfolgt die Quantifizierung unabhängig von einer möglichen Identifizierung. Wurde für ein Peptid kein MS/MS-Spektrum aufgezeichnet, da es im Rahmen der DDA (Data Dependent Acquisition) nicht fragmentiert wurde, kann dies in einer unabhängigen LC-MS-Analyse nachgeholt werden. DDA bezeichnet einen Vorgang, bei dem die höchsten Signale eines MS-Spektrums automatisch nacheinander selektiert und fragmentiert werden. Nach erfolgter Identifizierung der Peptide können aus den Einzelintensitäten (Flächen) der Peptide (MS-Ebene) die Werte für die entsprechenden Proteine berechnet werden.

Die Tatsache, dass bei dieser Methode keinerlei Markierung verwendet wird, kann gleichermaßen als Vor- und Nachteil angesehen werden. Durch die fehlende Markierung gibt es grundsätzlich keine Limitierung in Bezug auf die Anzahl der zu vergleichenden Zustände (Multiplexing). Außerdem ist die Methode deutlich kostengünstiger als vergleichbare Methoden, welche auf Isotopenmarkierung (SILAC; iTRAQ, etc.) basieren. Wie auch bei 2D-DIGE ist eine absolute Quantifizierung von Proteinen nicht möglich. Da die zu vergleichenden Proben in vollständig unabhängigen Analysen untersucht werden, ist bei der Durchführung auf eine gute Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung und des LC-MS-Setups zu achten.



**Abbildung 3.11:** Vereinfachte Darstellung der labelfreien Quantifizierung.

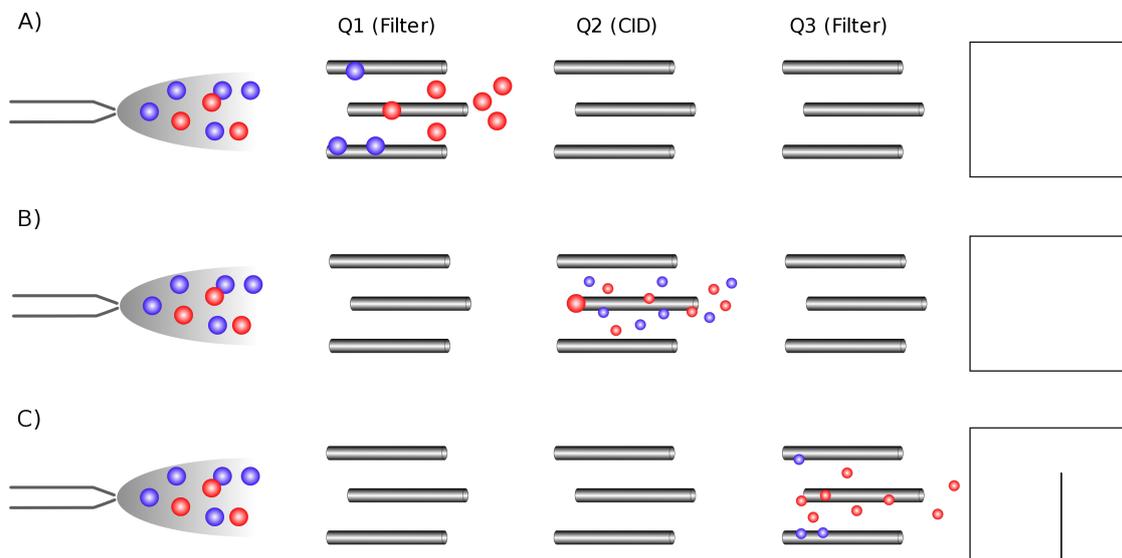
Die einzelnen Analysen werden auf Basis ihres „Contour Plots“, ähnlich zweier Gelbilder während der 2D-DIGE-Analyse, übereinandergelegt (A). Zur Quantifizierung wird die „Fläche“, welche durch den Elutionszeitraum und die Intensität eines Peptids (Isotopenmusters) aufgespannt wird, für jedes Peptid eines Laufes erfasst und zwischen den verschiedenen analysierten Zuständen verglichen (B). Für die Identifizierung der auf MS-Ebene quantifizierten Peptide werden die über DDA aufgenommenen MS/MS-Spektren herangezogen (C).

### 3.3.8 Selected reaction monitoring (SRM)

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Quantifizierungsmethoden, welche als „Screening-Methoden“ zu betrachten sind, stellt SRM (Selected Reaction Monitoring) einen labelfreien Ansatz zur gezielten Quantifizierung (aber auch Identifizierung) bestimmter Proteine dar. Dabei können sowohl Proteine, die bereits in einer vorherigen LC-MS-Analyse identifiziert wurden als auch nicht identifizierte Proteine (sofern deren Aminosäuresequenz bekannt ist) in die Untersuchung mit einbezogen werden (Picotti *et al.*, 2009). Die Quantifizierung der Proteine erfolgt hierbei über eine repräsentative Auswahl von Peptiden, die stellvertretend für das entsprechende Protein quantifiziert werden. Als SRM-Übergang wird die Kombination des  $m/z$ -Verhältnisses des gesuchten Peptids und eines Fragments dieses Peptids bezeichnet. Die Auswahl geeigneter Peptide ist dabei entscheidend für die Sensitivität und Selektivität der Methode. Für SRM-Übergänge ausgewählter Peptide sollten sowohl einzigartig für ein zu quantifizierendes Protein, als auch massenspektrometrisch gut detektierbar sein (Mallick *et al.*, 2007). Außerdem sollten diese so genannten „proteotypischen Peptide“ (PTPs) keine Modifikationen aufweisen, um eine Aufspaltung des SRM-Signals zu verhindern. Insbesondere die Beurteilung der Detektierbarkeit der ausgewählten Peptide und deren Fragmente stellt ein Problem dar. Neben der empirischen Suche nach geeigneten Peptiden und Übergängen mittels eines vorgeschalteten Identifizierungslaufs (DDA) können proteotypische Peptide auch mit geeigneten Programmen vorhergesagt werden (Mallick *et al.*, 2007). In beiden Fällen sollten die identifizierten SRM-Übergänge allerdings mittels einer „SRM triggered MS/MS-Analyse“ validiert werden. Dabei löst die Detektion eines SRM-Übergangs am Detektor die Aufnahme eines MS/MS-Spektrums aus, welches dann zur Überprüfung des Peptid-/Precursor-Ions verwendet werden kann und somit sicherstellt, dass mit den gewählten Parametern auch tatsächlich das gewünschte Peptid detektiert wird.

Für die Quantifizierung eines Peptids werden der erste (Q1) und dritte Quadrupol (Q3) eines Triple-Quadrupole-Massenspektrometers als Massenfiter eingesetzt und auf das  $m/z$ -Verhältnis des Peptid-Ions (Q1) bzw. eines für das Peptid charakteristischen Fragment-Ions (Q3) eingestellt (Abbildung 3.12). Die für einen Übergang am Detektor gemessene Ionenspur (Intensität über Zeit) ist zur Menge des Peptides proportional. Um die Verlässlichkeit der Identifizierung und Quantifizierung zu erhöhen, werden pro Peptid in der Regel mehrere SRM-Übergänge betrachtet. Pro Peptid werden somit mehrere Fragmentionen analysiert. Hierdurch können auch isobare Peptide, welche das gleiche  $m/z$ -Verhältnis, aber eine unterschiedliche Aminosäuresequenz besitzen, unterschieden werden. Zusätzlich können vor der eigentlichen Quantifizierung zur Steigerung der Sensitivität verschiedene Geräteparameter wie die Kollisionsenergie (CE) und das

Declustering Potential (DC) für einzelne Übergänge optimiert werden. Sowohl für die Identifizierung geeigneter Übergänge als auch für die Optimierung der erwähnten Geräteparameter wird häufig auf synthetische Peptide zurückgegriffen. Dies vermindert die Komplexität und den dynamischen Bereich während der Methodenentwicklung erheblich, was insbesondere bei der Quantifizierung niederabundanter Peptide von Vorteil ist.



**Abbildung 3.12:** Schematische Darstellung der Analyse eines SRM-Übergangs.

Die SRM-Analyse erfolgt in einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer. Dabei werden der erste und der dritte Quadrupol (Q1, Q3) als Massenfilter betrieben, Q2 dient als Kollisionszelle. Nach Selektion eines bestimmten Peptid-Ions ( $m/z$ -Verhältnisses) durch Q1 (A), werden diese Ionen in Q2 fragmentiert (B). Q3 ist wiederum für ein bestimmtes  $m/z$ -Verhältnis selektiv (C). Alle Ionen und Fragmentionen, welche nicht den „Filtereinstellungen“ entsprechen, gelangen nicht zum Detektor.

Zwei weitere kritische Parameter bei SRM-Experimenten stellen die Dwell- und Cycle-Time dar. Als Dwell-Time wird diejenige Zeit bezeichnet, welche für die Analyse eines einzelnen SRM-Übergangs zur Verfügung steht. Die Cycle-Time beschreibt diejenige Zeitspanne, welche zum Durchlaufen aller in einem Experiment zu analysierenden SRM-Übergänge benötigt wird. Eine Erhöhung der Dwell-Time geht somit mit einer Erhöhung der Sensitivität, allerdings auch mit einer Erhöhung der Cycle-Time einher. Da bei einer langen Cycle-Time während des Elutionszeitraums eines Peptides weniger Datenpunkte aufgenommen werden können, führt dies zu einer ungenaueren Quantifizierung der eluierenden Peptide. Um in jeder LC-MS-Analyse eine möglichst große Anzahl an Proteinen quantifizieren zu können, muss daher ein Kompromiss zwischen Dwell- und Cycle-Time gefunden werden. Eine Möglichkeit die Zahl der messbaren SRM-Übergänge

weiter zu erhöhen, ist die Verwendung einer „scheduled SRM“-Methode. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass ein bestimmtes Peptid in einem definierten Zeitraum von der RP-Säule eluiert und SRM-Übergänge, welche der Detektion dieses Peptides dienen, nur während dieser Zeit zu erwarten sind. Somit ist es möglich, bestimmte SRM-Übergänge nur während eines definierten Zeitfensters und nicht während des gesamten Gradienten zu „scannen“. Dies reduziert die Cycle-Time drastisch und erlaubt durch die Erhöhung der Dwell-Time einen deutlichen Sensitivitätsgewinn (Stahl-Zeng *et al.*, 2007).

## 3.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, im Rahmen des Verbundprojekts „Systembiologie in *Pseudomonas putida* für die industrielle Biokatalyse“, quantitative Veränderungen des Proteoms von *Pseudomonas putida* KT2440 in Gegenwart verschiedener Substanzen, welche Edukte bzw. Produkte möglicher biotechnologischer Synthesewege darstellen, zu analysieren. Dabei sollen die Auswirkungen der Stoffe Ethylenglycol, Glyoxylsäure, Butanol und Vanillin auf *P. putida* KT2440 untersucht werden. Eine weitere Analyse zum Metabolismus von Terpenen (Citronellol) soll in *P. aeruginosa* PAO1 erfolgen, da dieser Organismus, im Gegensatz zu *P. putida* KT2440, über die nötige genetische Ausstattung verfügt. Ein besonderes Augenmerk liegt bei allen Analysen auf Enzymen, welche für den Abbau der gewünschten Produkte verantwortlich bzw. an der Synthese wirtschaftlich interessanter Zwischen- und Endprodukte beteiligt sind. Zudem sollen Toleranzmechanismen sowie eine mögliche Stressantwort gegenüber den eingesetzten, teilweise toxischen, Substanzen analysiert werden.

Im Kontext des Verbundprojekts sollen die erhobenen Proteomdaten durch die Identifizierung von Schlüsselenzymen konkrete Anhaltspunkte für die Entwicklung von *Pseudomonas*-Mutanten liefern, welche die gewünschten Produkte (Glyoxylsäure, Vanillin, Butanol) synthetisieren und akkumulieren. Diese von den Projektpartnern generierten Mutanten sollen im Anschluss ebenfalls auf quantitative Veränderungen des Proteoms untersucht werden, um Veränderungen im Stoffwechsel aufzuzeigen und mögliche Schritte zur weiteren Optimierung zu identifizieren. Darüber hinaus sollen die erhobenen Proteomdaten zusammen mit Daten aus Transkriptom- und Metabolomanalysen in ein genombasiertes Netzwerkmodell einfließen und zur Simulation des bakteriellen Stoffwechsels herangezogen werden.

Für die Quantifizierung zytosolischer Proteine soll die bereits etablierte 2D-DIGE-Methode verwendet werden. Da insbesondere große und hydrophobe Proteine mit dieser Methode nur schwer zu erfassen sind, sollen vor allem für die quantitative Untersuchung

des Membran- und Gesamtproteoms alternative Methoden der Probenvorbereitung, Fraktionierung und Quantifizierung etabliert werden. Um eine möglichst große Zahl von Proteinen mit überschaubarem zeitlichen und finanziellen Aufwand identifizieren und quantifizieren zu können, sollen hierfür vor allem labelfreie massenspektrometrische Quantifizierungsmethoden zum Einsatz kommen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmittel und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Appli-Chem (Darmstadt) und Fluka (Neu-Ulm) bezogen und hatten den Reinheitsgrad „pro Analyse“ (p.A.). Einige wichtige Chemikalien und Verbrauchsmittel sind in *Tabelle 4.1* zusammengefasst.

**Tabelle 4.1:** Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
<b>UPLC Säulen (Waters), Nadel</b>	
2 cm x 180 $\mu\text{m}$ C18 (Partikelgröße: 5 $\mu\text{m}$ )	Waters (USA)
20 cm x 75 $\mu\text{m}$ BEH 130 C18 (Partikelgröße: 1,7 $\mu\text{m}$ )	Waters (USA)
Silica-Emitter-Tip (360 $\mu\text{m}$ OD, 10 $\mu\text{m}$ ID)	New Objective (USA)
<b>HPLC Säulen (Agilent Technologies)</b>	
50x 2,1 mm, (Partikelgröße: 2,6 $\mu\text{m}$ ), C18, 100 $\text{\AA}$	Phenomenex
<b>HPLC Säulen (Dionex U3000)</b>	
300 $\mu\text{m}$ x 5 mm Acclaim PepMap100 C18, 5 $\mu\text{m}$ , 100 $\text{\AA}$	Dionex
150 mm x 75 $\mu\text{m}$ REPROSIL-PUR C18-AQ, 2.4 $\mu\text{m}$	Maisch
<b>Sonstiges</b>	
Pseudomonas Isolationsagar (PIA)	BD (Deutschland)
PlusOne Bind-Silane	GE Healthcare (Deutschland)
Trypsin rec. (Proteomics Grade)	Roche Diagnostics (Deutschland)

Tabelle 4.2: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
<b>2D-DIGE Equipment</b>	
DALTSix Gel Caster	GE Healthcare (Deutschland)
Ettan IPGphor 3	GE Healthcare (Deutschland)
Ettan DALTSix Electrophoresis Unit	GE Healthcare (Deutschland)
Typhoon Trio +	GE Healthcare (Deutschland)
Ettan Spot Picker	GE Healthcare (Deutschland)
Digest Pro MS	Intavis (Deutschland)
SpeedVac concentrator 5301	Eppendorf (Deutschland)
<b>UPLC/HPLC und Massenspektrometer</b>	
nano Acquity UPLC	Waters (USA)
ESI LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific (USA)
Infinity 1290	Agilent Technologies (Deutschland)
U3000	Dionex
Qtrap 5500	AB Sciex (Deutschland)
<b>Allgemeine Laborgeräte</b>	
BioPhotometer	Eppendorf (Deutschland)
Optima™ MAX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Deutschland)
Vertikale Gelelektrophoresekammer	GE Healthcare (Deutschland)
Multitron Standard	Infors HT (Schweiz)
Sonifier 450	Branson (USA)
Systec V-120	Systec (Germany)
MilliQ	Millipore (Germany)

**Tabelle 4.3:** Verwendete Softwarepakete.

<b>Softwarepaket</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller / Quelle</b>
Scaffold	3.6.2	Proteome Software
Mascot Server	2.3	Matrix Science
Progenesis SameSpots	4.1	Nonlinear Dynamics
Progenesis LC-MS	3.1	Nonlinear Dynamics
Xcalibur	2.0.7	Thermo
NCBI Datenbank	18.03.2011	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
MRMPilot <sup>TM</sup>	2.1	AB Sciex
Analyst	1.5.2	AB Sciex
MultiQuant <sup>TM</sup>	2.1	AB Sciex
Python	2.7.3	<a href="http://www.python.org">www.python.org</a>

**Tabelle 4.4:** Häufig verwendete Lösungen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Waschpuffer Zellernte (pH8)	5 mM Magnesium Acetat 10 mM Tris-HCl
DIGE-Lysepuffer (pH 8,5)	30 mM TRIS ( Base) 7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4% Chaps
2 x Ladepuffer 1D-Frak. (pH 6,8)	150 mM TRIS 1,2% SDS 20 mM DTT 10% Glycerol 0,03% Bromphenolblau
3 x Ladepuffer 1D-SDS PAGE (pH 6,8)	150 mM Tris-HCl, pH 6,8 1,2% SDS 30% Glycerin 15% Mercaptoethanol 0,03% Bromphenolblau
Carbonatextraktionspuffer (pH 11,5)	100 mM Natriumbicarbonat
1x Probenpuffer 1D-SDS PAGE (pH 6,8)	4 % SDS 4% Glycerin 0,3% Mercaptoethanol 75 mM Tris-HCl, pH 6,8
Laemmli-Puffer (pH 8,3)	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1% SDS
Fixierlösung (Silberfärbung)	30% Ethanol (v/v)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
	10% Essigsäure (v/v)
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	2 % Glucose (w/v) 100 mM Borsäure 150 mM NaOH 50 µM Natriumthiosulfat
Stopplösung (Silberfärbung)	330 mM TRIS 2% Essigsäure
2 x Probenpuffer (DIGE)	8 M Harnstoff 130 mM DTT 4% Chaps
Rehydrierungspuffer	7M Harnstoff 20 mM DTT 4% Chaps 2 M Thioharnstoff
Äquilibrierungspuffer (pH 8,8)	6 M Harnstoff 75 mM Tris (Base) 2% SDS 29,3% Glycerol
1 M TRIS pH 8,8	1 M Tris (Base)
10x 2D-Gel-Laufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 2% (w/v) SDS

---

## 4.2 Kultivierung

### 4.2.1 Verwendete Bakterienstämme

**Tabelle 4.5:** Übersicht über die in den einzelnen Teilprojekten verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft	Teilprojekt
<i>P. putida</i> KT2440	Wildtyp	BASF	Ethylenglycol, Vanillin, Butanol
<i>P. putida</i> GN187	$\Delta upp, \Delta gcl, \Delta glcB,$ $\Delta prpb$	AG Altenbuchner	Ethylenglycol
<i>P. putida</i> GN259	$\Delta upp, \Delta aceA, \Delta gcl,$ $\Delta glcB, \Delta prpb$	AG Altenbuchner	Ethylenglycol
<i>P. putida</i> JM37	Wildtyp	BASF	Ethylenglycol
<i>P. putida</i> GN235	$\Delta upp, \Delta lapA, \Delta vdh$	AG Altenbuchner	Vanillin
<i>P. putida</i> GN276	$\Delta upp, \Delta lapA, \Delta vdh,$ $\Delta PP\_3827-PP\_2832$	AG Altenbuchner	Vanillin
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	AG Jendrossek	Terpene

### 4.2.2 Kulturmedien

**Tabelle 4.6:** Übersicht über die eingesetzten Kulturmedien.

Zusätzlich zu den eingesetzten Kulturmedien sind in dieser Tabelle auch die Zusammensetzungen der eingesetzten Spurensalz- und Vitaminlösungen angegeben.

Medium	Zusammensetzung
LB	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl
M12 (BASF)	1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Medium	Zusammensetzung
	0,1 g/l NaCl
	0,2 g/l MgSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O
	0,02 g/l CaCl - 2 H <sub>2</sub> O
	1 ml/l Spurensalzlösung SL4
	10 ml/l Vitaminlösung
	2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	entsprechende C-Quelle
M12 (BVT)	2,2 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,02 g/l NaCl
	0,4 g/l MgSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O
	0,04 g/l CaCl - 2 H <sub>2</sub> O
	10 ml/l Spurensalzlösung SEL
	2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	entsprechende C-Quelle
MM	4,47 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 2 H <sub>2</sub> O
Minimalmedium	1,5 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
(nach Schlegel <i>et al.</i> 1961)	1,0g/l NH <sub>4</sub> Cl
	0,2 g/l MgSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O
	0,02 g/l CaCl <sub>2</sub> - 2 H <sub>2</sub> O
	1,2 mg/l Fe(III)NH <sub>4</sub> -Citrat
	0,1 ml SL6 10000x
Pseudomonas Isolationsagar	45 g PIA (BD)
	20 ml Glycerol
	auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Spurensalzlösung SL4	200 mg/l FeSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O
	10 mg/l ZnSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O
	3 mg/l MnCl <sub>2</sub> - 4 H <sub>2</sub> O
	30 mg/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>

Medium	Zusammensetzung
	20 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
	1 mg/l $\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
	2 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
	3 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	500 mg/l Titriplex III
Spurensalzlösung SEL	1 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	200 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	100 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
	30 mg/l $\text{H}_3\text{Bo}_3$
	100 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
	2 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
	3 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	1,5 g/l $\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Vitaminlösung	200 mg/l Biotin
	200 mg/l Folsäure
	20 mg/l p-Aminobenzosäure
	20 mg/l Riboflavin
	40 mg/l Calziumpantothemat
	140 mg/l Nicotinsäure
	40 mg/l Pyridoxin HCl
	200 mg/l Myo-Inosit
	40 mg/l Thiaminium HCl

### 4.2.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Alle Stämme wurden vor einem Versuch frisch aus einem Glycerol-Stock auf „Pseudomonas Isolations-Agar“ (PIA) ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie für eine Vorkultur gepickt und im entsprechenden Medium gelöst. Da sich die folgenden Schritte der Kultivierung bis zur Zellernte zwischen den einzelnen Versuchen teils deutlich unterschieden, werden diese in separaten Abschnitten besprochen. Die Zellernte war wiederum in allen im Schüttelkolben durch-

geführten Versuchen identisch und wurde wie folgt bei 4°C durchgeführt. 50 ml der Bakteriensuspension der Hauptkultur wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbliebene Bakteriensuspension auf gleiche Weise behandelt. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 20 ml Waschpuffer resuspendiert, für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut für 10 min bei 3200 g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 10 ml Waschpuffer wiederholt. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 1,5 ml Waschpuffer aufgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 4.2.3.1 Kultivierung der Zellen für die Analyse des Ethylenglycol- und Glyoxylsäure-Metabolismus

Die in diesen Versuchen verwendeten Stämme (KT2440, GN187, GN259 und JM37) wurden wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben aus einem Glycerolstock angezogen. Die Vorkultur erfolgte in 20 ml LB-Medium bei 30°C und 180 rpm über Nacht. Vor der Inokulation der Hauptkultur wurde die Vorkultur unter dem Mikroskop auf Kontaminationen überprüft. Für die Hauptkultur wurden je 100 ml M12-BASF Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben vorgelegt und mit 100 µl der Vorkultur inokuliert. Als einzige Kohlenstoffquelle wurden dem Medium 10 mM Glucose zugesetzt. Nach 12 h Inkubation bei 30°C und 180 rpm wurden jeweils drei Kolben mit 80 mM Ethylenglycol bzw. 10,8 mM Glyoxylsäure behandelt. Drei weitere Kolben dienten als Kontrolle und wurden nicht behandelt. Nach weiteren 5 h Inkubation wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben geerntet. Die Kultivierung wurde gemeinsam mit Björn Mückschel (AG Hauer, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) durchgeführt.

### 4.2.3.2 Kultivierung der Zellen für die Analyse des Butanol-Metabolismus

In diesem Teilprojekt wurde ausschließlich der Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 verwendet. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den im Schüttelkolben und den im Fermenter erhobenen Daten zu gewährleisten, erfolgte die Kultivierung der Proben in M12-BVT anstelle von M12-BASF Medium. Beide Medien sind in Tabelle 4.6 beschrieben und unterscheiden sich sowohl in der Konzentration der enthaltenen Salze als auch in der Zusammensetzung der eingesetzten Spurenelementlösungen. Zudem wurden dem M12-BASF Medium eine Vitaminlösung zugesetzt, welche das M12-BVT Medium nicht enthielt.

Die Vorkultur erfolgte in 5 ml M12-BVT Medium (10 mM Glucose) bei 30°C und 180 rpm über Nacht. Für die Hauptkultur wurden 100 ml M12-BVT Medium (10 mM

Glucose) in einem 500 ml Erlenmeyerkolben vorgelegt und auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,02 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen bei 30°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 kultiviert und mit Butanol induziert. Hierzu wurden je drei Kolben mit 0,5 g/l bzw. 3 g/l Butanol induziert, drei weitere Kolben wurden nicht behandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach einer weiteren Stunde, nachdem diese eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht hatten (4.2.3). Die Kultivierung der für die 2D-DIGE-Analysen verwendeten Zellen wurde von Björn Mückschel (AG Hauer, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) durchgeführt. Proben für die 2D-DIGE-Experimente und die 1D-Gel-Fraktionierung wurden unter identischen Bedingungen generiert.

#### 4.2.3.3 Kultivierung der Zellen für die Analyse des Vanillin-Metabolismus

Für dieses Teilprojekt wurden die Stämme *P. putida* KT2440 und *P. putida* GN235 verwendet. Die Zellen wurden in M12-BASF Medium, welches entweder 10 mM Glucose oder 6,6 mM (0,1%) Vanillin als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, kultiviert. Um eine Adaption der Zellen an die jeweils eingesetzte Kohlenstoffquelle zu ermöglichen, wurde diese bereits in der Vorkultur eingesetzt (6,6 mM Vanillin bzw. 10 mM Glucose). Da bei der Kultivierung des Wildtypstammes (*P. putida* KT2440) eine Tendenz zur Aggregation beobachtet wurde, wurde das Volumen der Vorkultur auf 50 ml erhöht. Die Kultivierung erfolgte in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bei 30°C und 180 rpm über Nacht. Die Hauptkultur wurde in 100 ml M12-BASF Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 10 mM Glucose bzw. 6,6 mM Vanillin durchgeführt. Hierzu wurde die Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,01 eingestellt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte somit während der logarithmischen Wachstumsphase. Für jede Kohlenstoffquelle wurden drei biologische Replikate kultiviert.

#### 4.2.3.4 Kultivierung der Zellen für die Analyse des Terpen-Metabolismus

Die Kultivierung des in diesem Versuch verwendeten Stammes *P. aeruginosa* PAO1 sowie die Probenvorbereitung für des 1D-Gel-Fraktionierungs-Experiment wurde von Nadine Walter (AG Jendrossek, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart) durchgeführt. Die Überprüfung des Zellwachstums erfolgte nicht über die Messung der OD<sub>600</sub> sondern über ein Klett-Summerson Photoelectricolorimeter.

Für die Vorkultur wurden die Zellen in 100 ml MM-Medium mit 0,05% Oktansäure als einziger Kohlenstoffquelle in 500 ml Erlenmeyerkolben für 16 h bei 30°C kultiviert. Für die Hauptkultur wurden 200 ml MM Medium in eine 1 l Erlenmeyerkolben vorgelegt und mit der Vorkultur auf 10-20 Kletteinheiten eingestellt. Als Kohlenstoffquellen für die einzelnen analysierten Zustände wurden folgende Konzentrationen verwendet:

0,05% Oktansäure + 0,1% Citronellol; 0,05% Oktansäure + 0,1% Citronellsäure; 0,1% Oktansäure und 0,4% Glucose. Die Ernte der Zellen erfolgte bei 200 Klett-Einheiten durch Zentrifugation bei 7.000 rpm für 10 min. Im Gegensatz zu den übrigen Versuchen wurden die Zellen nach der Zentrifugation nicht gewaschen, sondern bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte über eine French-Press. Für eine genauere Beschreibung der Kultivierung sei auf die Diplomarbeit von *Nadine Walter* verwiesen (Walter, 2012).

### 4.2.4 Kultivierung von *Pseudomonas putida* KT2440 im Bioreaktor

Die Kultivierung der für die Metabolom-, Transkriptom- und Proteom-Analyse benötigten Bakterien wurde am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart von *Tobias Vallon* (AG Takors, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart) durchgeführt. Daher soll die Anzucht der Bakterien im Reaktor hier nur kurz beschrieben werden.

Zu Beginn wurde 13,6 ml eines Glycerolstocks von *P. putida* KT2440 in einen Schüttelkolben mit 130 ml M12-BVT Medium mit 4 g/l Glucose überführt und für 6 h bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3,5 kultiviert. Anschließend wurde diese Vorkultur in einen 3,71 KLF Bioreaktor in welchem 1350 ml M12-BVT Medium mit 4 g/l Glucose vorgelegt waren transferiert. Die Kultivierung wurde bei 30°C, einem  $\Delta p$  von 0,5 bar, einer Begasungsrate (VG) von 2 Nl/min und einem pO<sub>2</sub> > 30% (Sättigung der Gelöstsauerstoffkonzentration in %) durchgeführt. Der pH Wert wurde durch 25% NH<sub>4</sub>OH bei pH 7 konstant gehalten. Die Rührerdrehzahl variierte zwischen 300 und 1.200 rpm und diente dazu eine Gelöstsauerstoffkonzentration > 30% zu gewährleisten.

Der Bioreaktor wurde bis zum Erreichen der C-Limitierung im Batch-Verfahren betrieben (OD<sub>600</sub> ~ 10). Im Anschluss wurde die kontinuierliche Kultivierung unter Glucoselimitierung (Verdünnungsrate D= 0,1 h<sup>-1</sup>) gestartet. Als Feedmedium wurde M12-BVT Medium mit 10 g/l Glucose verwendet. Nach 50 h kontinuierlicher Kultivierung (5 Verweilzeiten) wurden die ersten Proteomproben (Steady-State I) aus dem Reaktor entnommen (3 x 5 ml) und analog zu den Schüttelkolbenexperimenten pelletiert und gewaschen. Im Anschluss an die Probenahme erfolgte der Wechsel des Feedmediums auf M12-BVT 10 g/l Glucose + 0,75 g/l Butanol. Nach weiteren fünf Verweilzeiten (ca. 50 h) wurden erneut Proben entnommen (Steady-State II) und ein Wechsel des Feedmediums auf M12-BVT Medium 10 g/l Glucose + 7,5 g/l Butanol durchgeführt. Nach weiteren 50 h erfolgte eine letzte Probenahme (Steady-State III) aus dem Bioreaktor. Insgesamt wurden sechs Kultivierungen im Bioreaktor durchgeführt. Pro Zustand (Steady-State I, II, III) waren am Ende je drei biologische Replikate für die Proteomanalyse vorhanden.

## 4.3 Probenvorbereitung

### 4.3.1 Aufschluss von Bakterienzellen

Der Aufschluss der aus den Schüttelkolben und dem Bioreaktor gewonnenen Zellen erfolgte, je nach Versuch, in unterschiedlichen Puffern. Während die Bakterien für die 2D-DIGE-Analyse und die labelfreie Analyse der Membranfraktion in DIGE-Lysepuffer aufgeschlossen wurden, erfolgte der Aufschluss der Proben für das 1D-Gel-Fraktionierungsexperiment mit 2 x Ladepuffer (1D-Fraktionierung). Die für die 1D-Gel-Elektrophorese benötigten Bestandteile Glycerol und Bromphenolblau wurden erst unmittelbar vor der Gelelektrophorese zugegeben (s. 4.4.1). Die aus den einzelnen Kultivierungen erhaltenen Zellpellets wurden in der 5-fachen Menge des entsprechen Puffers resuspendiert und mittels Ultraschall (5 x 30 s) auf Eis aufgeschlossen. Da sich die nachfolgende Behandlung der Proben je nach eingesetzter Methode unterschied, werden diese Schritte separat besprochen.

### 4.3.2 Probenvorbereitung für die 2D-DIGE-Analyse

Um nicht-lysierte Zellen und Zellwandbestandteile nach dem Aufschluss abzutrennen, wurden die Proben bei 14.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Ultraschallröhrchen überführt und für 1 h bei 80.000 g zentrifugiert. Hierdurch wurde die Membranfraktion von der zytosolischen Fraktion getrennt. Im Anschluss wurde der Proteingehalt des Überstandes mittels Bradford-Assay (s. Abschnitt 4.3.5) bestimmt und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Aufarbeitung des Membranpellets wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

### 4.3.3 Probenvorbereitung der Membranprotein-Proben

Das aus der Ultrazentrifugation erhaltene Membranpellet wurde in 100 µl eiskaltem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aufgenommen und mit Hilfe von Ultraschall (20 s im Ultraschallbad) gelöst. Anschließend wurden weitere 800 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hinzugegeben und die Probe wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, lose mit der Membran assoziierte Proteine zu entfernen. Durch Zentrifugation bei 80.000 g für 30 min wurden die Membranen anschließend erneut pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Um die Proteine aus der Membran zu lösen, wurde das Pellet in 150 µl 1 x Probenpuffer resuspendiert. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Pellets war dies oft schwierig. Um das Pellet vollständig zu solubilisieren, wurde die Probe daher häufig nochmals im Ultraschallbad behandelt. Nach erfolgreicher Solubilisierung wurde die Probe für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend bei 14.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde

in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mittels Bradford-Assay (s. Abschnitt 4.3.5).

#### 4.3.4 Probenvorbereitung der 1D-Gel-Fraktionierungsproben

Die in 2 x Ladepuffer aufgeschlossene Probe (s. Abschnitt 4.3.1) wurde für 3 min auf 95°C erhitzt und im Anschluss bei 16.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Aufgrund der hohen Viskosität der Probe bildete sich häufig kein Pellet, weshalb die Probe für 20 min im Ultraschallbad behandelt wurde. Die anschließende Zentrifugation bei 16.000 g für 20 min bei 4°C führte zur Bildung des gewünschten Pellets. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt mittels Bradford-Assay (s. Abschnitt 4.3.5) bestimmt. Die Vorbereitung der Proben für die Analyse des Terpen-Metabolismus unterschied sich von dem hier beschriebenen Vorgehen und ist in der Diplomarbeit von *Nadine Walter* (Walter, 2012) ausführlich beschrieben.

#### 4.3.5 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Der Proteingehalt aller Proben wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (Bradford, 1976). Vor der Analyse wurden die Proben 1:1000 verdünnt. Dies diente sowohl der Anpassung der Proteinmenge an die zuvor erstellte Kalibriergerade (0 – 20 µg/ml BSA) als auch der Verdünnung von in der Probe enthaltenen störenden Substanzen (SDS, Salze, etc.). Für die eigentliche Messung wurden 800 µl der verdünnten Probe mit 200 µl Bradford-Reagenz (Roti<sup>TM</sup>-Quant, Carl Roth) gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Probe bei 595 nm in einem BioPhotometer (Eppendorf, Germany) vermessen und die in der Probe enthaltene Proteinmenge über die Kalibriergerade bestimmt.

### 4.4 Gelelektrophorese

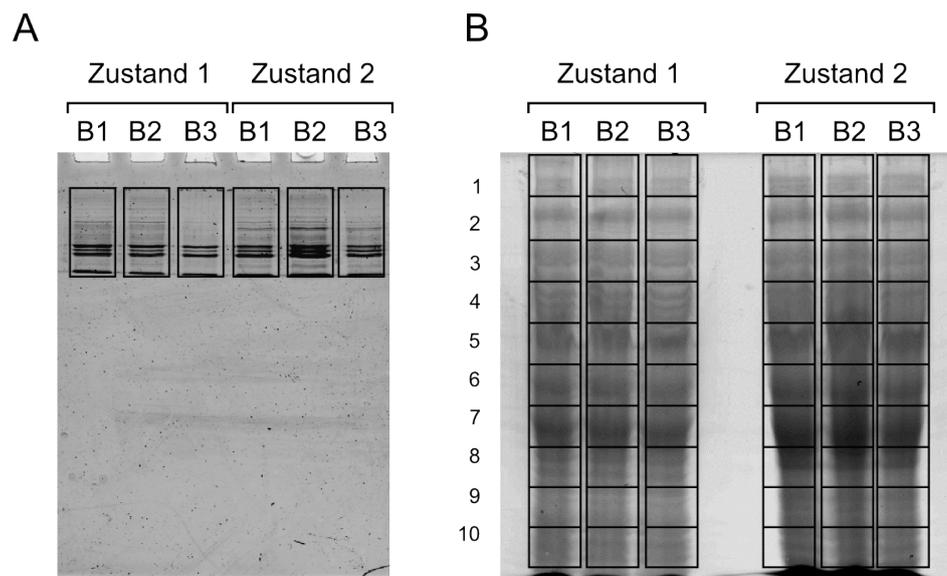
#### 4.4.1 1D-SDS-PAGE

Die eindimensionale SDS-PAGE wurde sowohl für die Analyse der Membranfraktion als auch für das 1D-Gel-Fraktionierungs-Experiment eingesetzt. Während sie im ersten Fall vor allem für die Entsalzung der Probe verwendet wurde, diente sie bei Letzterem vor allem der Fraktionierung der Probe. In beiden Fällen wurde ein diskontinuierliches Elektrophoresesystem verwendet (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung der eingesetzten Minigele (6 cm x 8 cm x 1 mm) ist in Tabelle 4.7 beschrieben. Das Sammelgel hatte eine Länge von 1 cm, das Trenngel von 5 cm.

**Tabelle 4.7:** Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der für die 1D-SDS PAGE verwendeten Gele.

	Trenngel 10%	Sammelgel 4,5%
Bidest	2,5 ml	1,2 ml
30% Acrylamidmix (Rotiphorese-Gel 37,5:1)	2 ml	0,3 ml
4x TRIS HCl/SDS Puffer (pH 8,8)	1,5 ml	-
4x TRIS HCl/SDS Puffer (pH 6,8)	-	0,5 ml
TEMED	6 $\mu$ l	3 $\mu$ l
10% APS (w/v)	40 $\mu$ l	20 $\mu$ l

Für die Entsalzung der Membranproteinproben wurden 15  $\mu$ g Protein auf ein Gel aufgetragen und bei 30 mA aufgetrennt. Nachdem die Probe bis zu einer Tiefe von ca. 1 cm in das Trenngel migriert war, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel mit Coomassie gefärbt (s. Abschnitt 4.4.2.1). Im Anschluss wurde die gesamte Bande als Block aus dem Gel ausgeschnitten und wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben verdaut.



**Abbildung 4.1:** 1D-SDS-PAGE im Rahmen der Analyse des A) Membranproteoms und B) Gesamtproteoms.

Die schwarzen Rechtecke markieren die aus den Gelen ausgeschnittenen Bereiche.

Für das 1D-Gel-Fraktionierungs-Experiment wurde die 200  $\mu$ g Protein entsprechende Probenmenge mit 10% Glycerol und 0,03% Bromphenolblau versetzt und auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde die Probe bei 30 mA komplett aufgetrennt. Im Anschluss an die folgende Coomassie-Färbung wurde jede Gelspur in zehn Banden zerteilt und diese mit Trypsin verdaut. Um die technische Varianz gering zu halten, wurden

die in einem Experiment zu analysierenden Proben wenn möglich auf einem Gel aufgetrennt. Pro Zustand wurden sowohl in dem Membranprotein-Experiment als auch in der 1D-Gel-Fraktionierung des gesamten Zellextraktes drei biologische Replikate analysiert. Die beiden Ansätze sind in Abbildung 4.1 exemplarisch gegenübergestellt.

### 4.4.2 Proteinfärbung

#### 4.4.2.1 Coomassie-Färbung

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Coomassie-Färbung, handelt es sich um eine kolloidale Coomassie Färbung (G250), welche mit der anschließenden massenspektrometrischen Analyse kompatibel war. Da die Sensitivität der Färbung keine entscheidende Bedeutung für die weitere Analyse der Membranfraktion und des Gesamtproteoms hatte, wurde diese Färbemethode der aufwendigeren Silberfärbung in diesen Fällen vorgezogen. Die Färbelösung wurde nach Angaben des Herstellers (Carl Roth, Deutschland) hergestellt. Hierzu wurden 60 ml H<sub>2</sub>O mit 20 ml Methanol und 20 ml Roti<sup>TM</sup>-Blue gemischt und das 1D-Gel darin für mehrere Stunden inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch H<sub>2</sub>O in einem neuen Gefäß. Zur Dokumentation wurden die Gele anschließend auf einem Typhoon Trio-plus Scanner bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm ohne Emissionsfilter gescannt.

#### 4.4.2.2 Silberfärbung

Diese Färbung wurde vor allem zur Kontrolle der 2D-DIGE-Gele eingesetzt (s. Abschnitt 4.4.3.6). In einem ersten Schritt wurden die Gele über Nacht unter leichtem Schütteln in 30% Ethanol und 10% Essigsäure fixiert. Nach viermaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O für je 10 min wurden die Gele mit 8 mM Natriumthiosulfat für 5 min sensibilisiert und erneut zweimal mit H<sub>2</sub>O für je 2 min gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 10 mM Silbernitrat für eine Stunde. Im Anschluss an die Färbung wurden die Gele in eine neue Glaswanne überführt, gewaschen (H<sub>2</sub>O für 30 s) und mit Entwicklerlösung für 20 bis 30 min entwickelt. Sobald eine ausreichend intensive Färbung der Protein-Spots zu erkennen war, wurde die Entwicklerlösung entfernt und die Reaktion gestoppt (Stopplösung). Pro Gel wurden 500 ml jeder Lösung eingesetzt.

### 4.4.3 2D-DIGE

Die durchgeführten 2D-DIGE-Analysen gliederten sich in mehrere Schritte, die im Folgenden separat besprochen werden.

#### 4.4.3.1 Herstellung der Gele

Die für die 2. Dimension benötigten 12% SDS-Gele (20 cm x 26 cm) wurden in einem speziellen Gießstand (EttanDalt Gelcaster, GE) hergestellt und über Nacht polymerisiert. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4.8 angegeben. Nach dem Einfüllen der Acrylamid-Lösung in den Gießstand wurden die Gele mit 0,1% SDS überschichtet um eine gerade Gelkannte zu erzeugen.

**Tabelle 4.8:** Übersicht über die für vier 12% SDS-Gele benötigten Substanzen.

12% SDS-Gele	5x Ansatz für 4 Gele
Bidest (4°C)	78,75 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid (4°C)	150 ml
1 M TRIS-HCl pH 8,8 (4°C)	140,63 ml
10% SDS	3,75 ml
TEMED	281,25 µl
10% APS	1,875 ml

Gele, welche später zum Ausstechen von Protein-Spots mit Hilfe des Ettan<sup>TM</sup> Spot Pickers verwendet wurden, wurden zuvor mit Bind-Silane auf einer der Glasplatten immobilisiert. Hierfür wurden eine Lösung aus 16 ml Ethanol, 400 µl Essigsäure und 20 µl PlusOne Bind-Silane hergestellt. Auf jede Glasplatte, auf der ein Gel fixiert werden sollte, wurden 5 ml dieser Lösung gleichmäßig aufgetragen. Anschließend wurden die behandelten Glasplatten für 1,5 h bei Raumtemperatur getrocknet und an beiden Seiten mit Markierungspunkten für den Ettan<sup>TM</sup> Spot Picker versehen.

#### 4.4.3.2 Markierung der 2D-DIGE-Proben

Für die Markierung der Proben standen die drei DIGE-Farbstoffe Cy2, Cy3 und Cy5 zur Verfügung. Da Fluoreszenz-Farbstoffe lichtempfindlich sind, wurde während des gesamten Versuchs darauf geachtet, sie so wenig Licht wie möglich auszusetzen. In jedem Experiment wurden die zu vergleichenden Proben mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert, während Cy2 für die Markierung des jeweiligen internen Standards reserviert war. Der interne Standard wurde dabei aus allen Proben eines Experiments zu gleichen Teilen gemischt. Für die Markierungsreaktion wurde das Volumen, welches 50 µg Protein entsprach, aus der entsprechenden Probe (s. Abschnitt 4.3.2) entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit DIGE-Lysepuffer auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl Farbstoff (Cy2, Cy3, Cy5) zur Probe gegeben und die Probe für

30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Farbstoffe wurden zuvor nach Angaben des Herstellers in Dimethylformamid gelöst. Um die Kopplungsreaktion zu stoppen und noch nicht gebundenen Farbstoff abzufangen, wurde zu jeder Probe 1  $\mu\text{l}$  10 mM Lysin gegeben und die Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die beiden Proben, welche nun mit Cy3 und Cy5 markiert waren, mit dem internen Standard (Cy2) vereint.

Die weiteren Schritte unterschieden sich je nach verwendetem pH-Gradienten. Streifen mit einem pH-Gradienten von pH 3-11 wurden über so genanntes „Cup-Loading“ mit Probe beladen, während Streifen mit einem pH-Gradienten von pH 4-7 bereits während der Rehydrierung des IPG-Streifens mit Probe beladen wurden („Rehydration-Loading“).

### **IPG-Streifen pH 4-7**

Um eine größere Proteinmenge für die massenspektrometrische Analyse zur Verfügung zu haben, wurden jedem Probenmix zusätzlich 50  $\mu\text{g}$  nicht markierter interner Standard zugesetzt. Im Anschluss wurden dem Probenmix 5  $\mu\text{l}$  Pharmalyte und 2  $\mu\text{l}$  Bromphenolblau hinzugefügt. Das Gesamtvolumen wurde mit Rehydrierungspuffer auf 500  $\mu\text{l}$  eingestellt und der Probenmix für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

### **IPG-Streifen pH 3-11**

Dem Probenmix für das „Cup-Loading“ wurde kein zusätzliches Protein zugesetzt. Zu den 150  $\mu\text{g}$  Protein wurden 15,4  $\mu\text{l}$  2 x Probenpuffer sowie 1  $\mu\text{l}$  IPGs (3-11 NL) hinzugefügt. Anschließend wurde der Probenmix mit DIGE-Lysepuffer auf 100  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt und bei Raumtemperatur für mindestens 1 h inkubiert.

#### **4.4.3.3 Die 1. Dimension (IEF)**

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, erfolgte die Beladung der IPG-Streifen auf zwei unterschiedliche Arten. Das so genannte „Rehydration Loading“ wurde für die 24 cm langen IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von pH 4-7 verwendet. Hierzu wurden die trockenen Streifen über Nacht mit dem Probenmix (500  $\mu\text{l}$ ) inkubiert. Für die isoelektrische Fokussierung wurden die Streifen in einen Ettan<sup>TM</sup> IPGphor 3 (GE Healthcare) überführt und die Fokussierung mit den in Tabelle 4.9 angegebenen Einstellungen durchgeführt. Die maximale Stromstärke wurde auf 75  $\mu\text{A}$  pro Streifen begrenzt um einer zu starken Erwärmung der Gelstreifen entgegen zu wirken.

Die 24 cm langen IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von pH 3-11 wurden über das so genannte „Cup-Loading“ beladen. Hierzu wurden die IPG-Streifen über Nacht in 500  $\mu\text{l}$  Rehydrierungspuffer rehydriert und anschließend in den Ettan<sup>TM</sup> IPGphor 3 (GE Heal-

thcare) überführt. Die Probe wurden dann über ein „Cup“ an der Anode auf den Streifen aufgebracht und die Fokussierung mit den in Tabelle 4.9 angegebenen Parametern gestartet. Die Proteine gelangten somit erst während der ersten Schritte der Fokussierung in den IPG-Streifen. Auch hier wurde die maximale Stromstärke auf 75  $\mu\text{A}$  pro IPG-Streifen beschränkt.

**Tabelle 4.9:** Parameter der isoelektrischen Fokussierung für Rehydratation- und Cup-Loading. Unter dem Punkt „Programm“ ist angegeben, ob es sich um eine kontinuierliche Anhebung der Spannung (Gradient) oder eine schrittweise Anhebung handelte.

Programm	Spannung (V)	Zeit (h)
1. Schritt	150	2
2. Schritt	300	2
3. Gradient	1000	8
4. Gradient	8000	3
5. Schritt	8000	7
6. Schritt	50	8

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung wurden die Streifen für die folgende SDS-PAGE (2. Dimension) vorbereitet. In einem ersten Schritt wurden vorhandene Cysteine reduziert. Hierzu wurden die fokussierten Streifen für 15 min in 15 ml 65 mM DTT (Dithiothreitol) in Äquilibrierungspuffer inkubiert und möglicherweise vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Die freien Thiolgruppen der Cysteine wurden im Anschluss durch 15 ml 135 mM IAA (Iodacetamid) in Äquilibrierungspuffer für 15 min alkyliert und somit die erneute Ausbildung von Disulfidbrücken unterbunden. Zudem wurde durch den Austausch des Puffers die Harnstoffkonzentration in den IPG-Streifen gesenkt und das für die zweite Dimension benötigte SDS zugeführt. Im Anschluss wurden die Streifen mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült.

#### 4.4.3.4 Die 2. Dimension (SDS-PAGE)

Für die zweite Dimension wurden die äquilibrierten IPG-Streifen auf die in Abschnitt 4.4.3.1 gegossenen Gele aufgebracht und mit 0,5% (w/v) Agarose, 0,01% (w/v) Bromphenolblau fixiert. Dabei wurde auf einen luftblasenfreien Kontakt zwischen Gel und IPG-Streifen geachtet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer „Ettan DALT-six Electrophoresis Unit<sup>TM</sup>“ (GE Healthcare). Um auch bei den hier verwendeten langen Laufzeiten eine quantitative Beladung der Proteine mit SDS zu gewährleisten, kamen in den beiden Pufferkammern zwei unterschiedliche Pufferkonzentrationen zum Einsatz. Der 2D-Gel-Laufpuffer der oberen Pufferkammer (Kathode) war zweifach, der

der unteren Kammer (Anode) einfach konzentriert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Temperatur von 20°C durchgeführt, die über einen Thermostat kontrolliert wurde. Pro Gel wurden für die ersten 2 h 10 mA, anschließend 12 mA als Stromstärke eingestellt. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem das Bromphenolblau den unteren Rand der Gele erreicht hatte. Im Anschluss wurden die Gele auf einem Typhoon Trio-plus Fluoreszenzscanner (GE Healthcare) mit einer Auflösung von 100 µm gescannt. Dabei wurden die Laser- und Filter-Einstellungen den verwendeten Farbstoffe angepasst. Tabelle 4.10 fasst die entsprechenden Kombinationen zusammen.

**Tabelle 4.10:** Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Farbstoffe.

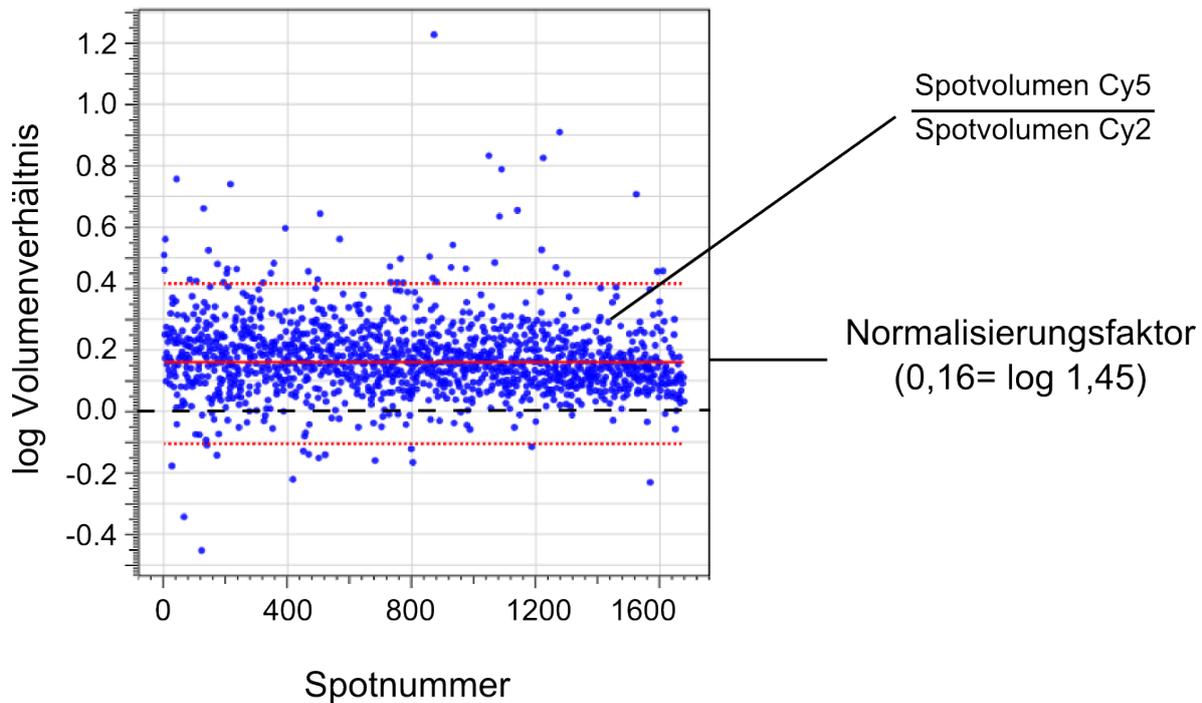
Cy-Farbstoff	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Cy3	532 nm	580 nm
Cy5	633 nm	670 nm
Cy2	488 nm	520 nm

Für jedes analysierte Gel wurden somit drei individuelle Gelbilder erzeugt und diese anschließend zusammen mit den übrigen biologischen Replikaten eines Versuchs quantitativ ausgewertet.

#### 4.4.3.5 Auswertung mittels Progenesis SameSpots

Zur quantitativen Analyse der 2D-DIGE-Gele wurde die Software Progenesis SameSpots in der Version 4.1 verwendet. Grundsätzlich wurden während aller Analysen die Voreinstellungen des Herstellers übernommen (<http://www.nonlinear.com>), weshalb an dieser Stelle nur kurz auf die einzelnen Arbeitsschritte eingegangen werden soll.

In einem ersten Schritt wurden die aufgenommenen Gelbilder eines Experiments in die Software geladen und von dieser automatisch auf ihre Qualität hin überprüft. Im Anschluss wurden die einzelnen Gelbilder (Cy2, Cy3, Cy5) wieder den entsprechenden Gelen zugeordnet. In einem nächsten Schritt wurde aus den Gelbildern der internen Standards (Cy2) eines als Referenz ausgewählt und die übrigen Gelbilder mit dieser Referenz abgeglichen. Ziel dieses so genannten „Alignments“ war es, die Spotmuster der einzelnen Gelbilder zur Deckung zu bringen und so Laufunterschiede zwischen den einzelnen Gelen digital auszugleichen. Im Anschluss daran wurden die auf allen Gelbildern vorhandenen Spots detektiert und auf einem gemeinsamen Bild zusammengeführt. Sowohl das Alignment als auch die Detektion der „Spots“ erfolgten dabei automatisch durch die Software. Randbereiche oder schlecht getrennte Bereiche des Gels sowie Farbartefakte konnten im folgenden Schritt über eine Filterfunktion von der Analyse ausgeschlossen werden.



**Abbildung 4.2:** Normalisierung eines Gelbildes (Cy5) auf den zugehörigen internen Standard (Cy2).

Der Normalisierungsfaktor berechnet sich auf Basis der Verteilung des Verhältnisses der Spottvolumina im zu normalisierenden Gelbild und dem internen Standard des gleichen Gels.

Für die anschließende Normalisierung der Cy3- und Cy5-Gelbilder auf den internen Standard (Cy2) des gleichen Gels wurde das von der Software vorgegebene Verfahren genutzt. Hierbei wurde für jeden Spot eines Gelbildes (z.B. Cy3) das Verhältnis der Spottvolumina (Intensität x Fläche) zwischen diesem und dem zugehörigen internen Standard ermittelt. Dieser Quotient wurde logarithmiert und in einem Koordinatensystem aufgetragen (Abbildung 4.2). Unter der Annahme, dass sich nur ein kleiner Teil der Spottvolumina zwischen den beiden untersuchten Zuständen unterscheidet und der Großteil konstant bleibt, müsste sich somit eine Verteilung um den Wert 0 ergeben. Aufgrund technischer Varianzen (systematischer Fehler) ist die Verteilung jedoch meist um einen bestimmten Faktor verschoben. Dieser Faktor stellt den Korrekturfaktor der Verteilung und damit den Normalisierungsfaktor dar. Um einen Vergleich zwischen den Gelen zu ermöglichen, wurden im Anschluss an die Normalisierung die internen Standards der drei in einem Versuch analysierten Gele ebenfalls gleichgesetzt. Hierdurch konnten systematische Fehler wie unterschiedliche Proteinbeladung zwischen den Proben oder variierende Scanner-Sensitivität zwischen den verwendeten Farbstoffen ausgeglichen werden.

Für die Analyse der Regulation wurden alle Replikate eines Zustands (Cy3 bzw. Cy5) in einer Gruppe zusammengefasst. Die Regulation eines Spots wurde dann anhand des

Quotienten der Mittelwerte der Spotvolumina zwischen den untersuchten Zuständen bestimmt. Zudem kalkulierte die Software für jede Regulation mit Hilfe einer Varianzanalyse (One Way ANOVA) einen p-Wert und lieferte damit ein Maß für die Signifikanz der Regulation. Als Kriterien für einen differentiell regulierten Spot wurden in dieser Arbeit ein p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation  $\geq 1,8$  festgelegt. Diese Schwellenwerte waren zuvor bei einem Vergleich identischer Proben durch 2D-DIGE empirisch ermittelt worden (Daten nicht gezeigt). Alle signifikant regulierten Spots wurden nach der statistischen Auswertung zusätzlich manuell überprüft, da die in der Software implementierte Filterfunktion nicht alle Artefakte (Farbstoffe, Staub, etc.) erfasste und schwache Spots, welche massenspektrometrisch nicht oder nur schwer identifiziert werden können, von der Analyse ausgeschlossen werden sollten. Dies führte in einigen Experimenten zu einer deutlichen Reduktion der zu analysierenden Spots. Die Positionen regulierter Spots wurden anschließend als Liste aus der Software exportiert und in die Software des Ettan<sup>TM</sup> Spot Pickers importiert.

### 4.4.3.6 Spot Picking

Im Anschluss an die Auswertung wurden die Gele in den Ettan<sup>TM</sup> Spot Picker überführt und die regulierten Spots anhand der importierten Liste automatisch ausgestochen. Dabei wurde diejenigen Gele verwendet, welche mit Bind Silane behandelt und mit Marker-Punkten versehen worden waren. Die aus den immobilisierten Gele ausgestochenen Protein-Spots wurden in 96-well Platten überführt und für die massenspektrometrische Analyse verdaut (s. Abschnitt 4.5.1). Da das Ausstechen der regulierten Protein-Spots auf Basis der Fluoreszenz-Bilder automatisch erfolgte, wurde die Präzision des Roboters im Anschluss mittels Silberfärbung überprüft. Hierbei fiel auf, dass das Eigengewicht der Cy-Farbstoffe (wie in der Einleitung beschrieben) besonders im niederen Molekulargewichtsbereich (10-25 kDa) zu einer Auftrennung von markierten und nicht markierten Proteinen führte. Da nur die Position der mit Cy-Farbstoffen markierten Protein-Spots durch den Roboter erfasst wurden und nur etwa 3% der Proteine eines Spots markiert waren, enthielten die ausgestochenen Proben häufig zu wenig Protein für eine Identifizierung mittels LC-ESI-MS/MS. Daher wurden im Anschluss an die Silberfärbung (s. Abschnitt 4.4.2.2) Protein-Spots, welche durch den Roboter nicht korrekt erfasst wurden, manuell ausgestochen. Hierdurch konnte die Zahl der identifizierten Proteine im niederen Molekulargewichtsbereich (10-25 kDa) deutlich gesteigert werden.

## 4.5 Massenspektrometrie

### 4.5.1 In-Gel-Verdau

Das für den Verdau von Gelproben eingesetzte Protokoll basiert im wesentlichen auf der von Shevchenko *et al.* (1996) publizierten Methode zum Verdau silbergefärbter Gele für massenspektrometrische Analysen. Dieses Protokoll wurde sowohl für die Verwendung mit einem Digest Pro MS-Verdauroboter (Intavis) als auch für den manuellen Verdau in leicht abgewandelter Form eingesetzt. Der Verdau der Gelproben war dabei für aus 1D- und 2D-Gelen ausgestochene (ausgeschnittene) Proben identisch, die eingesetzten Volumina wurden jedoch gegebenenfalls an die Größe der Gelstücke angepasst. Das Protokoll für den Verdau von Proben mit Hilfe des Roboters befindet sich im Anhang (s. Anhang), der manuelle Verdau wird im Folgenden kurz beschrieben.

In einem ersten Schritt wurden die Gelstücke für 5 min bei Raumtemperatur mit 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  unter Schütteln gewaschen und der Überstand verworfen. Um den Gelstücken das Wasser zu entziehen, wurden im Anschluss 150  $\mu\text{l}$  Acetonitril (ACN) zugegeben, die Gelstücke für 10 min unter Schütteln inkubiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Cysteine in der Probe durch Inkubation mit 100  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /10 mM DTT für 30 min bei 56°C reduziert. Der Überstand wurde verworfen und den Gelstücken mit 150  $\mu\text{l}$  ACN für 10 min die verbliebene Lösung entzogen. Im Anschluss wurden die Gelstücke mit 85  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  / 55 mM IAA für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und somit die reduzierten Cysteine alkyliert. Der Überstand wurde abgenommen, die Gelstücke mit 150  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  für 10 min inkubiert und der Überstand erneut verworfen. Anschließend wurden die Gelstücke durch die Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  ACN für 10 min dehydriert. Für den Verdau von 2D-DIGE-Spots wurden 24  $\mu\text{l}$  10 ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin in 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  auf die Gelstücke gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Beim Verdau größerer Banden aus 1D-Gelen wurde die Trypsinmenge (15 ng/ $\mu\text{l}$ ) entsprechend angepasst. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  aufgefüllt, bis die Gelstücke komplett mit Flüssigkeit bedeckt waren. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank und wurde am nächsten Morgen durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  10% Trifluoressigsäure(TFA) gestoppt. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Probengefäß überführt und in einem SpeedVac Concentrator 5301 komplett getrocknet. Für die anschließende massenspektrometrische Analyse wurde die Probe in 15  $\mu\text{l}$  (2D-DIGE-Spots) bzw. 60  $\mu\text{l}$  (1D-Gelbanden) 0,1% Methansäure (FA) resuspendiert.

### 4.5.2 Identifizierung von Proteinen

Für die massenspektrometrische Analyse der 2D-DIGE Protein-Spots wurden 5  $\mu\text{l}$  der in Abschnitt 4.5.1 verdauten Probe auf eine 2 cm x 180  $\mu\text{m}$  C18 (Partikelgröße: 5  $\mu\text{m}$ ) Vorsäule injiziert und auf dieser bei einem Fluss von 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  entsalzt und konzentriert. Im Anschluss wurden die Peptide durch einen linearen 30 min Gradienten (Tabelle 4.11) bei einem Fluss von 250  $\text{nl}/\text{min}$  von der Vorsäule über eine 20 cm x 75  $\mu\text{m}$  BEH 130 C18 Reversed Phase Säule (Partikelgröße: 1,7  $\mu\text{m}$ ) eluiert. Nicht eluierte Peptide wurden nach jedem Lauf durch einen Spülschritt (85% Lösungsmittel B) von der Säule entfernt. Im Anschluss wurde die Säule für die nächste LC-MS-Analyse rückkonditioniert (Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11:** Bei der Identifizierung von Proteinen verwendeter 30 min UPLC-Gradient. Als Lösungsmittel wurden 0,1% FA (A) bzw. 0,1% FA, 80% ACN (B) verwendet. Nach dem Gradienten wurde die Säule mit 85% Lösungsmittel B gespült und anschließend mit 1% B für den nächsten Lauf konditioniert.

Zeit (min)	%A	%B
1	99	1
30	50	50
35	15	85
40	15	85
45	99	1

Die Trennsäule war für die Identifizierung „online“ über eine NanoSpray II-Quelle (Thermo Fischer Scientific) mit dem LTQ Orbitrap XL ESI-MS verbunden. Als Nadel kam ein Silica-Emitter-Tip (ID 10  $\mu\text{m}$ , OD 360  $\mu\text{m}$ ) zum Einsatz. Übersichtsspektren ( $m/z = 300\text{-}1.800$ ) wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 60.000 (bei  $m/z = 400$ ) aufgenommen. Für die Fragmentierung wurden die sechs intensivsten Ionen eines Übersichtsspektrums automatisch ausgewählt (DDA) und in der Ionenfalle fragmentiert. Die Analyse der Fragmente erfolgte ebenfalls in der linearen Ionenfalle. Peptid-Ionen welche einmal fragmentiert wurden, wurden im Anschluss für 15 s von der Fragmentierung ausgeschlossen. Während der Analyse erfolgte eine interne Kalibrierung des Gerätes über das Polycyclodimethylsiloxan-Ion ( $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2)_6 \text{H}^+$ ) mit einem  $m/z$ -Wert von 445,12 (Olsen *et al.*, 2005).

### 4.5.3 Labelfreie massenspektrometrische Quantifizierung

Labelfreie Quantifizierung wurde sowohl bei der Analyse des Membranproteoms als auch bei der Analyse des 1D-Gel-Fraktionierungs-Experiments eingesetzt. Grundsätzlich waren die Einstellungen und Parameter der UPLC und des Massenspektrometers mit denen aus den Identifizierungs-Experimenten identisch. In den einzelnen Versuchen kamen jedoch unterschiedliche UPLC-Gradienten zum Einsatz. Aufgrund der Komplexität der Probe wurde für die Quantifizierung der Membranfraktion ein 240 min langer Gradient verwendet (Tabelle 4.12).

**Tabelle 4.12:** Im Rahmen der Analyse des Membranproteoms verwendeter 240 min UPLC-Gradient.

Die Zusammensetzung der Lösungsmittel war mit denen aus Tabelle 4.11 identisch. Nach dem Ende des Gradienten wurde die Säule mit 85% Lösungsmittel B gespült und im Anschluss für die nächste Analyse konditioniert.

Zeit (min)	%A	%B
1	99	1
3	95	5
240	60	40
245	15	85
250	15	85
251	99	1

Bei der Analyse der einzelnen Fraktionen der 1D-Gel-Fraktionierung wurden in den beiden durchgeführten Teilprojekten unterschiedlich lange Gradienten verwendet. Die Analyse der Proben aus dem Vanillin-Teilprojekt erfolgte über einen 90 min Gradienten, für die Analyse der Proben aus dem Butanol-Teilprojekt wurde ein 60 min Gradient verwendet. Dabei unterschied sich auch die Zahl der für die Fragmentierung ausgewählten Peptid-Ionen. Im Vanillin-Teilprojekt wurden die sieben, im Butanol-Teilprojekt die sechs intensivsten Signale für die Fragmentierung ausgewählt. Die übrigen Einstellungen des Massenspektrometers waren mit denen aus Abschnitt 4.5.2 identisch. Der Verlauf der beiden Gradienten ist in Tabelle 4.13 dargestellt.

**Tabelle 4.13:** Aufbau der für die 1D-Gel-Fraktionierung im A) Butanol- und B) Vanillin-Teilprojekt verwendeten UPLC-Gradienten

A) Butanol Teilprojekt			B) Vanillin Teilprojekt		
Zeit (min)	%A	%B	Zeit (min)	%A	%B
1	99	1	1	99	1
60	50	50	90	60	40
65	15	85	95	15	85
70	15	85	100	15	85
75	99	1	101	99	1

#### 4.5.3.1 Quantitative Analyse von Membranproteinen

Wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben wurden die in Abschnitt 4.3.3 erzeugten Proben über ein 1D-Gel entsalzt, als Block ausgeschnitten und anschließend verdaut. Dies erfolgte simultan für alle in einem Experiment analysierten Proben (drei biologische Replikate pro Zustand). Vor der massenspektrometrischen Analyse wurde die optimale Verdünnung der Probe über Testläufe ermittelt. Im Anschluss wurden 5  $\mu$ l der verdünnten Proben injiziert und analysiert. Für die Auswertung der Daten wurde die Software Progenesis LC-MS verwendet, welche bereits in der Einleitung (Abschnitt 3.3.5) kurz vorgestellt wurde. In weiten Teilen ist das Design der Datenanalyse zu dem in der Software Progenesis SameSpots (s. Abschnitt 4.4.3.5) analog.

Zu Beginn wurden die von der LTQ Orbitrap XL erzeugten Ergebnisdateien (.raw) in die Software importiert und von dieser als Contour Plot dargestellt. Als Contour-Plot wird die dreidimensionale Darstellung eines LC-MS-Laufs bezeichnet. Dabei werden die detektierten  $m/z$ -Verhältnisse und deren Elutionszeiten in einem Koordinatensystem aufgetragen (Abbildung 3.11). Die Intensität eines  $m/z$ -Verhältnisses wird durch eine „Heatmap“ kodiert. Da zu diesem Zeitpunkt der Analyse noch keine Peptid-Identifizierungen in die Software übertragen werden können, werden die Isotopenmuster der detektierten  $m/z$ -Verhältnisse als „Features“ bezeichnet. Anhand der Contour Plots wurde eine der Analysen als Referenz ausgewählt und die übrigen Contour Plots, ähnlich wie bei der 2D-DIGE-Analyse, mit dieser abgeglichen. Hierzu wurden die einzelnen Contour-Plots durch manuell gesetzte Vektoren gegeneinander verschoben und bestmöglich zur Deckung gebracht. Im Anschluss wurde dieses Alignment durch automatisch von der Software generierte Vektoren ergänzt und verbessert. Dies ermöglichte es, Retentionszeit-Schwankungen zwischen den einzelnen LC-MS-Analysen auszugleichen. Nach erfolgtem Alignment wurden die Features aller Contour Plots in einem Master-

Image vereint und mögliche Kontaminationen durch Hintergrundionen mit Hilfe von Filterkriterien von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für die folgende Normalisierung wurden nur Features berücksichtigt, welche einen  $m/z$ -Wert zwischen 250 und 1.800 aufwiesen und 2-, 3- oder 4-fach positiv geladen waren. Zudem wurden nur Features in die Analyse einbezogen, welche während des Gradienten und nicht während des Spülschritts eluierten (s. UPLC-Methode, Tabelle 4.12).

Im Anschluss wurden alle LC-MS-Läufe mit Hilfe des ausgewählten Referenzlaufes normalisiert. Dieser Schritt war mit der Normalisierung im Rahmen der 2D-DIGE-Analyse identisch (s. Abschnitt 4.4.3). Da im Gegensatz zu einer 2D-DIGE-Analyse kein interner Standard vorhanden war, wurden die Features der verschiedenen LC-MS-Läufe in Relation zu Features der für das Alignment ausgewählten Referenz normalisiert. Im Detail ist dieses Verfahren auf der Seite des Herstellers (<http://www.nonlinear.com>) beschrieben.

Im Anschluss an die Normalisierung wurden die LC-MS-Läufe der biologischen Replikate eines Zustands (z.B. Glucose) gruppiert und für jedes Feature dessen Regulationsfaktor zwischen den untersuchten Zuständen berechnet. Darüber hinaus wurde für jedes Feature analog zum Verfahren in der 2D-DIGE-Analyse, ein p-Wert mit Hilfe einer Varianzanalyse (One Way ANOVA) bestimmt. In einem nächsten Schritt wurden vorhandene MS/MS-Daten für die Datenbanksuche in einen Mascot Generic File (.mgf) exportiert und wie in Abschnitt 4.5.4 beschrieben eine Datenbanksuche mit den Suchalgorithmen Mascot und *X!Tandem* durchgeführt. Nach erfolgter Validierung der Suchergebnisse mittels der Software Scaffold (s. Abschnitt 4.5.4) wurden diese in Form einer „Tab Delimited Textfile“ wieder in die Progenesis LC-MS Software importiert. Durch die Identifizierungen konnten die einzelnen Features nun verschiedenen Peptiden und damit Proteinen zugeordnet werden. Die Berechnung der Regulation und des p-Wertes der einzelnen Proteine erfolgte analog zur Berechnung auf Peptidebene. Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie mindestens 2-fach reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen. Die angelegten Kriterien für die Identifizierung eines Peptids bzw. Proteins sind in Abschnitt 4.5.4 dargelegt.

#### 4.5.3.2 Quantitative Analyse der 1D-Gel-Fraktionierungsdaten

Die in Abschnitt 4.3.4 erzeugten Proben wurden wie in 4.4.1 beschrieben über eine 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und in zehn Fraktionen unterteilt. Da pro Zustand drei biologische Replikate analysiert wurden, bestand jeder Versuch aus 60 einzelnen Fraktionen. Diese wurden verdaut (s. Abschnitt 4.5.1) und wie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Progenesis LC-MS. Dabei glich der Ablauf in weiten Teilen dem in Abschnitt

4.5.3.1 beschrieben. So wurde die Analyse der einzelnen Fraktionen (1-10) exakt wie die Analyse der Membranproteine durchgeführt. Für jede Fraktion wurden die drei biologischen Replikate der beiden Zustände in einem Experiment verglichen und die Regulation sowie der p-Wert berechnet. Im Anschluss an die Einzelanalyse wurden die zehn Fraktionen eines biologischen Replikats in der Software wieder kombiniert. Zudem erfolgte eine Normalisierung zwischen den analysierten Fraktionen. Die biologischen Replikate der beiden Zustände wurden gruppiert und die Regulation sowie der p-Wert der Proteine berechnet. Bei dieser Kalkulation wurden die in allen Fraktionen identifizierten Peptide eines Proteins berücksichtigt. Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie mindestens 2-fach reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen.

### 4.5.4 Datenbanksuche

In einem ersten Schritt wurden die „Thermo Result Files“ (.raw) in das mit Mascot kompatible Dateiformat „Mascot Generic Format“ (.mgf) umgewandelt. Des Weiteren wurde mit Hilfe der Software Scaffold 3.6.2 eine speziesspezifische Datenbank für *Pseudomonas putida* KT2440 erstellt und diese auf dem Mascot-Server (Version: 2.3) eingerichtet. Erzeugte mgf-Files wurden über das Programm Mascot-Daemon 2.3.2 parallel gegen die speziesspezifische Datenbank (*P. putida* KT2440) und die NCBI-Datenbank (Unter-Kategorie „Bacteria“) gesucht. Die Suche gegen die NCBI-Datenbank diente der Identifizierung von in *P. putida* KT2440 nicht annotierten Proteinen über Homologien zu anderen Bakterien.

Wenn nicht anders angegeben, wurden für die Datenbanksuche folgende Parameter verwendet: „Trypsin/P“ (Trypsin-Schnittstellen, welche vor einem Prolin liegen, werden nicht berücksichtigt) wurde als Protease festgelegt und die erlaubten Fehlschnittstellen auf drei begrenzt. Die erlaubten Ladungszustände der Peptid-Ionen, wurden auf 2-, 3- und 4-fach positiv geladene Ionen beschränkt. Die Massentoleranz der Peptid-Ionen wurde auf 5 ppm, die der Fragmentionen auf 0,6 Da festgesetzt. Als feste Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cystein (Avg. +57,072), als variable Modifikation die Oxidation von Methionin (Avg. +15,999) in die Suche einbezogen.

Die von Mascot erzeugten Ergebnis-Dateien (.dat) wurden mit Hilfe der Software Scaffold 3.6.2 validiert. Hierfür wurden die Daten mit der *X!Tandem*-Suchmaschine erneut gegen die speziesspezifische *P. putida* KT2440 Datenbank gesucht. Die Modifikationen (feste und variable) sowie die Massentoleranz für Peptid- und Fragmentionen waren mit denen der Mascot-Suche identisch. Als Protease wurde Trypsin ausgewählt. Dabei wurde von einem semi-tryptischen Verdau ausgegangen. Die Fehlschnittstellen waren auf zwei beschränkt. Da unterschiedliche Such-Algorithmen teilweise unterschiedliche Ergebnisse liefern, diente diese zusätzliche Suche mit einer alternativen Suchmaschine

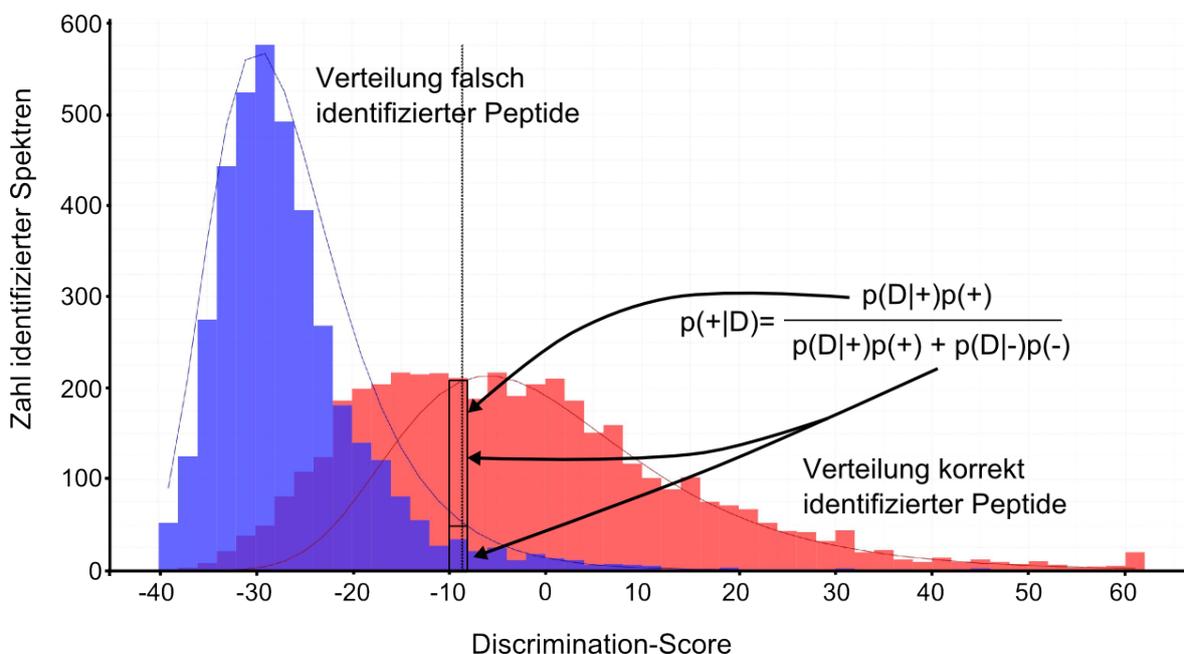
der Validierung und Ergänzung der durch Mascot erhaltenen Daten.

Nach erfolgter Suche wurden die Identifizierungen einer statistischen Auswertung unterzogen. Dabei wurden sowohl die Mascot- als auch die *X!Tandem*-Datenbanksuche sowie die von beiden Suchmaschinen eingesetzten Scoring-Systeme berücksichtigt. Das Prinzip des „Scoring“ wird im Folgenden anhand des Mascot-Algorithmus erläutert. Um die Qualität der Identifizierung eines MS/MS-Spektrums durch den Mascot-Suchalgorithmus zu beurteilen, werden von Mascot die beiden Größen „Mascot-Ion-“ und „Mascot-Identity-Score“ verwendet. Dabei stellt der „Mascot-Ion-Score“ ein Maß für die Wahrscheinlichkeit dar, dass die Identifizierung des Spektrums rein zufällig erfolgt. Je kleiner der Mascot-Ion-Score, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei einer gegebenen Identifizierung um ein zufälliges Ereignis handelt. Der Mascot-Identity-Score kann hingegen als Schwellenwert für ein vorgegebenes Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) angesehen werden. Ein „Mascot-Ion-Score“ welcher unter dem „Mascot-Identity-Score“ liegt, wird als nicht signifikant angesehen.

Basierend auf diesen beiden Größen berechnet der in Scaffold implementierte „Peptide Prophet Algorithmus“ eine Verteilung des so genannten „Discrimination Scores“ (Mascot-Ion-Score minus Mascot-Identity-Score) und leitet daraus eine Wahrscheinlichkeit für „Korrektheit“ einer Identifizierung mit einem bestimmten Mascot-Ion-Score ab (Abbildung 4.3) (Keller *et al.*, 2002).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden folgende Kriterien festgelegt: Peptide wurde als identifiziert betrachtet, wenn sie eine Peptid-Wahrscheinlichkeit von 80% oder mehr aufwiesen. Ein Protein musste mit mindestens zwei Peptiden und einer Protein-Wahrscheinlichkeit von 99% identifiziert werden, um als identifiziert zu gelten. Dabei wurde die Protein-Wahrscheinlichkeit mit Hilfe des Protein Prophet Algorithmus auf Basis der Peptid-Wahrscheinlichkeiten berechnet (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Zudem wurde sowohl eine „False Discovery Rate“ (FDR) auf Peptid-, als auch auf Proteinebene ausgegeben. Die aus dieser Analyse erhaltenen Ergebnisse wurden dann in einem zweiten Schritt (s. Abschnitt 4.5.5) mit Informationen aus weiteren Datenbanken vervollständigt.

Abweichend von dem hier beschriebenen Vorgehen wurden die Proben des Ethylenglycol-Teilprojekts lediglich mit Mascot gegen die NCBI-Datenbank (Kategorie: Bakterien) gesucht. Eine zweite Suche mit *X! Tandem* entfiel.



**Abbildung 4.3:** Berechnung der Peptid-Wahrscheinlichkeit in Scaffold.

Die Peptid-Wahrscheinlichkeit ergibt sich aus dem Quotienten der Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung bei einem gegebenen „Discrimination-Score“ und der Gesamtwahrscheinlichkeit dieses Scores. (gepunktete Linie): 80% Peptid-Wahrscheinlichkeit (aus Scaffold-Software, Keller *et al.* 2002)

#### 4.5.5 Datenanalyse und Annotierung

Die aus Scaffold exportierten Ergebnisse wurden zusätzlich mit Metadaten aus der „Pseudomonas Genome Database“ ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) vervollständigt (Winsor *et al.*, 2011). Diese Datenbank fasst Informationen zu verschiedenen *Pseudomonaden* aus unterschiedlicher Datenbanken (Psort, COG, etc.) zusammen. Die für diese Arbeit relevanten Daten wurden über ein in Python ([www.python.org](http://www.python.org)) geschriebenes Skript ausgelesen und mit den aus der Proteinquantifizierung erhaltenen Daten kombiniert (s. Anhang 4.5.5). Dies ermöglichte eine Zuordnung der identifizierten und quantifizierten Proteine zu einzelnen subzellulären Kompartimenten sowie die funktionelle Klassifizierung dieser Proteine. Darüber hinaus wurden die Proteindaten um Informationen zu den zugrundeliegenden Genen sowie den vorhergesagten Molekulargewichten und den isoelektrischen Punkten ergänzt.

## 4.5.6 Quantifizierung von Proteinen mittels SRM (Selected Reaction Monitoring)

### 4.5.6.1 Probenvorbereitung

Im Rahmen dieser Analyse sollten die aus den 2D-DIGE-Experimenten erhaltenen Daten überprüft werden (s. Abschnitt 5.5). Daher wurden für diesen Versuch die in 4.3.2 erwähnten Proben verwendet. Je 150 µg dieser Proben wurden mit 5 x Ladepuffer versetzt und für 2 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 10% Acrylamid-1D-SDS-Gel (s. Abschnitt 4.4.1) aufgetragen und bei 30 mA getrennt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Proben komplett in das Trenngel migriert waren. Im Anschluss wurde die Probe wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben verdaut und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 4.5.6.2 SRM-Analyse und quantitative Auswertung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden in einem Protein-Spot einer 2D-SDS-PAGE meist mehrere Proteine, teilweise mit einer ähnlichen Anzahl an Peptiden, identifiziert. Daher lässt sich das eigentlich regulierte Protein häufig nicht zuverlässig bestimmen.

Um zu validieren, welches der in einem Spot identifizierten Proteine tatsächlich das regulierte Protein darstellt, wurden diese Proteine mittels SRM analysiert. In einem ersten Schritt wurden aus den regulierten Proteinspots eines 2D-DIGE-Experiments diejenigen ausgewählt, in welchen mehrere Proteine mit einer ähnlichen Anzahl an Peptiden identifiziert wurden. Als Kontrolle bzw. Referenz wurden drei Proteine ausgewählt, welche sich in nicht-regulierten Protein-Spots befanden und mit einer großen Anzahl an Peptiden identifiziert worden waren (potentielle „Housekeeping Proteine“). Um das SRM-Experiment vorzubereiten, wurden die Aminosäure-Sequenzen (FASTA) der Proteine aus der NCBI-Datenbank in die Software MRM<sup>TM</sup>Pilot importiert und auf geeignete proteotypische Peptide untersucht (MIDAS<sup>TM</sup>-Workflow). Hierzu wurden die Proteine *in silico* verdaut und die erhaltenen Peptide nach mehreren Kriterien gefiltert. Peptide welche eine Länge von 5 bis 15 Aminosäuren aufwiesen und keine Methionine oder Cysteine enthielten, wurden als geeignet eingestuft, alle übrigen Peptide wurden für die SRM-Analyse nicht berücksichtigt. Für jedes ausgewählte Peptid wurden im Anschluss jeweils drei SRM-Übergänge von der Software kalkuliert und diese in einem SRM-getriggerten MS/MS-Experiment überprüft. Hierzu wurden die in Abschnitt 4.5.6.1 erzeugten Proben verwendet. Bei einem SRM-getriggerten MS/MS-Experiment wird bei erfolgter Detektion eines SRM-Übergangs die Aufnahme eines MS/MS-Spektrums ausgelöst. Um die zur Verfügung stehende Messzeit je

SRM-Übergang (Dwell-Time) möglichst hoch und die für den Durchlauf aller SRM-Übergänge benötigte Zeit (Cycle-Time) niedrig zu halten, wurden die Analysen der SRM-Übergänge der verschiedenen Proteine auf mehrere LC-MS-Läufe aufgeteilt. Es wurden 5  $\mu\text{l}$  Probe (Rohextrakt) injiziert. Die Trennung der Peptide erfolgte auf einer RP-C18-HPLC-Säule (Dr. Maisch, 75  $\mu\text{m}$  x 15 cm) bei einer Flussrate von 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  mit dem in Tabelle 4.14 angegebenen Gradienten. Für die SRM-getriggerten-MS/MS-Experimente wurde eine Dwell-Time  $\geq 40$  ms eingestellt. Die Zahl der pro Analyse überprüften Übergänge wurde so angepasst, dass die Cycle-Time dabei unter 8 s lag. Als Schwellenwert (Wert ab welchem ein MS/MS-Spektrum getriggert wird), wurden 100 Counts gewählt.

**Tabelle 4.14:** Für die SRM-Analysen verwendeter 30 min HPLC-Gradient.

Dieser HPLC-Gradient wurde für alle mit der SRM-Methode durchgeführte Analysen (MIDAS; CE-Optimierung, Scheduled-SRM) verwendet. Als Lösungsmittel kamen 0,1% FA (A) bzw. 0,1% FA, 80% ACN (B) zum Einsatz. Nach dem Gradienten wurde die Säule mit 90% Lösungsmittel B gespült und anschließend mit 1% B für den nächsten Lauf konditioniert.

Zeit (min)	%A	%B
0	99	1
30	50	50
31	10	90
36	10	90
37	99	1
75	99	1

Die erhaltenen Ergebnisse (.wiff-Files) wurden in die MRM-Pilot<sup>TM</sup>-Software importiert. Dabei zeigte sich, dass die von MRM<sup>TM</sup>Pilot vorhergesagten Übergänge in der Praxis nicht immer die intensivsten Signale für ein Peptid darstellten und alternative Übergänge intensivere Signale lieferten. Pro Protein wurden (wenn möglich) drei Peptide und pro Peptid drei Übergänge für die SRM-Quantifizierung ausgewählt.

Um die Signalintensität der Übergänge zu verbessern, wurden in einer weiteren LC-MS-Analyse die Kollisionsenergien für die ausgewählten Übergänge optimiert. Im Anschluss wurden die Daten der verschiedenen LC-MS-Analysen kombiniert, die einzelnen Übergänge/Peptide auf Basis der Retentionszeiten gruppiert und eine finale, sogenannte „Scheduled-SRM-Methode“ erstellt. Diese ermöglichte die Quantifizierung aller Übergänge in einer einzigen SRM-Analyse. Das Zeitfenster, in welchem nach einem bestimmten SRM-Übergang „gesucht“ wurde, wurde auf 120 s eingestellt (60 s vor und

nach der erwarteten Retentionszeit). Da Dwell- und Cycle-Time von der Zahl der in den einzelnen „Fenstern“ überwachten SRM-Übergängen abhängen, können diese hier nicht verlässlich angegeben werden. Es wurde der in Tabelle 4.14 angegebene Gradient verwendet. Q1 und Q3 wurden mit „Unit Resolution“ betrieben.

Die Peakflächen der erhaltenen Übergänge wurden mit der Software MultiQuant berechnet und im Anschluss statistisch ausgewertet. Wie bei den vorherigen Versuchen wurden auch im Rahmen dieses Experiments drei biologische Replikate je Zustand analysiert. Um technische Varianzen zwischen den einzelnen Proben und LC-MS-Läufen auszugleichen, wurde ein Referenzlauf bestimmt und die übrigen Analysen auf diesen normalisiert. Hierzu wurden die Peakflächen der Referenz-Proteine für die Berechnung eines Korrekturfaktors herangezogen.

In einem ersten Schritt wurde das Verhältnis der Peakflächen von fünf SRM-Übergängen aus zwei unterschiedlichen Referenz-Proteinen zwischen dem zu normalisierenden und dem Referenz-Lauf gebildet. Im Anschluss wurden die Peakflächen dieser Übergänge aufsummiert und das arithmetische Mittel bestimmt. Dieser Wert stellte den Korrekturfaktor, welcher zur Normalisierung verwendet wurde, dar. Nach erfolgter Normalisierung wurden für jeden SRM-Übergang die Peakflächen eines Zustandes (z.B. Glucose) aufsummiert und das arithmetische Mittel dieser Peakflächen bestimmt. Aus dem Vergleich der beiden Zustände wurde dann die Regulation der einzelnen SRM-Übergänge berechnet. Um berücksichtigt zu werden, musste ein Übergang in mindestens zwei Läufen pro Zustand detektiert werden oder in einem Zustand geschlossen nicht auftreten. Die Regulation eines Proteins wurde aus den Regulationsfaktoren der zu diesem Protein gehörenden SRM-Übergänge bestimmt (Mittelwert). Konnten für ein Protein weniger als drei proteotypische Peptide oder für ein Peptid weniger als drei SRM-Übergänge identifiziert werden, wurde die Analyse mit der maximalen Anzahl identifizierter SRM-Übergänge durchgeführt.

## 4.6 Quantifizierung der Metabolite des Vanillinstoffwechsels

Die für die Quantifizierung benötigten Proben wurden wie in Abschnitt 4.2.3.3 beschrieben kultiviert. Nach Inokulation der Hauptkultur wurde alle zwei Stunden 1 ml der Kultur entnommen und bei 100.000 g für 30 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand steril filtriert (0,2 µm Filter) und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Für die Analyse wurden die Proben 1/100 verdünnet und 5 µl auf einer RP-C18-HPLC-Säule (50 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å, Phenomenex-Kinetex) bei einer Flussrate von 200 µl/min bei 40°C mit dem in Tabelle 4.15 beschriebenen HPLC-Gradienten auf-

getrennt. Die Detektion der Metabolite erfolgte bei 260 nm in einem UV-Detektor. Für die Methodenetablierung wurden kommerziell erhältliche Referenzsubstanzen (Sigma-Aldrich) der Metabolite Vanillin, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoat, Protocatechuat und Vanillyl-Alkohol verwendet.

**Tabelle 4.15:** Für die Metaboliten-Analyse verwendeter 8,7 min HPLC-Gradient. Als Lösungsmittel wurden H<sub>2</sub>O (neutral) (A) bzw. 0,1% FA in ACN (B) verwendet. Nach dem Gradienten wurde die Säule mit 80% Lösungsmittel B gespült und anschließend mit 2% B für den nächsten Lauf konditioniert.

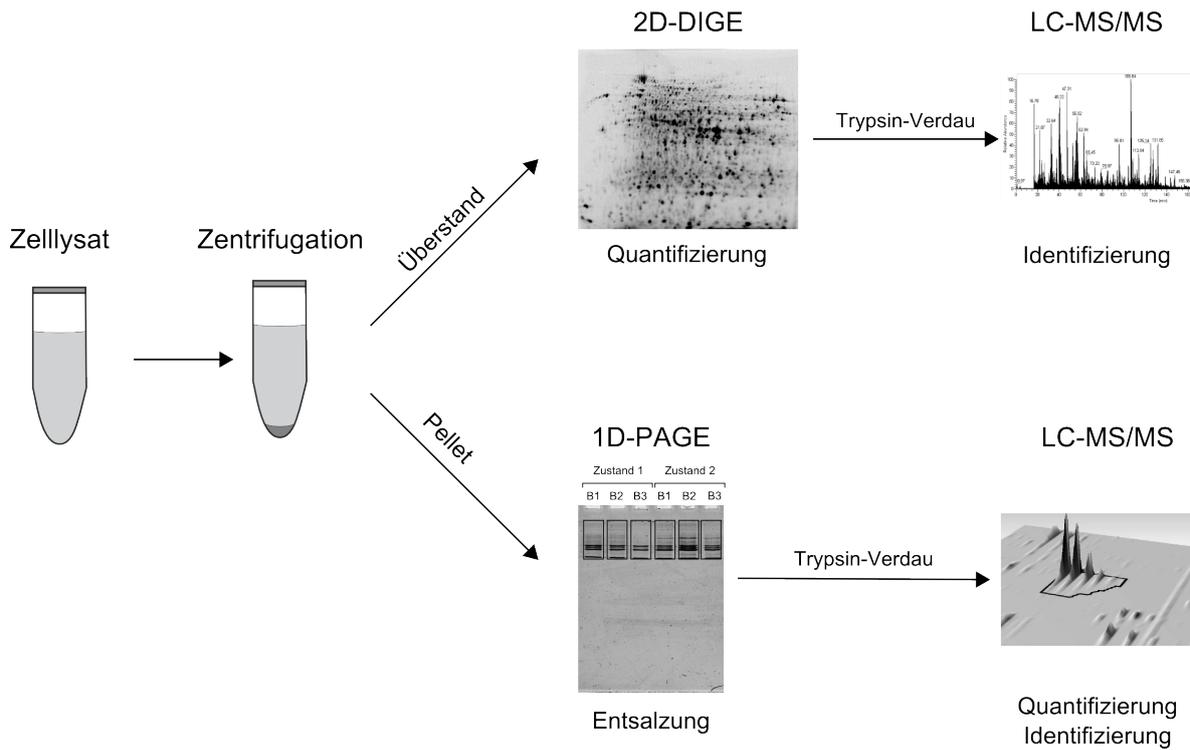
<b>Zeit (min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	98	2
3	98	2
4	85	15
8,7	50	50
13	20	80
16	20	80
18	98	2
25	98	2

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Untersuchungen zum Abbau von Ethylenglycol

Die Synthese von Glyoxylsäure (GXS) aus Ethylenglycol (EG) in *Pseudomonas putida* KT2440 stellt das Fernziel dieses Teilprojektes dar. Eine Identifizierung der am Abbau von Ethylenglycol aber auch Glyoxylsäure beteiligten Enzyme sowie das Verständnis der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen, war hierzu ein entscheidender Schritt. Neben *Pseudomonas putida* KT2440 wurde auch der Stamm *Pseudomonas putida* JM37 analysiert, welcher bereits von Li *et al.* (2010) auf den Metabolismus von Glyoxylsäure, jedoch nicht auf den Abbau von Ethylenglycol untersucht wurde. Während der Fokus im Rahmen dieser Arbeit auf *Pseudomonas putida* KT2440 lag, diente *Pseudomonas putida* JM37 lediglich als Referenz. Zusätzlich wurden auch zwei Mutanten von *Pseudomonas putida* KT2440 analysiert, welche auf Basis der im Wildtyp erhobenen Daten von der Arbeitsgruppe Altenbuchner (Universität Stuttgart, Institut für Industrielle Genetik) erzeugt wurden. Diese Mutanten wurden mit GN187 ( $\Delta upp$ ,  $\Delta prpB$ ,  $\Delta gcl$ ,  $\Delta glcB$ ) und GN259 ( $\Delta upp$ ,  $\Delta prpB$ ,  $\Delta gcl$ ,  $\Delta glcB$ ,  $\Delta aceA$ ) bezeichnet. Um den unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Proteine und den Limitierungen der einzelnen Analysemethoden gerecht zu werden, wurden sämtliche Proben in eine zytosolische und eine Membranfraktion aufgeteilt. Die differenzielle Quantifizierung der zytosolischen Fraktion erfolgte mittels 2D-DIGE, die der Membranfraktion über einen labelfreien massenspektrometrischen Ansatz. Alle Experimente wurden mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Der Ablauf der Probenvorbereitung und der quantitativen Analyse ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Die Kultivierung der Bakterienstämme erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Hauer (Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie) und ist in Kapitel 4 im Detail beschrieben. Die Anzucht der Bakterien wurde in M12-BASF Medium, welches 10 mM Glucose als Kohlenstoffquelle enthielt, durchgeführt. Die Zugabe von Ethylenglycol bzw. Glyoxylsäure erfolgte nach zwölfstündiger Kultivierung als Puls, die Ernte der Zellen nach weiteren 5 h. Es ist zu vermuten, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe der Testsubstanzen bereits in der stationären Phase befanden. Die Ernte der Zellen, der Aufschluss sowie die Proteinbestimmung sind in Kapitel 4 beschrieben.



**Abbildung 5.1:** Durchführung der Proteomics-Experimente zum Abbau von Ethylenglycol und Glyoxylsäure.

Das Zelllysat wurde durch Zentrifugation in eine zytosolische und eine Membranfraktion getrennt. Die quantitative Analyse der zytosolischen Fraktion erfolgte mittels 2D-DIGE, die der Membranfraktion mittels labelfreier massenspektrometrischer Quantifizierung. Die einzelnen Schritte der Analyse sind in Kapitel 4 im Detail beschrieben.

## 5.1.1 Analyse der zytosolischen Fraktionen durch 2D-DIGE

### 5.1.1.1 Der Metabolismus von EG und GXS in *Pseudomonas putida* KT2440

Die Gelbilder sowie die Listen der darin regulierten Proteine der im Folgenden besprochenen Versuche sind im Anhang, sortiert nach Kapitelüberschriften zu finden.

#### Optimierung der 2D-Gelelektrophorese

Um den optimalen pH-Bereich für die isoelektrische Fokussierung der *Pseudomonas putida*-Proben zu ermitteln, wurde die Trennleistung zweier unterschiedlicher IPG-Streifen (pH 4-7 und pH 3-11) mit identischen Proteinextrakten getestet. Hierzu wurden Ethylenglycol-induzierte Proben von *P. putida* KT2440 und entsprechende auf Glucose kultivierte Kontrollen eingesetzt. Die Markierung der induzierten Proben erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3, die der nicht induzierten Proben mit Cy5. Der interne Standard wurde aus allen sechs zu analysierenden Proben gemischt und mit Cy2 markiert. Insgesamt konnten bei Verwendung des IPG-Streifens (pH 4-7) 1747 Spots detektiert werden. Nach dem Entfernen von Farbstoffartefakten (Spikes) und Verunreinigungen, welche von der verwendeten Analysesoftware fälschlicherweise als Spots annotiert wurden, verblieben 885 Spots. Hiervon wiesen 91 eine signifikante Regulation nach den zu Grunde gelegten statistischen Kriterien (Regulationsfaktor  $> 1,8$ ; p-Wert  $< 0,05$ ) auf.

Da über die Filterfunktion der Software nicht alle Artefakte (Farbstoffe, Staub, etc.) entfernt werden konnten und auch schwache Spots welche wenig Protein enthielten (schlechte massenspektrometrische Identifizierbarkeit) von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden sollten, wurden alle regulierten Spots zusätzlich manuell überprüft. Dies führte in einigen Fällen zu einer deutlichen Reduktion der zu analysierenden Spots. Nach erfolgter manueller Validierung wurden 21 regulierte Proteinspots aus dem Gel ausgestochen und mit Trypsin verdaut. Bei der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse konnten in allen 21 regulierten Spots ein oder mehrere Proteine identifiziert werden.

Die Verwendung des IPG-Streifens (pH 3-11) erlaubte die Detektion von insgesamt 1624 Spots (keine Artefakte), wovon 79 nach den o.g. statistischen Kriterien reguliert waren. Nach manueller Validierung wurden 23 Spots mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnten in 21 Spots ein oder mehrere Proteine identifiziert werden. In den beiden übrigen Spots wurden keine Proteine identifiziert. 13 der in diesem Experiment reguliert gefundenen Spots lagen in einem pH-Bereich von pH 4-7, 10 in einem pH-Bereich jenseits von pH 7. Da sechs der regulierten Spots, welche in einem pH-Bereich größer als 7 lagen, lediglich Isoformen eines Enzyms (PP\_2679) enthielten und ein Spot nicht identifiziert werden konnte, konnten aufgrund des breiteren

pH-Gradienten lediglich vier zusätzliche regulierte Proteine detektiert werden. Gleichzeitig führte der breitere pH-Gradient zu einer geringeren Zahl regulierter Spots im pH-Bereich pH 4-7 (13 Spots im Vergleich zu 21 Spots), was sich durch die geringere Auflösung dieses IPG-Streifens (pH 3-11) erklären lässt. Aufgrund des minimalen Zugewinns an regulierten Spots durch die Verwendung des breiten pH-Gradienten und dem gleichzeitigen deutlichen Verlust an Auflösungsvermögen wurde für alle weiteren Experimente IPG-Streifen mit einem pH-Gradienten von pH 4-7 eingesetzt. Die Verwendung dieses pH-Gradienten führte, bedingt durch das höhere Auflösungsvermögen, auch zu einer Reduktion co-migrierender Proteinspots und damit zu einer geringeren Anzahl unterschiedlicher Proteine je Spot.

Das höhere Auflösungsvermögen ändert jedoch nichts daran, dass mit modernen Massenspektrometern häufig mehrere Proteine in einem einzigen Spot identifiziert werden können und somit das eigentlich regulierte Protein nicht immer eindeutig identifiziert werden kann. Häufig wird daher das abundanteste Protein eines Spots als das regulierte Protein angesehen, wobei die Abundanz eines Proteins aus der Anzahl der identifizierten Peptide dieses Proteins abgeleitet wird. Wie Timms *et al.* (2008) zu bedenken geben, ist diese Annahme jedoch nicht immer korrekt. Aufgrund dieser Limitierung ist 2D-DIGE in erster Linie als Screening-Methode zu betrachten, welche die Anzahl möglicher regulierter Proteine im Vergleich zur Gesamtprobe deutlich einschränkt. Eine Überprüfung der Ergebnisse mit unabhängigen Methoden ist aber in jedem Fall sinnvoll. Angesichts des hohen dynamischen Bereichs, sowie des hohen Auflösungsvermögens ist 2D-DIGE nichtsdestotrotz eine optimale Technologie für die Analyse komplexer Proben und die Untersuchung regulatorischer Netzwerke.

Zusätzlich zur Evaluierung der pH-Bereiche wurden auch alternative Fluoreszenzfarbstoffe (G-Dyes, NH DyeAGNOSTICS GmbH) mit den oben beschriebenen Proben in einem pH 4-7-Gradienten getestet. G-Dyes weisen ähnliche Anregungs- und Emissionswellenlängen wie Cy-Dyes auf, sind in ihrem Molekulargewicht jedoch nicht ausbalanciert. Für die Auswertung der G-Dye-Gelbilder mit der Analysesoftware konnten daher die gleichen Parameter wie für Auswertung der Cy-Dye Gel-Gelbilder herangezogen werden. Insgesamt konnten 1621 Spots (2033 vor Bereinigung) detektiert werden. Hier von waren 68 nach statistischen Kriterien reguliert. 27 Spots verblieben nach manueller Validierung. Ein Vergleich mit dem im gleichen pH-Bereich durchgeführten Cy-Dye Experiment ergab, dass sich 16 Spots mit bereits identifizierten Spots aus diesem Gel deckten. Daher wurden lediglich 11 Spots, welche ausschließlich in dem mit G-Dyes durchgeführten Experiment reguliert waren, massenspektrometrisch analysiert. Diese zusätzlich identifizierten Spots zeigen, dass sich beide getesteten Farbstoffe in ihrer Sensitivität für bestimmte Proteine unterscheiden und daher als teilweise komplementär anzusehen sind. Da durch die Verwendung von G-Dyes kein genereller Gewinn an Sen-

sitivität festgestellt werden konnte, wurden für alle weiteren Experimente ausschließlich Cy-Dyes verwendet.

Die im Rahmen der zusätzlich durchgeführten Experimente (pH-Gradient pH 3-11, G-Dyes) gewonnenen Daten wurden in die Stoffwechsellanalysen von *Pseudomonas putida* KT2440 unter Einfluss von Ethylenglycol mit einbezogen.

Die Proteom-Analyse der mit Glyoxylsäure behandelten Zellen (*Pseudomonas putida* KT2240) wurde mit den als Standard festgelegten Parametern (pH 4-7, Cy-Dyes) durchgeführt. In diesem Experiment wurden 1459 Spots (1634 vor Bereinigung) detektiert, wovon 91 nach statistischen Gesichtspunkten reguliert waren. Nach manueller Evaluierung verblieben 32 Spots, welche aus dem Gel ausgeschnitten und verdaut wurden. Hiervon konnten 23 Spots in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden. Worauf die geringe Zahl identifizierter Proteine in diesem Versuch zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Eine Übersicht über alle in dieser Versuchsreihe durchgeführten 2D-DIGE-Experimente gibt Tabelle 5.1.

**Tabelle 5.1:** Übersicht über die im Rahmen der Analyse des Glyoxylsäure- und Ethylenglycol-Metabolismus durchgeführten 2D-DIGE Experimente.

Stamm	pH	Behandlung	Spots <sup>a</sup>	Protein Spots <sup>b</sup>	Reg. Spots <sup>c</sup>	Analysierte Spots <sup>d</sup>	Ident. Spots
KT2440	4-7	EG	1747	850	91	21	21
KT2440	3-11	EG	1624	1624	79	23	21
KT2440	4-7	EG (G-Dyes)	2033	1621	68	11	10
KT2440	4-7	GXS	1634	1459	91	32	23
GN187	4-7	EG	3098	1414	19	4	4
GN187	4-7	GXS	3098	1414	47	23	20
GN259	4-7	EG	1596	1370	32	18	16
GN259	4-7	GXS	1596	1370	44	23	19
JM37	4-7	EG	1463	1357	42	20	18
JM37	4-7	GXS	3202	1605	134	34	27

<sup>a</sup> Anzahl der insgesamt detektierten Spots.

<sup>b</sup> Anzahl der Spots, welche in die Auswertung einbezogen wurden (Spikes und Artefakte wurden zuvor entfernt).

<sup>c</sup> Anzahl der Spots, welche nach statistischen Kriterien reguliert waren.

<sup>d</sup> Anzahl der Spots, welche nach manueller Validierung ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert wurden.

## Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit Ethylenglycol (EG)

Um einen Überblick über die in diesem Experiment regulierten Proteine zu geben, wurde ein Auszug aus den Ergebnissen und deren Vergleich mit anderen untersuchten Zuständen und Stämmen in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

**Tabelle 5.2:** Auswahl regulierter Proteine nach Behandlung mit EG und GXS in den verschiedenen untersuchten Stämmen. Alle Regulationsfaktoren wurden den mit diesen Stämmen durchgeführten 2D-DIGE-Experimenten entnommen. Wurde ein Protein in mehreren Spots detektiert, ist in der Tabelle der Regulationsfaktor des am stärksten regulierten Spots angegeben. Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie um eine Faktor von 1,8 bzw. 0,6 reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen. Regulationsfaktoren  $> 1$  zeigen eine Induktion des Proteins in der mit GXS bzw. EG behandelten Proben an.

Spot	Protein	KT2440		GN259		JM37	
		EG	GXS	EG	GXS	EG	GXS
1	Isocitrat Lyase (AceA)	2,8	2,8	k.o.	k.o.	1,9	-
2	Glyoxylat Carboligase (Gcl)	-	-	k.o.	k.o.	9,6	16
3	Malat Synthase G (GlcB)	-	-	k.o.	k.o.	3,7	17
4	Quinoprotein Alkohol-Dehydrogenase (PedH)	21	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5	Quinoprotein Alkohol-Dehydrogenase (PedE)	34	-	8,2	-	31	0,5
6	Aldehyd-Dehydrogenase (PedI)	5,2	-	-	-	7,9	-
7	Aldehyd-Dehydrogenase (PP_0545)	-	-	5,5	-	2	-
8	Transkriptions-Regulator (PedR1)	4,8	-	-	-	4,8	-
9	PAS/PAC Sensor Hybrid Histidin-Kinase (PedS1)	7,7	-	-	-	-	-
10	Acetyl-CoA Synthase (AcsA, PP_4487)	2,6	1,8	-	2,2	3,3	-
11	Hypothetisches Porin (PP_2662)	31	-	15	-	34	-

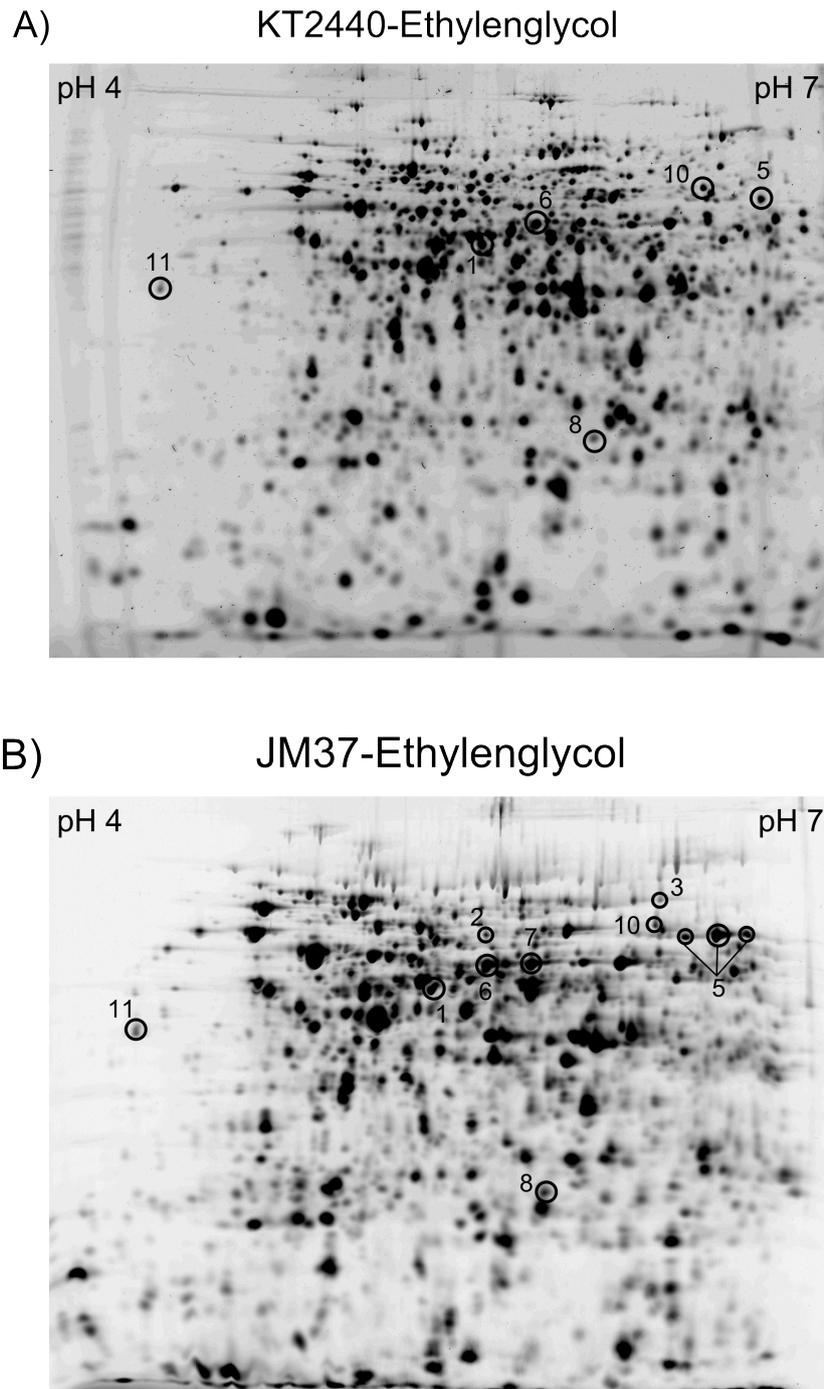
*n.a.*: Nicht analysiert (dieser pH-Bereich wurde in den entsprechenden Versuchen nicht erfasst).

-: Das Protein war nach den angelegten Kriterien (Regulation  $> 1,8$ , bzw.  $< 0,6$ ; p-Wert  $< 0,05$ ) nicht reguliert.

*k.o.*: Das entsprechende Gen war in diesem Stamm deletiert.

Abbildung 5.2 zeigt darüber hinaus die Position der in Tabelle 5.2 aufgelisteten Proteine auf den 2D-DIGE-Gelen von *P. putida* KT2440 und *P. putida* JM37 nach Behandlung mit Ethylenglycol.

Zu den nach Behandlung mit Ethylenglycol am stärksten induzierten Proteinen gehörten die beiden Alkohol-Dehydrogenasen PP\_2674 (34-fach) und PP\_2679 (21-fach). Eine ebenfalls starke Regulation zeigte das nicht näher charakterisierte Protein PP\_2662



**Abbildung 5.2:** Gelbilder (pH 4-7) der mit Ethylenglycol behandelten Proben von A) *P. putida* KT2440 und B) *P. putida* JM37.

Die Spotnummern entsprechen den in Tabelle 5.2 angegebenen Nummern. Spots, welche auf diesem Gelbild nicht gezeigt jedoch in Tabelle 5.2 angegeben sind, waren in den hier gezeigten Versuchen nicht reguliert und können den entsprechenden Abbildungen im Anhang entnommen werden.

(31-fach), bei welchem es sich vermutlich um ein Porin handelt (71% Sequenzidentität zu einem Porin aus *Pseudomonas stutzeri* A1501). Neben den erwähnten Alkohol-Dehydrogenasen wurde auch die Aldehyd-Dehydrogenase PP\_2680 (5,2-fach) induziert. Von den laut Li *et al.* (2010) in *P. putida* JM37 an der Umsetzung von Glyoxylsäure beteiligten Enzymen waren das Enzym Isocitrat-Lyase (AceA)(2,8-fach), jedoch nicht die Enzyme Malat Synthase (GlcB) und Glyoxylat Carboligase (Gcl) unter Ethylenglycol induziert. Auffällig war die Regulation der beiden regulatorischen Proteine PedR1 (ErbR) und PedS1 (ErcS') welche eine starke Homologie zu entsprechenden Enzymen in *P. aeruginosa* aufweisen und dort an der Regulation des Alkoholabbaus beteiligt sind. Das zugrundeliegende Regulon wurde von Mern *et al.* (2010) für *P. aeruginosa* unter dem Einfluss von Ethanol beschrieben. Eine Induktion dieses Regulons könnte auch die Induktion der Acetyl-CoA Synthetase (AcsA) erklären, welche in *P. aeruginosa* nach Kretzschmar *et al.* (2010) durch ErdR reguliert wird.

Eine unter EG verminderte Expression zeigten die beiden Citratzyklus-Enzyme Isocitrat-Dehydrogenase (PP\_4012) und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1 (SucA). Auch der „Sugar ABC Transporter“ PP\_1018 sowie die nicht näher charakterisierten Proteine PP\_3783-PP\_3785 wurden in Ethylenglycol behandelten Zellen vermindert exprimiert.

### **Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit Glyoxylsäure (GXS)**

Insgesamt fielen die durch GXS bedingten Regulationen schwächer aus als diejenigen, die nach Ethylenglycol-Behandlung zu beobachten waren. Die stärkste Induktion nach GXS-Behandlung zeigten die beiden Enzyme Isocitrat-Dehydrogenase (PP\_4012) (5-fach) und Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes) (5,1-fach).

Interessant ist hier vor allem die Regulation der Isocitrat-Dehydrogenase, welche in *Pseudomonas putida* KT2440 in zwei Isoformen vorliegt. Das Gen PP\_4011 kodiert dabei für eine dimere Isocitrat-Dehydrogenase (Molekulargewicht des Monomers 46 kDa), das Gen PP\_4012 für eine monomere Form von etwa 80 kDa. Untersuchungen in *Pseudomonas psychrophila* zeigten keine Unterschiede in Hinblick auf Substratspezifität und Umweltbedingungen zwischen den beiden Enzymen, obwohl diese eine nur sehr geringe Homologie aufweisen (22% Sequenzidentität) (Matsuo *et al.*, 2010). In unseren Versuchen zeigte PP\_4012 unter EG eine verminderte, unter GXS eine verstärkte Expression. PP\_4011 wurde unter GXS hingegen vermindert exprimiert.

Die nach Behandlung mit EG am stärksten regulierten Proteine PP\_2674 (Alkohol-Dehydrogenase), PP\_2662 (hypothetisches Porin) sowie PP\_2680 (Aldehyd-Dehydrogenase) zeigten nach GXS-Behandlung keine Regulation. PP\_2679 wurde aufgrund seines hohen pIs (pI9,09) in diesem Experiment nicht erfasst. Neben AceA, welches

wie bereits unter EG auch unter GXS induziert war, wurden auch die Citratzyklus Enzyme Aconitase und IpdG durch GXS induziert. Zusätzlich wurden alle drei Untereinheiten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes nach GXS-Behandlung verstärkt exprimiert. Obwohl keine Regulation von am Alkoholabbau beteiligten Enzymen beobachtet wurde, zeigte das Enzym Acetyl-CoA Synthetase (AcsA) nach GXS-Behandlung eine leichte Induktion (1,8-fach).

#### 5.1.1.2 Der Metabolismus von EG und GXS in *Pseudomonas putida* GN187

Die hier untersuchte KT2440-Mutante GN187 ( $\Delta upp \Delta prpB \Delta gcl \Delta glcB$ ) wurde auf Basis der im Wildtyp erhaltenen Ergebnisse und den Beobachtungen von Li *et al.* (2010) von Nadja Graf (AG Altenbuchner, Universität Stuttgart, Institut für Industrielle Genetik) erzeugt. Zusätzlich zu den bereits von Li *et al.* (2010) in *P. putida* JM37 inaktivierten Genen *gcl* (Glyoxylat-Carboligase) und *glcB* (Malat-Synthase) wurde in dieser Mutante auch das Gen *prpB* (Enzym Methylisocitrat-Lyase) deletiert. Der Knockout der Methylisocitrat-Lyase erfolgte, um einer möglichen Isocitrat-Lyase Aktivität dieses Enzyms vorzubeugen. Dass im umgekehrten Fall eine Isocitrat-Lyase auch Methylisocitrat als Substrat akzeptiert, wurde von Gould *et al.* (2006) in *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt. Somit verblieb von den vermuteten Abbauwegen für den Abbau von GXS lediglich der Weg über das Enzym Isocitrat-Lyase.

#### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* GN187 nach Behandlung mit Ethylenglycol (EG)

Nach Behandlung mit EG zeigt sich ein ähnliches Bild wie im Wildtyp. Sowohl die Alkohol-Dehydrogenase PP\_2674 als auch die Aldehyd-Dehydrogenase PP\_2680 sowie der Regulator PedR1 waren unter EG induziert. Dagegen war die Aldehyd-Dehydrogenase PP\_0545 lediglich 1,7-fach reguliert und lag somit knapp unter dem definierten Schwellenwert für eine differentielle Regulation. Eine Induktion der Isocitrat Lyase (AceA) konnte nicht festgestellt werden.

#### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* GN187 nach Behandlung mit Glyoxylsäure (GXS)

Auch nach GXS-Behandlung zeigte diese Mutante keine signifikanten Unterschiede zu den im Wildtyp beobachteten Regulationen. So deckte sich die Induktion von SucA und AceE mit den aus dem Wiltyp-Experiment erhaltenen Daten. Auch die beiden Isocitrat-Dehydrogenasen (PP\_4011, PP\_4012) waren nach GXS-Behandlung wie im Wildtyp reguliert. Die dimere Form (PP\_4011) konnte jedoch noch in einem weiteren Spot identifiziert werden, in welchem sie nach Gabe von GXS induziert vorlag. Die

Position der beiden Spots lässt dabei eine differentielle posttranslationale Modifikation des Enzyms in den beiden Spots vermuten. Grundsätzlich konnten keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung EG- bzw. GXS-Abbaus in *P. putida* GN187 gefunden werden.

### 5.1.1.3 Der Metabolismus von EG und GXS in *Pseudomonas putida* GN259

Um zusätzliche Information über die möglichen Abbauwege von EG zu erhalten, wurde eine weitere Mutante (GN259) untersucht. Diese Mutante enthielt, zusätzlich zu den Deletionen der Mutante GN187 eine Deletion des Gens *aceA*. Somit stand der Mutante GN259 ( $\Delta upp$ ,  $\Delta prpB$ ,  $\Delta gcl$ ,  $\Delta glcB$ ,  $\Delta aceA$ ) keiner der von Li *et al.* (2010) für *Pseudomonas putida* JM37 postulierten Abbauwege zur Verfügung.

#### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* GN259 nach Behandlung mit Ethylenglycol (EG)

Wie bereits bei den Analysen des Wildtyps, zeigten auch in der Mutante *P. putida* GN259 die Alkohol-Dehydrogenase PP\_2674 und das hypothetische Porin PP\_2662 die stärkste Regulation nach EG-Behandlung. Anstelle der im Wildtyp als differenziell reguliert identifizierten Aldehyd-Dehydrogenase PP\_2680, war in der Mutante *P. putida* GN259 jedoch die Aldehyd-Dehydrogenase PP\_0545 in ihrer Expression verstärkt. Dieses Enzym war, wie Tabelle 5.2 zeigt, in *P. putida* JM37 gleichermaßen unter dem Einfluss von EG induziert. Neben dem Citratzyklus-Enzym  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1 (SucA) war auch die Expression des Enzyms Dihydrolipoyl-Transacetylase (die E2-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes) unter EG verstärkt.

PedR1 oder eine der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen wurden in diesem Versuch nicht identifiziert. Der regulierte Spot 1311 könnte jedoch aufgrund seiner Position im Gel PedR1 enthalten. Im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse wurden in diesem Spot jedoch keine Proteine identifiziert.

#### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* GN259 nach Behandlung mit Glyoxylsäure (GXS)

Auch im Bezug auf die Behandlung mit GXS waren in der Mutante *P. putida* GN259 kaum Unterschiede zum Wildtyp festzustellen. Sowohl die Untereinheiten des Pyruvat-(AceE, AceF) und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (SucA) als auch die Isocitrat-Dehydrogenase (PP\_4012) waren nach GXS-Behandlung induziert. Die bereits im Wildtyp beobachtete leichte Induktion der Acetyl-Co-Synthase (AcsA) war ebenfalls zu beobachten. Eine Regulation der zweiten dimeren Isocitrat-Dehydrogenase (PP\_4011) konnte nicht festgestellt werden.

#### 5.1.1.4 Der Metabolismus von EG und GXS in *Pseudomonas putida* JM37

Neben *P. putida* KT2440 wurde in dieser Arbeit auch der Stamm *P. putida* JM37 untersucht (Li *et al.*, 2010). Bei *P. putida* JM37 handelt es sich um ein Wildtypisolat, welches aus einer m-Xylol haltigen Bodenprobe isoliert wurde. Dieser Stamm ist in der Lage, sowohl auf Ethylenglycol als auch auf Glycol- und Glyoxylsäure als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Im Gegensatz zu *P. putida* KT2440 ist das Genom von *P. putida* JM37 nicht sequenziert. Die Identifizierung regulierter Proteine basierte daher auf Homologien zu anderen, bereits sequenzierten *Pseudomonaden*. Neben Proteinen aus *P. putida* KT2440 wurden daher auch Proteine aus *Pseudomonas putida* F1 und *Pseudomonas putida* W619 in diesem Versuch identifiziert.

#### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* JM37 nach Behandlung mit Ethylenglycol (EG)

Nach Behandlung mit EG zeigten die Alkohol-Dehydrogenase (PP\_2674) und das hypothetische Porin (PP\_2662) die stärkste Regulation. Zudem war neben der bereits in *P. putida* KT2440 identifizierten Aldehyd-Dehydrogenase PP\_2680 auch die in der Mutante *P. putida* GN259 regulierte Aldehyd-Dehydrogenase (PP\_0545) nach EG-Behandlung induziert. Die Enzyme Isocitrat-Lyase (AceA), Glyoxylat-Carboligase (Gcl) und Malat Synthase (GlcB) wurden ebenfalls unter Ethylenglycol verstärkt exprimiert. Die Induktion dieser Enzyme lässt sowohl auf eine Induktion des „Glycerat Pathway“ (Kornberg *et al.*, 1961a) als auch des „Glyoxylatzyklus“ (bzw. Dicarboxylic-Acid-Cycle) (Kornberg *et al.*, 1957; Kornberg *et al.*, 1961b) in *P. putida* JM37 schließen (Li *et al.*, 2010). Ebenfalls reguliert war das Enzym Hydroxypyruvat-Isomerase, welches die Isomerisierung von Tatronat-Semialdehyd, dem Produkt der Glyoxylat-Carboligase und Hydroxypyruvat, katalysiert. Beide Enzyme liegen in *Pseudomonas putida* W619 im gleichen Operon. Ein weiteres, am „Glyoxylatzyklus“ (bzw. Dicarboxylic-Acid-Cycle) beteiligtes Enzym, die Malat-Dehydrogenase, war nach der Zugabe von EG ebenfalls induziert. Anders als in *P. putida* KT2440 war die Isocitrat-Lyase (AceA) unter Ethylenglycol nur geringfügig (1,9-fach) reguliert. Die in diesem Experiment gefundene Isocitrat-Dehydrogenase wurde aufgrund ihrer Homologie zu einem entsprechenden Enzym in *Pseudomonas putida* F1 identifiziert. Ein Molekulargewicht von 83 kDa lässt hier auf eine monomere Isocitrat-Dehydrogenase schließen. Wie auch PP\_2012 in *P. putida* KT2440 wurde dieses Enzym nach EG-Behandlung vermindert exprimiert. Die Induktion der Glycolat-Oxidase (GlcD) könnte auf einen Abbau von EG über das Zwischenprodukt Glycolsäure hindeuten. Der Regulator PedR1 und die Acetyl-Co-Synthetase (AcsA) waren ebenfalls induziert.

### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* JM37 nach Behandlung mit Glyoxylsäure (GXS)

Unter den 2D-DIGE-Experimenten war in diesem Versuch die größte Zahl differentiell regulierter Spots zu finden. So waren insgesamt 134 Spots nach statistischen Kriterien differentiell reguliert, wovon 34 Spots nach manueller Evaluierung für die massenspektrometrische Analyse ausgewählt wurden. Hiervon waren 30 Spots nach der Behandlung mit GXS verstärkt, vier vermindert exprimiert.

In den mit GXS behandelten Zellen zeigten die Enzyme Malat-Synthase (17-fach) und Glyoxylat-Carboligase (16-fach) die stärkste Induktion. Eine Regulation der Isocitrat-Lyase über den definierten Schwellenwert (1,8-fach) konnte nicht festgestellt werden. Wie bereits bei EG behandelten Zellen, war auch nach GXS-Behandlung das Enzym Hydroxypyruvat-Isomerase (12-fach) reguliert. Die zusätzliche Regulation der Hydroxypyruvat-Reduktase deutet auf einen Abbau von Glyoxylsäure über Hydroxypyruvat zu Glycerat hin. Das Enzym Hydroxy-Oxopropionate-Reduktase, welches die Umwandlung von Tatronat-Semialdehyd zu Glycerate katalysiert, konnte jedoch nicht identifiziert werden (Abbildung 5.7). Einen weiteren Hinweis auf die Induktion des „Glycerat-Pathways“ liefert die Induktion der Pyruvat-Kinase. Darüber hinaus legt die Induktion der Malat-Dehydrogenase eine Regulation des „Glyoxylatzyklus“ (bzw. „Dicarboxylic-Acid-Cycle“) nahe. Wie bereits bei *P. putida* KT2440 beobachtet, kommt es auch bei *P. putida* JM37 nach GXS-Behandlung zu einer Induktion von AcsA jedoch nicht zu einer Induktion von PedR1.

#### 5.1.2 Analyse des Membranproteoms

Zusätzlich zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen 2D-DIGE-Experimenten wurde auch das Membranpellet, welches neben der zytosolischen Fraktion während der Probenvorbereitung gewonnen wurde, auf differentiell regulierte Proteine untersucht. Da 2D-DIGE nicht die Methode der Wahl zur Analyse von Membranproteinen darstellt, wurde zur Quantifizierung dieser Fraktion ein labelfreier massenspektrometrischer Ansatz gewählt. Dabei kam aufgrund der Komplexität der Probe ein 240 min UPLC-Gradient zum Einsatz. Neben den beiden Wildtypen *P. putida* KT2440 und JM37 wurde auch die Mutante *P. putida* GN259 mit dieser Methode untersucht. Da von der Mutante *P. putida* GN187 keine zusätzlichen Informationen erwartet wurden (es wurde vermutet, dass der Abbau von EG in KT2440 ohnehin nur über AceA erfolgt), wurde GN187 in dieser Analyse nicht berücksichtigt.

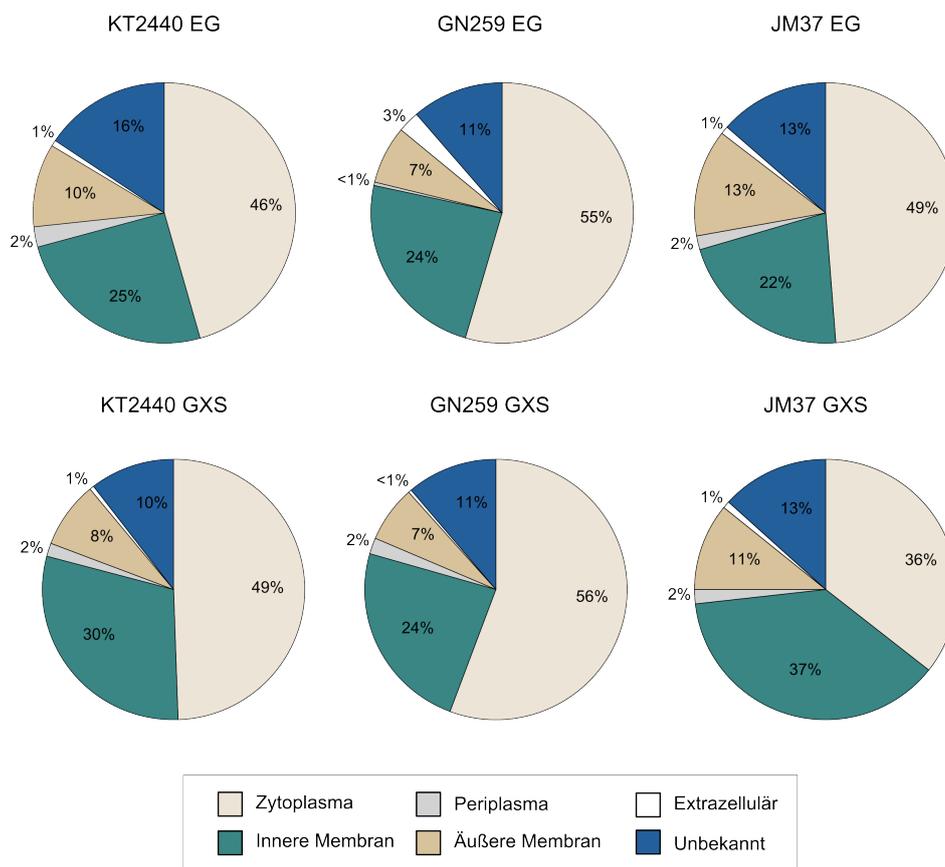
**Tabelle 5.3:** Übersicht über die im Rahmen der Analyse des Glyoxylsäure- und Ethylenglycol-Metabolismus durchgeführten Membranproteom-Analysen.

Stamm	Behandlung	Features	Features (nach Filter)	MS/MS	Ident. Proteine	Reg. Proteine
KT2440	EG	21560	16503	9398	403	17
JM37	EG	23700	19643	9769	435	11
KT2440	GXS	39483	18713	9363	377	15
JM37	GXS	22648	18416	9839	498	273
GN259	EG	24701	21572	11247	506	23
GN259	GXS	31744	27104	12406	524	81

*Features:* Anzahl der insgesamt detektierten Features (Peptide).

*(nach Filter):* Features, welche nach dem Filtern mit den in Kapitel 4 angegebenen Parametern in der Analyse verblieben (Ladungszustand +2,+3,+4, MW 200 - 1800 Da).

*MS/MS:* Zahl aufgenommener MS/MS-Spektren.



**Abbildung 5.3:** Prozentuale Verteilung der während der Analyse der Membranfraktion in den verschiedenen durchgeführten Vergleichen identifizierten Proteine auf die unterschiedlichen subzellulären Kompartimente.

Für die quantitative Analyse der Proben und die Identifizierung der differenziell regulierten Proteine wurden die beiden Softwarepakete Progenesis LC-MS und Scaffold, sowie die Suchmaschinen Mascot und *X!Tandem* verwendet. Die verwendeten Suchkriterien sowie die Funktionsweise der verwendeten Software-Pakete wurde bereits in den Abschnitten 4.5.3 und 4.5.4 erläutert. Die in den einzelnen Experimenten detektierten, identifizierten und regulierten Peptide („Features“) und Proteine sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

In allen durchgeführten Experimenten wurden nur Features berücksichtigt, welche einen  $m/z$ -Wert zwischen 200 und 1800 Da sowie eine Ladung zwischen 2+ und 4+ aufwiesen. Waren für ein „Feature“ mehr als zehn MS/MS-Spektren vorhanden, wurden nur die zehn intensivsten MS/MS-Spektren für die Datenbanksuche ausgewählt. Ein Peptid, welches eine „Peptid-Wahrscheinlichkeit“ von mindestens 80% aufwies, wurde als eindeutig identifiziert angesehen. Ein Protein galt als eindeutig identifiziert, wenn es eine „Protein-Wahrscheinlichkeit“ von 99% aufwies und anhand von mindestens zwei Peptiden identifiziert wurde. Zusätzlich wurde eine „False Discovery-Rate“ (FDR) auf Peptid- und Proteinebene ermittelt. Proteine, welche sich in ihrer „Peakfläche“ mindestens um einen Faktor 2 zwischen den untersuchten Zuständen unterschieden und einen  $p$ -Wert  $< 0.05$  aufwiesen, wurden als differentiell reguliert angesehen.

Abbildung 5.3 zeigt die Verteilung der in den einzelnen Analysen identifizierten Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente. Der Anteil der Membranproteine an den insgesamt identifizierten Proteinen lag in allen Experimenten zwischen 30 und 40%. Die Gesamtzahl identifizierter Proteine schwankte dabei zwischen 400 und 525 Proteinen. Da für die Zuordnung der Proteine zu den einzelnen Kompartimenten Informationen aus der „Pseudomonas Genome Database“ (Winsor *et al.*, 2011) herangezogen wurden und hier nicht für alle Proteine entsprechende Informationen hinterlegt waren, konnten nicht alle identifizierten Proteine in Abbildung 5.3 berücksichtigt werden. Der in der Membranfraktion gefundene Anteil zytosolischer Proteine lässt sich durch „Kontaminationen“ der Membranfraktion mit zytosolischen Proteinen sowie durch membranassoziierte Proteine, welche in der Datenbank dem Zytosol zugeordnet wurden, erklären.

Die Gelbilder sowie die Listen der darin regulierten Proteine der im Folgenden besprochenen Versuche sind im Anhang, sortiert nach Kapitelüberschriften zu finden.

### 5.1.2.1 Untersuchung der Membranproteinfraktion in *Pseudomonas putida* KT2440

#### Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit Ethylenglycol (EG)

Um auch hier einen Überblick über die in diesem Experiment regulierten Proteine zu geben, wurde ein Auszug aus den Ergebnissen und deren Vergleich mit anderen untersuchten Zuständen und Stämmen in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

**Tabelle 5.4:** Auswahl regulierter Proteine nach Behandlung mit EG und GXS in den verschiedenen untersuchten Stämmen.

Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie um einen Faktor von 2 bzw. 0,5 reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen. Regulationsfaktoren  $> 1$  zeigen eine Induktion des Proteins in der mit GXS bzw. EG behandelten Proben an.

Protein	KT2440		GN259		JM37	
	EG	GXS	EG	GXS	EG	GXS
Isocitrate lyase (AceA)	5,7	-	k.o.	k.o.	5,6	-
Glyoxylate carboligase (Gcl)	-	-	k.o.	k.o.	-	-
Malate synthase G (GlcB)	-	-	k.o.	k.o.	-	-
Quinoprotein alcoholdehydrogenase (PedH)	-	-	74,4	-	198,1	-
Quinoprotein alcoholdehydrogenase (PedE)	-	-	-	-	-	-
Aldehyde dehydrogenase family protein (PedI)	94,8	-	36,1	-	86,1	-
Aldehyde dehydrogenase family protein (PP_0545)	2,4	-	2,2	-	3,9	-
Transcriptional regulator (PedR1)	-	-	-	-	-	-
PAS/PAC sensor hybrid histidine kinase (PedS1)	-	-	-	-	-	-
Acetyl-CoA Synthase (AcsA, PP_4487)	30,3	2,2	-	2,6	-	-
Acetat Permease (ActP, PP_1743)	17,5	4,2	-	6,1	-	3,6
Hypothetical Porin (PP_2662)	17	-	73,6	-	-	-

-: Das Protein war nach den angelegten Kriterien (Regulation  $> 2$  bzw.  $< 0,5$ ; p-Wert  $< 0,05$ ) nicht reguliert.

k.o.: Das entsprechende Gen war in diesem Stamm deletiert.

Insgesamt wurden in diesem Experiment 403 Proteine identifiziert, wovon 17 eine Regulation aufwiesen. Der Anteil der Membranproteine (innere und äußere Membran) an den identifizierten Proteinen lag bei 35% (141 Proteine). Unter den differenziell regulierten Proteinen, waren 14 nach EG-Behandlung induziert, drei wurden vermindert exprimiert. Von diesen Proteinen waren jedoch lediglich drei Proteine einer der beiden Membranen zuzuordnen, darunter die Acetat Permease (ActP), das hypothetische

Porin (PP\_2662) und ein weiteres hypothetisches Protein (PP\_1202). Zudem wurden die bereits in der 2D-DIGE-Analyse gefundene Aldehyd-Dehydrogenase PP\_2680 sowie die Aldehyd-Dehydrogenase PP\_0545 nach Behandlung mit EG verstärkt exprimiert. PP\_0545 (2,4-fach) war dabei deutlich schwächer reguliert, als PP\_2680 (95-fach). Des Weiteren wurde das PQQ-Synthese Protein PqqC identifiziert, welches in *P. aeruginosa* ebenfalls der Regulation durch PedR1 unterliegt.

### **Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit Glyoxylsäure (GXS)**

Insgesamt wurden in diesem Versuch 377 Proteine identifiziert, wovon 15 Proteine differenziell reguliert waren. Nach GXS-Behandlung wurden vier Proteine verstärkt, 11 Proteine vermindert exprimiert. Dies steht in einem deutlichen Kontrast zu den im 2D-DIGE-Experiment erhobenen Daten. Hier waren lediglich drei von 23 identifizierten Proteinen nach GXS-Gabe herunter reguliert.

Unter den identifizierten Proteinen konnten 38% einer der beiden Membranen zugeordnet werden. Alle regulierten Membranproteine wurden unter GXS verstärkt exprimiert. Darunter die bereits nach EG-Behandlung induziert gefundene Acetat-Permease (ActP) sowie die Proteine Succinat Dehydrogenase (SdhD) und MscL.

Zusätzlich zu den bereits im 2D-DIGE reguliert gefundenen Proteinen ist die verminderte Expression des Malat-Enzyms (MaeB) und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PckA) nach Behandlung mit GXS von Interesse. Da sich die Zellen zum Zeitpunkt der Probenahme voraussichtlich in der stationären Phase befanden, und Glucose als C-Quelle zu diesem Zeitpunkt aufgebraucht war, könnte die Regulation des Malat-Enzyms auf einen alternativen Weg zur Gewinnung von NADPH in unbehandelten Zellen hinweisen. Die Induktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase in unbehandelten Zellen könnte mit einer verstärkten Induktion der Gluconeogenese in diesem Zustand verbunden sein. Behandelte Proben erhielten mit GXS hingegen eine „neue“ Kohlenstoffquelle und stellten ihren Metabolismus vermutlich auf diese um.

#### **5.1.2.2 Untersuchung der Membranproteinfraktion in *Pseudomonas putida* GN259**

### **Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* GN259 nach Behandlung mit Ethylenglycol (EG)**

Insgesamt konnten in diesem Experiment 506 Proteine identifiziert werden, wovon 24 zwischen den beiden Zuständen differentiell reguliert waren. 17 dieser Proteine waren nach EG-Gabe induziert, sechs wurden vermindert exprimiert. Der Anteil der Membranproteine unter den identifizierten Proteinen lag bei 31%.

Unter den nach EG-Gabe induzierten Membranproteinen befand sich eine große Anzahl an „TonB-Dependent Outer Membrane Receptors“, welche eine Rolle bei der Aufnahme von Metallionen spielen (PP\_1006, PP\_1446, PP\_3330, PP\_3340, PP\_4270,). Zudem waren zwei Bakterioferritin-Proteine (PP\_0482, PP\_1082) unter EG induziert. Auch das hypothetische Porin PP\_2662 und der Ethanolamin Transporter PP\_0544 wurden verstärkt exprimiert. Dieser Transporter liegt auf dem Genom direkt benachbart zu der bereits im entsprechenden 2D-DIGE-Experiment reguliert gefundenen Aldehyd-Dehydrogenase PP\_0545 und könnte daher eine Rolle im EG-Metabolismus spielen. Zusätzlich konnte auch die Aldehyd-Dehydrogenase PP\_2680 in diesem Experiment identifiziert werden. Die Alkohol-Dehydrogenase PP\_2679 und das PQQ-Syntheseprotein PqqC (PP\_0378) zeigten nach EG-Gabe ebenfalls eine verstärkte Expression. Die Induktion des hypothetischen Proteins GlcG, welches in einem Operon mit den drei Untereinheiten der Glycolat-Oxidase liegt, könnte auf einen Abbau von Ethylenglycol über Glycolsäure hinweisen. Die monomere Isocitrat-Dehydrogenase wurde nach EG-Behandlung vermindert exprimiert.

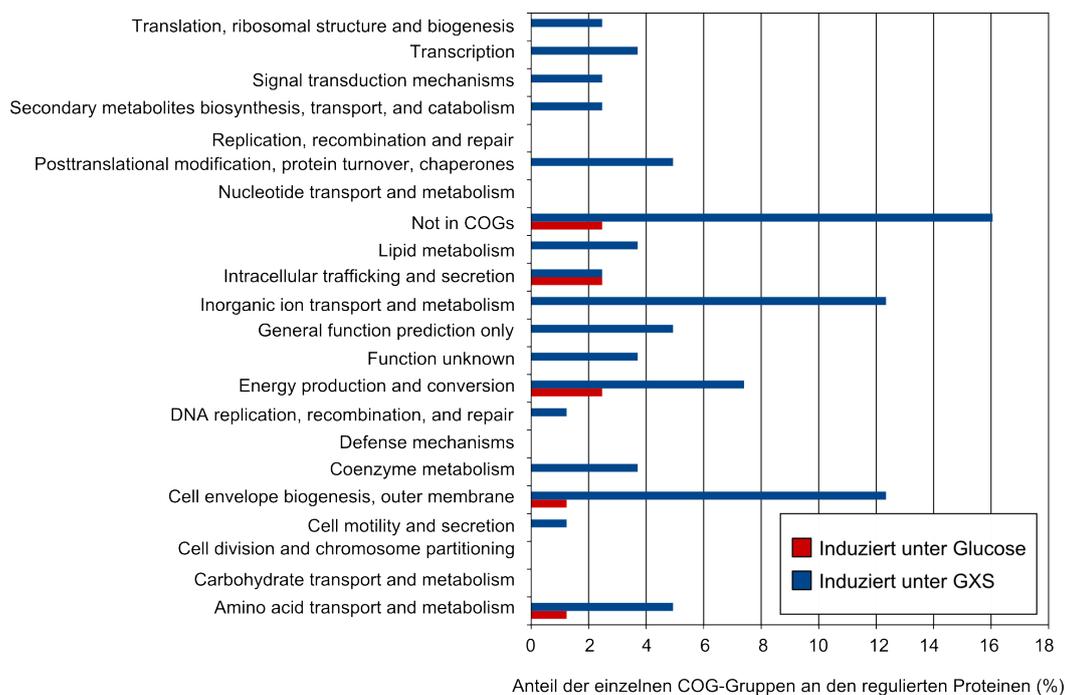
### **Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* GN259 nach Behandlung mit Glyoxylsäure (GXS)**

Insgesamt konnten in diesem Experiment 524 Proteine identifiziert werden, wovon 81 nach GXS-Gabe eine differentielle Regulation zeigten. Wie auch bei der mit *P. putida* JM37 durchgeführten Analyse des Membranproteoms, waren auch in diesem Experiment unter GXS deutlich mehr Proteine differentiell reguliert als unter EG. So waren 73 von 81 regulierten Proteinen unter GXS induziert, lediglich acht zeigten eine entgegengesetzte Regulation. 31% aller identifizierten Proteine konnten einer der beiden Membranen zugeordnet werden.

Um einen besseren Überblick über die Funktion der regulierten Proteine zu erhalten, wurde eine Einteilung der regulierten Proteine anhand der COG (Cluster of Orthologous Genes)-Datenbank vorgenommen (Abbildung 5.4). Die deutlichste Regulation nach GXS-Behandlung war in den Kategorien „Inorganic Ion Transport and Metabolism“, „Cell Envelope Biogenesis“ und „Energy Production and Conversion“ zu beobachten.

In der Kategorie „Inorganic Ion Transport and Metabolism“ wurden größtenteils die gleichen „TonB-Dependent Outer Membrane Receptors“ wie im vorherigen Experiment (PP\_1006, PP\_1446, PP\_3330, PP\_4247) sowie die beiden Bakterioferritin-Proteine identifiziert. Zudem waren weitere „TonB-Dependent Outer Membrane Receptors“ (PP\_0861, PP\_3612) sowie die beiden Porine OprD (Aminosäuretransport) und OprE (Funktion unbekannt) nach EG-Behandlung induziert.

Bei den identifizierten Enzymen des Energie-Metabolismus handelt es sich überwiegend



**Abbildung 5.4:** Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie. Die einzelnen Balken spiegeln den Anteil der entsprechenden Kategorie, an den insgesamt regulierten Proteinen wider. Die Kategorie „Not in COGs“ enthält Proteine, für welche in der Datenbank keine COG-Informationen vorhanden waren.

um Enzyme des Citratzyklus (SdhD, GltA) bzw. des Methylcitratzyklus (PP\_2335). Zudem zeigten die Acetat-Permease (ActP) sowie die Malat-Dehydrogenase (Mqo-1) nach Behandlung mit GXS eine Induktion.

### 5.1.2.3 Untersuchung der Membranproteinfraktion in *Pseudomonas putida* JM37

#### Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* JM37 nach Behandlung mit Ethylenglycol (EG)

Insgesamt konnten in diesem Experiment 435 Proteine identifiziert werden, wovon 11 Proteine differenziell reguliert waren. Acht dieser Proteine wurden nach EG-Behandlung verstärkt exprimiert. Der Anteil der Membranproteine an den insgesamt identifizierten Proteinen betrug 35%. Unter den regulierten Proteinen befanden sich lediglich zwei Membranproteine, welche jedoch nicht direkt mit dem EG-Metabolismus in Verbindung gebracht werden konnten (PP\_3340, YajC). Zu den bereits im zugehörigen 2D-DIGE-Experiment unter EG induzierten Proteinen zählten die beiden Aldehyd-Dehydrogenasen (PP\_2680, PP\_0545) und die Isocitrat-Lyase (AceA)(Tabelle 5.4). Außerdem wurde die Alkohol-Dehydrogenase PP\_2679 nach EG-Behandlung verstärkt exprimiert.

### Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* JM37 nach Behandlung mit Glyoxylsäure (GXS)

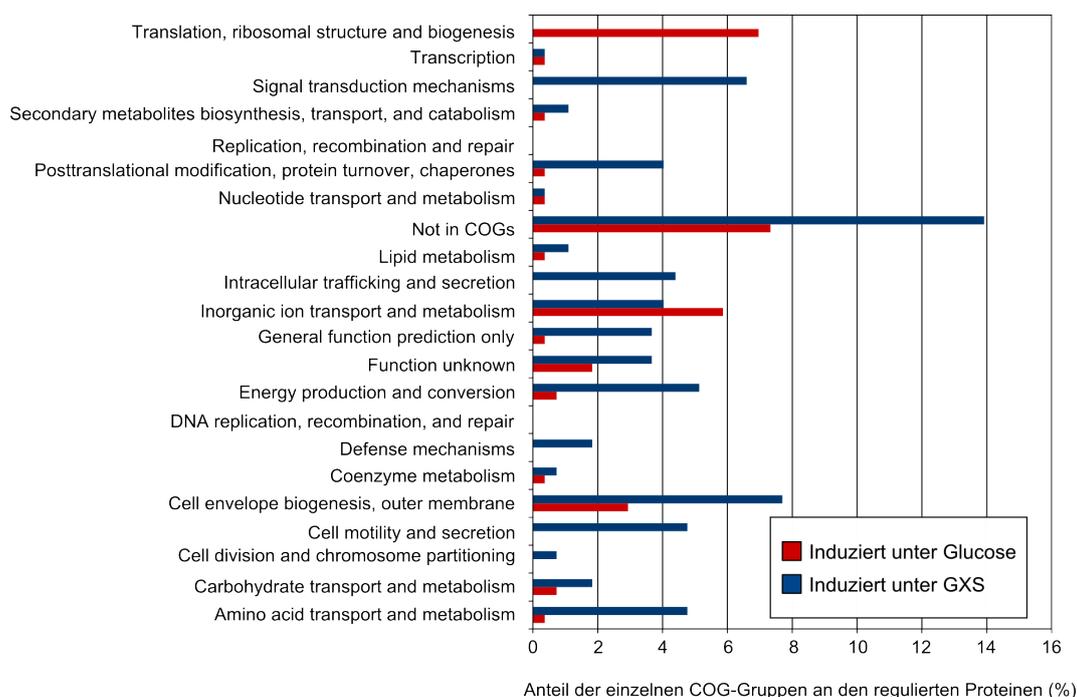
Wie bereits im 2D-DIGE-Experiment zu beobachten war, zeigte der GXS-Puls die größte Wirkung auf das Proteom von *P. putida* JM37. In der Membranfraktion waren 273 von 498 identifizierten Proteinen reguliert. Generell unterschied sich dieser Versuch weder im Hinblick auf die Zahl der detektierten Features (Peptide) noch in Bezug auf die Zahl der identifizierten Proteine signifikant von den übrigen Membran-Versuchen (Tabelle 5.3), was einen technischen Grund für den deutlich erhöhten Anteil regulierter Proteine unwahrscheinlich erscheinen lässt. Auffällig war lediglich die im Vergleich zu den übrigen Membran-Experimenten geringere Varianz zwischen den verschiedenen biologischen Replikaten eines Zustandes. Dies könnte zumindest teilweise die größere Anzahl signifikant regulierter Proteine erklären.

Auch die Verteilung der Proteine auf die subzellulären Kompartimente unterschied sich deutlich von den anderen durchgeführten Membranproteom-Analysen. So waren 48% der identifizierten Proteine einer der beiden Membranen zuzuordnen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine in diesem Experiment höhere Effizienz der Carbonatextraktion sowie eine bessere Extraktion der Proteine aus der Membran als bei den übrigen Membranproteom-Experimenten.

Von den 273 differentiell regulierten Proteinen wurden 80 nach GXS-Gabe vermindert, 193 verstärkt exprimiert. Um einen besseren Überblick über die 273 regulierten Proteine zu erhalten, wurden auch hier die Proteine den 22 funktionellen Kategorien der COG-Datenbank zugeordnet (Abbildung 5.5).

Bei dieser Einteilung zeigte sich, dass ein beträchtlicher Anteil der nach GXS-Behandlung schwächer exprimierten Proteine den Bereichen „Translation, Ribosomal Structure and Biogenesis“ sowie „Inorganic Ion Transport and Metabolism“ zuzuordnen waren. Unter diesen Proteinen befanden sich eine große Anzahl Transporter, welche an der Aufnahme von Eisen beteiligt sind, sowie das eisenbindende Protein Bakterioferritin. Die starken Änderungen im Bereich Translation ließen sich vor allem auf die verminderte Expression ribosomaler Proteine nach GXS-Behandlung zurückführen.

Viele der unter GXS verstärkt exprimierten Proteine konnten den Kategorien „Signal Transduction Mechanisms“, „Intracellular Trafficking and Secretion“, „Cell Motility and Secretion“ und „Energy Production and Conversion“ zugeordnet werden. Die induzierten Transporter deckten dabei ein breites Spektrum verschiedener Substrate ab. Neben Transportern für Metallionen (ExbE, ExbD) waren auch Transporter für aromatische und aliphatische Kohlenhydrate (PP\_1820, GntP) induziert. Bei einem Großteil der Signalproteine handelte es sich um verschiedene Histidin-Kinasen (PP\_0409, PP\_1013, PP\_1652, etc.), welchen jedoch, nach unseren Erkenntnissen, nicht in direktem Zusammenhang mit dem Abbau von GXS stehen. Im Bereich „Cell Motility and Secretion“ wa-



**Abbildung 5.5:** Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie. Die einzelnen Balken spiegeln den Anteil der entsprechenden Kategorie an den insgesamt regulierten Proteinen wider. Die Kategorie „Not in COGs“ enthält Proteine, für welche in der Datenbank keine COG-Informationen vorhanden waren.

ren eine Vielzahl so genannter „Methyl-Accepting Chemotaxis Sensors“ (z.B. PP\_1488, PP\_2249, PP\_2861, etc.) induziert. Diese Proteine sind an der Detektion unterschiedlicher Substanzen und deren Konzentrationen im umgebenden Medium beteiligt und haben einen unmittelbaren Einfluss auf die Bewegungsrichtung der Bakterien. Welche Substanzen die von uns identifizierten Proteine detektieren, konnte nicht ermittelt werden. Zudem wurden verschiedene Proteine, welche am Aufbau der Geißeln beteiligt sind, identifiziert (MotC, FlhA, FliL). Wie auch in den vorherigen Membranproteom-Experimenten zeigte sich auch nach Behandlung mit GXS eine Induktion der Actetat-Permease (ActP).

In der Kategorie „Energy Production and Conversion“ waren lediglich die beiden Citratzyklus-Enzyme SucD und IpdG unter GXS vermindert exprimiert, wohingegen eine Reihe verschiedener Proteine der Atmungskette (PP\_0106, CyoA, PetB, CioA, CcoP-2) eine deutliche Induktion in dieser Bedingung zeigten. Die Induktion dieser Enzyme unter GXS deutet auf eine verstärkte Energiegewinnung über diesen Weg unter GXS hin.

### 5.1.3 Der Abbau von Ethylenglycol in *Pseudomonas putida* KT2440 und JM37

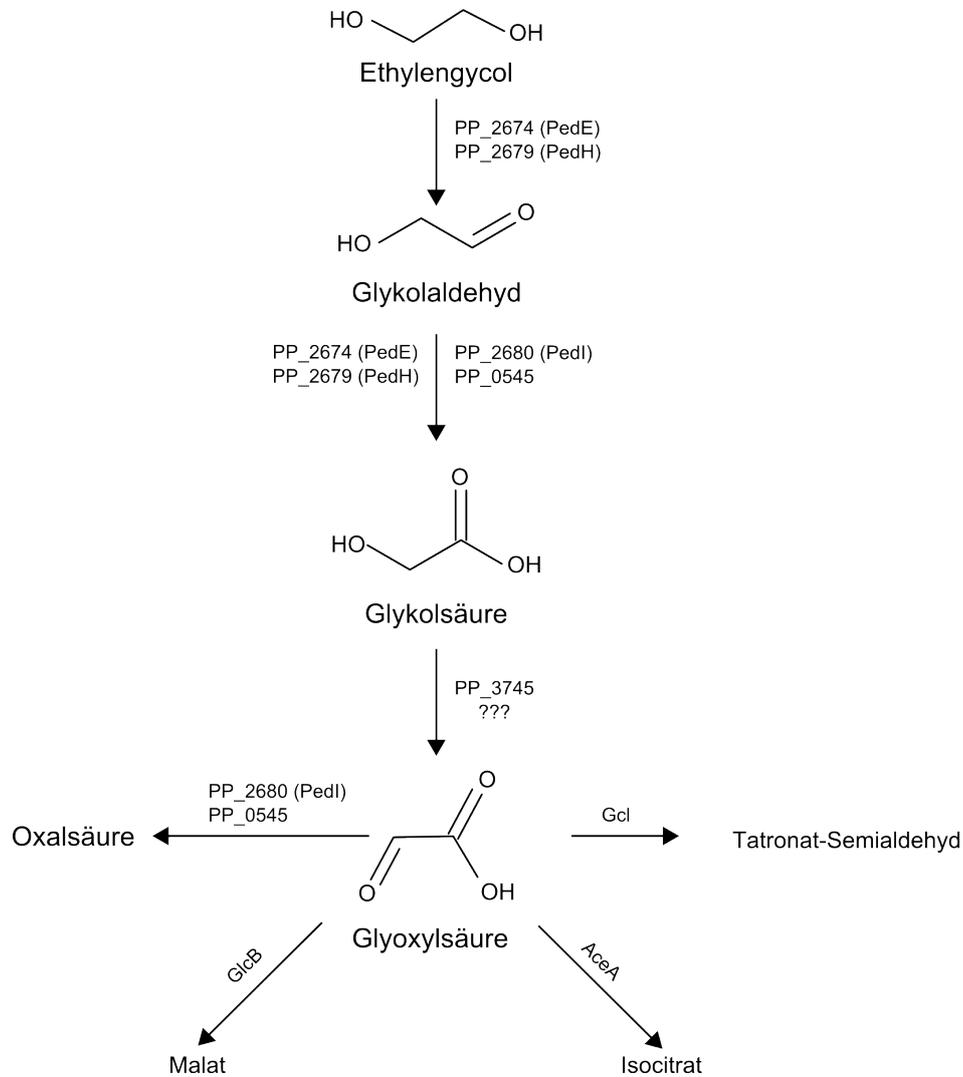
Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Proteomics-Versuchen wurden auch weiterführende mikrobiologische Versuche mit den beiden Stämmen *P. putida* KT2440 und JM37 von Björn Mückschel (Arbeitsgruppe Hauer, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) durchgeführt. Da auch diese Ergebnisse für die Interpretation der Proteomics-Daten von Interesse sind, werden sie im Folgenden mit den Ergebnissen der Proteomics-Versuche gemeinsam besprochen.

Bei Wachstumsversuchen auf den Substraten Ethylenglycol, Glycolsäure und Glyoxylsäure (als alleiniger Kohlenstoffquelle) zeigten die beiden untersuchten Stämme ein grundsätzlich unterschiedliches Verhalten.

Während *P. putida* JM37 auf allen drei Substraten rasches Wachstum zeigte, war *P. putida* KT2440 hierzu in den ersten 48 h auf keinem der getesteten Substrate in der Lage (Mückschel *et al.*, 2012). Bei längeren Kultivierungen konnte auch *P. putida* KT2440, wenn auch deutlich langsamer, auf Ethylenglycol, Glycolsäure und Glyoxylsäure wachsen (Persönliche Kommunikation, Björn Mückschel). In Gegenwart von Glucose als zusätzlicher Kohlenstoffquelle waren beide Stämme zum Abbau der drei getesteten Substrate fähig. Dabei zeigte *P. putida* KT2440 im Vergleich zu *P. putida* JM37 zwar geringere Umsetzungsraten, setzte aber alle drei Substrate ebenfalls vollständig um.

Zudem akkumulierte in *P. putida* KT2440 im Gegensatz zu *P. putida* JM37 Oxalat als Endprodukt (nach 24 h). Bei der Umsetzung von Ethylenglycol kam es bei *P. putida* KT2440 zudem zu einer temporären Akkumulation von Glykol- und Glyoxylsäure (Mückschel *et al.*, 2012).

Wie bereits in Kapitel 3 erwähnt, sind in *Pseudomonaden* drei Stoffwechselwege im Zusammenhang mit dem Metabolismus von Glyoxylsäure beschrieben (Kornberg *et al.*, 1959; Bailey *et al.*, 1966). Die Schlüsselenzyme dieser Wege sind die Glyoxylat-Carboligase (Gcl), die Isocitratlyase (AceA) und die Malat Synthase (GlcB), weshalb diese im Rahmen der Proteomanalyse von besonderem Interesse waren und in der Mutanten GN259 zusammen mit dem Enzym Methylisocitratlyase (prpB) deletiert wurden. Neben diesen am Abbau von Glyoxylsäure beteiligten Enzymen, waren auch die an der Oxidation von Ethylenglycol zu Glyoxylsäure beteiligten Enzyme von Interesse. Hier konnten im Rahmen der Proteomics-Experimente die Alkohol-Dehydrogenasen PedE (PP\_2674) und PedH (PP\_2679) sowie die Aldehyd-Dehydrogenasen PedI (PP\_2680) und PP\_0545 identifiziert werden. Dabei konnte im Rahmen der 2D-DIGE-Analysen in allen Stämmen eine Induktion von PedE unter Ethylenglycol festgestellt werden, während PedH aus technischen Gründen (pH Bereich der IEF) nur in *P. putida* KT2440 identifiziert werden konnte. In *P. putida* KT2440 und JM37 war die Aldehyd-Dehy-



**Abbildung 5.6:** Postulierter Abbauweg von Ethylenglycol zu Glyoxylsäure in *P. putida* KT2440, GN259 und JM37.

Bei der Analyse des Stammes *P. putida* JM37 wurden einige der hier angegebenen Proteine aufgrund von Homologien identifiziert. ??? : Es konnte kein passendes Enzym für die entsprechende Reaktion identifiziert werden.

drogenase PedI, in GN259 die Aldehyd-Dehydrogenase PP\_0545 unter EG induziert (Tabelle 5.2). Die Regulation aller in den einzelnen Experimenten identifizierten Spots sowie die dazugehörigen Gelbilder sind im Anhang dieser Arbeit zu finden.

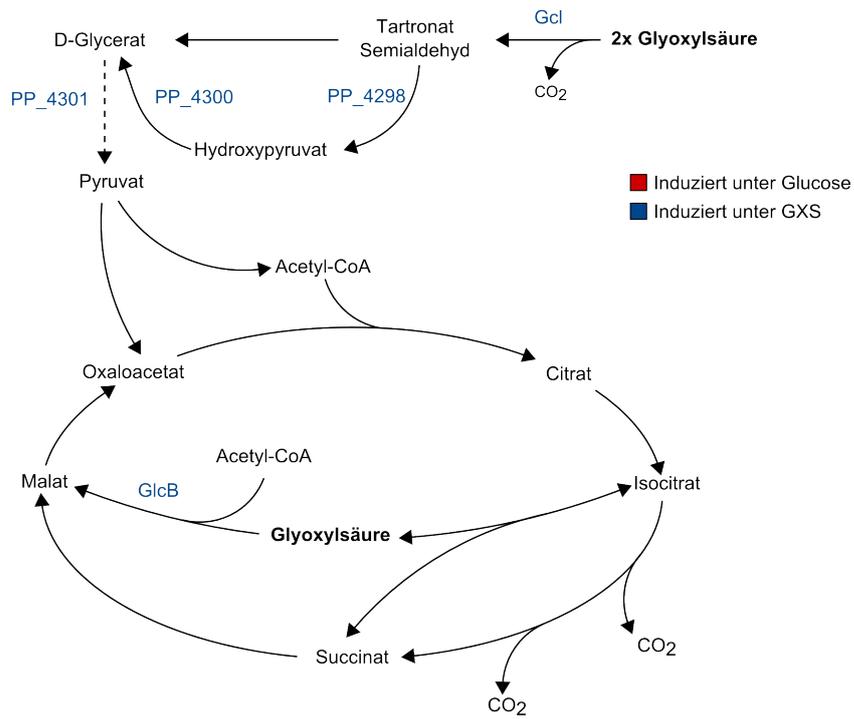
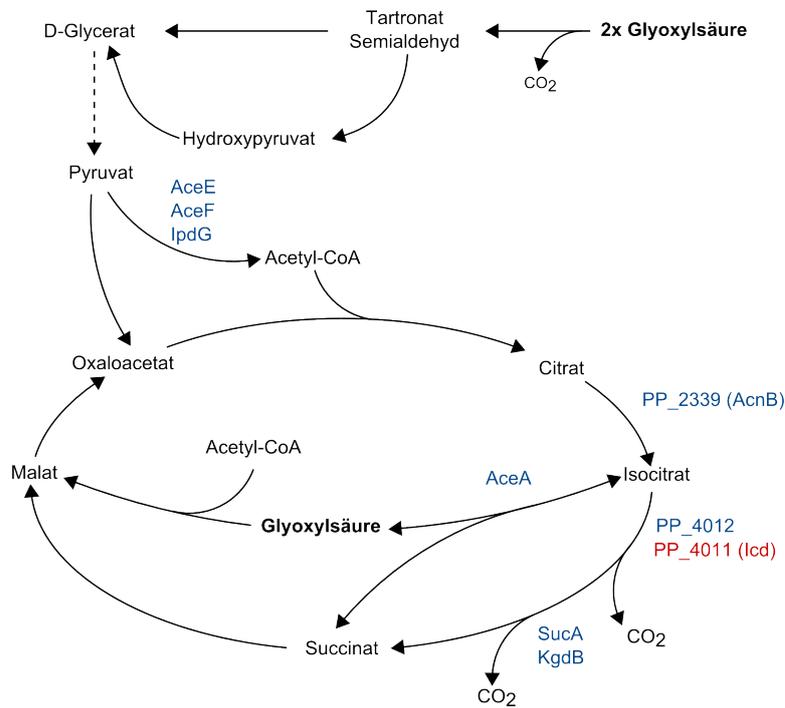
Durch die Analyse der Membranfraktion konnte das aus den 2D-DIGE-Experimenten gewonnene Bild vervollständigt werden (Tabelle 5.4). So zeigte sich, dass in allen drei Stämmen sowohl die Aldehyd-Dehydrogenase PedI als auch PP\_0545 (bzw. entsprechende homologe Enzyme in *P. putida* JM37) unter Ethylenglycol induziert waren. Dabei wies PedI in allen Stämmen die stärkere Induktion auf. Auch die Alkohol-Dehydrogenase PedH war in der Membranfraktion von *P. putida* GN259 und JM37 unter Ethylenglycol deutlich induziert. In *P. putida* KT2440 konnte das Protein in der Membranfraktion nicht identifiziert werden. Es wurde jedoch in der 2D-DIGE-Analyse mit erweitertem pH-Bereich (IEF, pH 3-11) identifiziert. Zudem wurde in *P. putida* KT2440 und GN259 das PQQ-Biosyntheseprotein PqqC unter Ethylenglycol verstärkt exprimiert.

Aufgrund dieser Daten wurde für alle drei *Pseudomonas*-Stämme der in Abbildung 5.6 dargestellte Abbauweg von Ethylenglycol zu Glyoxylsäure postuliert. Dabei ist auch die subzelluläre Lokalisation der einzelnen an diesem Weg beteiligten Enzyme von Bedeutung. Während es sich bei den beiden Alkohol-Dehydrogenasen PedE und PedH um periplasmatische Proteine handelt, sind die beiden Aldehyd-Dehydrogenasen PedI und PP\_0545 dem Zytoplasma zuzuordnen (Quelle: *Pseudomonas* Genome Database). Dies wirft, neben der Frage des Transports von Glycolaldehyd bzw. Glycolsäure auch die Frage nach einem Enzym, welches die Oxidation von Glycolsäure zu Glyoxylsäure katalysiert, auf. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre das in *P. putida* JM37 regulierte Enzym GlcD (PP\_3745). Bei dem in allen untersuchten Stämmen unter EG induzierten hypothetischen Porin (PP\_2662) könnte es sich zudem um ein für EG spezifisches Porin handeln. Die Acetat-Permease ActP wäre darüber hinaus ein möglicher Kandidat für den Transport von Glycolsäure über die innere Membran.

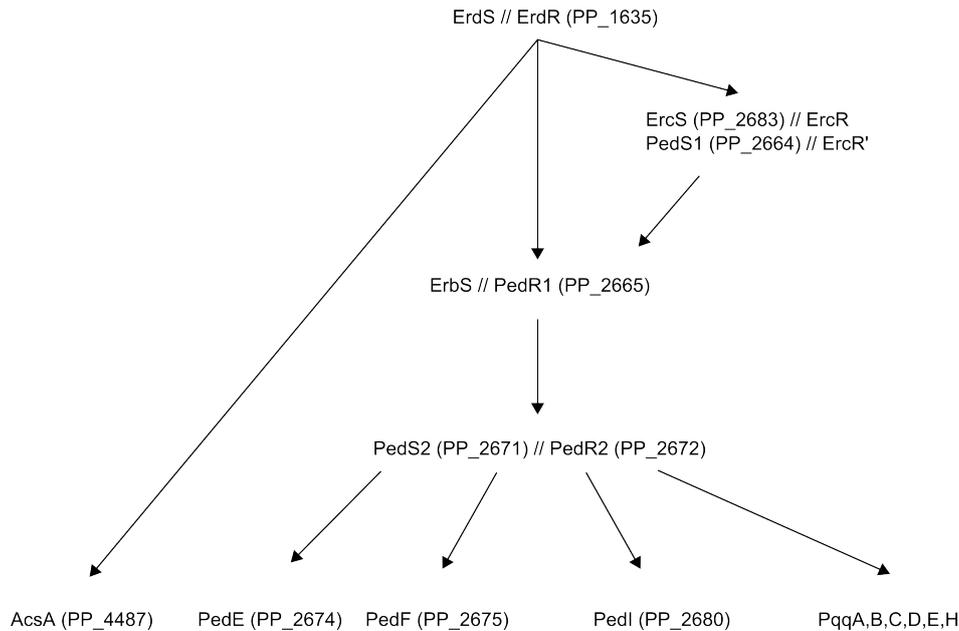
Im weiteren Metabolismus von Glyoxylsäure unterscheiden sich *P. putida* KT2440 und GN259 deutlich von *P. putida* JM37. Während in *P. putida* JM37 alle drei postulierten Abbauwege (Gcl, GlcB und AceA) unter EG induziert waren, wurde in *P. putida* KT2440 lediglich der Abbauweg über AceA verstärkt exprimiert.

Nach Behandlung mit GXS waren in *P. putida* JM37 Gcl und GlcB deutlich reguliert, während AceA keine Regulation zeigte (Abbildung 5.7 A). In *P. putida* KT2440 war auch hier lediglich AceA induziert (Abbildung 5.7 B). Zudem zeigte sich in *P. putida* KT2440 eine Induktion verschiedener Enzyme des Citratzyklus, darunter PP\_4012 und SucA und KgdB.

Neben den am Metabolismus von EG und GXS beteiligten Enzymen, war auch der Regulator PedR1 unter Ethylenglycol jedoch nicht unter Glyoxylsäure in *P. putida*

A) *P. putida* JM37B) *P. putida* KT2440

**Abbildung 5.7:** Unter GXS induzierte Abbauwege in A) *P. putida* JM37 und B) *P. putida* KT2440.



**Abbildung 5.8:** Mögliches, unter EG induziertes, zum ErbR-Regulon aus *P. aeruginosa* homologes Regulon in *P. putida* KT2440 und JM37.

Wo möglich wurde die Nomenklatur aus Mückschel *et al.* (2012) übernommen. Die Abbildung wurde auf Basis des von Mern und Kretzschmar *et al.* (Kretzschmar *et al.* 2010; Mern *et al.* 2010) für *P. aeruginosa* vorgeschlagenen Netzwerkmodells erstellt. Pfeile drücken vermutete regulatorische Beziehungen aus.

KT2440 und JM37 induziert. Dieser Response-Regulator ist zu dem erstmals von Schweizer (1991) beschriebenen Regulator ErbR aus *P. aeruginosa* sowie zu dem von Arias *et al.* (2008) in *P. putida* U beschriebenen Regulator PedR1 homolog. Aufgrund der Verwandtschaft von *P. putida* KT2440 und *P. putida* U wird im Folgenden, wenn möglich, die Nomenklatur aus *P. putida* U übernommen.

PedR1 (ErbR) ist in *P. aeruginosa* als zentraler Regulator des Ethanol-Abbaus beschrieben (Mern *et al.*, 2010; Schobert *et al.*, 2001). Dabei kontrolliert PedR1, teilweise über das Sensor-Kinase/Response Regulator Paar PedS2/PedR2, die Expression verschiedener, am Ethanol-Abbau beteiligter, Enzyme. Unter den durch dieses System kontrollierten Enzymen befinden sich auch mehrere der unter EG induzierte Proteine (bzw. Homologe dieser Proteine) wie PedE (PP\_2674), PedI (PP\_2680) und PqqC (PP\_0378). Die Expression der Acetyl-CoA Synthetase AcsA, welche ebenfalls unter mehreren Bedingungen induziert war, wird (in *P. aeruginosa*) von einer höheren Ebene des gleichen Regulons kontrolliert (Kretzschmar *et al.*, 2010). Abbildung 5.8 gibt den von Mern und Kretzschmar *et al.* (Kretzschmar *et al.* 2010; Mern *et al.* 2010) für *P. aeruginosa* postulierten Abbauweg mit den entsprechenden homologen Proteinen aus *P. putida* KT2440 wieder.

## 5.2 Untersuchungen zum Butanol-Metabolismus

Die im Rahmen dieses Teilprojekts durchgeführten Arbeiten befassten sich mit der Toleranz von *Pseudomonas putida* KT2440 gegenüber dem organischen Lösungsmittel Butanol. Im Hinblick auf die angestrebte biotechnologische Synthese von Butanol in diesem Stamm, wurden verschiedene am Katabolismus von Butanol beteiligte Enzyme identifiziert und quantifiziert. Des Weiteren lag ein besonderes Augenmerk auf vom Butanol-Katabolismus unabhängigen Resistenzmechanismen wie Stress-induzierten Proteinen, Porinen und Transportern. Untersuchungen zum Wachstum von *P. putida* KT2440 in Gegenwart verschiedener Butanolkonzentrationen sowie eine Stoffflussanalyse wurden bereits von Rühl *et al.* (2009) publiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteomanalysen zweier unterschiedlicher Ansätze durchgeführt. Die untersuchten Proben unterschieden sich dabei sowohl in der Art ihrer Kultivierung (Schüttelkolben und Bioreaktor) als auch in den verwendeten Butanol- und Glucosekonzentrationen. In beiden Ansätzen wurden parallel zu den hier beschriebenen Proteomanalysen auch Analysen des Transkriptoms durchgeführt (AG Hauer, Institut für Technische Biochemie bzw. AG Takors, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart). Zudem erfolgte in einer weiteren Kultivierung im Bioreaktor eine  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse durch die Arbeitsgruppe Takors. Wie bereits im Teilprojekt „Untersuchungen zum Abbau von Ethylenglycol“, erfolgten die Proteomanalysen mittels 2D-DIGE (zytosolische Fraktion) sowie labelfreier massenspektrometrischer Quantifizierung (Membranfraktion). Die im Bioreaktor kultivierten Proben wurden zusätzlich mit einem 1D-Fraktionierungsansatz (GeLCMSMS), welcher sowohl zytosolische Proteine als auch Membranproteine erfasst, analysiert.

Da es sich bei allen verwendeten Methoden um „Screening Methoden“ handelt und in jedem Versuch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine identifiziert wurden, kann an dieser Stelle nicht auf alle Proteine im Detail eingegangen werden. Eine Übersicht über die in jedem Experiment identifizierten Proteine sowie die zugehörigen Abbildungen finden sich im Anhang dieser Arbeit.

### 5.2.1 Proteomanalyse der aus dem Schüttelkolben erhaltenen Proben

Die Kultivierung der in diesem Experiment verwendeten Proben erfolgte durch die Arbeitsgruppe Hauer (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart). Vor- und Hauptkultur wurden in M12-BVT Medium mit 2 g/l Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Butanol wurde bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 als Puls zur Hauptkultur gegeben. Für jeden Zustand wurden drei unabhängige biologische Replikate kultiviert. Die finalen

Butanolkonzentrationen der mit Butanol behandelten Proben betragen 0,5 g/l bzw. 3 g/l. Nach einer Stunde ( $OD_{600}$  von 0,5 - 0,8) wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben geerntet, gewaschen und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei der Analyse des Proteoms wurden Vergleiche zwischen „Glucose und 0,5 g/l Butanol“, „Glucose und 3 g/l Butanol“ sowie „0,5 g/l und 3 g/l Butanol“ durchgeführt. Dabei wurde Butanol als Puls zu den bereits auf Glucose kultivierten Proben hinzugegeben.

### 5.2.1.1 Analyse der zytosolischen Fraktion durch 2D-DIGE

Der Vergleich zwischen der Kontrolle (Glucose) und den beiden behandelten Proben (0,5 g/l und 3 g/l Butanol) erfolgte in zwei unabhängigen 2D-DIGE-Experimenten. Für jeden der beiden Vergleiche kam dabei ein eigener interner Standard, gemischt aus den drei biologischen Replikaten der Kontrolle und den drei biologischen Replikaten der entsprechend behandelten Probe, zum Einsatz. Aufgrund der Verwendung zweier unterschiedlicher interner Standards musste der Vergleich zwischen den mit 0,5 g/l und 3 g/l Butanol behandelten Proben ohne einen internen Standard durchgeführt werden. Dies hatte jedoch lediglich einen Einfluss auf die verwendete Normalisierungsmethode in der Analysesoftware Progenesis SameSpots.

**Tabelle 5.5:** Übersicht über die im Rahmen der Analyse des Butanol-Metabolismus durchgeführten 2D-DIGE Experimente.

Stamm	pH	Behandlung	Spots <sup>a</sup>	Protein Spots <sup>b</sup>	Reg. Spots <sup>c</sup>	Analysierte Spots <sup>d</sup>	Ident. Spots
KT2440	4-7	Glucose vs. 0,5 g/l BuOH	1877	1492	48	22	22
KT2440	4-7	Glucose vs. 3 g/l BuOH	3680	1677	137	37	37
KT2440	4-7	0,5 g/l vs. 3 g/l BuOH	2603	1740	79	20	18

<sup>a</sup> Anzahl der insgesamt detektierten Spots.

<sup>b</sup> Anzahl der Spots, welche in die Auswertung einbezogen wurden (Spikes und Artefakte wurden zuvor entfernt).

<sup>c</sup> Anzahl der Spots, welche nach statistischen Kriterien reguliert waren.

<sup>d</sup> Anzahl der Spots, welche nach manueller Validierung ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert wurden.

Wie bei allen in dieser Arbeit beschriebenen 2D-DIGE-Experimenten wurden als Kriterien für die Regulation eines „Spots“ eine Änderung der Fluoreszenzintensität (bzw. des Spotvolumens) um einen Faktor von 1,8 (bzw. 0,6) und ein p-Wert  $< 0,05$  vor-

ausgesetzt. Grundlage für die eindeutige massenspektrometrische Identifizierung eines Proteins in einem Spot war das Vorhandensein von mindestens zwei Peptiden, einer Peptid-Wahrscheinlichkeit von 80% und einer Protein-Wahrscheinlichkeit von 99% (s. Abschnitt 4.5.4). Eine Übersicht über die in den einzelnen Analysen erfassten, regulierten und identifizierten Spots gibt Tabelle 5.5.

Um einen Überblick über die in den verschiedenen Experimenten regulierten Proteine zu geben, wurden möglicherweise am Butanol-Metabolismus beteiligte Enzyme sowie deren Regulation unter 0,5 g/l bzw. 3 g/l Butanol in Tabelle 5.6 zusammengefasst. Da die aus dem Vergleich zwischen 0,5 g/l und 3 g/l erhaltenen Daten keine zusätzliche Information liefern, werden diese Ergebnisse in Tabelle 5.6 nicht berücksichtigt.

**Tabelle 5.6:** Regulation möglicherweise, am Butanol-Metabolismus beteiligter Proteine nach Behandlung der Zellen mit 0,5 g/l bzw. 3 g/l Butanol.

Wurde ein Protein in mehreren Spots detektiert, ist in der Tabelle der Regulationsfaktor des am stärksten regulierten Spots angegeben. Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie um einen Faktor von 1,8 bzw. 0,6 reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen. Ein Regulationsfaktor  $> 1$  steht für eine Induktion des Proteins nach Butanol-Behandlung.

Locus-Tag	Gen	Protein	0,5 g/l	3 g/l	Reg. In
PP_2136	<i>fadB</i>	Multifunctional Fatty Acid Oxidation Complex	-	3,5	BuOH
PP_2662		Hypothetical Protein	4,5	-	BuOH
PP_2665	<i>agmR</i>	PedR1	2,7	-	BuOH
PP_2674	<i>qedH</i>	Quinoprotein Ethanol Dehydrogenase (PedE)	6,4	-	BuOH
PP_2680		Aldehyde Dehydrogenase (PedI)	4,3	2,5	BuOH
PP_3553		Acyl-CoA Synthetase	9,2	8,5	BuOH
PP_3554		Acyl-CoA Dehydrogenase	2,5	2,3	BuOH
PP_3754		Beta-Ketothiolase	6,7	3,9	BuOH
PP_3755	<i>paaH</i>	3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase	7,6	4,6	BuOH
PP_4116	<i>aceA</i>	Isocitrate-Lyase	3,9	1,9	BuOH
PP_4201		Electron Transfer Flavoprotein	1,8	2	BuOH
PP_4203		Electron-Transferring-Flavoprotein Dehydrogenase	2,5	3	BuOH
PP_4487	<i>acsA</i>	Acetyl-CoA Synthetase	3,5	2,4	BuOH
PP_5278		Aldehyde Dehydrogenase	-	1,9	BuOH

- : Das Protein war nach den angelegten Kriterien (Regulation  $> 1,8$ , bzw.  $< 0,6$ ; p-Wert  $< 0,05$ ) nicht reguliert.

*Reg. In:* Zustand in welchem das Protein induziert war.

*0,5 g/l:* Regulationsfaktor „Glucose vs. 0,5 g/l Butanol“.

*3 g/l:* Regulationsfaktor „Glucose vs. 3 g/l Butanol“.

### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit 0,5 g/l Butanol

Wie Tabelle 5.5 zeigt, konnte in allen 22 in diesem Experiment analysierten Spots mindestens ein Protein identifiziert werden. Alle regulierten Spots waren dabei nach Butanol-Zugabe induziert. Auffällig war, dass ähnlich dem Abbau von Ethylenglycol, eine starke Induktion der Alkohol-Dehydrogenase PedE (6,4-fach), der Aldehyd-Dehydrogenase PedI (4,3-fach), der Acetyl-CoA Synthetase AcsA (3,5-fach) sowie des Regulators PedR1 (2,7-fach) nach Butanol-Gabe zu beobachten war. Die Induktion der Alkoholdehydrogenase PedE und die Induktion des PedR1-Regulons stimmen mit den Beobachtungen von Vrionis *et al.* (2002) in *P. putida* ATCC 11172 überein. Diese stellten fest, dass die PQQ-abhängige Alkohol-Dehydrogenase, welche zu PedE homolog ist, in *P. putida* ATCC 11172 durch Alkohole unterschiedlicher Kettenlänge induziert werden kann.

Darüber hinaus waren das hypothetische Porin PP\_2662 (4,5-fach) sowie die Isocitrat-Lyase (AceA) (3,9-fach) in Butanol behandelten Zellen induziert. Neben der Acetyl-CoA-Synthetase (AcsA) war auch die Acyl-CoA-Synthetase (PP\_3553) nach Butanol-Behandlung deutlich nach oben reguliert. Beide Enzyme könnten das durch Oxidation aus Butanol entstandene Butyrat in Butyryl-CoA umwandeln und in den Prozess der  $\beta$ -Oxidation einschleusen. Die Hypothese eines über die  $\beta$ -Oxidation verlaufenden Butanol-Katabolismus wird durch die Induktion mehrerer an diesem Prozess beteiligter Enzyme unterstützt. So wurde das der Acyl-CoA Synthetase auf dem Genom benachbarte Protein (PP\_3554), welches für eine Acyl-Co-Dehydrogenase kodiert, ebenfalls induziert. Auch die an den folgenden Schritten der  $\beta$ -Oxidation beteiligten Enzyme 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (PP\_3755) und  $\beta$ -Ketothiolase (PP\_3754) waren nach Butanol-Zugabe nach oben reguliert.

Die beiden unter Butanol induzierten Proteine „Electron Transfer Flavoprotein“ (PP\_4201) und „Electron-Transferring-Flavoprotein Dehydrogenase“ (PP\_4203) könnten als Elektronenakzeptoren für an der Oxidation von Butanol beteiligte Dehydrogenasen fungieren. Eine Induktion von Stressproteinen konnte bei dieser Butanolkonzentration nicht festgestellt werden.

### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit 3 g/l Butanol

Die Zugabe von 3 g/l Butanol führte zu einer differentiellen Regulation von insgesamt 37 Spots, wovon 35 nach Zugabe von Butanol induziert waren. Neun der bereits unter 0,5 g/l Butanol induzierten Proteine waren auch nach Gabe von 3 g/l Butanol induziert. Wider erwarten zeigten die Alkohol-Dehydrogenase PedE und der Regulator PedR1 jedoch keine Regulation im Vergleich zur Glucose-Kontrolle. Derjenige Spot, welcher im

vorherigen Experiment (0,5 g/l Butanol) PedR1 enthielt, war auch in diesem Experiment reguliert (Spot: 3087). PedR1 wurde darin jedoch nur mit einem Peptid identifiziert und erfüllte somit nicht die vorgegebenen Kriterien für eine Identifizierung. Anstelle von PedR1 wurde in diesem Spot PP\_3547 identifiziert. Spots, welche im vorherigen Experiment PedE enthielten, waren in diesem Experiment nicht reguliert. Wie Tabelle 5.6 zeigt, korreliert die Erhöhung der Butanolkonzentration nicht mit der verstärkten Induktion der am Butanol-Katabolismus beteiligten Enzyme. Vielmehr ist unter der höheren Butanolkonzentration eine weniger starke Induktion der entsprechenden Enzyme zu beobachten. Zusätzlich zur 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (PP\_3755) zeigte sich unter 3 g/l Butanol eine Induktion von FadB, welches die gleiche Reaktion katalysiert. Neben PedI wurde eine weitere Aldehyd-Dehydrogenase (PP\_5278), die in keinem der bisherigen Experimente gefunden worden war, identifiziert.

Auffallend ist auch die Induktion verschiedener mit Stress assoziierter Proteine. Neben dem Universal Stress Protein (PP\_2132), sind auch zwei am Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beteiligte Enzyme (PP\_0115, PP\_2439) sowie die Chaperone (PP\_3095, PP\_4179) unter Butanol deutlich induziert. Auch die beiden Citratzyklus-Enzyme Fumarate-Hydratase (PP\_1755) und Succinyl-CoA-Synthetase (PP\_4186) wurden nach Butanol-Gabe verstärkt exprimiert.

### **Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit 0,5 g/l bzw. 3 g/l Butanol**

Der direkte Vergleich der beiden mit Butanol behandelten Proben zeigte insgesamt 20 regulierte Spots, wovon 18 in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden konnten. Zehn dieser Spots wiesen in mit 3 g/l Butanol behandelten Zellen ein größeres Spotvolumen auf, als in Zellen, welche mit 0,5 g/l Butanol behandelt worden waren. Darunter FadB (PP\_2136) und die beiden Stressproteine PP\_3668 und KatE. Zudem waren die hypothetischen Proteine PP\_3088 und PP\_3099, welche Homologien zu Typ VI-Sekretionssystemen aufweisen, bei einer Butanolkonzentration von 3 g/l stärker exprimiert.

Die Enzyme Isocitrat-Lyase (AceA), Aldehyd Dehydrogenase (PedI), Alkohol-Dehydrogenase (PedE) und 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (PP\_3755) waren jedoch in mit 3 g/l Butanol behandelten Zellen schwächer induziert als in Zellen, welche mit 0,5 g/l Butanol behandelt worden waren. Generell bestätigte dieser direkte Vergleich der beiden Butanolkonzentrationen die bereits aus den Vergleichen mit Glucose gewonnenen Erkenntnisse.

### 5.2.1.2 Analyse des Membranproteoms

Die in jedem der drei Butanol-Experimente vor der 2D-DIGE-Analyse durch Ultrazentrifugation abgetrennte Membranfraktion wurde mittels labelfreier massenspektrometrischer Quantifizierung untersucht. Das verwendete Verfahren sowie die zugrundegelegten Analyse Kriterien waren mit denen der Ethylenglycol-Experimente identisch. Tabelle 5.7 gibt einen Überblick über die Eckdaten der Analyse.

**Tabelle 5.7:** Übersicht über die im Rahmen der Analyse des Butanol-Metabolismus durchgeführten Membranproteom-Analysen.

Stamm	Behandlung	Features	Features (nach Filter)	MS/MS	Ident. Proteine	Reg. Proteine
KT2440	0,5 g/l BuOH	55079	30397	7682	286	8
KT2440	3 g/l BuOH	46676	24556	7520	238	43
KT2440	0,5 vs 3 g/l BuOH	57080	31208	7874	274	54

*Features:* Anzahl der insgesamt detektierten Features (Peptide).

*(nach Filter):* Features, welche nach dem Filtern mit den in Kapitel 4 angegebenen Parametern in der Analyse verblieben (Ladungszustand +2,+3,+4, MW 200 - 1800 Da).

*MS/MS:* Zahl aufgenommener MS/MS-Spektren.

Die Zusammensetzung der Membranfraktion in Hinblick auf die Lokalisation der identifizierten Proteine ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

Die in den folgenden Abschnitten besprochenen Proteine sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst. Da die aus dem Vergleich zwischen 0,5 g/l und 3 g/l erhaltenen Daten keine zusätzliche Information liefern, werden diese Ergebnisse in Tabelle 5.8 nicht berücksichtigt.

**Tabelle 5.8:** Regulation möglicher, am Butanol-Metabolismus beteiligter Proteine nach Behandlung der Zellen mit 0,5 g/l bzw. 3 g/l Butanol.

Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie um einen Faktor von 2 reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen. Die Spalte „Reg. In“ gibt an, in welchem der jeweils untersuchten Zustände das entsprechende Protein induziert war.

Locus-Tag	Gen	Protein	0,5 g/l	3 g/l	Reg. In
PP_0288		major facilitator superfamily MFS_1	3,2	NID	BuOH
PP_0584		methyl-accepting chemotaxis transducer	NR	3,9	Glu
PP_1016		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	NR	2,3	Glu

Locus-Tag	Gen	Protein	0,5 g/l	3 g/l	Reg. In
PP_1017		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	NR	2,4	Glu
PP_1019	<i>oprB-1</i>	porin B	NR	2,2	Glu
PP_1206	<i>oprD</i>	outer membrane porin	NR	2,5	Glu
PP_1371		methyl-accepting chemotaxis transducer	NR	4,0	Glu
PP_1383		BenF-like porin	NR	4,2	Glu
PP_1743	<i>actP</i>	acetate permease	4,5	NR	BuOH
PP_2310		methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	NR	5,3	Glu
PP_2674	<i>PedE</i>	quinoprotein ethanol dehydrogenase	15,2	NID	BuOH
PP_2680		aldehyde dehydrogenase family protein	11,6	NR	BuOH
PP_3099		hypothetical protein	NR	16,2	BuOH
PP_3100		hypothetical protein	NID	16,5	BuOH
PP_3417	<i>gntP</i>	gluconate transporter	NR	2,1	Glu
PP_3754		beta-ketothiolase	150,9	NID	BuOH
PP_3784		hypothetical protein	NR	3,3	Glu
PP_4116	<i>aceA</i>	isocitrate lyase	9,2	NID	BuOH
PP_4487	<i>acsA</i>	acetyl-CoA synthetase	5,4	NR	BuOH
PP_5020		methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	NR	5,2	Glu

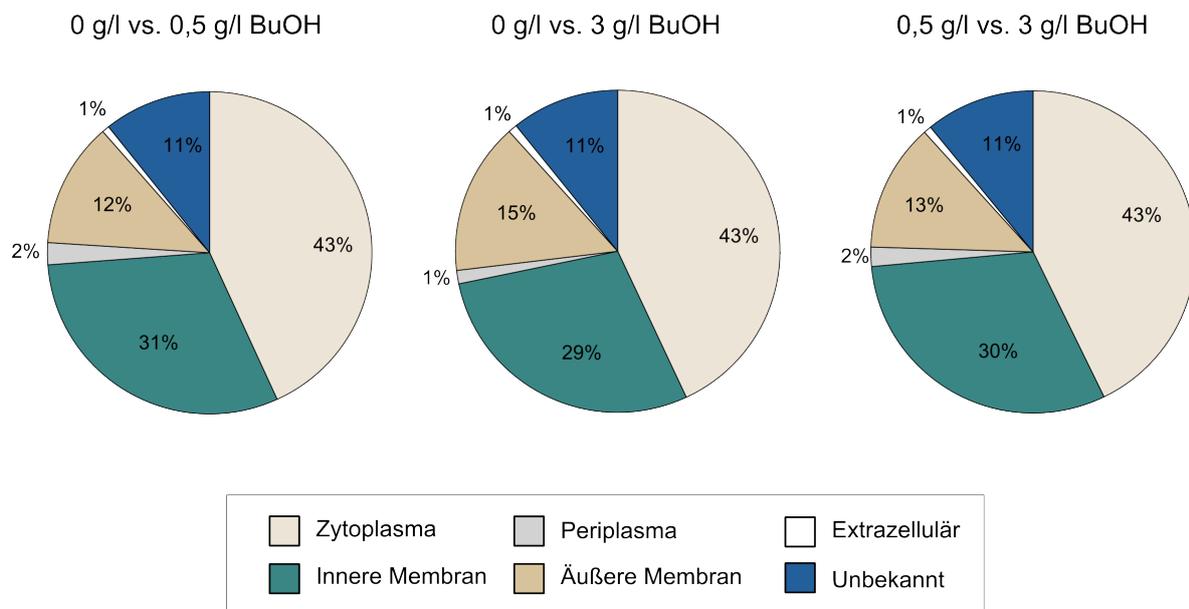
*NR*: nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand in welchem das Protein induziert war.

*0,5 g/l*: Regulationsfaktor „Glucose vs. 0,5 g/l Butanol“.

*3 g/l*: Regulationsfaktor „Glucose vs. 3 g/l Butanol“.



**Abbildung 5.9:** Prozentuale Verteilung der während der Analyse der Membranfraktion in den verschiedenen durchgeführten Vergleichen identifizierten Proteine auf die unterschiedlichen subzellulären Kompartimente.

### Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit 0,5 g/l Butanol

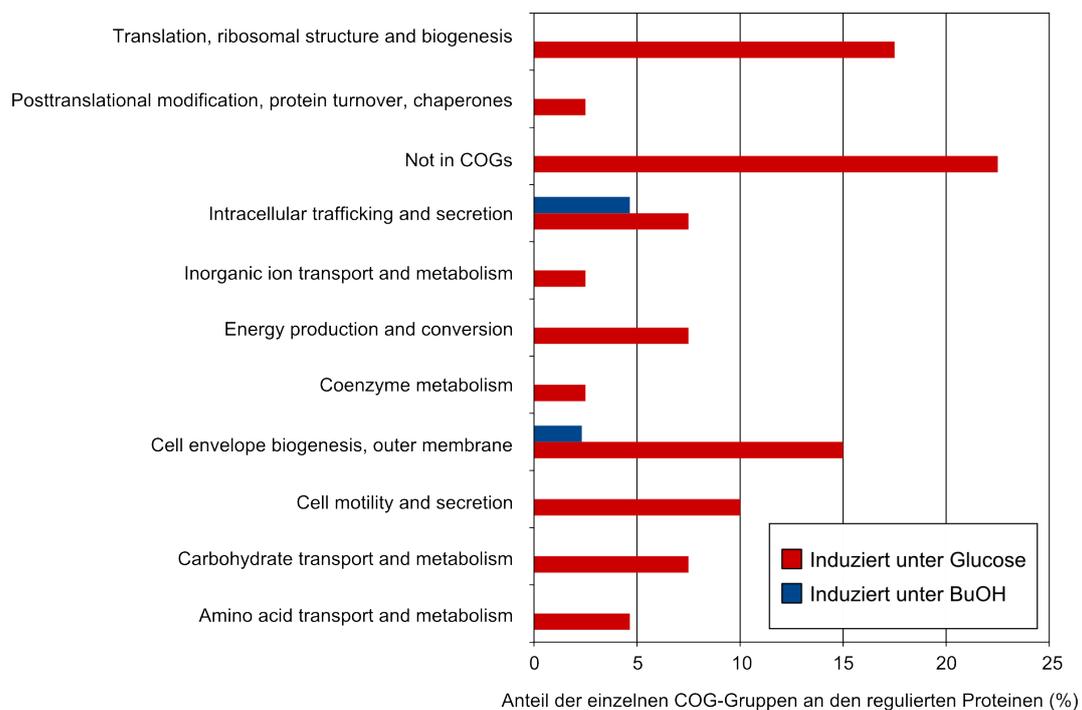
In diesem Experiment konnten insgesamt 286 Proteine identifiziert werden. Wie Tabelle 5.7 zeigt, ist die Zahl differentiell regulierter Proteine (acht Proteine) im Vergleich zu den übrigen Membranproteom-Experimenten ausgesprochen gering. Da jedoch keine technischen Auffälligkeiten in diesem Experiment auftraten und auch in der korrespondierenden 2D-DIGE-Analyse eine recht geringe Zahl regulierter Proteine gefunden wurde, ist von einem biologischen und nicht von einem technischen Effekt auszugehen. Fünf der acht regulierten Proteine (PedI, PedE, AceA, AcsA, PP\_3754) konnten in der 2D-DIGE-Analyse ebenfalls induziert werden.

Interessant ist die Induktion der beiden, in der inneren Membran verorteten, Transporter „Acetat-Permease“ (ActP) und „MFS-1“ (PP\_0288). Da ein zu ActP homologer Transporter in *E. coli* neben Acetat auch in einem geringeren Umfang Butyrat transportiert, könnte ActP auch in *P. putida* beim Transport dieses Metaboliten aus dem Periplasma in das Zytoplasma eine Rolle spielen (Gimenez *et al.*, 2003). Zudem wurde er bereits in den mit Ethylenglycol durchgeführten Experimenten identifiziert. MFS-1 weist Homologien zu Oxalat/Formiat-Antiportern auf und könnte daher auch in *P. putida* KT2440 am Transport von Oxalat beteiligt sein. Die Überoxidation von Glyoxylat zu Oxalat wurde bereits in mit Ethylenglycol behandelten *P. putida* KT2440 Zellen beschrieben (Mückschel *et al.*, 2012). Als weiteres induziertes Enzym wurde das At-

mungskettenenzym Cytochrom-c-Oxidase (Untereinheit 1) identifiziert. Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) katalysiert die Oxidation von Cytochrom C und könnte so über CytochromC<sub>550</sub> (PedF) an der Oxidation von Butanol durch PedE beteiligt sein.

### Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit 3 g/l Butanol

In diesem Experiment konnten insgesamt 238 Proteine identifiziert werden, wovon 43 reguliert waren. Im Gegensatz zu der entsprechenden 2D-DIGE Analyse, in welcher 35 von 37 regulierten Spots nach Butanol-Zugabe induziert waren, waren in der Membranfraktion lediglich drei Proteine nach Butanol-Zugabe induziert. Die übrigen 40 regulierten Proteine wurden unter Butanol vermindert exprimiert. Bei zwei der induzierten Proteine handelte es sich um die beiden hypothetischen Proteine PP\_3099 und PP\_3100, welche vermutlich Teile eines Typ VI-Sekretionssystems sind. PP\_1502 stellt ein Porin der OmpA/MotB Familie dar, welches ebenfalls zu einem Typ VI-Sekretionssystem gehören könnte.



**Abbildung 5.10:** Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie.

Die einzelnen Balken spiegeln den Anteil der entsprechenden Kategorie an den insgesamt regulierten Proteinen wider. Die Kategorie „Not in COGs“ enthält Proteine für die in der Datenbank keine COG-Informationen vorhanden waren. Kategorien, denen keine Proteine zugeordnet wurden, sind in diesem Diagramm nicht dargestellt.

Um einen besseren Überblick über die regulierten Proteine zu bekommen, wurden sie anhand ihrer Funktion (COG-Datenbank) gruppiert (Abbildung 5.10).

Die meisten der unter Glucose induzierten Proteine entfielen auf die Kategorien „Proteinbiosynthese“ und „Cell Envelope Biogenesis“. Eine deutlich verstärkte Expression zeigte dabei das für die Glucose-Aufnahme verantwortliche Porin OprB-1. Auch einige Transporter der inneren Membran wie die an der Glucoseaufnahme beteiligten Proteine (PP\_1016 und PP\_1017) sowie der Gluconattransporter GntP (PP\_3417) wurden unter Glucose verstärkt exprimiert. Die nach Butanol-Zugabe schwächere Expression einiger am Transport extrazellulärer Proteine beteiligter Enzyme wie die Preprotein Translocase (SecF) und die Signal Peptidase I „LepB“ lässt sich durch die in diesem Zustand reduzierte Proteinexpression erklären. Auffällig ist auch die Regulation vierer verschiedener „Methyl-Accepting Chemotaxis Transducer“, welche über das Genom verteilt liegen (PP\_0584, PP\_1371, PP\_5020, PP\_2310) und ebenfalls unter Butanol vermindert exprimiert wurden. Die genaue Funktion der einzelnen Proteine ist jedoch nicht bekannt.

Wie bereits in der 2D-DIGE-Analyse waren die Proteine OprD und PP\_3784 auch in der Membranfraktion in Gegenwart von Butanol nach unten reguliert. OprD ist vor allem im Zusammenhang mit Antibiotika-Resistenzen (Carbapeneme) bekannt, spielt aber auch beim Aminosäuretransport eine Rolle (Hancock *et al.*, 2002). Zudem war das an der Aufnahme von Aromaten beteiligte Porin PP\_1383 unter Glucose induziert.

### **Differenzielle Regulation von Membranproteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 nach Behandlung mit 0,5 g/l bzw. 3 g/l Butanol**

Im Vergleich zwischen den mit 0,5 g/l und den mit 3 g/l Butanol behandelten Proben waren 54 Proteine reguliert. Hiervon zeigten lediglich fünf eine verstärkte Expression bei höherer Butanolkonzentration. Drei dieser Proteine (PP\_1502, PP\_3099, PP\_3100) waren bereits im Vergleich zwischen „Glucose und 3 g/l Butanol“ induziert. Zusätzlich wiesen der Transporter Acetat Permease (ActP) sowie das hypothetische Protein PP\_1503 unter 3 g/l Butanol eine im Vergleich zu 0,5 g/l Butanol verstärkte Expression auf. Im Vergleich zwischen Kontrolle und 3 g/l wurde ActP aufgrund seines p-Wertes (0,054) nicht als reguliert eingestuft.

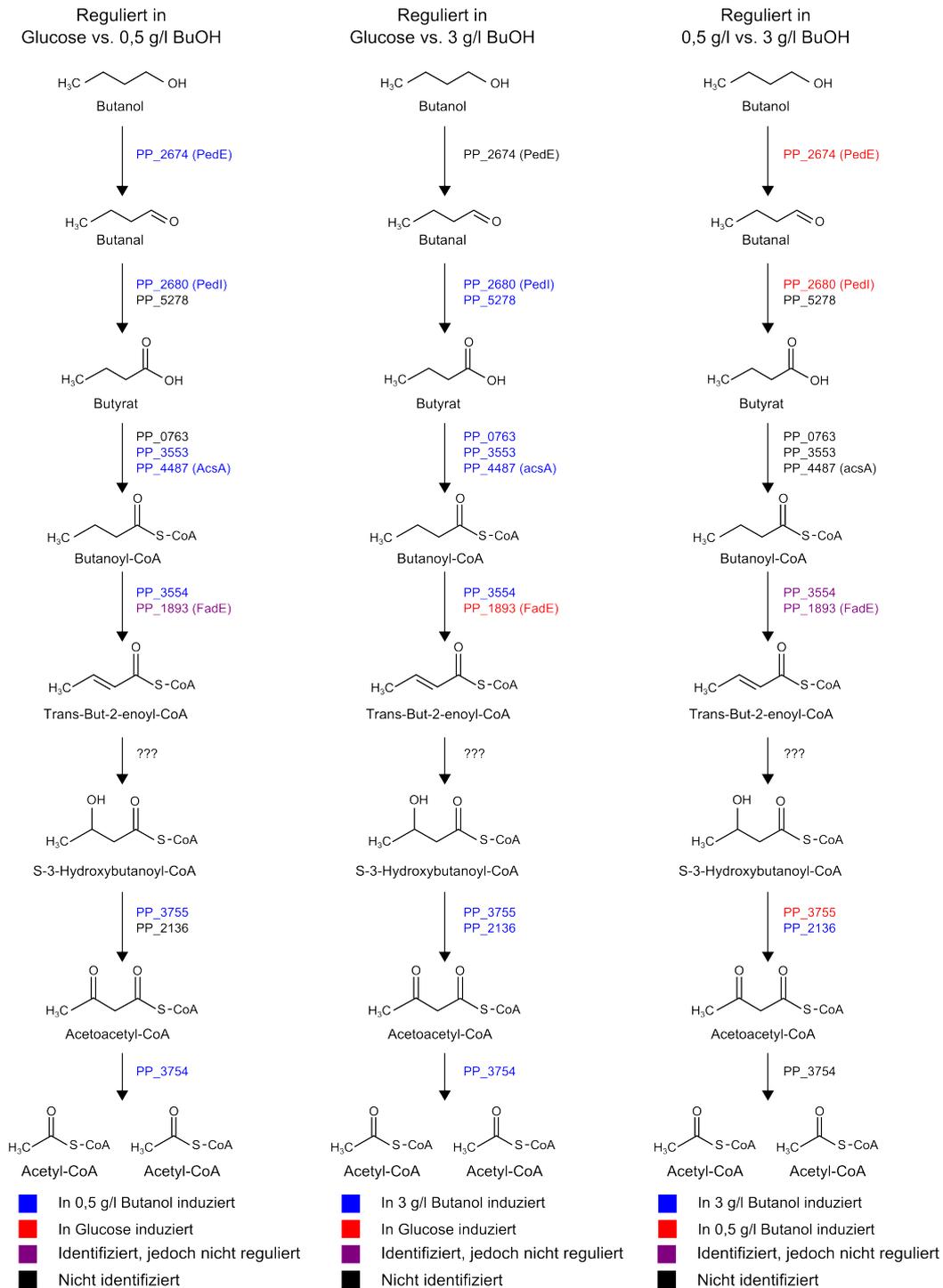
Alle übrigen regulierten Proteine zeigten im direkten Vergleich bei höheren Butanolkonzentrationen eine geringere Expression. Die schwächere Expression der Isocitrat-Lyase (AceA), der Alkohol-Dehydrogenase (PedE) und der Aldehyd-Dehydrogenase (PedI) in der Analyse der Membranfraktion korrelierte mit den Daten des entsprechenden 2D-DIGE-Experiments (5.2.1.1). Auffällig ist zudem die in 3 g/l verminderte Expression der Proteine PP\_3781, PP\_3783, PP\_3784, PP\_3785, PP\_3788, welche in einem Operon organisiert sind. Die Funktion der einzelnen Proteine des Operons ist jedoch

nicht bekannt. Auch in diesem Vergleich zeigten die bereits oben erwähnten Proteine aus der Gruppe der „Methyl-Accepting Chemotaxis Transducer“ eine in der höheren Butanolkonzentration geringere Expression.

### 5.2.1.3 Abbauwege und Toleranzmechanismen

Aufgrund der durch die 2D-DIGE-Experimente und die Analyse des Membranproteoms gewonnenen Daten lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen mit 0,5 g/l und mit 3 g/l behandelten Zellen erkennen. Während unter 0,5 g/l Butanol eine Induktion der Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen PedE und PedI zu erkennen war, tritt diese in mit 3 g/l Butanol behandelten Zellen entweder gar nicht (PedE) oder nur in einem geringeren Maße (PedI) auf (Abbildung 5.11).

Eine Induktion verschiedener Enzyme der  $\beta$ -Oxidation ist sowohl unter 0,5 g/l als auch unter 3 g/l in einer ähnlichen Intensität zu erkennen. Höhere Butanolkonzentrationen scheinen also nicht zu einer weiteren Induktion Butanol abbauender Enzyme zu führen, sondern andere Resistenzmechanismen zu aktivieren. So kommt es unter 3 g/l Butanol zu einer verstärkten Expression von Stressproteinen, welche unter 0,5 g/l Butanol nicht beobachtet wurde. Zudem könnte die Expression der Proteine PP\_3099, PP\_3100 und PP\_1502 auf eine Induktion von Typ IV-Sekretionssystemen und damit auf einen verstärkten Export von Butanol hinweisen. Auch die Induktion von PP\_3089 (Typ VI-Sekretion) und die verminderte Expression von OprD (PP\_1206) könnten auf eine Abschottung der Zelle hindeuten.



**Abbildung 5.11:** Postulierter Abbauweg für Butanol in *P. putida* KT2440.

Die Abbildung wurde auf Basis der Daten aus den 2D-DIGE- und den Membranproteom-Experimenten erstellt. Da im Rahmen der Membranproteom-Analyse auch nicht regulierte Proteine identifiziert wurden, sind diese in der Abbildung in einer eigenen Farbe (lila) dargestellt. Für die Katalyse der Reaktion „Trans-But-2-enoyl-CoA“ zu „S-3-Hydroxybutanoyl-CoA“ konnten keine passenden Enzyme identifiziert werden.

## 5.2.2 Transkriptom- und Proteomanalyse im Vergleich

Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Proteomdaten wurden für die im vorherigen Abschnitt besprochenen Vergleiche „Glucose vs. 0,5 g/l Butanol“ und „Glucose vs. 3 g/l Butanol“ auch Transkriptomdaten erhoben. Diese Arbeiten wurden von *Björn Mückschel* (AG Hauer, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) durchgeführt und werden daher an dieser Stelle nur kurz zu den Proteomdaten in Bezug gesetzt. Das VENN-Diagramm in Abbildung 5.12 zeigt einen Vergleich der in den beiden Experimenten differentiell regulierten Transkripte und Proteine.

In beiden analysierten Vergleichen waren lediglich zehn Proteine sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene reguliert (Tabelle 5.9, Tabelle 5.10). Diese in beiden Analysen differentiell regulierten Proteine konnten größtenteils dem für Butanol postulierten Abbauweg zugeordnet werden.

**Tabelle 5.9:** Proteine welche im Vergleich zwischen Glucose und 0,5 g/l Butanol sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene differentiell reguliert waren.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg.- Trans.	Reg.- Prot.
PP_2673		Pentapeptide Repeat-Containing Protein	5,8	3,7
PP_2674	<i>qedH</i>	Quinoprotein Ethanol-Dehydrogenase	6,5	6,4
PP_2680		Aldehyd Dehydrogenase	6,6	4,3
PP_3553		Acyl-CoA Synthetase	3,4	9,2
PP_3754		Beta-Ketothiolase	4,4	6,7
PP_3755	<i>paaH</i>	3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase	5	7,6
PP_4116	<i>aceA</i>	Isocitrate Lyase	4,2	3,9
PP_4201		Electron Transfer Flavoprotein	1,9	1,8
PP_4203		Electron-Transferring-Flavoprotein Dehydrogenase	2,3	2,5
PP_4487	<i>acsA</i>	Acetyl-CoA Synthetase	2,5	3,2

*Reg.-Trans.:* Regulation auf Transkriptomebene. Transkripte wurden als reguliert betrachtet, wenn sie eine Regulation von  $\pm 2,5$  und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen.

*Reg.-Prot.:* Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie um einen Faktor von mehr als 1,8 (bzw. weniger als 0,6) reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen.

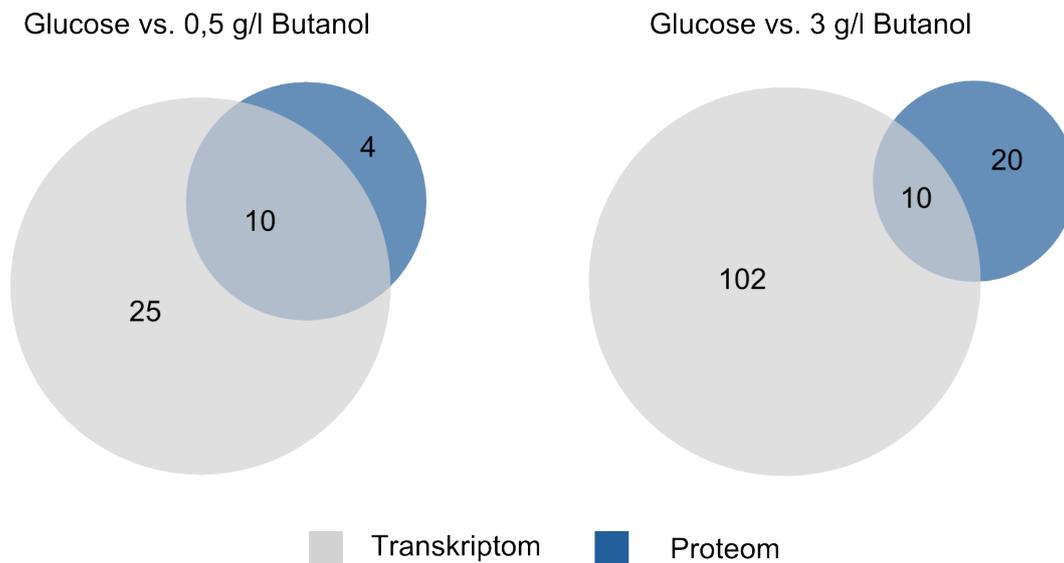
**Tabelle 5.10:** Proteine welche im Vergleich zwischen Glucose und 3 g/l Butanol sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene differentiell reguliert waren.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg.- Trans.	Reg.- Prot.
PP_1206	<i>oprD</i>	Outer Membrane Porin	-1,7	0,5
PP_2680		Aldehyd-Dehydrogenase	4	2,5
PP_3241		Hypothetical Protein	4	5,7
PP_3553		Acyl-CoA Synthetase	3,7	8,5
PP_3554		Acyl-CoA Dehydrogenase	2,4	2,3
PP_3754		Beta-Ketothiolase	2,8	3,9
PP_3755	<i>paaH</i>	3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase	3,1	4,6
PP_3783		Hypothetical Protein	-2	0,5
PP_4201		Electron Transfer Flavoprotein	1,9	2
PP_4203		Electron-Transferring-Flavoprotein Dehydrogenase	2,1	3

*Reg.-Trans.:* Regulation auf Transkriptomenebene. Transkripte wurden als reguliert betrachtet, wenn sie eine Regulation von  $\pm 2,5$  und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen.

*Reg.-Prot.:* Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie um einen Faktor von mehr als 1,8 (bzw. weniger als 0,6) reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen.

Eine geringe Schnittmenge zwischen Transkriptom- und Proteomdaten wurde bereits in anderen Studien beobachtet (Picard *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010) und ist vermutlich auf mehrere Ursachen zurückzuführen. So könnten die im Vergleich zu Proteinen geringere Halbwertszeit der mRNA sowie die variable Stabilität unterschiedlicher mRNAs für die Unterschiede verantwortlich sein. Zudem könnten Modifikationen sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene die jeweiligen „Regulationen“ beeinflussen. Nicht zuletzt trägt sicherlich auch die für die Proteomanalyse verwendete Methode (2D-DIGE), welche sowohl in Bezug auf die analysierten Proteine (zytosolische Fraktion) als auch in Bezug auf den analysierten pH-Bereich (pH 4-7) limitiert ist, zu den Unterschieden bei. Um einen besseren Vergleich zwischen Transkriptom- und Proteomdaten zu ermöglichen, wäre die Durchführung eines 1D-Gel-Fraktionierung-Experimentes sinnvoll, da über dieses Experiment ein weitaus größerer Teil des Proteoms als bei der hier eingesetzten Methode abgebildet werden kann (s. Abschnitt 6.4).



**Abbildung 5.12:** VENN-Diagramm zum Vergleich der Transkriptom- und Proteomanalyse. Die jeweiligen Kreise geben die Anzahl der regulierten Transkripte/Proteine in den beiden untersuchten Vergleichen wieder. Für die Proteomdaten wurden die aus den 2-D-DIGE-Experimenten erhaltenen Ergebnisse verwendet. Proteine, welche in mehr als einem regulierten Spot detektiert wurden, wurden nur einfach in die Ergebnisliste aufgenommen. Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie um einen Faktor von mehr als 1,8 (bzw. weniger als 0,6) reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen. Transkripte wurden als reguliert betrachtet, wenn sie eine Regulation von  $\pm 2,5$  und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen.

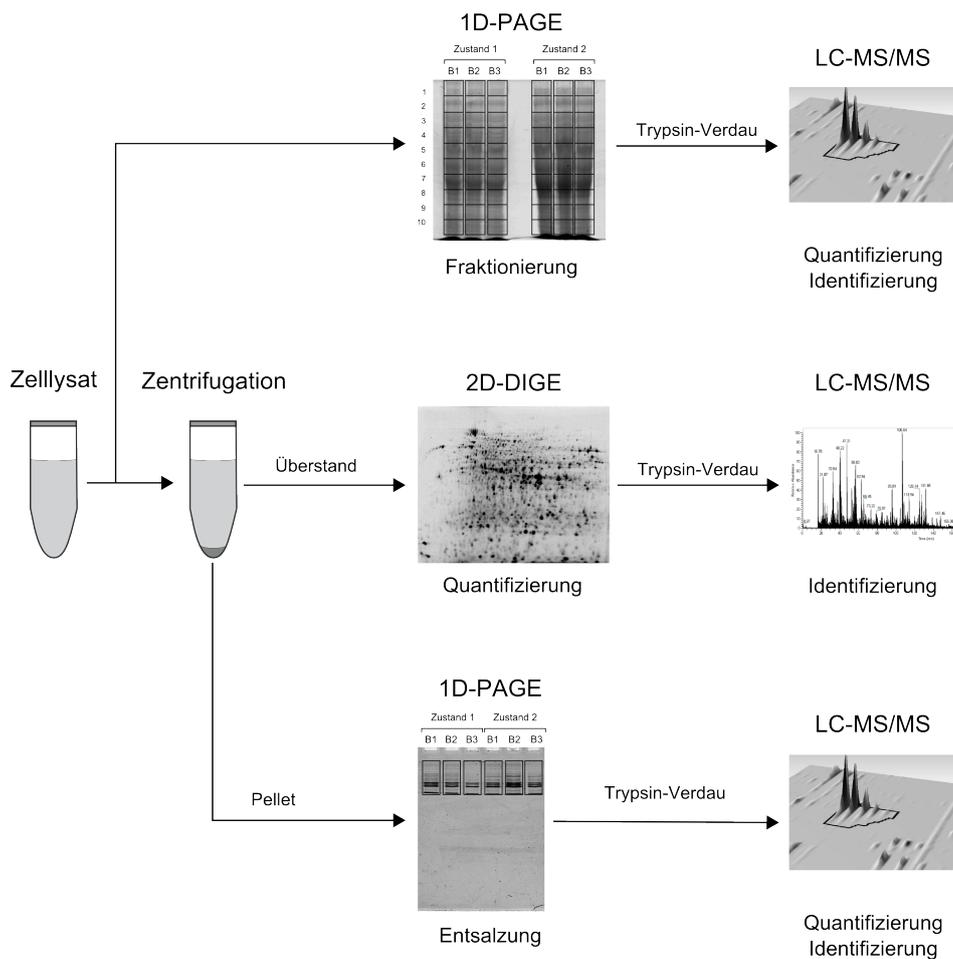
### 5.2.3 Proteomanalyse der aus dem Bioreaktor erhaltenen Proben

Die hier beschriebene Kultivierung sowie die Analyse der Transkriptomproben wurden von *Tobias Vallon* (AG Takors, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart) durchgeführt. Die Kultivierung von *P. putida* KT2440 erfolgte in einem 3,7 l Chemostat-Bioreaktor in M12-BVT Medium. Für die Proteomanalyse wurden nach Erreichen dreier definierter Steady-State Zustände jeweils Proben entnommen. Die erste Probenentnahme erfolgte nach 50 h (5 Verweilzeiten) und wird als Steady-State I (10 g/l Glucose,  $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ ) bezeichnet. Nach einem Wechsel des Feedmediums (10 g/l Glucose, 0,75 g/l Butanol,  $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ ) und Erreichen eines zweiten Steady-State Zustandes (50 h, 5 Verweilzeiten) erfolgte eine weitere Probenentnahme. Anschließend wurde das Feedmedium erneut gewechselt (10 g/l Glucose, 7,5 g/l Butanol,  $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ ) und nach Erreichen eines dritten Steady-State-Zustandes (50 h, 5 Verweilzeiten) eine weitere Probe entnommen. Da die Kultivierung der Proben unter C-Limitierung erfolgte, lag die im Reaktor gemessene Butanolkonzentration sowohl bei einer Butanolkonzentration von 0,75 g/l als auch bei einer Butanolkonzentration von 7,5 g/l im Feedmedium unter 0,5 mg/l.

Alle Proben wurden wie in Abschnitt 4.3 beschrieben behandelt und bis zur weiteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Proteomanalyse der Proben aus dem Bioreaktor wurde mit drei biologischen Replikaten jedes Steady-State Zustandes durchgeführt.

- Steady-State I: 10 g/l Glucose, 0 g/l Butanol im Feedmedium
- Steady State II: 10 g/l Glucose, 0,75 g/l Butanol im Feedmedium
- Steady State III: 10 g/l Glucose, 7,5 g/l Butanol im Feedmedium



**Abbildung 5.13:** Durchgeführte Proteomics-Experimente zum Metabolismus von Butanol (Bioreaktor).

Die Analyse der zytosolischen Fraktion und des Membran-Proteoms erfolgte wie bereits in Abbildung 5.1 beschrieben. Darüber hinaus wurde in einem weiteren Experiment eine Fraktionierung des Komplettlysats mittels 1D-SDS-PAGE durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden im Anschluss verdaut und die enthaltenen Peptide massenspektrometrisch quantifiziert und identifiziert. Die einzelnen Schritte der durchgeführten Analyse sind im Kapitel „Material und Methoden“ im Detail beschrieben.

Da nicht alle Kultivierungen über den gesamten Zeitraum stabil verliefen, wurden Steady-State Zustände aus verschiedenen Kultivierungen kombiniert. Während aus Fermenter I zu allen drei Steady-State Zuständen Proben entnommen werden konnten, war in Fermenter III und Fermenter IV eine Probenahme lediglich zu den Zeitpunkten Steady-State I und Steady-State II möglich. Die fehlende Steady-State III-Proben wurde aus den Fermentern V und VI ergänzt. Die durchgeführten Kultivierungen sowie die aus diesen Kultivierungen entnommenen und analysierten Proben sind in Tabelle 5.11 zusammengefasst.

**Tabelle 5.11:** Übersicht über die durchgeführten Kultivierungen und die entnommenen und analysierten Proben.

	Steady-State I	Steady-State II	Steady-State II
Kultivierung I	Analysiert	Analysiert	Analysiert
Kultivierung II	Probe	Keine Probe	Keine Probe
Kultivierung III	Analysiert	Analysiert	Keine Probe
Kultivierung IV	Analysiert	Analysiert	Keine Probe
Kultivierung V	Probe	Probe	Analysiert
Kultivierung VI	Keine Probe	Keine Probe	Analysiert

*Analysiert:* Proben welche im Rahmen der Proteomanalyse untersucht wurden.

*Probe:* Es wurde eine Probe entnommen. Diese wurde jedoch nicht analysiert.

*Keine Probe:* Zu diesem Zeitpunkt konnte aus technischen Gründen keine Probe entnommen werden.

Wie die ermittelten Biomassekonzentrationen zum Zeitpunkt der durchgeführten Probenahmen zeigen, waren die unterschiedlichen Kultivierungen zu diesen Zeitpunkten untereinander vergleichbar (Persönliche Kommunikation, Tobias Vallon, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart).

Im Gegensatz zu den im Schüttelkolben durchgeführten Experimenten erfolgte im Rahmen dieses Versuchs auch eine Analyse mittels 1D-Gel-Fraktionierung (GeLCMSMS). Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche gibt Abbildung 5.13.

Da aufgrund der durchgeführten GeLCMSMS-Analysen eine sehr große Anzahl an Proteinen identifiziert und quantifiziert werden konnten, werden die identifizierten Stoffwechselwege und deren Regulation in Abschnitt 5.2.3.4 für alle Analysen gemeinsam auf Basis dieser Daten besprochen. Eine Liste aller in den einzelnen Experimenten regulierter Proteine befindet sich, sortiert nach Kapitelüberschriften, im Anhang dieser Arbeit.

### 5.2.3.1 Analyse der zytosolischen Fraktion durch 2D-DIGE

Für die 2D-DIGE-Analysen der Proben aus den Fermentern wurde der interne Standard (IS), im Gegensatz zu den 2D-DIGE-Analysen der Schüttelkolben-Experimente aus allen drei untersuchten Zuständen gemischt. Somit stand dieser auch für den Vergleich von Steady-State II und Steady-State III zur Verfügung. Die bei der Auswertung angelegten Kriterien entsprachen den bereits bei der Analyse der Schüttelkolben verwendeten. Eine Übersicht über die in den einzelnen Analysen gefundenen, regulierten, ausgestochenen und identifizierten Spots gibt Tabelle 5.12.

**Tabelle 5.12:** Übersicht über die im Rahmen der Analyse des Butanol-Metabolismus durchgeführten 2D-DIGE Experimente.

Stamm	pH	Behandlung	Spots <sup>a</sup>	Protein Spots <sup>b</sup>	Reg. Spots <sup>c</sup>	Analysierte Spots <sup>d</sup>	Ident. Spots
KT2440	4-7	0,75 g/l	2550	2031	154	48	40
KT2440	4-7	7,5 g/l	2038	1930	357	78	75
KT2440	4-7	0,75 g/l vs. 7,5 g/l	2496	1829	131	37	36

<sup>a</sup> Anzahl der insgesamt detektierten Spots.

<sup>b</sup> Anzahl der Spots, welche in die Auswertung einbezogen wurden (Spikes und Artefakte wurden zuvor entfernt).

<sup>c</sup> Anzahl der Spots, welche nach statistischen Kriterien reguliert waren.

<sup>d</sup> Anzahl der Spots, welche nach manueller Validierung ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert wurden.

### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State I und Steady-State II

In 40 von 48 regulierten Spots konnte bei der massenspektrometrischen Analyse mindestens ein Protein identifiziert werden. Dabei wiesen 26 Spots eine höhere Fluoreszenzintensität in Steady-State II im Vergleich zu Steady-State I auf. 22 Spots waren entgegengesetzt reguliert. Die in Steady-State I induzierte Dehydrogenase Subunit (PP\_1661) war in insgesamt vier regulierten Spots vorhanden, was auf mehrere post-translationale Modifikationen dieses Proteins hinweisen könnte. Auch das im gleichen Operon befindliche Protein PP\_1659 konnte in zwei Spots identifiziert werden und war in diesen jeweils entgegengesetzt reguliert. Über die Funktion dieses Operons ist nichts bekannt.

Auffällig war, dass in diesem Experiment eine signifikante Zahl von Proteinen identifiziert wurde, welche nicht *P. putida* KT2440 sondern verschiedenen Arten der Gattung *Paenibacillus* zugeordnet werden konnten. Die Analyse der Gelbilder sowie die Ergeb-

nisse der GeLCMSMS-Analyse (s. Abschnitt 5.2.3.3) zeigten, dass die kontaminierten Proben aus Fermenter III und IV stammten. Es ist davon auszugehen, dass in diesen Fermentern zusätzlich zu *P. putida* KT2440 auch eine Subpopulation von *Paenibacillus* *sp.* vorhanden war. Ob diese Kontamination einen Einfluss auf die in *P. putida* KT2440 beobachtete Proteinregulation hatte, lässt sich nur schwer abschätzen.

### **Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State I und Steady-State III**

In diesem Experiment waren insgesamt 78 Spots differentiell reguliert, wovon 75 massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. 38 dieser Spots waren in Steady-State I induziert, 37 in Steady-State III. Wie im vorherigen Experiment konnten auch hier einige Proteine in mehreren Spot nachgewiesen werden. Spots, welche wahrscheinlich unterschiedlich modifizierte Formen des Proteins enthielten, bildeten deutlich sichtbare horizontale Ketten.

Auffällig in diesem Experiment war die Identifizierung der Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen (PedE, PedI) sowie der Isocitrat Lyase (PP\_4116) in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen des Gels. Dies würde für eine Degradation oder für eine gezielte Prozessierung (einen gezielten Abbau) der betroffenen Proteine in den analysierten Proben sprechen. Da die Regulation der entsprechenden Spots in allen Gelen identisch war und die Vorbereitung der Proben nach jeder Kultivierung erfolgte, ist eine Degradation der Proteine während der Probenaufarbeitung unwahrscheinlich.

### **Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State II und Steady-State III**

In diesem Vergleich konnten in 36 von 37 regulierten Spots ein oder mehrere Proteine identifiziert werden. 20 dieser Spots waren in Steady-State III nach oben, 16 nach unten reguliert. Generell konnten durch diesen Vergleich keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden.

#### **5.2.3.2 Analyse des Membranproteoms**

Die differentielle Proteomanalyse der Membranfraktionen erfolgte wie bereits für die entsprechenden Analysen im Teilprojekt Ethylenglycol beschrieben (s. Abschnitt 5.1.2). Tabelle 5.13 gibt einen Überblick über die Eckdaten der durchgeführten Analysen.

**Tabelle 5.13:** Übersicht über die im Rahmen der Analyse des Butanol-Metabolismus durchgeführten Membranproteom-Analysen.

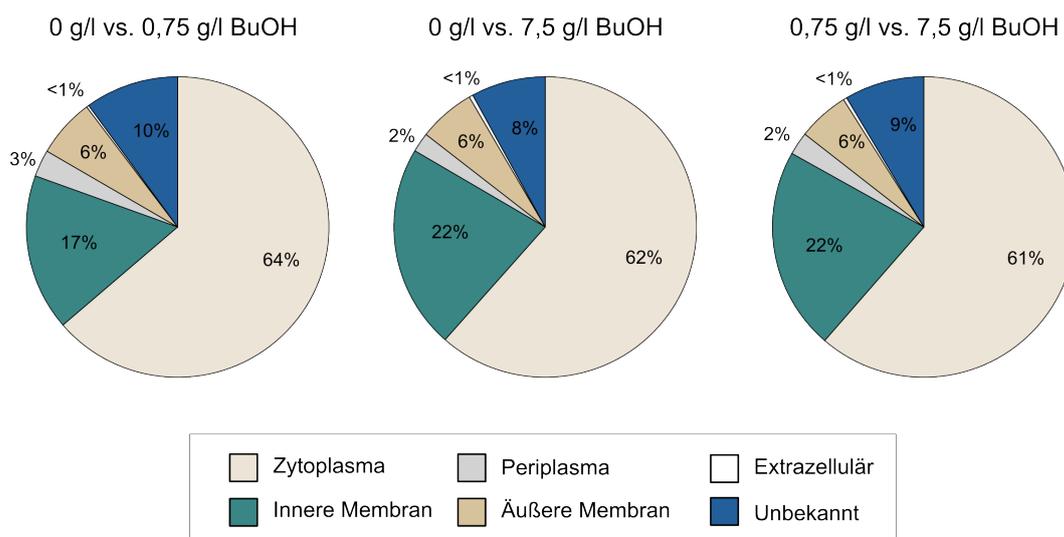
Stamm	Behandlung	Features	Features (nach Filter)	MS/MS	Ident. Proteine	Reg. Proteine
KT2440	0,75 g/l BuOH	36689	22807	10828	435	23
KT2440	7,5 g/l BuOH	45368	28009	13862	530	80
KT2440	0,75 g/l vs 7,5 g/l BuOH	45103	29097	13461	598	54

*Features:* Anzahl der insgesamt detektierten Features (Peptide).

*(nach Filter):* Features, welche nach dem Filtern mit den in Kapitel 4 angegebenen Parametern in der Analyse verblieben (Ladungszustand +2,+3,+4, MW 200 - 1800 Da).

*MS/MS:* Zahl aufgenommener MS/MS-Spektren.

Die Zusammensetzung der Membranfraktion in Hinblick auf die Lokalisation der identifizierten Proteine ist in Abbildung 5.14 dargestellt.

**Abbildung 5.14:** Prozentuale Verteilung der während der Analyse der Membranfraktion in den verschiedenen durchgeführten Vergleichen identifizierten Proteine auf die unterschiedlichen subzellulären Kompartimente.

Es fällt auf, dass im Vergleich zu den im Schüttelkolben durchgeführten Experimenten, der Anteil an zytosolischen Proteinen in den Membranfraktionen dieser Versuche deutlich erhöht war. In den einzelnen durchgeführten Vergleichen waren die Anteile weitgehend konstant. Obwohl sich das verwendete Protokoll zur Probenvorbereitung in den beiden Versuchen nicht unterschied, war die Anreicherung von Membranproteinen in den aus dem Bioreaktor gewonnenen Proben offenbar weniger erfolgreich. Das Ge-

wicht des nach der Zellernte erhaltenen Pellets, aber auch dessen Löslichkeit in dem verwendeten Lysepuffer, waren im Vergleich zu den Schüttelkolben-Experimenten deutlich geringer. Die geringe Löslichkeit könnte zu einer schlechteren Trennung der beiden Fraktionen geführt haben und somit für die „Kontamination“ der Membranfraktion mit zytosolischen Proteinen verantwortlich sein.

### **Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State I und Steady-State II**

In diesem Versuch konnten insgesamt 435 Proteine identifiziert werden, wovon 23 nach den in dieser Arbeit angelegten Kriterien (s. Tabelle 5.13) als reguliert zu betrachten sind. In Steady-State II zeigten 18 Proteine eine verstärkte Expression, fünf waren in Steady-State I induziert.

### **Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State I und Steady-State III**

Die Zahl der identifizierten Proteine war in diesem Experiment mit 530 deutlich höher als im Vergleich zwischen Steady-State I und Steady-State II. Auch waren mit 80 Proteinen wesentlich mehr Proteine als im vorherigen Versuch (Vergleich von Steady-State I und Steady State II) reguliert. 67 aller regulierten Proteine wiesen eine verstärkte Expression in Steady-State III auf, 13 waren in Steady-State I induziert.

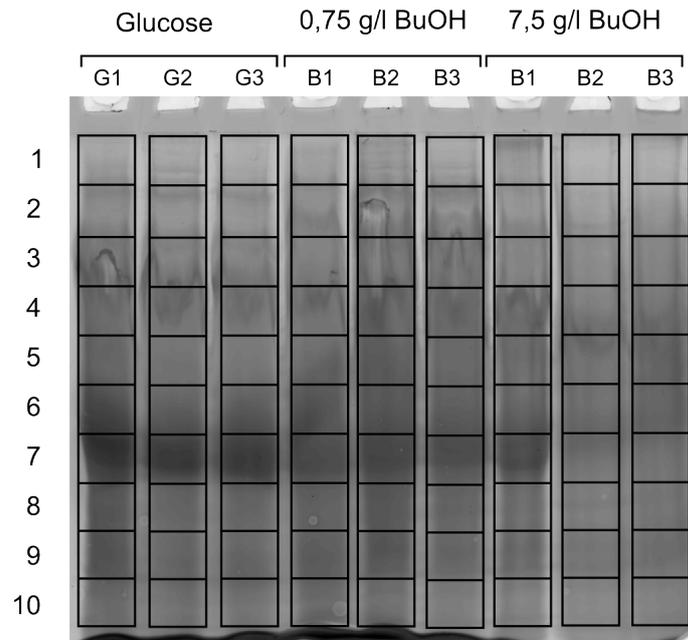
### **Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State II und Steady-State III**

Die Zahl der in diesem Experiment identifizierten Proteine betrug 598 wovon 54 zwischen den beiden Zuständen differentiell reguliert waren. 34 Proteine waren in Steady-State III, 20 in Steady-State II stärker exprimiert.

#### **5.2.3.3 1D-Fraktionierung (GeLCMSMS-Analyse)**

Bei dieser Methode erfolgte vor der eigentlichen, labelfreien Quantifizierung mittels LC-ESI-MS eine Fraktionierung des Komplettlysats über eine 1D-SDS PAGE. Hierzu wurden die Proben mit einem SDS-haltigen Puffer extrahiert, was insbesondere die Löslichkeit hydrophober (Membran-)Proteine deutlich verbessert. Eine Unterteilung des Gels in zehn Fraktionen erlaubte eine deutliche Reduktion der Komplexität der Gesamtprobe, was zu einer deutlich höheren Zahl identifizierbarer und quantifizierbarer Proteine führte (Abbildung 5.15).

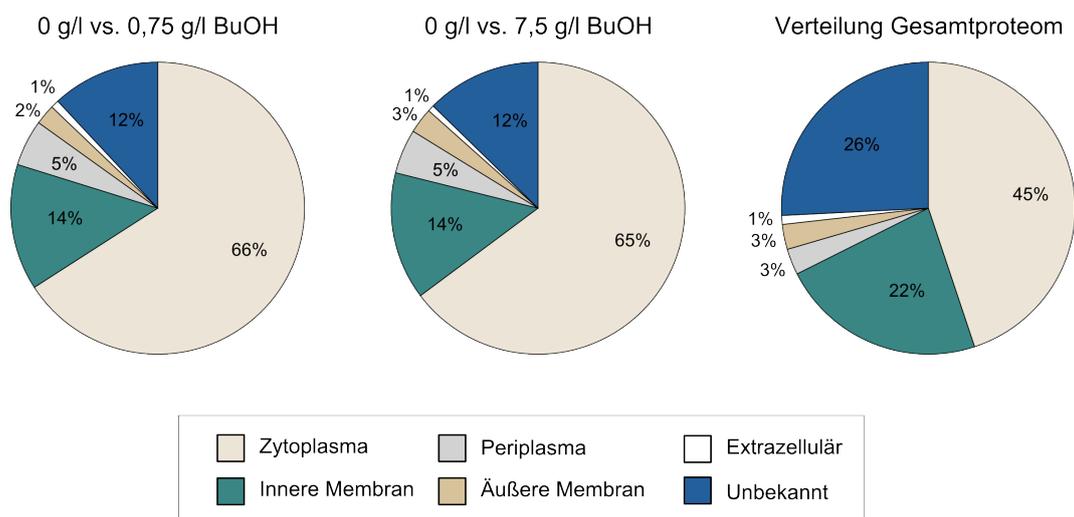
In der Regel konnten mit dieser Methode ca. 30% der im *P. putida* KT2440 Genom kodierten Proteine identifiziert werden. Für die durchgeführten Vergleiche wurden je



**Abbildung 5.15:** 1D-Gel-Fraktionierung der aus dem Bioreaktor gewonnenen Proben. Alle in einem Experiment analysierten Proben wurden wenn möglich auf einem einzigen 1D-SDS-Gel aufgetrennt und in zehn Fraktionen unterteilt. Diese wurden aus dem Gel ausgeschnitten, verdaut und mittels LC-ESI-MS/MS analysiert.

drei biologische Replikate eines Zustands untersucht. Jede Fraktion eines jeden Replikats wurde dabei in einer 60 min LC-ESI-MS/MS-Analyse vermessen und die einzelnen Läufe anschließend mit Hilfe der Software Progenesis LC-MS wieder zu einer „Gesamtfraktion“ zusammengeführt (s. Abschnitt 4.5.3). Die Berechnung der Regulationsfaktoren der Proteine erfolgte nach der Kombination aller Fraktionen einer Probe. Neben einer für *P. putida* KT2440 spezifischen Datenbank wurde auch die Bakteriendatenbank der NCBI für die Datenbanksuchen eingesetzt. Alle Protein-Identifizierungen wurden mit der Software Scaffold 3.6.0 validiert. Ein Protein galt als identifiziert, wenn es eine Protein-Wahrscheinlichkeit von 90% aufwies und mindestens zwei Peptide des Proteins mit einer Peptid-Wahrscheinlichkeit von 80% identifiziert wurden.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation der identifizierten Proteine zeigte in allen GeLCMSMS-Experimenten einen recht hohen Anteil zytosolischer Proteine (Abbildung 5.16). Somit war diese Fraktion im Vergleich zur Verteilung des Gesamtproteoms leicht überrepräsentiert. Diese Tatsache ist wahrscheinlich durch die schlechtere Solubilisierbarkeit von Membranproteinen im Vergleich zu zytosolischen Proteinen zu erklären. Als Referenz ist in Abbildung 5.16 auch die prozentuale Verteilung aller in der „Pseudomonas Genome Database“ für *P. putida* KT2440 hinterlegten Proteine angegeben. Wie bereits eingangs erwähnt, werden die Ergebnisse aller durchgeführten Experimente gemeinsam in Abschnitt 5.2.3.4 besprochen.



**Abbildung 5.16:** Prozentuale Verteilung der während der GeLCMSMS-Experimente in den verschiedenen durchgeführten Vergleichen identifizierte Proteine auf die unterschiedlichen subzellulären Kompartimente.

### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State I und Steady-State II

In diesem Vergleich konnten insgesamt 1385 Proteine identifiziert werden. Während in Fraktion 2 bis Fraktion 5 über 2200 Peptide pro Fraktion identifiziert werden konnten, war die Anzahl in den übrigen Fraktionen deutlich geringer. Die unterschiedliche Anzahl an Identifizierungen in den einzelnen Fraktionen korrelierte dabei nicht mit der Zahl identifizierter Features. Obwohl während der Auswertung keine Auffälligkeiten in den einzelnen Fraktionen festgestellt werden konnten, könnte dies ein Hinweis auf ein technisches Problem während der LC-ESI-MS/MS-Analyse sein. Alle für die einzelnen Fraktionen erhobenen Daten sind in Tabelle 5.14 zusammengefasst. Es ist zu beachten, dass die Datenbanksuche lediglich gegen Bakteriendatenbanken erfolgte und somit MS/MS-Spektren, welche auf nicht-bakterielle Kontaminationen wie z.B. Keratin zurückgehen, nicht identifiziert werden konnten.

Von den 1385 identifizierten Proteinen wurden 20 Proteine aufgrund von Homologien zu anderen *Pseudomonaden*, nicht jedoch in *Pseudomonas putida* KT2440 identifiziert. Weitere 149 Proteine konnten keinem Organismus der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet werden. Die Anzahl differentiell regulierter Proteine betrug 98, wovon 70 in Steady-State II verstärkt exprimiert wurden. Der Anteil nicht aus *Pseudomonaden* stammender Proteine lag unter den in Steady-State II induzierten Proteinen bei über 40%, wobei ein Großteil (30 Proteine) der Proteine *Paenibacillus sp.* zugeordnet werden konnten. Aufgrund des hohen Anteils von Fremdproteinen und der verhältnismäßig geringen Anzahl regulierter Proteine ergab die funktionelle Gruppierung der Proteine

mittels COG-Datenbank kein valides Ergebnis.

**Tabelle 5.14:** Übersicht über die in den einzelnen Fraktionen detektierten Features, aufgenommenen und identifizierten MS/MS-Spektren sowie identifizierten Peptiden.

	Features (Peptide)	Aufgenommene MS/MS-Spektren	Identifizierte MS/MS-Spektren	Identifizierte Peptide
Fraktion 1	5974	3468	1346	1230
Fraktion 2	11813	5947	2532	2323
Fraktion 3	13725	6805	2717	2369
Fraktion 4	12246	6081	2600	2298
Fraktion 5	12310	5617	2596	2318
Fraktion 6	11213	5382	2265	1972
Fraktion 7	9207	5031	2043	1758
Fraktion 8	13027	6180	2185	1968
Fraktion 9	13467	6157	2161	1934
Fraktion 10	10711	5558	2232	2002

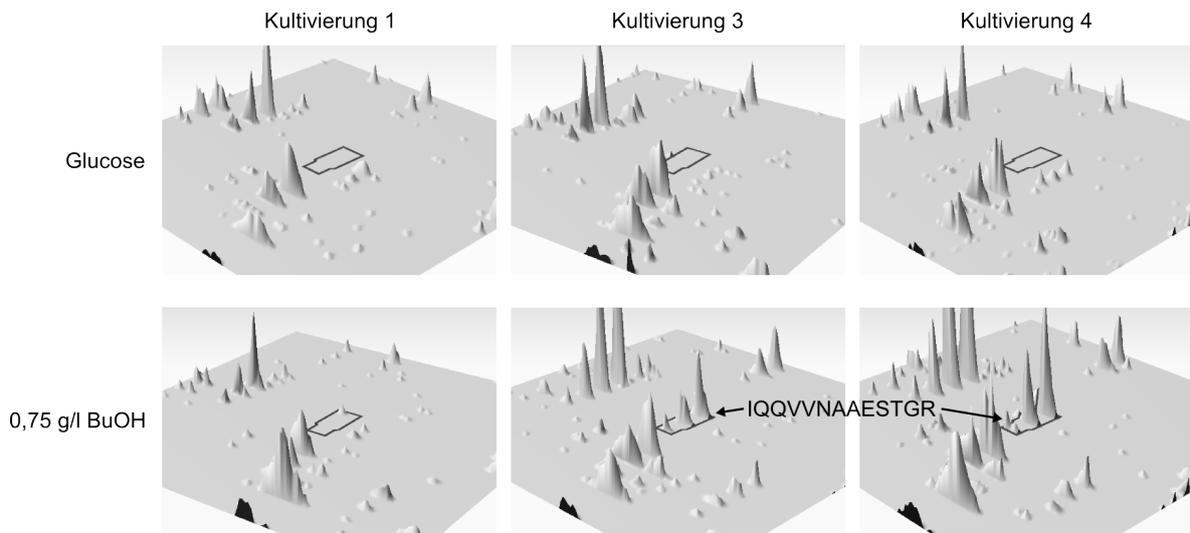
*Features:* Anzahl der in einer Fraktion detektierten Features (Peptide).

*Aufgenommene MS/MS-Spektren:* Zahl der in einer Fraktion aufgenommenen MS/MS-Spektren.

*Identifizierte MS/MS-Spektren:* Zahl der MS/MS-Spektren, welche in der Datenbank identifiziert werden konnten.

*Identifizierte Peptide:* Zahl der identifizierten Peptide.

Wie die 2D-DIGE-Daten legt auch eine genaue Betrachtung der mit *Paenibacillus sp.* assoziierten „Features“ in diesem Experiment eine Kontamination von Fermenter III und IV nahe. Abbildung 5.17 zeigt die Verteilung eines aus *Paenibacillus sp.* stammenden Peptids (IQQVVNAAESTGR) über die einzelnen analysierten Proben. Das in Abbildung 5.17 gezeigte Peptid ist dem Protein „Beta-Lactamase Domain-Containing Protein“ aus *Paenibacillus sp.* Y412MC10 zuzuordnen. Wie bereits in Abschnitt 5.2.3.1 erwähnt, ist ein möglicher Einfluss dieser „Kontamination“ auf die Regulationsvorgänge in *Pseudomonas putida* KT2440 nicht abzuschätzen. Nach Abzug der Proteine, welche anderen Organismen zugeordnet werden konnten, wurden in Steady-State II lediglich 31 Proteine aus *P. putida* KT2440 verstärkt exprimiert.



**Abbildung 5.17:** Darstellung der Kontamination der Fermenter III und IV anhand des Peptids IQQVVNAAESTGR aus *Paenibacillus sp.*

Wie die Abbildung zeigt, konnte das Peptid IQQVVNAAESTGR nur in Fermenter III und IV detektiert werden.

### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State I und Steady-State III

In diesem Experiment konnten insgesamt 1398 Proteine identifiziert werden. Im Vergleich zum vorherigen Experiment waren lediglich 12 der 276 regulierten Proteine aus Organismen, welche nicht der Gattung *Pseudomonas* angehörten (hiervon neun aus *Paenibacillus sp.*). Von den insgesamt regulierten Proteinen wurden 176 unter Butanol vermindert, 100 verstärkt exprimiert. Die Anzahl der detektierten Features, der aufgenommenen MS/MS-Spektren und der identifizierten Peptide war über die einzelnen Fraktionen deutlich konstanter als im vorherigen Experiment (Tabelle 5.15). Dies deutet auf eine gute Reproduzierbarkeit der massenspektrometrischen Analyse hin.

**Tabelle 5.15:** Übersicht über die in den einzelnen Fraktionen detektierten Features, aufgenommenen und identifizierten MS/MS-Spektren sowie identifizierten Peptiden.

	Features (Peptide)	Aufgenommene MS/MS-Spektren	Identifizierte MS/MS-Spektren	Identifizierte Peptide
Fraktion 1	6228	3722	1462	1253
Fraktion 2	10660	5776	2563	2303
Fraktion 3	12444	6725	3060	2596
Fraktion 4	12680	7026	3361	2794
Fraktion 5	12703	6646	3063	2631

	Features (Peptide)	Aufgenommene MS/MS-Spektren	Identifizierte MS/MS-Spektren	Identifizierte Peptide
Fraktion 6	12018	6351	2975	2501
Fraktion 7	12284	6625	3007	2505
Fraktion 8	13144	7116	3310	2823
Fraktion 9	13504	7251	3280	2718
Fraktion 10	11311	6380	2708	2348

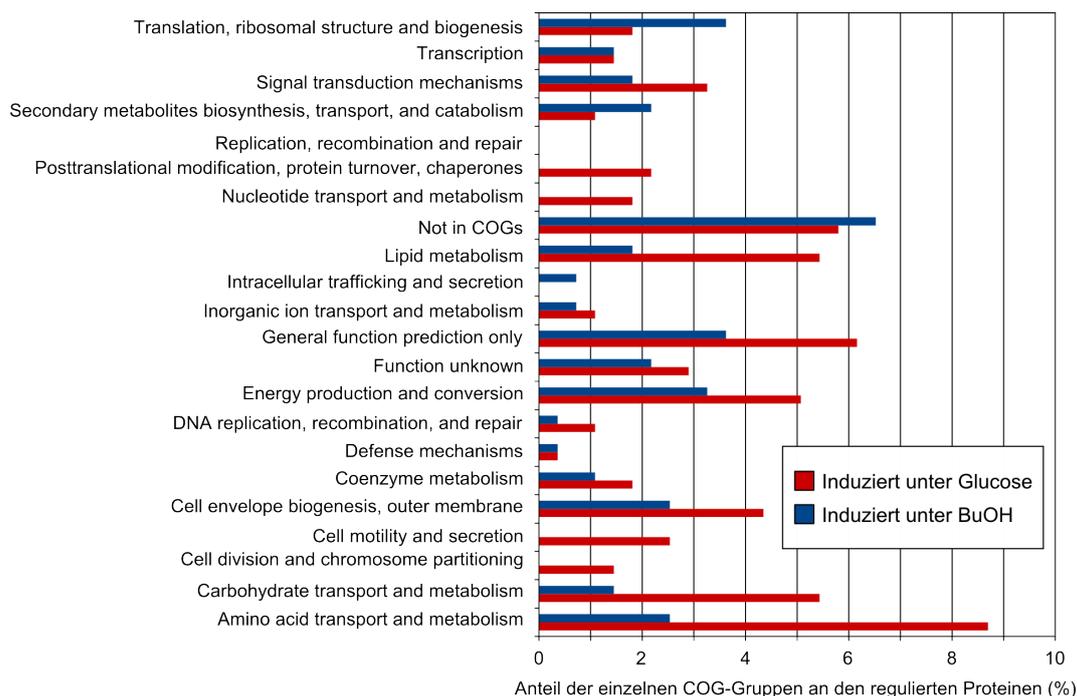
*Features:* Anzahl der in einer Fraktion detektierten Features (Peptide).

*Aufgenommene MS/MS-Spektren:* Zahl der in einer Fraktion aufgenommenen MS/MS-Spektren.

*Identifizierte MS/MS-Spektren:* Zahl der MS/MS-Spektren, welche in der Datenbank identifiziert werden konnten.

*Identifizierte Peptide:* Zahl der identifizierten Peptide.

Die Einteilung der in den beiden Zuständen regulierten Proteine auf die einzelnen funktionellen Gruppen (COG) ist in Abbildung 5.18 dargestellt. Aufgrund der größeren Zahl der unter Glucose induzierten Proteine (176), war deren Anteil in fast alle Kategorien höher, als der der unter Butanol induzierten Proteine.



**Abbildung 5.18:** Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie.

Die einzelnen Balken spiegeln den Anteil der entsprechenden Kategorie, an den insgesamt regulierten Proteinen wider. Die Kategorie „Not in COGs“ enthält Proteine, für die in der Datenbank keine COG-Informationen vorhanden waren. BuOH: 7,5 g/l Butanol in Feedmedium.

Viele der differentiell regulierten Proteine konnten dem „Aminosäure Transport und Metabolismus“, dem „Lipid Metabolismus“, dem „Kohlenhydrat Transport und Metabolismus“ sowie dem „Energie-Metabolismus“ zugeordnet werden.

### Differenzielle Regulation von Proteinen in *Pseudomonas putida* KT2440 im Vergleich zwischen Steady-State II und Steady-State III

Die Zahl der in diesem Experiment identifizierten Proteine betrug 1400, wovon 146 eine Regulation in einem der beiden Zustände zeigten. 48 Proteine wurden in Steady-State III verstärkt, 99 vermindert exprimiert. Die Verteilung der identifizierten Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente unterschied sich nicht von den vorherigen Experimenten. Auch die Einteilung in verschiedene funktionelle Gruppen zeigte keine Auffälligkeiten. Wie bereits bei den vorherigen Methoden brachte auch hier der direkte Vergleich zwischen Steady-State II und Steady-State III keine neuen Erkenntnisse.

#### 5.2.3.4 Der Metabolismus von Butanol in *Pseudomonas putida* KT2440

Der folgende Abschnitt fasst die Ergebnisse der verschiedenen Methoden für die aus dem Bioreaktor entnommenen Proben zusammen. Da die GeLCMSMS-Analyse den umfangreichsten Datensatz lieferte, beziehen sich die im Folgenden beschriebenen Regulationen der Stoffwechselwege, wenn nicht explizit anders erwähnt, auf diese Analysemethode. Generell konnten im Rahmen dieser Analyse eine Vielzahl der am Entner-Doudoroff-Weg und der  $\beta$ -Oxidation beteiligten Enzyme identifiziert werden.

#### PedR1-Regulon

Wie bereits unter Ethylenglycol, waren auch unter Butanol große Teile des PedR1-Regulons induziert (Abbildung 5.19).

**Tabelle 5.16:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Proteine aus dem Genbereich PP\_2662 bis PP\_2683. Zudem sind die Regulationsfaktoren weiterer, mit dem PedR1-Regulon assoziierten, Proteine angegeben. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_2662		hypothetical protein	NID	24,1	266,4	BuOH
PP_2663		hypothetical protein	NID	46,9	15	BuOH
PP_2664	<i>pedS1</i>	PAS/PAC sensor hybrid histidine kinase	NID	80,3	9,7	BuOH
PP_2665	<i>pedR1</i>	AgmR	6,2	13,4	NID	BuOH

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_2666		hypothetical protein	NID	NID	NID	
PP_2667	<i>pedC</i>	ABC transporter	NID	NID	NID	
PP_2668	<i>pedB</i>	efflux ABC transporter ATP-binding protein	20,9	57,8	8,7	BuOH
PP_2669	<i>pedA</i>	YVTN beta-propeller repeat-containing protein	NID	61,3	NID	BuOH
PP_2670		hypothetical protein	NID	NID	NID	
PP_2671	<i>pedS2</i>	sensor signal transduction histidine kinase	NID	NID	NID	
PP_2672	<i>pedR2</i>	LuxR family DNA-binding response regulator	5,5	NR	NID	BuOH
PP_2673	<i>pedD</i>	pentapeptide repeat-containing protein	29,9	56,9	13,7	BuOH
PP_2674	<i>pedE</i>	quinoprotein ethanol dehydrogenase	43,4	125,2	6	BuOH
PP_2675	<i>pedF</i>	cytochrome c-type protein	NID	86,7	NID	BuOH
PP_2676	<i>pedG</i>	periplasmic protein	101,7	133,1	23,8	BuOH
PP_2677		hypothetical protein	25,5	53,9	18,7	BuOH
PP_2678		beta-lactamase domain protein	23,7	35,8	NID	BuOH
PP_2679	<i>pedH</i>	quinoprotein ethanol dehydrogenase	103,6	23,5	59	BuOH
PP_2680	<i>pedI</i>	aldehyde dehydrogenase family protein	16,5	62,9	13,6	BuOH
PP_2683	<i>ercS</i>	PAS/PAC sensor hybrid histidine kinase	NR	2,8	NR	BuOH
PP_0375	<i>pqqH</i>	PqqH	NID	39,6	6,6	BuOH
PP_0376	<i>pqqE</i>	PqqE	NID	17,9	3,2	BuOH
PP_0378	<i>pqqC</i>	PqqC	10,3	19,6	4,5	BuOH
PP_0379	<i>pqqB</i>	PqqB	4,4	19	NID	BuOH
PP_4487	<i>acsA</i>	acetyl-CoA synthetase	9,7	44,7	6,9	BuOH

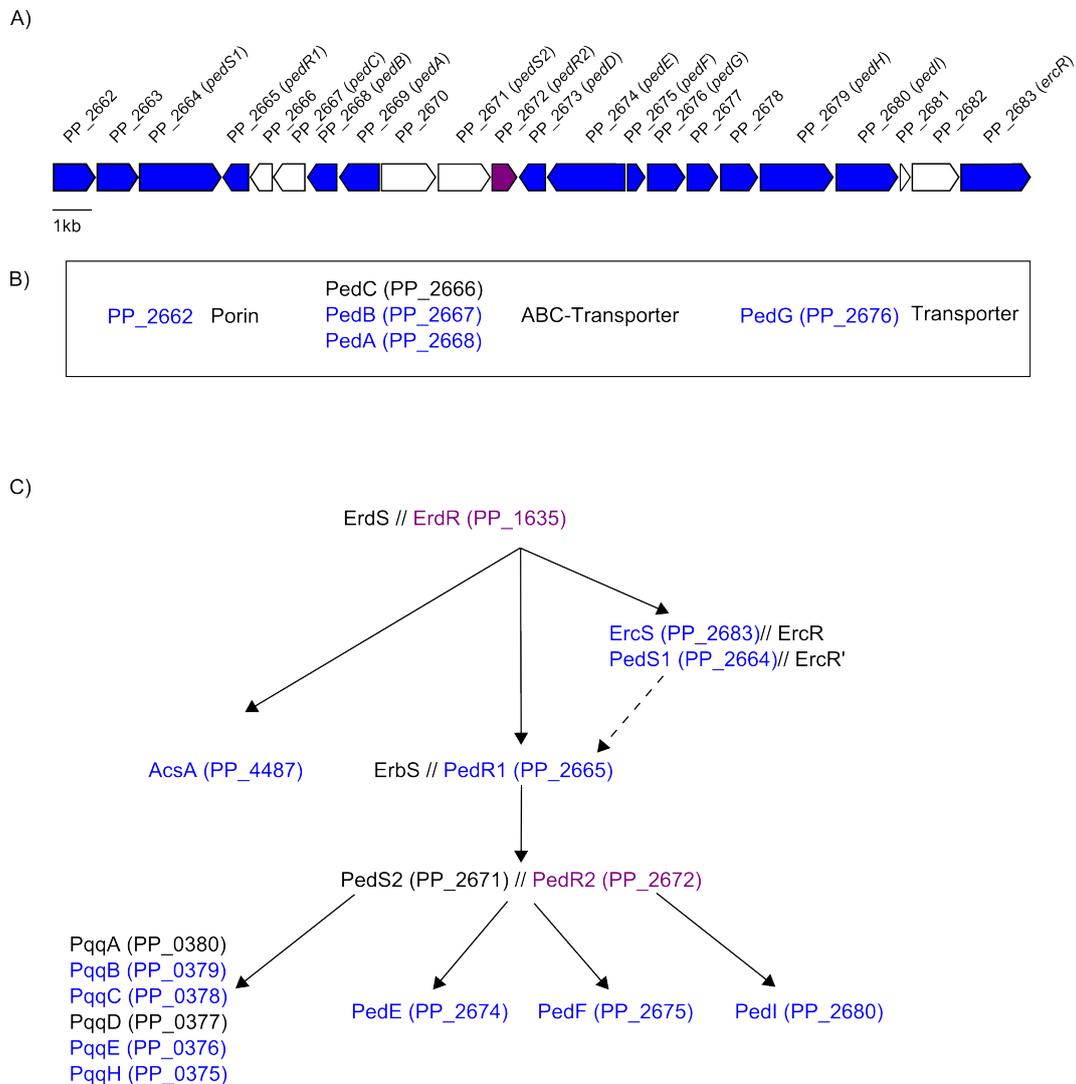
*NR*: Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen.

Neben den Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen PedE, PedH und PedI wurden auch die beiden in dieser Gen-Region befindlichen Proteine PedB und PedA sowie die Proteine PP\_2676 bis PP\_2678 verstärkt exprimiert. Dabei kodiert PedB (PP\_2668) zusammen mit PedA (PP\_2669) und dem nicht identifizierten Proteinen PedC (PP\_2667) für einen ABC-Transporter unbekannter Funktion. Während es sich bei PedG ebenfalls um den Teil eines ABC-Transporters handelt, enthält das Protein PP\_2679 eine



**Abbildung 5.19:** Regulation von Proteinen aus der Genregion zwischen PP\_2662 und PP\_2683 zwischen Steady-State I und Steady-State III in den verschiedenen durchgeführten 1D-Fraktionierungs-Experimenten.

(blau) induziert in Steady-State III, (lila) nicht reguliert, (weiß) nicht identifiziert A) Regulier- te Gene, B) Regulierte, möglicherweise mit dem Transport von Butanol assoziierte Proteine, C) Mit dem PedR1-Regulon assoziierte und regulierte Proteine, sowie deren vermutete regu- latorische Verbindung.

$\beta$ -Lactamase Domäne (Antibiotikaresistenz). Die Funktion von PP\_2678 ist nicht bekannt. Auch das Porin PP\_2662 sowie die PQQ-Biosyntheseproteine PqqB, PqqC, PqqE und PqqH zeigten unter Butanol eine deutliche Induktion. Wie Tabelle 5.16 zeigt, waren bis auf PedH alle Proteine der Region unter 7,5 g/l Butanol deutlich stärker als unter 0,75 g/l Butanol reguliert. Das Protein Acetyl-CoA Synthetase, welches zwar nicht in dieser Genregion liegt, aber mit dem PedR1-Regulon in Zusammenhang steht war unter Butanol ebenfalls induziert.

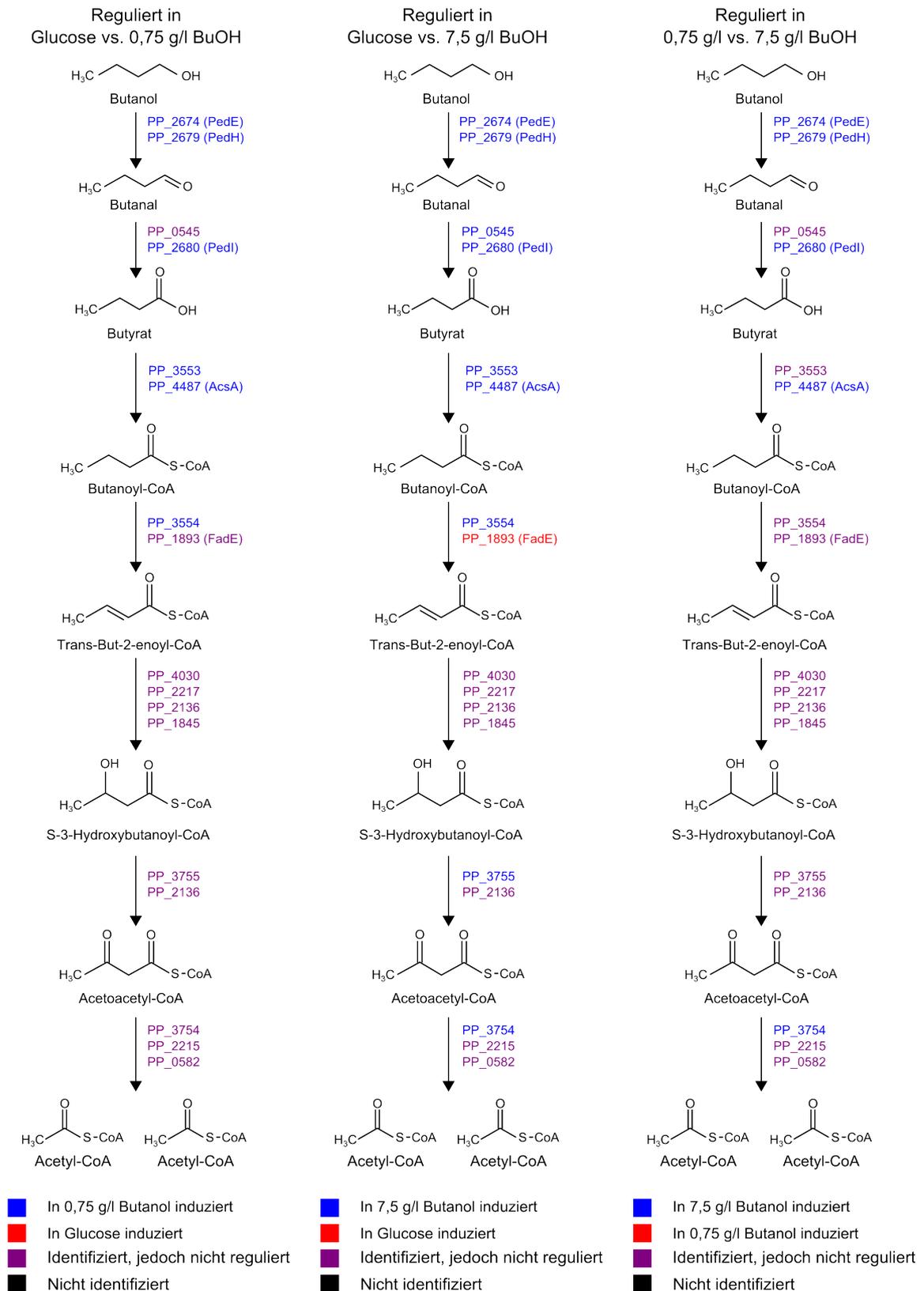
### Lipid-Metabolismus

Generell zeigte sich unter Butanol eine Induktion verschiedener am Abbau von Fettsäuren beteiligter Enzyme. Wie die Anzahl regulierter Proteine in Abbildung 5.20 zeigt, waren dabei deutlich mehr Proteine zwischen Steady-State I und Steady-State III als zwischen Steady-State I und Steady-State II reguliert.

So waren neben den an der Synthese von Butanoyl-CoA beteiligten Enzymen (PedE, PedI und PP\_3553) auch Enzyme des nachfolgenden  $\beta$ -Oxidations-Weges sowie des Citratzyklus (s. nächster Abschnitt) induziert (Tabelle 5.17). So wurden die Enzyme Acyl-CoA-Synthetase (PP\_3553), Acyl-CoA-Dehydrogenase (PP\_3554),  $\beta$ -Ketothiolase (PP\_3754) und 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (PP\_3755) in Steady-State III verstärkt exprimiert. Das Enzym Enoyl-CoA-Hydratase war in keiner der durchgeführten Analysen reguliert. AcsA(PP\_4487), welches als Acetyl-CoA-Synthetase beschrieben ist, könnte ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung von Butansäure zu Butanoyl-CoA spielen.

Die verminderte Expression der Alkohol-Dehydrogenase PP\_1816 sowie der nicht näher charakterisierten Acyl-CoA-Dehydrogenasen (PP\_0368, PP\_0370, PP\_3638 und PP\_4780) in Steady-State III, weisen auf die Spezifität der am Butanol-Abbau beteiligten und in Steady-State III induzierten Dehydrogenasen hin. Zudem zeigten sowohl die Teile des Leucin-Abbaus downstream von 3-Methylbutanoyl-CoA als auch Teile des 2-Methylisocitrat Zyklus eine unter Butanol verminderte Expression. Die Regulation beider Cluster ließe sich durch den unter Butanol im Vergleich zu Glucose geringeren Abbau verzweigt-kettiger bzw. ungeradzahliger Fettsäuren erklären (Santos *et al.*, 2009). Das beim Abbau ungeradzahliger Fettsäuren entstehende Propionyl-CoA, kann über den 2-Methylisocitrat Zyklus in Succinat umgewandelt und weiter metabolisiert werden. Um das beim Abbau verzweigter Fettsäuren entstehende 3-Methylbutanoyl-CoA zu Acetoacetat abzubauen, werden einige Enzyme des Leucin-, Valin-, und Isoleucin Metabolismus benötigt. Offenbar werden diese beiden Abbauwege in der Gegenwart von Butanol reprimiert.

An der Biosynthese von Fettsäuren beteiligte Enzyme waren im Rahmen der GeLCMSMS-Analysen nicht reguliert. In den 2D-DIGE-Analysen konnte jedoch AccB



**Abbildung 5.20:** Differenziell regulierte Proteine des postulierten Butanol-Abbauweges in den verschiedenen durchgeführten 1D-Fraktionierungs-Experimenten.

(PP\_0559), welches an der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA beteiligt ist, identifiziert werden (SI vs. SII). Auch in der Membranfraktion zeigte sich eine Induktion von Enzymen der Fettsäuresynthese. So waren hier zwei 3-Oxoacyl-ACP-Synthasen (PP\_4545; PP\_4379) unter Butanol induziert (SI vs SII). Beide gefundenen 3-Oxoacyl-ACP-Synthasen katalysieren, laut KEGG Datenbank, die gleiche Reaktion. Sie weisen jedoch nur eine sehr geringe Sequenzidentität von 24% auf. Auf eine Induktion der Fettsäurebiosynthese und damit auf einen möglichen Umbau der Membran in Folge der Butanolexposition könnte auch die Induktion von PP\_0581 (FabG) hinweisen.

Da jedoch keine weiteren, am Auf- oder Umbau von Lipiden beteiligten Enzyme reguliert waren und keine Daten zur Lipidzusammensetzung erhoben wurden, lässt sich ein Umbau der Membran nicht bestätigen (SI vs. SIII).

**Tabelle 5.17:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Proteine der  $\beta$ -Oxidation. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_2674	<i>pedE</i>	Quinoprotein Ethanol-Dehydrogenase	43,4	125,2	5,5	BuOH
PP_2679	<i>pedH</i>	Quinoprotein Ethanol-Dehydrogenase	103,6	23,5	6	BuOH
PP_0545		Aldehyd-Dehydrogenase	NR	2,4	NR	BuOH
PP_2680	<i>pedI</i>	Aldehyd-Dehydrogenase	16,5	62,9	15,7	BuOH
PP_3553		Acyl-CoA Synthetase	73,6	40,2	NR	BuOH
PP_4487	<i>acsA</i>	Acetyl-CoA Synthetase	9,7	44,7	6,9	BuOH
PP_3554		Acyl-CoA Dehydrogenase	7	32,4	NR	BuOH
PP_1893	<i>fadE</i>	Acyl-CoA Dehydrogenase	NR	0,4	NR	BuOH
PP_4030		Enoyl-CoA Hydratase	NR	NR	NR	
PP_2217	<i>fadB1x</i>	Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase	NR	NR	NR	
PP_2136	<i>fadB</i>	Multifunctional Fatty Acid Oxidation Complex	NR	NR	NR	
PP_1845		Enoyl-CoA Hydratase	NR	NR	NR	
PP_3755	<i>paaH</i>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	NR	2,4	NR	BuOH
PP_2136	<i>fadB</i>	Multifunctional Fatty Acid Oxidation Complex	NR	NR	NR	
PP_3754		Beta-Ketothiolase	NR	2,5	2,2	BuOH
PP_2215	<i>fadAx</i>	Acetyl-CoA Acetyltransferase	NR	NR	NR	

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_2127	<i>fadA</i>	3-Ketoacyl-CoA Thiolase	NID	NR	NID	
PP_0582		Acetyl-CoA Acetyltransferase	NR	NR	NR	
PP_4116	<i>aceA</i>	Isocitrat-Lyase	3,1	80,9	37,7	BuOH
PP_0356	<i>glcB</i>	Malat Synthase	NR	7,8	5,1	BuOH
PP_0751	<i>mgo-1</i>	Malate:Quinone Oxidoreduktase	NR	2,7	NR	BuOH

*NR*: Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen.

### Lipopolysaccharid (LPS)

Ein Gencluster (PP\_3126 – PP\_3135), welches an der Synthese von Lipopolysacchariden bzw. der Zellwand beteiligt ist, war zwischen Steady-State I und Steady-State II nicht reguliert, zeigte jedoch in Steady-State III im Vergleich zu Steady-State I eine deutlich verminderte Expression. Dies könnte auf eine Abnahme der LPS-Synthese mit steigender Butanolkonzentration hinweisen. Eine Aussage über mögliche biologische Ursachen dieses Vorgangs ist auf Basis der erhobenen Daten nicht möglich.

**Tabelle 5.18:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Proteine der LPS-Biosynthese. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert < 0,05 und eine Regulation um einen Faktor > 2 aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_3126		polysaccharide export protein	NR	NR	NR	
PP_3127		lipopolysaccharide biosynthesis protein	NR	2,7	3,4	Glu
PP_3128		protein-tyrosine kinase	NR	3,2	2,9	Glu
PP_3129	<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase	NR	3,8	NR	Glu
PP_3130		hypothetical protein	2	7,6	NR	Glu
PP_3131		hypothetical protein	NR	NID	NID	
PP_3134		transferase hexapeptide repeat containing protein	NR	4,6	NR	Glu
PP_3135		glycosyl transferase	NR	12,3	3	Glu

*NR*: Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

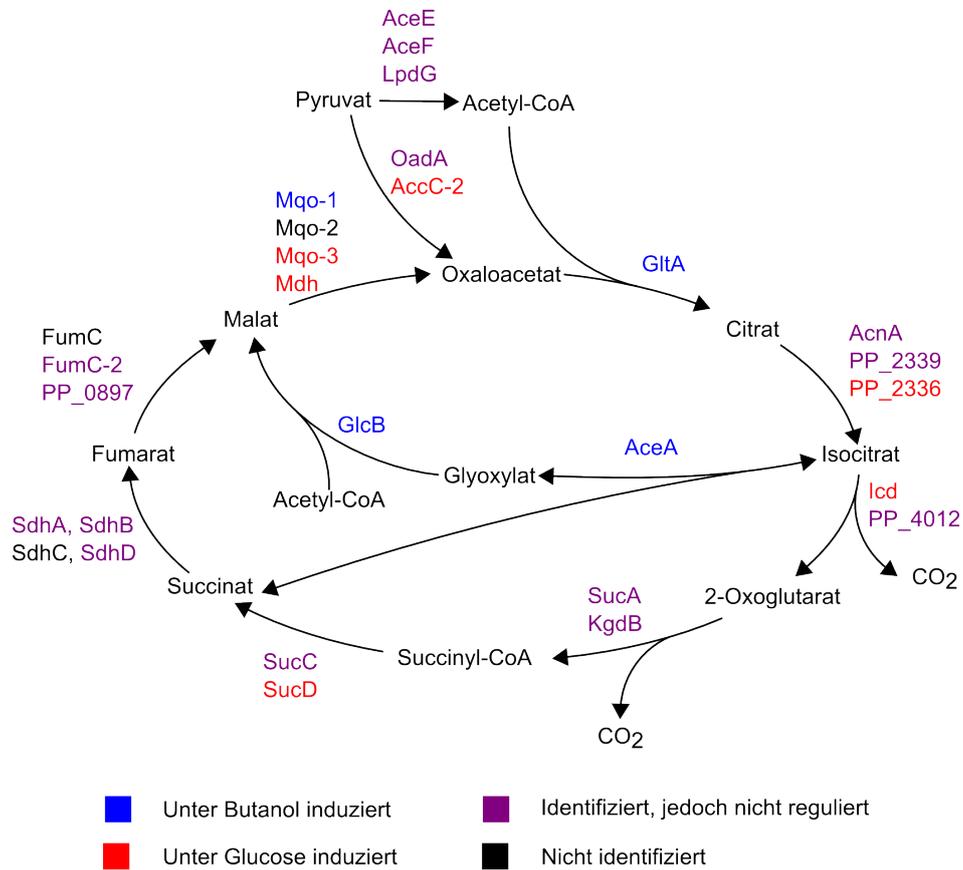
*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen.

## Citratzyklus

Besonders zwischen den Zuständen Steady-State I und Steady-State III war eine verstärkte Expression der Enzyme AceA und GlcB zu beobachten. Zusammen mit der Induktion der Malat:Quinon Oxidoreduktase (Mqo-1) und der Citrat-Synthase (GltA) könnte dies auf einen verstärkten Kohlenstoff-Fluss durch den Glyoxylat-Shunt (Abbildung 5.21) hindeuten.



**Abbildung 5.21:** Differentielle Regulation der Enzyme des Citratzyklus zwischen Steady-State I und Steady-State III in *P. putida* KT2440.

Die Abbildungen basiert auf den Daten der GeLCMSMS-Analyse.

Auffällig ist, dass die laut Morales *et al.* (2004) unter der Kontrolle von Crc stehende Malat: Quinon Oxidoreduktase (Mqo-2) nicht identifiziert werden konnte. Mqo-3 und die Malat-Dehydrogenase (Mdh), welche die gleiche Reaktion katalysiert, waren entgegengesetzt reguliert. Dies könnte auf eine differenzielle Induktion dieser Enzyme über unterschiedliche übergeordnete Regulatoren hinweisen.

**Tabelle 5.19:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Proteine des Citrat-Zyklus. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_0338	<i>aceF</i>	dihydrolipoamide acetyltransferase	NR	NR	NR	
PP_0339	<i>aceE</i>	pyruvate dehydrogenase subunit E1	NR	NR	NR	
PP_0356	<i>glcB</i>	malate synthase G	NR	7,8	5,1	BuOH
PP_0654	<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	NR	2,1	NR	BuOH
PP_0751	<i>mgo-1</i>	malate:quinone oxidoreductase	NR	2,7	NR	BuOH
PP_0897		hydro-lyase, Fe-S type, tartrate/fumarate subfamily, alpha subunit	NR	NR	NR	
PP_1755	<i>fumC-2</i>	fumarate hydratase	NR	NR	NR	
PP_2112	<i>acnA</i>	aconitate hydratase	NR	NR	NR	
PP_2336		aconitate hydratase	NR	3,5	NR	Glu
PP_2339	<i>acnB</i>	bifunctional aconitate hydratase 2/2-methylisocitrate dehydratase	NR	NR	NR	
PP_2925	<i>mgo-3</i>	malate:quinone oxidoreductase	NR	2,4	NR	Glu
PP_4011	<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent	NR	2,2	NR	Glu
PP_4012		isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent	NR	NR	NR	
PP_4116	<i>aceA</i>	isocitrate lyase	3,1	80,9	37,7	BuOH
PP_4185	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	NR	2,2	NR	Glu
PP_4186	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase subunit beta	NR	NR	NR	
PP_4187	<i>lpdG</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	NR	NR	NR	
PP_4188	<i>kgdB</i>	dihydrolipoamide succinyltransferase	NR	NR	NR	
PP_4189	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	NR	NR	NR	
PP_4190	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	NR	NR	NR	
PP_4191	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	NR	NR	NR	
PP_4192	<i>sdhD</i>	succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane anchor protein	NR	NR	NR	

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_5346	<i>oadA</i>	pyruvate carboxylase subunit B	NR	NR	NR	
PP_5347	<i>accC-2</i>	pyruvate carboxylase subunit A	NR	2,5	2,9	Glu

*NR*: Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen.

## Atmungskette

Eine verstärkte Expression unter Butanol zeigten auch mehrere Proteine, welche als Elektronenakzeptoren fungieren oder an deren Synthese beteiligt sind. Darunter CyoA (PP\_0812), Azurin (PP\_4870), CcmE (PP\_4323) und das „Cytochrome C-Type Protein“ (PedF). Interessant ist die Induktion von Azurin (PP\_4870), welches in *Pseudomonas putida* HK5 eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Elektronen zwischen Alkohol-Dehydrogenasen (ADH II und ADH III) und Proteinen der Atmungskette spielt (Toyama *et al.*, 2004). Dies könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein einer Typ II-Alkohol-Dehydrogenase in *P. putida* KT2440 nach Behandlung mit Butanol sein. Auch das als Elektronenakzeptor fungierende Protein PP\_4201 war unter Butanol (in Steady-State II) induziert. Die Induktion könnte auf die vermehrte Expression von Alkohol-Dehydrogenasen, welche dieses Protein als Elektronenakzeptor nutzen, hinweisen.

Weitere Proteine welche mit der Atmungskette in Zusammenhang stehen, konnten vor allem im Rahmen der Analyse des Membranproteoms identifiziert werden. So waren die beiden Proteine PP\_0812, PP\_0813, welche am Aufbau von Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) beteiligt sind, in Steady-State III induziert. Ebenfalls in Bezug zur Atmungskette stehen die beiden im *ccm*-Operon (Cytochrom-c-Maturation) kodierten Proteine PP\_4321 und PP\_4322 (DsbE, CcmF), welche an der Prozessierung von Cytochrom C beteiligt sind. Auch das bereits erwähnte Azurin (PP\_4870), die an der Prozessierung von Cytochrom C beteiligten Proteine PP\_4321 und PP\_4322 (DsbE, CcmF) sowie das Protein Ubiquinol Oxidase (Untereinheit 2), ein Teil der Elektronentransportkette, waren in der Membranfraktion induziert.

**Tabelle 5.20:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Proteine, welche Teile der Atmungskette darstellen oder mit dieser in Zusammenhang stehen. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_0812	<i>cyoA</i>	ubiquinol oxidase subunit 2	NID	10,5	NR	BuOH
PP_0813	<i>cyoB</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit I	NID	NID	NID	
PP_2675	<i>pedF</i>	cytochrome c-type protein	NID	86,7	NID	BuOH
PP_4201		electron transfer flavoprotein, alpha subunit	2,6	NR	NR	BuOH
PP_4202		electron transfer flavoprotein, beta subunit	NR	NR	NR	
PP_4203		electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	NR	5,6	NR	BuOH
PP_4321	<i>dsbE</i>	periplasmic protein thiol-disulphide oxidoreductase DsbE	NID	NID	NID	
PP_4322	<i>ccmF</i>	cytochrome c-type biogenesis protein CcmF	NID	NID	NID	
PP_4323	<i>ccmE</i>	cytochrome c-type biogenesis protein CcmE	NID	15,5	NID	BuOH
PP_4870		azurin	NR	51,9	24,7	BuOH

*NR*: Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen

## Transporter und Efflux-Systeme

Eine Induktion unter Butanol zeigten vor allem die im PedR1-Gencluster kodierten ABC-Transporter (PedA, B und PedG) und das Porin (PP\_2662). Als weitere Teile von ABC-Transportern waren die Proteine PP\_0196 und PP\_2131 unter Butanol induziert. Zudem waren die Proteine Acetat-Permease (PP\_1743) und „Major Facilitator of Transport“ (PP\_0288) wie bereits unter Ethylenglycol auch unter Butanol induziert. Die mögliche Funktion dieser Proteine wird in Kapitel 6.2 besprochen.

Mit PP\_3582 wurde lediglich ein Efflux-Transporter in Steady-State III induziert gefunden. Keiner der beiden ebenfalls in *P. putida* KT2440 kodierten Transporter TtgABC bzw. Ttg2A, 2b und 2c zeigten unter Butanol eine Induktion. Im Gegenteil

wurde TtgB im Vergleich zwischen Steady-State I und Steady-State II in letzterem sogar vermindert exprimiert. Die Induktion des „Transcriptional-Regulators MvaT“ würde eigentlich auf eine verstärkte Expression von MexEF-OprN sowie eine verminderte Expression von OprD hinweisen (Westfall *et al.*, 2006). Während OprD keine Regulation zeigte, konnten MexEF-OprN nicht identifiziert werden. Die geringe Expression von RND-Efflux-Transportern unter Butanol deutet darauf hin, dass die Reaktion von *P. putida* KT2440 auf Butanol in den in diesen Experimenten eingesetzten Konzentrationen nicht auf der Extrusion des toxischen Substrats über Efflux-Transporter basiert.

**Tabelle 5.21:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Transporter und Efflux-Systeme. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_0196		ABC transporter ATP-binding protein	2,9	2,2	NR	BuOH
PP_0288		major facilitator superfamily MFS_1	NID	310,2	NR	BuOH
PP_1206	<i>oprD</i>	outer membrane porin	NR	NR	NR	
PP_1366		transcriptional regulator MvaT, P16 subunit	NR	47,1	NR	BuOH
PP_1743	<i>actP</i>	acetate permease	4,5	28,6	NR	BuOH
PP_2131		ABC transporter ATP-binding protein	NR	2,5	NR	BuOH
PP_2662		hypothetical protein	NID	24,1	266,4	BuOH
PP_2667	<i>pedC</i>	ABC transporter	NID	NID	NID	
PP_2668	<i>pedB</i>	efflux ABC transporter ATP-binding protein	20,9	57,8	8,7	BuOH
PP_2669	<i>pedA</i>	YVTN beta-propeller repeat-containing protein	NID	61,3	NID	BuOH
PP_2676	<i>pedG</i>	periplasmic protein	101,7	133,1	23,8	BuOH
PP_3582		RND efflux transporter	NR	14,9	NR	BuOH

*NR*: nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen.

### Aminosäurestoffwechsel

Wie Abbildung 5.18 zeigt, wurden mehrere am „Aminosäuretransport und -Metabolismus“ beteiligte Enzyme in Steady-State I im Vergleich zu Steady-State III verstärkt

exprimiert. Darunter die Transporter PP\_0882/PP\_0884, PP\_3814 und PP\_1297 – PP\_1300. In die gleiche Richtung waren auch die Proteine ArcC (PP\_0999) und ArgI (PP\_1000) des Argininmetabolismus reguliert. Das laut COG-Datenbank ebenfalls zum „Aminosäuretransport und -Metabolismus“ gehörende Protein PP\_1661 wurde mit den beiden im gleichen Operon befindlichen Proteinen PP\_1659 und PP\_1660 ebenfalls in Steady-State I verstärkt exprimiert. Die Funktion dieser Proteine im Aminosäure-Metabolismus ist jedoch nicht bekannt. Ebenfalls in Steady-State I induziert waren die in einem Operon organisierten Proteine PP\_3775, PP\_3777 und PP\_3778. Dabei kann PP\_3775 dem Glycin-, Serin- und Threonin-Metabolismus zugeordnet werden. Im Rahmen der 2D-DIGE-Analysen konnte zusätzlich eine Induktion der Enzyme MetE (PP\_2698), MetF (PP\_4977) und PotF-2 (PP\_5181) in Steady-State I festgestellt werden. Während MetE und MetF am „Tetrahydrofolat-Metabolismus“ beteiligt sind, kann PotF-2 dem Arginin-Metabolismus zugeordnet werden. Generell war unter Butanol eine deutlich verminderte Expression von am Transport und an der Biosynthese von Aminosäuren beteiligten Proteinen zu beobachten.

**Tabelle 5.22:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Proteine des Aminosäure-Metabolismus. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_0882	<i>dppA</i>	dipeptide ABC transporter periplasmic dipeptide-binding protein	NR	7	NID	Glu
PP_0884		dipeptide ABC transporter periplasmic peptide-binding protein	NR	11,9	NID	Glu
PP_0999	<i>arcC</i>	carbamate kinase	NR	4	2,4	Glu
PP_1000	<i>argI</i>	ornithine carbamoyltransferase	NR	3,5	2,8	Glu
PP_1001	<i>arcA</i>	arginine deiminase	NR	3	2	Glu
PP_1297	<i>aapJ</i>	general amino acid ABC transporter periplasmic protein	NR	2,5	2,6	Glu
PP_1298	<i>aapQ</i>	polar amino acid ABC transporter inner membrane subunit	NR	6,3	NR	Glu
PP_1300	<i>aapP</i>	general amino acid ABC transporter ATP-binding protein	NR	4,4	3,8	Glu
PP_1659		hypothetical protein	2	5,2	NR	Glu
PP_1660		hypothetical protein	NR	11	NID	Glu
PP_1661		dehydrogenase subunit	2,3	4	NR	Glu
PP_2698	<i>metE</i>	homocysteine S-methyltransferase	NID	NID	NID	

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_3775		sarcosine oxidase	NR	2,9	2,1	Glu
PP_3777		hypothetical protein	2,3	8,7	3,1	Glu
PP_3778	<i>proC-1</i>	pyrroline-5-carboxylate reductase	NR	3,5	NR	Glu
PP_3814		polyamine ABC transporter periplasmic polyamine-binding protein	NR	2,4	NR	Glu
PP_4977	<i>metF</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	NR	NR	NR	
PP_5181	<i>potF-2</i>	putrescine ABC transporter periplasmic putrescine-binding protein	NR	NR	NR	

*NR*: nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

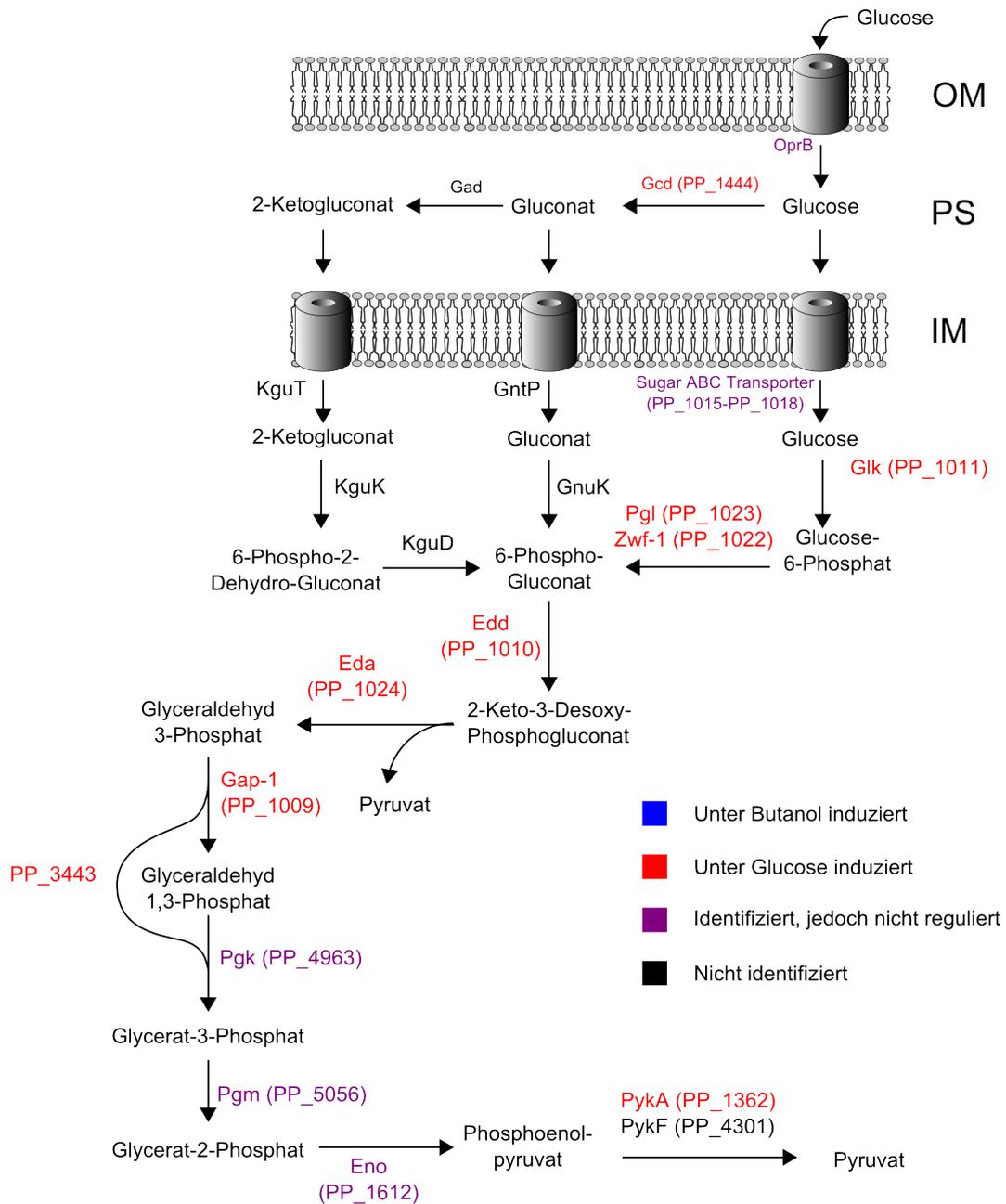
*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen.

### Kohlenhydratstoffwechsel

Während zwischen Steady-State I und Steady-State II keine Veränderungen des Glucose-Metabolismus zu beobachten waren, zeigten einige Proteine des Glucose-Abbaus zwischen Steady-State I und Steady-State III eine differentielle Regulation (Abbildung 5.22)(Tabelle 5.23).

In Steady-State III vermindert exprimiert wurden vor allem Proteine des Glucokinase-Zweiges und die Enzyme des Entner-Doudoroff Weges. Die am Abbau von Glucose über Gluconat beteiligten Enzyme konnten hingegen bis auf Gcd nicht identifiziert werden. Der Glucosetransporter PP\_1015-PP\_1018 sowie das Porin OprB-1 waren nicht differentiiell reguliert. Die verringerte Expression von Proteinen des Glucose-Abbaus lässt sich durch das Vorhandensein von Butanol als alternativer Kohlenstoffquelle erklären. Hierfür spricht auch die Induktion der Enzyme des Glyoxylat-Shunts AceA und GlcB.



**Abbildung 5.22:** Differentielle Regulation des Entner-Doudoroff-Weges und angrenzender Stoffwechselwege in *P. putida* KT2440 zwischen Steady-State I und Steady-State III. Die Abbildungen basiert auf den Daten der GeLCMSMS-Analyse.

**Tabelle 5.23:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Proteine des Glucose-Metabolismus. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_0338	<i>aceF</i>	dihydrolipoamide acetyltransferase	NR	NR	NR	
PP_0339	<i>aceE</i>	pyruvate dehydrogenase subunit E1	NR	NR	NR	
PP_1009	<i>gap-1</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	NR	9,1	6,7	Glu
PP_1010	<i>edd</i>	phosphogluconate dehydratase	NR	4,1	5	Glu
PP_1011	<i>glk</i>	glucokinase	NR	2,7	5,2	Glu
PP_1012	<i>gltR-2</i>	winged helix family two component transcriptional regulator	NR	2,5	NR	Glu
PP_1015		sugar ABC transporter periplasmic sugar-binding protein	NR	NR	NR	
PP_1016		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	NR	NR	NR	
PP_1017		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	NR	NR	NR	
PP_1018		sugar ABC transporter ATP-binding subunit	NR	NR	NR	
PP_1019	<i>oprB-1</i>	porin B	NR	NR	NR	
PP_1022	<i>zuf-1</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	NR	2,3	NR	Glu
PP_1023	<i>pgl</i>	6-phosphogluconolactonase	NR	2,4	NR	Glu
PP_1024	<i>eda</i>	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy- phosphogluconate aldolase	NR	3,5	2,2	Glu
PP_1362	<i>pykA</i>	pyruvate kinase	NR	2,7	3,3	Glu
PP_1444	<i>gcd</i>	glucose dehydrogenase (pyrroloquinoline-quinone)	NR	3,3	NR	Glu
PP_1612	<i>eno</i>	phosphopyruvate hydratase	NR	NR	NR	
PP_3376	<i>kguD</i>	2-ketogluconate 6-phosphate reductase	NID	NID	NID	
PP_3377	( <i>kguT</i> )	major facilitator transporter	NID	NID	NID	
PP_3378	<i>kguK</i>	PfkB domain protein	NID	NID	NID	
PP_3379		xylose isomerase	NID	NID	NID	
PP_3380	<i>ptxS</i>	PtxS family transcriptional regulator	NR	NR	NR	

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_3382	<i>(gad)</i>	gluconate 2-dehydrogenase acceptor subunit	NID	NID	NID	
PP_3383	<i>(gad)</i>	gluconate 2-dehydrogenase acceptor subunit	NID	NID	NID	
PP_3415	<i>GnuR</i>	LacI family transcription regulator	NID	NID	NID	
PP_3417	<i>gntP</i>	gluconate transporter	NID	NID	NID	
PP_3443		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NR	3,9	3,1	Glu
PP_4187	<i>lpdG</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	NR	NR	NR	
PP_4310	<i>pykF</i>	pyruvate kinase	NID	NID	NID	
PP_4963	<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	NR	NR	NR	
PP_5056	<i>pgm</i>	phosphoglyceromutase	NR	NR	NR	
PP_5346	<i>oadA</i>	pyruvate carboxylase subunit B	NR	NR	NR	
PP_5347	<i>accC-2</i>	pyruvate carboxylase subunit A	NR	2,9	NR	Glu

*NR*: Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen.

### Trehalose-Metabolismus

Von Interesse könnte auch die verminderte Expression von am Trehalose-Metabolismus beteiligten Enzymen sein. Im Gegensatz zum Verhalten in den Vanillin-Experimenten, wo diese Enzyme unter Vanillin deutlich induziert waren (s. Abschnitt 5.3.4), zeigt sich unter Butanol eine entgegengesetzte Regulation (Induktion unter Glucose). Während die Induktion unter Vanillin auf Stress zurückzuführen sein könnte, lässt sich eine Induktion unter Glucose nicht abschließend erklären. Eine Besprechung der möglichen Funktionen von Trehalose in *P. putida* KT2440 erfolgt in Abschnitt 5.3.4.

**Tabelle 5.24:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Proteine des Trehalose-Metabolismus. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen.

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_4050	<i>glgA</i>	glycogen synthase	2,2	7,2	NR	Glu
PP_4051	( <i>TreZ</i> )	malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	NR	2,2	NR	Glu
PP_4052	<i>malQ</i>	4-alpha-glucanotransferase	2,9	3,6	NR	Glu
PP_4053	( <i>TreY</i> )	maltooligosyl trehalose synthase	2,8	3,5	NR	Glu
PP_4055	<i>glgX</i>	glycogen debranching protein GlgX	2,4	6,9	2,7	Glu
PP_4058	<i>glgB</i>	glycogen branching enzyme	NR	NR	2,1	Glu
PP_4059	( <i>TreS</i> )	trehalose synthase	4	8	NR	Glu
PP_4060		alpha-amylase family protein	NR	NR	NR	

*NR*: Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

(*Gen*): Der Gen-Name stammt nicht aus *P. putida* sondern aus *P. syringae*.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III*: Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen

### Stressantwort

Generell war in keinem der untersuchten Zustände eine deutliche Induktion von Stressproteinen zu beobachten. Während zwischen Steady-State I und Steady-State II keine Regulation festgestellt werden konnte, waren einige mit der Stressantwort assoziierte Proteine zwischen Steady-State I und Steady-State III reguliert. Die regulierten Proteine sind in Tabelle 5.25 zusammengefasst.

Auffällig war die in Steady-State I verstärkte Expression der Proteine DnaK, HtpG, GroEL und SodB, welche im Rahmen der 2D-DIGE-Analyse festgestellt wurde (Steady-State I und Steady-State III). Während DnaK, GroEL und SodB in den GeLCMSMS-Analysen nicht reguliert waren, war HtpG in diesen unter Butanol induziert. Da beide Ergebnisse als valide zu betrachten sind, kommt als mögliche Erklärung vor allem eine posttranslationale Modifikation des Proteins (HtpG) in Betracht. Da PTMs nur mittels 2D-DIGE, nicht jedoch durch eine GeLCMSMS-Analyse standardmäßig erfasst werden, könnte dies die entgegengesetzte Regulation des Proteins in den beiden Experimenten erklären. Auch die Regulation der übrigen in der 2D-DIGE-Analyse regulierten Stressproteine könnte durch PTMs erklärt werden.

**Tabelle 5.25:** In den verschiedenen 1D-Fraktionierungs-Experimenten differentiell regulierte Stressproteine. Proteine wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert  $< 0,05$  und eine Regulation um einen Faktor  $> 2$  aufwiesen

Locus-Tag	Gen	Protein	I vs. II	I vs. III	II vs. III	Reg. In
PP_0915	<i>sodB</i>	superoxide dismutase	NR	NR	NR	
PP_1361	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL	NR	NR	NR	
PP_1623	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma factor RpoS	NR	2,3	NR	BuOH
PP_3095		chaperone-associated ATPase	NR	4,5	7,9	BuOH
PP_4179	<i>htpG</i>	heat shock protein 90	NR	2,2	2,1	BuOH
PP_4727	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	NR	NR	NR	
PP_4894	<i>hfq</i>	RNA-binding protein Hfq	NID	114,4	192,1	BuOH

*NR:* Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID:* Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

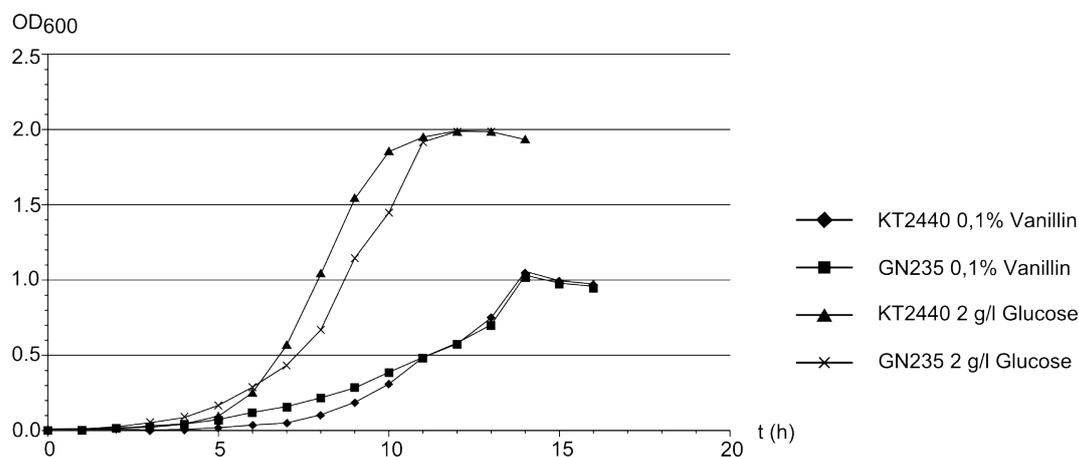
*Reg. In:* Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*I vs. II, I vs. III, II vs. III:* Regulation zwischen den angegebenen Steady-State Zuständen

### 5.3 Untersuchungen zum Vanillin-Metabolismus

Die in diesem Teilprojekt angestrebte Synthese von Vanillin sollte, wie bereits eingangs erläutert, durch heterologe Expression von Genen aus *E. coli* in *P. putida* KT2440 erfolgen. Aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften stellt Vanillin, ähnlich wie Butanol, für *P. putida* KT2440 einen Stressfaktor dar. Vanillin wird daher, wie andere Aromaten auch, über verschiedene Mechanismen aus *P. putida* KT2440 eliminiert. Neben dem Export von Vanillin kann dieses in *P. putida* KT2440 auch zu weniger toxischen Metaboliten abgebaut werden. Hierbei kann Vanillin als alleinige Kohlenstoffquelle genutzt werden. Da toxische Effekte mit der Erhöhung der Vanillinkonzentration zunehmen und bei einer Vanillinkonzentration jenseits von 0,3% kein Wachstum mehr erfolgte, wurde für die Anzucht der zu analysierenden Proben eine Vanillinkonzentration von 0,1% gewählt. Im Gegensatz zu den mit Butanol durchgeführten Experimenten, erfolgte die Zugabe von Vanillin nicht als Puls, sondern wurde als einzige Kohlenstoffquelle direkt im Medium gelöst. Ein Vorteil dieses Vorgehens war, dass Vanillin nicht in einem zusätzlichen Lösungsmittel gelöst werden musste, was bei Vanillinkonzentrationen jenseits von 1% erforderlich ist. Neben *P. putida* KT2440 wurde auch die Mutante *P. putida* GN235 untersucht, welche für das Gen *vdh* (kodiert für das Enzym Vanillin-Dehydrogenase) defizient war. Wie auch die von Overhage *et al.* (1999b) publizierte *vdh*-defiziente Mutante des Stammes *Pseudomonas sp.* HR199, zeigte auch *P. puti-*

da GN235 keine nennenswerten Wachstumsunterschiede zum Wildtyp. Abbildung 5.23 zeigt das Wachstum von *P. putida* KT2440 und *P. putida* GN235 in Gegenwart von 2 g/l Glucose bzw. 0,1% Vanillin. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante wuchsen mit Vanillin als alleiniger Kohlenstoffquelle zu einer deutlich geringeren, finalen OD<sub>600</sub> ( $\sim 1,0$ ) als mit Glucose ( $\sim 2,0$ ). Das Erreichen dieser finalen OD<sub>600</sub> erfolgt zudem deutlich später.



**Abbildung 5.23:** Wachstum von *P. putida* KT2440 und GN235 auf 2 g/l Glucose bzw. 0,1% Vanillin.

Während die Kultivierung der mit Butanol behandelten Bakterien sowohl im Kolben als auch im Fermenter in M12-BVT Medium erfolgte, fiel die Wahl für diesen Versuch auf M12-BASF Medium. Nachdem in Schüttelkolben-Kulturen mit M12-BVT Medium eine verstärkte Aggregatbildung beobachtet wurde und daher neben einer Beeinträchtigung der OD<sub>600</sub> Messungen auch ein Einfluss auf die Proteinexpression nicht ausgeschlossen werden konnte, erschien der Wechsel des Mediums an dieser Stelle sinnvoll. Da für diesen Versuch keine Kultivierung im Bioreaktor durchgeführt wurde, musste außerdem auf die Vergleichbarkeit der beiden Ansätze keine Rücksicht genommen werden. Bereits die Vorkulturen wurden mit den in der Hauptkultur verwendeten Kohlenstoffquellen (2 g/l Glucose, 0,1% Vanillin) in 50 ml M12-BASF Medium angezogen. Die Hauptkulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,01 eingestellt, die Ernte der Zellen erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6. Während die Analyse der aus *P. putida* GN235 gewonnenen Proben ausschließlich mittels 2D-DIGE und der Analyse des Membranproteoms erfolgte, wurden Proben aus *P. putida* KT2440 zusätzlich durch eine GeLCMSMS-Analyse untersucht. Die Besprechung der unter Vanillin induzierten Proteine und Stoffwechselwege erfolgt gemeinsam für alle durchgeführten Experimente in Abschnitt 5.3.4. Eine Liste aller in den einzelnen Experimenten regulierter Proteine befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

### 5.3.1 Analyse der zytosolischen Fraktion durch 2D-DIGE

Die Analyse der beiden Stämme *P. putida* KT2440 und *P. putida* GN235 erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten. Tabelle 5.26 fasst die Eckdaten der Analysen zusammen.

**Tabelle 5.26:** Übersicht über die im Rahmen der Analyse des Vanillin-Metabolismus durchgeführten 2D-DIGE Experimente.

Stamm	pH	Behandlung	Spots <sup>a</sup>	Protein Spots <sup>b</sup>	Reg. Spots <sup>c</sup>	Analysierte Spots <sup>d</sup>	Ident. Spots
KT2440	4-7	0,1% Vanillin	4493	2383	519	68	66
GN235	4-7	0,1% Vanillin	4086	1572	283	65	58

<sup>a</sup> Anzahl der insgesamt detektierten Spots.

<sup>b</sup> Anzahl der Spots, welche in die Auswertung einbezogen wurden (Spikes und Artefakte wurden zuvor entfernt).

<sup>c</sup> Anzahl der Spots, welche nach statistischen Kriterien reguliert waren.

<sup>d</sup> Anzahl der Spots, welche nach manueller Validierung ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert wurden.

#### 5.3.1.1 Differentielle Regulation von Proteinen in *P. putida* KT2440 bei Wachstum auf 0,1% Vanillin

In diesem Versuch waren nach statistischen Kriterien (Regulationsfaktor  $> 1,8$ , p-Wert  $< 0,05$ ) 519 Spots reguliert, wovon nach manueller Validierung 68 Spots ausgestochen und mittels LC-ESI-MS/MS analysiert wurden (Tabelle 5.26). Die große Diskrepanz zwischen „regulierten“ und „analysierten“ Spots ergab sich durch eine große Anzahl an Spikes (Farbartefakten) in diesem Experiment. 55 Spots waren unter Vanillin induziert, 13 wurden vermindert exprimiert. In 66 der 68 Spots konnte mindestens ein Protein identifiziert werden, für zwei Spots erbrachte die massenspektrometrische Analyse kein Ergebnis.

#### 5.3.1.2 Differentielle Regulation von Proteinen in *P. putida* GN235 bei Wachstum auf 0,1% Vanillin

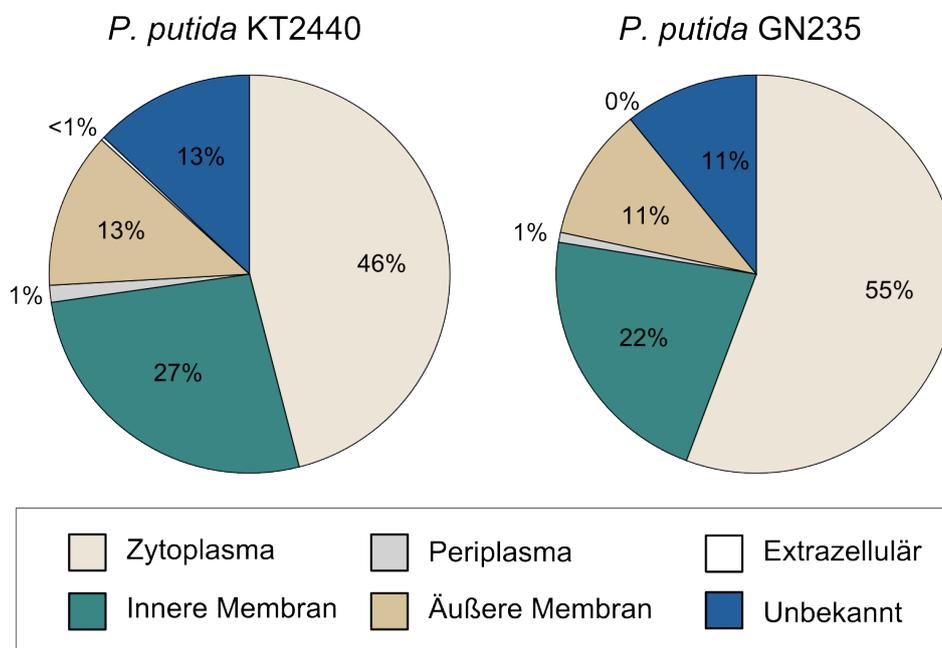
Mit 283 nach statistischen Kriterien regulierten Spots waren in diesem Versuch scheinbar deutlich weniger Spots reguliert als im vorherigen, mit *P. putida* KT2440 durchgeführten Experiment. Aufgrund der in den Gelbildern vorhandenen Hintergrundsignalen (Spikes) wurden auch hier die von der Software ermittelten differentiell regulierten Spots manuell validiert. Da in diesem Versuch deutlich weniger „Spikes“ auftraten, wurden nach manueller Überprüfung 65 Spots aus dem Gel ausgeschnitten, verdaut und mittels

LC-ESI-MS/MS analysiert. Von den 58 identifizierten Spots waren 49 unter Vanillin induziert, 9 zeigten eine verminderte Expression (Tabelle 5.26).

Auch wenn sich die in GN235 unter Vanillin vermindert exprimierte Proteine teilweise von den in *P. putida* KT2440 identifizierten unterschieden, deckten sich die in den beiden Zuständen induzierten bzw. reprimierten Stoffwechselwege größtenteils. Wodurch der Knockout des Enzyms Vanillin-Dehydrogenase (Vdh) kompensiert wurde, ließ sich aus den Daten dieses Experiments nicht ableiten.

### 5.3.2 Analyse des Membranproteoms

Die vor der 2D-DIGE-Analyse durch Ultrazentrifugation abgetrennte Membranfraktion wurde auch in diesem Experiment mittels labelfreier massenspektrometrischer Quantifizierung untersucht.



**Abbildung 5.24:** Verteilung der während der Analyse der Membranfraktion identifizierten Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente.

Der höhere Anteil zytosolischer Proteine in der Mutante *P. putida* GN235 lässt sich vermutlich durch eine geringere Effizienz der Carbonatextraktion in diesem Versuch erklären.

Die Verteilung aller in *P. putida* KT2440 und *P. putida* GN235 identifizierter Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente ist in Abbildung 5.24 dargestellt. Tabelle 5.27 fasst die statistischen Parameter der beiden Versuche zusammen.

**Tabelle 5.27:** Übersicht über die im Rahmen der Analyse des Vanillin-Metabolismus durchgeführten Membranproteom-Analysen.

Stamm	Behandlung	Features	Features (nach Filter)	MS/MS	Ident. Proteine	Reg. Proteine
KT2440	0,1 %Vanillin	21609	14571	8057	382	136
GN235	0,1 %Vanillin	20244	17647	7946	385	76

*Features:* Anzahl der insgesamt detektierten Features (Peptide).

*(nach Filter):* Features, welche nach dem Filtern mit den in Kapitel 4 angegebenen Parametern in der Analyse verblieben (Ladungszustand +2,+3,+4, MW 200 - 1800 Da).

*MS/MS:* Zahl aufgenommener MS/MS-Spektren.

### 5.3.2.1 Differentielle Regulation von Proteinen in *P. putida* KT2440 bei Wachstum auf 0,1% Vanillin

In diesem Versuch konnten insgesamt 382 Proteine identifiziert werden, wovon 36% (136 Proteine) differentiell reguliert waren. Anzumerken ist, dass der relative Anteil an Membranproteinen (innere und äußere Membran) unter den regulierten Proteinen mit 51% deutlich höher lag als unter den insgesamt identifizierten Proteinen (Anteil Membran: 40%). Da die Trennung zwischen Membranfraktion und zytosolischer Fraktion aus den bereits in Abschnitt 5.1.2 erwähnten Gründen nicht absolut ist, wurden auch in diesem Versuch in der Membranfraktion viele dem Zytoplasma zugeordnete Proteine identifiziert. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Verteilung eines Proteins auf die beiden Fraktionen in auf Glucose und Vanillin kultivierten Zellen identisch ist, weshalb sich für den Vergleich zwischen den beiden Zuständen keine technischen Probleme ergeben.

Von den 136 regulierten Proteinen waren 91 unter Vanillin induziert, 45 zeigten in Gegenwart von Vanillin eine verminderte Expression. Wie bereits bei den vorherigen Experimenten stellen die Daten des Membranpoteoms eine umfangreiche Ergänzung der aus den 2D-DIGE-Experimenten gewonnenen Informationen dar.

### 5.3.2.2 Differentielle Regulation von Proteinen in *P. putida* GN235 bei Wachstum auf 0,1% Vanillin

Von den 385 in diesem Versuch identifizierten Proteinen waren 76 Proteine reguliert. Damit war der prozentuale Anteil regulierter Proteine (20%) im Vergleich zu dem entsprechenden Versuch in *P. putida* KT2440 (36%) deutlich geringer. Von den in jedem der beiden Versuche identifizierten Proteinen waren 299 Proteine identisch, 83 (KT2440) bzw. 86 (GN235) Proteine wurden jeweils nur in einem der beiden Versuche identifi-

ziert. Diese Diskrepanz lässt sich vermutlich durch die Tatsache erklären, dass die aus *P. putida* KT2440 und GN235 erzeugten Proben unabhängig voneinander kultiviert, aufgearbeitet und analysiert wurden, was zu einer weit höheren technischen Varianz führt, als innerhalb der beiden Analysen (biologische Replikate). Zudem können bei der Vielzahl von Peptiden, welche zu einem gegebenen Zeitpunkt von der HPLC-Säule eluieren, nicht alle Peptide identifiziert werden. Da die Auswahl der zu fragmentierenden Peptidmassen während einer sogenannten „Data Dependent Acquisition“ (DDA) automatisch erfolgt, können sich die ausgewählten Peptide zwischen den Versuchen unterscheiden und so zu unterschiedlichen Identifizierungen führen. Der Vergleich zwischen den beiden Stämmen anhand der darin identifizierten Proteine ist daher schwierig. Von den 76 in *P. putida* GN235 identifizierten Proteinen waren 53 unter Vanillin induziert, 23 wiesen in diesem Zustand eine verminderte Expression auf. Generell konnten auch in der Membranfraktion keine grundlegenden Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden.

### 5.3.3 1D-Fraktionierung

Der hier beschriebene Versuch wurde analog zu dem bereits im Rahmen des Butanol-Teilprojekts beschriebenen GeLCMSMS-Experiments durchgeführt. Auch hier fand keine Trennung in eine zytosolische und eine Membranfraktion statt. Der Versuch wurde mit drei biologischen Replikaten pro Zustand (Glucose bzw. Vanillin) durchgeführt. Ein Unterschied zu dem in Abschnitt 5.2.3.3 beschriebenen Experiment lag in der Länge des für die LC-ESI-MS/MS-Analyse verwendeten HPLC-Gradienten. An Stelle eines 60 min Gradienten wurde in diesem Versuch ein 116 min Gradient verwendet (s. Kapitel 4).

Außerdem wurden während der „Data Dependent Acquisition“ nicht die sechs sondern die sieben intensivsten MS-Signale für die Fragmentierung ausgewählt. Die Auswertung erfolgte mit dem in Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Softwarepaket Progenesis LC-MS. Um auch in *P. putida* KT2440 nicht annotierte Proteine identifizieren zu können, wurde auch hier neben einer für *P. putida* KT2440 spezifischen Datenbank der bakterielle Teil der NCBI nr-Datenbank in die Suche mit einbezogen. Wie Tabelle 5.28 zeigt, wurden durch den längeren LC-Gradienten deutlich mehr Proteine identifiziert, als in den korrespondierenden Butanol-Experimenten. Insgesamt konnten in diesem Experiment 1536 Proteine identifiziert und quantifiziert werden, was knapp 30% des Gesamtproteoms von *P. putida* KT2440 entspricht. In Tabelle 5.28 sind die Anzahl der in den einzelnen Fraktionen detektierten Peptide (Features), sowie weitere Parameter der Analyse zusammengefasst.

**Tabelle 5.28:** Übersicht über die in den einzelnen Fraktionen detektierten Features, die aufgenommenen und identifizierten MS/MS-Spektren sowie die identifizierten Peptiden.

	<b>Features (Peptide)</b>	<b>Aufgenommene MS/MS-Spektren</b>	<b>Identifizierte MS/MS-Spektren</b>	<b>Identifizierte Peptide</b>
Fraktion 1	5567	4177	1868	1709
Fraktion 2	8573	6333	3220	2923
Fraktion 3	7579	5583	2859	2595
Fraktion 4	8367	6140	3184	2828
Fraktion 5	10394	7398	3986	3523
Fraktion 6	10947	7859	4094	3617
Fraktion 7	9873	7014	3678	3097
Fraktion 8	9236	6650	3443	2893
Fraktion 9	9961	7151	3716	3204
Fraktion 10	9044	6508	3230	2785

*Features:* Anzahl der in einer Fraktion detektierten Features (Peptide).

*Aufgenommene MS/MS-Spektren:* Zahl der in einer Fraktion aufgenommenen MS/MS-Spektren.

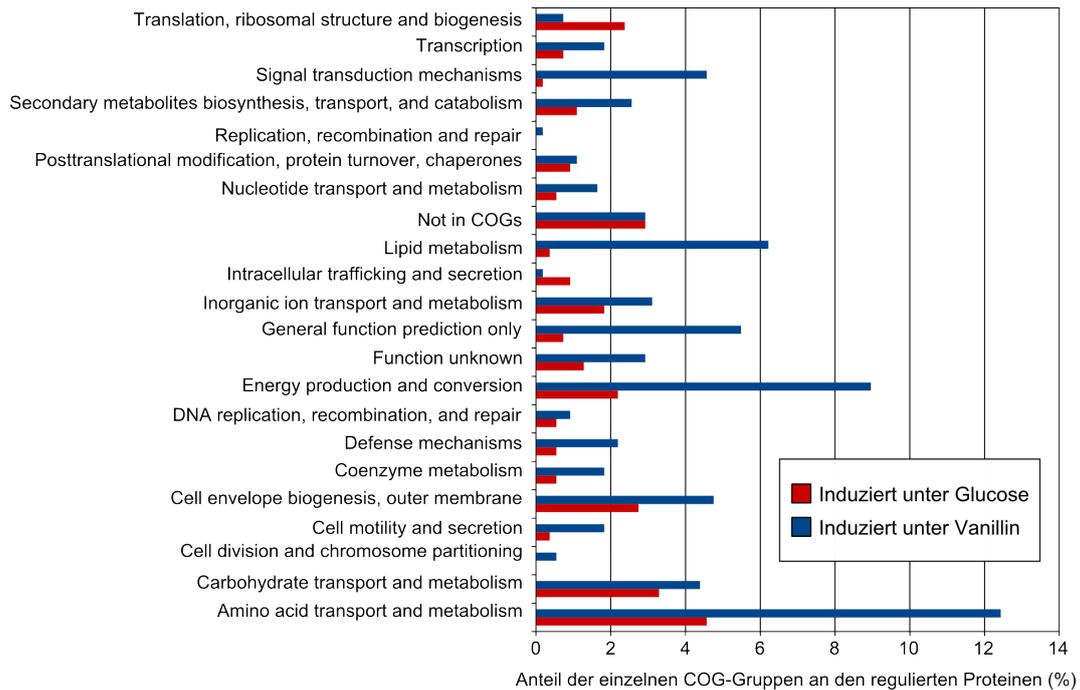
*Identifizierte MS/MS-Spektren:* Zahl der MS/MS-Spektren, welche in der Datenbank identifiziert werden konnten.

*Identifizierte Peptide:* Zahl der identifizierten Peptide.

Im Vergleich zu den Experimenten aus Abschnitt 5.2.3.3 zeigen die Anzahl der detektierten Features und die Anzahl der aufgenommenen MS/MS-Spektren einen linearen Zusammenhang. Gleiches gilt für das Verhältnis von identifizierten Peptiden und detektierten Features. Beide Zusammenhänge sowie die im Vergleich zu den Butanol-Experimenten höhere Gesamtzahl identifizierter Proteine weisen darauf hin, dass die durch die Verlängerung des UPLC-Gradienten erreichte Reduktion der Komplexität der Probe zu einem deutlichen Informationsgewinn führte.

Insgesamt waren 569 Proteine differenziell reguliert. Hiervon waren 169 Proteine unter Vanillin in ihrer Expression vermindert, 400 Proteine zeigten eine verstärkte Expression. Um einen besseren Überblick über die Gesamtheit der Regulationen zu erhalten, wurden die regulierten Proteine anhand ihrer in der COG-Datenbank hinterlegten Funktion gruppiert. Abbildung 5.25 zeigt die prozentuale Verteilung der regulierten Proteine auf die einzelnen COG-Kategorien.

Es wird deutlich, dass in beiden untersuchten Zuständen vor allem der Energie- und der Aminosäure-Metabolismus starken Regulationen unterworfen waren. Da unter Vanillin deutlich mehr Proteine als unter Glucose induziert waren, haben diese in fast allen Kategorien einen höheren Anteil als unter Glucose induzierte. Die meisten der unter Va-

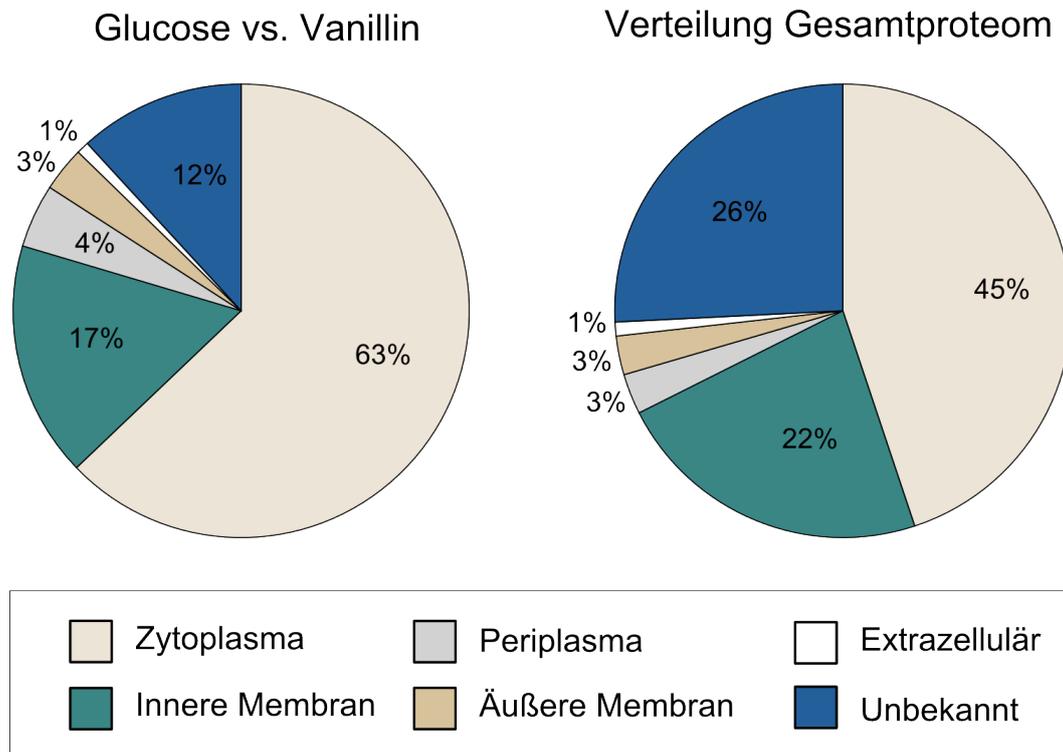


**Abbildung 5.25:** Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie.

Die einzelnen Balken spiegeln den Anteil der entsprechenden Kategorie, an den insgesamt regulierten Proteinen wider. Die Kategorie „Not in COGs“ enthält Proteine, für die in der Datenbank keine COG-Informationen vorhanden waren.

nillin induzierten Proteine konnten neben dem bereits erwähnten Energie-Metabolismus den Bereichen „Lipid-Metabolismus“, „Aminosäure-Transport und Metabolismus“ sowie „Signaltransduktion“ zugeordnet werden.

In diesem Versuch waren zytosolische Proteine im Vergleich zur vorhergesagten Verteilung des Gesamtproteoms leicht über-, Proteine der Plasmamembran leicht unterrepräsentiert (Abbildung 5.26). Die möglichen Gründe hierfür wurden bereits in Abschnitt 5.2.3.3 besprochen.



**Abbildung 5.26:** Verteilung der während des 1D-Fraktionierungs-Experiments in *P. putida* KT2440 identifizierten Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente. Die Verteilung der Proteine des Gesamtproteoms von *P. putida* KT2440 wurde der „Pseudomonas Genome Database“ entnommen.

Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Experimenten (2D-DIGE- und Membranproteom-Experimente) wurde eine fast lückenlose Abdeckung der in den beiden Zuständen regulierten Stoffwechselwege erreicht.

### 5.3.4 Regulierte Stoffwechselwege in *P. putida* KT2440 unter 0,1% Vanillin

Wie bereits im Teilprojekt Butanol erfolgt die Besprechung der regulierten Stoffwechselwege, wenn nicht explizit anders erwähnt, auf Basis der aus der GeLCMSMS-Analyse erhaltenen Daten.

### Glucose-Metabolismus

Eine verminderte relative Expression unter Vanillin zeigten vor allem Proteine, welche an der Aufnahme und dem Abbau von Glucose beteiligt waren. Wie von Del Castillo *et al.* (2008) anhand von Microarray-Daten postuliert, erfolgt der Glucose-Abbau in *Pseudomonas putida* über drei verschiedene Wege, welche in 6-Phosphogluconat konvergieren.

So waren neben dem Porin OprB-1 auch die Transporter der inneren Membran für Glucose (PP\_1015-PP\_1018), Gluconat (GntP) und 2-Ketogluconat (KguT) unter Glucose induziert. Auch die periplasmatischen Enzyme, welche die Umwandlung von Glucose in Gluconat und anschließend in 2-Ketogluconat katalysieren, waren differenziell reguliert. Während das Enzym Gluconat-Dehydrogenase unter Glucose induziert war, wurde die Glucose-Dehydrogenase in diesem Zustand vermindert exprimiert. Auch die intrazellulären Enzyme, welche die drei Metaboliten (Glucose, Gluconat und 2-Ketogluconat) in 6-Phosphogluconat umwandeln und die initialen Schritte des Entner-Doudoroff-Weges darstellen, waren bis auf GnuK (PP\_3416), welches nicht identifiziert werden konnte, induziert.

Im Folgenden waren alle weiteren Schritte des Entner-Doudoroff-Weges bis zum Metaboliten „3-Phosphoglycerat“, sowie die Enzym(-Komplexe) Pyruvat-Dehydrogenase- und Pyruvat-Carboxylase unter Glucose induziert. Die dazwischenliegenden Schritte wiesen entweder keine Regulation auf (Pgm, Eno, PgK, PykA) oder konnten nicht identifiziert werden (PykF). Die von Del Castillo *et al.* (2008) beschriebenen Regulatoren des Glucose-Metabolismus wurden bis auf HexR ebenfalls reguliert gefunden. Eine ausführliche Diskussion der induzierten Regulatoren GnuR, PtxS und GltR-2 befindet sich in Abschnitt 6.3. Wie mit Butanol behandelte Zellen wiesen auch in Vanillin kultivierte Zellen eine verminderte Expression des nicht näher charakterisierten Operons (PP\_3781-PP\_3788) auf (Winsor *et al.*, 2011).

**Tabelle 5.29:** Übersicht über die identifizierten Proteine des Glucose-Metabolismus sowie deren Regulation in den unterschiedlichen durchgeführten Analysen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_0338	<i>aceF</i>	dihydrolipoamide acetyltransferase	2,7	7,4	2,2	Glu
PP_0339	<i>aceE</i>	pyruvate dehydrogenase subunit E1	2,6	4,6	-	Glu
PP_1009	<i>gap-1</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	39,6	100	-	Glu
PP_1010	<i>edd</i>	phosphogluconate dehydratase	38,8	176,4	-	Glu
PP_1011	<i>glk</i>	glucokinase	27,8	-	-	Glu
PP_1012	<i>gltR-2</i>	winged helix family two component transcriptional regulator	12,9	-	-	Glu
PP_1015		sugar ABC transporter periplasmic sugar-binding protein	67,3	76,5	12	Glu
PP_1016		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	178,5	253	-	Glu
PP_1017		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	2406,1	59,9	-	Glu
PP_1018		sugar ABC transporter ATP-binding subunit	337,3	28,3	7,7	Glu
PP_1019	<i>oprB-1</i>	porin B	95,6	74,5	5,4	Glu
PP_1022	<i>zwf-1</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	46,4	351,3	6,3	Glu
PP_1023	<i>pgl</i>	6-phosphogluconolactonase	84,7	65	14	Glu
PP_1024	<i>eda</i>	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy- phosphogluconate aldolase	158,5	1257,9	-	Glu
PP_1444	<i>gcd</i>	glucose dehydrogenase (pyrroloquinoline-quinone)	3	-	-	Van
PP_3376	<i>kguD</i>	2-ketogluconate 6-phosphate reductase	226	45,3	-	Glu
PP_3377	<i>(kguT)</i>	major facilitator transporter	2081,3	30,4	-	Glu
PP_3378	<i>kguK</i>	PfkB domain protein	1334,7	-	-	Glu
PP_3379		xylose isomerase	78	-	-	Glu
PP_3380	<i>ptxS</i>	PtxS family transcriptional regulator	3,8	-	-	Glu
PP_3382	<i>(gad)</i>	gluconate 2-dehydrogenase acceptor subunit	544,1	-	-	Glu

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_3383	<i>(gad)</i>	gluconate 2-dehydrogenase acceptor subunit	100,4	-	-	Glu
PP_3415	<i>GnuR</i>	LacI family transcription regulator	13,4	-	-	Glu
PP_3417	<i>gntP</i>	gluconate transporter	40,5	257,2	-	Glu
PP_3443		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5,5	-	-	Glu
PP_4187	<i>lpdG</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	1,3	1,7	-	Glu
PP_5346	<i>oadA</i>	pyruvate carboxylase subunit B	12	5,9	4,1	Glu
PP_5347	<i>accC-2</i>	pyruvate carboxylase subunit A	11,7	25	-	Glu

-. Nicht identifiziert / reguliert.

*Reg. 1D*: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

*Reg. Mem*: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

*Reg. 2D*: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

### Unter Glucose induzierte Transporter und Efflux-Systeme

Auf Ebene der äußeren Membran war neben dem für die Glucose Aufnahme entscheidenden Protein OprB-1 auch das Porin OprE unter Glucose induziert. Obwohl die Substratspezifität von OprE nicht bekannt ist, scheint es bei der Chrom-Resistenz eine wichtige Rolle zu spielen (Rivera *et al.*, 2008). Auch eine Beteiligung am Aminosäuretransport (Arginin, Prolin) wurde postuliert (Tamber *et al.*, 2006). Das unspezifische (allgemeine) Porin OprF wies hingegen zwischen den beiden Zuständen keine quantitativen Unterschiede in seiner Expression auf. Diese Beobachtung deckt sich mit der Feststellung, dass *Pseudomonaden*, im Gegensatz zu anderen gramnegativen Bakterien, einen Großteil des Membrantransports über spezifische und nicht über unspezifische Porine bewerkstelligen (Tamber *et al.*, 2006). Neben den oben genannten Porinen waren auch zwei Porine der NodT Familie (PP\_3582, PP\_4211) unter Glucose induziert. Typisch für diese Familie ist der dreigliedrige Aufbau, welcher aus einer „ABC-Transporter-ATPase“, einem „Membrane Fusion Protein (MFP)“ und dem bereits erwähnten Porin besteht. Die Komponenten der inneren Membran waren wie die Porine ebenfalls induziert (PP\_3585 bzw. PP\_4209-PP\_4210). Es kann davon ausgegangen werden, dass RND-Efflux-Systeme dieses Typs kleine Moleküle transportieren (Poole, 2001). Die genauen Substrate der beiden unter Glucose induzierten Transporter sind jedoch nicht bekannt. Zusätzlich zu diesen RND-Transportern waren einige Untereinheiten von Transportern, welche an der Eisenaufnahme beteiligt sind, unter Glucose induziert (PP\_3612, PP\_5196, PP\_3155, PP\_3325). Für einen erhöhten Eisenbedarf

unter Glucose spricht auch die Induktion von TonB und ExbB (PP\_5306, PP\_5308), welche bei der Regulation verschiedener Eisentransporter eine Rolle spielen. Auch einige nicht näher charakterisierte Aminosäure-Transporter zeigten eine verstärkte Expression unter Glucose.

Wie Abbildung 5.25 zeigt, weisen unter Glucose kultivierte Zellen eine deutliche Induktion von an der Proteinbiosynthese beteiligten Proteinen (im Vergleich zu Vanillin kultivierten Zellen) auf, was auf eine verstärkte Expression ribosomaler Proteine (PP\_0455, PP\_0464, PP\_0466, etc.) zurückzuführen ist.

**Tabelle 5.30:** Übersicht über die identifizierten Transporter, Porine und Efflux-Systeme sowie deren Regulation in den verschiedenen Analysen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_0234	<i>oprE</i>	outer membrane porin	5,2	2,7	-	Glu
PP_1015		sugar ABC transporter periplasmic sugar-binding protein	67,3	76,5	12	Glu
PP_1016		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	178,5	253	-	Glu
PP_1017		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	2406,1	59,9	-	Glu
PP_1018		sugar ABC transporter ATP-binding subunit	337,3	28,3	7,7	Glu
PP_1019	<i>oprB-1</i>	porin B	95,6	74,5	5,4	Glu
PP_3155		outer membrane ferric siderophore receptor	12,7	38,5	-	Glu
PP_3325		outer membrane ferric siderophore receptor	2,4	3,9	3,6	Glu
PP_3377	<i>(kguT)</i>	major facilitator transporter	2081,3	30,4	-	Glu
PP_3417	<i>gntP</i>	gluconate transporter	40,5	257,2	-	Glu
PP_3582		RND efflux transporter	2,8	-	-	Glu
PP_3585		efflux transporter RND family, MFP subunit	3,9	-	-	Glu
PP_3612		TonB-dependent siderophore receptor	7,7	15,1	-	Glu
PP_4209		efflux transporter RND family, MFP subunit	6	-	-	Glu
PP_4210		efflux ABC transporter ATP-binding protein	3	-	-	Glu
PP_4211		RND efflux transporter	2,4	-	-	Glu

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_5196		iron ABC transporter periplasmic iron-binding protein	7,6	-	-	Glu
PP_5306	<i>exbB</i>	ferric siderophore transport system protein ExbB	2,6	2,8	-	Glu
PP_5308	<i>tonB</i>	TonB family protein	3,4	-	-	Glu

-.: Nicht identifiziert / reguliert.

Reg. 1D: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

Reg. Mem: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

Reg. 2D: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

Reg. In: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

### Citratzyklus

Auf Ebene des Citratzyklus zeigten die Succinyl-CoA Synthetase (SucC, SucD), die Malat: Quinon Oxidoreduktasen (Mqo-1) sowie die Fumarase (FumC) eine verminderte Expression unter Vanillin. FumC-2 und PP\_0897 sowie Mqo-3 waren hingegen unter Vanillin induziert. Somit unterschieden sich die Regulationen der Malat: Quinon Oxidoreduktasen und der Fumarasen zwischen den einzelnen Isoenzymen. Zudem konnte unter Vanillin eine Induktion der beiden Enzyme des Glyoxylat-Shunts (AceA, GlcB) festgestellt werden. Als weitere Komponenten des Citratzyklus waren die Enzyme AcnA, PP\_2336, SdhABCD und Icd in auf Vanillin kultivierten Zellen induziert.

**Tabelle 5.31:** Übersicht über die identifizierten Proteine des Citrat-Zyklus sowie deren Regulation in den verschiedenen Analysen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_0356	<i>glcB</i>	malate synthase G	3,8	-	-	Van
PP_0751	<i>mgo-1</i>	malate:quinone oxidoreductase	2,2	-	-	Glu
PP_0897		hydro-lyase, Fe-S type, tartrate/fumarate subfamily, alpha subunit	2,2	3,3	5,2	Van
PP_0944	<i>fumC</i>	fumarate hydratase	2,7	3,4	-	Glu
PP_1755	<i>fumC-2</i>	fumarate hydratase	5,6	-	-	Van
PP_2112	<i>acnA</i>	aconitate hydratase	7,1	-	-	Van
PP_2336		aconitate hydratase	2,8	-	-	Van
PP_2925	<i>mgo-3</i>	malate:quinone oxidoreductase	338,1	-	-	Van

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_4011	<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent	5,7	-	3,6	Van
PP_4116	<i>aceA</i>	isocitrate lyase	5,2	9,5	3,3	Van
PP_4185	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	-	3		Glu
PP_4186	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase subunit beta	-	2,5		Glu
PP_4189	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	-	-	-	
PP_4190	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	-	2,2	-	Van
PP_4191	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	2,1	-	1,9	Van
PP_4192	<i>sdhD</i>	succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane anchor protein	-	2,9	-	Van
PP_4193	<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit	-	3,2	-	Van

-: Nicht identifiziert / reguliert.

*Reg. 1D*: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

*Reg. Mem*: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

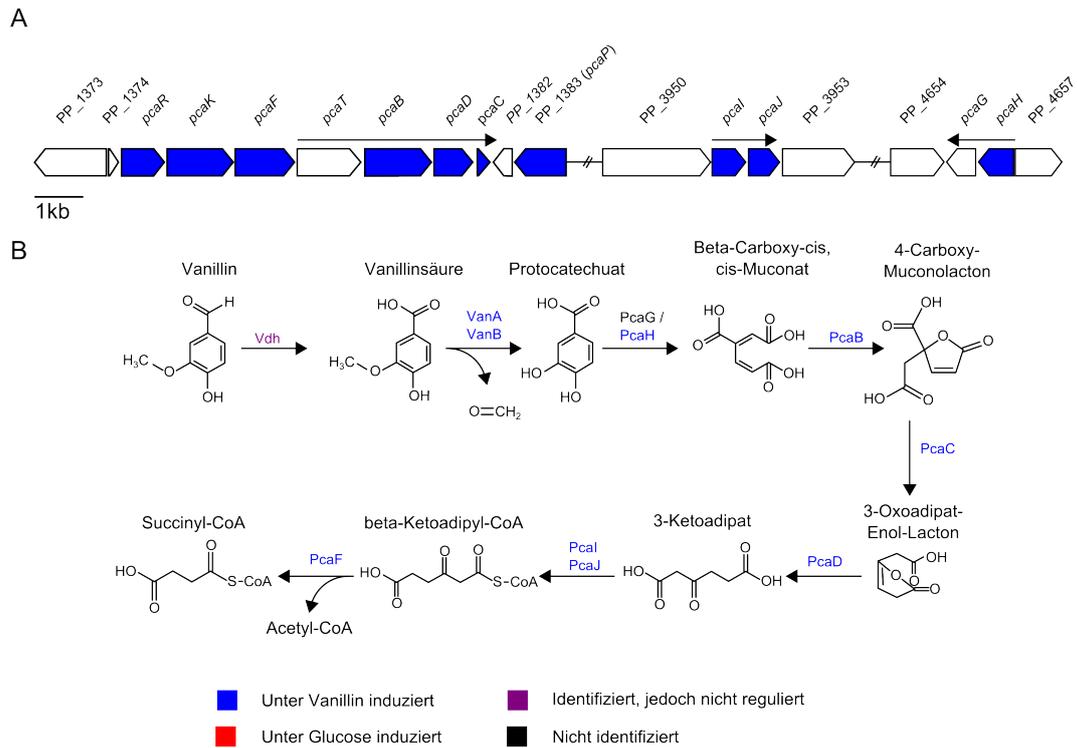
*Reg. 2D*: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

### Vanillin-Abbau und der $\beta$ -Ketoacidat-Weg

In Gegenwart von Vanillin war vor allem eine verstärkte Expression der Enzyme des Protocatechuat-Zweiges des  $\beta$ -Ketoacidat-Wegs zu beobachten. Bis auf PcaG, welches mit keiner der verwendeten Methoden identifiziert werden konnte, waren alle Proteine des Pca-Zweiges unter Vanillin induziert (Abbildung 5.27).

Downstream von Vanillinsäure waren die beiden Untereinheiten der Vanillat-Demethylase (VanA und VanB), welche die Umsetzung von Vanillinsäure zu Protocatechuat katalysieren, induziert. Das Enzym Vanillin-Dehydrogenase (Vdh), welches mutmaßlich den ersten Schritt des Vanillinabbaus katalysiert, wurde in diesen Experimenten (GeLCMSMS) zwar identifiziert, zeigte jedoch keine Regulation. Die von Overhage *et al.* (1999b) als VDH-II beschriebene Coniferylaldehyd-Dehydrogenase (PP\_5120) war hingegen unter Vanillin 6,9-fach induziert. Da in diesem Versuch keine absoluten Enzymmengen und auch keine Umsatzraten bestimmt wurden, lässt dieses Ergebnis jedoch noch keinen Schluss über den ersten Schritt des Vanillinabbaus in *P. putida*



**Abbildung 5.27:** Differenziell regulierte Proteine des  $\beta$ -Ketoadipat-Weges.

A) Genabschnitte welche für Enzyme des Protocatechuat-Zweiges oder für daran beteiligte Transporter kodieren. Bekannte Operons wurden durch Pfeile markiert. B) Vermuteter Abbauweg von Vanillin zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA mit daran beteiligten Enzyme in *P. putida* KT2440. Die Regulationsfaktoren der einzelnen Proteine in den unterschiedlichen Versuchen sind in Tabelle 5.32 zusammengefasst.

KT2440 zu. Die Tatsache, dass *P. putida* GN235 ein ähnliches Wachstumsverhalten wie *P. putida* KT2440 zeigte, deutet jedoch darauf hin, dass Vdh nicht für die Umsetzung von Vanillin zu Vanillinsäure benötigt wird. Ein weiteres Enzym, welches ebenfalls die Umsetzung von Vanillin zu Vanillinsäure katalysieren könnte, ist das Enzym Benzaldehyd-Dehydrogenase (PP\_1948, 57-fach in GeLCMSMS), welches auch im Rahmen der 2D-DIGE-Analyse der Mutante GN235 (2,8-fach) identifiziert wurde. Dieses Enzym liegt in der unter Vanillin stark induzierten Genregion PP\_1943-PP\_1957. Die übrigen Gene dieser Region kodieren für Enzyme des „Glycin-Cleavage-Systems“ und des Tetrahydrofolat-Metabolismus und spielen daher sowohl im Ana- und Katabolismus der Aminosäuren Serin und Glycin als auch bei der Biosynthese von Nukleinsäuren eine wichtige Rolle. Darüber hinaus werden über den Tetrahydrofolat-Metabolismus C<sub>1</sub>-Körper für verschiedene zelluläre Prozesse (Aminosäuresynthese, Purinsynthese, Methylierung, etc.) bereitgestellt.

Neben den beschriebenen Enzymen des Protocatechuat-Weges wurde auch das Enzym 4-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PobA) welches 4-Hydroxybenzoat in Protocatechuat umwandelt unter Vanillin induziert. Worauf dessen Induktion beruht, lässt sich anhand der erhobenen Daten jedoch nicht beurteilen.

In *P. putida* KT2440 liegen die Gene des Protocatechuat-Weges in vier Clustern *pcaF* (PP\_1377), *pcaBDC* (PP\_1379-PP\_1381), *pcaIJ* (PP\_3951-PP\_3952) und *pcaGH* (PP\_4655-PP\_4656) (Morales *et al.*, 2004). Dabei verschmelzen die ersten beiden Cluster durch die Transporter *pcaK* (PP\_1376) und *pcaT* (PP\_1378) mit *pcaR* (PP\_1375) zu einem großen, am Transport und dem Abbau von Vanillin beteiligten Gen-Cluster. Für die Regulation eines Großteils dieser Gene ist der Regulator PcaR zuständig, welcher zusammen mit  $\beta$ -Ketodipat deren Transkription induziert. Nach Jiménez *et al.* (2002) handelt es sich dabei um die Gene *pcaF*, *pcaIJ* und *pcaDC*. Inwieweit die Transporter *pcaK* und *pcaT* sowie *pcaB* oder gar *pcaP* der Kontrolle durch PcaR unterliegen, wurde bis dato nicht untersucht. Abbildung 5.27 zeigt die Gene des *pca*-Clusters, die Regulation der durch diese kodierten Proteine, sowie die Regulation weiterer am Vanillin-Abbau beteiligter Enzyme.

**Tabelle 5.32:** Übersicht über die identifizierten Proteine des *pca*-Clusters sowie deren Regulation in den verschiedenen Analysen.

Zusätzlich wurden weitere, mutmaßlich am Vanillin-Abbau beteiligte Proteine in die Tabelle aufgenommen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_1375	<i>pcaR</i>	<i>pca</i> regulon regulatory protein	2,2	-	-	Van
PP_1376	<i>pcaK</i>	benzoate transport	41,9	211,8	-	Van
PP_1377	<i>pcaF</i>	beta-ketoadipyl CoA thiolase	219	22,8	7,2	Van
PP_1379	<i>pcaB</i>	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	92,7	117	6,1	Van
PP_1380	<i>pcaD</i>	3-oxoadipate enol-lactonase	35,1	59,3	-	Van
PP_1381	<i>pcaC</i>	4-carboxymuconolactone decarboxylase	-	-	4,9	Van
PP_1383	<i>pcaP</i>	BenF-like porin	223,3	154,8	-	Van
PP_3537	<i>pobA</i>	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	545,6	46	-	Van
PP_3736	<i>vanA</i>	Rieske (2Fe-2S) domain protein	126,1	482,2	7,6	Van
PP_3737	<i>vanB</i>	ferredoxin	412,9	77,7	9,3	Van
PP_3951	<i>pcaI</i>	3-oxoadipate CoA-transferase, subunit A	1349,9	549	14	Van
PP_3952	<i>pcaJ</i>	3-oxoadipate CoA-transferase, subunit B	4442	up	5,1	Van
PP_4656	<i>pcaH</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit	105,7	1794,2	-	Van
PP_1948		benzaldehyde dehydrogenase	57,2	-	-	Van
PP_5120		conifer aldehyde dehydrogenase	6,9	-	-	Van

-: Nicht identifiziert / reguliert.

Reg. 1D: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

Reg. Mem: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

Reg. 2D: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

Reg. In: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

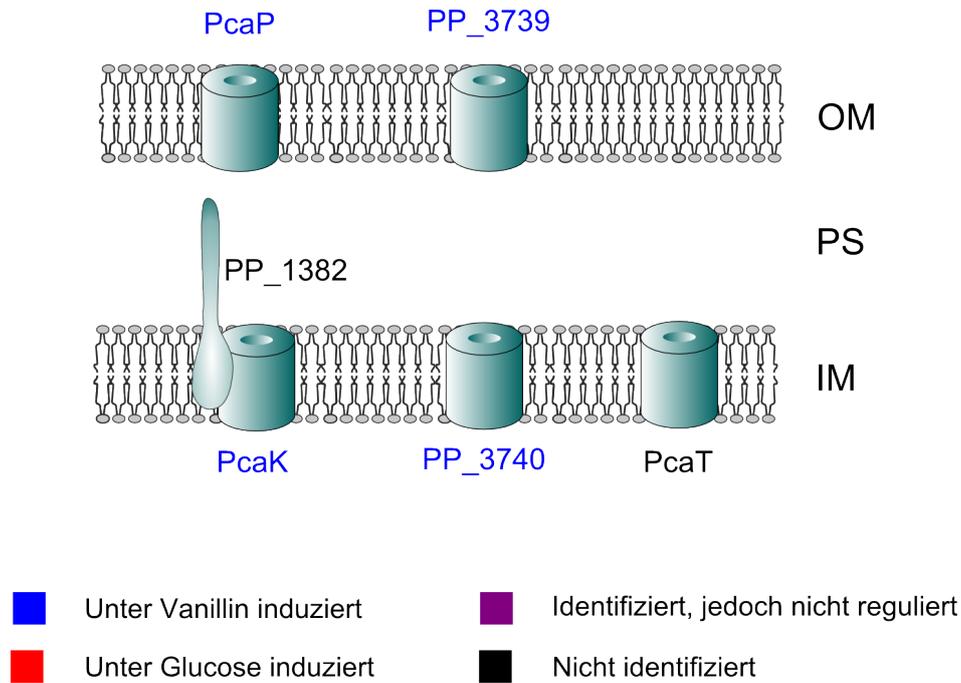
up: Das Protein wurde nur in Gegenwart von Vanillin gefunden.

### Unter Vanillin induzierte Transporter und Efflux-Systeme

Zu den Genen *vanA* und *vanB* benachbart liegt ein stark induzierter (2000-fach) Transporter der inneren Membran (PP\_3740), welcher der „Major Facilitator of Transport“-Superfamilie angehört, sowie ein in der *P. putida* KT2440 Datenbank nicht in eine Proteinsequenz übersetztes Gen (PP\_3739), welches einen „Frameshift“ aufweist. Das Gen

PP\_3739 zeigte bei einem BLAST-Alignment 76% Sequenzidentität (e-value: 1.0E-164) mit *opdK* aus *P. aeruginosa*, einem spezifischen Porin, welches unter anderem Vanillinsäure transportiert (Tamber *et al.*, 2006). In unseren Analysen wurde jedoch nicht das homologe Protein aus *P. aeruginosa* sondern das aus *P. putida* F1, welches eine Sequenzidentität von 97% (e-value: 0.0) aufweist, identifiziert. Aufgrund der Homologie ist zu vermuten, dass dieses ebenfalls stark regulierte Porin (185-fach) zusammen mit PP\_3740 für den Transport von Vanillin/Vanillinsäure verantwortlich ist. Zu *pcaF* benachbart wurde ein ähnliches Transportsystem gefunden. Während PP\_1377 (*pcaF*) für das Enzym  $\beta$ -Ketoadipyl CoA Thiolase, welches den letzten Schritt des  $\beta$ -Ketoadipate Weges katalysiert, kodiert, handelt es sich bei dem Genprodukt von PP\_1376 um den Transporter PcaK. Dieser Transporter wurde von Nichols *et al.* (1997) als spezifisch für 4-Hydroxybenzoat und Protocatechuat beschrieben. Neben seiner Rolle als Transporter soll PcaK auch bei der Chemotaxis eine Rolle spielen (Harwood *et al.*, 1994). Etwas entfernt von *pcaK* und oberhalb des Clusters *pcaBDC* liegt das Gen *pcaP*. Dieses Gen codiert für ein Porin der OprD Familie und ist wie auch PcaK unter Vanillin induziert. Aufgrund seiner Nachbarschaft zu den *pcaBDC*-Genen sowie dem *ttgABC*-Efflux-System könnte dieses Porin in Zusammenhang mit dem Transport von Intermediaten des Protocatechuat-Metabolismus stehen. Welchen Metaboliten dieses Porin tatsächlich transportiert, ist jedoch nicht bekannt. Das direkt benachbarte Gen PP\_1382 kodiert möglicherweise für ein „Membrane Fusion Protein“, welches jedoch in keinem unserer Versuche identifiziert werden konnte. Ob PcaK, PcaP und PP\_1382 eine funktionelle Einheit bilden, lässt sich daher nicht mit Sicherheit sagen. Der durch PP\_1378 kodierte  $\beta$ -Ketodipat-Transporter PcaT, welcher zwischen den Clustern *pcaF* und *pcaBDC* liegt, konnte ebenfalls nicht identifiziert werden. Abbildung 5.28 fasst die regulierten Transporter/Porine zusammen.

Wie Santos *et al.* (2004) feststellten, kann *P. putida* KT2440 aufgrund seiner genetischen Ausstattung mindestens vier Multi-Drug-Efflux-Systeme, nämlich TtgABC, Ttg2A2B2C, MexC/MexD/OprJ und MexE/MexF/OprN, exprimieren. Hiervon waren unter Vanillin sowohl TtgABC als auch MexE/MexF/OprN induziert. Die beiden anderen, auf dem Chromosom kodierten Efflux-Systeme waren entweder nicht reguliert (Ttg2A2B2C) oder konnten nicht identifiziert werden (MexC/MexD/OprJ). Während TtgABC eine Rolle beim Transport organischer Lösungsmittel zugeschrieben wurde (Ramos *et al.*, 1998), steht MexE/MexF/OprN offenbar mit der Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* in Zusammenhang (Chloramphenicol, Trimethoprim, Fluorchinolone und Triclosan) (Fetar *et al.*, 2011). Fetar *et al.* (2011) zeigten auch, dass MexT, welcher zur Familie der „LysR-Type Transcriptional Activators“ gehört und unter Vanillin ebenfalls induziert war (2,2-fach), für die Expression von MexE/MexF/OprN in *P. aeruginosa* essentiell ist. Eine Überexpression von MexT führte in *P. aeruginosa* zu einer



**Abbildung 5.28:** Regulierte Transport-Proteine welche mit dem Transport von Vanillin oder dessen Metaboliten in Verbindung stehen.

Die Regulationsfaktoren der einzelnen Proteine in den unterschiedlichen Versuchen sind in Tabelle 5.33 zusammengefasst.

verstärkten Expression von MexE/MexF/OprN (Fetar *et al.*, 2011). Anders stellt sich die Situation allerdings in *Pseudomonas syringae* (pv. tabaci 6605) dar. Kawakita *et al.* (2012) zeigten, dass die Expression von MexE/MexF/OprN in diesem Bakterium unabhängig von MexT erfolgt. Ob die Expression des Efflux-Systems MexE/MexF/OprN auch in *P. putida* KT2440 unabhängig von MexT erfolgt, lässt sich anhand der vorhandenen Daten nicht klären.

Ebenfalls stark induziert waren einige Transportsysteme, welche der Kategorie der Typ I-Sekretionssysteme zuzuordnen sind. Der grundlegende Aufbau dieser Systeme ist, wie auch bei den RND-Efflux-Systemen (TtgABC, MexE/MexF/OprN), dreigliedrig. Zu den Komponenten der inneren Membran zählen das so genannte MFP (Membrane Fusion Protein) und ein ABC-Transporter. Die Komponente der äußeren Membran ist ein so genanntes OEP (Outer Membrane Efflux Protein), welches im Fall der Typ I-Sekretionssysteme, der TolC-Familie zuzuordnen ist (Zgurskaya *et al.*, 2011). Neben dem Transport von Proteinen, sind Typ I-Sekretionssysteme auch am Transport verschiedener Peptide, Polysaccharide und kleiner Moleküle beteiligt (Holland *et al.*, 2005). Den Prototypen dieses Systems stellt das HlyA-Exportsystem von *E. coli* dar, welches aus den Komponenten HlyB, HlyD und TolC aufgebaut ist (Mackman *et al.*, 1985). Da in diesem Experiment nicht in jedem Fall alle Komponenten eines Trans-

portsystems identifiziert werden konnten, wurde auch bei einer Induktion einer Komponente von der Induktion des Gesamtsystems ausgegangen. Unter Vanillin induziert waren unter anderem PP\_0176, PP\_0178, PP\_0179 und PP\_0804-PP\_0806 sowie PP\_0906-PP\_0907. Die Funktion der potentiellen Efflux-Systeme PP\_0804-PP\_0806 und PP\_0906-PP\_0907 ist unbekannt.

Neben dem komplett regulierten System PP\_0176, PP\_0178, PP\_0179 war auch PP\_1152 (HlyD family protein), welches einem ähnlichen Cluster angehört induziert. Obwohl die beiden Export-Systeme als Fusarinsäure-Transporter in der „Pseudomonas Genome Datenbank“ annotiert sind, könnten sie laut der Conserved Domain Datenbank (CDD), auch eine Rolle beim Transport anderer Aromaten spielen (Marchler-Bauer *et al.*, 2011). Ein entsprechendes OEP war auf dem Genom nicht benachbart, was aufgrund der Tatsache, dass mehrere Transportsysteme das gleiche OEP nutzen können nicht gegen eine Funktion des Transport-Systems im Vanillin-Metabolismus spricht. Ebenfalls induziert war das Typ-I-Sekretionssystem PP\_1271-PP\_1273, wovon PP\_1272 und PP\_1273 unter Vanillin induziert waren. PP\_1272 war auch in *P. putida* S12 nach Behandlung mit Toluol induziert (Wijte *et al.*, 2011). Die in der gleichen Arbeit beschriebene Acetat Permease (ActP) wurde auch in unseren Experimenten unter Vanillin verstärkt exprimiert und war bereits unter Butanol und Ethylenglycol ebenfalls induziert. Die mögliche Funktion von ActP wird in Kapitel 6.1 diskutiert. Das MFP EmrA (PP\_3549), welches zusammen mit PP\_3548 ein weiteres Sekretionssystem bildet, zeigte unter Vanillin ebenfalls eine verstärkte Expression. Auch hier konnte kein auf dem Genom benachbartes OEP identifiziert werden. Ein weiteres OEP, welches zur TolC-Familie gehört, wurde wiederum mit PP\_4923 identifiziert. Die beiden letzten in diesem Versuch induzierten Typ I-Sekretionssysteme waren PP\_5173-PP\_5175 sowie PP\_5206-PP\_5208. Dabei kodieren PP\_5174 und PP\_5175 beide für MFPs, während PP\_5206 und PP\_5207 beide für die ABC-Transporter-Untereinheit des Sekretionssystems kodieren. Neben den beschriebenen Typ I-Sekretionssystemen war auch ein Typ-IV-Sekretionssystem unter Vanillin induziert. Dabei stellen die beiden regulierten Proteine PP\_1121 und PP\_1122 die Komponente der äußeren Membran dar. Ein zugehöriges OEP konnte in beiden Fällen nicht identifiziert werden. Tabelle 5.33 fasst alle in den Vanillin-Versuchen regulierten Transportsysteme und Porine zusammen.

**Tabelle 5.33:** Übersicht über die identifizierten Transporter, Porine und Efflux-Systeme sowie deren Regulation in den verschiedenen durchgeführten Analysen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_0176		fusaric acid resistance protein region	49,1	178,7	-	Van
PP_0178		secretion protein HlyD family protein	72,3	23,3	-	Van
PP_0179		RND efflux transporter	51,1	29,2	-	Van
PP_0412		polyamine ABC transporter periplasmic protein	3,2	-	1,8	Van
PP_0413		binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	3	-	-	Van
PP_0804		protein secretion ABC efflux system, permease and ATP-binding protein	8,2	-	-	Van
PP_0805		TolC family type I secretion outer membrane protein	3,8	-	-	Van
PP_0806		surface adhesion protein	37,6	-	-	Van
PP_0906		multidrug efflux protein	60,3	-	-	Van
PP_0907		RND efflux membrane fusion protein-related protein (MFP)	5,1	-	-	Van
PP_1121		OmpA/MotB domain protein	6,7	8,6	-	Van
PP_1122		OmpA/MotB domain protein	9,1	12,1	-	Van
PP_1152		secretion protein HlyD family protein	32,3	99,2	-	Van
PP_1272		secretion protein HlyD family protein	8,4	-	-	Van
PP_1273		RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	31	118,8	-	Van
PP_1376	<i>pcaK</i>	benzoate transport	41,9	211,8	-	Van
PP_1383	<i>(pcaP)</i>	BenF-like porin	223,3	154,8	-	Van
PP_1384	<i>ttgC</i>	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	2,6	3,1	-	Van
PP_1385	<i>ttgB</i>	transporter hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family	2,7	3,2	-	Van
PP_1386	<i>ttgA</i>	efflux transporter RND family, MFP subunit	2,3	-	-	Van
PP_1481		gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	13	-	-	Van
PP_1484		spermidine/putrescine ABC transporter ATPase	530,7	-	-	Van

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_1486		polyamine ABC transporter periplasmic polyamine-binding protein	12,5	-	-	Van
PP_1722		ABC transporter ATP-binding protein	8,95	-	-	Van
PP_1726		ABC transporter periplasmic protein	12,34	-	2,3	Van
PP_1743	<i>actP</i>	acetate permease	171,3	-	-	Van
PP_2668		efflux ABC transporter ATP-binding protein	23,5	-	-	Van
PP_2669		YVTN family beta-propeller repeat-containing protein	40,2	-	-	Van
PP_3425	<i>mexE</i>	efflux transporter RND family, MFP subunit	-	32,4	-	Van
PP_3426	<i>mexF</i>	transporter hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family	9,7	17,4	-	Van
PP_3427	<i>oprN</i>	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	72	112,9	-	Van
PP_3549	<i>emrA</i>	secretion protein HlyD family protein	up	-	-	Van
PP_3636		sulfonate ABC transporter periplasmic sulfonate-binding protein	7,3	-	-	Van
PP_3637		sulfonate ABC transporter ATP-binding protein	3,4	-	-	Van
PP_3739		aromatic compound-specific porin	185,7	278,6	-	Van
PP_3740		major facilitator family transporter	2078,3	7894,5	-	Van
PP_4838	<i>oprC</i>	TonB-dependent copper receptor	42,6	7,6	-	Van
PP_4863		branched chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein	8,8	-	-	Van
PP_4864		branched chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein	5,9	-	-	Van
PP_4867		extracellular ligand-binding receptor	8,1	-	2,3	Van
PP_4923		TolC family type I secretion outer membrane protein	3,2	4	-	Van
PP_5173		acriflavin resistance protein	7	9,6	-	Van
PP_5174		RND efflux transporter, MFP	9,6	-	-	Van
PP_5175		efflux transporter RND family, MFP subunit	7,2	-	-	Van

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_5179	<i>potG</i>	spermidine/putrescine ABC transporter ATPase	2,2	-	-	Van
PP_5180	<i>potF-1</i>	putrescine ABC transporter periplasmic putrescine-binding protein	3,1	-	-	Van
PP_5181	<i>potF-2</i>	putrescine ABC transporter periplasmic putrescine-binding protein	2,2	-	4,8	Van
PP_5206		secretion protein HlyD family protein	2,1		-	Van

-.: Nicht identifiziert / reguliert.

*Reg. 1D*: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

*Reg. Mem*: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

*Reg. 2D*: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

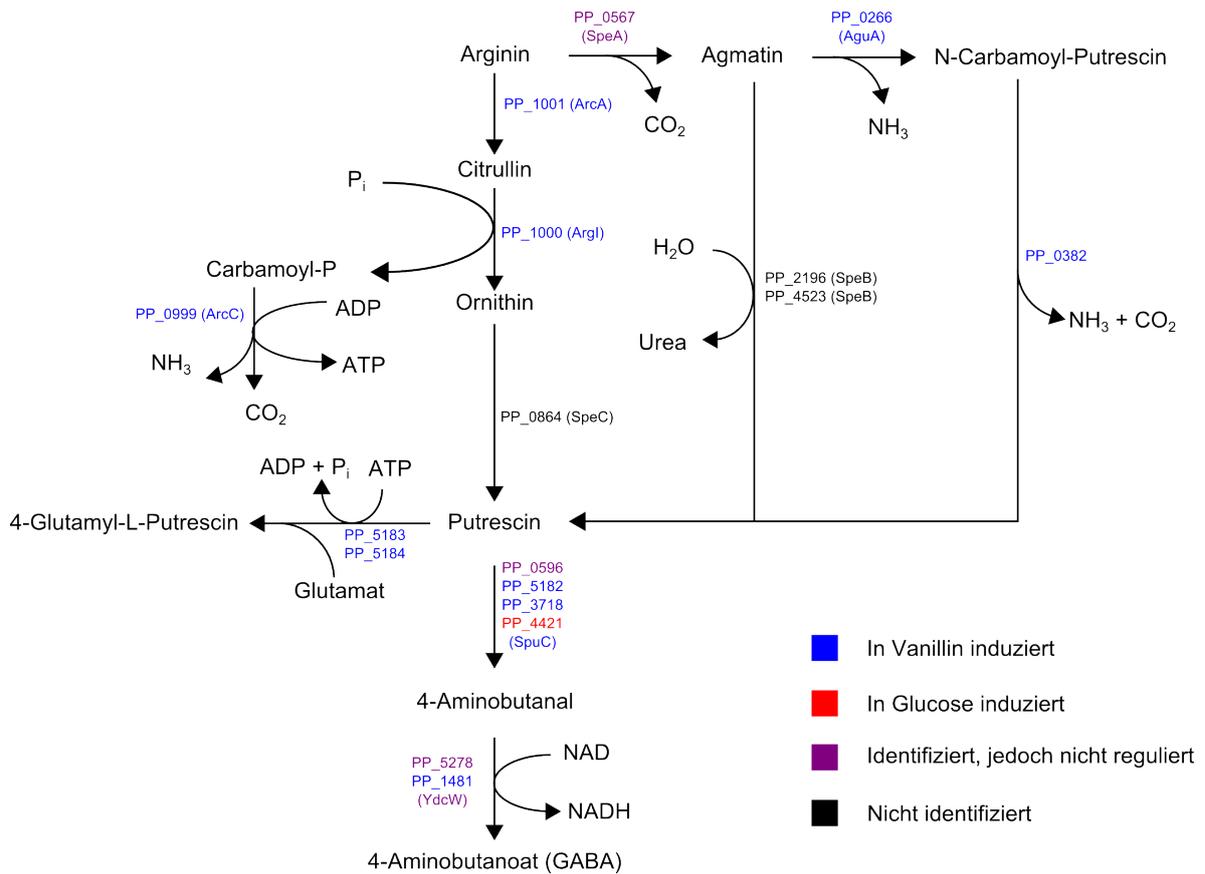
*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

*up*: Das Protein wurde nur in Gegenwart von Vanillin gefunden.

### Aminosäure- und Putrescin-Metabolismus

Nicht zuletzt war unter Vanillin auch eine Induktion des Polyamin ABC-Transporters (PP\_0412 und PP\_0413) sowie der Putrescin ABC-Transporter (PP\_5179-PP\_5181) und PP\_1484, PP\_1486 zu beobachten (Tabelle 5.33). Zudem war der Arginin/Ornithin-Antiporter ArcD unter Vanillin induziert. Von diesen regulierten Proteinen wies PP\_1484 die deutlichste Regulation auf. Die beiden erstgenannten Transporter waren auch in einer Transkriptomstudie von Bandounas *et al.* (2011) zum Putrescin-Metabolismus in *Pseudomonas putida* S12 induziert (Putrescin wurde hier als C-Quelle eingesetzt). Wie dort zeigte sich neben der Induktion der Transportproteine auch in unserem Experiment unter Vanillin eine deutliche Induktion des gesamten Arginin/Putrescin-Metabolismus. So war sowohl der Abbauweg von Arginin über Citrullin und Ornithin (Deiminase Pathway) zu Putrescin als auch der Weg über Agmatin und N-Carbaomyl-Putrescin zu Putrescin induziert (Abbildung 5.29).

Da nicht alle Proteine des Abbauweges in *P. putida* KT2440 annotiert waren, wurde deren Funktion von korrespondierenden Enzymen aus *P. aeruginosa* abgeleitet. So ist das aus *P. aeruginosa* bekannte Enzym Carbamoylputrescin-Hydrolase (PA0293, AguB) in *P. putida* KT2440 nicht annotiert. Mit Hilfe eines Sequenzvergleichs konnte jedoch PP\_0382 als möglicher Kandidat für die Umsetzung von N-Carbamoyl-Putrescin zu Putrescin identifiziert werden (30% Sequenzidentität). Die Ornithin-Carbamoyltransferase ArgI, welche unter Vanillin ebenfalls induziert war, zeigt eine starke Homologie zu



**Abbildung 5.29:** Differenziell regulierte Proteine des Arginin- bzw. Putrescin-Metabolismus. Die Abbildung basiert auf den Arbeiten von Chou *et al.* (2008) und Bandounas *et al.* (2011). Die Regulationsfaktoren der einzelnen Proteine in den unterschiedlichen Versuchen sind in Tabelle 5.34 zusammengefasst.

ArcB aus *P. aeruginosa* (91% Sequenzidentität) und könnte somit in *P. putida* KT2440 die Umwandlung von Citrullin zu Ornithin katalysieren.

Auch mehrere am Abbau von Putrescin beteiligte Enzyme, welche laut Bandounas *et al.* (2011) ortholog zur Putrescin-Aminotransferase (SpuC) aus *P. aeruginosa* sind, konnten in unseren Versuchen identifiziert werden. Dabei waren die Aminotransferase PP\_5182 sowie das hypothetische Protein PP\_3718 unter Vanillin induziert. Das hypothetische Protein PP\_4421 war entgegengesetzt reguliert. In unmittelbarer Nachbarschaft zu dem am stärksten induzierten Putrescin Transportsystem (PP\_1484, PP\_1486) liegt das Gen PP\_1481, welches für das Enzym  $\gamma$ -Aminobutyraldehyd-Dehydrogenase kodiert. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von 4-Aminobutyraldehyd zu 4-Aminobutyrat (GABA) und war unter Vanillin induziert.

Einige der Enzyme, welche weitere Schritte des Putrescin-Abbaus katalysieren könnten, wurden zwar identifiziert, zeigten in unserem Experiment jedoch keine Regulation. Auch der von Bandounas *et al.* (2011) in *Pseudomonas putida* S12 postulierte „ $\gamma$ -Glutamylatation“-Weg war bis auf die beiden Glutamin-Synthetasen PP\_5183 und PP\_5184 nicht reguliert. Ob die Induktion dieser beiden Enzyme tatsächlich auf den Putrescin-Abbau zurückzuführen ist, oder doch auf einer Induktion der Glutaminsynthese aus Glutamat beruht, lässt sich anhand der vorhandenen Daten nicht sagen. Die Regulation der in diesem Abschnitt beschriebenen Proteine in den einzelnen durchgeführten Experimenten ist in Tabelle 5.34 zusammengefasst.

**Tabelle 5.34:** Übersicht über die regulierten Proteine, welche mit dem Putrescin-Metabolismus in Verbindung stehen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_0999	<i>arcC</i>	carbamate kinase	9,9	-	4,8	Van
PP_1000	<i>argI</i>	ornithine carbamoyltransferase	7,6	-	5,4	Van
PP_1001	<i>arcA</i>	arginine deiminase	8,2	-	5	Van
PP_1002	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	173	28,4	-	Van
PP_5182		aminotransferase	5,1	-	-	Van
PP_5183		glutamine synthetase	2,4	-	-	Van
PP_5184		glutamine synthetase	2,4	-	-	Van
PP_0382		Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	4	-	-	Van
PP_3718		hypothetical protein	15,8	-	-	Van
PP_4421		hypothetical protein	2,3	-	-	Glu

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_1481		gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	13	-	-	Van

-.: Nicht identifiziert / reguliert.

*Reg. 1D*: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

*Reg. Mem*: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

*Reg. 2D*: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

*Reg. In*: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

Interessant ist, dass eine Induktion des Arginin-Abbaus auch von Segura *et al.* (2005) in *P. putida* DOT-T1E nach der Behandlung mit Toluol beobachtet wurde. Ein möglicher Grund für diese Induktion stellt laut Segura *et al.* (2005) das beim Arginin-Abbau über den Deiminase-Weg gewonnene ATP dar. Aufgrund des deutlich erhöhten Energiebedarfs der Zelle unter Lösungsmittelstress könnte ein Abbau von Arginin zusätzliches ATP liefern und dies auch unter anaeroben Bedingungen (Vander Wauven *et al.*, 1984). Eine Induktion des Arginin-Abbaus wurde vor allem als Antwort auf eine geringe Sauerstoffkonzentration und eine Verringerung der Kohlenstoffquelle beschrieben (Mercenier *et al.*, 1980). Neben der Gewinnung von ATP käme auch ein erhöhter Bedarf an Putrescin als Erklärung für die Induktion des Arginin-Abbaus in Frage. So wird Putrescin eine Rolle in der Stressantwort insbesondere im Hinblick auf ROS (Reactive Oxygen Species) sowie generell in der Regulation der Transkription zugeschrieben (Rhee *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurde Putrescin auch als Regulator von Porinen beschrieben, welcher die Permeabilität von Porinen verringern und somit die Lösungsmittelresistenz erhöhen kann (Iyer *et al.*, 1997).

Der oben erwähnte erhöhte ATP-Bedarf unter Lösungsmittelstress führte bei Segura *et al.* (2005) auch zu einer erhöhten Purin-Biosynthese (vermutet aufgrund der Induktion von fol-D2 und purM). Eine Induktion dieser Enzyme konnte in den hier vorgestellten Experimenten nicht gefunden werden. Lediglich PurU (PP\_1943), welches allerdings auch eine Rolle im Tetrahydrofolat-Metabolismus spielt, war unter Vanillin induziert. Auffällig war zudem die Induktion der Enzyme der Serin- (SerA, SerC) und Glycinsynthese (GlyA, GlyA-1). Ein Grund für die Induktion dieser Stoffwechselwege könnte die Bildung von 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat, einem zentralen Molekül des „One Carbon Metabolism“ sein. Hierfür spricht auch die Induktion des „Glycin-Cleavage-Systems“ (GcvT-1, PP\_1944, GcvP-1, GcvP-2) sowie weiterer Enzyme des Tetrahydrofolat-Metabolismus (FolD-1, PurU) unter Vanillin.

**Tabelle 5.35:** Übersicht über die regulierten Proteine, welche mit dem Serin- und Glycin- sowie dem Tetrahydrofolat-Metabolismus in Verbindung stehen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_0322	<i>glyA-1</i>	serine hydroxymethyltransferase	2,8	-	-	Van
PP_0671	<i>glyA</i>	serine hydroxymethyltransferase	-	-	1,9	Van
PP_0986	<i>gcvT-1</i>	glycine cleavage system T protein	2,8	-	3,1	Van
PP_0988	<i>gcvP-1</i>	glycine dehydrogenase	4,4	5,6	-	Van
PP_1768	<i>serC</i>	phosphoserine aminotransferase	-	-	7,6	Van
PP_1943	<i>purU</i>	formyltetrahydrofolate deformylase	107,9	975,8	9,1	Van
PP_1944		aminomethyltransferase	283,7	39,9	11	Van
PP_1945	<i>fold-1</i>	5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase	up	-	9	Van
PP_5155	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-	-	3,4	Van
PP_5192	<i>gcvP-2</i>	glycine dehydrogenase	17,9	-	-	Van

-.: Nicht identifiziert / reguliert.

Reg. 1D: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

Reg. Mem: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

Reg. 2D: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

Reg. In: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

up: Das Protein wurde nur in Gegenwart von Vanillin gefunden.

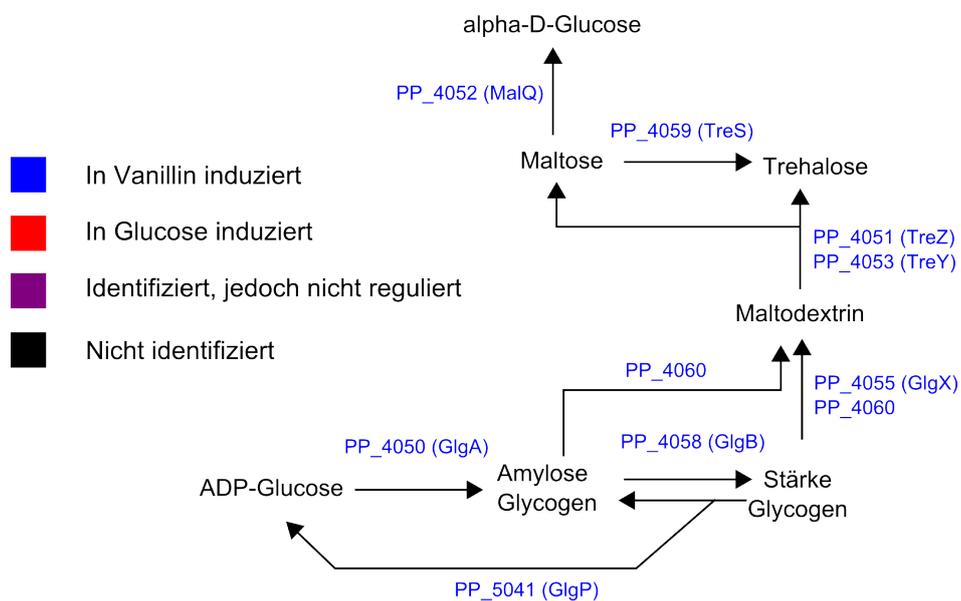
### Trehalose-Metabolismus

Eine deutliche Induktion unter Vanillin erfuhr auch der Trehalose-Metabolismus. So waren die beiden an diesem Stoffwechselweg beteiligten Gencluster PP\_4050 – PP\_4055 sowie PP\_4058 – PP\_4060 bis auf PP\_4054, welches nicht identifiziert werden konnte, unter Vanillin induziert. Die beiden Gen-Cluster sind zu den in *Pseudomonas syringae* gefundenen Clustern homolog (Freeman *et al.*, 2010) (Tabelle 5.36).

**Tabelle 5.36:** Vergleich der Aminosäuresequenz der am Trehalose-Metabolismus beteiligten Proteine zwischen *P. syringae* und *P. putida* KT2440.

Locus-Tag in <i>P. syringae</i>	% Aminosäureidentität (Name) in <i>P. putida</i> KT2440
PSPTO_2760	72 (PP_4060)
PSPTO_2761	74 (PP_4059, treS)
PSPTO_2762	74 (PP_4058, glgB)
PSPTO_3125	78 (PP_4050, glgA)
PSPTO_3126	63 (PP_4051, treZ)
PSPTO_3127	59 (PP_4052, malQ)
PSPTO_3128	64 (PP_4053, treY)
PSPTO_3129	88 (PP_4054)
PSPTO_3130	81 (PP_4055)

Neben Genen für die Synthese von Trehalose enthalten diese auch Enzyme, welche am Glykogen-Stoffwechsel beteiligt sind. Wie Freeman *et al.* (2010) zeigten, sind Glykogen auf- und abbauende sowie Enzyme der Trehalose-Synthese unter osmotischem Stress zeitgleich induziert. Dieses Verhalten konnte auch in dem hier beschriebenen Versuch in Gegenwart von Vanillin beobachtet werden (Abbildung 5.30) (Tabelle 5.37).



**Abbildung 5.30:** Differentiell regulierte Proteine des Trehalose-Metabolismus. Die Bezeichnung der Proteine wurde teilweise aus *P. syringae* übernommen. Der Stoffwechselweg wurde aus Daten der KEGG-Datenbank erstellt. Die Regulationsfaktoren der einzelnen Proteine in den unterschiedlichen Versuchen sind in Tabelle 5.37 zusammengefasst.

Neben dem Enzym Trehalose Synthase (PP\_4059, TreS), welches Maltose zu Trehalose

umsetzt, waren auch die Enzyme Maltooligosyl-Trehalose-Synthase (PP\_4053, TreY) und Malto-Oligosyltrehalose Trehalohydrolase (PP\_4051, TreZ) induziert. Wie Freeman *et al.* (2010) zeigten, sind beide Loci für die Trehalose-Synthese essentiell. Bei der Synthese von Trehalose aus geradzahigen Maltooligosacchariden setzten die Enzyme TreZ/Y (PP\_4051, PP\_4053) neben Trehalose auch Maltose frei (Kim *et al.*, 2000). Diese kann wiederum durch TreS (PP\_4059) ebenfalls zu Trehalose umgesetzt werden. PP\_4060, welches für eine  $\alpha$ -Amylase kodiert, erhöht durch seine gesteigerte Aktivität die Anzahl an Maltooligosacchariden mit reduzierenden Enden. Wie Kim *et al.* (2000) zeigten, ist die Anzahl reduzierender Enden entscheidend für den Umsatz durch TreZ/Y und erklärt den geringen Umsatz von Polysacchariden durch diese beiden Enzyme (Kim *et al.*, 2000). Alle unter Vanillin induzierten Enzyme der Trehalose-Synthese sind in Abbildung 5.30 zusammengefasst.

Über die genaue Funktion von Trehalose in Zusammenhang mit dem Vanillin-Metabolismus ist nichts bekannt. Trehalose werden jedoch unterschiedliche Funktionen in Mikroorganismen zugeschrieben. Neben seiner Schutzfunktion bei osmotischem Stress, Hitze, Kälte und Oxidation kommt Trehalose auch eine Rolle als Signalmolekül (in Hefe) und als Zellwandbestandteil in Mykobakterien zu (Crowe *et al.*, 1992; Thevelein *et al.*, 1995; Argüelles, 2000). Im Zusammenhang mit Vanillin, dürfte von diesen Eigenschaften die Stabilisierung von Membranen und Proteinen im Vordergrund stehen.

**Tabelle 5.37:** Übersicht über die regulierten Proteine, welche mit dem Trehalose-Metabolismus in Verbindung stehen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_4050	<i>glgA</i>	glycogen synthase	6,1	-	-	Van
PP_4051	( <i>TreZ</i> )	malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	17,6	-	-	Van
PP_4052	<i>malQ</i>	4-alpha-glucanotransferase	31,5	-	-	Van
PP_4053	( <i>TreY</i> )	maltooligosyl trehalose synthase	11,3	-	-	Van
PP_4055	<i>glgX</i>	glycogen debranching protein GlgX	22,2	-	-	Van
PP_4058	<i>glgB</i>	glycogen branching enzyme	4,6	-	-	Van
PP_4059	( <i>TreS</i> )	trehalose synthase	19	-	-	Van
PP_4060		alpha-amylase family protein	28,1	-	-	Van

-: Nicht identifiziert / reguliert.

Reg. 1D: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

Reg. Mem: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

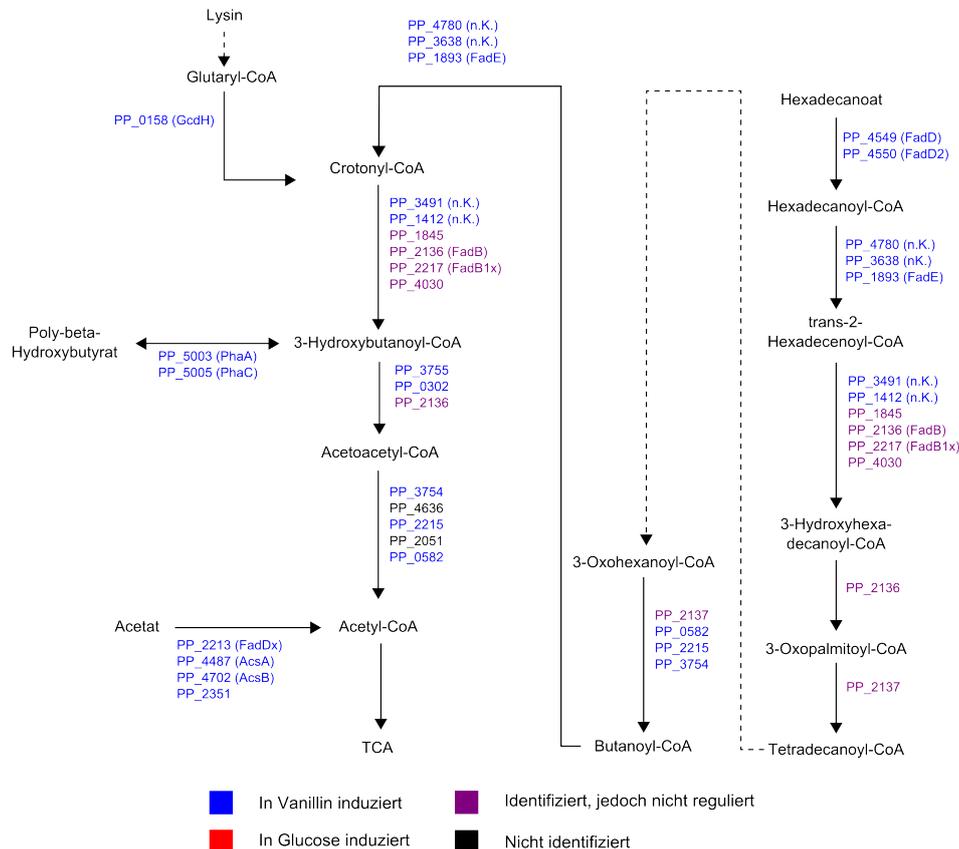
Reg. 2D: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

Reg. In: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

(Gen): Der Genname stammt nicht aus *P. putida* sondern aus *P. syringae*

## Lipid-Metabolismus

Im Hinblick auf mögliche Einflüsse von Vanillin auf die Zellmembranen von *P. putida* KT2440 galt ein besonderes Augenmerk dem Lipid-Metabolismus. Hier zeigte sich außer der Induktion von FabG (PP\_0581) keine Regulation im Bereich der Fettsäurebiosynthese zwischen den beiden untersuchten Zuständen. Deutlich induziert waren hingegen einige Enzyme, welche beim Abbau von Fettsäuren eine Rolle spielen (Abbildung 5.31).



**Abbildung 5.31:** Differenziell regulierte Proteine des Fettsäure-Metabolismus.

n.k.: Nicht in KEGG-Datenbank annotiert, gestrichelte Linie: es liegen mehrere Schritte zwischen den gezeigten Metaboliten. Die Regulationsfaktoren der einzelnen Proteine in den unterschiedlichen Versuchen sind in Tabelle 5.38 zusammengefasst.

Wie auch bei der Induktion des Arginin-Deiminase Weges wäre der erhöhte ATP-Bedarf der Zellen unter Vanillin eine mögliche Erklärung für die Induktion dieses Stoffwechselweges. Da die Zugabe von Vanillin jedoch nicht als Puls erfolgte, sondern Vanillin als alleinige Kohlenstoffquelle vorlag und die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden, wäre an dieser Stelle eher eine verstärkte Synthese und kein Abbau von Fettsäuren (Biomasse) zu erwarten. Da alle Regulationen relativ zu der in Glucose kultivierten Kontrolle zu sehen sind, muss eine verstärkte Expression des Fettsäureabbaus nicht zwangsläufig einen „absoluten“ Abbau von Fettsäuren bedeuten.

Neben dem Fettsäureabbau waren auch die drei Acetyl-CoA Synthetasen PP\_4487 (AcsA), PP\_4702 (AcsB) und PP\_2351 unter Vanillin induziert, wobei die beiden erstgenannten dem Propanoat-Metabolismus zugeordnet werden können (KEGG-Datenbank). Auf eine verstärkte Expression des Propanoat-Metabolismus deutet auch die Induktion von PP\_2338 (PrpD) hin. Die Induktion dieser Enzyme könnte sich ebenfalls mit einem verstärkten Abbau ungeradzahligter Fettsäuren erklären lassen. Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch die Induktion mehrerer am Leucin-, Isoleucin- und Valin-Abbau beteiligter Enzyme (PP\_4064 - PP\_4067, PP\_4666 (MmsB) und PP\_4667 (MmsA-2)).

In einer Microarray-Studie von Domínguez-Cuevas *et al.* (2006) zur Stressantwort von *P. putida* KT2440 auf Toluol, Benzoat und o-Xylen wurde die „Cyclopropane Fatty Acid Synthetase“ PP\_5365 (CfaB) nach o-Xylen Gabe vermindert exprimiert. Toluol und Benzoat hatten keinen Einfluss auf deren Expression. CfaB katalysiert die Umwandlung von *cis*-ungesättigten Fettsäuren in Cyclopropan-Fettsäuren. Die Hypothese, dass o-Xylene besonders toxisch ist und PP\_5365 (CfaB) daher vermindert exprimiert wird, deckt sich nicht mit den Ergebnissen von Muñoz-Rojas *et al.* (2006). Muñoz-Rojas *et al.* (2006) zeigten, dass eine erhöhte Konzentration von C<sub>17</sub>:cyclopropane in der Membran zu deren Verfestigung führt. Diese Verfestigung wäre unter Lösungsmittelstress ebenso zu erwarten. Unter Vanillin zeigt sich in unserem Experiment eine deutlich verstärkte Expression von PP\_5365 (CfaB).

Auch die beiden am LPS-Metabolismus beteiligten Proteine PP\_0342(WaaC) und PP\_3127 waren unter Vanillin induziert. Die Lipoproteine VacJ (PP\_2163) und GDSL (PP\_0418), welche bei Roma-Rodrigues *et al.* (2010) unter Phenol induziert waren, waren in unseren Experimenten ebenfalls reguliert. Dabei unterschieden sich jedoch die Regulationen in der Analyse der Membranfraktion und der GeLCMSMS-Analyse. Während bei der Analyse der Membranfraktion beide Proteine unter Vanillin in ihrer Expression verstärkt waren, zeigte VacJ im GeLCMSMS-Experiment eine verringerte Expression unter Vanillin. Da in der Analyse von Roma-Rodrigues *et al.* (2010) ebenfalls die Membranfraktion untersucht wurde, decken sich die beiden Ergebnisse für die Membranfraktion. Anhand dieser Ergebnisse werden auch die Vor- und Nachteile der eingesetzten Methoden deutlich. Während die Analyse des Gesamtproteoms mittels 1D-Fraktionierung alle Proteine erfasst (auch diejenigen welche nicht funktional oder nicht an ihrem Bestimmungsort sind), erlaubt die Analyse der Membran eine Aussage über die Regulation der Proteine in diesem Kompartiment.

**Tabelle 5.38:** Übersicht über die in den einzelnen Experimenten regulierten Proteine, welche mit dem Metabolismus von Lipiden in Zusammenhang stehen.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_0158	<i>gcdH</i>	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	27,9	-	-	Van
PP_0302		3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	16,3	-	-	Van
PP_0342	<i>waaC</i>	lipopolysaccharide heptosyltransferase I	2,1	-	-	Van
PP_0418		GDSL family lipase	2,9	2,6	-	Van
PP_0582		acetyl-CoA acetyltransferase	2,3	-	-	Van
PP_1412		enoyl-CoA hydratase/isomerase	11,2	-	-	Van
PP_1893	<i>fadE</i>	acyl-CoA dehydrogenase	17,6	8,9	-	Van
PP_2163	<i>vacJ</i>	VacJ family lipoprotein	2,4	2,6	-	Glu/ Van
PP_2213	<i>fadDx</i>	AMP-dependent synthetase and ligase	6	-	-	Van
PP_2215	<i>fadAx</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	3,5	-	-	Van
PP_2338	<i>prpD</i>	2-methylcitrate dehydratase	6,5	-	-	Van
PP_2351		acetyl-CoA synthetase	19,3	-	-	Van
PP_3127		lipopolysaccharide biosynthesis protein	8,1	28,9	-	Van
PP_3491		enoly-coenzyme A hydratase/isomerase family protein	2,5	-	-	Van
PP_3638		acyl-CoA dehydrogenase	4,3	-	-	Van
PP_3754		beta-ketothiolase	4,2	-	-	Van
PP_3755	<i>paaH</i>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	18,3	-	-	Van
PP_4064	<i>ivd</i>	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	2,6	-	-	Van
PP_4065		propionyl-CoA carboxylase	3	-	-	Van
PP_4066		gamma-carboxygeranoyl-CoA hydratase	3,2	-	-	Van
PP_4067		acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase	3,5	-	-	Van
PP_4487	<i>acsA</i>	acetyl-CoA synthetase	4,8	-	-	Van

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_4549	<i>fadD</i>	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	2,3	-	-	Van
PP_4550	<i>fadD2</i>	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	7,8	-	-	Van
PP_4666	<i>mmsB</i>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	11,3	-	-	Van
PP_4667	<i>mmsA-2</i>	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	8,1	-	-	Van
PP_4702	<i>acsB</i>	acetyl-CoA synthetase	33,4	-	-	Van
PP_4780		acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	7,8	-	-	Van
PP_5003	<i>phaA</i>	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 1	4,1	-	-	Van
PP_5005	<i>phaC</i>	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 2	7	-	-	Van
PP_5365		cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	28,2	-	-	Van

-: Nicht identifiziert / reguliert.

Reg. 1D: Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

Reg. Mem: Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

Reg. 2D: Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

Reg. In: Zustand, in welchem das Protein induziert war.

### Stressantwort

Im Gegensatz zu den mit anderen monozyklischen aromatischen Verbindungen wie Phenol und Toluol durchgeführten Proteomics- und Transkriptomics-Experimenten (Santos *et al.*, 2004; Segura *et al.*, 2005; Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006; Roma-Rodrigues *et al.*, 2010), zeigte sich in unserem Versuch nur eine geringe Induktion von Chaperonen und anderen Stressproteinen. Während in einer Transkriptomanalyse von *P. putida* KT2440 in Gegenwart von Toluol (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006) 12 Proteine aus dieser Kategorie induziert (Regulation > 2) waren, wurden in den von uns durchgeführten Experimenten unter dem Einfluss von Vanillin lediglich drei dieser Proteine (GroEL, HtpG, DnaK) verstärkt exprimiert. Zusätzlich waren die beiden Stressproteine PP\_1210 und PP\_2648 unter Vanillin induziert.

Im Gegensatz zu den Daten von Domínguez-Cuevas *et al.* (2006) zeigten die beiden Proteine PP\_1478 und PP\_2187, welche unter Toluol vermindert exprimiert wurden (Regulation < 0,5), in unserem Experiment unter Vanillin eine Induktion. Das Stressprotein AhpC (PP\_2439), das in anderen Studien sowohl unter der Einwirkung von Phenol als auch von Vanillin reguliert war (Santos *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006), konnte

in unseren Experimenten nicht identifiziert werden. Die im Vergleich zu anderen Studien geringe Induktion von Stressproteinen kann neben der vergleichsweise geringen Vanillinkonzentration (0,1%) auch auf den im Vergleich zu Toluol (2,54) und Phenol (1,54) geringeren  $P_{o/w}$  von Vanillin (1,21) zurückzuführen sein. Einen weiteren Grund für die vergleichsweise geringe Induktion von Stressproteinen könnte die Adaption der Bakterien an Vanillin darstellen. Während bei Santos *et al.* (2004) und Domínguez-Cuevas *et al.* (2006) Phenol und Toluol jeweils als „Puls“ zugegeben wurden erfolgte in unseren Experimenten die Kultivierung mit Vanillin als einziger Kohlenstoffquelle. Die Adaption der Zellen wäre auch eine mögliche Erklärung für die fehlende Induktion von an der *cis/trans*-Isomerisierung von Fettsäuren beteiligten Enzymen wie Cti (PP\_2376), da dieser Vorgang vor allem eine kurzfristige Adaption an Lösungsmittelstress darstellt.

**Tabelle 5.39:** Übersicht über die in den einzelnen durchgeführten Experimenten regulierten Stress-Proteine.

Locus-Tag	Gen	Protein	Reg. 1D	Reg. Mem	Reg. 2D	Reg. In
PP_1210		DNA-binding stress protein	4,5	-	-	Van
PP_1361	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL	-	-	2,6	Van
PP_1478		NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	7	-	-	Van
PP_2187		universal stress protein	8	-	-	Van
PP_2648		universal stress protein	16,6	-	-	Van
PP_4179	<i>htpG</i>	heat shock protein 90	-	-	2	Van
PP_4727	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	-	-	2,7	Van

-: Nicht identifiziert / reguliert.

*Reg. 1D:* Regulationsfaktoren aus dem GeLCMSMS Experiment.

*Reg. Mem:* Regulationsfaktoren aus der Analyse der Membranfraktion.

*Reg. 2D:* Regulationsfaktoren aus der 2D-DIGE-Analyse.

*Reg. In:* Zustand, in welchem das Protein induziert war.

### Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen

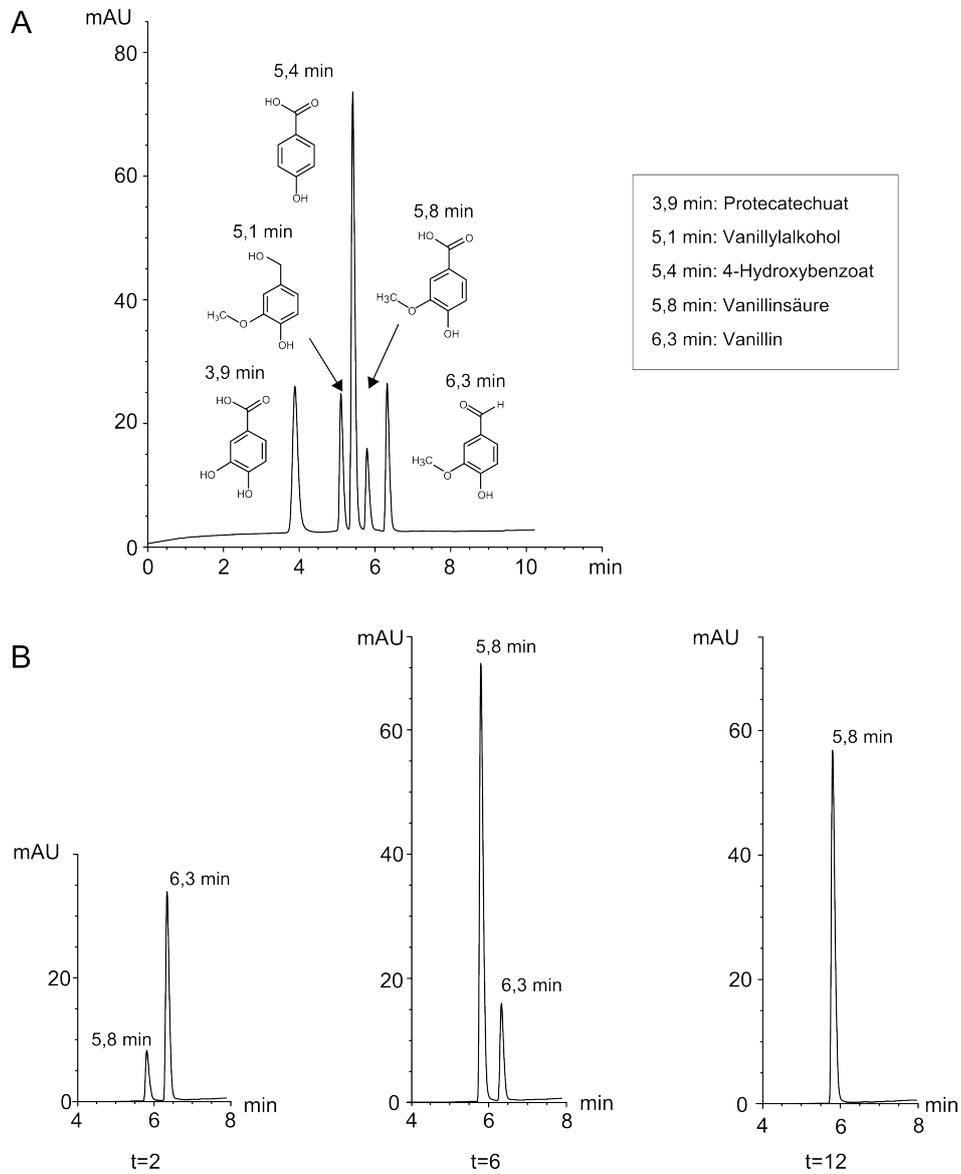
Wie auch bei den mit Butanol und Ethylenglycol durchgeführten Experimenten, waren die Aldehyd-Dehydrogenasen PP\_0545 und PedI (PP\_2680) sowie die Alkohol-Dehydrogenase PedE (PP\_2674) induziert. Worauf die Regulation dieser Enzyme zurückzuführen sein könnte, wird in Abschnitt 6.3 diskutiert.

### 5.3.5 Metabolitenanalysen

Um die aus den Proteomdaten gewonnenen Erkenntnisse zum Abbau von Vanillin zu verifizieren, wurden zusätzlich HPLC-Analysen verschiedener Metaboliten im Kulturüberstand durchgeführt. Hierzu wurde *P. putida* KT2440 und die Mutante *P. putida* GN235 in 100 ml M12-BASF Medium mit 0,1% Vanillin als Kohlenstoffquelle kultiviert. Für die Analysen wurden alle zwei Stunden jeweils 1 ml Bakteriensuspension entnommen und der nach einem Zentrifugationsschritt erhaltene bakterienfreie Überstand auf das Vorhandensein von Vanillin, Vanillinsäure, Protocatechuat, Vanillylalkohol und 4-Hydroxybenzoat untersucht. Die beiden letztgenannten Substanzen wurden aufgrund der Ergebnisse der Proteom-Analysen (s. Abschnitt 5.3.1 - 5.3.3) ausgewählt, da vermutet wurde, dass diese mögliche Zwischenprodukte des Vanillin-Abbaus darstellen. Die Induktion der Alkoholdehydrogenase (PedE) in der 2D-DIGE-Analyse legte zudem einen möglichen Abbau von Vanillin zu Vanillylalkohol nahe. Die Induktion der 4-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PobA, PP\_3537) wiederum könnte ein Hinweis auf die Entstehung von 4-Hydroxybenzoat während des Vanillin-Abbaus sein.

Alle fünf Referenz-Substanzen konnten mit Hilfe des in Abschnitt 4.6 beschriebenen HPLC-Gradienten auf einer RP-C<sub>18</sub>-Säule getrennt und mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260 nm erfasst werden (Abbildung 5.32, A). Die drei Substanzen Protocatechuat, Vanillylalkohol und 4-Hydroxybenzoat konnten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in keiner der analysierten Proben aus den beiden *Pseudomonas*-Stämmen KT2440 und GN235 nachgewiesen werden. Vanillin und Vanillinsäure wurden hingegen zu verschiedenen Zeitpunkten in unterschiedlichen Konzentrationen im Überstand detektiert (Abbildung 5.32, B). Da lediglich der Kulturüberstand untersucht wurde, lässt sich keine Aussage über die intrazellulären Konzentrationen der einzelnen Substanzen treffen. Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante GN235 konnten auch in diesem Experiment nicht festgestellt werden. Nach 10 h konnte Vanillin nicht mehr nachgewiesen werden. Nach etwa acht Stunden nahm auch die Konzentration von Vanillinsäure kontinuierlich ab. Zum Zeitpunkt der Entnahme der Proben für die Proteomanalyse ( $t=12$ ,  $OD_{600} = 0.6$ ) war somit lediglich Vanillinsäure, nicht jedoch Vanillin im Überstand nachweisbar.

Auffällig ist, dass Vanillin schnell zu Vanillinsäure umgesetzt und in das umgebende Medium abgegeben wurde. Dies könnte darauf hinweisen, dass nur ein Teil des zur Verfügung stehenden Vanillins direkt zur Energiegewinnung verwendet wurde. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Vanillin-Abbaus wäre demnach die Umsetzung von Vanillinsäure zu Protocatechuat durch VanA/VanB. Da bei dieser Reaktion die ebenfalls zytotoxische Substanz Formaldehyd entsteht (Jiménez *et al.*, 2004), könnte die Geschwindigkeit des notwendigen Abbaus von Formaldehyd zu CO<sub>2</sub> ebenfalls die



**Abbildung 5.32:** Quantitative Analyse der Metabolite Vanillin, Vanillinsäure, Protocatechuat, Vanillylalkohol und 4-Hydroxybenzoat.

A) Analyse der Referenzsubstanzen B) Messung der Metaboliten im zellfreien Medium nach 2, 6 und 12 h.

Geschwindigkeit der von VanA/VanB katalysierten Reaktion beeinflussen. Einige Proteine, die an der Eliminierung von Formaldehyd in *P. putida* KT2440 beteiligt sind (Roca *et al.*, 2008), wie ein „Formaldehyd Dehydrogenase Family Accessory Protein“ (FdhD, PP\_0257), eine „Molybdopterin Oxidoreduktase“ (PP\_0256), eine „D-Isomer Specific 2-Hydroxyacid Dehydrogenase“ (PP\_1616) und eine „S-Formylglutathione Hydrolase“ (PP\_1617) waren in Gegenwart von Vanillin ebenfalls induziert.

## 5.4 Untersuchungen zum Metabolismus von Terpenen

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Jendrossek (Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart) wurde der Abbau von Citronellol und Citronellsäure in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 untersucht. Als Kontrollen dienten auf Glucose und auf Oktansäure kultivierte Zellen. Die Verwendung von Oktansäure sollte dabei Aufschluss über Unterschiede im Metabolismus unverzweigter und verzweigter Fettsäuren geben. Wie bereits bei den vorherigen Versuchen erfolgte die Analyse in Triplikaten (drei biologische Replikate pro Zustand). Die Anzucht, der Aufschluss, sowie die Gelelektrophorese wurden von der Arbeitsgruppe Jendrossek durchgeführt, werden aber hier im Hinblick auf die Interpretation der Ergebnisse kurz beschrieben. Generell wurde das Wachstum der Bakterien nicht wie bei den übrigen Experimenten mittels einer OD<sub>600</sub> Messung verfolgt, sondern über ein Klett-Summerson Photoelectricolorimeter. Angaben zum Bakterienwachstum beziehen sich daher stets auf Klett-Summerson Einheiten. Die Kultivierung der Zellen unterschied sich zudem von der in den übrigen Experimenten verwendeten Methode. So wurden die Zellen über Nacht (16 h) in 100 ml Minimalmedium mit 0,15% Oktansäure als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Hauptkulturen wurden auf 15 Klett-Einheiten angeimpft und in 200 ml Minimalmedium mit den unten genannten Kohlenstoffquellen kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte bei 200 Klett-Einheiten durch Zentrifugation.

Als Kohlenstoffquellen in den Hauptkulturen kamen folgende Substanzen zum Einsatz: 0,1% Citronellol + 0,05% Oktansäure, 0,1% Citronellsäure + 0,05% Oktansäure, 0,1% Oktansäure und 0,4% Glucose. Eine zweite Lag-Phase welche laut *Nadine Walter* (Walter, 2012) in den Wachstumskurven von Citronellol + Oktansäure sowie Citronellsäure + Oktansäure zu erkennen war, deutet auf eine Umstellung des Stoffwechsels auf die jeweils zweite Kohlenstoffquelle hin. Zum Zeitpunkt der Ernte (200 Klett) wurde von einer kompletten Umstellung des Metabolismus der Bakterien auf das jeweilige zweite Substrat (Citronellol, Citronellsäure) ausgegangen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte (ohne Detergenzien) in einer French-Press (Walter, 2012). Membran und Zellwandfrag-

mente wurden anschließend über einen Zentrifugationsschritt (35.000 rpm) abgetrennt. Somit enthielten die in den Proteomics Experimenten analysierten Proben lediglich die zytoplasmatische Fraktion des Proteoms. Insgesamt wurden 200 µg Protein je Probe auf ein 1D-SDS-Gel aufgetragen, aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und für das 1D-Fraktionierungsexperiment in 10 Banden geteilt. Alle weiteren Schritte wurden wie in Kapitel 4 beschrieben durchgeführt. Als Datenbank wurde neben einer spezifischen *P. aeruginosa* PAO1 Datenbank, auch der bakterielle Teil der NCBIInr-Datenbank verwendet.

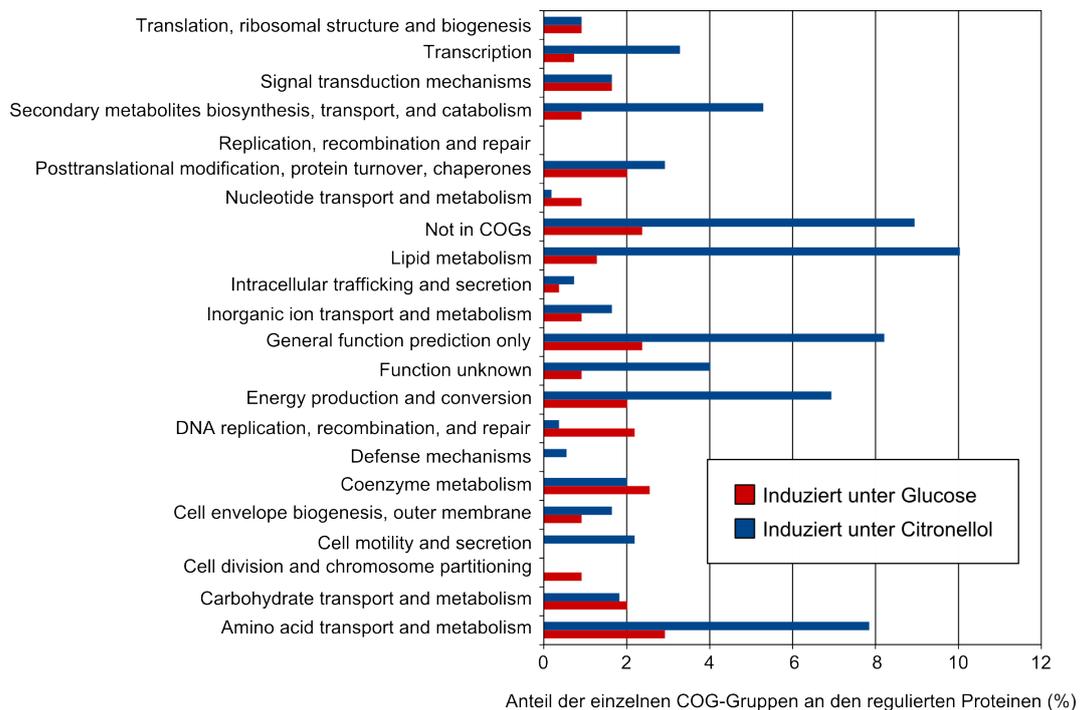
#### 5.4.1 1D-Fraktionierung (GeLCMSMS-Analyse)

Auch wenn verschiedene, sich ergänzende Proteomics-Experimente wie 2D-DIGE oder GeLCMSMS, wie sie im Rahmen des Vanillin- und Butanol-Projektes zum Einsatz kamen (s. Abschnitt 5.2 und 5.3) ein umfangreicheres Bild liefern als ein einzelner Ansatz, wurde für die Untersuchung des Terpen-Metabolismus aufgrund limitierter zeitlicher Ressourcen lediglich die GeLCMSMS-Methode verwendet. Wie der Vergleich der einzelnen Experimente in Abschnitt 6.4 für Vanillin zeigt, liefert diese Methode den bei weitem umfangreichsten Datensatz. Zu beachten ist, dass es sich bei den hier untersuchten Proben um die zytosolische Proteinfraction und nicht wie in den Experimenten zur Umsetzung des Vanillin- und Butanol-Metabolismus um einen Gesamtzellaufschluss handelte. Obwohl sowohl die auf Citronellol als auch auf Citronellsäure kultivierten Proben zusätzlich Oktansäure enthielten, werden die jeweiligen Zustände zum besseren Verständnis als „Citronellol“ und „Citronellsäure“ bezeichnet.

Des Weiteren wurden die auf Glucose, Oktansäure und Citronellol kultivierten Proben zeitgleich mittels LC-ESI-MS/MS analysiert, während die „Citronellsäure-Proben“ zu einem späteren Zeitpunkt mit einer neuen nano-HPLC-Säule analysiert wurden. Dies führte zu einer Verschiebung der Retentionszeiten der Peptide, was eine quantitative Auswertung der Daten mittels der eingesetzten Analysesoftware (Progenesis-LCMS) erschwerte. Daher wurden die „Citronellol-Proben“ unter diesem „neuen Setup“ für eine bessere Vergleichbarkeit erneut analysiert. Aufgrund des veränderten Setups wiesen die Vergleiche zwischen Glucose und Citronellsäure sowie Oktansäure und Citronellsäure eine erhöhte Varianz auf. Im Folgenden werden die beiden Vergleiche „Glucose gegen Citronellol“ und „Glucose gegen Oktansäure“ ausführlich beschrieben. Eine tabellarische Übersicht aller identifizierten und regulierten Proteine sowie aller durchgeführten Vergleiche befindet sich im Anhang.

### 5.4.1.1 Differenzielle Regulation von Proteinen in *P. aeruginosa* im Vergleich zwischen Glucose und Citronellol

In diesem Experiment konnten insgesamt 1656 Proteine identifiziert werden (dies entspricht ca. 31% des gesamten Proteoms), wovon 550 Proteine eine Regulation zwischen den beiden untersuchten Zuständen zeigten. Während unter 0,1% Citronellol (+ 0,05% Oktansäure) 390 Proteine induziert waren, wurden 160 Proteine in diesem Zustand vermindert exprimiert. Die funktionelle Gruppierung der regulierten Proteine zeigte, dass die Gruppen „Lipid-Metabolismus“, „Energiegewinnung“ sowie „Aminosäure-Metabolismus“ den höchsten Anteil an regulierten Proteinen aufwiesen (Abbildung 5.33).

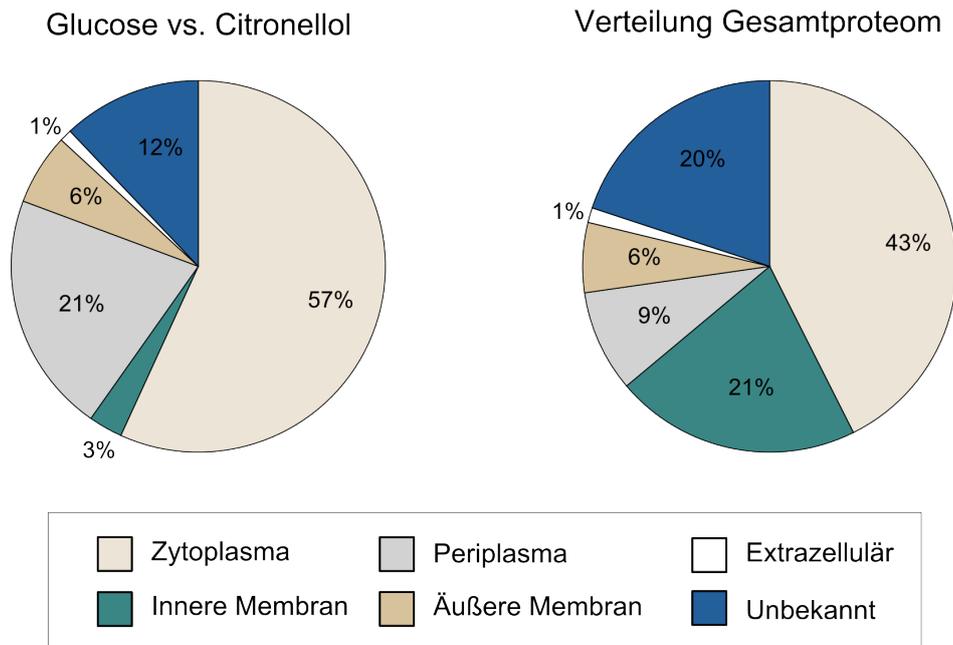


**Abbildung 5.33:** Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie.

Die einzelnen Balken spiegeln den Anteil der entsprechenden Kategorie an den insgesamt regulierten Proteinen wider. Die Kategorie „Not in COGs“ enthält Proteine, für die in der Datenbank keine COG-Informationen vorhanden waren.

Im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine waren zytoplasmatische und periplasmatische Proteine deutlich überrepräsentiert. Proteine der inneren und äußeren Membran wurden hingegen kaum identifiziert. In Abbildung 5.34 wurde die subzelluläre Verteilung der in diesem Experiment identifizierten Proteine der Verteilung des Gesamtproteoms von *P. aeruginosa* gegenübergestellt.

Von besonderem Interesse waren unter Citronellol induzierte Proteine, welche durch

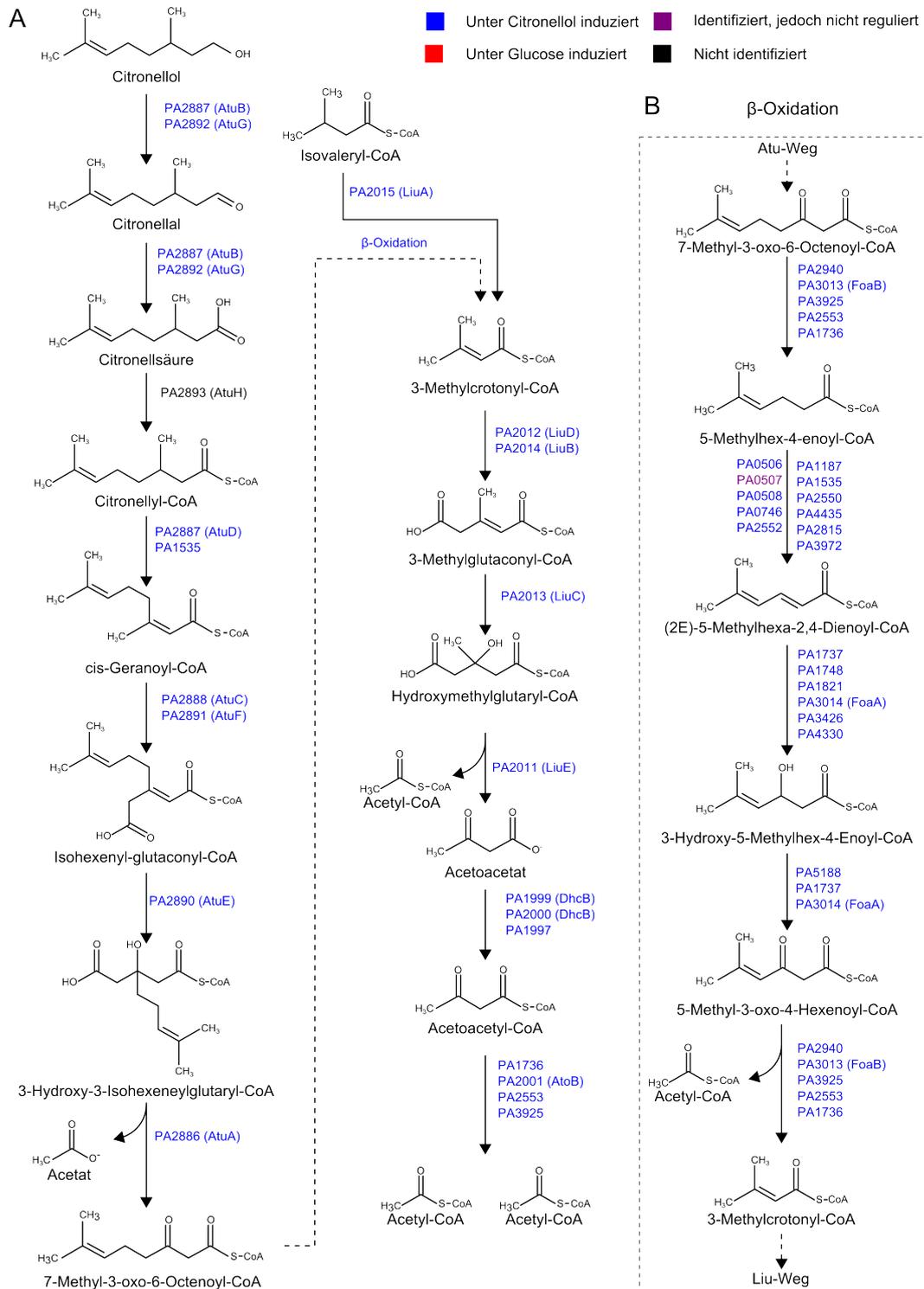


**Abbildung 5.34:** Verteilung der während des 1D-Fraktionierungs-Experiments identifizierten Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente im Vergleich zur Verteilung aller Proteine im Gesamtproteom. Die Verteilung der Proteine des Gesamtproteoms von *P. putida* KT2440 wurde der „Pseudomonas Genome Database“ entnommen.

Gene des *atu*- und *liu*-Genclusters kodiert wurden oder der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren zugeordnet werden konnten. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass Gene des *atu*-Clusters für die Enzyme des ersten Teils des Terpenabbaus kodieren. Das durch das Enzym HHG-CoA Lyase (*AtuA*) erzeugte „7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA“ wird anschließend über verschiedene Enzyme der  $\beta$ -Oxidation zu 3-Methylcrotonyl-CoA abgebaut und in den Leucin-Abbau (*liu*-Cluster) eingeschleust (Díaz-Pérez *et al.*, 2004; Höschle *et al.*, 2005; Förster-Fromme *et al.*, 2006).

Auch wenn verschiedene Genprodukte des *atu*-Clusters bereits einer Reaktion in diesem Abbauweg eindeutig zugeordnet werden konnten, sind die an der initialen Oxidation von Citronellol zu Citronellsäure beteiligten Enzyme noch nicht bekannt. Auch die für die anschließende Aktivierung zu Citronellyl-CoA benötigten Proteine konnten bis jetzt nicht eindeutig identifiziert werden. Ein möglicher Kandidat für diesen Schritt ist *AtuH*. Zudem ist nicht bekannt, ob der Abbau unverzweigter und verzweigter Fettsäuren von den gleichen oder unterschiedlichen Enzymen katalysiert wird.

Von den neun Genen des *atu*-Clusters waren acht unter Citronellol induziert. Lediglich die „Very-long chain Acyl-CoA Synthetase (*atuH*)“ konnte in diesem (und auch in keinem anderen) Experiment identifiziert werden. Die sechs Gene des *liu*-Clusters zeigten unter Citronellol ebenfalls eine deutliche Induktion (Abbildung 5.35). Wie erwartet, waren auch verschiedene Enzyme der  $\beta$ -Oxidation unter Citronellol in ihrer Expres-



**Abbildung 5.35:** Differenziell regulierte Proteine des Atu- und Liu-Clusters (A) sowie der  $\beta$ -Oxidation nach Behandlung mit Citronellol (B).

sion verstärkt. So konnte für jeden Schritt der  $\beta$ -Oxidation ein oder mehrere Enzyme identifiziert werden (Abbildung 5.35).

Da das Genprodukt von *atuH* nicht identifiziert werden konnte, stellt sich die Frage, ob die Aktivierung von Citronellsäure zu Citronellyl-CoA durch ein spezifisches Enzym oder durch unspezifische Acyl-CoA Synthetasen/Ligasen ermöglicht wird. Die Suche nach geeigneten Enzymen ergab sieben Kandidaten, welche eine entsprechende Protein-Domäne aufwiesen und unter Citronellol induziert waren (Tabelle 5.40). Zusätzlich wurden mehrere Acetyl-CoA-Synthetasen identifiziert, deren Induktion jedoch höchstwahrscheinlich auf die Freisetzung von Acetat durch das Enzym HHG-CoA-Lyase (AtuA) und der anschließenden Aktivierung des Acetats zu Acetyl-CoA zurückzuführen ist.

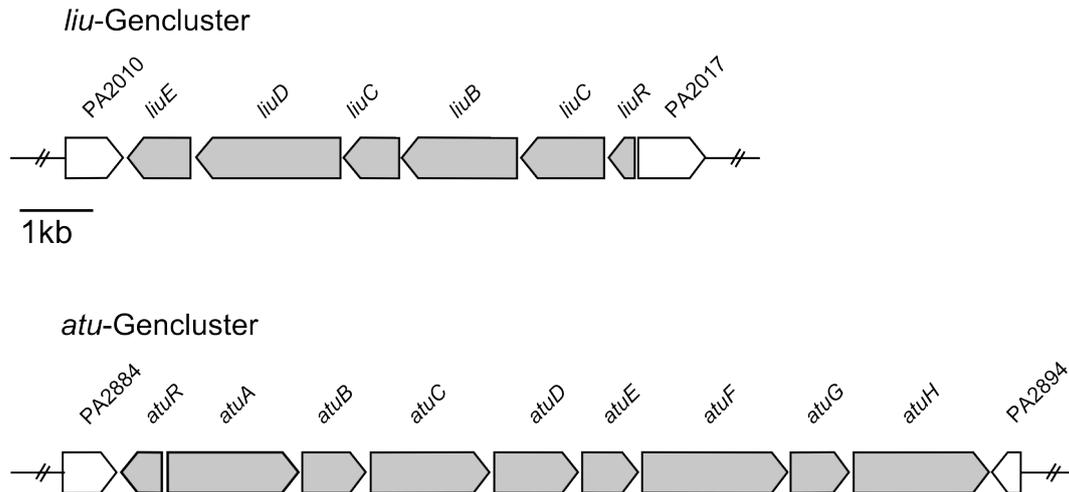
**Tabelle 5.40:** Differentiell regulierte Acyl- und Acetyl-CoA Synthetasen in auf Citronellol kultivierten Zellen.

Funktion	Locus-Tag	Gen	Protein	Reg.
Vermutete Acyl-CoA Synthetasen	PA1617		probable AMP-binding enzyme	38,9
	PA2555		probable AMP-binding enzyme	7,2
	PA2557		probable AMP-binding enzyme	49,7
	PA3299	<i>fadD1</i>	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	5,6
	PA3300	<i>fadD2</i>	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	6,1
	PA3860		probable AMP-binding enzyme	21
	PA3924		probable medium-chain acyl-CoA ligase	3,1
Vermutete Acetyl-CoA Synthetasen	PA0887	<i>acsA</i>	acetyl-coenzyme A synthetase	3,4
	PA1997		probable AMP-binding enzyme	5,6
	PA2001	<i>atoB</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	21,6
	PA4026		probable acetyltransferase	5,3
	PA4733	<i>acsB</i>	acetyl-coenzyme A synthetase	6,8

*Reg.:* Werte >1 zeigen eine Induktion unter Citronellol im Vergleich zu Glucose an.

Von den in Tabelle 5.40 aufgeführten Acyl-CoA Synthetasen zeigten PA1617 und PA 2557 die stärkste Induktion unter Citronellol. PA2557 liegt zudem in einer unter Citronellol stark induzierten Genregion. So wurden die Proteine des Operons PA2552 - PA2555, welche größtenteils für Enzyme der  $\beta$ -Oxidation kodieren, unter Citronellol verstärkt exprimiert. Eine von *Nadine Walter* (Walter, 2012) durchgeführte heterologe Expression der Gene PA1617, PA2557 und PA4733 (*AcsB*) in *E. coli* und die anschlie-

ßende Analyse der Enzymaktivität zeigten jedoch keine Umsetzung von Citronellsäure zu Citronellyl-CoA durch diese Enzyme. Auch die übrigen getesteten Substanzen (Citronellsäure, Geranylsäure, Isovaleriansäure, Heptansäure, Succinat, Essigsäure) wurden von PA1617 und PA2557 nicht umgesetzt. Lediglich PA4733 war zur Umsetzung von Essigsäure in der Lage (Walter, 2012). Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob die fehlende Aktivität auf die experimentellen Bedingungen oder auf die Substratspezifität der beteiligten Enzyme zurückzuführen war.

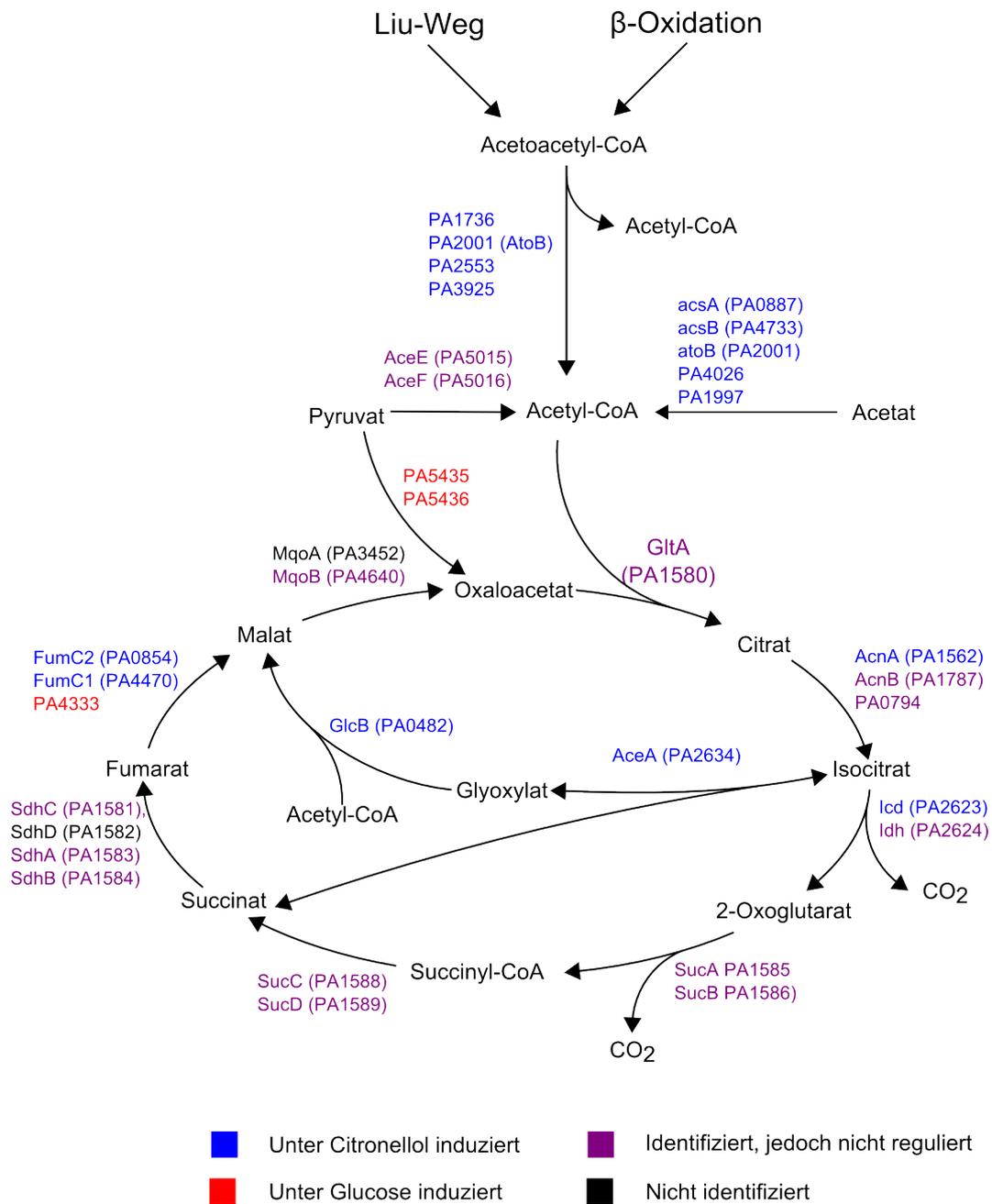


**Abbildung 5.36:** Organisation des *liu*- und *atu*-Gencluster in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Auffällig war auch die verstärkte Expression der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (LiuA), welche die Umsetzung von Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA katalysiert und dem Leucin-Abbau zuzuordnen ist. Obwohl dieses Enzym nicht direkt am Abbau von Terpenen beteiligt ist, liegt *liuA* im gleichen Operon wie die übrigen Gene des *liu*-Clusters (Abbildung 5.36).

Dies würde die vermutlich durch LiuR regulierte Induktion aller *liu*-Gene unter Citronellol erklären. Über die Funktion von *liuR* ist wenig bekannt. Díaz-Pérez *et al.* (2004) zeigten, dass Mutanten, welche eine Transposoninsertion in *liuR* (damals *gnyR*) trugen, nicht mehr auf Citronellol und anderen Terpenen wachsen konnten. Dies deckt sich mit der von uns nachgewiesenen Induktion von LiuR unter Citronellol.

Letzten Endes liefert der Abbau von Citronellol fünf Acetyl-CoA (eines über den Zwischenschritt des weiteren Abbaus von Acetat), welche über den Citratzyklus in Energie und Biomasse umgewandelt werden. Acetat wird hierfür mittels einer Acetyl-CoA Synthetase (Tabelle 5.40) aktiviert. Der durch die Synthese von Biomasse bedingte Verlust von Citratzyklus-Intermediaten muss bei Wachstum auf Acetyl-CoA durch den anaplerotischen Glyoxylat-Zyklus, ausgeglichen werden. Dass dieser Zyklus in Gegenwart von Citronellol aktiv ist, zeigt sich in der deutlichen Induktion der Enzyme Isocitrat-

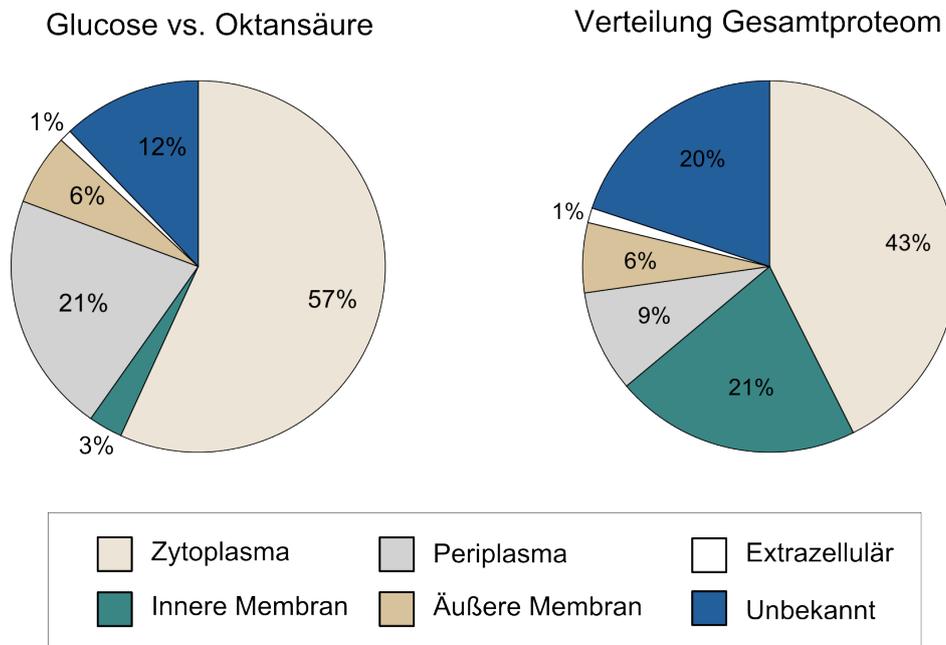


**Abbildung 5.37:** Differentielle Regulation der Enzyme des Citratzyklus sowie einiger zuffliegender Stoffwechselwege (Glucose vs. Citronellol).

Lyase (AceA) und Malat-Synthase (GlcB) (Abbildung 5.37). Zudem waren die Isocitrat-Dehydrogenase (Icd) sowie die beiden Fumarat-Hydratasen (fumC1, fumC2) unter Citronellol induziert. Alle übrigen Enzyme des Citratzyklus zeigten keine differentielle Regulation zwischen den beiden Zuständen.

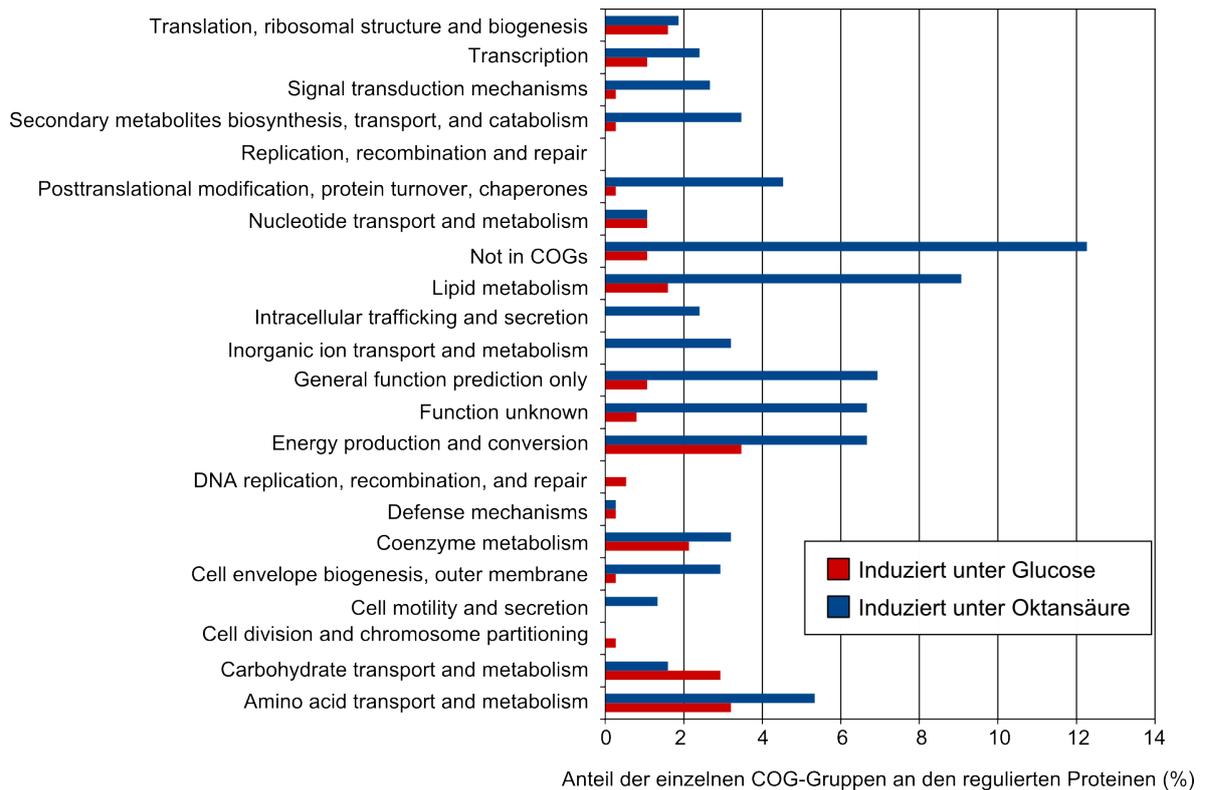
#### 5.4.1.2 Differenzielle Regulation von Proteinen in *P. aeruginosa* im Vergleich zwischen Glucose und Oktansäure

Von den 1674 (dies entspricht ca. 31% des gesamten Proteoms) in diesem Experiment identifizierten Proteinen waren 292 unter Oktansäure induziert, 83 zeigten in diesem Zustand eine verminderte Expression. Damit waren in diesem Experiment insgesamt 375 Proteine differentiell reguliert, deutlich weniger als in Gegenwart von Citronellol (550 Proteine). Die Aufteilung der identifizierten Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente wies hingegen keine Unterschiede zum vorherigen Experiment auf (Abbildung 5.38).



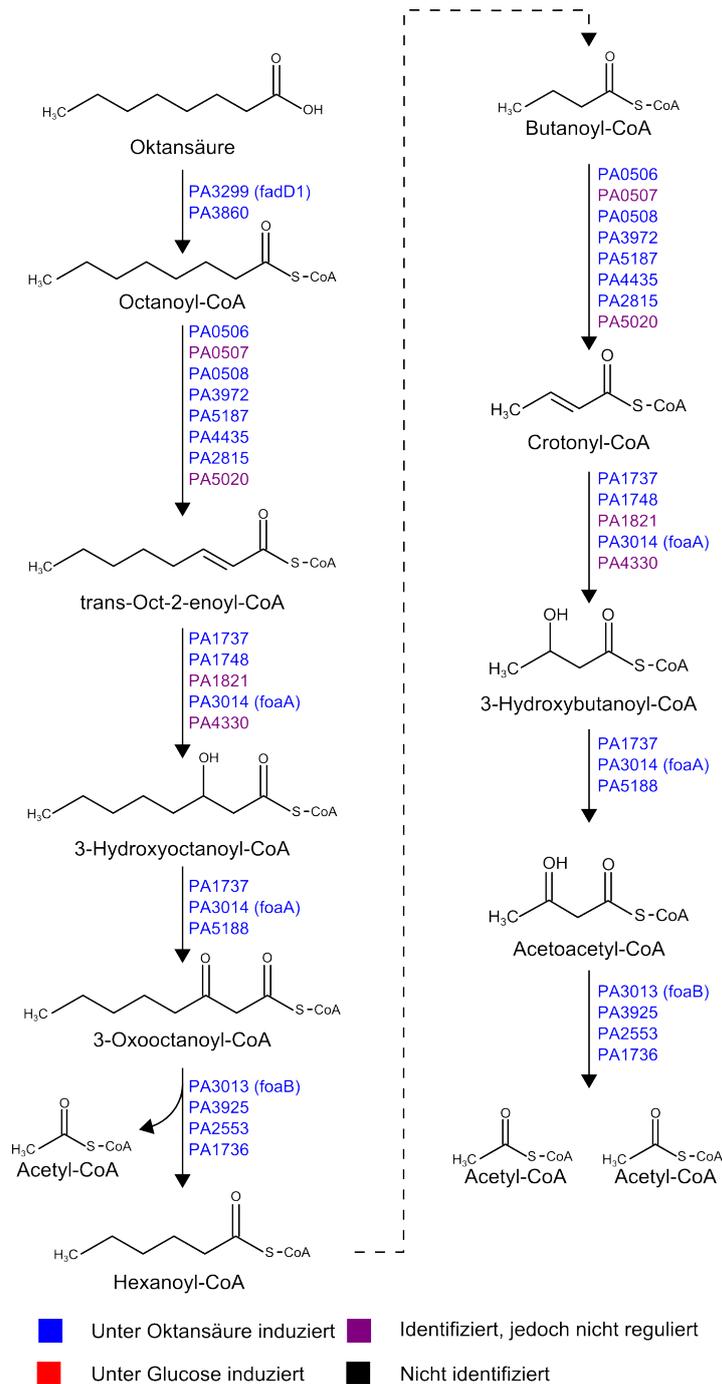
**Abbildung 5.38:** Verteilung der während der GeLCMSMS-Analyse identifizierten Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente im Vergleich zur Verteilung aller Proteine im Gesamtproteom. Die Verteilung der Proteine des Gesamtproteoms von *P.aeruginosa* wurde der „Pseudomonas Genome Database“ entnommen.

Auch die funktionelle Zuordnung der regulierten Proteine glich weitgehend der des vorherigen Experiments. Auch hier entfiel der höchste Prozentsatz der unter Oktansäure induzierten Proteine auf den Lipid-Metabolismus. Viele der unter Glucose verstärkt exprimierten Proteine konnten hingegen dem Kohlenhydratstoffwechsel, dem Energie-Metabolismus sowie dem Aminosäuretransport zugeordnet werden (Abbildung 5.39).



**Abbildung 5.39:** Einteilung der differenziell regulierten Proteine anhand ihrer COG-Kategorie. Die einzelnen Balken spiegeln den Anteil der entsprechenden Kategorie an den insgesamt in einem der beiden Zustände (Glucose bzw. Oktansäure) regulierten Proteine wider. Die Kategorie „Not in COGs“ enthält Proteine, für die in der Datenbank keine COG-Informationen vorhanden waren.

Wie zu erwarten zeigte sich vor allem eine Induktion der Enzyme der  $\beta$ -Oxidation (Abbildung 5.40).



**Abbildung 5.40:** Differentielle Regulation der Enzyme der  $\beta$ -Oxidation zwischen auf Glucose und auf Oktansäure kultivierten Zellen. Die Regulationsfaktoren der einzelnen Enzyme sind in Tabelle 5.41 zu finden.

Im Gegensatz zum vorherigen Versuch, waren keine Enzyme des *Atu*-Clusters und, bis auf *LiuA*, auch keine Proteine des *Liu*-Gencluster unter Oktansäure induziert. Die Re-

gulation von LiuA war unter Oktansäure deutlich geringer als unter Citronellol (2,13 zu 52,9). Im Gegensatz hierzu waren viele der Enzyme, welche Reaktionen der  $\beta$ -Oxidation katalysieren, sowohl unter Citronellol als auch unter Oktansäure induziert (Tabelle 5.41). Auf die in den einzelnen Versuchen regulierten Enzyme der  $\beta$ -Oxidation wird im folgenden Abschnitt ebenso eingegangen wie auf mögliche Kandidaten für die Oxidation von Citronellol zu Citronellsäure.

#### 5.4.1.3 Der Abbau von Terpenen

Zusätzlich zu den für den Terpenabbau spezifischen Proteine des Atu- und des Liu-Clusters, durchlaufen sowohl Terpene als auch unverzweigte Fettsäuren einen bzw. mehrere Zyklen der  $\beta$ -Oxidation. Ob diese Schritte dabei in beiden Fällen von identischen oder unterschiedlichen Enzymen katalysiert werden, ist nicht bekannt. Bereits für die Aktivierung der Fettsäure in *P. aeruginosa* stehen eine Reihe von Acyl-CoA Synthetasen zur Verfügung, über deren Substratspezifität wenig bekannt ist. Lediglich die „Very-Long Chain Acyl-CoA Synthetase (AtuH), war in der KEGG-Datenbank eindeutig dem Terpenabbau zugeordnet. Dieses Enzym konnte in unseren Experimenten jedoch nicht identifiziert werden. Auch für die Acyl-CoA Dehydrogenase Reaktion waren in der Datenbank zwei unterschiedliche Sätze an Enzymen hinterlegt. Alle weiteren Schritte der  $\beta$ -Oxidation können (laut KEGG-Datenbank) von mehreren Enzymen katalysiert werden und wurden bezüglich möglicher Substrate nicht unterschieden. Um mögliche Unterschiede in der Substratspezifität aufzudecken, wurden in Tabelle 5.41 die in den einzelnen Experimenten gefundenen Regulationen der möglicherweise an der  $\beta$ -Oxidation beteiligten Enzyme gegenübergestellt. Neben den Vergleichen mit Citronellol wurden auch Vergleiche mit Citronellsäure berücksichtigt.

**Tabelle 5.41:** Mögliche an der  $\beta$ -Oxidation beteiligte Proteine und deren Regulation in den einzelnen durchgeführten Vergleichen. Enzyme, welche unter Citronellol deutlich stärker als unter Oktansäure exprimiert werden, sind fett gedruckt.

Locus- Tag	Gen	Protein	Glu	Glu	Glu	Okta	Okta
			vs. Citro	vs. Citra	vs. Okta	vs. Citro	vs. Citra
<b>PA1617</b>		<b>probable AMP-binding enzyme</b>	<b>38,91</b>	<b>23,6</b>	<b>NID</b>	<b>16,06</b>	<b>14,5</b>
PA2555		probable AMP-binding enzyme	7,2	807,7	NID	NR	11,3
<b>PA2557</b>		<b>probable AMP-binding enzyme</b>	<b>49,66</b>	<b>61,7</b>	<b>NID</b>	<b>25,67</b>	<b>11,7</b>
PA3299	<i>fadD1</i>	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	5,62	6	3,29	3,25	2,2

Locus- Tag	Gen	Protein	Glu vs. Citro	Glu vs. Citra	Glu vs. Okta	Okta vs. Citro	Okta vs. Citra
PA3300	<i>fadD2</i>	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	6,05	NID	NID	3,12	NR
<b>PA3860</b>		<b>probable AMP-binding enzyme</b>	<b>21,04</b>	<b>34,2</b>	<b>9,86</b>	<b>2,55</b>	<b>6,6</b>
PA3924		probable medium-chain acyl-CoA ligase	3,06	NR	NID	2,37	NR
PA0506		probable acyl-CoA dehydrogenase	8,24	9,5	6,87	NR	NR
PA0507		probable acyl-CoA dehydrogenase	NR	NID	NR	NR	NID
PA0508		probable acyl-CoA dehydrogenase	10,75	17,4	10,98	NR	2
PA0746		probable acyl-CoA dehydrogenase	5,07	NID	NID	NR	NID
PA0879		probable acyl-CoA dehydrogenase	NID	NID	NID	NID	NID
PA1022		probable acyl-CoA dehydrogenase	NID	NID	NID	NID	NID
<b>PA1187</b>		<b>probable acyl-CoA dehydrogenase</b>	<b>26,22</b>	<b>35,3</b>	<b>NID</b>	<b>5,55</b>	<b>34</b>
<b>PA1535</b>		<b>citronellyl-CoA dehydrogenase</b>	<b>65,54</b>	<b>39,4</b>	<b>NID</b>	<b>25,56</b>	<b>39,9</b>
PA2550		probable acyl-CoA dehydrogenase	5,44	NID	NID	NR	NR
<b>PA2552</b>		<b>probable acyl-CoA dehydrogenase</b>	<b>15,4</b>	<b>13,7</b>	<b>NID</b>	<b>4,96</b>	<b>14,7</b>
PA2815		probable acyl-CoA dehydrogenase	3,86	NID	4,62	NR	NR
<b>PA3972</b>		<b>probable acyl-CoA dehydrogenase</b>	<b>14,37</b>	<b>14,3</b>	<b>3,81</b>	<b>4,88</b>	<b>4,9</b>
<b>PA4435</b>		<b>probable acyl-CoA dehydrogenase</b>	<b>31,59</b>	<b>30,5</b>	<b>7,99</b>	<b>12,65</b>	<b>13,4</b>
PA4979		probable acyl-CoA dehydrogenase	NID	NID	NID	NID	NID
PA4994		probable acyl-CoA dehydrogenase	NID	NID	NID	NID	NID
PA4995		probable acyl-CoA dehydrogenase	NID	NID	NID	NID	NID
PA5020		probable acyl-CoA dehydrogenase	NID	NID	NR	NR	NID
PA5187		probable acyl-CoA dehydrogenase	NID	8,2	8,64	0,01	NR
<b>PA1737</b>		<b>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</b>	<b>25,93</b>	<b>40,6</b>	<b>8,22</b>	<b>4,15</b>	<b>7,6</b>
PA1748		enoyl-CoA hydratase/isomerase	3,38	5,2	6,66	NR	NR
PA1821		enoyl-CoA hydratase/isomerase	8,29	6,4	NR	NR	4,6
PA3014	<i>foaA</i>	fatty-acid oxidation complex	4,11	4,6	5,57	NR	NR
PA3426		enoyl CoA-hydratase/isomerase	2,46	NID	NID	2,79	NID

Locus- Tag	Gen	Protein	Glu vs. Citro	Glu vs. Citra	Glu vs. Okta	Okta vs. Citro	Okta vs. Citra
<b>PA4330</b>		<b>enoyl-CoA hydratase/isomerase</b>	<b>39,28</b>	<b>49,9</b>	<b>NR</b>	<b>17,64</b>	<b>21,2</b>
<b>PA1737</b>		<b>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</b>	<b>25,93</b>	<b>40,6</b>	<b>8,22</b>	<b>4,15</b>	<b>7,6</b>
PA3014	<i>foaA</i>	fatty-acid oxidation complex	4,11	4,6	5,57	NR	NR
PA5188		3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	7,55	7,7	12,06	NR	NR
<b>PA1736</b>		<b>probable acyl-CoA thiolase</b>	<b>30,19</b>	<b>32,9</b>	<b>11,21</b>	<b>7,14</b>	<b>11,9</b>
PA2001	<i>atoB</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	21,59	21,6	12,35	NR	2,7
<b>PA2553</b>		<b>probable acyl-CoA thiolase</b>	<b>17,12</b>	<b>11</b>	<b>3,34</b>	<b>5,04</b>	<b>4,3</b>
<b>PA2940</b>		<b>probable acyl-CoA thiolase</b>	<b>398,81</b>	<b>NID</b>	<b>NID</b>	<b>15,73</b>	<b>41,6</b>
PA3013	<i>foaB</i>	fatty-acid oxidation complex beta-subunit	7,95	7,3	9,17	NR	NR
PA3454		probable acyl-CoA thiolase	NID	NID	NID	NR	NID
PA3589		probable acyl-CoA thiolase	NID	NID	NID	NID	NID
PA3925		probable acyl-CoA thiolase	6,57	11,2	6,23	NR	2
PA4785		probable acyl-CoA thiolase	NID	NID	NID	NID	NID
PA1997		probable AMP-binding enzyme	5,59	8,4	4,62	NR	NR
<b>PA1999</b>	<i>dhcA</i>	<b>dehydrocarnitine CoA transferase</b>	<b>65,32</b>	<b>31,5</b>	<b>29,32</b>	<b>2,12</b>	<b>2,2</b>
PA2000	<i>dhcB</i>	dehydrocarnitine CoA transferase	36,86	13,4	23,88	NR	NR
PA0887	<i>acsA</i>	acetyl-coenzyme A synthetase	3,38	7,2	3,13	NR	2,8
PA2001	<i>atoB</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	21,59	21,6	12,35	NR	2,7
PA4026		probable acetyltransferase	5,25	NR	NR	3,4	NR
PA4733	<i>acsB</i>	acetyl-coenzyme A synthetase	6,77	4,3	NR	3,41	NR

*fett*: Vermutete Präferenz für Terpene.

*NR*: Nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Glu*: Glucose, *Citro*: Citronellol, *Citra*: Citronellsäure, *Okta*: Oktansäure

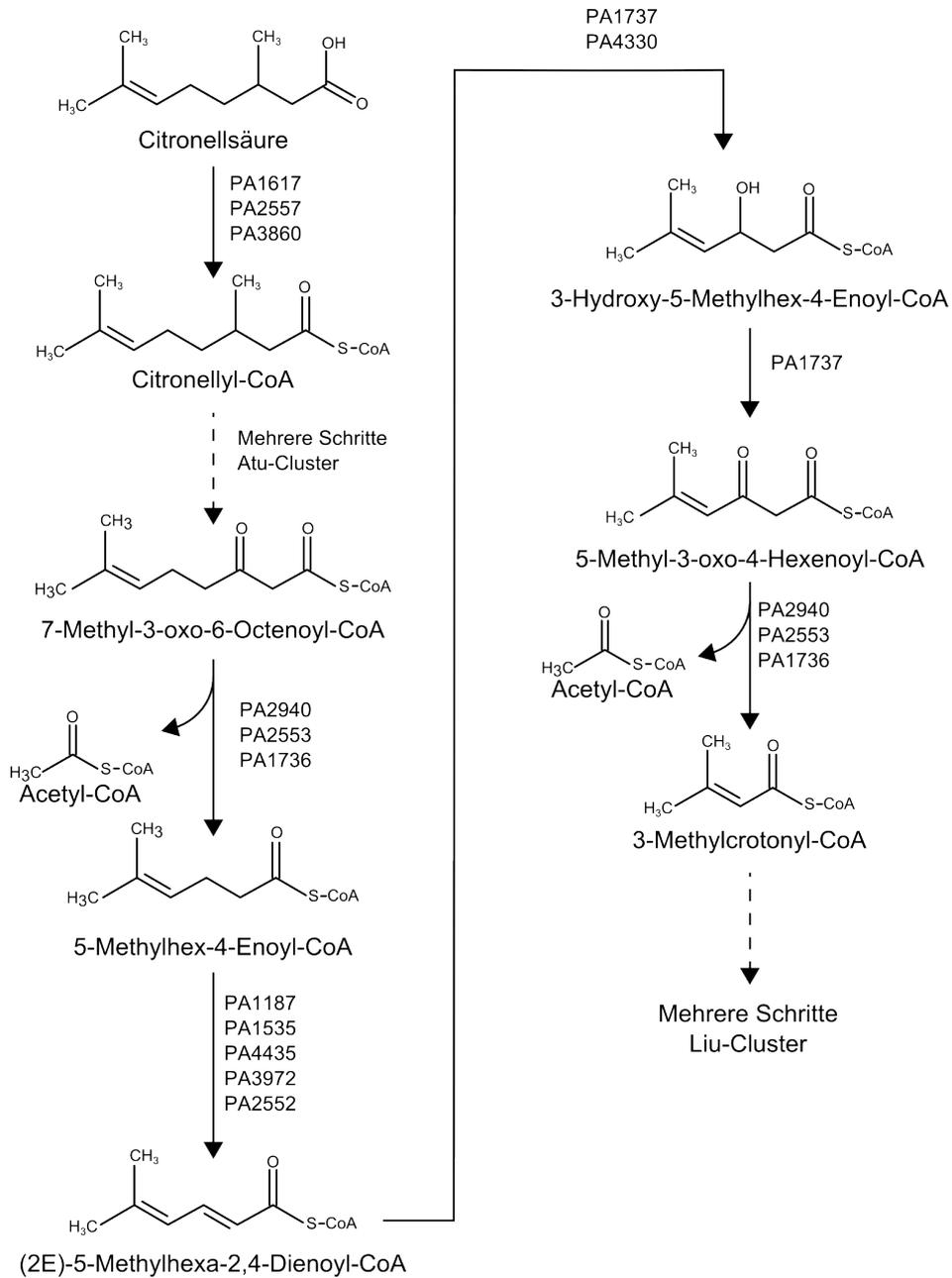
Unter den Acyl-CoA Synthetasen zeigten vor allem PA1617, PA2557 und PA3680 in Gegenwart von Terpenen eine im Vergleich zu Oktansäure verstärkte Expression.

Auch unter den Acyl-CoA Dehydrogenasen waren mehrere Enzyme unter Terpenen deutlich stärker exprimiert als unter Oktansäure (PA1187, PA1535, PA4435, PA3972 und PA2552). Interessanterweise war nur ein einziges dieser Enzyme (PA2552) in der KEGG-Datenbank dem Terpenabbau und nicht dem klassischen Fettsäureabbau zuge-

ordnet. Einige weitere Acyl-Co-Dehydrogenasen wurden durch beide (PA0506, PA0508) oder keines (PA4979, PA4995, PA0879) der eingesetzten Substrate induziert.

Die beiden Enzyme „Probable Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase“ (PA4330) sowie Probable 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (PA1737) waren sowohl unter Oktansäure als auch unter Citronellol/Citronellsäure induziert, zeigten jedoch in Gegenwart von Citronellol eine deutlich stärkere Induktion. Viele der übrigen Enzyme, welche diese Reaktionen katalysieren könnten, waren unter beiden Bedingungen gleichermaßen (geringfügig) induziert. Unter den identifizierten Acyl-CoA-Thiolasen zeigten die Enzyme PA1736, PA2553 und PA2940 in Gegenwart von Terpenen eine deutlich stärkere Expression als unter Oktansäure.

Es fällt auf, dass die für die Metabolisierung von Acetat und Acetoacetat, im Rahmen des Terpenabbaus, benötigten Enzyme keine deutliche Induktion durch die entsprechenden Substrate erfuhren. Lediglich PA1999 wurde beim Wachstum auf Terpenen etwas stärker induziert als beim Wachstum auf Oktansäure. Zudem ist zu bemerken, dass keine Enzyme der  $\beta$ -Oxidation identifiziert wurden, welche im Vergleich zu Citronellol/Citronellsäure eine verstärkte Expression unter Oktansäure zeigten. [Abbildung 5.41](#) fasst die unter dem Einfluss von Terpenen im Vergleich zu Oktansäure verstärkt exprimierte Enzyme der  $\beta$ -Oxidation in einem Schema zusammen.



**Abbildung 5.41:** Schematische Darstellung der Enzyme der  $\beta$ -Oxidation, welche nach Behandlung mit Terpenen deutlich stärker induziert waren als nach Behandlung mit Oktansäure.

Die Oxidationsreaktionen von Citronellol zu Citronellal und weiter zu Citronellsäure werden derzeit den Enzymen *AtuB* und *AtuG* zugeschrieben (Förster-Fromme *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass *AtuB* im Gegensatz zu *AtuG*, für den Terpenabbau in *P. aeruginosa* essentiell ist (Förster-Fromme *et al.*, 2006). Vor diesem Hintergrund fällt auf, dass *AtuB* und *AtuG* zwischen auf Citronellol und auf Citronellsäure kultivierten Zellen in unseren Experimenten keine differentielle Regulation zeigten. Sowohl *AtuB* als auch *AtuG* waren unter Citronellsäure und Citronellol gleichermaßen induziert. Wie Tabelle 5.42 zu entnehmen ist, zeigten Proteine des *atu*-Clusters unter Citronellsäure eine etwas geringere Expression als unter Citronellol. Dabei wichen *AtuB* und *AtuG* jedoch nicht vom Verhältnis der übrigen Proteine des Clusters ab. Da *AtuB* und *AtuG* beide der Familie der „Short-Chain-Dehydrogenases“ zuzuordnen sind, wurden in Tabelle 5.43 weitere Vertreter dieser Familie auf ihre Regulation untersucht.

**Tabelle 5.42:** Regulation der *Atu*- und *Liu*-Proteine unter Citronellol, Citronellsäure und Oktansäure.

Locus-Tag	Gen	Glu vs. Citro	Glu vs. Citra	Glu vs. Okta	Okta vs. Citro	Okta vs. Citra
PA2011	<i>liuE</i>	24,2	12,7	NR	17,2	13,5
PA2012	<i>liuD</i>	46,4	44,8	NR	21,2	17,2
PA2013	<i>liuC</i>	48,3	34,5	NR	39,5	40,5
PA2014	<i>liuB</i>	71,5	60,1	NID	45,2	46,7
PA2015	<i>liuA</i>	52,9	25,9	2,13	31,1	24,2
PA2016	<i>liuR</i>	52,8	NID	NID	NR	NID
PA2885	<i>atuR</i>	4,3	5,6	NR	3,1	NR
PA2886	<i>atuA</i>	101,1	64,5	NID	64	92,8
PA2887	<i>atuB</i>	108,4	88,2	NID	79,9	115,6
PA2888	<i>atuC</i>	57,5	48,9	NID	45,9	50,3
PA2889	<i>atuD</i>	106,3	36,4	NID	61,5	25,2
PA2890	<i>atuE</i>	52,7	46,4	NID	35,4	23,1
PA2891	<i>atuF</i>	37,7	31	NID	27,5	38,2
PA2892	<i>atuG</i>	86,3	34,8	NID	87,6	43,5
PA2893	<i>atuH</i>	NID	NID	NID	NID	NID

*NR*: nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Glu*: Glucose, *Citro*: Citronellol, *Citra*: Citronellsäure, *Okta*: Oktansäure

**Tabelle 5.43:** Differentiell regulierte Dehydrogenasen in den durchgeführten Vergleichen.

Locus- Tag	Gen	Protein	Glu	Glu	Glu	Okta	Okta
			vs. Citro	vs. Citra	vs. Okta	vs. Citro	vs. Citra
PA1023		probable short-chain dehydrogenase	3,2	3,9	NR	NR	NR
PA1066		probable short-chain dehydrogenase	2,2	NR	2	NR	NR
PA1344		probable short-chain dehydrogenase	5,8	3,3	2,6	NR	NR
PA1470		probable short-chain dehydrogenase	5,6	2,7	7,3	3,6	2,2
PA1828		probable short-chain dehydrogenase	3,4	NR	NR	NR	NR
PA2554		probable short-chain dehydrogenase	13,9	15,4	NR	5,2	5,8
PA2887	<i>atuB</i>	putative dehydrogenase	108,4	88,2	NR	79,9	115,6
PA2892	<i>atuG</i>	GCCase, alpha-subunit (biotin-containing)	86,3	34,8	NR	87,6	43,5
PA2918		probable short-chain dehydrogenase	4,8	3,5	NR	2,4	2,2
PA3128		probable short-chain dehydrogenase	3,9	2,5	NR	NR	NR
PA3427		probable short-chain dehydrogenases	4,9	3,5	NR	NR	NR
PA4389		probable short-chain dehydrogenase	4,7	4,7	3,4	NR	NR
PA5150		probable short-chain dehydrogenase	2,4	NR	2,4	NID	NR
PA1982	<i>exaA</i>	quinoprotein ethanol dehydrogenase	2,6	45,5	NID	11,7	60,8
PA0366		probable aldehyde dehydrogenase	16,7	NID	NID	10,7	NID
PA0747		probable aldehyde dehydrogenase	32,6	NID	17,7	NR	NID
PA1984	<i>exaC</i>	NAD <sup>+</sup> dependent aldehyde dehydrogenase	52,4	26,2	NID	NID	20,4
PA4899		probable aldehyde dehydrogenase	7,7	10	NID	3,5	4,3
PA5312	<i>pauC</i>	aldehyde dehydrogenase	2	2,4	NR	NR	2,2

*NR*: nicht reguliert (Das Protein wurde aber in dem entsprechenden Vergleich identifiziert).

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Glu*: Glucose, *Citro*: Citronellol, *Citra*: Citronellsäure, *Okta*: Oktansäure

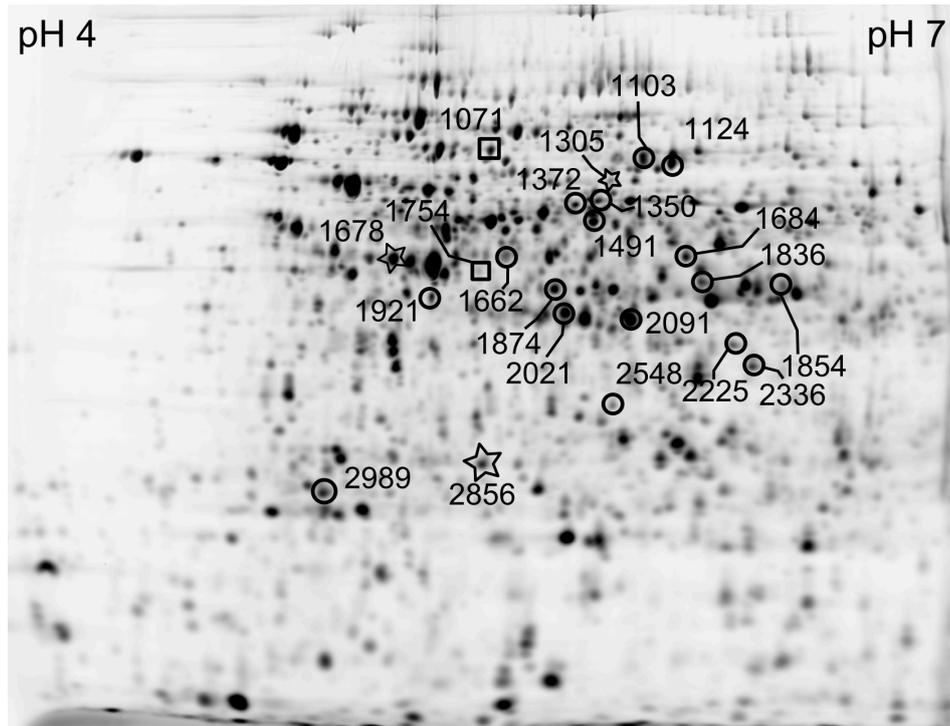
Wie *AtuB* und *AtuG* zeigten auch einige der analysierten Dehydrogenasen (PA2554, PA2918, PA1982) eine Induktion unter Citronellol und Citronellsäure nicht jedoch unter Oktansäure, was auf eine Funktion dieser Proteine in Zusammenhang mit dem Terpenabbau hinweisen könnte. Da diese Enzyme jedoch unter Citronellol und Citronellsäure gleichermaßen reguliert waren, schließt dies eine exklusive Rolle bei der Umsetzung von Citronellol zu Citronellsäure aus. Unter allen Dehydrogenasen, welche

dieses Regulationsmuster aufwiesen, waren *AtuB* und *AtuG* am stärksten reguliert. Lediglich die „Probable Aldehyde Dehydrogenase (PA0366)“ war einzig unter Citronellol, nicht aber unter Citronell- bzw. Oktansäure induziert und wäre somit ein möglicher Kandidat für die exklusive Umsetzung von Citronellol zu Citronellsäure.

## 5.5 Validierung von 2D-DIGE-Experimenten mittels Selected Reaction Monitoring (SRM)

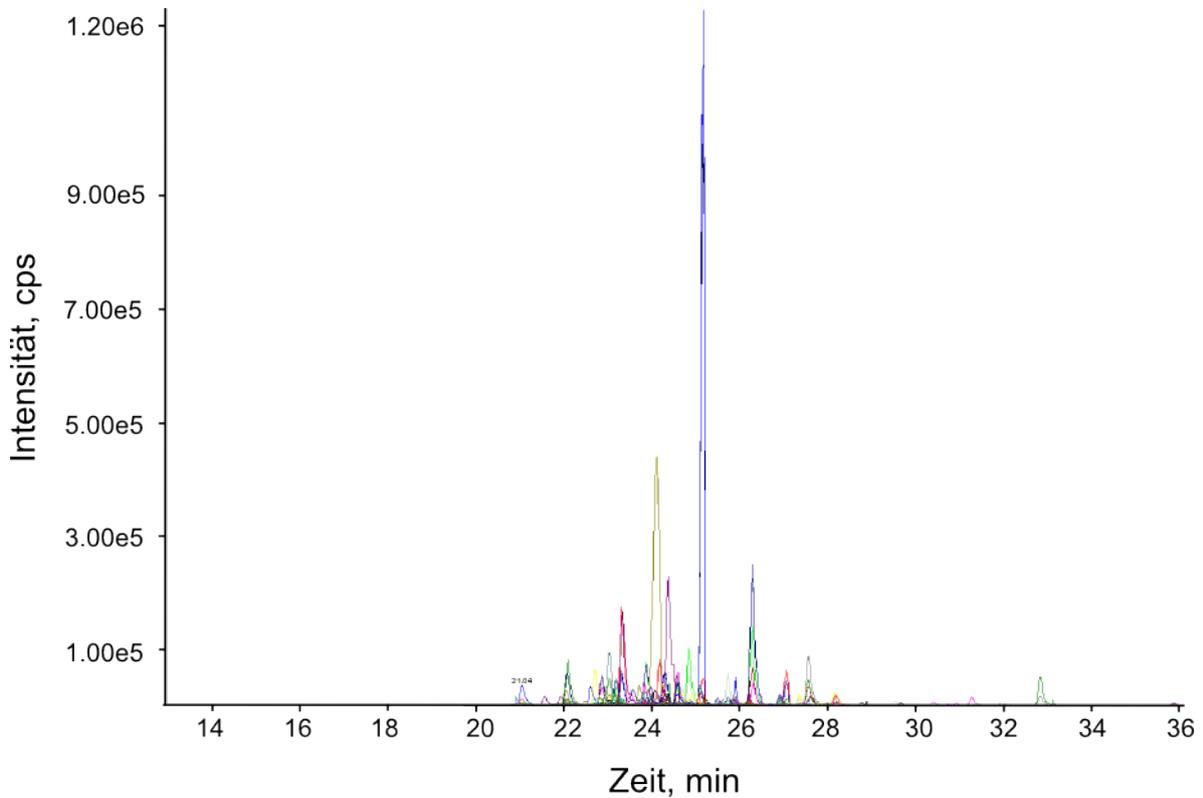
Wie bereits im Rahmen der 2D-DIGE-Analysen erwähnt, führt das Vorhandensein mehrerer Proteine in einem einzigen Spot zu Problemen bei der Identifizierung des in diesem Spot regulierten Proteins. Obwohl in der Regel das abundanteste Protein eines Spots als reguliert betrachtet wird, ist diese Annahme nicht immer korrekt (Timms *et al.*, 2008). Die Selektion des „richtigen“ Proteins wird zudem bei ähnlich abundanten Proteinen, gemessen an der Zahl der identifizierten Peptide, nahezu unmöglich. Daher wurden in diesen Fällen alle möglichen Kandidaten als reguliert betrachtet. In den Ergebnistabellen, welche im Anhang zu finden sind, wurden zudem alle in einem Spot identifizierten Proteine angegeben.

Für die anhand der im Vanillin-Teilprojekt für *P. putida* KT2440 erhobenen 2D-DIGE-Daten sollte daher mittels eines SRM-Ansatzes gezielt, das in einem Spot regulierte Protein identifiziert werden. Insgesamt waren in dem entsprechenden 2D-DIGE-Experiment 68 Spots reguliert, wovon in 66 Spots ein oder mehrere Proteine identifiziert werden konnten. In 19 dieser Spots wurden mehrere Proteine mit einer vergleichbaren Anzahl an Peptiden identifiziert. Diese Spots, sowie drei nicht-regulierte Spots wurden für die SRM-Analyse ausgewählt (Abbildung 5.42). Die in den nicht regulierten Spots identifizierten Proteine „Malic Enzyme“, Phosphoribosylaminoimidazole-Succinocarboxamide Synthase“ sowie das „PhoH Family Protein“ dienten zur Normalisierung (s. Kapitel 4). In den 19 für die SRM-Analyse ausgewählten Spots konnten 43 unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Für diese Proteine wurden mit Hilfe der Software MRMPilot<sup>TM</sup> geeignete proteotypische Peptide ausgewählt und „in silico“ je Peptid zwei SRM-Übergänge ermittelt. Diese Übergänge wurden mit einem MIDAS-Experiment (s. Kapitel 4) validiert und im Anschluss die drei intensivsten Übergänge jedes Peptids ausgewählt. Pro Protein wurden drei Peptide berücksichtigt. Ein Protein wurde somit im Idealfall durch neun SRM-Übergänge repräsentiert. Da nicht alle Proteine die nötige Zahl detektierbarer Peptide enthielten und nicht alle Peptide drei geeignete SRM-Übergänge lieferten, lag die Zahl der insgesamt analysierten Übergänge bei 341 (361 inklusive der für die Normalisierung benötigten Peptide) anstelle von 387 (407). Für alle Übergänge wurde im Folgenden die Kollisionsenergie (CE) optimiert um die Signalintensität



**Abbildung 5.42:** Gelbild des 2D-DIGE-Experiments „Glucose vs. 0,1% Vanillin“. Das Gelbild gibt den Vanillin-behandelten Zustand wieder. Differenziell regulierte Spots, welche für die SRM-Analyse ausgewählt wurden, sind mit Kreisen (unter Vanillin nach oben reguliert) bzw. Kästchen (unter Glucose nach oben reguliert) markiert. Sterne markieren nicht regulierte Spots, welche zur Identifizierung von „Housekeeping-Proteinen“ herangezogen wurden.

der SRM-Übergänge zu verbessern. Um eine größere Zahl von SRM-Übergängen ohne Sensitivitätsverlust in einem einzigen HPLC-Lauf analysieren zu können wurde eine „Scheduled-SRM-Methode“ eingesetzt.



**Abbildung 5.43:** Bei der Analyse einer mit Glucose behandelten Probe detektierte SRM-Übergänge.

Die unterschiedlichen Farben geben die verschiedenen, detektierten Übergänge wieder. Es wird deutlich, dass ein großer Teil der SRM-Übergänge in einem Zeitfenster zwischen Minute 20 und 28 aufgenommen wurde.

Nach erfolgter Optimierung der Kollisionsenergie wurden alle SRM-Übergänge auf Basis ihrer Retentionszeiten in einer einzigen „Scheduled-SRM-Methode“ zusammengefasst und die beiden Zustände (je drei Replikate) mit dieser Methode analysiert. [Abbildung 5.43](#) zeigt die während einer „Scheduled SRM-Analyse“ detektierten SRM-Übergänge. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software MultiQuant. SRM-Übergänge welche in einzelnen Analysen nicht oder nur schwer (verrauschte Signale) detektiert werden konnten, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Alle weiteren Schritte der Auswertung (Normalisierung, etc.) sind in [Kapitel 4](#) beschrieben. [Tabelle 5.44](#) zeigt die Ergebnisse der SRM-Analyse im Vergleich zu den Ergebnissen der 2D-DIGE Analyse.

**Tabelle 5.44:** Vergleich der Ergebnisse der 2D-DIGE und der SRM-Analyse der zytosolischen Fraktion von *P. putida* KT2440.

Regulationsfaktoren  $> 1$  zeigen eine Induktion unter Vanillin, Regulationsfaktoren  $< 1$  eine Induktion unter Glucose an. Proteine, welche in beiden Methoden eine ähnliche Regulation aufwiesen, sind in der Tabelle fett gedruckt.

Spot	gi Nummer	Protein-Name	2D-DIGE	SRM	Pep. ID
1071	26987080	dihydrolipoamide acetyltransferase	0,5	0,4	2
	26988179	TonB-dependent receptor	0,5	0,3	2
1103	<b>26987139</b>	<b>serine protein kinase PrkA</b>	<b>1,8</b>	<b>2</b>	<b>21</b>
	26991804	dihydroxy-acid dehydratase	1,8	0,9	29
	<b>26990883</b>	<b>succinate dehydrogenase flavoprotein subunit</b>	<b>1,8</b>	<b>2</b>	<b>20</b>
1124	26987139	serine protein kinase PrkA	1,9	2	31
	26990883	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1,9	2	26
1350	<b>26987283</b>	<b>aldehyde dehydrogenase family protein</b>	<b>4</b>	<b>3,6</b>	<b>16</b>
	26991765	arginyl-tRNA synthetase	4	0,9	15
1372	26988711	isopropylmalate isomerase large subunit	3	0,9	10
	<b>26989399</b>	<b>aldehyde dehydrogenase family protein</b>	<b>3</b>	<b>3,6</b>	<b>11</b>
1491	<b>26987737</b>	<b>arginine deiminase</b>	<b>5</b>	<b>6,9</b>	<b>27</b>
	<b>26988214</b>	<b>gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase</b>	<b>5</b>	<b>3,8</b>	<b>11</b>
	26991567	adenylosuccinate synthetase	5	0,7	11
1662	26991676	dihydroorotase	3,6	0,9	6
	<b>26990716</b>	<b>isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent</b>	<b>3,6</b>	<b>3,6</b>	<b>6</b>
1684	<b>26988671</b>	<b>aminomethyltransferase</b>	<b>11</b>	<b>52</b>	<b>18</b>
	26991491	gamma-glutamyl phosphate reductase	11	1,2	12
1754	26987193	elongation factor Tu	0,2	0,9	12
	<b>26987755</b>	<b>porin B</b>	<b>0,2</b>	<b>Glu</b>	<b>17</b>
1836	26987578	cysteine desulfurase	3,4	1,1	14

Spot	gi Nummer	Protein-Name	2D-DIGE	SRM	Pep. ID
	26990249	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	3,4	1	12
	26991831	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	3,4	1,3	18
	26986957	4-aminobutyrate aminotransferase	3,4	1,6	19
1854	26990491	aminotransferase	3,1	0,1	7
	<b>26987722</b>	<b>glycine cleavage system T protein</b>	<b>3,1</b>	<b>3,1</b>	<b>12</b>
	26987877	extracellular ligand-binding receptor	2,3	0,7	17
1874	26991638	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	2,3	1,2	11
	<b>26988458</b>	<b>ABC transporter periplasmic protein</b>	<b>2,3</b>	<b>5,4</b>	<b>18</b>
1921	26989632	delta-aminolevulinic acid dehydratase	1,8	1,3	9
	26987153	polyamine ABC transporter periplasmic protein	1,8	2,4	9
	26991857	putrescine ABC transporter periplasmic putrescine-binding protein	4,8	1,7	12
2021	26988489	hypothetical protein PP_1758	4,8	n.d.	8
	26988698	aromatic amino acid aminotransferase	4,8	0,7	9
	<b>26987735</b>	<b>carbamate kinase</b>	<b>4,8</b>	<b>8,2</b>	<b>9</b>
	<b>26990443</b>	<b>Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein</b>	<b>4,8</b>	<b>2</b>	<b>10</b>
2091	<b>26991857</b>	<b>putrescine ABC transporter periplasmic putrescine-binding protein</b>	<b>1,8</b>	<b>1,7</b>	<b>13</b>
	26991754	3-dehydroquinate synthase	1,8	0,9	8
2225	<b>26987615</b>	<b>oligopeptide/dipeptide ABC transporter ATPase</b>	<b>5,6</b>	<b>1,3</b>	<b>3</b>
	26988349	S-formylglutathione hydrolase	5,6	0,9	4
	26989183	inosine/uridine-preferring nucleoside hydrolase	5,6	0,1	2
2336	26989848	UDP-glucose 4-epimerase	9,1	Van	3
	26988670	formyltetrahydrofolate deformylase	9,1	Van	2
2548	26990382	aldo/keto reductase family oxidoreductase	9	0,6	5
	26988672	5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase	9	0,9	2

Spot	gi Nummer	Protein-Name	2D-DIGE	SRM	Pep. ID
2989	26991411	heat shock protein GrpE	4,1	0,8	5
	<b>26990657</b>	<b>3-oxoadipate CoA-transferase subunit B</b>	<b>4,1</b>	<b>Van</b>	<b>2</b>

*Spot*: Spotnummer in 2D-DIGE Gel

*Pep. ID*: Anzahl der im 2D-DIGE Experiment für das jeweilige Protein identifizierte Peptide

*n.d.*: Der entsprechende SRM-Übergang konnte in diesem Versuch nicht detektiert werden

*Van*: Protein wurde nur auf in Vanillin kultivierten Proben identifiziert

*Glu*: Protein wurde nur in auf Glucose kultivierten Proben identifiziert

Wie Tabelle 5.44 zeigt, konnten für 10 der 19 analysierten Spots das regulierte Protein eindeutig anhand der SRM-Daten identifiziert werden. In drei Spots, welche mehr als zwei Proteine enthielten, erlaubte die SRM-Analyse eine weitere Einschränkung der möglichen Kandidaten. In sechs Spots lieferte die SRM-Analyse keine klaren Hinweise auf das in dem jeweiligen Spot regulierte Protein. Die Analyse zeigte darüber hinaus, dass das abundanteste Protein nicht immer das regulierte Protein eines Spots darstellt (z.B. 1103, 2989).

Eine Limitierung dieser Methode besteht zweifellos in der Zahl der pro Analyse detektierbaren Übergänge, welche trotz der Verwendung einer „Scheduled-SRM-Methode“ beschränkt ist. So zeigte sich, dass das Zeitfenster (120 s), in welchem ein bestimmter SRM-Übergang detektiert wird, kritisch für die Analyse ist, da bereits kleine Schwankungen der Retentionszeit zu einem Verlust eines SRM-Signals führen können. Eine Vergrößerung des Zeitfensters zieht wiederum eine Reduktion der in einer Analyse messbaren SRM-Übergänge nach sich.

Eine weitere Optimierung in Hinblick auf Sensitivität und Durchsatz ist daher entscheidend für den weiteren Einsatz dieser Methode. Zudem sind die Bestimmung des technischen Fehlers sowie eine statistische Auswertung (Signifikanztest) zur Validierung der Methode unerlässlich. Da mit der Etablierung der GeLCMSMS-Methode in dieser Arbeit neben der 2D-DIGE-Analyse eine unabhängige Methode, welche die Identifizierung einer Vielzahl von Proteinen erlaubte, zur Verfügung stand, wurden diese Optimierungen jedoch nicht weiter verfolgt. Nichtsdestotrotz konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass „Single Reaction Monitoring“ eine vielversprechende Methode zur Validierung von 2D-DIGE-Experimenten darstellt.

## 6 Diskussion

### 6.1 Ethylenglycol und Glyoxylsäure

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämme *Pseudomonas putida* KT2440 und *Pseudomonas putida* JM37 wiesen in Gegenwart von Glyoxylsäure einige entscheidende Unterschiede in ihrer Proteinexpression auf.

So wuchs *P. putida* JM37 auf Glyoxylsäure als einziger Kohlenstoffquelle, deutlich schneller als *P. putida* KT2440, welcher erst nach 50 h Kultivierung zu wachsen begann. Entscheidend für das Wachstum auf Glyoxylsäure ist dessen Metabolisierung über das Enzym Glyoxylat Carboligase (Gcl) (Bailey *et al.*, 1966; Kornberg *et al.*, 1961a; Kornberg *et al.*, 1961b). Dies ist der einzige der drei postulierten Abbauewege, welcher ein „Auffüllen“ des Citratzyklus und somit die Synthese von Biomasse erlaubt. Wie die Inaktivierung von *gcl* in *P. putida* KT2440 zeigte, war dieses Enzym auch für das langsame Wachstum dieses Stammes auf Glyoxylsäure und Ethylenglycol essentiell (Persönliche Kommunikation, Björn Mückschel, AG Hauer, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart).

Im so genannten „Glycerat-Pathway“ werden zwei Moleküle Glyoxylat zu Tatronatsemialdehyd konjugiert und anschließend über mehrere Schritte in Pyruvat umgewandelt. Die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat durch das Enzym Pyruvat-Carboxylase stellt dann die eigentliche anaplerotische Reaktion dar. Über die beiden anderen postulierten Wege können keine Citratzyklus-Intermediate ersetzt werden, da sie jeweils zwei Decarboxylierungsschritte beinhalten. Beim „Dicarboxylic Acid Cycle“ wird Glyoxylat unter Addition von Acetyl-CoA durch das Enzym Malat Synthase (GlcB) in Malat umgewandelt, welches anschließend über Pyruvat zu Acetyl-CoA abgebaut wird und dem Zyklus erneut zur Verfügung steht (Kornberg *et al.*, 1961b). Die Synthese von Isocitrat aus Succinat und Glyoxylsäure durch das Enzym Isocitrat Lyase (AceA) und die folgende Rückgewinnung von Succinat erlaubt ebenfalls lediglich die Erzeugung von Energie.

Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass *P. putida* JM37 vornehmlich die Wege über die Enzyme Malat-Synthase (GlcB) und Glyoxylat-Carboligase (Gcl) verwendet, während *P. putida* KT2440 Glyoxylsäure lediglich über das Enzym Isocitrat-Lyase (AceA) zu metabolisieren scheint. Auf eine Induktion des „Glycerat-Pathway“

in *P. putida* JM37 deutet zudem die Induktion der Enzyme Hydroxypyruvat-Isomerase (PP\_4298), Hydroxypyruvat-Reductase (PP\_4300) und der Pyruvat-Kinase (PP\_4301) hin. Wie Li *et al.* (2010) zeigten, waren alle Mutanten von *P. putida* JM37 nach Inaktivierung von *gcl* ( $\Delta gcl$ ,  $\Delta gcl/\Delta aceA$ ,  $\Delta gcl/\Delta glcB$ ), zum Wachstum auf Glyoxylat fähig. Dies würde einen weiteren Abbauweg für Glyoxylsäure in *P. putida* JM37, welcher ebenfalls Wachstum auf diesem Substrat erlaubt, vermuten lassen. Unsere Experimente lieferten jedoch keinen Hinweis auf die Existenz eines solchen alternativen Abbauweges. Bei den beiden unter Ethylenglycol induzierten Alkohol-Dehydrogenasen PedE (PP\_2674) und PedH (PP\_2679) handelt es sich um Pyrrolochinolinchinon-abhängige, periplasmatische Enzyme, welche untereinander eine Aminosäure-Sequenzidentität von 52% aufweisen. Zudem zeigen sie ein hohes Maß an Sequenzidentität zu den in *P. putida* U identifizierten Alkohol-Dehydrogenasen PedE und PedH (98%, 99%), welche dort am Abbau von 2-Phenylethanol beteiligt sind (Arias *et al.*, 2008) (Tabelle 6.1). Arias *et al.* (2008) zeigten, dass das Wachstum einer  $\Delta pedE::Tn5$  Mutante auf C<sub>6</sub>-C<sub>9</sub> Alkoholen sowie Phenylethanol deutlich verlangsamt war und die maximal erreichte OD<sub>600</sub> geringer als diejenige des Wildtyps ausfiel. Unter Ethanol und Butanol zeigte die Mutante hingegen ein deutlich schnelleres Wachstum und erreichte zudem eine höhere maximale OD<sub>600</sub>. Auf den Abbau von Decanol hatte die Mutation keinen Einfluss. Die Doppelmutante  $\Delta pedE::Tn5$ ,  $\Delta pedH::pJQ200KS$  konnte auf den oben genannten Substanzen nicht wachsen. Arias *et al.* (2008) schlossen daraus, dass der Abbau von Alkoholen, welche eine Kettenlänge von weniger als sechs C-Atomen aufweisen nicht über PedE und PedH verläuft. Aufgrund dieser Daten postulierten sie des Weiteren eine Präferenz von PedH für Decanol (Arias *et al.*, 2008). Ob PedE und PedH auch am Metabolismus von Diolen beteiligt sind, wurde nicht untersucht.

**Tabelle 6.1:** Vergleich der Aminosäuresequenz der Proteine PedE, PedH, PedI und PedR1 zwischen *P. putida* KT2440, *P. putida* U, *P. aeruginosa* und *P. putida* HK5.

<i>P. putida</i> KT2440	% Aminosäuresequenzidentität (Name) des homologen Proteins in :				
	<i>P. putida</i> U	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. putida</i> HK5		
PedR1 (PP_2665)	91 (PedR1)	86 (ErbR)	-	-	-
PedE (PP_2674)	98 (PedE)	84 (ExaA)	90 (ADH I)	38 (IIB)	73 (IIG)
PedH (PP_2679)	99 (PedH)	52 (ExaA)	53 (ADH I)	40 (IIB)	82 (IIG)
PedI (PP_2680)	97 (PedI)	88 (ExaC)	-	-	-

-: Keine Sequenz bekannt

IIB:ADH IIB, IIG:ADH IIG

Die Mutanten GN116 ( $\Delta$ PP\_2674), GN104 ( $\Delta$ PP\_2679) und GN127 ( $\Delta$ PP\_2674,  $\Delta$ PP\_2679) wurden, ähnlich wie bei Arias *et al.* (2008) von Yvonne Beck (Beck, 2012) auf ihr Wachstum in Gegenwart verschiedener Alkohole getestet. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zu den in *P. putida* U publizierten Daten (Arias *et al.*, 2008), was die Umsetzung kurzkettiger (C<sub>2</sub> bis C<sub>5</sub>) Alkohole betraf. Ethanol, Butanol und Pentanol wurden in der Mutante GN127 wesentlich langsamer als im Wildtyp umgesetzt. Oktanol konnte nicht metabolisiert werden. In GN116 und GN104 konnten hingegen keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Im Hinblick auf Ethylenglycol war die Umsetzung in der Mutante GN127 ebenfalls drastisch reduziert, die verbliebene Aktivität und die Akkumulation von Oxalat waren vermutlich auf andere unspezifische Dehydrogenasen zurückzuführen (Mückschel *et al.*, 2012). Bei der Umsetzung von Glyoxylsäure und Glycolsäure konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Dies deutet auf eine Rolle der beiden Alkohol-Dehydrogenasen in den ersten Schritten des Ethylenglycol-Abbaus sowie eine Redundanz der beiden Enzyme in Bezug auf den Abbau verschiedener Alkohole in *P. putida* KT2440 hin. Zudem scheint sich das Substratspektrum von PedE und PedH aus *P. putida* U von dem Substratspektrum von PedE und PedH aus *P. putida* KT2440 zu unterscheiden (Arias *et al.*, 2008).

Neben der großen Sequenzidentität zu *P. putida* U zeigten die beiden Alkohol-Dehydrogenasen auch eine große Übereinstimmung mit der in *P. aeruginosa* beschriebenen Alkohol-Dehydrogenase ExaA (Rupp *et al.*, 1988; Görisch *et al.*, 1989) und den in *P. putida* HK5 beschriebenen Alkohol-Dehydrogenasen ADH I und ADH IIG (Toyama *et*

*al.*, 1995; Toyama *et al.*, 2005) (Tabelle 6.1). Im Gegensatz zu PedE und PedH in *P. putida* U ist ExaA in *P. aeruginosa* vor allem als Ethanol-Dehydrogenase beschrieben (Rupp *et al.*, 1988; Görisch *et al.*, 1989). Wie Chattopadhyay *et al.* (2010) zeigten, kann ExaA jedoch neben Ethanol noch eine Vielzahl weiterer Alkohole metabolisieren und scheint zudem am Abbau von Terpenen (s. Abschnitte 5.4 und 6.5) beteiligt zu sein. *P. aeruginosa* verfügt anders als *P. putida* U und *P. putida* KT2440 lediglich über eine PQQ-abhängige Alkohol-Dehydrogenase. PP\_2674 und PP\_2679 weisen Sequenzidentitäten von 84% bzw. von 52% gegenüber ExaA auf.

Eine deutlich höhere Sequenzidentität (82%) zeigt PP\_2679 mit der Alkohol-Dehydrogenase ADH IIG von *P. putida* HK5 (Toyama *et al.*, 1995). Alkohol-Dehydrogenasen dieses Typs enthalten neben PQQ auch HämC als weitere prosthetische Gruppe und liegen funktional als Monomere vor (Anthony, 2001). Das bevorzugte Substrat der von ADH IIG aus *P. putida* HK5 ist 1,2-Propandiol, Ethandiol bewirkte lediglich eine schwächere Induktion dieses Enzyms (Promden *et al.*, 2009). Ethanol und Butanol bewirkten keine Induktion (Promden *et al.*, 2009). Sowohl das für eine ADH II geringe Molekulargewicht (64,9 kDa) als auch das mit dem Wildtyp vergleichbare Wachstum der Mutante GN116 auf verschiedenen Alkoholen deuten darauf hin, dass es sich bei PP\_2679 um eine ADH des Typs I und nicht wie es die Sequenzhomologie nahe legt eine ADH vom Typ II handelt. In Bezug auf die Substratspezifität und die Umsatzrate zeigten PedE und PedH zudem in keinem der durchgeführten Versuche nennenswerte Unterschiede.

Die im Rahmen der Proteomics-Experimente identifizierten Aldehyd-Dehydrogenasen PP\_0545 und PP\_2680 (PedI) waren in Gegenwart von Ethylenglycol in *P. putida* KT2440, GN259 und JM37 induziert. Besonders bei der Analyse des Membranproteoms zeigte sich, dass PP\_2680 hierbei eine deutlich stärkere Induktion als PP\_0545 aufwies. Die Doppelmutante GN345 ( $\Delta$ PP\_0545,  $\Delta$ PP\_2680) zeigte bei Umsetzungsversuchen mit Ethylenglycol zu Beginn eine temporäre Anreicherung von Glycolaldehyd, welches im weiteren Verlauf des Experiments jedoch weiter metabolisiert wurde (Persönliche Kommunikation, Björn Mückschel, AG Hauer, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart). Dieser weitere Abbau ist möglicherweise auf die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase PedE (und evtl. auch PedH) zurückzuführen, welche offenbar auch eine Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität besitzt. Wie Yvonne Beck (Beck, 2012) in Enzymtests mit über-exprimierter PedE zeigte, weist PedE gegenüber Glycolaldehyd eine vergleichbare Aktivität wie gegenüber Ethylenglycol auf. Somit ist ein Knockout der beiden unter Ethylenglycol induzierten Aldehyd-Dehydrogenasen für eine langfristige Akkumulation von Glycolaldehyd nicht ausreichend.

Neben der Spezifität und Umsatzrate der Enzyme ist auch die Lokalisation der an der Katalyse der einzelnen Schritte beteiligten Enzyme von Bedeutung. Während

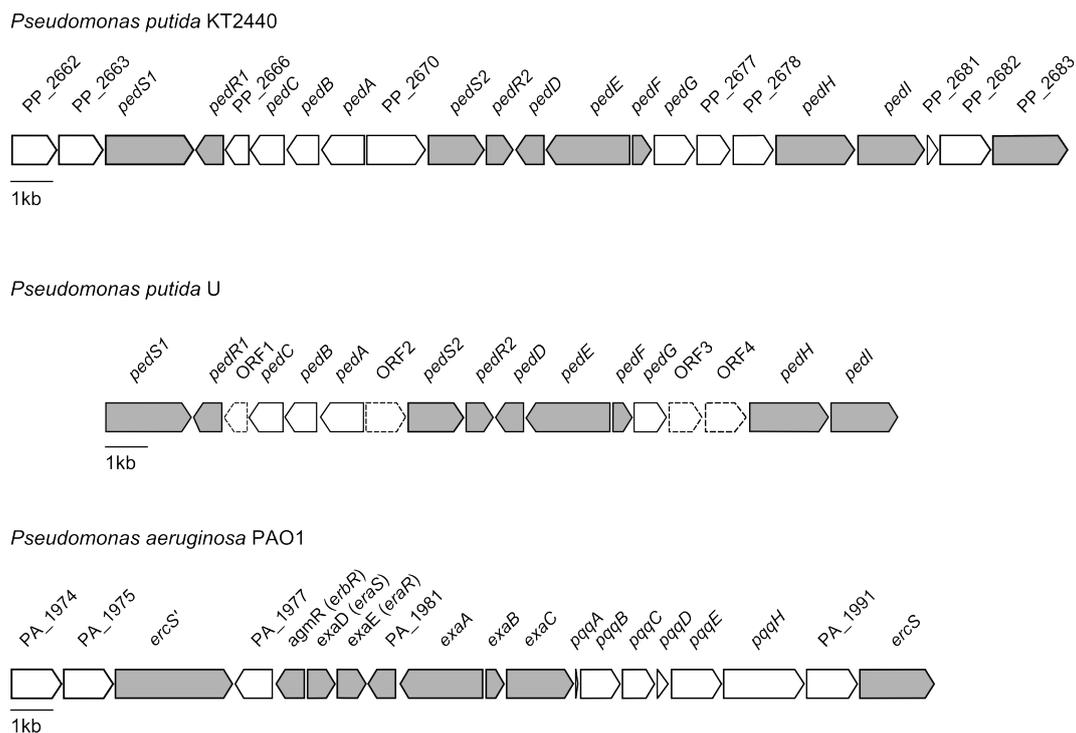
es sich bei PedE und PedH um periplasmatische Enzyme handelt, sind PP\_0545 und PedI im Zytoplasma lokalisiert (vorhergesagt durch psort 3.0). Für den Transport von Ethylenglycol über die äußere Membran könnte das hypothetische Protein PP\_2662, welches in allen drei untersuchten Stämmen unter Ethylenglycol verstärkt exprimiert wurde, zuständig sein. Laut der „Conserved Domain Database (CDD)“ handelt es sich bei diesem Protein um ein Porin das der „OM-Channels“ Superfamilie angehört. Ob und wie Ethylenglycol bzw. eines seiner postulierten Abbauprodukte (Glycolaldehyd, Glycolsäure, Glyoxylsäure) über die innere Membran gelangen, ist nicht bekannt. Ein mögliches Transportprotein könnte die Acetat-Permease (ActP, PP\_1743) darstellen, welche in allen untersuchten Stämmen unter Glyoxylsäure und in *P. putida* KT2440 auch unter Ethylenglycol eine deutliche Induktion zeigte. Dieses Protein weist eine Sequenzidentität von 96% zu YjcG einer Acetat-Permease aus *E. coli* K12 auf. In der Arbeit von Gimenez *et al.* (2003) finden sich Hinweise, dass YjcG neben Acetat auch Glycolat als Substrat akzeptieren könnte. Ob auch kurzkettige Alkohole zu dem Substratspektrum des zur Aldehyd-Dehydrogenase (PP\_0545) benachbarten Ethanolamin-Transporter (PP\_0544) gehören und dieser somit ebenfalls eine Rolle beim Transport von Ethylenglycol spielen könnte, ist nicht bekannt. Die Induktion von PP\_0544 in *P. putida* GN259 unter Ethylenglycol lässt dies jedoch vermuten.

Von Interesse für den Transport könnten außerdem die Produkte der Gene PP\_2667-PP\_2669 sein, welche alle eine starke Homologie zu den Proteinen PedABC aus *P. putida* U aufweisen und dort für die drei Komponenten eines ABC-Transporters kodieren (Arias *et al.*, 2008). Dieses Transportsystem war jedoch weder unter Ethylenglycol noch unter Glyoxylsäure induziert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus *P. putida* U, wo eine Mutante  $\Delta pedABC$  keinen Einfluss auf das Wachstum mit kurzkettigen ( $C_2$ - $C_3$ ) Alkoholen zeigte, jedoch bei Kettenlängen zwischen  $C_4$  und  $C_{10}$  einen drastischen Effekt auf das Wachstum hatte (Arias *et al.*, 2008).

In *P. aeruginosa* ATCC 17933 wird der Abbau von Ethanol (und auch anderen Alkoholen) durch ein hierarchisches Netzwerk reguliert (Mern *et al.*, 2010). Neben der Alkohol-Dehydrogenase ExaA, stehen auch die Aldehyd-Dehydrogenase ExaC und das Cytochrom 550 (ExaB) sowie die PQQ-Biosynthesepoteine PqqABCDEH (PA1985-PA1990) unter der Kontrolle des Regulators ErbR (PedR1) (Schobert *et al.*, 2001; Gliese *et al.*, 2004; Gliese *et al.*, 2010). ErbR wurde erstmals von Schweizer (1991) als Regulator des Glycerol-Metabolismus beschrieben. Wie Gliese *et al.* (2004) zeigten, erfolgt die Kontrolle von ExaA nicht direkt durch ErbR sondern über die Sensorkinase EraS und den Response Regulator EraR. Mern *et al.* (2010) identifizierten über diese Ebenen der Regulation hinaus die beiden Sensorkinasen ErcS und ErcS' sowie den Response Regulator ErdR, welche ErbR übergeordnet sind. Dabei wird ErdR konstitutiv exprimiert, während die Aktivität des *ercS*-Promotors von der eingesetzten Kohlen-

stoffquelle abhängig ist. Dies gilt auch für *erbR*, dessen Promotor unter Butanol 40% und unter Glycerol 60% der Aktivität derer unter Ethanol erreichte. Aufgrund der von Kretzschmar *et al.* (2008) beobachteten Beeinträchtigung der Ethanol-Oxidation durch Inaktivierung von *aceA*, spekulierten Mern *et al.* (2010) über den Einfluss verschiedener Stoffwechselintermediate auf die Oxidation von Ethanol. Sie vermuten, dass dieser Einfluss über die einzelnen Regulationsebenen vermittelt wird. Eine Übertragung des Regulationsmodells auf *P. putida* wurde erstmals von Vrionis *et al.* (2002) vorgeschlagen. Sie zeigten, dass ein zu ErbR homologes Protein auch in *P. putida* ATCC 11172 für den Ethanol-Abbau essentiell ist. Eine Inaktivierung von *erbR* (Tn5 insert) in *P. putida* ATCC 11172 führte zu einer drastischen Verringerung des Ethanol- und Decanol-Umsatzes.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass der Abbau von Ethylenglycol in *P. putida* KT2440 durch ein vergleichbares Regulon wie in *P. aeruginosa* gesteuert wird. Ein erstes Indiz hierfür stellt die vergleichbare Anordnung der entsprechenden Gene sowie deren Homologie in *P. putida* KT2440, *P. putida* U und *P. aeruginosa* dar (Abbildung 6.1).



**Abbildung 6.1:** Vergleich des PedR1-Genclusters zwischen den Stämmen *P. putida* KT2440, *P. putida* U und *P. aeruginosa*. Grau hinterlegte Gene zeigen eine starke Homologie zwischen den drei Stämmen. „Open Reading Frames“ (ORFs) sind nicht in ihrer tatsächlichen Größe dargestellt.

Die verstärkte Expression der wichtigsten Effektoren des Regulons (PedE, PedI, PqqC)

sowie die Induktion von PedR1 (ErbR) und PedS1 (ErcS') unter Ethylenglycol in *P. putida* KT2440 stellen einen weiteren Hinweis dar. Die entsprechenden Proteine waren in *P. putida* JM37, bis auf die in diesem Stamm nicht identifizierten Proteine PedS1 und PqqC, nach Ethylenglycol-Gabe ebenfalls induziert.

Auffällig ist, dass PedE und PedI in *P. putida* GN259 sowohl in den 2D-DIGE-Experimenten als auch bei der Analyse des Membranproteoms eine Induktion unter Ethylenglycol zeigten, obwohl PedR1 in diesen Experimenten nicht identifiziert werden konnte. In diesem Zusammenhang kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich PedR1 in dem 2,9-fach regulierten, aber nicht identifizierten Spot 1311, welcher aufgrund seiner Position PedR1 enthalten könnte, befindet. Die verringerte Induktion der an der Ethylenglycol-Oxidation beteiligten Enzyme, könnte auf den Knockout von *aceA* in *P. putida* GN259 zurückzuführen sein. Wie Kretzschmar *et al.* (2008) zeigten, wurde ein vergleichbarer Effekt auch in *P. aeruginosa* in Hinblick auf die Oxidation von Ethanol beobachtet. Um eine Rolle der zu den Regulatoren in *P. aeruginosa* homologen Proteine auch für die Regulation des Ethylenglycol Abbaus in *P. putida* KT2440 sicher nachzuweisen, sowie deren hierarchische Anordnung aufzuklären, bedarf es weiterer Untersuchungen. Eine Inaktivierung von PedR1 (ErbR) und eine anschließende Beobachtung der Induktion von PedE und PedI wäre hierzu ein erster Schritt. Dieses Experiment könnte zudem Aufschluss darüber geben, ob PedH ebenfalls der Kontrolle von PedR1 unterliegt, wie es die Ergebnisse von Vrionis *et al.* (2002) in *P. putida* ATCC 11172 nahelegen. Während Arias *et al.* (2008) davon ausgehen, dass es sich bei PedS1 (ErcS') um die Sensorkinase von PedR1 (ErbR) handelt, legen Versuche von Mern *et al.* (2010) nahe, dass die zu ErbR gehörende Sensorkinase in *P. aeruginosa* noch nicht identifiziert wurde.

Obwohl Ethanol das bevorzugte Substrat der Alkohol-Dehydrogenase ExaA ist, werden offenbar auch viele weitere Alkohole und auch Terpene über dieses Enzym abgebaut (Mern *et al.*, 2010; Chattopadhyay *et al.*, 2010). Einen weiteren Einblick in die Regulation des Metabolismus von Alkoholen in *P. putida* KT2440 gibt daher der folgende Abschnitt, welcher sich mit dem Abbau von Butanol befasst.

## 6.2 Butanol

Im Rahmen der Untersuchung der Butanol-Toleranz und des Butanol-Metabolismus wurden sowohl Experimente in Schüttelkolben, als auch in Fermentern durchgeführt. Diese unterschieden sich neben dem grundsätzlich verschiedenen Versuchsaufbau auch in der Menge des zugegebenen Butanols und der Versuchsdurchführung. So wurden im Schüttelkolben-Experiment (Hauptkultur) insgesamt neun Kolben mit 100 ml M12-BVT Medium mit 2 g/l Glucose als Kohlenstoffquelle auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,02

angepflicht. Die Zugabe von 0,5 g/l Butanol bzw. 3 g/l Butanol erfolgte als Puls in jeweils drei Schüttelkolben. Im Gegensatz hierzu wurden die Bakterien im Bioreaktor in einem kontinuierlichen Prozess kultiviert. Die Proben für Steady-State I wurden nach 50 h Kultivierung mit 10 g/l Glucose, die Proben für Steady-State II nach weiteren 50 h Kultivierung mit 10 g/l Glucose + 0,75 g/l Butanol (Feedmedium) und die Proben für Steady-State III nach weiteren 50 h Kultivierung mit 10 g/l Glucose + 7,5 g/l Butanol (Feedmedium) entnommen. Nach 50 h (5 Verweilzeiten) waren mehr als 99% des Reaktorvolumens ausgetauscht. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Bakterien im Bioreaktor zum Zeitpunkt der Probenahme ihren Metabolismus an die jeweils erhöhte Kohlenstoff-Verfügbarkeit angepasst hatten und die beobachteten Unterschiede in der Proteinexpression eine langfristige Anpassung an die entsprechende Butanolkonzentration darstellen.

Die Regulationen im Schüttelkolben spiegeln hingegen eher die unmittelbare Reaktion auf einen „Butanol-Schock“ unterschiedlicher Konzentration wider. Es ist anzumerken, dass die im Fermenter gemessenen Butanolkonzentrationen weit unter den in den Schüttelkolben eingesetzten Konzentrationen lagen. So wurden bei einer Butanolkonzentration von 7,5 g/l im Feedmedium aufgrund der C-Limitierung lediglich 0,5 mg/l Butanol im Reaktor gemessen.

Ob neben den unterschiedlichen Butanolkonzentrationen auch die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (pH-Kontrolle, O<sub>2</sub>-Versorgung, Verfügbarkeit der C-Quelle) einen Einfluss auf die Ergebnisse hatten, lässt sich nicht abschließend klären. Da auf Proteomebene jedoch keine direkten Vergleiche zwischen Fermenter- und Kolben-Proben durchgeführt wurden, sollten die in beiden Experimenten beobachteten Expressionsunterschiede vor allem auf die jeweils eingesetzte Butanolkonzentration zurückzuführen sein.

### **6.2.1 Vergleich der aus dem Schüttelkolben und dem Bioreaktor erhaltenen Daten**

Ein Vergleich der in beiden Experimenten durchgeführten 2D-DIGE-Analysen zeigte, dass insbesondere Enzyme der  $\beta$ -Oxidation in den Schüttelkolben-Experimenten eine deutlich stärkere Regulation als im Fermenter aufwiesen (Tabelle 6.2). Auch die vermuteten initialen Enzyme des Abbauweges, die Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen PedE und PedI, waren in den beiden Experimenten unterschiedlich stark reguliert. Während diese Enzyme im Schüttelkolben bei 0,5 g/l Butanol die stärkste Expression zeigten und bei 3 g/l weniger stark exprimiert wurden, stieg deren Expression im Fermenter mit steigender Butanolkonzentration weiter an (Tabelle 6.2). PedI wurde dabei im Fermenter unter 0,75 g/l Butanol nicht identifiziert, zeigte jedoch unter 7,5 g/l Bu-

tanol eine deutliche Induktion.

**Tabelle 6.2:** Vergleich differentiell regulierter Proteine in den Schüttelkolben- und Bioreaktor-Experimenten.

Die angegebenen Regulationsfaktoren stammen aus den jeweiligen 2D-DIGE Experimenten. Wurde ein Protein in mehreren Spots detektiert, ist in dieser Tabelle der Regulationsfaktor des am stärksten regulierten Spots angegeben. Proteine wurden als reguliert betrachtet, wenn sie um eine Faktor von 1,8 bzw. 0,6 reguliert waren und einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen. Ein Regulationsfaktor  $> 1$  zeigt eine verstärkte Expression des entsprechenden Proteins im behandelten Zustand an.

			Kolben		Fermenter	
			0,5 g/l	3,0 g/l	0,75 g/l	7,5 g/l
PP_2674	qedH	Quinoprotein Ethanol Dehydrogenase	6,4	NID	14	37
PP_5278		Aldehyde Dehydrogenase Family Protein	NID	1,9	NID	NID
PP_2680		Aldehyde Dehydrogenase Family Protein	4,3	2,5	NI	8,7
PP_4487	acsA	Acetyl-CoA Synthetase	3,5	2,4	6	19
PP_3553		Acyl-CoA Synthetase	9,2	8,5	NID	NID
PP_0763		Long-Chain-Fatty-Acid-CoA Ligase	NID	1,8	NID	NID
PP_3554		Acyl-CoA Dehydrogenase Domain-Containing Protein	2,2	2,3	NID	NID
PP_2136	fadB	Multifunctional Fatty Acid Oxidation Complex	NID	3,5	NID	NID
PP_3755	paaH	3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase	7,6	4,6	NID	NID
PP_3754		Beta-Ketothiolase	6,7	3,9	NID	NID
PP_2662		Hypothetical Protein	4,5	NID	NID	NID
PP_2665	agmR	LuxR Family Two Component Transcriptional Regulator	2,7	NID	NID	NID
PP_2673		Pentapeptide Repeat-Containing Protein	3,7	NID	NID	NID
PP_4116	aceA	Isocitrate Lyase	3,9	1,9	NID	5,2
PP_4201		Electron Transfer Flavoprotein	1,8	2	NID	NID
PP_4203		Electron-Transferring-Flavoprotein Dehydrogenase	2,5	3	NID	NID
PP_4870		Azurin	1,9	NID	NID	NID

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden)

Die im Schüttelkolben geringere Expression der beiden Enzyme nach Behandlung mit

3 g/l Butanol könnte auf unmittelbare toxische Effekte des Butanols und eine damit verbundene Stressantwort zurückzuführen sein. Auf eine ausgeprägte Stressantwort unter 3 g/l Butanol deutet zudem die Induktion der Stressproteine Hydroperoxidase II (PP\_0115), Universal Stress Protein (PP\_2132), Alkyl-Hydroperoxide-Reductase (PP\_2439), Heat Shock Protein 90 (PP\_4179) und Chaperone-Associated ATPase (PP\_3095) hin. Eine generelle Beeinträchtigung der Proteinexpression kann jedoch ausgeschlossen werden, da eine Induktion verschiedener Enzyme der  $\beta$ -Oxidation unter 3 g/l Butanol zu beobachten war. Die spezifische Regulation von PedE und PedI sowie einiger weiterer Proteine wird vermutlich über PedR1 kontrolliert. Dieses bereits in den mit Ethylenglycol durchgeführten Experimenten induzierte Regulon wurde in Abschnitt 6.1 ausführlich besprochen.

Warum in den aus dem Bioreaktor entnommenen Proben im Rahmen der 2D-DIGE-Experimente weder in Steady-State II noch in Steady-State III eine Induktion der Enzyme der  $\beta$ -Oxidation festgestellt werden konnte, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Möglicherweise waren die entsprechenden Proteine in Spots enthalten, welche zwar differentiell reguliert waren, aber in denen die massenspektrometrische Identifizierung kein Ergebnis erbrachte. Zudem könnte eine Regulation durch die Fluoreszenz andere Proteine des gleichen Spots überdeckt worden sein. Wie die Ergebnisse zeigen, konnten mit Hilfe des alternativen 1D-Fraktionierungs-Experiments auch in den aus dem Bioreaktor erhaltenen Proben Enzyme der  $\beta$ -Oxidation identifiziert werden.

Es ist zu vermuten, dass in den im Bioreaktor kultivierten Bakterien die Degradation von Butanol als Resistenzmechanismus ausreichend war. Auch im Schüttelkolben scheint dies nach Behandlung mit 0,5 g/l Butanol der entscheidende Resistenzmechanismus zu sein. Nach Behandlung mit 3 g/l Butanol spielen offenbar andere Resistenzmechanismen (Efflux, Stressproteine) eine entscheidende Rolle.

### **6.2.2 GeLCMSMS-Analyse der aus dem Bioreaktor entnommenen Proben**

Mit den aus dem Fermenter stammenden Proben wurde zusätzlich zu den 2D-DIGE-Analysen und der Analyse des Membranproteoms eine GeLCMSMS-Analyse durchgeführt (s. Kapitel 4). Daher liegen zu diesem Versuch deutlich umfangreichere Daten als zu den Schüttelkolbenexperimenten vor. Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Regulationen beziehen sich, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, auf die Ergebnisse dieses Experiments.

Wie Tabelle 5.17 in Abschnitt 5.2.3.3 zeigt, waren sowohl in Steady-State II als auch in Steady-State III verschiedene Enzyme der  $\beta$ -Oxidation verstärkt exprimiert. Bis auf die Acyl-CoA Dehydrogenase (FadA) waren alle aus diesem Abbauweg induzierten

Enzyme zwischen Steady State I und Steady-State III stärker als zwischen Steady-State I und Steady-State II reguliert. Dies gilt gleichermaßen für die Alkohol-Dehydrogenasen PedE und PedH, die Aldehyd-Dehydrogenase PedI sowie die Enzyme des Glyoxylat-Shunts AceA und GlcB, wovon letzteres nur in Steady-State III verstärkt exprimiert wurde. Daher korreliert die Expression des in Abbildung 5.20 dargestellten Abbauweges offenbar mit der im Feedmedium eingesetzten Butanolkonzentration.

Der in Abbildung 5.20 dargestellte Abbauweg deckt sich zudem mit dem von Rühl *et al.* (2009) im Rahmen einer Stoffflussanalyse postulierten Abbau-Weg. Laut Rühl *et al.* (2009) führte die Butanolexposition (1% (10 g/l) Butanol) von *P. putida* KT2440 zu einem Anstieg der Glucoseaufnahme und einem verstärkten metabolischen Fluss in Richtung Citratzyklus. Dies wird mit einem erhöhten Energiebedarf der Zelle, aufgrund von Veränderungen der Membran, der Induktion von Effluxsystemen und der Beeinträchtigung des Protonengradienten erklärt (Rühl *et al.*, 2009).

Die in unserem GeLCMSMS-Experiment beobachtete verstärkte Expression von Enzymen des Glyoxylat-hunts (AceA, GlcB), deutet darauf hin, dass vor allem dieser Weg unter dem Einfluss höherer Butanolkonzentrationen verstärkt genutzt wird. Eine Induktion der Enzyme Pyruvat-Carboxylase und „Malic Enzyme“, welche anaplerotische Reaktionen katalysieren, konnte nicht festgestellt werden. Zusätzlich zu der im Fermenter durchgeführten Stoffflussanalyse wurden von Rühl *et al.* (2009) verschiedene *Pseudomonaden* auf ihre Butanol-Toleranz getestet (Toxizitätstests). Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten *Pseudomonas*-Stämmen konnte *P. putida* KT2440 nur bis zu einer Konzentration von 1,5% (15 g/l) Butanol wachsen, was auch durch eine Adaption an Butanol nicht verbessert werden konnte.

### 6.2.3 Differentiell regulierte Proteine des Membran Auf- und Umbaus

Auffällig war, dass in *P. putida* KT2440 im Rahmen der GeLCMSMS-Analysen keine Induktion von Enzymen, welche am Membran-Auf- oder Umbau beteiligt sind, festgestellt werden konnte. Auch die beiden anderen Versuche lieferten keine eindeutigen Hinweise auf einen Umbau der Membran. So waren zwischen Steady-State I und Steady-State II lediglich einige Enzyme, welche am Anfang der Fettsäurebiosynthese stehen, induziert (PP\_0559, PP\_0581, PP\_4545; PP\_4379).

Laut einer Arbeit von Rühl *et al.* (2012) zeigte *P. putida* KT2440 nach Adaption an Butanol einen erhöhten Anteil an Phosphatidylglycerol am gesamten Glycerophospholipid (Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Cardiolipin) sowie einen erhöhten Anteil ungesättigter Fettsäuren. Zudem kam es zu einer Erhöhung des Anteils an *cis*- im Vergleich zu *trans*-ungesättigten Fettsäuren. Die letzten beiden Änderungen de-

cken sich dabei nicht mit der in Gegenwart von Butanol oder anderer Lösungsmittel zu erwartenden Antwort, da sie die Fluidität der äußeren Membran erhöhen. Der lösungsmitteltolerante Stamm *P. putida* DOT-T1E, zeigte im Hinblick auf den Anteil gesättigter Fettsäuren eine entgegengesetzte Tendenz (Rühl *et al.*, 2012).

Rühl *et al.* (2012) stellten zudem fest, dass das Enzym Cti (PP\_2376), welches die *cis/trans*-Isomerisierung von Fettsäuren katalysiert in *P. putida* KT2440 zwar kodiert wird, offenbar aber keine Funktion zeigt. Auch wir konnten weder in den im Schüttelkolben noch in den im Fermenter durchgeführten Versuchen eine Induktion dieses Enzyms feststellen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass zum Zeitpunkt der Probenahme der Prozess der Umstrukturierung der äußeren und inneren Membran bereits abgeschlossen war und die beteiligten Enzyme zu diesem Zeitpunkt nicht mehr reguliert waren.

#### 6.2.4 Transporter und Efflux-Systeme

Als ein weiterer möglicher Mechanismus der Lösungsmitteltoleranz in *P. putida* KT2440, welcher einen erhöhten ATP-Bedarf mit sich bringt, kommt ein aktiver Export von Butanol in Betracht. Wie bereits im Experiment mit Ethylenglycol zeigte *P. putida* KT2440 auch unter Butanol eine verstärkte Expression der Acetat-Permease (ActP), welche mit steigender Butanolkonzentration weiter anstieg. Unter 7,5 g/l Butanol waren zudem das MFS\_1-Protein (PP\_0288) die „ABC Transporter ATP-Bindeproteine“ (PP\_0196, PP\_2131) sowie das RND Efflux-System (PP\_3582) induziert. Von diesen Proteinen wiesen MFS\_1 (PP\_0288) und die Acetat Permease (ActP) die deutlichste Regulation auf. PP\_0288 enthält laut der Conserved Domain Datenbank (CDD) eine oder mehrere Domänen welche zu einem Oxalat/Formiat Antiporter aus *Oxalobacter formigenes* homolog sind. In *Oxalobacter formigenes* dient dieser Antiporter dem Aufbau eines Protonengradienten über die innere Membran (Anantharam *et al.*, 1989). Eine Besonderheit dieses Organismus ist dessen Fähigkeit, ohne Zufuhr von Zuckern einen Protonengradienten, der auf dem beschriebenen Antiporter beruht, aufzubauen und diesen zur Energiegewinnung zu nutzen (Allison *et al.*, 1985). Da ein ähnliches System in *P. putida* KT2440 unwahrscheinlich erscheint, kann aufgrund der Homologie eine Oxalat/Formiat-Transportfunktion von PP\_0288 vermutet werden. Der ABC Transporter (PP\_0196 - PP\_0198) ist vermutlich am Transport von Aminosäuren beteiligt. Die genaue Funktion vom PP\_2131 ist nicht bekannt. Bei PP\_3582 handelt es sich um die Komponente der äußeren Membran eines RND-Efflux Systems, welches auch in Gegenwart von Vanillin verstärkt experimentiert wurde (s. Abschnitt 5.3.3). Welche Substrate von diesem Efflux-System transportiert werden, ist bislang nicht untersucht. Neben ActP und PP\_0288 ist das hypothetische Porin (PP\_2662), welches in Steady-

State III verstärkt exprimiert wurde sowohl aufgrund seiner Position im Genom als auch aufgrund seiner starken Induktion unter Ethylenglycol (31-fach), von besonderem Interesse. Die Tatsache dass, dieses Gen unmittelbar benachbart zum ersten Gen des bereits in Abschnitt 6.1 beschriebenen PedR1-Genclusters liegt, kann als Hinweis auf eine Rolle im Abbau von Alkoholen gewertet werden. Als weitere Transporter in diesem Cluster kommen die Proteine PP\_2667 – PP\_2669 in Betracht, welche von Arias *et al.* (2008) in *P. putida* U als PedCBA beschrieben wurden. In *P. putida* U führte eine Inaktivierung des Transportsystems ( $\Delta pedABC$ ) zu einer deutlich geringeren maximalen OD<sub>600</sub> und einem verlangsamten Wachstum bei Kultivierung auf Alkoholen mit einer Kettenlänge zwischen C<sub>4</sub> und C<sub>10</sub>. Von den an diesem ABC-Transporter beteiligten Proteinen wurde im Rahmen des GeLCMSMS-Experiments PP\_2668 (PedB) identifiziert, welches sowohl in Steady-State II als auch Steady-State III induziert war. PP\_2669 (PedA) war hingegen lediglich in Steady-State III induziert. Ebenfalls eine Rolle bei der Aufnahme von Substraten vermutet Arias *et al.* (2008) bei den beiden Proteinen PedD (PP\_2673) und PedG (PP\_2676), welchen sie eine Rolle bei der Substratbindung im Periplasma zuschrieben. Eine Inaktivierung von PedD ( $\Delta pedD$ ) bewirkte in *P. putida* U beim Wachstum auf Alkoholen der Kettenlänge C<sub>6</sub>-C<sub>9</sub> eine deutlich verminderte finale OD<sub>600</sub> und eine geringere Wachstumsrate (Arias *et al.*, 2008). Insbesondere PedG zeigte im Rahmen des GeLCMSMS-Experiments eine starke Induktion unter Butanol. Dies könnte ein Anhaltspunkt für eine Funktion von PP\_2676 bei der Substratbindung analog zu PedG in *P. putida* U sein. Die genaue Funktion des Proteins lässt sich jedoch anhand der in dieser Arbeit generierten Daten nicht ermitteln.

### 6.2.5 Das PedR1 Regulon

Von den von Mern *et al.* (2010) in *P. aeruginosa* beschriebenen regulatorischen Proteinen des ErbR-Gen-Clusters waren in den in dieser Arbeit durchgeführten GeLCMSMS-Experimenten in *P. putida* KT2440 neben PedR1 (ErbR) auch die Regulatoren PedS1 (ErcS'), ErcS, sowie PedR2 (EraR) in Gegenwart von Butanol induziert. Der in *P. aeruginosa* offenbar konstitutiv exprimierte Response Regulator ErdR konnte ebenfalls identifiziert werden, zeigte jedoch, wie zu erwarten, in keinem der Versuche eine Regulation. PedR2 (EraR) wurde nur in Steady-State II nicht jedoch in Steady-State III reguliert gefunden, da die Regulation in Steady-State III nicht das nötige Signifikanzniveau ( $p < 0.05$ ) erreichte. Darüber hinaus zeigten fast alle Homologen der in *P. aeruginosa* identifizierten Zielproteine der Regulationskaskade eine Induktion unter Butanol (Tabelle 5.16).

Es liegt daher nahe, dass die Gegenwart von Butanol, ähnlich wie im Falle von Ethylenglycol zu einer Induktion des PedR1-Regulons in *P. putida* KT2440 führt. Wie Um-

setzungsversuche von *Yvonne Beck* (Beck, 2012) nahelegen weisen die Enzyme PedE und PedH in *P. putida* KT2440 ein von *P. putida* U (Arias *et al.*, 2008) verschiedenes Substratspektrum auf. So deuten mehrere von Arias *et al.* (2008) erzeugte Insertionsmutanten in *P. putida* U darauf hin, dass in diesem Stamm Alkohole mit einer Kettenlänge bis C<sub>5</sub> über andere, nicht durch PedR1 regulierte Stoffwechselwege metabolisiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die der Umsetzungsversuche von *Yvonne Beck* zeigen, dass in *P. putida* KT2440 offenbar auch kürzere Alkohole über die Enzyme des PedR1-Regulons abgebaut werden können (Beck, 2012). Wie stark die beiden Substrate Butanol und Ethylenglycol die einzelnen Regulatoren und Enzyme in *P. putida* KT2440 induzieren, muss durch weitere Versuche (z.B. Promotor-Aktivitätsstudien) geklärt werden. Aufgrund der vorliegenden Daten ist fraglich, ob der PedR1-Promotor in *P. putida* KT2440 unter Butanol lediglich 40% der Aktivität derer unter Ethanol aufweist, wie dies in *P. aeruginosa* der Fall ist (Mern *et al.*, 2010). Untersuchungen der Promotoraktivität der einzelnen Komponenten des Systems könnten auch über die Frage Aufschluss geben, ob PedS1 (ErcS') und PedR1 (ErbR) ein Regulatorpaar bilden wie dies von Arias *et al.* (2008) für *P. putida* U vermutet wird, oder ob beide zu unterschiedlichen Regulatorpaaren gehören, wie dies in *P. aeruginosa* von Mern *et al.* (2010) gezeigt wurde. Unter der Annahme, dass der hierarchische Aufbau des Netzwerks dem von Mern *et al.* (2010) postulierten gleicht, bewirkt Butanol eine verstärkte Expression von Proteinen aller Ebenen dieser Regulationskaskade. Welche intra- oder extrazellulären Metabolite den „Trigger“ für die einzelnen Sensorinasen darstellen, ist nicht bekannt.

Von großem Interesse ist zudem die Frage, ob auch die in der Genregion zwischen PP\_2662 und PP\_2683 identifizierten Transportproteine in das regulatorische Netzwerk um PedR1 eingebunden sind und welche Substratspezifität diese Transporter in *P. putida* KT2440 im Vergleich zu *P. putida* U aufweisen. Darüber hinaus könnte ein Vergleich der Proteinexpression mit einem als besonders lösungsmitteltolerant beschriebenen Stamm wie z.B. *P. putida* S12, welcher bereits auf Ebene des Metabolismus und der Lipid-Zusammensetzung der Membran charakterisiert wurde (Rühl *et al.*, 2009; Rühl *et al.*, 2012), Aufschluss über die unterschiedlichen Mechanismen der Lösungsmitteltoleranz in diesen Stämmen geben.

## 6.3 Vanillin

Wie bereits bei den im Teilprojekt „Butanol“ durchgeführten Versuchen, kamen auch in diesem Teilprojekt sowohl 2D-DIGE als auch labelfreie massenspektrometrische Quantifizierung (Membranfraktion, 1D-Fraktionierung) zum Einsatz. Dabei lieferte die 1D-

Fraktionierung (GeLCMSMS) den umfangreichsten Datensatz (Abschnitt 5.3.3). Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse beziehen sich daher, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, auf diese Methode. In Bezug auf den Abbau von Vanillin zeigte sich sowohl im 2D-DIGE-Experiment als auch im GeLCMSMS-Experiment eine deutliche Induktion der Proteine des Pca-Clusters (Abbildung 5.27). Hierbei wurden in der GeLCMSMS-Analyse alle Proteine bis auf PcaC, welches allerdings in der 2D-DIGE-Analyse induziert war, unter Vanillin verstärkt exprimiert. Auch VanA und VanB, welche die Umwandlung von Vanillinsäure zu Protocatechuat katalysieren, waren deutlich induziert. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Kim *et al.* (2006) publizierten Daten zum Abbau von Vanillin über die Vanillat-Demethylase und die Proteine des Pca-Clusters. In den hier beschriebenen Experimenten konnten, im Gegensatz zu der von Kim *et al.* (2006) durchgeführten Analyse, alle Enzyme des Pca-Weges sowie beide Untereinheiten der Vanillat-Demethylase identifiziert werden. Zudem konnten verschiedene am Metabolismus von Vanillin beteiligte Transportsysteme identifiziert werden. Auf das Enzym Vanillin-Dehydrogenase (Vdh), welches mutmaßlich den ersten Schritt des Vanillin-Abbaus darstellt und von Kim *et al.* (2006) nicht identifiziert wurde, wird im folgenden Abschnitt im Detail eingegangen.

### 6.3.1 Vanillin-Dehydrogenase

Von besonderem Interesse im Hinblick auf eine biotechnologische Produktion von Vanillin, ist das Enzym Vanillin-Dehydrogenase, welches den initialen Schritt des Vanillinabbaus katalysiert. Aufgrund dieser Funktion wurde vermutet, dass durch einen Knock-Out von *vdh* eine Akkumulation von Vanillin erreicht werden könnte. Im Rahmen der GeLCMSMS-Analyse wurde das entsprechende Enzym zwar identifiziert, war in Gegenwart von Vanillin allerdings nicht induziert. Auch die 2D-DIGE-Analyse, die Metaboliten-Analyse sowie die Wachstumskurven der *vdh*-defizienten Mutante *P. putida* GN235 lieferten keinen Hinweis auf eine kritische Rolle der Vanillin-Dehydrogenase im Rahmen des Vanillin-Metabolismus. Obwohl die Metaboliten-Analyse zeigt, dass zum Zeitpunkt der Probenahme ( $t=12$  h,  $OD_{600} = 0,6$ ) kein Vanillin mehr im Überstand nachweisbar war und somit eine zuvor induzierte Vdh zu diesem Zeitpunkt bereits nicht mehr induziert sein könnte, spricht der Vergleich zwischen *P. putida* KT2440 und GN235 gegen eine Schlüsselrolle der Vdh im Vanillin-Abbau.

Wahrscheinlich ist, dass ein oder mehrere Enzyme, welche diese Reaktion ebenfalls katalysieren, die Funktion der Vanillin-Dehydrogenase in *P. putida* KT2440 ganz oder teilweise ersetzen. Hierfür spricht auch, dass die Inaktivierung der Vanillin-Dehydrogenase in verschiedenen *Pseudomonaden* unterschiedliche Folgen hat (Di Gioia *et al.*, 2011). Während die Inaktivierung des *vdh*-Gens in *P. putida* HR199 ein Wachstum auf Vanil-

lin zuließ, war die *vdh*-defiziente Variante des Stamms *P. fluorescens* BF13 hierzu nicht in der Lage (Overhage *et al.*, 1999b; Di Gioia *et al.*, 2011). Darüber hinaus akkumulierte in *P. fluorescens* BF13 ( $\Delta vdh$ ) Vanillin über die Zeit, während in *P. putida* HR199 ( $\Delta vdh$ ) nur eine temporäre Anreicherung von Vanillin zu beobachten war (Overhage *et al.*, 1999b; Di Gioia *et al.*, 2011).

Overhage *et al.* (1999b) zeigten, dass das Enzym Coniferylaldehyd-Dehydrogenase, welches Coniferylaldehyd zu Ferulasäure umsetzt, auch die Umsetzung von Vanillin zu Vanillinsäure katalysieren kann und somit die Inaktivierung des *vdh*-Gens in *P. putida* HR199 (teilweise) kompensiert. Daher wäre das Fehlen der Coniferylaldehyd-Dehydrogenase in dem von Di Gioia *et al.* (2011) getesteten Stamm *P. putida fluorescens* BF13, eine mögliche Erklärung für die verbesserte Anreicherung von Vanillin. Nichtsdestotrotz, war auch in *P. fluorescens* BF13 ( $\Delta vdh$ ) ein Anstieg der Vanillinsäurekonzentration über die Zeit zu beobachten, was auf ein weiteres noch nicht identifiziertes Enzym mit Vanillin-Dehydrogenase-Aktivität hinweisen könnte (Di Gioia *et al.*, 2011). Da das Enzym Coniferylaldehyd-Dehydrogenase für die Herstellung von Vanillin aus Eugenol essentiell ist, stellt das Fehlen dieses Enzyms in *P. fluorescens* BF13 ein Problem für die biotechnologische Herstellung von Vanillin auf diesem Weg dar. Für den von der Arbeitsgruppe Sprenger (Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart) angestrebten Syntheseweg wäre dieses Enzym allerdings nicht essentiell, was *P. fluorescens* BF13 für einen interessanten Kandidaten für diese Synthese macht. In unseren Versuchen konnte das Enzym Coniferylaldehyd-Dehydrogenase (PP\_5120) lediglich im Rahmen des GeLCMSMS-Experiments, welches ausschließlich mit *P. putida* KT2440 durchgeführt wurde, identifiziert werden. Dies lässt sich auf den für das Enzym vorhergesagten pI von 9,6 zurückführen, welcher durch die 2D-DIGE-Analyse (pH 4-7) nicht erfasst wurde. Eine Aussage über die möglicherweise unterschiedliche Regulation dieses Enzyms in der Mutante GN235 und dem Wildtyp ist daher nicht möglich. In *P. putida* KT2440 war PP\_5120 im Gegensatz zur Vanillin-Dehydrogenase (Vdh), welche keine Regulation zeigte, 6,9-fach nach oben reguliert.

Während Overhage *et al.* (1999b) zeigten, dass die *vdh*-defiziente Mutante von *P. putida* HR199 lediglich 17,4% der Vdh-Aktivität des Wildtyps besaß, deuten sowohl das Wachstumsverhalten der Mutante GN235 als auch die Tatsache, dass sich Mutante und Wildtyp im Hinblick auf die durchgeführte Metabolitenmessung nicht unterschieden, auf eine prominentere *vdh*-unabhängige Vdh-Aktivität in *P. putida* KT2440 hin.

Neben der erwähnten Coniferylaldehyd-Dehydrogenase könnten in *P. putida* KT2440 auch noch weitere Enzyme den Abbau von Vanillin zu Vanillinsäure katalysieren. So stellt die Benzaldehyd-Dehydrogenase (PP\_1948), die um einen Faktor 57 unter Vanillin induziert war, einen vielversprechenden Kandidaten für diese Reaktion dar. Möglicherweise sind aber auch noch weitere unspezifische Aldehyd-Dehydrogenasen am

Vanillin-Abbau beteiligt (Tabelle 6.3). Von Interesse könnte hierbei auch die von *Nadja Graf* (AG Altenbuchner, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart) erzeugte Mutante GN276 sein. Diese Mutante ist neben *vdh* auch für einen Molybdatttransporter (PP\_3827-PP\_3832) defizient und nicht mehr in der Lage, auf Vanillin zu wachsen. Eine Induktion der Proteine des Molybdatttransporters unter Vanillin konnte in *P. putida* KT2440 jedoch nicht festgestellt werden. Es ist daher zu vermuten, dass eine der an der Umsetzung von Vanillin zu Vanillinsäure beteiligten Aldehyd-Dehydrogenase Molybdat als Co-Faktor benötigt. Aldehyd-Dehydrogenasen, welche diesen Co-Faktor benötigen, wurden bereits in *P. stutzeri* IFO12695 und *Pseudomonas sp.* KY 4690 identifiziert (Uchida *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2005). Entsprechende Enzyme aus *P. putida* KT2440 sind jedoch nicht bekannt.

**Tabelle 6.3:** Regulation verschiedener möglicherweise an der Umsetzung von Vanillin zu Vanillinsäure beteiligter Enzyme in den 2D-DIGE Analysen von *P. putida* KT2440 und *P. putida* GN235. Für *P. putida* KT2440 sind zudem die Regulationsfaktoren der GeLCMSMS-Analyse (1D) angegeben.

Locus-Tag	Gen	Protein	Regulation		
			2D-DIGE KT2440	2D-DIGE GN235	1D KT2440
PP_0545		aldehyde dehydrogenase family protein	4	2,4	5,5
PP_1948		benzaldehyde dehydrogenase	NID	2,8	57,2
PP_2680		aldehyde dehydrogenase family protein	3	6,1	9,3
PP_3151		aldehyde dehydrogenase family protein	NID	NID	42
PP_5120		conifer aldehyde dehydrogenase	NID	NID	6,9
PP_5258		aldehyde dehydrogenase family protein	NID	NID	5,9

*NID*: Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

### 6.3.2 PedR1-Regulon

Interessant ist, dass es neben der verstärkten Expression von Enzymen des Pca-Weges unter Vanillin auch zu einer Induktion einiger Enzyme des PedR1-Regulons, welches bereits unter Ethylenglycol und Butanol induziert war, kam. Zusätzlich zur bereits erwähnten Aldehyd-Dehydrogenase (PedI) waren auch der Regulator PedS1 (ErcS') sowie die beiden ABC-Transporter Untereinheiten (PedB und PedA) unter Vanillin induziert. Die beiden Alkohol-Dehydrogenasen PedE und PedH zeigten in der GeLCMSMS-Analyse keine Regulation (p-Wert > 0,05), PP\_2674 wurde jedoch in beiden 2D-DIGE-Experimenten (KT2440, GN235) reguliert gefunden. Da im Rahmen der 2D-DIGE-

Analyse unterschiedlich modifizierte Proteine und Isoformen voneinander getrennt werden können, wäre es möglich, dass die in der 2D-DIGE-Analyse gemessene Regulation der Regulation einer bestimmten (evtl. posttranslational modifizierten) Isoform entspricht.

Eine Induktion der Alkoholdehydrogenase PedE wurde auch von Kim *et al.* (2006) festgestellt. In dieser Arbeit wurde deren Induktion jedoch auf das zur Solubilisierung des Vanillins verwendete Ethanol zurückgeführt (Vanillin wurde in Ethanol gelöst, bevor es als Puls zugegeben wurde). Da in unserem Experiment Vanillin in einer Konzentration von 0,1% vorlag, konnte dieses ohne die Hilfe eines Lösungsmittels in M12-BASF Medium gelöst werden. Eine mögliche alternative Erklärung für die beobachtete Induktion, wäre der Abbau von entstandenem Vanillyl-Alkohol durch PedE. Aufgrund der Tatsache, dass PedE auch Aldehyde als Substrat akzeptiert (Persönliche Kommunikation, Björn Mückschel, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) wäre auch eine Umsetzung von Vanillin zu Vanillyl-Alkohol durch PedE denkbar. Obwohl während der gesamten Kultivierung kein Vanillyl-Alkohol im Überstand nachgewiesen werden konnte schließt dies nicht aus, dass geringe Mengen transient im Cyto-/Periplasma vorlagen. Wie Arbeiten von *Nadja Graf* (Persönliche Kommunikation, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart) zeigen, kommt es in der Mutante GN276 bei Umsetzungsversuchen mit Ferulasäure zu einer messbaren Anreicherung von Vanillyl-Alkohol. Warum Vanillyl-Alkohol in *P. putida* GN276 nicht jedoch in GN235 akkumuliert, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

### 6.3.3 Glucose Metabolismus

Im Vergleich zu Vanillin waren unter Glucose die drei in *P. putida* KT2440 bekannten Abbauwege von Glucose über Glucose-6-Phosphat, Gluconat und 2-Ketogluconat sowie einige Enzyme des Entner-Doudoroff Weges in ihrer Expression verstärkt.

Lediglich das Enzym Glucose-Dehydrogenase, welches die Umwandlung von Glucose zu Gluconat katalysiert, zeigte unter Vanillin eine verstärkte Expression (3-fach). Wie Del Castillo *et al.* (2007a) zeigen, sind die Gene der einzelnen Abbauwege über mehrere Cluster im Genom verteilt. Neben den Genen des Abbauweges enthalten diese Cluster auch Regulatoren, welche entweder als Repressoren (PtxS, GnuR, HexR) oder als positive Regulatoren (GltR-2) fungieren (Del Castillo *et al.*, 2008). Wie auch in der von Del Castillo *et al.* (2007a) durchgeführten Transkriptomanalyse (Citrat gegen Glucose), sind auch in unseren Versuchen bis auf HexR alle Regulatoren unter Glucose induziert. HexR, welcher als Repressor des Glucosephosphat-Weges fungiert, konnte in unseren Experimenten nicht identifiziert werden. Das als positiver Regulator des ABC-Transportsystems (PP\_1015-PP\_1018) beschriebene Protein GltR-2 sowie der Repressor

GnuR, welcher den Gluconattransporter (GntP) und die Gluconatkinase (GnuK) reguliert, waren hingegen beide unter Glucose induziert (Del Castillo *et al.*, 2008). Gleiches gilt für den Repressor PtxS, der neben Genen des 2-Ketogluconat-Metabolismus noch weitere nicht mit dem Glucosemetabolismus assoziierte Gene kontrolliert (Del Castillo *et al.*, 2008). Unsere Daten bestätigen daher die von Del Castillo *et al.* (2008) erhobene Transkriptomdaten im Hinblick auf die Expression der einzelnen Regulatoren. Worauf die Induktion mutmaßlicher Repressoren des Glucosemetabolismus während des Wachstums auf Glucose beruht, bedarf weiterer Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die induzierten Repressoren lediglich für eine Feinabstimmung des Glucosemetabolismus zuständig sind, während die grundlegende Regulation höheren Ebenen (z.B. Crc) obliegt.

### 6.3.4 Regulation des Vanillin-Abbaus

Wie der Abbau von Glucose wird auch der Abbau von Vanillin durch verschiedene Regulatoren beeinflusst. Dabei werden die drei Cluster, auf welche die *pca*-Gene im Genom verteilt sind (PP\_1375-PP\_1383, PP\_3951-PP\_3952, PP\_4655-PP\_4656) (Abbildung 5.27) durch zwei unterschiedliche Regulatoren beeinflusst. Der wichtigste Regulator ist PcaR, welcher in Gegenwart von  $\beta$ -Ketoacidat verschiedene *pca*-Gene in ihrer Expression beeinflusst. Romero-Steiner *et al.* (1994) zeigten, dass dies die Gene *pcaIJ*, *pcaBDC* und *pcaF* betrifft. Ob, wie Jiménez *et al.* (2002) postulieren, auch die Transporter PcaK und PcaT sowie PcaP der Kontrolle von PcaR unterliegen, scheint nicht abschließend geklärt zu sein, da in der Literatur hierzu widersprüchliche Angaben zu finden sind (Moreno *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 1999).

Bekannt ist hingegen, dass die Gene *pcaG* und *pcaH* von einem anderen Regulator und dem Metaboliten Protocatechuat induziert werden (Harwood *et al.*, 1996; Hosokawa, 1970). Dieser Regulator wurde von Jiménez *et al.* (2002) aufgrund seiner Homologie zu einem in *Agrobacterium tumefaciens* am Abbau phenolischer Verbindungen beteiligten Regulator identifiziert und als PcaQ (PP\_1713) beschrieben. Im Gegensatz zu PcaR konnte PcaQ (PP\_1713) in unseren Experimenten jedoch nicht identifiziert werden. Auch der vermutete Repressor VanR (PP\_3738), welcher die Expression von VanA und VanB kontrolliert und zur Familie der GntR-Repressoren gehört, wurde nicht identifiziert (Jiménez *et al.*, 2002; Morawski *et al.*, 2000). Morawski *et al.* (2000) zeigte für *Acinetobacter* (Stamm ADP1), dass das zu *P. putida* KT2440 homologe Protein VanR die Expression von vanA/B reprimiert. Ob VanR auch einen Einfluss auf die Expression des vermuteten Vanillat-Transporters PP\_3739 und das zu OpdK homologe PP\_3740 ausübt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Es ist gut möglich, dass die nicht identifizierten Regulatoren aufgrund ihrer verhältnis-

mäßig geringen Größe (zwischen 10 und 25 kDa) und der damit verbundenen geringen Menge beim Verdau erzeugter Peptide während der LC-MS/MS-Analyse nicht erfasst wurden. Hierfür wäre der Einsatz einer zusätzlichen MS-Methode (wie z.B. SRM), welche die gezielte Quantifizierung einzelner Proteine erlaubt, eine geeignete Alternative.

### 6.3.5 Am Transport von Vanillin oder dessen Intermediaten beteiligte Transportsysteme

Die in dieser Arbeit identifizierten spezifischen Transporter für Metaboliten des Vanillin- und Protocatechuat-Metabolismus, welche zu den entsprechenden Enzymen der Abbauwege auf dem Genom benachbart liegen, sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst.

**Tabelle 6.4:** Regulation der mit dem Transport von Vanillin und dessen Metaboliten assoziierten Transporter. Es werden die in verschiedenen Publikationen für die Transporter nachgewiesenen Substrate sowie die zugehörige Quelle angegeben.

Locus-Tag	Gen	Protein	Substrat	Reg.	Publikation
PP_1376	<i>pcaK</i>	benzoate transport	4-Hydroxybenzoat, Protocatechuat	41,9	Nichols <i>et al.</i> 1997
PP_1378	<i>pcaT</i>	metabolite/H <sup>+</sup> symporter	$\beta$ -Ketoacid	NID	Parke <i>et al.</i> 1976; Parke <i>et al.</i> 2000
PP_1383	<i>pcaP</i>	BenF-like porin	nicht bekannt	223,3	
PP_3739	<i>opdK</i>	outer membrane porin	Vanillin, Vanillat	185,7	Tamber <i>et al.</i> 2006
PP_3740		major facilitator family transporter	Protocatechuat, Aromaten	2078,3	Tamber <i>et al.</i> 2006; Parke <i>et al.</i> 2000

*NID:* Nicht identifiziert (Das Protein konnte nicht identifiziert werden).

*Regulation:* Ein Regulationsfaktor  $> 1$  steht für eine verstärkte Expression unter Vanillin (s. Kapitel 4).

Während die Substrate von PcaK, PcaT und OpdK bekannt sind, wurde die Substratspezifität von PcaP und PP\_3740 bis jetzt nicht genauer untersucht. Ein zu PP\_3740 homologes Protein (57% Identität) aus *Acinetobacter sp.* ist in diesem an der Aufnahme von Protocatechuat beteiligt (Parke *et al.*, 2000), was eine ähnliche Funktion in *P. putida* KT2440 nahelegt. Warum es unter Vanillin zu einer Induktion von p-Hydroxybenzoat- und Protocatechuat-Transportern (PcaK, PP\_3740) kommt, obwohl diese Substrate im Überstand nicht nachgewiesen werden konnten, ist unklar (Abbildung 5.32). Im Hinblick auf 4-Hydroxybenzoat fällt auf, dass neben dem Transporter auch das Enzym Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PobA), welches 4-Hydroxybenzoat in

Protocatechuat umwandelt, unter Vanillin verstärkt exprimiert wird. Die nachgewiesene hohe Substratspezifität von PcaK und die Induktion von PobA sprechen dabei gegen eine Induktion der beiden Proteine durch alternative Substrate (Nichols *et al.*, 1997).

### 6.3.6 Lösungsmittelstress

Obwohl Vanillin eine Kohlenstoffquelle für *P. putida* KT2440 darstellt, wirkt es vor allem in höheren Konzentrationen toxisch auf diese Bakterien. Somit wurde neben Regulationsvorgängen, die dem Abbau von Vanillin zur Energiegewinnung und Biomassensynthese dienen, auch eine Stressantwort erwartet. Auch wenn hierzu für *P. putida* KT2440 mit Vanillin als alleiniger C-Quelle lediglich eine Studie (Kim *et al.*, 2006) vorhanden ist, beschäftigt sich eine Vielzahl von Arbeiten mit der Toleranz unterschiedlicher *P. putida* Stämme gegenüber verschiedenen aromatischen Verbindungen (Tabelle 6.5).

**Tabelle 6.5:** Untersuchungen zur Lösungsmitteltoleranz in verschiedenen *Pseudomonaden*.

Publikation	Verwendete Stämme	Substanzen	Level	Technik (Färbung)
Segura <i>et al.</i> 2003	Verschiedene Stämme	Toluol	G	2D-Gel (Coomassie)
Santos <i>et al.</i> 2004	<i>P. putida</i> KT2440	Phenol	P	2D-Gel (Coomassie)
Segura <i>et al.</i> 2005	<i>P. putida</i> DOT-T1E	Toluol	P	2D-Gel (Silber)
Kurbatov <i>et al.</i> 2006	<i>P. putida</i> KT2440 (PG150)	Phenol, Pyruvat, Succinat	P	2D-Gel (Silber + Coomassie)
Domínguez-Cuevas <i>et al.</i> 2006	<i>P. putida</i> KT2440	Toluol, Xylen, 3-Methylbenzoat	T	Array
Kim <i>et al.</i> 2006	<i>P. putida</i> KT2440	Succinat, Benzoat, Vanillin, p-Hydroxybenzoat, Phenylethylamin, Phenylalanin	P	2D-Gel (Silber) / ICAT
Volkers <i>et al.</i> 2006	<i>P. putida</i> S12	Toluol	P	2D-Gel (DIGE)
Roma-Rodrigues <i>et al.</i> 2010	<i>P. putida</i> KT2440	Phenol	P	2D-Gel (Flamingo)
Yun <i>et al.</i> 2011	<i>P. putida</i> KT2440	Benzoat	P	1DE-MudPIT
Wijte <i>et al.</i> 2011	<i>P. putida</i> S12	Toluol	P	Isotope Labelling

Publikation	Verwendete Stämme	Substanzen	Level	Technik (Färbung)
Haußmann <i>et al.</i> 2012	<i>C. glutamicum</i>	Protocatechuat	P	Metabolic labelling, Spectral Counting

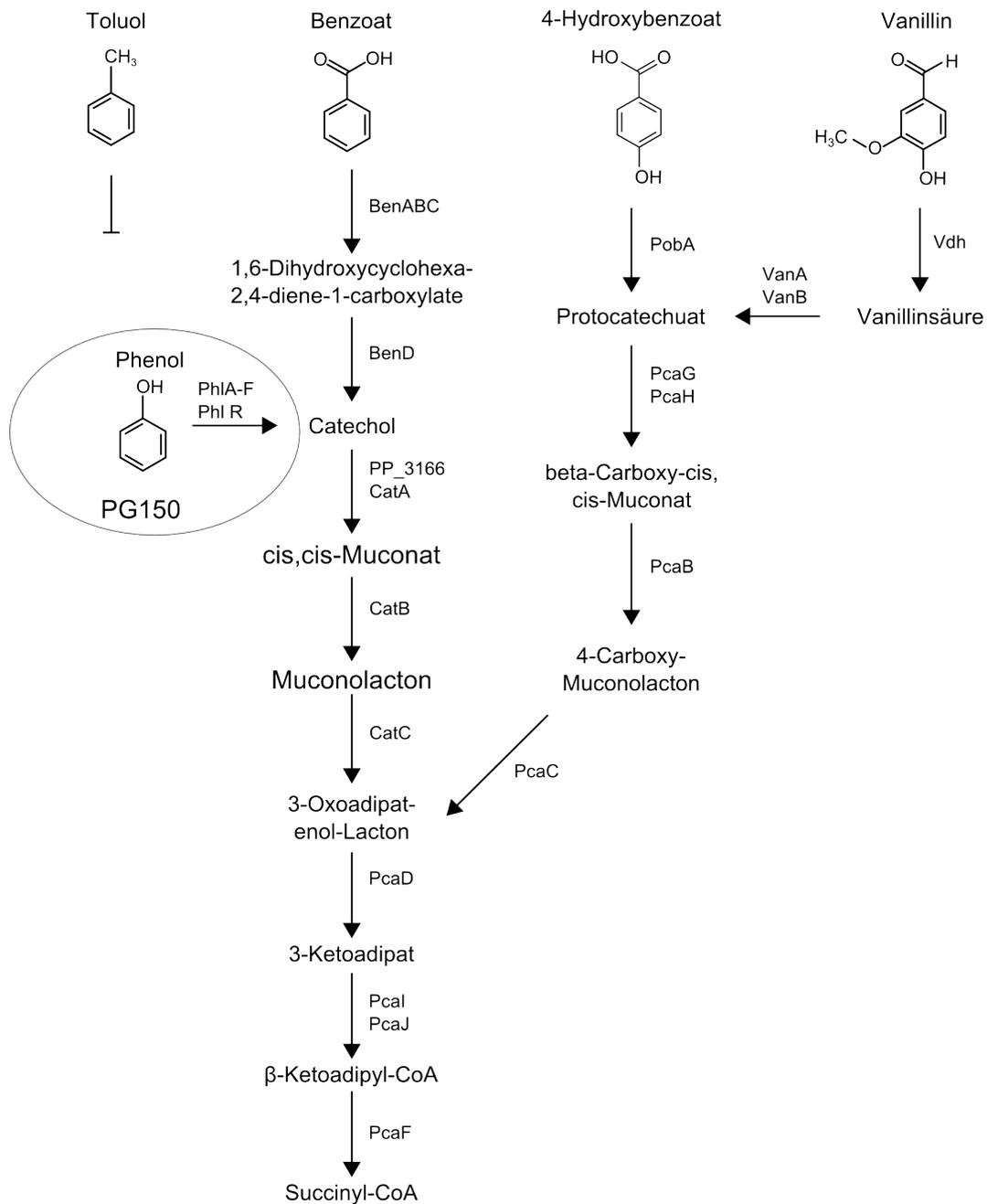
G: Genomics, T: Transkriptomics, P: Proteomics

So wurde in *P. putida* KT2440 bereits die Reaktion auf Toluol auf Transkriptomebene (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006) sowie die Reaktion auf Phenol auf Proteom- und Genomebene untersucht (Segura *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Kurbatov *et al.*, 2006; Roma-Rodrigues *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde in zwei Proteomics-Studien dessen Reaktion auf Benzoat und 4-Hydroxybenzoat untersucht (Kim *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2011).

Proteomanalysen des besonders lösungsmittelresistenten Stamms *P. putida* S12 wurde von Volkers *et al.* (2006) und Wijte *et al.* (2011) nach Behandlung mit Toluol durchgeführt. Obwohl es sich bei allen getesteten Verbindungen um Aromaten handelt, unterscheiden sich diese sowohl in ihren physikochemischen Eigenschaften als auch in ihrer Metabolisierbarkeit durch die untersuchten Stämme deutlich. Vanillin, Benzoat und 4-Hydroxybenzoat können von *P. putida* KT2440 als Kohlenstoffquelle genutzt werden, Phenol und Toluol hingegen nicht (Abbildung 6.2).

Eine Besonderheit ist der von Kurbatov *et al.* (2006) untersuchten Stamm *P. putida* KT2440 PG150. Dieser ist aufgrund eines mini TN5 Transposons, welches die Gene *phlA-F* und *phlR* enthält in der Lage Phenol in Catechol umzuwandeln und über den *ortho*-Cleavage Pathway abzubauen. Da es sich bei *P. putida* KT2440 um eine Variante von *Pseudomonas putida* mt-2 handelt, dem das TOL Plasmid fehlt, kann dieser im Gegensatz zu anderen *Pseudomonaden* (z.B. *P. putida* F1, *P. putida* DOT-T1E) Toluol nicht über den Toluol-Dioxygenase Pathway metabolisieren (Abbildung 6.2).

Außerdem unterscheiden sich die einzelnen getesteten Substrate in dem für die Toxizität wichtigen  $\log P_{O/W}$ . Die in den verschiedenen Studien getesteten Substanzen weisen laut LOGKOW-Datenbank (<http://logkow.cisti.nrc.ca/logkow/>) folgende  $\log P_{O/W}$  Werte auf: Toluol (2,73), Benzoat (1,88), 4-Hydroxybenzoat (1,58), Phenol (1,50) und Vanillin (1,21). Wie Ramos *et al.* (2002) schreiben, sind Substanzen mit einem  $\log P_{O/W}$  zwischen 1,5 und 4 besonders toxisch für Bakterien, wobei die Toxizität mit steigendem  $\log P_{O/W}$  zunimmt. Dabei bewirken diese Substanzen vor allem eine Beeinträchtigung der Membranintegrität und wirken damit indirekt über einen Verlust von Ionen, Metaboliten, Proteinen und eine Störung des Protonengradienten zellschädigend (Ramos *et al.*, 2002). Die zellulären Abwehrmechanismen, die als Reaktion auf diese toxischen Substanzen ausgelöst werden, lassen sich in die folgenden Kategorien einteilen:



**Abbildung 6.2:** Übersicht über die Abbauege von Benzoat, 4-Hydroxybenzoat und Vanillin in *P. putida* KT2440.

Phenol kann nur durch den Stamm *P. putida* KT2440 PG150, welcher die Transgene *phlA-F* und *phlR* enthält abgebaut werden. *P. putida* KT2440 kann weder Phenol noch Toluol metabolisieren (Kim *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2011; Kurbatov *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2004).

a) Stabilisierung und Anpassung der Zellmembran und Zellwand, b) Export toxischer Substanzen über Efflux-Systeme, c) Detoxifikation durch Derivatisierung und d) Abbau (Ramos *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004). Auch die Expression von Chaperonen und Antioxidantien wurde beobachtet (Santos *et al.*, 2004). Eine Umstellung des Energie-Metabolismus wird vor allem durch den erhöhten Energiebedarf der Zelle für die oben erwähnten Anpassungen erklärt. Bei Substanzen, welche gleichzeitig eine Kohlenstoffquelle darstellen, kann diese Umstellung auch der Integration der neuen Energiequelle geschuldet sein.

### 6.3.7 Stabilisierung und Anpassung der Zellmembran und Zellwand

Im Gegensatz zu der von Santos *et al.* (2004) unter Phenol beobachteten Induktion der Fettsäuresynthese, zeigte sich in unseren Versuchen keine Regulation entsprechender Enzyme. Die verstärkte Expression von FabG, welches als einziges Enzym der Fettsäuresynthese unter Vanillin induziert war, liefert hierfür keine ausreichenden Anhaltspunkte. Auch auf eine verstärkte *cis/trans*-Isomerisierung fanden sich, wie bereits unter Butanol, keine Hinweise. Das Enzym „Cyclopropane-Fatty-Acyl-Phospholipid Synthase“ (CfaB, PP\_5365), welches die Synthese von Cyclopropan-Fettsäuren aus *cis*-ungesättigten Fettsäuren katalysiert, war hingegen unter Vanillin induziert. Cyclopropan-Fettsäuren werden normalerweise vermehrt vor dem Erreichen der stationären Phase gebildet, tragen aber auch unter Lösungsmittelstress zu einer Stabilisierung der Membran bei (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Pini *et al.*, 2011). Obwohl im Gegensatz zu einer früheren Annahme die Expression von *cti* und *cfaB* nicht durch das Substrat reguliert ist, scheint in *P. putida* KT2440 unter Vanillin lediglich CfaB induziert zu sein. Die Induktion von CfaB sowie die fehlende Induktion von CfaA decken sich mit den Ergebnissen von Muñoz-Rojas *et al.* (2006), welche eine höhere Aktivität von CfaB im Vergleich mit CfaA zeigten.

Obwohl keine vermehrte Synthese von Fettsäuren unter Vanillin zu beobachten war, war der Abbau von Fettsäuren deutlich induziert, was sich in einer verstärkten Expression der Enzyme der  $\beta$ -Oxidation ausdrückte. Eine Induktion des Fettsäureabbaus aufgrund des erhöhten Energiebedarfs der Zelle unter Vanillin scheidet als mögliche Erklärung aus, da die Zugabe von Vanillin nicht als Puls erfolgte, sondern Vanillin während der gesamten Kultivierung als alleinige Kohlenstoffquelle vorlag. Zudem wurden die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Eine Umwandlung des aus Vanillin gewonnenen Acetyl- bzw. Succinyl-CoA in Fettsäuren und deren anschließender Abbau erscheint nicht effizient. Eine mögliche Erklärung für die Induktion wäre der Abbau von Fettsäuren, welche aus lysierten Zellen stammen und aus dem Medium

aufgenommen wurden.

Einen Grund für die geringe Regulation von an der Biosynthese von Membranen beteiligten Enzymen könnte auch in der Versuchsdurchführung liegen. Während Santos *et al.* (2004) einen Phenol-Puls auf mit Succinat als C-Quelle kultivierte Zellen gaben, erfolgte die Kultivierung unserer Zellen bereits in der Vorkultur mit Vanillin als einziger Kohlenstoffquelle. Zum Zeitpunkt der Probenahme waren die Zellen und damit auch die Membranen bereits an Vanillin adaptiert, womit kein erhöhter Bedarf an Membran-auf- oder umbauenden Enzymen bestand.

### 6.3.8 Export toxischer Substanzen über Efflux-Systeme

Auch wenn sich kein deutlicher Umbau der Membran unter Vanillin feststellen ließ, waren verschiedene, bereits in anderen Studien identifizierte Efflux-Systeme unter dem Einfluss von Vanillin induziert. Darunter befand sich auch das RND-Efflux-System TtgABC. Roma-Rodrigues *et al.* (2010) fanden in *P. putida* KT2440 nach Behandlung mit Phenol und Analyse des Membranproteoms mittels 2D-Elektrophorese eine Induktion von TtgA und TtgC. Die in dieser Studie ebenfalls regulierten Proteine Ttg2A und Ttg2C sowie das mutmaßliche Efflux-System PP\_1516-PP\_1517 zeigten in unseren Versuchen jedoch keine Regulation oder wurden nicht identifiziert (Ttg2C).

Auch in Gegenwart von Toluol war (auf Transkriptomebene) in *P. putida* KT2440 eine Induktion der Efflux-Systeme TtgABC, Ttg2A und PP\_1516-PP\_1517 zu beobachten (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006). Die in dieser Studie zusätzlich regulierten Transporter PP\_3349 und PP\_3588 konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. In Bezug auf TtgABC ist auch dessen unterschiedliche Expression in verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen als Reaktion auf verschiedene aromatische Lösungsmittel interessant. Während TtgABC in *P. putida* KT2440 unter Phenol induziert war, war dies in *P. putida* DOT-T1E nicht der Fall (Segura *et al.*, 2003). In *P. putida* S12 wurde TtgABC unter Toluol sogar vermindert exprimiert (Wijte *et al.*, 2011). Laut Wijte *et al.* (2011) waren das in *P. putida* KT2440 nicht vorhandene Transportsystem SrpABC (TtgGHI) sowie PP\_1272 die einzigen unter dem Einfluss von Toluol induzierten Transportsysteme in *P. putida* S12. Das potentielle Typ-1-Sekretionssystem PP\_1271-PP\_1273 war auch in unseren Versuchen in *P. putida* KT2440 unter Vanillin induziert. Die Induktion dieses Transportsystems unter 4-Hydroxybenzoat in *P. putida* S12 palB1 könnte auf eine Funktion im Transport von 4-Hydroxybenzoat oder verwandter Verbindungen auch in *P. putida* KT2440 hinweisen (Verhoef *et al.*, 2010). Eine Rolle des Efflux-Systems MexE, MexF, OprN im Rahmen der Lösungsmitteltoleranz wurde von Santos *et al.* (2004) zwar vermutet, konnte aber bei der Analyse des Membranproteoms nach Behandlung mit Phenol durch Roma-Rodrigues *et al.* (2010)

nicht nachgewiesen werden. Eine Funktion von MexE, MexF, OprN ist in *P. aeruginosa* im Hinblick auf Antibiotikaresistenzen bekannt, das Efflux-System wurde aber in *P. putida* bis jetzt nicht mit Lösungsmitteltoleranz in Verbindung gebracht (Fetar *et al.*, 2011). Warum dieses Efflux-System unter Vanillin, nicht aber unter Phenol induziert ist und welche Substrate von ihm transportiert werden, ist nicht bekannt.

Im Gegensatz zu (Wijte *et al.*, 2011) welche in *P. putida* S12 eine verminderte Expression fast aller Transportsysteme (abgesehen von wenigen Efflux-Pumpen) unter Toluol feststellten, zeigte sich in *P. putida* KT2440 unter Vanillin ein differenzierteres Bild. So waren die Aminosäuretransporter PP\_4863, PP\_4864, PP\_4867 und PP\_1722, PP\_1726, der vermutliche Sulfonat-Transporter PP\_2636, PP\_3637 sowie verschiedene dem Putrescin-Transport zugeordnete Proteine (PP\_0412, PP\_0413; PP\_1484, PP\_1486; PP\_5179-PP\_5181) unter Vanillin induziert. Die Induktion der Aminosäuretransporter in unserem Versuch im Vergleich zu den von Wijte *et al.* (2011) erhaltenen Daten, kann auf die grundsätzlich unterschiedliche Reaktion verschiedener Stämme (*P. putida* S12 und *P. putida* KT2440) auf Lösungsmittelstress, auf die beiden getesteten Substanzen (Toluol und Vanillin) selbst, sowie auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückgeführt werden. Die verstärkte Expression der Putrescin-Transporter ist wahrscheinlich auf die in Abschnitt 5.3.4 beschriebene Induktion des Putrescin-Metabolismus zurückzuführen. Mögliche Gründe für dessen Induktion reichen von einem verstärkten Argininabbau zur ATP-Synthese (Segura *et al.*, 2005) bis zu einem erhöhten Bedarf an Putrescin.

Wie bei Wijte *et al.* (2011) unter Phenol war auch in unseren Versuchen ActP (PP\_1743) unter Vanillin induziert. Ob diese Regulation wirklich auf einen vermehrten Import von Acetat zurückzuführen ist, wie Wijte *et al.* (2011) vermuten, oder ob andere Metabolite für dessen Induktion verantwortlich sind, konnte nicht abschließend geklärt werden.

### 6.3.9 Porine

Auch die Regulationen der Porine, welche von Roma-Rodrigues *et al.* (2010) unter dem Einfluss von Phenol erfasst wurden, deckten sich nicht mit dem unter Vanillin gefundenen Muster. Während OprB-1 unter Phenol und Vanillin in seiner Expression vermindert war, war dies für OprF und OprQ nur unter Phenol der Fall (Roma-Rodrigues *et al.*, 2010). Das unter Toluol induzierte Porin OprH, welches die Membranstabilität erhöht (Bell *et al.*, 1991; Volkers *et al.*, 2006), konnte in unseren Experimenten nicht identifiziert werden. Eine verminderte Expression von OprF wurde auch in *P. putida* S12 nach Toluol-Behandlung festgestellt (Volkers *et al.*, 2006).

Die weniger ausgeprägte Regulation dieser Porine könnte auf eine geringere Toxizität

von Vanillin im Vergleich zu Phenol und Toluol zurückzuführen sein. Dies deckt sich mit dem geringeren  $\log P_{O/W}$  von Vanillin im Vergleich zu Phenol und Toluol. Für eine geringere Toxizität von Vanillin spricht auch die vergleichsweise geringe Induktion von Stressproteinen. Eine starke Regulation zeigte hingegen das Porin PP\_3739, welches aufgrund seiner Homologie zu OpdK in *P. aeruginosa* identifiziert wurde und dort als Vanillin- bzw. Vanillinsäure-Porin beschrieben ist. Ebenfalls stark reguliert war das Porin PcaP (PP\_1383), über dessen Substratspezifität nichts bekannt ist. Da das zugehörige Gen jedoch in unmittelbarer Nachbarschaft zum *pcaBDC*-Cluster liegt, erscheint eine Funktion im Rahmen des Protocatechuat-Abbaus wahrscheinlich (s. Abschnitt 5.3.4).

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Reaktion von *P. putida* KT2440 auf Stress durch aromatische Verbindungen zwar über ähnliche Mechanismen, jedoch nicht über identische Proteine erfolgt. Ob eine Substanz von *P. putida* KT2440 metabolisiert werden kann oder nicht, scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Annahme wird durch Studien zum Benzoat-Metabolismus in *P. putida* KT2440 unterstützt. Auch hier wurde vornehmlich eine Induktion der Abbauewege, nicht jedoch von Stressproteinen und Efflux-Systemen festgestellt (Kim *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2011).

## 6.4 Vergleich der eingesetzten Methoden

In einem Großteil der in dieser Arbeit zitierten Publikationen zur Lösungsmitteltoleranz in *Pseudomonaden* erfolgte die Analyse des Proteoms über zweidimensionale Gelelektrophorese (Tabelle 6.5). Dabei kamen verschiedene Färbungen (Coomassie, Silber, Fluoreszenz, DIGE) zum Einsatz. Zudem wurde in drei Studien eine Isotopenmarkierung in Kombination mit einer LC-ESI-MS/MS-Analyse für die Protein-Quantifizierung eingesetzt. Kim *et al.* (2006) analysierten mit Benzoat behandelte Proben mittels ICAT, was zur Identifizierung und Quantifizierung von 110 Proteinen führte. Wijte *et al.* (2011) setzten in ihrer Studie zur Toluolantwort von *P. putida* S12 Dimethylation-Labeling zur Quantifizierung ein. Yun *et al.* (2011) verwendeten eine GeLCMSMS-Analyse zur Identifizierung von Proteinen und iTRAQ zu deren Quantifizierung.

Eine Kombination aus metabolischer Markierung (N15) und labelfreier Quantifizierung wurde von Haußmann *et al.* (2012) bei der Analyse des Protocatechuat-Metabolismus in *Corynebacterium Glutamicum* verwendet. Als Methode der labelfreien Quantifizierung kam „Spectral Counting“ zum Einsatz.

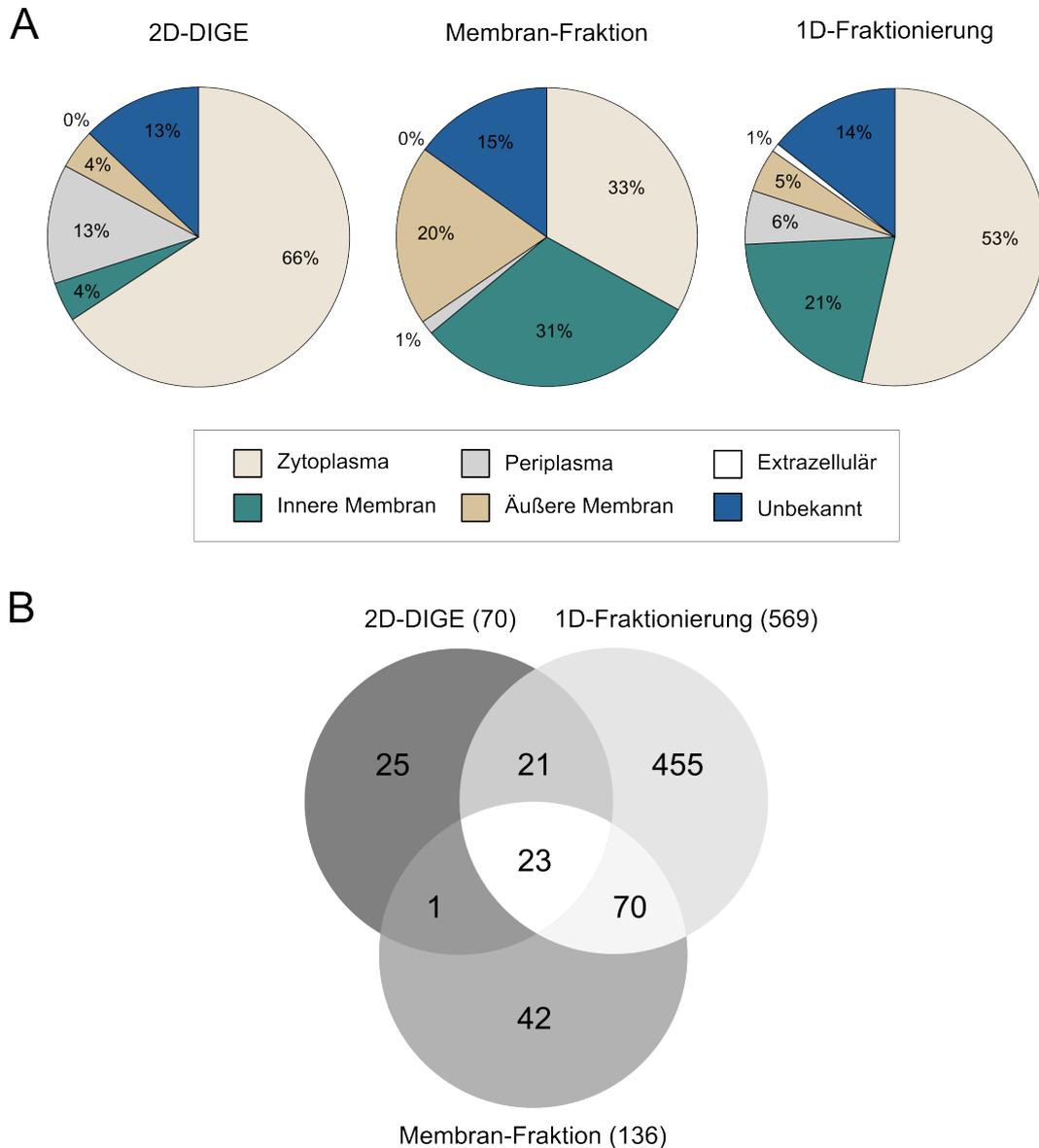
In den meisten dieser Studien wurde lediglich eine der erwähnten Methoden für die Protein-Quantifizierung eingesetzt. Dagegen wurde in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zumeist eine Kombination aus 2D-DIGE und labelfreier mas-

senspektrometrischer Quantifizierung angewandt. Dabei wurde der zytosolische Anteil der Proben über 2D-DIGE, die Membranfraktion über labelfreie massenspektrometrische Quantifizierung analysiert. Durch die gezielte Hydrolyse der Proteine zu Peptiden konnten bei den LC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethoden die Nachteile, welche die zweidimensionale Gelelektrophorese aufgrund der geringen Löslichkeit stark hydrophober Membranproteine aufweist, umgangen werden. Eine Analyse des „Gesamtproteoms“ über GeLCMSMS erfolgte zusätzlich in den Versuchen zum Butanol- (Bioreaktor) und Vanillin-Metabolismus. Der grundlegende Versuchsaufbau der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, wurde in [Abbildung 5.13](#) am Beispiel des Butanol-Teilprojekts schematisch dargestellt, ist aber mit dem der Vanillin-Experimente identisch.

Anhand des Vanillin-Teilprojekts soll ein Vergleich der eingesetzten Methoden im Hinblick auf die Zahl der identifizierten bzw. quantifizierten Proteine sowie deren Lokalisation in der Zelle erfolgen. Hierbei sind die Besonderheiten der gelbasierten bzw. LC-ESI-MS/MS-basierten Analysemethoden zu berücksichtigen. Da in einem 2D-DIGE-Experiment nur diejenigen Spots identifiziert wurden, welche eine Regulation aufwiesen, entsprach die Zahl der quantifizierten Proteine bei dieser Methode immer der Anzahl der identifizierten Proteine. Zudem befanden sich in einem „Spot“ meist mehrere Proteine, da Proteine mit gleichem oder sehr ähnlichem pI und Molekulargewicht mittels der verwendeten 2D-DIGE-Methode (pH 4-7) nicht ausreichend getrennt werden können. Um das regulierte Protein in einem Spot zu bestimmen, wurde das abundanteste Protein eines Spots (gemessen an der Anzahl der identifizierten Peptide) als reguliert betrachtet. Aufgrund posttranslationaler Modifikationen oder Proteinabbau kann ein Protein oder eine Isoform desselben zudem in mehr als einem Spot vorhanden sein. Die Möglichkeit diese Proteine zu trennen, stellt einen klaren Vorteil der 2D-DIGE-Methode gegenüber peptidbasierten Methoden (labelfreie Quantifizierung), dar. Der Rückschluss von der Regulation einzelner Peptide auf die Regulation eines Proteins ist dann problematisch, wenn nur eine von mehreren Isoformen, welche einen Großteil identischer Peptide enthalten, reguliert ist. Ein Vorteil der peptidbasierten Quantifizierung liegt hingegen in der Identifizierung einer großen Anzahl von Proteinen (auch nicht-regulierter) mit vertretbarem zeitlichen Aufwand.

Um 2D-DIGE und labelfreie Quantifizierung vergleichen zu können, wurden für die Darstellung in [Abbildung 6.3](#) folgende Annahmen getroffen: Die Diagramme zur Verteilung der Proteine auf die einzelnen Kompartimente (Zytoplasma, Membran, etc.) beziehen sich sowohl für die 2D-DIGE-Analyse als auch für die beiden labelfreien Ansätze ausschließlich auf den Anteil der regulierten Proteine. Waren in einem Spot der 2D-DIGE-Analyse mehrere Proteine enthalten, wurde, wo immer möglich, nur das abundanteste Protein dieses Spots als reguliert betrachtet. Wurden mehrere Proteine in

einem Spot mit einer ähnlichen Anzahl an Peptiden identifiziert, wurden diese alle als reguliert angesehen. Proteine welche in mehreren Spots identifiziert wurden, wurden in beiden Abbildungsteilen nur einmal berücksichtigt.



**Abbildung 6.3:** Vergleich der im Rahmen des Vanillin-Teilprojekts eingesetzten Methoden in *P. putida* KT2440.

A) Verteilung der regulierten Proteine auf die einzelnen subzellulären Kompartimente. B) VENN-Diagramm zur Darstellung der Zahl regulierter Proteine und deren Schnittmengen zwischen den eingesetzten Methoden. Die Gesamtzahl regulierter Proteine der jeweiligen Methode ist in Klammern angegeben.

Der Vergleich der subzellulären Lokalisation zwischen den einzelnen Experimenten zeigt, dass wie erwartet, der Anteil zytosolischer Proteine bei der 2D-DIGE-Analyse am höchsten war. Die Membranfraktion weist dagegen prozentual betrachtet den höchsten

Anteil an Proteinen der äußeren und der inneren Zellmembran auf. Bei der Analyse des Gesamtproteoms mittels GeLCMSMS lagen die Anteile der einzelnen Kompartimente unter den regulierten Proteinen meist zwischen denen der beiden anderen Analysen (Abbildung 6.3 B). Obwohl der prozentuale Anteil an Membranproteinen in der Analyse des Membranproteoms am größten war und dabei vor allem auch in der 2D-DIGE-Analyse nicht detektierte Proteine erfasst wurden, zeigten die absoluten Zahlen, dass im Rahmen der 1D-Fraktionierung mehr regulierte Membranproteine identifiziert werden konnten. So wurden bei der Analyse der Membranfraktion 67 Membranproteine (IM: 41 / OM: 26), bei der Analyse des Gesamtlysats 139 regulierte Membranproteine (IM: 113 / OM: 26) identifiziert. 44 Membranproteine wurden dabei in beiden Analysen gefunden, 23 nur in der Membranfraktion, 95 nur im Gesamtlysat. Obwohl diese Zahlen für eine methodische Überlegenheit der 1D-Gel-Fraktionierung sprechen, erscheint eine Fraktionierung der Proteine nach Kompartimenten weiterhin sinnvoll. Im Idealfall werden auf diese Weise nur Proteine quantifiziert, welche sich auch tatsächlich im entsprechenden Kompartiment befinden und keine Proteine, welche bereits teilweise abgebaut wurden. Zudem wird durch die Fraktionierung die Komplexität der Probe deutlich reduziert, was die Identifizierbarkeit und Quantifizierbarkeit nieder abundanter Proteine erhöht.

Trotz der erfolgreichen Anreicherung von Membranproteinen waren in der Membranfraktion 33% (44) dem Zytosol zugeordnete Proteine enthalten. Wie die Studie von Roma-Rodrigues *et al.* (2010) zeigt, ist dies bei derartigen Versuchen nicht ungewöhnlich. Neben „Verunreinigungen“ mit zytosolischen Proteinen während der Anreicherung, sind auch mit der Membran assoziierte Proteine, welche durch die Carbonat-Extraktion nicht entfernt wurden, eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein entsprechender Proteine in der Membranfraktion.

Die Gesamtzahl der regulierten Proteine in den verschiedenen Experimenten unterschied sich ebenfalls deutlich. So konnten durch das 2D-DIGE-Experiment 70 Proteine aus 66 Spots (68 Spots waren reguliert) quantifiziert und identifiziert werden. In der Membranfraktion wurden 382 Proteine identifiziert, wovon 136 reguliert waren. Die größte Anzahl an Proteinen (1536) wurde bei der Analyse des Gesamtlysats mittels GeLCMSMS identifiziert. Hiervon waren 569 Proteine reguliert. Somit konnten 29% der in der psort-Datenbank (Rey *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2011) für *P. putida* KT2440 hinterlegten Proteine im Rahmen der 1D-Gel-Fraktionierung identifiziert werden. Etwas mehr als ein Drittel der identifizierten Proteine war reguliert. Obwohl durch die GeLCMSMS-Methode die größte Zahl an Proteinen identifiziert werden konnte, wurde beispielsweise PcaC nur im Rahmen des 2D-DIGE-Experimentes identifiziert. Dass die verschiedenen Methoden im Hinblick auf die identifizierten Proteine weitgehend komplementär sind, zeigt auch das in Abbildung 6.3 B dargestellte VENN-Diagramm. So

konnten lediglich 23 regulierte Proteine mit allen eingesetzten Methoden erfasst werden. Die Unterschiede zwischen den Methoden lassen sich vor allem durch die Komplexität der analysierten Proben erklären. Da nur eine gewisse Anzahl von Peptiden pro Zeiteinheit massenspektrometrisch identifiziert bzw. quantifiziert werden kann, wurde in allen Experimenten die Komplexität der Probe vor der LC-ESI-MS/MS-Analyse deutlich reduziert. Dies wurde zum einen über gelbasierte Fraktionierung auf Proteinebene (2D-DIGE, 1D-Fraktionierung) zum anderen durch chromatographische Trennung der Peptide über lange RP-HPLC-Gradienten (Membranfraktion) erreicht. Von jedem Trennverfahren werden identische Proteine bzw. Peptide unterschiedlich gut erfasst, was sich auf die Wahrscheinlichkeit einer Identifizierung in der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse auswirkt. Zudem gelangen trotz reduzierter Komplexität pro Zeiteinheit mehr Peptide in das Massenspektrometer als analysiert werden können. Besonders Peptide, welche nur in geringer Zahl vorliegen und somit eine geringe Signal-Intensität aufweisen, werden häufig nicht reproduzierbar für eine Fragmentierung ausgewählt und somit seltener identifiziert. Um einen möglichst großen Teil der regulierten Proteine zu erfassen, erscheint es daher sinnvoll, mehrere Analysemethoden zu kombinieren. Den besten Überblick über das Gesamtproteom liefert sicherlich die GeLCMSMS-Analyse, welche allerdings auch die längste Analysezeit in Anspruch nimmt.

Auffällig sind die teilweise deutlichen Unterschiede in den Regulationsfaktoren zwischen 2D-DIGE- und GeLCMSMS-Experimenten. Da es sich um unabhängige Methoden handelt, sind deren Regulationsfaktoren nicht vergleichbar. Zudem geben die Werte in allen eingesetzten Methoden nur ein relatives Verhältnis zwischen den untersuchten Zuständen wieder.

Während die Quantifizierung in 2D-DIGE-Experimenten auf der Fluoreszenz der markierten Proteine beruht, erfolgt die Quantifizierung in GeLCMSMS-Experimenten auf Basis der beim Verdau erzeugter Peptide (mindesten zwei je Protein). In 2D-DIGE-Experimenten haben alle Proteine eines Spots einen Einfluss auf den Regulationsfaktor, da diese alle zur Fluoreszenz des Spots beitragen. Da sich bei der labelfreien Quantifizierung der Regulationsfaktor eines Proteins aus den Regulationsfaktoren der detektierten Peptide berechnet, nimmt mit der Zahl der identifizierten Peptide eines Proteins auch die Präzision des Regulationsfaktors zu. Auch die Signalintensitäten der zur Quantifizierung verwendeten „Features“ sowie deren reproduzierbare Detektion in den unterschiedlichen biologischen Replikaten haben einen entscheidenden Einfluss auf den Regulationsfaktor eines Proteins. Da sich neben diesen experimentellen Parametern auch die Berechnung der Regulationsfaktoren zwischen den unterschiedlichen Methoden unterscheidet, sollte die Größe der ermittelten Faktoren nicht als absolut angesehen werden. Für eine präzisere Bestimmung der Regulationsfaktoren sei auf Methoden, welche die

gezielte und absolute Quantifizierung bestimmter Proteine ermöglichen (z.B. AQUA), verwiesen.

## 6.5 Terpene

Im Rahmen der für diesen Versuchsteil durchgeführten Proteomanalysen konnten bis auf *AtuH* alle Proteine des *Atu*- und des *Liu*-Clusters identifiziert werden. Zudem waren all diese Proteine unter Citronellol und Citronellsäure induziert. Unter Oktansäure zeigte lediglich *LiuA*, welches die Umsetzung von Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA katalysiert, eine geringfügige Induktion (2,3-fach). Vermutlich ist diese recht schwache Induktion jedoch auf Veränderungen im „Valin, Leucin und Isoleucin“-Stoffwechselweg zurückzuführen. Eine Induktion dieses Stoffwechselweges unter dem Einfluss von Terpenen und Oktansäure lässt sich auch aufgrund der Induktion der Leucin-Dehydrogenase (*PA3418*) vermuten. Wie bei *LiuA* fällt auch die Induktion dieses Enzyms unter Oktansäure deutlich schwächer aus als unter Citronellol/Citronellsäure.

Ein unerwartetes Ergebnis stellte die Induktion der Proteine *AtuB* und *AtuG* unter Citronellsäure dar. Wie bereits in Abschnitt 5.4.1.3 erwähnt, wird den beiden Enzymen *AtuB* und *AtuG* die initiale Oxidation von Citronellol/Citronellal zugeschrieben. Eine mögliche Erklärung für die Induktion der beiden Proteine unter Citronellsäure könnte ihre Einbindung in entsprechende Operon-Strukturen darstellen. So befindet sich *atuB* in einem vorhergesagten Operon mit *atuC*. *AtuG* ist in einem Operon mit *atuD*, *atuE* und *atuF* organisiert. Da die übrigen Gene der beiden Operons auch für den Abbau von Citronellsäure benötigt werden, würde eine verstärkte Expression des gesamten Operons auch die Induktion der für den Citronellsäure-Abbau nicht benötigten Proteine *AtuB* und *AtuG* erklären. Dies ließe sich auch mit der postulierten Funktion der beiden Proteine in Einklang bringen.

Gegen eine exklusive Funktion bei der Oxidation von Citronellol/Citronellal sprechen jedoch die Beobachtungen von Förster-Fromme *et al.* (2006). Mit Hilfe von Knockoutmutanten der Gene *atuB* und *atuG* (über ein pKnockout-System) wurde die Umsetzung mehrerer Substanzen, darunter Citronellol und Citronellsäure, untersucht. Dabei zeigte sich, dass *AtuB* sowohl für den Abbau von Citronellol als auch für den von Citronellsäure essentiell ist (Förster-Fromme *et al.*, 2006). Dies würde auf eine weitere oder andere Rolle von *AtuB*, welche den Abbau von Citronellsäure mit einschließt, hinweisen.

*AtuD* und *PA1535*, welche vermutlich beide die Umsetzung von Citronellyl-CoA zu Geranoyl-CoA katalysieren, waren sowohl unter Citronellol als auch unter Citronellsäure induziert. Obwohl *PA1535* laut KEGG-Datenbank dem  $\beta$ -Oxidations-Weg zuzuordnen ist, legt die Publikation von Förster-Fromme *et al.* (2008) eine für Citronellyl-

CoA spezifische Dehydrogenase-Aktivität dieses Enzyms nahe. Während *AtuD* für den Terpenabbau essentiell zu sein scheint, wuchsen PA1535-Mutanten auf Citronellol als alleiniger Kohlenstoffquelle. Interessant ist, dass PA1535 auch Oktanoyl-CoA umsetzen konnte. In unseren Experimenten wurde PA1535 unter Oktansäure nicht identifiziert, war jedoch beim Wachstum auf Terpenen deutlich induziert. Zudem zeigten Förster-Fromme *et al.* (2008), dass PA1535 „5-Methylhex-4-Enoyl-CoA“ nicht umsetzen konnte und offenbar keine Funktion im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation besitzt. PA1535 scheint daher für die Umsetzung von Citronellyl-CoA spezifisch zu sein. Zudem deuten die hier vorgestellten Daten darauf hin, dass Oktanoyl-CoA von PA1535 zwar umgesetzt werden kann, dieses Substrat aber keine verstärkte Expression des Enzyms bewirkt.

Darüber hinaus wird aus den Ergebnissen ersichtlich, dass einige Enzyme der  $\beta$ -Oxidation in Gegenwart von Terpenen, jedoch nicht oder nur in geringerem Maße unter Oktansäure induziert werden (Abbildung 5.41). Um zu klären, ob der Abbau von Terpenen und unverzweigter Fettsäuren tatsächlich von unterschiedlichen Enzymen katalysiert wird und wie die Spezifität und die Umsatzrate der entsprechenden Enzyme für die einzelnen Substrate sind, bedarf es weiterer Untersuchungen. Die Analyse von Knockout-Mutanten sowie Enzymaktivitätstests wären hierzu ein erster Schritt.

Von Interesse ist zudem die Regulation des Terpenabbaus. Sowohl das *atu*- als auch das *liu*-Gencluster verfügen über je einen Regulator (*atuR* und *liuR*), welcher sich auf dem Genom in unmittelbarer Nachbarschaft zu den übrigen Genen des Clusters befindet (Abbildung 5.36). Beide Regulatoren werden durch eine kurze „Intergenic Region“ von den übrigen Proteinen getrennt. *AtuR* ist dabei entgegengesetzt zum übrigen Cluster orientiert, *liuR* in gleicher Richtung. In unseren Versuchen zeigte *AtuR* sowohl unter Citronellol als auch unter Citronellsäure eine verstärkte Expression. Diese verstärkte Expression während des Wachstums auf Terpenen stimmt nicht mit den Ergebnissen von Förster-Fromme *et al.* (2010) und Förster-Fromme *et al.* (2006) überein. Demnach ist *AtuR* aufgrund seiner Gensequenz der Familie der „TetR-Transcriptional Regulators“ zugeordnet, einer Familie deren Mitglieder gewöhnlich als Repressoren wirken. Zudem führte ein Knockout von *atuR* auch ohne Zugabe von Terpenen zu einer konstitutiven, wenn auch geringen, Expression der übrigen Gene des *atu*-Clusters, was dessen Rolle als Repressor zu bestätigen scheint (Förster-Fromme *et al.*, 2010). Auf Basis der vorliegenden Daten lässt sich die Rolle von *AtuR* jedoch nicht abschließend klären.

*LiuR* gehört der Familie der „GlnR Type Transkriptional Regulators“ an. *GlnR* selbst fungiert in *Bacillus subtilis* ebenfalls als Repressor der Transkription (Brown *et al.*, 1996). Welche Rolle *LiuR* bei der Regulation des *liu*-Clusters spielt, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, da der Regulator lediglich in Experimenten in Gegenwart von Citronellol, nicht jedoch in Gegenwart von Citronellsäure, identifiziert werden konnte. Hier zeigte er jedoch eine deutliche Induktion.

Wie bereits in den übrigen Experimenten dieser Arbeit zeigte sich auch in diesem Teilprojekt, dass Proteine eines Abbauwegs auf dem Genom häufig benachbart liegen und einer gemeinsamen Regulation unterworfen sind. Dies ist eine in Bakterien weit verbreitete Form der Genom-Organisation (Lathe *et al.*, 2000). So war das Cluster PA2552 - PA2557, welches aus zwei Operons (PA2552-PA2555 und PA2556-PA2557) besteht sowohl unter Citronellol als auch unter Citronellsäure induziert. Unter Oktansäure zeigte nur ein Protein dieses Clusters, PA2553, eine leichte Induktion. Auch größere Genombereiche waren zu großen Teilen geschlossen induziert. Darunter die Region zwischen PA1994 und PA2003, welche gleichermaßen beim Wachstum auf unverzweigten wie verzweigten Fettsäuren verstärkt exprimiert wurde. Im Hinblick auf den Citratzyklus, kam es unter Oktansäure und Citronellol/Citronellsäure zu einer Induktion der beiden Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Shunts Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase. Die von Förster-Fromme *et al.* (2005) als essentiell für den Abbau von Terpenen beschriebene Malat: Quinon Oxidoreduktase (MqoB) konnte auch in unseren Versuchen identifiziert werden. Das Enzym zeigte jedoch in keinem der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eine verstärkte Expression. Dieses Ergebnis steht nicht unbedingt im Widerspruch zu den von Förster-Fromme *et al.* (2005) erhobenen Daten, da MqoB auch konstitutiv exprimiert sein könnte. Die zweite Malat:Quinon Oxidoreduktase (MqoA) konnte in keinem unserer Versuche identifiziert werden.

Im Hinblick auf die Publikation von Chattopadhyay *et al.* (2010) welche zeigt, dass ExaA eine Rolle beim Abbau von Geraniol spielt, war auch dieses Enzym von besonderem Interesse. Eine Inaktivierung dieses Enzyms führte bei Chattopadhyay *et al.* (2010) zu einem verminderten Wachstum auf Geraniol. Zudem zeigte rekombinant exprimiertes ExaA eine hohe Spezifität sowie Umsatzrate für Citronellol (Chattopadhyay *et al.*, 2010). Mit Blick auf die Funktion des homologen Enzyms in *P. putida* KT2440 beim Abbau von Butanol und Ethylenglycol wäre daher eine Rolle von ExaA bei der Oxidation von Citronellol zu Citronellsäure denkbar. Die im Vergleich zu AtuB und AtuG geringe Induktion von ExaA unter Citronellol deutet jedoch auf eine untergeordnete Rolle beim Abbau von Citronellol hin. Zudem wurde ExaA unter Citronellsäure deutlich stärker exprimiert als unter Citronellol, was eine Beteiligung an der Oxidation von Citronellol unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Wie bereits in Abschnitt 5.4 erwähnt, wurden die Daten unter zwei verschiedenen LC-ESI-MS/MS-Setups erhoben. In diesen unterschiedlichen Setups wiesen identische Peptide stark voneinander abweichende Retentionszeiten auf, was vermutlich auf unterschiedliche Trenneigenschaften der eingesetzten HPLC-Säulen, bedingt durch Abnutzungseffekte, zurückzuführen ist. Während LC-ESI-MS/MS Läufe eines Setups eine gute Vergleichbarkeit zeigten, war diese in den Experimenten „Glucose vs. Citronellsäure“ und „Citronellsäure vs. Citronellol“, welche aus unterschiedlichen Setups kombiniert

werden mussten, deutlich schlechter. Trotz dieser Effekte konnte durch ein „manuelles Alignment“ eine gute Vergleichbarkeit der unterschiedlichen LC-ESI-MS/MS-Analysen erreicht werden.

Da keine Messung von Metaboliten im Überstand erfolgte, ist es schwer zu beurteilen, ob zum Zeitpunkt der Probenahme noch Oktansäure in den auf Citronellol und Citronellsäure kultivierten Proben vorhanden war und welchen Einfluss diese verbliebene Oktansäure gegebenenfalls auf die Protein-Regulation hatte.

# Literatur

- Alban, Andrew, Stephen Olu David, Lennart Bjorkestén, Christian Andersson, Erik Sloge, Steve Lewis und Ian Currie (2003). „A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard.“ In: *Proteomics* 3.1, S. 36–44.
- Allison, M. J., K. A. Dawson, W. R. Mayberry und J. G. Foss (1985). „*Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract.“ eng. In: *Arch Microbiol* 141.1, S. 1–7.
- Anantharam, V., M. J. Allison und P. C. Maloney (1989). „Oxalate:formate exchange. The basis for energy coupling in *Oxalobacter*.“ eng. In: *J Biol Chem* 264.13, S. 7244–7250.
- Anthony, C. (2001). „Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes.“ eng. In: *Antioxid Redox Signal* 3.5, S. 757–774.
- Aono, R. und H. Kobayashi (1997). „Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 63.9, S. 3637–3642.
- Argüelles, J. C. (2000). „Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis.“ eng. In: *Arch Microbiol* 174.4, S. 217–224.
- Arias, Sagrario, Elías R. Olivera, Mario Arcos, Germán Naharro und José M. Luengo (2008). „Genetic analyses and molecular characterization of the pathways involved in the conversion of 2-phenylethylamine and 2-phenylethanol into phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U.“ eng. In: *Environ Microbiol* 10.2, S. 413–432.
- Armirotti, Andrea und Gianluca Damonte (2010). „Achievements and perspectives of top-down proteomics.“ eng. In: *Proteomics* 10.20, S. 3566–3576.
- Atsumi, Shota, Anthony F Cann, Michael R Connor, Claire R Shen, Kevin M Smith, Mark P Brynildsen, Katherine J Y Chou, Taizo Hanai und James C Liao (2008a). „Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production.“ eng. In: *Metab Eng* 10.6, S. 305–311.
- Atsumi, Shota, Taizo Hanai und James C. Liao (2008b). „Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels.“ eng. In: *Nature* 451.7174, S. 86–89.

- Bailey, E. und R. P. Hullin (1966). „The metabolism of glyoxylate by cell-free extracts of *Pseudomonas* sp.“ eng. In: *Biochem J* 101.3, S. 755–763.
- Bandounas, Luaine, Hendrik Ballerstedt, Johannes H. de Winde und Harald J. Ruijsenaars (2011). „Redundancy in putrescine catabolism in solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12.“ eng. In: *J Biotechnol* 154.1, S. 1–10.
- Bantscheff, Marcus, Markus Schirle, Gavain Sweetman, Jens Rick und Bernhard Kuster (2007). „Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review.“ In: *Anal Bioanal Chem* 389.4, S. 1017–1031.
- Beck, Yvonne (2012). „Untersuchungen zum Ethylenglykol-Metabolismus in *P. putida* KT2440 und JM37“. Diplomarbeit. Institut für Technische Biochemie: Universität Stuttgart.
- Bell, A., M. Bains und R. E. Hancock (1991). „*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH: expression from the cloned gene and function in EDTA and gentamicin resistance.“ eng. In: *J Bacteriol* 173.21, S. 6657–6664.
- Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko und Lubert Stryer (2003). *Biochemie*. 5. Aufl. Heidelberg ; Berlin : Spektrum, Akad. Verl., S. 1153.
- Berggren, K., E. Chernokalskaya, T. H. Steinberg, C. Kemper, M. F. Lopez, Z. Diwu, R. P. Haugland und W. F. Patton (2000). „Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex.“ eng. In: *Electrophoresis* 21.12, S. 2509–2521.
- Bertalanffy, Karl Ludwig von (1968). *General System Theory: Foundations, Development, Applications*. New York: George Braziller Incorporated.
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier und W. Postel (1982). „Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications.“ eng. In: *J Biochem Biophys Methods* 6.4, S. 317–339.
- Bloch, Konrad (1964). „The biological synthesis of cholesterol“. In: *Nobel Lecture*.
- Bondarenko, Pavel V, Dirk Chelius und Thomas A Shaler (2002). „Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry.“ eng. In: *Anal Chem* 74.18, S. 4741–4749.
- Bradford, M. M. (1976). „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.“ In: *Anal Biochem* 72, S. 248–254.
- Brown, S. W. und A. L. Sonenshein (1996). „Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis* glnRA operon.“ eng. In: *J Bacteriol* 178.8, S. 2450–2454.

- Chattopadhyay, Ava, Karin Förster-Fromme und Dieter Jendrossek (2010). „PQQ-dependent alcohol dehydrogenase (QEDH) of *Pseudomonas aeruginosa* is involved in catabolism of acyclic terpenes.“ eng. In: *J Basic Microbiol* 50.2, S. 119–124.
- Chaykin, S., J. Law, A. H. Phillips, T. T. Tchen und K. Bloch (1958). „Phosphorylated Intermediates in the Synthesis of Squalene“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 44.10, S. 998–1004.
- Chelius, Dirk und Pavel V. Bondarenko (2002). „Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry.“ eng. In: *J Proteome Res* 1.4, S. 317–323.
- Child, J. und A. Willetts (1978). „Microbial metabolism of aliphatic glycols. Bacterial metabolism of ethylene glycol.“ eng. In: *Biochim Biophys Acta* 538.2, S. 316–327.
- Chou, Han Ting, Dong-Hyeon Kwon, Mohamed Hegazy und Chung-Dar Lu (2008). „Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.“ eng. In: *J Bacteriol* 190.6, S. 1966–1975.
- Craig, Robertson und Ronald C. Beavis (2004). „TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra.“ eng. In: *Bioinformatics* 20.9, S. 1466–1467.
- Crowe, J. H., F. A. Hoekstra und L. M. Crowe (1992). „Anhydrobiosis.“ eng. In: *Annu Rev Physiol* 54, S. 579–599.
- Del Castillo, Teresa, Juan L Ramos, José J Rodríguez-Herva, Tobias Fuhrer, Uwe Sauer und Estrella Duque (2007a). „Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis.“ eng. In: *J Bacteriol* 189.14, S. 5142–5152.
- Del Castillo, Teresa und Juan L. Ramos (2007b). „Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways.“ eng. In: *J Bacteriol* 189.18, S. 6602–6610.
- Del Castillo, Teresa, Estrella Duque und Juan L. Ramos (2008). „A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate.“ eng. In: *J Bacteriol* 190.7, S. 2331–2339.
- Di Gioia, Diana, Francesca Luziatelli, Andrea Negroni, Anna Grazia Ficca, Fabio Fava und Maurizio Ruzzi (2011). „Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid.“ eng. In: *J Biotechnol*.
- Dole, Malcolm, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson und M. B. Alice (1968). „Molecular Beams of Macroions“. In: *The Journal of Chemical Physics* 49.5, S. 2240–2249.
- Domon, Bruno und Ruedi Aebersold (2006). „Mass spectrometry and protein analysis.“ eng. In: *Science* 312.5771, S. 212–217.
- Domínguez-Cuevas, Patricia, José-Eduardo González-Pastor, Silvia Marqués, Juan-Luis Ramos und Víctor de Lorenzo (2006). „Transcriptional tradeoff between metabolic

- and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene.“ eng. In: *J Biol Chem* 281.17, S. 11981–11991.
- Díaz-Pérez, A. L., A. N. Zavala-Hernández, C. Cervantes und J. Campos-García (2004). „The gnyRDBHAL cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 70.9, S. 5102–5110.
- Dürre, P. (1998). „New insights and novel developments in clostridial acetone/ butanol/ isopropanol fermentation“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (6), S. 639–648.
- Dürre, Peter (2011). „Fermentative production of butanol—the academic perspective.“ eng. In: *Curr Opin Biotechnol* 22.3, S. 331–336.
- Edman, P. (1949). „A method for the determination of amino acid sequence in peptides.“ eng. In: *Arch Biochem* 22.3, S. 475.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong und C. M. Whitehouse (1989). „Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.“ eng. In: *Science* 246.4926, S. 64–71.
- Fetar, Hossam, Christie Gilmour, Rachael Klinoski, Denis M. Daigle, Charles R. Dean und Keith Poole (2011). „mexEF-oprN multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by the MexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol.“ eng. In: *Antimicrob Agents Chemother* 55.2, S. 508–514.
- Fincher, E. L. und W. J. Payne (1962). „Bacterial utilization of ether glycols.“ eng. In: *Appl Microbiol* 10, S. 542–547.
- Freeman, Brian C., Chiliang Chen und Gwyn A. Beattie (2010). „Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere.“ eng. In: *Environ Microbiol* 12.6, S. 1486–1497.
- Förster-Fromme, Karin und Dieter Jendrossek (2005). „Malate:quinone oxidoreductase (MqoB) is required for growth on acetate and linear terpenes in *Pseudomonas citronellolis*.“ eng. In: *FEMS Microbiol Lett* 246.1, S. 25–31.
- Förster-Fromme, Karin, Birgit Höschle, Christina Mack, Michael Bott, Wolfgang Armbruster und Dieter Jendrossek (2006). „Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 72.7, S. 4819–4828.
- Förster-Fromme, Karin, Ava Chattopadhyay und Dieter Jendrossek (2008). „Biochemical characterization of AtuD from *Pseudomonas aeruginosa*, the first member of a new subgroup of acyl-CoA dehydrogenases with specificity for citronellyl-CoA.“ eng. In: *Microbiology* 154.Pt 3, S. 789–796.
- Förster-Fromme, Karin und Dieter Jendrossek (2010). „AtuR is a repressor of acyclic terpene utilization (Atu) gene cluster expression and specifically binds to two 13

- bp inverted repeat sequences of the *atuA-atuR* intergenic region.“ eng. In: *FEMS Microbiol Lett* 308.2, S. 166–174.
- Gaston, L. W. und E. R. Stadtman (1963). „Fermentation of ethylene glycol by *Clostridium glycolicum*, sp. n.“ eng. In: *J Bacteriol* 85, S. 356–362.
- Gavagan, JE, SK Fager, JE Seip, MS Payne, DL Anton und R DiCosimo (1995). „Glyoxylic Acid Production Using Microbial Transformant Catalysts“. In: *J. Org. Chem* 60, S. 3957–3963.
- Gimenez, Rosa, María Felisa Nuñez, Josefa Badia, Juan Aguilar und Laura Baldoma (2003). „The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*.“ eng. In: *J Bacteriol* 185.21, S. 6448–6455.
- Gliese, Nicole, Viola Khodaverdi, Max Schobert und Helmut Görisch (2004). „AgmR controls transcription of a regulon with several operons essential for ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933.“ eng. In: *Microbiology* 150.Pt 6, S. 1851–1857.
- Gliese, Nicole, Viola Khodaverdi und Helmut Görisch (2010). „The PQQ biosynthetic operons and their transcriptional regulation in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Arch Microbiol* 192.1, S. 1–14.
- Gonzalez, C. F., W. A. Taber und M. A. Zeitoun (1972). „Biodegradation of ethylene glycol by a salt-requiring bacterium.“ eng. In: *Appl Microbiol* 24.6, S. 911–919.
- Gould, Ty A., Helmus van de Langemheen, Ernesto J. Muñoz-Elías, John D. McKinney und James C. Sacchettini (2006). „Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*.“ eng. In: *Mol Microbiol* 61.4, S. 940–947.
- Green, Edward M. (2011). „Fermentative production of butanol—the industrial perspective.“ eng. In: *Curr Opin Biotechnol* 22.3, S. 337–343.
- Guo, Z. und J. E. Houghton (1999). „PcaR-mediated activation and repression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* are propagated by its binding to both the -35 and the -10 promoter elements.“ eng. In: *Mol Microbiol* 32.2, S. 253–263.
- Gygi, S. P., B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb und R. Aebersold (1999). „Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.“ eng. In: *Nat Biotechnol* 17.10, S. 994–999.
- Görg, A., W. Postel und S. Günther (1988). „The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.“ eng. In: *Electrophoresis* 9.9, S. 531–546.
- Görg, Angelika, Wilhelm Postel, Johann Weser, Siegfried Günther, John R. Strahler, Samir M. Hanash und Luke Somerlot (1987). „Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer“. In: *Electrophoresis* 8 (2), S. 122–124.

- Görg, Angelika, Oliver Drews, Carsten Lück, Florian Weiland und Walter Weiss (2009). „2-DE with IPGs.“ eng. In: *Electrophoresis* 30 Suppl 1, S122–S132.
- Görisch, H. und M. Rupp (1989). „Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas*.“ eng. In: *Antonie Van Leeuwenhoek* 56.1, S. 35–45.
- Hancock, Robert E W. und Fiona S L. Brinkman (2002). „Function of pseudomonas porins in uptake and efflux.“ eng. In: *Annu Rev Microbiol* 56, S. 17–38.
- Harwood, C. S., N. N. Nichols, M. K. Kim, J. L. Ditty und R. E. Parales (1994). „Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate.“ eng. In: *J Bacteriol* 176.21, S. 6479–6488.
- Harwood, C. S. und R. E. Parales (1996). „The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity.“ eng. In: *Annu Rev Microbiol* 50, S. 553–590.
- Haußmann, Ute und Ansgar Poetsch (2012). „Global proteome survey of protocatechuate- and glucose-grown *Corynebacterium glutamicum* reveals multiple physiological differences.“ eng. In: *J Proteomics* 75.9, S. 2649–2659.
- Heim, S., M. Ferrer, H. Heuer, D. Regenhardt, M. Nimtz und K. N. Timmis (2003). „Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase.“ eng. In: *Environ Microbiol* 5.12, S. 1257–1269.
- Heipieper, H. J., R. Diefenbach und H. Keweloh (1992). „Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 58.6, S. 1847–1852.
- Holland, I Barry, Lutz Schmitt und Joanne Young (2005). „Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review).“ eng. In: *Mol Membr Biol* 22.1-2, S. 29–39.
- Hosokawa, K. (1970). „Regulation of synthesis of early enzymes of p-hydroxybenzoate pathway in *Pseudomonas putida*.“ eng. In: *J Biol Chem* 245.20, S. 5304–5308.
- Hylemon, P. B. und PV Phibbs Jr (1972). „Independent regulation of hexose catabolizing enzymes and glucose transport activity in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 48.5, S. 1041–1048.
- Höschle, Birgit, Volker Gnau und Dieter Jendrossek (2005). „Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (*Liu*) and acyclic terpene utilization (*Atu*), and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF*, in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Microbiology* 151.Pt 11, S. 3649–3656.
- Ideker, T., T. Galitski und L. Hood (2001). „A new approach to decoding life: systems biology.“ eng. In: *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2, S. 343–372.

- Inui, Masayuki, Masako Suda, Sakurako Kimura, Kaori Yasuda, Hiroaki Suzuki, Hiroshi Toda, Shogo Yamamoto, Shohei Okino, Nobuaki Suzuki und Hideaki Yukawa (2008). „Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*.“ eng. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 77.6, S. 1305–1316.
- Isken, S. und J. A. de Bont (1998). „Bacteria tolerant to organic solvents.“ eng. In: *Extremophiles* 2.3, S. 229–238.
- Isobe, K. (1995). „Oxidation of ethylene glycol and glycolic acid by glycerol oxidase.“ eng. In: *Biosci Biotechnol Biochem* 59.4, S. 576–581.
- Iyer, R. und A. H. Delcour (1997). „Complex inhibition of OmpF and OmpC bacterial porins by polyamines.“ eng. In: *J Biol Chem* 272.30, S. 18595–18601.
- Jiménez, José Ignacio, Baltasar Miñambres, José Luis García und Eduardo Díaz (2002). „Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440.“ eng. In: *Environ Microbiol* 4.12, S. 824–841.
- Jiménez, JoséL., Baltasar Miñambres, JoséLuis García und Eduardo Díaz (2004). „Genomic Insights in the Metabolism of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*“. English. In: *Pseudomonas*. Hrsg. von Juan-Luis Ramos. Springer US, S. 425–462.
- Karas, M., D. Bachmann, U. Bahr und F. Hillenkamp (1987). „Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds“. In: *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78.0, S. 53–68.
- Kataoka, M., M. Sasaki, A. R. Hidalgo, M. Nakano und S. Shimizu (2001). „Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms.“ eng. In: *Biosci Biotechnol Biochem* 65.10, S. 2265–2270.
- Kawakita, Yuichiro, Fumiko Taguchi, Yoshishige Inagaki, Kazuhiro Toyoda, Tomonori Shiraishi und Yuki Ichinose (2012). „Characterization of each *aefR* and *mexT* mutant in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605.“ eng. In: *Mol Genet Genomics* 287.6, S. 473–484.
- Keller, Andrew, Alexey I Nesvizhskii, Eugene Kolker und Ruedi Aebersold (2002). „Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search.“ eng. In: *Anal Chem* 74.20, S. 5383–5392.
- Kim, Y. H., T. K. Kwon, S. Park, H. S. Seo, J. J. Cheong, C. H. Kim, J. K. Kim, J. S. Lee und Y. D. Choi (2000). „Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 66.11, S. 4620–4624.
- Kim, Young Hwan, Kun Cho, Sung-Ho Yun, Jin Young Kim, Kyung-Hoon Kwon, Jong Shin Yoo und Seung Il Kim (2006). „Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis.“ eng. In: *Proteomics* 6.4, S. 1301–1318.

- Kitano, Hiroaki (2002). „Computational systems biology.“ eng. In: *Nature* 420.6912, S. 206–210.
- Klose, J. (1975). „Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.“ eng. In: *Humangenetik* 26.3, S. 231–243.
- Kornberg, H. L. und H. A. Krebs (1957). „Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle.“ eng. In: *Nature* 179.4568, S. 988–991.
- Kornberg, H. L. und A. M. Gotto (1959). „Formation of malate from glycollate by *Pseudomonas ovalis* Chester.“ eng. In: *Nature* 183, S. 1791–1793.
- (1961a). „The metabolism of C2 compounds in micro-organisms. 6. Synthesis of cell constituents from glycollate by *Pseudomonas* sp.“ eng. In: *Biochem J* 78, S. 69–82.
- Kornberg, H. L. und J. R. Sadler (1961b). „The metabolism of C2-compounds in micro-organisms. VIII. A dicarboxylic acid cycle as a route for the oxidation of glycollate by *Escherichia coli*.“ eng. In: *Biochem J* 81, S. 503–513.
- Kretzschmar, Utta, Viola Khodaverdi, Jae-Hun Jeoung und Helmut Görisch (2008). „Function and transcriptional regulation of the isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Arch Microbiol* 190.2, S. 151–158.
- Kretzschmar, Utta, Viola Khodaverdi und Lorenz Adrian (2010). „Transcriptional regulation of the acetyl-CoA synthetase gene *acsA* in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Arch Microbiol* 192.8, S. 685–690.
- Kurbatov, Leonid, Dirk Albrecht, Heidrun Herrmann und Lothar Petruschka (2006). „Analysis of the proteome of *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different sources of carbon and energy.“ In: *Environ Microbiol* 8.3, S. 466–478.
- Laemmli, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ eng. In: *Nature* 227.5259, S. 680–685.
- Lathe 3rd, WC, B. Snel und P. Bork (2000). „Gene context conservation of a higher order than operons.“ eng. In: *Trends Biochem Sci* 25.10, S. 474–479.
- Li, Kai und J. W. Frost (1998). „Synthesis of Vanillin from Glucose“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 120, S. 10545–10546.
- Li, Xuan Zhong, Janosch Klebensberger und Bettina Rosche (2010). „Effect of *gcl*, *glcB* and *aceA* disruption on glyoxylate conversion by *Pseudomonas putida* JM37.“ eng. In: *J Microbiol Biotechnol* 20.6, S. 1006–1010.
- Liu, Hongbin, Rovshan G Sadygov und John R Yates (2004). „A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.“ eng. In: *Anal Chem* 76.14, S. 4193–4201.
- Lottspeich, Friedrich (2012). *Bioanalytik*. Hrsg. von Joachim W. Engels Friedrich Lottspeich. 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, S. 1208.

- Lovric, Josip (2011). *Introducing Proteomics: From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis*. Wiley.
- Lynen, F., H. Eggerer, U. Henning und Ingrid Kessel (1958). „Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl-delta-3-butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene, III“. In: *Angewandte Chemie* 70.24, S. 738–742.
- Lynen, Feodor (1964). „The pathway from activated acetic acid"to the terpenes and fatty acids“. In: *Nobel Lecture*.
- Mackman, N., J. M. Nicaud, L. Gray und I. B. Holland (1985). „Identification of polypeptides required for the export of haemolysin 2001 from E. coli.“ eng. In: *Mol Gen Genet* 201.3, S. 529–536.
- Makarov (2000). „Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis“. eng. In: *Anal Chem* 72.6, S. 1156–1162.
- Makarov, Alexander, Eduard Denisov, Oliver Lange und Stevan Horning (2006). „Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer.“ eng. In: *J Am Soc Mass Spectrom* 17.7, S. 977–982.
- Mallick, Parag, Markus Schirle, Sharon S. Chen, Mark R. Flory, Hookeun Lee, Daniel Martin, Jeffrey Ranish, Brian Raught, Robert Schmitt, Thilo Werner, Bernhard Kuster und Ruedi Aebersold (2007). „Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics.“ eng. In: *Nat Biotechnol* 25.1, S. 125–131.
- Marchler-Bauer, Aron, Shennan Lu, John B. Anderson, Farideh Chitsaz, Myra K. Derbyshire, Carol DeWeese-Scott, Jessica H. Fong, Lewis Y. Geer, Renata C. Geer, Noreen R. Gonzales, Marc Gwadz, David I. Hurwitz, John D. Jackson, Zhaoxi Ke, Christopher J. Lanczycki, Fu Lu, Gabriele H. Marchler, Mikhail Mullokandov, Marina V. Omelchenko, Cynthia L. Robertson, James S. Song, Narmada Thanki, Roxanne A. Yamashita, Dachuan Zhang, Naigong Zhang, Chanjuan Zheng und Stephen H. Bryant (2011). „CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.“ eng. In: *Nucleic Acids Res* 39.Database issue, S. D225–D229.
- Matsuo, Shougo, Haruna Shirai und Yasuhiro Takada (2010). „Isocitrate dehydrogenase isozymes from a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas psychrophila*.“ eng. In: *Arch Microbiol* 192.8, S. 639–650.
- Mattioda, Christidis (2000). *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Hrsg. von Cornils B Bohnet M Brinker CG. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, Germany, 89–92.
- McCoy, Elizabeth, E. B. Fred, W. H. Peterson und E. G. Hastings (1926). „A Cultural Study of the Acetone Butyl Alcohol Organism“. English. In: *The Journal of Infectious Diseases* 39.6, pp. 457–483.

- Mercenier, A., J. P. Simon, C. Vander Wauven, D. Haas und V. Stalon (1980). „Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *J Bacteriol* 144.1, S. 159–163.
- Mermelstein, L. D., E. T. Papoutsakis, D. J. Petersen und G. N. Bennett (1993). „Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon.“ eng. In: *Biotechnol Bioeng* 42.9, S. 1053–1060.
- Mern, Demissew S, Seung-Wook Ha, Viola Khodaverdi, Nicole Gliese und Helmut Görisch (2010). „A complex regulatory network controls aerobic ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*: indication of four levels of sensor kinases and response regulators.“ eng. In: *Microbiology* 156.Pt 5, S. 1505–1516.
- Morales, Gracia, Juan Francisco Linares, Ana Beloso, Juan Pablo Albar, José Luis Martínez und Fernando Rojo (2004). „The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds.“ In: *J Bacteriol* 186.5, S. 1337–1344.
- Morawski, B., A. Segura und L. N. Ornston (2000). „Repression of *Acinetobacter* vanillate demethylase synthesis by VanR, a member of the GntR family of transcriptional regulators.“ eng. In: *FEMS Microbiol Lett* 187.1, S. 65–68.
- Moreno, Renata und Fernando Rojo (2008). „The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator.“ eng. In: *J Bacteriol* 190.5, S. 1539–1545.
- Muheim, A. und K. Lerch (1999). „Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin.“ In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (4), S. 456–461.
- Muñoz-Rojas, Jesús, Patricia Bernal, Estrella Duque, Patricia Godoy, Ana Segura und Juan-Luis Ramos (2006). „Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 72.1, S. 472–477.
- Mückschel, Björn, Oliver Simon, Janosch Klebensberger, Nadja Graf, Bettina Rosche, Josef Altenbuchner, Jens Pfannstiel, Armin Huber und Bernhard Hauer (2012). „Ethylene Glycol Metabolism of *Pseudomonas putida*.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol*.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A P Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Düsterhöft, B. Tümmeler und C. M. Fraser (2002). „Complete genome sequence and

- comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440.“ eng. In: *Environ Microbiol* 4.12, S. 799–808.
- Nesvizhskii, Alexey I., Andrew Keller, Eugene Kolker und Ruedi Aebersold (2003). „A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry.“ eng. In: *Anal Chem* 75.17, S. 4646–4658.
- Ng, F. M. und E. A. Dawes (1967). „Regulation of enzymes of glucose metabolism by citrate in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Biochem J* 104.3, 48P.
- Nichols, N. N. und C. S. Harwood (1997). „PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*.“ eng. In: *J Bacteriol* 179.16, S. 5056–5061.
- Nielsen, David R, Effendi Leonard, Sang-Hwal Yoon, Hsien-Chung Tseng, Clara Yuan und Kristala L Jones Prather (2009). „Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria.“ eng. In: *Metab Eng* 11.4-5, S. 262–273.
- Oda, Y., K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn und B. T. Chait (1999). „Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.12, S. 6591–6596.
- O’Farrell, P. H. (1975). „High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.“ eng. In: *J Biol Chem* 250.10, S. 4007–4021.
- Olsen, Jesper V, Lyris M F de Godoy, Guoqing Li, Boris Macek, Peter Mortensen, Reinhold Pesch, Alexander Makarov, Oliver Lange, Stevan Horning und Matthias Mann (2005). „Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap.“ eng. In: *Mol Cell Proteomics* 4.12, S. 2010–2021.
- Ong, Shao-En, Blagoy Blagoev, Irina Kratchmarova, Dan Bach Kristensen, Hanno Steen, Akhilesh Pandey und Matthias Mann (2002). „Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.“ eng. In: *Mol Cell Proteomics* 1.5, S. 376–386.
- Ornston, L. N. und M. K. Ornston (1969). „Regulation of glyoxylate metabolism in *Escherichia coli* K-12.“ eng. In: *J Bacteriol* 98.3, S. 1098–1108.
- Overhage, J., H. Priefert und A. Steinbüchel (1999a). „Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. Strain HR199.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 65.11, S. 4837–4847.
- Overhage, J., H. Priefert, J. Rabenhorst und A. Steinbüchel (1999b). „Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene.“ eng. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 52.6, S. 820–828.
- Overhage, J., A. U. Kresse, H. Priefert, H. Sommer, G. Krammer, J. Rabenhorst und A. Steinbüchel (1999c). „Molecular characterization of the genes *pcaG* and *pcaH*,

- encoding protocatechuate 3,4-dioxygenase, which are essential for vanillin catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 65.3, S. 951–960.
- Parke, D. und L. N. Ornston (1976). „Constitutive synthesis of enzymes of the protocatechuate pathway and of the beta-ketoadipate uptake system in mutant strains of *Pseudomonas putida*.“ eng. In: *J Bacteriol* 126.1, S. 272–281.
- Parke, D., D. A. D’Argenio und L. N. Ornston (2000). „Bacteria are not what they eat: that is why they are so diverse.“ eng. In: *J Bacteriol* 182.2, S. 257–263.
- Patterson, Scott D. und Ruedi H. Aebersold (2003). „Proteomics: the first decade and beyond.“ eng. In: *Nat Genet* 33 Suppl, S. 311–323.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy und J. S. Cottrell (1999). „Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.“ In: *Electrophoresis* 20.18, S. 3551–3567.
- Picard, Flora, Clémentine Dressaire, Laurence Girbal und Muriel Coccagn-Bousquet (2009). „Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology.“ eng. In: *C R Biol* 332.11, S. 958–973.
- Picotti, Paola, Bernd Bodenmiller, Lukas N. Mueller, Bruno Domon und Ruedi Aebersold (2009). „Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics.“ eng. In: *Cell* 138.4, S. 795–806.
- Pini, Cecilia, Patricia Godoy, Patricia Bernal, Juan-Luis Ramos und Ana Segura (2011). „Regulation of the cyclopropane synthase *cfaB* gene in *Pseudomonas putida* KT2440.“ eng. In: *FEMS Microbiol Lett* 321.2, S. 107–114.
- Pinkart, H. C., J. W. Wolfram, R. Rogers und D. C. White (1996). „Cell Envelope Changes in Solvent-Tolerant and Solvent-Sensitive *Pseudomonas putida* Strains following Exposure to *o*-Xylene.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 62.3, S. 1129–1132.
- Poblete-Castro, Ignacio, Judith Becker, Katrin Dohnt, Vitor Martins dos Santos und Christoph Wittmann (2012). „Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species.“ eng. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 93.6, S. 2279–2290.
- Poole, K. (2001). „Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms.“ eng. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* 3.2, S. 255–264.
- Priefert, H., J. Rabenhorst und A. Steinbüchel (1997). „Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate.“ eng. In: *J Bacteriol* 179.8, S. 2595–2607.
- Priefert, H., J. Overhage und A. Steinbüchel (1999). „Identification and molecular characterization of the eugenol hydroxylase genes (*ehyA/ehyB*) of *Pseudomonas* sp. strain HR199.“ eng. In: *Arch Microbiol* 172.6, S. 354–363.
- Promden, Worrawat, Alisa S Vangnai, Hirohide Toyama, Kazunobu Matsushita und Piamsook Pongsawasdi (2009). „Analysis of the promoter activities of the genes en-

- coding three quinoprotein alcohol dehydrogenases in *Pseudomonas putida* HK5.“ eng. In: *Microbiology* 155.Pt 2, S. 594–603.
- Puchalka, Jacek, Matthew A. Oberhardt, Miguel Godinho, Agata Bielecka, Daniela Regenhardt, Kenneth N. Timmis, Jason A. Papin und Vítor A P. Martins dos Santos (2008). „Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology.“ eng. In: *PLoS Comput Biol* 4.10, e1000210.
- Ramos, J. L., E. Duque, P. Godoy und A. Segura (1998). „Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E.“ eng. In: *J Bacteriol* 180.13, S. 3323–3329.
- Ramos, Juan L, Estrella Duque, Maria-Trinidad Gallegos, Patricia Godoy, Maria Isabel Ramos-Gonzalez, Antonia Rojas, Wilson Teran und Ana Segura (2002). „Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria.“ eng. In: *Annu Rev Microbiol* 56, S. 743–768.
- Rey, Sébastien, Michael Acab, Jennifer L Gardy, Matthew R Laird, Katalin deFays, Christophe Lambert und Fiona S L Brinkman (2005). „PSORTdb: a protein subcellular localization database for bacteria.“ In: *Nucleic Acids Res* 33.Database issue, S. D164–D168.
- Rhee, H. J., Eui-Jin Kim und J. K. Lee (2007). „Physiological polyamines: simple primordial stress molecules.“ eng. In: *J Cell Mol Med* 11.4, S. 685–703.
- Rivera, Sonia L., Eréndira Vargas, Martha I. Ramírez-Díaz, Jesús Campos-García und Carlos Cervantes (2008). „Genes related to chromate resistance by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.“ eng. In: *Antonie Van Leeuwenhoek* 94.2, S. 299–305.
- Roca, Amalia, José-Juan Rodríguez-Herva, Estrella Duque und Juan L. Ramos (2008). „Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification.“ eng. In: *Microb Biotechnol* 1.2, S. 158–169.
- Roma-Rodrigues, Catarina, Pedro M Santos, Dirk Benndorf, Erdmann Rapp und Isabel Sá-Correia (2010). „Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome.“ In: *J Proteomics*.
- Romero-Steiner, S., R. E. Parales, C. S. Harwood und J. E. Houghton (1994). „Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of p-hydroxybenzoate.“ eng. In: *J Bacteriol* 176.18, S. 5771–5779.
- Ross, Philip L., Yulin N. Huang, Jason N. Marchese, Brian Williamson, Kenneth Parker, Stephen Hattan, Nikita Khainovski, Sasi Pillai, Subhakar Dey, Scott Daniels, Subhasish Purkayastha, Peter Juhasz, Stephen Martin, Michael Bartlet-Jones, Feng He, Allan Jacobson und Darryl J. Pappin (2004). „Multiplexed protein quantitation

- in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents.“ eng. In: *Mol Cell Proteomics* 3.12, S. 1154–1169.
- Rupp, M. und H. Görisch (1988). „Purification, crystallisation and characterization of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Biol Chem Hoppe Seyler* 369.6, S. 431–439.
- Rutherford, Becky J, Robert H Dahl, Richard E Price, Heather L Szmidt, Peter I Benke, Aindrila Mukhopadhyay und Jay D Keasling (2010). „Functional Genomic Study of Exogenous n-Butanol Stress in *Escherichia coli*.“ In: *Appl Environ Microbiol* 76.6, S. 1935–1945.
- Ruzicka, L. (1953). „The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds.“ eng. In: *Experientia* 9.10, S. 357–367.
- Rühl, Jana, Andreas Schmid und Lars Mathias Blank (2009). „Selected *Pseudomonas putida* strains able to grow in the presence of high butanol concentrations.“ eng. In: *Appl Environ Microbiol* 75.13, S. 4653–4656.
- Rühl, Jana, Eva-Maria Hein, Heiko Hayen, Andreas Schmid und Lars M. Blank (2012). „The glycerophospholipid inventory of *Pseudomonas putida* is conserved between strains and enables growth condition-related alterations.“ eng. In: *Microb Biotechnol* 5.1, S. 45–58.
- Sajtos, A. (1991). „Process for the preparation of glyoxylic acid and glyoxylic acid derivatives“. Pat. 5,015,760.
- Sandra, Koen, Mahan Moshir, Filip D’hondt, Katleen Verleysen, Koen Kas und Pat Sandra (2008). „Highly efficient peptide separations in proteomics Part 1. Unidimensional high performance liquid chromatography.“ eng. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 866.1-2, S. 48–63.
- Santos, Pedro M, Dirk Benndorf und Isabel Sá-Correia (2004). „Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics.“ eng. In: *Proteomics* 4.9, S. 2640–2652.
- Santos, Pedro M. und Isabel Sá-Correia (2009). „Adaptation to beta-myrcene catabolism in *Pseudomonas* sp. M1: an expression proteomics analysis.“ eng. In: *Proteomics* 9.22, S. 5101–5111.
- Sawyer, M. H., P. Baumann, L. Baumann, S. M. Berman, J. L. Cánovas und R. H. Berman (1977). „Pathways of D-fructose catabolism in species of *Pseudomonas*.“ eng. In: *Arch Microbiol* 112.1, S. 49–55.
- Schlegel, H. G., H. Kaltwasser und G. Gottschalk (1961). „[A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies].“ ger. In: *Arch Mikrobiol* 38, S. 209–222.

- Schmidt, Alexander, Josef Kellermann und Friedrich Lottspeich (2005). „A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels.“ eng. In: *Proteomics* 5.1, S. 4–15.
- Schobert, M. und H. Görisch (2001). „A soluble two-component regulatory system controls expression of quinoprotein ethanol dehydrogenase (QEDH) but not expression of cytochrome c(550) of the ethanol-oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *Microbiology* 147.Pt 2, S. 363–372.
- Schulze, Waltraud X und Björn Usadel (2010). „Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics.“ eng. In: *Annu Rev Plant Biol* 61, S. 491–516.
- Schweizer, H. P. (1991). „The *agmR* gene, an environmentally responsive gene, complements defective *glpR*, which encodes the putative activator for glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *J Bacteriol* 173.21, S. 6798–6806.
- Segura, Ana, Antonia Rojas, Ana Hurtado, María-José Huertas und Juan L. Ramos (2003). „Comparative genomic analysis of solvent extrusion pumps in *Pseudomonas* strains exhibiting different degrees of solvent tolerance.“ eng. In: *Extremophiles* 7.5, S. 371–376.
- Segura, Ana, Patricia Godoy, Pieter van Dillewijn, Ana Hurtado, Nuria Arroyo, Simon Santacruz und Juan-Luis Ramos (2005). „Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene.“ eng. In: *J Bacteriol* 187.17, S. 5937–5945.
- Seubert, W. (1960). „Degradation of isoprenoid compounds by micro-organisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp.“ eng. In: *J Bacteriol* 79, S. 426–434.
- Shen, C. R. und J. C. Liao (2008). „Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways.“ eng. In: *Metab Eng* 10.6, S. 312–320.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm und M. Mann (1996). „Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.“ eng. In: *Anal Chem* 68.5, S. 850–858.
- Sikkema, J., J. A. de Bont und B. Poolman (1994). „Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes.“ eng. In: *J Biol Chem* 269.11, S. 8022–8028.
- Silva, E.A. Borges da, M. Zabkova, J.D. Araújo, C.A. Cateto, M.F. Barreiro, M.N. Belgacem und A.E. Rodrigues (2009). „An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin“. In: *Chemical Engineering Research and Design* 87.9, S. 1276 –1292.
- Stahl-Zeng, Jianru, Vinzenz Lange, Reto Ossola, Katrin Eckhardt, Wilhelm Krek, Ruedi Aebersold und Bruno Domon (2007). „High sensitivity detection of plasma proteins

- by multiple reaction monitoring of N-glycosites.“ eng. In: *Mol Cell Proteomics* 6.10, S. 1809–1817.
- Steen, Eric J., Rossana Chan, Nilu Prasad, Samuel Myers, Christopher J. Petzold, Alyssa Redding, Mario Ouellet und Jay D. Keasling (2008). „Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol.“ eng. In: *Microb Cell Fact* 7, S. 36.
- Sun, Na, Cuiping Pan, Stephan Nickell, Matthias Mann, Wolfgang Baumeister und István Nagy (2010). „Quantitative proteome and transcriptome analysis of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* cultured under aerobic and anaerobic conditions.“ eng. In: *J Proteome Res* 9.9, S. 4839–4850.
- Svensson, Harry, F. Woldbye, T. Lindahl, H. Palmstierna, Berndt Sjöberg und Jens Toft (1961). „Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. I. The Differential Equation of Solute Concentrations at a Steady State and its Solution for Simple Cases“. In: *Acta Chemica Scandinavica* 15, S. 325–341.
- Tamber, Sandeep, Martina M. Ochs und Robert E W. Hancock (2006). „Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*.“ eng. In: *J Bacteriol* 188.1, S. 45–54.
- Tanaka, Koichi, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida, Tamio Yoshida und T. Matsuo (1988). „Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry“. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2.8, S. 151–153.
- Thevelein, J. M. und S. Hohmann (1995). „Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?“ eng. In: *Trends Biochem Sci* 20.1, S. 3–10.
- Timmis, Kenneth N. (2002). „*Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence.“ eng. In: *Environ Microbiol* 4.12, S. 779–781.
- Timms, John F. und Rainer Cramer (2008). „Difference gel electrophoresis.“ eng. In: *Proteomics* 8.23-24, S. 4886–4897.
- Tiwari, N. P. und J. J. Campbell (1969). „Enzymatic control of the metabolic activity of *Pseudomonas aeruginosa* grown in glucose or succinate media.“ eng. In: *Biochim Biophys Acta* 192.3, S. 395–401.
- Toyama, H., A. Fujii, K. Matsushita, E. Shinagawa, M. Ameyama und O. Adachi (1995). „Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols.“ eng. In: *J Bacteriol* 177.9, S. 2442–2450.
- Toyama, Hirohide, F. Scott Mathews, Osao Adachi und Kazunobu Matsushita (2004). „Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology.“ eng. In: *Arch Biochem Biophys* 428.1, S. 10–21.

- Toyama, Hirohide, Zhi-Wei Chen, Megumi Fukumoto, Osao Adachi, Kazunobu Matsushita und F. Scott Mathews (2005). „Molecular cloning and structural analysis of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5.“ eng. In: *J Mol Biol* 352.1, S. 91–104.
- Uchida, H., T. Fukuda, Y. Satoh, Y. Okamura, A. Toriyama, A. Yamashita, K. Aisaka, T. Sakurai, Y. Nagaosa und T. Uwajima (2005). „Characterization and potential application of purified aldehyde oxidase from *Pseudomonas stutzeri* IFO12695.“ eng. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 68.1, S. 53–56.
- Uchida, Hiroyuki, Daisaku Kondo, Ayako Yamashita, Yukio Nagaosa, Takeshi Sakurai, Yutaka Fujii, Kinya Fujishiro, Kazuo Aisaka und Takayuki Uwajima (2003). „Purification and characterization of an aldehyde oxidase from *Pseudomonas* sp. KY 4690.“ eng. In: *FEMS Microbiol Lett* 229.1, S. 31–36.
- Unlü, M., M. E. Morgan und J. S. Minden (1997). „Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts.“ eng. In: *Electrophoresis* 18.11, S. 2071–2077.
- Vander Wauven, C., A. Piérard, M. Kley-Raymann und D. Haas (1984). „*Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway.“ eng. In: *J Bacteriol* 160.3, S. 928–934.
- Vasconcelos, I., L. Girbal und P. Soucaille (1994). „Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol.“ eng. In: *J Bacteriol* 176.5, S. 1443–1450.
- Verhoef, Suzanne, Hendrik Ballerstedt, Rita J M. Volkers, Johannes H. de Winde und Harald J. Ruijssenaars (2010). „Comparative transcriptomics and proteomics of p-hydroxybenzoate producing *Pseudomonas putida* S12: novel responses and implications for strain improvement.“ eng. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 87.2, S. 679–690.
- Vesterberg, O. und H. Svensson (1966). „Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins.“ eng. In: *Acta Chem Scand* 20.3, S. 820–834.
- Volkers, Rita J M, Ad L de Jong, Albert G Hulst, Ben L M van Baar, Jan A M de Bont und Jan Wery (2006). „Chemostat-based proteomic analysis of toluene-affected *Pseudomonas putida* S12.“ eng. In: *Environ Microbiol* 8.9, S. 1674–1679.
- Vrionis, H. A., A. J. Daugulis und A. M. Kropinski (2002). „Identification and characterization of the AgmR regulator of *Pseudomonas putida*: role in alcohol utilization.“ eng. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 58.4, S. 469–475.
- Wallach, O. (1885). „Zur Kenntniss der Terpene und der ätherischen Oele.“ In: *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 227.3, S. 277–302.

- Walter, Nadine (2012). „Abbau von Citronellol in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1“. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie: Universität Stuttgart.
- Walton, Nicholas J, Melinda J Mayer und Arjan Narbad (2003). „Vanillin.“ eng. In: *Phytochemistry* 63.5, S. 505–515.
- Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams und I. Humphery-Smith (1995). „Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*.“ eng. In: *Electrophoresis* 16.7, S. 1090–1094.
- Weber, F. J. und J. A. de Bont (1996). „Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes.“ eng. In: *Biochim Biophys Acta* 1286.3, S. 225–245.
- Weizmann, C. (1915). „Improvements in the bacterial fermentation of carbohydrates and in bacterial cultures for the same“. Pat. 4845.
- Westfall, Landon W., Nancy L. Carty, Nancy Layland, Phillip Kuan, Jane A. Colmer-Hamood und Abdul N. Hamood (2006). „mvaT mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon mexEF-oprN.“ eng. In: *FEMS Microbiol Lett* 255.2, S. 247–254.
- Wiener, Norbert (1948). *Cybernetics or Control and Communication in the Animal and the Machine*. 2. Aufl. Cambridge, MA: MIT Press.
- Wijte, Dorien, Ben Van Baar, Albert J R Heck und Maarten Altelaar (2010). „Probing the proteome response to toluene exposure in the solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12.“ eng. In: *J Proteome Res*.
- Wijte, Dorien, Ben L M. van Baar, Albert J R. Heck und A F Maarten Altelaar (2011). „Probing the proteome response to toluene exposure in the solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12.“ eng. In: *J Proteome Res* 10.2, S. 394–403.
- Wilkins, M. R., C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams und D. F. Hochstrasser (1996). „From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis.“ eng. In: *Biotechnology (N Y)* 14.1, S. 61–65.
- Winsor, Geoffrey L., David K W. Lam, Leanne Fleming, Raymond Lo, Matthew D. Whiteside, Nancy Y. Yu, Robert E W. Hancock und Fiona S L. Brinkman (2011). „*Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes.“ eng. In: *Nucleic Acids Res* 39.Database issue, S. D596–D600.
- Wolff, J. A., C. H. MacGregor, R. C. Eisenberg und PV Phibbs Jr (1991). „Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO.“ eng. In: *J Bacteriol* 173.15, S. 4700–4706.

- Wood J. M., W. A. und R. F. Schwerdt (1954). „Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens*. II. Mechanism of hexose phosphate oxidation.“ eng. In: *J Biol Chem* 206.2, S. 625–635.
- Yadav, G.D und V.R Gupta (2000). „Synthesis of glyoxalic acid from glyoxal“. In: *Process Biochemistry* 36.1–2, S. 73 –78.
- Yu, Nancy Y., Matthew R. Laird, Cory Spencer und Fiona S L. Brinkman (2011). „PSORTdb—an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea.“ eng. In: *Nucleic Acids Res* 39.Database issue, S. D241–D244.
- Yun, Sung-Ho, Gun Wook Park, Jin Young Kim, Sang Oh Kwon, Chi-Won Choi, Sun-Hee Leem, Kyung-Hoon Kwon, Jong Shin Yoo, Chulhyun Lee, Soohyun Kim und Seung Il Kim (2011). „Proteomic characterization of the *Pseudomonas putida* KT2440 global response to a monocyclic aromatic compound by iTRAQ analysis and 1DE-MudPIT.“ eng. In: *J Proteomics*.
- Zaldivar, J., A. Martinez und L. O. Ingram (1999). „Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*.“ eng. In: *Biotechnol Bioeng* 65.1, S. 24–33.
- Zgurskaya, Helen I., Ganesh Krishnamoorthy, Abigail Ntrel und Shuo Lu (2011). „Mechanism and Function of the Outer Membrane Channel TolC in Multidrug Resistance and Physiology of Enterobacteria.“ eng. In: *Front Microbiol* 2, S. 189.
- Zhang, Guoan, Roland S. Annan, Steven A. Carr und Thomas A. Neubert (2010). „Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry.“ eng. In: *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 16, Unit16.1.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>EMP-Weg</b>	Embden-Meyerhof
<b>DIGE</b>	Difference Gel Electrophoresis
<b>SILAC</b>	Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture
<b>ICAT</b>	Isotope-Coded Affinity Tag
<b>iTRAQ</b>	Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
<b>XIC</b>	Extracted Ion Chromatogram
<b>ICPL</b>	Isotope Coded Protein Labels
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>m/z</b>	Masse / Ladung
<b>RP-HPLC</b>	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography
<b>IEF</b>	Isoelektrische Fokussierung
<b>PTMs</b>	posttranslationale Modifikationen
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>TCA</b>	Tricarboxylic Acid Cycle
<b>LC</b>	Liquid Chromatography
<b>ESI</b>	Electrospray Ionisation
<b>SRM</b>	Selected Reaction Monitoring
<b>PTP</b>	Proteotypische Peptide

<b>CE</b>	Collision Energy
<b>DC</b>	Declustering Potential
<b>GeLCMSMS</b>	1D-Gel-Fraktionierungs-Experiment
<b>EG</b>	Ethylenglycol
<b>GXS</b>	Glyoxylsäure
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>MW</b>	Molecular Weight
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>FA</b>	Methansäure
<b>DDA</b>	Data Dependent Acquisition

## Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Armin Huber für die Vergabe des Themas, die konstruktiven Anregungen und die hervorragende Betreuung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Jens Pfannstiel für seine großartige praktische und theoretische Unterstützung bei allen mit dieser Arbeit verbundenen Belangen.

Berit Jöns für ihre Unterstützung im Labor und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Iris Klaiber für die weitreichenden Einblicke in die Hard- und Software von HPLCs und Massenspektrometern.

Berit Würtz für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Life Science Centers und des Fachgebiets Biosensorik für das angenehme Arbeitsklima.

Allen Kooperationspartnern des BMBF-Projekts „Systembiologie in *Pseudomonas putida* für die industrielle Biokatalyse“.

Björn Mückschel für die Bereitstellung von Proben und den regen fachlichen Austausch.

Tobias Vallon für die Bereitstellung von Proben und die Einblicke in die Biotechnologie.

Nadine Walter für die Bereitstellung von Proben und die angenehme Zusammenarbeit.

Nadja Graf für die Erzeugung der unterschiedlichen, in dieser Arbeit untersuchten Mutanten.

Henning Henkel für seine Unterstützung bei allen kleinen und großen Programmieraufgaben und allen Fragen rund um Linux und L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X.

Meinen Eltern für ihre Unterstützung.

Lioba

# Eidesstattliche Versicherung

## Eidesstattliche Versicherung gemäß §7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema “Quantitative Proteomanalyse von *Pseudomonaden* zur Aufklärung biotechnologisch relevanter Stoffwechselwege” handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.
4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Stuttgart-Hohenheim, den 22.05.2013

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Oliver Simon  
Geboren 31.03.1983 in Villingen  
Staatsang. deutsch

## Beruflicher Werdegang

2009 - 2013 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physiologie,  
Fachgebiet Biosensorik, Universität Hohenheim

## Hochschulstudium

2009 - heute Promotion mit dem Thema "*Quantitative Proteomanalyse von Pseudomonaden zur Aufklärung biotechnologisch relevanter Stoffwechselwege*",  
AG Huber, Universität Hohenheim

02.2009 Master Thesis mit dem Thema: "*Stoichiometry measurement of a multiprotein complex*",  
AG Sickmann, Universität Würzburg

2006 - 2007 Auslandsstudium in Schweden, ERASMUS

2006 - 2009 Studium der Biomedizin (M.Sc.), Universität Würzburg

07.2006 Bachelor Thesis mit dem Thema: "*Characterization of platelet membranes using peptide centric proteomics*",  
AG Sickmann, Universität Würzburg

2003 - 2006 Studium der Biomedizin (B.Sc.), Universität Würzburg

## Schulbildung

2002 - 2003 Zivildienst

1993 - 2002 Hegau-Gymnasium, Singen

Stuttgart, 16. November 2013

# Anhang

Alle Tabellen und Abbildungen des Anhangs befinden sich auf der beiliegenden CD.