

Bakterielle Levansucrasen

Eine zuckersüße Versuchung

DARIA S. ZHURINA, ABHISHEK SRIVASTAVA, MATTHIAS S. ULLRICH
MOLEKULARE MIKROBIOLOGIE, SCHOOL OF ENGINEERING AND SCIENCE,
JACOBS UNIVERSITY, BREMEN

Viele Bakterien, die Pflanzen befallen, die Mundhöhle besiedeln und bei der Bioethanol-Gewinnung auftreten, besitzen extrazelluläre Levansucrasen. Diese Enzyme setzen Glukose aus Saccharose frei und polymerisieren Fruktosereste zu Levan.

Bacteria associated with plants, the oral cavity, or biofuel production use levansucrases to release glucose and polymerize levan.

■ Von Pflanzen gebildete Saccharose ist ein wesentlicher Transportzucker der Pflanzen, aber auch eine schnell zugängliche Energie- und Kohlenstoffquelle für Bakterien. Dazu zählen pflanzenpathogene, die Mundhöhle und den Boden besiedelnde oder die Bio-Ethanol-Gewinnung behindernde Gram-negative oder -positive Arten. Diese Mikroorganismen nutzen das etwa 50 kd große extrazelluläre Enzym Levansucrase, um Glukose aus Saccharose freizusetzen und die frei werdenden Fruktosylreste zu Levan zu polymerisieren (**Abb. 1**, [1]). Während Glukose anschließend von den Bakterien verstoffwechselt wird, lagert sich Levan mehr oder weniger kompakt um die Bakterienzellen. Für Levan wurden bislang drei wesentliche Funktionen angenommen: Schutz vor Austrocknung, Anheftung der Bakterien an biotische oder abiotische Oberflächen und Barriere für antimikrobielle Substanzen, wie sie beispielsweise

von Pflanzen gebildet oder in Zahnpflegeprodukten verwendet werden [1].

In pflanzenpathogenen und bodenbesiedelnden Bakterien wie *Pseudomonas syringae* oder *Bacillus subtilis* sind Levansucrasen Virulenz- und Fitnessfaktoren. Bei bakteriellen Zahnerkrankungen infolge von Saccharosehaltiger Nahrung und unzureichender Mundhygiene führt die bakterielle Levansynthese zu Plaquebildung und Karies. Während der Herstellung von Biosprit aus pflanzlichem Ausgangsmaterial treten Levan-produzierende bakterielle Kontaminationen auf, die zur Verstopfung von Produktionsmaterial und bei Fermentation mit *Zymomonas mobilis* zu einer deutlichen Verringerung des Ethanolgehalts führen [1]. Ein besseres Wissen über Levansucrasen ist daher sowohl für den Pflanzenschutz als auch für die Zahnmedizin und die Erzeugung erneuerbarer Energien von großem Interesse.

Das Enzym Levansucrase

Levansucrasen führen generell vier voneinander unterscheidbare enzymatische Reaktionen aus: (1) Sie spalten Saccharose unter Freisetzung von Glukose; (2) Sie verknüpfen die frei werdenden Fruktosylreste unter Zuhilfenahme von einzelnen Glukoseresten zu mittels β -(2,6)- und β -(2,1)-Brücken verbundenen Levanpolymerketten; (3) Sie können die Glukosereste an vollständigen Levanmolekülen gegen neue Glukosemoleküle austauschen; (4) Sie können Levan abbauen [2].

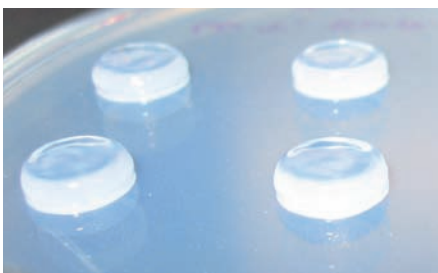
Levansucrasen findet man in verschiedenen Bakterienarten – vermutlich weil diese Enzyme wichtige ökologische Funktionen

besitzen und deren Gene in entsprechenden Habitaten horizontal übertragen wurden. Die meisten diesbezüglich untersuchten Bakterienarten besitzen nur eine Kopie des Levansucrase-Gens. Interessanterweise tragen alle bisher analysierten pflanzenpathogenen *Pseudomonas syringae*-Stämme zwei bis drei hochkonservierte Allele für Levansucrasen [3]. Dieser Umstand machte eine detaillierte Untersuchung der Levansucrasen im prägenomischen Zeitalter schwierig. Dennoch wurden für den Sojabohnen-infizierenden *P. syringae* pv. *glycinea*-Stamm PG4180 drei entsprechende Allele gefunden: *lscA*, *lscB* und *lscC* [4]. Während zwei dieser Gene zu funktionalen Genprodukten führen, wird das *lscA*-Gen nicht abgelesen. Allerdings bilden *E. coli*-Zellen Levan, wenn sie das *lscA*-Gen unter Kontrolle eines starken Promotors tragen, sodass auch LscA enzymatisch funktional ist.

Die gleichzeitige Mutation der Gene *lscB* und *lscC* führte in *P. syringae* PG4180 zu einer Levan-defizienten Mutante [4]. Ähnlich wie in den Genomen anderer *P. syringae*-Stämme befindet sich das 1.296 bp umfassende *lscB*-Gen auf einem natürlich vorkommenden Plasmid von PG4180, während das ebenfalls 1.296 bp große *lscC*-Gen chromosomal codiert ist [4]. Die beiden gebildeten Genprodukte weisen nur in fünf Aminosäureresten Unterschiede auf. Allerdings ergab die Analyse der Ausschleusung beider Genprodukte aus der Zelle einen interessanten Unterschied: Während die Levansucrase LscC hauptsächlich im periplasmatischen Raum auftritt, erwies sich LscB als das eigentlich von der Zelle abgegebene, extrazelluläre Enzym (**Abb. 2**). Entsprechend könnten die Genprodukte jeweils spezifische Funktionen haben, die Gegenstand unserer derzeitigen Untersuchungen sind.

Sekretion und Transkription von Levansucrasen

Im Gegensatz zur intensiv untersuchten Levansucrase von *B. subtilis* [5] besitzen weder LscB noch LscC Signalpeptide und werden ungespalten, also Typ-II-Export-unabhängig sekretiert. Wegen des gleichzeitigen Auftretens beider Enzyme im periplasmatischen Raum kann eine Ausschleusung durch die Sekretionssysteme vom Typ I, III oder IV

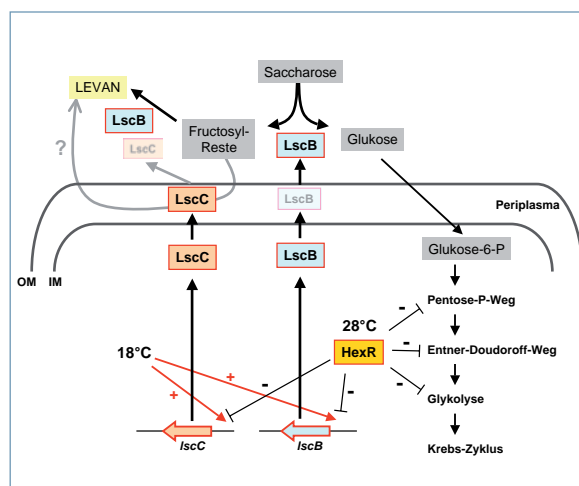


▲ **Abb. 1:** Levanbildung durch zellfreien, konzentrierten Kulturüberstand von *P. syringae* PG4180 auf 5%-Saccharose-haltigem Wasseragar nach etwa einer Woche Inkubation (Bild: Nemanja Ivanowski, Jacobs University Bremen).

ausgeschlossen werden. Auch das *tat(twin arginine motif transport)*-Sekretionssystem scheint nicht am Export der Proteine beteiligt zu sein. Für eine Autotransporter-Hypothese fehlen LscB und LscC die dafür notwendigen, typisch hydrophoben Proteinsequenzen. Unsere derzeitigen Untersuchungen konzentrieren sich daher auf den Mechanismus der Freisetzung von Levansucrasen in *P. syringae*, der möglicherweise neuartig oder eine Kombination bekannter, aber modifizierter Sekretionsmechanismen ist.

Die Untersuchung der Rolle von Levansucrasen für die Biofilmbildung von *P. syringae* ergab interessante Befunde: Im Rahmen der Analyse entsprechender Levan-defekter Mutanten erwies sich dieses Exopolymer als unwichtig [6]. Mittels Markierung durch zuckerspezifische Lektine wurde eine Anhäufung von Levan in zellfreien Räumen im Inneren von Mikrokolonien von *P. syringae* nachgewiesen, wenn diese mit Saccharose versorgt wurden. Dies erlaubt Spekulationen über eine mögliche Rolle von Levan als Speicherstoff für in Biofilmen wachsende Bakterienpopulationen. Ob das so gespeicherte Levan im Hungerzustand des Biofilms recycelt wird, ist Gegenstand unserer derzeitigen Untersuchungen.

Die Transkription der Levansucrase-Gene aus *P. syringae* PG4180 erfolgt temperaturabhängig [7]. Die Transkription ist bei der Virulenz-fördernden Temperatur von 18 °C optimal, während bei der idealen Wachstumstemperatur von 28 °C deutlich weniger Levansucrase gebildet wird (Abb. 2). *P. syringae* PG4180 ist ein typisches „Kaltwetter“-Pathogen und bildet Virulenzfaktoren wie z. B. das Phytotoxin Coronatin ebenfalls maximal bei 18 °C [8]. Die Transkriptions-Startstellen von *lscB* und *lscC* wurden lokalisiert und die entsprechenden *upstream* gelegenen DNA-Sequenzen einer DNA-Affinitätschromatographie unterzogen, um potenzielle Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Dabei zeigte sich, dass das für die transkriptionelle Repression von Genen für den Glukose-Meta-



◀ **Abb. 2:** Schematische Darstellung der Regulation der Transkription und Sekretion von Levansucrasen aus *P. syringae* PG4180. HexR ist ein globaler Repressor der Transkription von Genen, die für Enzyme des zentralen Glukose-Metabolismus codieren. 18 °C ist die induzierende Temperatur für beide Levansucrase-Gene. IM: innere Plasmamembran, OM: äußere Plasmamembran. Farbintensität und Größe der Boxen indizieren die Menge an im Kompartiment nachgewiesenem Enzym.

bolismus wichtige Protein HexR [9] spezifisch bei der reprimierenden Temperatur von 28 °C, nicht aber bei 18 °C an die *upstream*-DNA von *lscB* bindet. Levansucrase als aus der Zelle geschleustes Glukose-freisetzendes Enzym könnte also koordiniert mit dem zellulären Glukoseabbau reguliert werden (Abb. 2).

Zukünftige Forschung

Künftig wollen wir untersuchen, wie Levansucrase-Gene exprimiert werden, über welche Wege die beiden Enzyme exportiert bzw. sekretiert werden und was die tatsächliche Funktion von Levan im Zusammenhang mit dem allgemeinen Kohlenstoff-Metabolismus der Zellen ist. Die detaillierte Rolle mehrerer neu identifizierter Regulatorproteine soll ebenso untersucht werden wie die Export- und Sekretionsmechanismen für beide Levansucrasen. Schließlich wollen wir prüfen, welche spezifischen enzymatischen Aktivitäten die beiden Isoenzyme haben und ob die Levanbildung tatsächlich eine Art „Abfallbeseitigung“ zum späteren Recycling darstellt.

Danksagung

Wir würdigen die fruchtbare Zusammenarbeit mit der AG von Bernhard Eikmanns (Universität Ulm). Unsere Arbeiten werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. ■

Literatur

- [1] Ullrich MS (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends, Caister Academic Press, Norfolk, UK
- [2] Kasapis S, Morris E, Gross M et al. (1994) Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. Carbohydr Polymers 23: 55–64
- [3] www.pseudomonas.com
- [4] Li H, Ullrich MS (2001) Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. J Bacteriol 183: 3282–3292
- [5] Benyahia F, Chambert R, Petit-Glatron MF (1988) Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Effects on the secretion process of single amino acid substitutions in the mature part of the protein. J Gen Microbiol 134: 3259–3268
- [6] Laue H, Schenk A, Li H et al. (2006) Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. Microbiol 152: 2909–2918
- [7] Li H, Schenk A, Srivastava A et al. (2006) Thermo-responsive expression and differential secretion of the extra-cellular enzyme levansucrase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. glycinea. FEMS Microbiol Lett 265: 178–185
- [8] Ullrich MS, Schergaut M, Boch J et al. (2000) Temperature-responsive genetic loci in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. glycinea. Microbiol 146: 2457–2468
- [9] del Castillo T, Duque E, Ramos JL (2008) A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. J Bacteriol 190: 2331–2339

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Matthias S. Ullrich
Jacobs University Bremen
Campus-Ring 6
D- 28759 Bremen
Tel.: 0421-200-3245
Fax: 0421-200-3249
m.ullrich@jacobs-university.de

AUTOREN



Daria S. Zhurina

Jahrgang 1981. 2002–2005 Genetik-Studium an der Staatlichen Universität St. Petersburg, International Max Planck Research School, Bremen, und an der Jacobs University Bremen. 2009 Promotion, Jacobs University Bremen, seither Postdoktorandin.



Abhishek Srivastava

Jahrgang 1980. 2000–2005 Life Science-Studium an der Jawaharlal Nehru University, New Delhi. 2009 Promotion, Jacobs University Bremen, seither Postdoktorand.



Matthias Ullrich

Jahrgang 1963. 1985–1990 Mikrobiologie-Studium an der Universität Jena. 1992 Promotion. 1992–1996 Postdoktorand an der Oklahoma State University. 1996–2002 Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. Seit 2002 Professor für Mikrobiologie, Jacobs University Bremen.