

**Transkriptomanalyse verschiedener Morphotypen
von *Pseudomonas aeruginosa*, isoliert von Patienten
mit Cystischer Fibrose**

Von dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Franz von Götz
geboren am 2. Juni 1974 in Köln

Hannover 2003

angefertigt in der Zeit vom 15.04.00 bis 30.03.03 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene und in der Klinischen Forschergruppe „Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“ der Medizinischen Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 28.05.2003

Referent: Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler
Klinische Forschergruppe
„Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“
Medizinische Hochschule Hannover

Out of clutter, find simplicity.
From discord, find harmony.
In the middle of difficulty lies opportunity.

Albert Einstein

Kurzfassung

Das heterogene Habitat der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) bringt klein- bzw. langsam wachsende Morphotypen von *Pseudomonas aeruginosa* hervor, die durch eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika, autoaggregatives Wachstumsverhalten sowie eine gesteigerte Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen gekennzeichnet sind.

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der genomweiten Expressionsanalyse der biofilmbildenden SCV 20265, isoliert aus einer CF-Lunge, im Vergleich mit einem klonalen Wildtyp sowie einer *in vitro* generierten, schnell wachsenden Revertante. Mit dem verwendeten *P. aeruginosa* GeneChip (Affymetrix) lassen sich in einem Experiment 87 % des 6600 kb großen Genoms der SCV 20265 analysieren.

Insgesamt konnte die differentielle Regulation von 309 Genen im exponentiellen oder stationären Wachstumsstadium der klonalen Morphotypen nachgewiesen werden. Die Genexpressions-Profile deuten an, daß die SCV 20265 in einem physiologischen Stadium blockiert ist, welches ihre Adaptation an eine anaerobe aber auch oxidative Umwelt, antibiotischen Druck und ein Wachstum im Biofilm widerspiegelt. Als prominentester Pathogenitätsfaktor von *P. aeruginosa* wird das Typ III Proteinsekretionssystem und seine Effektorproteine in der SCV 20265 induziert. Folglich scheint die vorherrschende Annahme, daß *P. aeruginosa* während der chronischen Infektion von CF-Lungen einer Selektion in Richtung reduzierter Cytotoxizität und attenuierter Virulenz unterworfen ist, nicht für alle klonalen Varianten zuzutreffen.

Die molekulare Ursache des SCV-Phänotyps beruht höchstwahrscheinlich auf mikroevolutionären Prozessen in der stark selektiv wirkenden CF-Lunge. Möglicherweise können bisher nicht charakterisierte Mutationen über die Beeinflussung von intrazellulären Signalkaskaden pleiotrope Wirkungen haben, zu denen die Ausbildung kleiner Kolonien gehört. Der Response Regulator PvrR mit EAL-Domäne scheint in die Signalvermittlung involviert zu sein, da eine Genkomplementation den SCV-Phänotyp aufzuheben vermag.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Adaptationsmechanismen von SCV 20265 wie auch die gesammelten Hinweise für die molekularen Ursachen des SCV-Phänotyps können als Ausgangspunkte für gezielte Experimente an SCVs von *P. aeruginosa* dienen. Letztendlich könnte das Wissen um die Existenz von SCVs und ihre Anpassungsstrategien die Entwicklung von neuen Therapien gegen chronisch infizierende *P. aeruginosa* vorantreiben.

Schlüsselwörter: *Pseudomonas aeruginosa*, *small colony variant*, Cystische Fibrose

Abstract

The heterogeneous habitat of the cystic fibrosis (CF) lung gives rise to *Pseudomonas aeruginosa* small colony variants (SCVs) with increased antibiotic resistance, autoaggregative growth behaviour and an enhanced ability to form biofilms.

In this study the main focus has been put on a genome-wide expression analysis of the biofilm forming *P. aeruginosa* SCV 20265 isolated from a CF lung in comparison with its clonal wildtype and an *in vitro* generated revertant. With the applied *P. aeruginosa* GeneChip (Affymetrix) 87 % of the 6600 kb genome of SCV 20265 may be analysed in a single experiment.

Overall, the differential regulation of 309 genes in the exponential and stationary phase, respectively, were detected for the clonal morphotypes. The gene expression profiles indicate that SCV 20265 is arrested in a physiological state reflecting its adaptation to an anaerobic but oxidative environment, antibiotic pressure and a biofilm mode of growth. As the most prominent pathogenicity factor of *P. aeruginosa* the type III protein secretion system and the corresponding effector proteins are induced in SCV 20265. Thus, the prevailing assumption that *P. aeruginosa* is subject to selection towards reduced cytotoxicity and attenuated virulence during chronic CF lung infection might not apply to all clonal variants.

The molecular causes of the SCV phenotype are most likely due to microevolutionary processes in the strongly selective acting CF-lung. Probably, so far not characterized mutations may influence intracellular signalling cascades thereby having pleiotropic effects like the formation of small colonies. The response regulator PvrR with an EAL-domain seems to be involved in the signal transduction as a gene complementation abolishes the SCV phenotype.

The adaptation mechanisms of SCV 20265 as well as the gathered hints for the molecular cause of the SCV phenotype described in this study may be starting points for well directed experiments with SCVs from *P. aeruginosa*. Finally, knowledge about the existence of SCVs and their adaptation strategies could promote the development of new therapies against chronic infectious *P. aeruginosa*.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, small colony variant, cystic fibrosis

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann danke ich für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine immerwährende Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Herrn PD Dr. Ivo Steinmetz für die Überlassung dieses Themas und für viele anregende Diskussionen, die geholfen haben, meinem Puzzle eine Struktur zu geben.

Ich möchte mich besonders bei Frau Dr. Susanne Häußler bedanken, von deren Begeisterung und Arbeit über das Phänomen „SCV“ ich sehr profitiert habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler möchte ich mich dafür bedanken, daß ich in seinen Labors arbeiten und das wissenschaftliche Umfeld der Klinischen Forschergruppe genießen durfte.

Meiner Frau Friederike danke ich für ihr Verständnis, wenn der „zerstreute Professor“ mal wieder zu spät nach Hause kam und für ihre Liebe und Zuversicht. Meinem Sohn Rasmus danke ich dafür, daß er so ist wie er ist.

Bei meinen Eltern und Geschwister möchte ich mich für ihre liebevolle Unterstützung bedanken.

Meinem Freund und Kollegen Dr. Christian Weinel danke ich für die vielen Gespräche und das ewige Schulterklopfen, wie auch für seine Hilfe bei einigen Computer-Anwendungen.

Ich danke allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern meiner beiden Arbeitsgruppen für die Hilfe und die großartige Zeit – vor allem außerhalb des Labors. Besonders Doris Jordan danke ich für ihre Cytotoxizitäts-Experimente, Jens Klockgether für seine Begleitung bei der wunderschönen USA-Dienstreise und Miryam Weinel für ihre unvergleichliche Art.

Dr. Jörg Lauber möchte ich für seine ausgesprochen wertvolle Hilfe bei der Etablierung der Genexpressions-Analyse mittels Affymetrix GeneChips danken und Tanja Toepfer und Dr. Robert Geffers für ihre große Hilfsbereitschaft bei der Hybridisierung der GeneChips.

Dr. Ina Attree danke ich für die Konstruktion einer *exsA*-Mutante von SCV 20265.

Die vorliegende Studie wurde großzügig von der Cystic Fibrosis Therapeutics Inc. (USA) und der Mukoviszidose e.V. (Deutschland) unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
I. Einleitung	1
I.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Taxonomie, Lebensweise, Genomvariabilität	1
I.2. Pathogenität und Virulenzmechanismen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
I.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und Cystische Fibrose	6
I.4. Phänotypische Varianten von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bei Cystischer Fibrose	11
I.5. Expressionsanalyse mittels Proteom- und Transkriptomanalytik	15
I.6. Stand der Forschung zur Charakterisierung von <i>P. aeruginosa</i> SCVs, isoliert von Patienten mit Cystischer Fibrose	20
I.7. Zielsetzung	22
II. Material und Methoden	23
II.1. Organismen und Plasmide	23
II.2. Anzucht von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
II.2.1. Nährmedien	25
II.2.2. Kulturbedingungen	27
II.2.3. Bestimmung von Pyocyanin und Pyoverdin in Zellüberständen	28
II.2.4. Proteinbestimmung von Zellsuspensionen	29
II.3. RNA-Arbeitstechniken	30
II.3.1. Vorbehandlung von Lösungen und Geräten	30
II.3.2. Isolierung von Gesamt-RNA	30
II.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	32
II.3.4. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	32
II.3.5. Northern-Blotting	34
II.3.6. Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin	35
II.3.7. RNA-DNA-Hybridisierung	36
II.4. DNA-Arbeitstechniken	38
II.4.1. Vorbehandlung von Lösungen und Geräten	38
II.4.2. Isolierung von DNA aus Bakterien	38
II.4.3. Generelle Techniken für die Arbeit mit DNA	39
II.4.4. Enzymatische Manipulationen von DNA	41
II.4.5. Agarose-Gelelektrophorese	44
II.4.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	46
II.4.7. Southern-Blotting	46

II.4.8.	DNA-DNA-Hybridisierung	47
II.4.9.	Übertragung von DNA durch Elektroporation	47
II.5.	<i>P. aeruginosa</i> GeneChips (Affymetrix)	49
II.5.1.	Der <i>P. aeruginosa</i> GeneChip	49
II.5.2.	Generierung von cDNA und Markierung mit Biotin	52
II.5.3.	Markierung von genomischer DNA zur GeneChip-Hybridisierung	55
II.5.4.	Hybridisierung von GeneChips	55
II.5.5.	Auslesen des GeneChips	56
II.5.6.	Auswertung einer GeneChip Hybridisierung	57
II.5.7.	Paarvergleiche von GeneChip Hybridisierungen	60
II.5.8.	Auswertung eines Kreuzvergleichs von GeneChip Hybridisierungen	63
II.5.9.	Software und Datenbanken zur funktionellen Annotation differentiell regulierter Gene	65
II.6.	Chemikalien und Materialien	66
III.	Ergebnisse und Diskussion	67
III.1.	Wachstumsparameter und phänotypische Unterschiede der klonalen Morphotypen von <i>P. aeruginosa</i> 20265 bei der Anzucht in Flüssigmedium	67
III.2.	Genomweite Transkriptanalyse zum phänotypischen Vergleich klonaler Morphotypen von <i>P. aeruginosa</i> 20265	71
III.2.1.	Kritische Evaluierung von Expressionsanalysen mit dem <i>P. aeruginosa</i> GeneChip	71
III.2.2.	Abdeckung des <i>P. aeruginosa</i> 20265 Genoms durch den <i>P. aeruginosa</i> GeneChip	78
III.2.3.	Überblick der Ergebnisse zur Genexpression im intermorphotypischen Vergleich	80
III.2.4.	Differentiell regulierte Gene der Typ III-vermittelten Proteinsekretion	82
III.2.5.	Differentiell regulierte Gene von Motilitätsapparaten	89
III.2.6.	Differentiell regulierte Gene zur Aufnahme von Eisen	95
III.2.7.	Differentiell regulierte Gene des anaeroben Wachstums und der oxidativen und antibiotischen Resistenz	103
III.3.	Mögliche Ursachen des SCV Morphotyps	112
III.3.1.	Die SCV 20265 weist keine Mutation im <i>hemB</i> -Gen zur Häm-Biosynthese auf	115
III.3.2.	Eine Mutation des <i>lpdG</i> -Gens bewirkt einen SCV 20265 ähnlichen aber nicht identischen Phänotyp	118
III.3.3.	Die Überexpression des <i>pvrR</i> -Gens führt zu einer Komplementation des SCV Phänotyps	124
IV.	Zusammenfassung	130
V.	Literaturverzeichnis	134
VI.	Anhang	156
	Lebenslauf	167
	Wissenschaftliche Publikationen	168

Abkürzungen

bidest.	zweimal destilliert	TE	Tris-EDTA
bp	Basenpaare (DNA)/Basen (RNA)	TTSS	Typ III Sekretions-System
c	Konzentration	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
°C	Grad Celsius	U	Einheit der Enzymaktivität
CDS	kodierende Sequenz	UV	Ultraviolett
CF	Cystische Fibrose	vgl.	vergleiche
<i>cfu</i>	<i>colony forming units</i>	Vol.	Volumen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	w/v	Gewichtsanteil pro Gesamtvolumen
DEPC	Diethylpyrocarbonat	WT	Wildtyp, zur SCV klonales und sequentielles Isolat, schnell wachsend
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat	Ω	Ohm
DIG	Digoxigenin		
DNase	Desoxyribonuclease		
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat		
ds	doppelsträngig		
EC	<i>Enzyme Commission</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)		
EtBr	Ethidiumbromid		
F	Farad		
h	Stunde		
K-PO ₄	Kaliumphosphat		
kb	Kilobasen(paare)		
LB	Luria-Bertani		
M	Molar		
Mb	Megabasen		
m	milli- (10 ⁻³); Meter, Masse		
mol	6.022 x 10 ²³ Teilchen		
μ	mikro- (10 ⁻⁶)		
min	Minute		
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure		
n	nano- (10 ⁻⁹)		
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat		
OD	Optische Dichte		
p	piko- (10 ⁻¹²)		
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumkonzentration		
RBS	Ribosomenbindestelle		
REV	<i>in vitro</i> aus SCV generierte Revertante		
RNase	Ribonuclease		
r	Resistenz gegen Antibiotikum		
RT	Raumtemperatur (23 °C)		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
sp.	species		
ss	einzelsträngig		
SCV	<i>small colony variant</i>		
SSC	Standard-Saline-Citrat		
REV	Revertante, aus SCV <i>in vitro</i> generierter, schnell wachsender Morphotyp		
t	Zeit		
T	Temperatur		

I. Einleitung

I.1. *Pseudomonas aeruginosa*: Taxonomie, Lebensweise, Genomvariabilität

Die Gattung *Pseudomonas* wurde von Migula 1894 zum ersten Mal beschrieben (Migula 1894). Als Pseudomonaden wurden lange Zeit alle stäbchenförmigen, polar begeißelten und Gram-negativen Bakterien zusammengefaßt. Aufgrund dieser unspezifischen morphologischen Merkmale galt die Gattung *Pseudomonas* lange Zeit als Auffangbecken für unvollständig charakterisierte Arten (Stanier *et al.* 1966). Heutzutage werden die ehemals als Pseudomonaden beschriebenen Arten mit Hilfe der polyphasischen Taxonomie (Vandamme *et al.* 1996), die neben morphologischen auch metabolische Eigenschaften und Sequenzinformation u.a. der 16S-rRNA (Woese & Fox 1977) berücksichtigt, unterschiedlichen Gattungen zugeordnet. Die heute noch im weiteren Sinne als Pseudomonaden bezeichneten Eubakterien gehören der Gruppe der Proteobakterien an. Pseudomonaden im engeren Sinne, wie zum Beispiel *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* und *P. syringae*, werden in die Untergruppe der γ -Proteobakterien eingeordnet (Anzai *et al.* 2000). Pseudomonaden betreiben eine respirative Energiegewinnung mit Sauerstoff (O₂) oder oxidierten Stickstoff-Verbindungen (NO₃⁻, NO₂⁻, NO, N₂O) als Elektronenakzeptoren (Stanier *et al.* 1966), *P. aeruginosa* vermag darüber hinaus über den Arginin-Deiminase-Weg Arginin zu fermentieren (Mercenier *et al.* 1980; van der Woude *et al.* 1984). Die Denitrifikation von Böden durch einige Arten von *Pseudomonas* trägt zur Rezyklisierung von organisch eingebundenem Stickstoff bei. Pseudomonaden leben allgemein obligat heterotroph und vermögen ein beeindruckendes Spektrum von organischen Substraten zu oxidieren. Da sie auch in der Lage sind, schwer abbaubare, meist künstlich erzeugte Kohlenwasserstoffe, sogenannte Xenobiotika umzusetzen, werden einige Pseudomonaden zur Sanierung kontaminierter Böden eingesetzt (Esteve-Nunez *et al.* 2001).

Durch die Vielseitigkeit in der Substratverwertung und das lange Überleben unter extrem nährstoffarmen Bedingungen kommen Pseudomonaden in einer Vielzahl von Boden- und Wasserhabitaten vor. Diese Anspruchslosigkeit macht sie zu einer der artenreichsten und ökologisch wichtigsten Bakteriengruppen der Erde (Spiers *et al.* 2000). Die metabolische Versatilität von Pseudomonaden schlägt sich in der Größe ihrer Genome wieder: Pseudomonaden besitzen verglichen mit anderen Bakterien eher große Genome. *P. aeruginosa*: 6,2 Mb (Stover *et al.* 2000), *P. putida*: 6,1 Mb (Nelson *et al.* 2002),

P. fluorescens: 6,6 Mb (Rainey & Bailey 1996) und *P. syringae*: 6,0 Mb (vgl. <http://www.tigr.org>).

Das Genom von *P. aeruginosa* enthält 5570 Gene, eine mit dem Genom des Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* (ca. 6200 Gene) (Ball *et al.* 2000) vergleichbare Größe. Ein weiteres Charakteristikum metabolisch vielseitiger Organismen muß die Fähigkeit sein, wechselnde Umweltbedingungen wahrzunehmen und streng reguliert darauf zu reagieren. Entsprechend ist der Anteil an Zwei-Komponenten-Systemen im Genom von *P. aeruginosa* wesentlich höher als bei den meisten bisher komplett sequenzierten Bakteriengenomen (Stover *et al.* 2000).

Innerhalb der Art *P. aeruginosa* kommt es zu einer Diversifikation durch Deletionen und Insertionen größerer DNA-Blöcke. Die Genomgröße verschiedener ausgewählter Genotypen von *P. aeruginosa* schwankt dadurch zwischen 5 Mb und 7 Mb (Schmidt *et al.* 1996). Die ursächlichen Insertionen und Deletionen von 1 bis 214 kb großen DNA-Abschnitten sind dabei nicht über das gesamte Genom verteilt, sondern konzentrieren sich in sogenannten hypervariablen Regionen (Römling *et al.* 1997). Die ausgetauschten DNA-Abschnitte bestehen meist aus mobilen Elementen, wie z.B. Plasmiden, Bakteriophagen und Integrons, die sich häufig sequenzspezifisch in tRNA-Gene integrieren (Kiewitz *et al.* 2000; Larbig 2002). Punktmutationen spielen bei der Diversifikation der Genotypen von *P. aeruginosa* eine untergeordnete Rolle. Die Sequenzdiversität ausgewählter konservierter Gene von *P. aeruginosa* beträgt nur 0,3 % und ist damit um eine Größenordnung geringer als in *E. coli* und Salmonella (Kiewitz & Tümmler 2000).

I.2. Pathogenität und Virulenzmechanismen von *Pseudomonas aeruginosa*

Die ubiquitäre Verbreitung von Pseudomonaden ist nicht nur eine Folge ihrer metabolischen Versatilität. Pseudomonaden interagieren auch mit Eukaryonten und können so ihr Spektrum an besiedelbaren ökologischen Nischen verbreitern. So lassen sich *P. fluorescens* aus der Phyllosphäre und *P. putida* aus der Rhizosphäre von Pflanzen isolieren (Lugtenberg *et al.* 2001); auch für *P. aeruginosa* konnte bereits eine Besiedlung von Pflanzen nachgewiesen werden (Green *et al.* 1974). Diese Beziehungen können wie bei *P. putida* mutualistisch sein (Lugtenberg *et al.* 2001), einige Vertreter der Pseudomonaden sind jedoch für ihre Pathogenität bekannt. *P. syringae* befällt vornehmlich Pflanzen (Hirano & Upper 2000), wohingegen *P. aeruginosa* als opportunistischer Keim mit human-, tier- und pflanzenpathogenem Potential gilt. Wirtsunabhängig verwendet *P. aeruginosa* dabei ein ähnliches Repertoire an Virulenzfaktoren (Rahme *et al.* 2000; Mahajan-Miklos *et al.* 2000). Liegt keine lokale oder systemische Schwächung des Immunsystems vor, verläuft eine Kolonisation des Menschen mit *P. aeruginosa* meist harmlos (Aebi *et al.* 2001). Es kommt jedoch zu einer folgenschweren Infektion, wenn Patienten kolonisiert werden, die an Cystischer Fibrose (CF) erkrankt sind, unter Immunsuppressiva stehen oder größere Verbrennungen erlitten haben. *P. aeruginosa* ist in Europa und Nordamerika verantwortlich für 16 % der nosokomialen Pneumonien (Wiblin 1997), 12% der im Hospital erworbenen Harnwegsinfektionen (Pollack 1995), 8 % der Wundinfektionen nach chirurgischen Eingriffen (Kluytmans 1997) und 10 % der Sepsisfälle (Gordon *et al.* 1998). Patienten, die durch eine Knochenmarkstransplantation oder ein Krebsleiden mit Neutropenie extrem immunkompromittiert sind, zeigen sich besonders anfällig gegenüber Infektionen mit opportunistischen Erregern. In dieser Gruppe von Patienten sind Pneumonien und Sepsisfälle nach Infektion mit *P. aeruginosa* für 30 % der Todesfälle verantwortlich (Fergie *et al.* 1994; Bergen & Shelhamer 1996). Auf Stationen mit Verbrennungsoptionen können Ausbrüche von Infektionen mit *P. aeruginosa* zu 60 % Mortalität führen (Richard *et al.* 1994). Bei AIDS-Patienten führt eine *P. aeruginosa* Bakteriämie in 50 % der Fälle zum Tod (Mendelson *et al.* 1994).

Eine Vielzahl von Virulenzfaktoren ist für die Pathogenität von *P. aeruginosa* verantwortlich: Lokale Läsionen von Gewebestrukturen und Zerstörung verschiedener Bestandteile der Immunabwehr werden durch unterschiedliche Proteasen wie Elastasen (LasB, LasA) und alkalische Protease sowie durch zwei Phospholipasen (Leukocidin, Phospholipase C) herbeigeführt (Suter 1994). Darüber hinaus besitzt *P. aeruginosa* neben dem akut cytotoxisch

wirkenden Protein ExoU mit ExoA, ExoS und ExoT drei Exoenzyme mit ADP-ribosylierenden Eigenschaften (Cornelis & Van Gijsegem 2000). Diese Toxine werden über drei verschiedene Wege sezerniert. Insgesamt sieben solcher Sekretionswege sind bislang für Gram-negative Bakterien beschrieben (Jacob-Dubuisson *et al.* 1993; Voulhoux *et al.* 2001; Buttner & Bonas 2002) (Abb. 1.1).

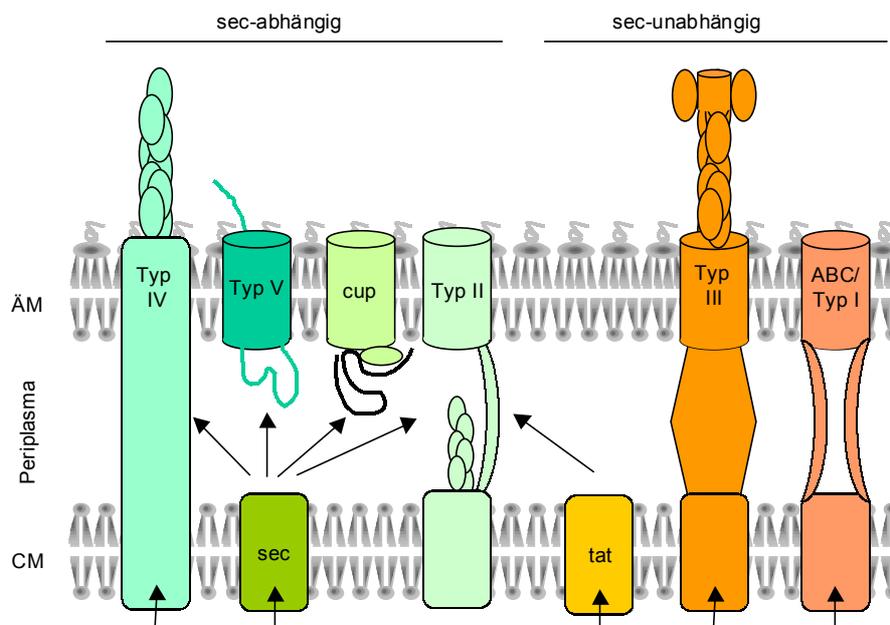


Abb. 1.1 Proteinsekretionssysteme in Gram negativen Bakterien.

Sec-abhängigen Systemen, Typ IV, Typ II, Chaperon Usher (cup) und Autotransporter/Typ V, stehen sec-unabhängige, Twin Arginin Translokase (tat), Typ III und ABC/Typ I, gegenüber. CM, Cytoplasmamembran; ÄM, äußere Membran

Alkalische Protease wird über die Typ I Sekretion (sog. ABC-Transporter) exportiert (Guzzo *et al.* 1991), während ExoU, ExoS, ExoT und die Adenylat-Cyclase ExoY, der noch keine zellschädigende Wirkung zuerkannt worden ist, über ein Typ III Sekretionssystem (TTSS) nach Kontakt direkt in die Zielzelle translociert werden (Hueck 1998; Galan & Collmer 1999; Cornelis & Van Gijsegem 2000; Buttner & Bonas 2002). Die Typ I und Typ III Apparate sind für den Transport durch die Cytoplasmamembran unabhängig vom *sec*-System, was auch für das Typ II-nutzende und bei Pflanzen weit verbreitete Twin-Arginin Translokase (tat) System zur Sekretion von Phospholipase C zutrifft (Voulhoux *et al.* 2001). Der Typ II-vermittelte Transport von Elastase und Exotoxin A (Koster *et al.* 2000) ist dagegen *sec*-abhängig, wie auch das Chaperone/Usher Sekretionssystem (Jacob-Dubuisson *et al.* 1993) zum Export von Untereinheiten zur *cup*-Pili Assemblierung (Vallet *et al.* 2001).

Typ IV (Christie 2001) und Typ V Sekretionssysteme (Autotransporter) (Henderson *et al.* 2000) wurden für *P. aeruginosa* noch nicht beschrieben und sind auch nicht durch die Genom-Sequenz von *P. aeruginosa* PAO1 kodiert (Stover *et al.* 2000).

Als weitere, sogenannte unspezifische Pathogenitätsfaktoren sind Siderophore zu erwähnen. Diese werden von *P. aeruginosa* gebildet, um mit hoher Affinität extrazellulär vorliegendes Eisen zu binden. Dadurch können selbst unter Eisenmangel, wie er u.a. im menschlichen Körper herrscht, genügend große Mengen für Respiration und Wachstum aufgenommen werden (Wandersman & Stojiljkovic 2000; Braun 2001). Die Synthese der beiden Fe (III)-Siderophore Pyoverdin und Pyochelin ist daher für den Infektionsprozess von entscheidender Bedeutung (Vasil & Ochsner 1999). An der Oberfläche von Bakterien gebundenes Eisen kann in Kombination mit dem sezernierten redox-aktiven Phenazin Pyocyanin über Fenton-Reaktionen Sauerstoff-Radikale bilden, welche direkt zellschädigend wirken (Britigan *et al.* 1992; Britigan *et al.* 1999). Pyocyanin ist für die charakteristische blau-grüne Kolonie-Färbung von *P. aeruginosa* auf bestimmten Selektivmedien verantwortlich und wirkt toxisch auf den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Mahajan-Miklos *et al.* 1999) und neutrophile Granulozyten (Usher *et al.* 2002). Neben den Rezeptoren für Pyochelin und Pyoverdin besitzt *P. aeruginosa* noch sechs weitere Rezeptoren, die vermutlich Ferrisiderophore (Fe^{3+}) von anderen Bakterien binden können (Vasil & Ochsner 1999). *P. aeruginosa* verwendet zudem die Systeme *has* und *phu*, um Häm-gebundenes Eisen in die Zelle zu transportieren (Ochsner *et al.* 2000a). Siderophor- bzw. Hämophor-Komplexe werden durch das membrandurchspannende Protein TonB vom Rezeptor in der äußeren Membran zu einem ABC-Transporter System in der inneren Bakterienmembran translociert (Poole *et al.* 1996). Diese Mechanismen zur Eisenaufnahme werden global vom negativen Regulatorprotein Fur kontrolliert (Vasil & Ochsner 1999).

I.3. *Pseudomonas aeruginosa* und Cystische Fibrose

In der Pathogenese der Cystischen Fibrose (CF) bedeuten chronische respiratorische Infektionen die schwerwiegendste Komplikation. Die CF ist die zweithäufigste autosomal-rezessive Erbkrankheit der weißen (kaukasischen) Bevölkerung. In Europa und Nordamerika erkrankt ca. eins von 2000 Kindern an CF (Aebi *et al.* 2001). Die Cystische Fibrose beruht auf einem Gendefekt im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR (Bear *et al.* 1992). CFTR ist ein Chlorid-ABC Transporter mit zusätzlichen Funktionen regulatorischer Natur (Tümmler & Kiewitz 1999). Die Abwesenheit von CFTR in der apikalen Membran von Epithelzellen bewirkt einerseits die Verringerung der Cl⁻-Sekretion und andererseits die beschleunigte Na⁺-Absorption durch die wegfallende inhibitorische Wirkung von CFTR auf den epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC) (Bear *et al.* 1992; Stutts *et al.* 1995; Knowles & Boucher 2002). Die bei der CF entstehende Deregulation des Na⁺- und Cl⁻-Haushalts bewirkt eine Verdickung epithelialer Sekrete. Eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion, Malabsorption von Nahrungsbestandteilen sowie Infertilität sind die schwerwiegendsten Folgen (Tümmler & Kiewitz 1999).

Folgendes Szenario wird für die CF-Lunge angenommen: Durch eine niedrige Konzentration von Na⁺ und Cl⁻ in der Flüssigkeit, die die Lungenoberfläche bedeckt (*airway surface liquid*, ASL) verringert sich zunächst das Flüssigkeits-Volumen derselben. Die ASL besteht aus mindestens zwei Schichten. Die sogenannte periciliäre Flüssigkeitsschicht umgibt die Cilien des Lungenepithels. Die Cilien transportieren die Mukusschicht, die hauptsächlich aus stark vernetzten, hochglykosylierten Proteinen (Mucinen) besteht und als erste Barriere und Auffangbecken für pathogene Bakterien dient. Über den Mukus werden normalerweise pathogene Bakterien, Pilze und Viren aus der Lunge transportiert und können schließlich abgehustet werden (Abb 1.2). Die während der CF auftretende Volumenabnahme des ASL führt zu einer Beeinträchtigung des Cilien-Schlages auf der apikalen Epithelienmembran und ermöglicht ein Aneinanderkleben des nun zähflüssigeren Mukus mit der zellulären Glykokalyx. So kommt der Abtransport von keimgeladenem Mukus zum Stillstand und es bilden sich dicke Mukusplaques in der Lunge (Knowles & Boucher 2002). Eine unveränderte Mucin-Sekretion bewirkt ein zusätzliches Anschwellen der Mukus-Schicht (Abb. 1.2).

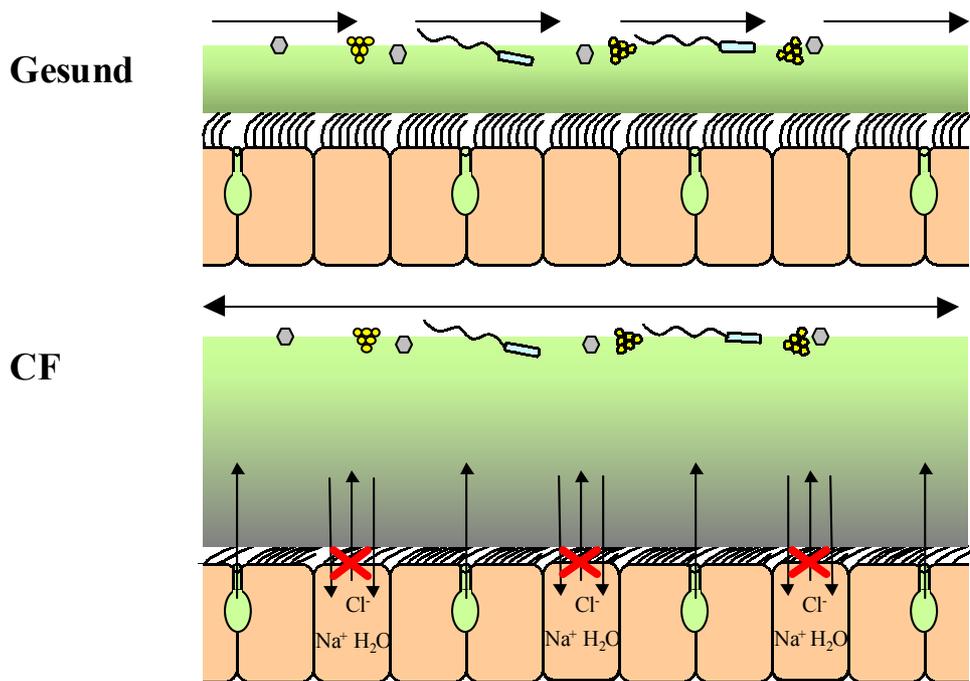


Abb. 1.2 Pathogene Veränderungen an der Lungenoberfläche bei Cystischer Fibrose (CF).

In der gesunden Lunge wird keimgeladener Mucus über ungehinderten Cilien-Schlag abtransportiert. In der CF-Lunge kommt es durch Deregulation des Ionenhaushalts zur Abnahme der die Cilien umgebenden Flüssigkeitsschicht. Der Cilienschlag wird beeinträchtigt und der Abtransport des Mucus kommt zum Erliegen. Eine unveränderte Mucinsekretion bewirkt das Anschwellen der Mukusschicht.

P. aeruginosa spielt bei der Besiedlung der CF-Lunge die infektiologisch dominante Rolle und wird daher auch als CF-Leitkeim bezeichnet (Smith *et al.* 1996; Govan & Deretic 1996; Tümmeler & Kiewitz 1999; Lyczak *et al.* 2002). Andere Pseudomonas-Spezies, sowie weitere bakterielle Erreger, wie *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, verschiedene Arten von *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes* aber auch Pilze wie *Aspergillus fumigatus* und Viren, die CF-Kranke opportunistisch befallen, erreichen nicht die Prävalenz, Persistenz und hohe Konzentration am Infektionsort, wie sie für *P. aeruginosa* beobachtet werden (Aebi *et al.* 2001). Über 80 % der CF-Patienten werden von diesem Bakterium infiziert (Hoiby 1993). CF-Patienten infizieren sich mit *P. aeruginosa* in der natürlichen Umwelt (Römling *et al.* 1994), in Sanitäreinrichtungen (Duschen, Waschbecken, Abflüsse) (Hardalo & Edberg 1997; Morais *et al.* 1997) und in Krankenhäusern, wo dieser Keim in Salben, Seifen, Spül- und Dialyseflüssigkeiten und an Geräten und Instrumenten persistiert oder von einem Patienten auf den anderen übertragen werden kann (Morrison & Wenzel 1984; Bosshammer *et al.* 1995).

Obwohl viele Hypothesen über den ursächlichen Zusammenhang der angeborene Krankheit Cystische Fibrose mit einer Lungeninfektionen durch *P. aeruginosa* vorgeschlagen wurden, existiert darum immer noch eine Kontroverse. Einige dieser Hypothesen stellen eine besondere Adärenz von *P. aeruginosa* an CF-Epithelzellen in den Vordergrund (de Bentzmann *et al.* 1996a; de Bentzmann *et al.* 1996b; Saiman & Prince 1993), eine verschlechterte Internalisierung und Abschilferung von *P. aeruginosa* enthaltenden Epithelzellen durch Abwesenheit des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR (Pier *et al.* 1996) oder eine Inaktivierung der Salz-sensiblen Defensine in der ASL (Goldman *et al.* 1997).

Eine neuere Hypothese geht von den speziellen Wachstumsbedingungen für Bakterien in der CF-Lunge aus, die besondere Anforderungen an potentiell infektiöse Bakterien stellt, um im Habitat der CF-Lunge überleben zu können. Diese sind eng mit der bei CF veränderten Zusammensetzung des ASL verknüpft, welche zunächst eine Volumenverringerng der periciliären Flüssigkeitsschicht und des Mukus bewirkt langfristig jedoch eine Volumenzunahme der Mukusschicht zur Folge hat. Durch den bei CF verstärkten ATP-getriebenen Na^+ -Import über den CFTR-regulierten ENaC ist eine Steigerung der epithelialen Atmungsrate nötig (Stutts *et al.* 1985), was zusätzlich zu der fehlenden Durchmischung des statischen Mukus mit Sauerstoff zur Ausbildung von hypooxischen Gradienten in den Mukusplaques beiträgt (Stutts *et al.* 1985; Worlitzsch *et al.* 2002). Inhalierete *P. aeruginosa* gelangen aktiv (flagelläre Motilität) und/oder passiv (Turbulenzen der Mukusoberfläche) in die Mukusmasse, bilden dort Mikrokolonien und reduzieren hier den Sauerstoffgehalt weiter (Abb. 1.3). Beim anschließenden anaeroben Wachstum verwenden sie vermutlich Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor (Hassett *et al.* 1999; Jones *et al.* 2000; Worlitzsch *et al.* 2002). *P. aeruginosa* passen sich also den veränderten Lebensbedingungen in der CF-Lunge an, indem sie die Fähigkeiten besitzen Mikrokolonien in anaeroben Mukusplaques bilden zu können (Worlitzsch *et al.* 2002). Diese Hypothese wird durch Untersuchungen an humanen Lungenpräparaten (Lam *et al.* 1980; Simel *et al.* 1984; Baltimore *et al.* 1989; Worlitzsch *et al.* 2002) sowie durch Studien an Tiermodellen (Marcus & Baker 1985; Niederman *et al.* 1983; Ramphal & Pyle 1983) unterstützt. Diese Studien wiesen eine besondere Adhärenz von *P. aeruginosa* an Mucinen nach und lokalisierten die Bakterien nicht am Epithel sondern vornehmlich im Lumen der Luftwege. Dazu passen Beobachtungen, daß *P. aeruginosa* unter niedrigen O_2 -Partialdrücken bzw. mikroaerophilen Bedingungen schneller wächst (Sabra *et al.* 2002) und anaerob besonders dicke Biofilme ausbildet

(Yoon *et al.* 2002). Es wird angenommen, daß sich die *in vivo* nachgewiesenen Mikrokolonien in Form von Biofilmen organisieren.

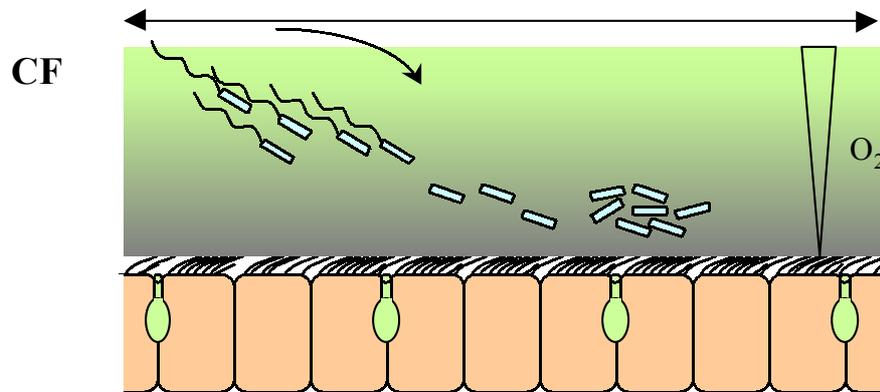


Abb. 1.3 Kolonisierung des Mukus von CF-Patienten durch *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa wandert aktiv oder passiv in den Mukus ein und bildet in tieferliegenden mikroaerophilen Bereichen Mikrokolonien bzw. Biofilme. Durch die bakterielle Zellatmung wird der Sauerstoffgehalt im Mukus weiter reduziert.

Biofilme entwickeln sich aus individuellen planktonischen Zellen in einem komplexen und wahrscheinlich streng regulierten Prozess. Diese voll entwickelte Oberflächen-gebundene Zellgemeinschaft kann eine hochorganisierte Struktur mit pilzförmigen Auswüchsen annehmen, die von einer Matrix aus Exopolysacchariden (bei *P. aeruginosa* vornehmlich Alginate) umgeben ist und wassergefüllte Kanäle zur Versorgung mit Nährstoffen aufweist (O'Toole *et al.* 2000). Biofilme schützen *P. aeruginosa* vor der Immunantwort ihres Wirts. Opsonisierende Antikörper und Phagozyten finden wenig Angriffsfläche, während lösliche Immunkomplexe eine chronische Entzündung bewirken, welche die Ausschüttung von Proteasen durch Polymorphkernige Leukozyten (PMNs) bewirken. Dies führt letztendlich zur fibrotischen Schädigung des Lungenepithels (Hoiby *et al.* 2001).

P. aeruginosa besitzt durch eine geringe Permeabilität seiner äußeren Membran eine intrinsische Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika, die durch mehrere Antibiotika Efflux Transporter zum energiegetriebenen Export von Antibiotika (Hancock 1998) und protektiv wirkenden Enzymen, wie β -Lactamasen (Lindberg & Normark 1986) noch verstärkt wird (Poole & Srikumar 2001; Putman *et al.* 2000; Stover *et al.* 2000). Biofilme vermitteln ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika (Stewart & Costerton 2001; Xu *et al.* 2000). Eine verminderte Diffusion des Antibiotikums durch die Biofilm-Matrix, eine veränderte Wachstumsrate von Zellen innerhalb von Biofilmen oder andere physiologische Veränderungen während des Wachstums

in einem Biofilm könnten dabei eine Rolle spielen (Costerton *et al.* 1999; Donlan & Costerton 2002). Die postulierte anaerobe Lebensweise von *P. aeruginosa* im Mukus der CF-Lunge könnte ein weiterer Grund für eine gesteigerte Resistenz *in vivo* sein, da eine verminderte Sauerstoff-Konzentration die Aktivität vieler antimikrobieller Wirkstoffe beeinträchtigt (Park *et al.* 1992). Die inhärente Resistenz gegen Antibiotika, die Fähigkeit Biofilme zu bilden und die anaerobe Lebensweise in der CF-Lunge sind vermutlich die Ursache dafür, daß es trotz einer durch intensive anti-pseudomonale Chemotherapie stark verbesserten Prognose für CF-Patienten noch nicht möglich ist, mit *P. aeruginosa* infizierte CF-Lungen nachhaltig zu therapieren (Hoiby 1993).

Wie bereits erwähnt, muß die Bildung von Biofilmen strengen Regulationen unterworfen sein, für die eine Art von Zell-Zell Kommunikation nötig ist. Dies erfolgt mit Hilfe von kleinen, frei diffundierbaren Signalmolekülen, sogenannte *autoinducer*. Durch stetige und bei steigender Zellzahl vermehrte Bildung häufen sich diese im extrazellulären Medium an und besitzen bei einer bestimmten Schwellenkonzentration bzw. *quorum* Signalwirkung. Dieser Vorgang wird auch als *quorum sensing* bezeichnet (Passador *et al.* 1993). *P. aeruginosa* hat zwei *quorum sensing* Schaltkreise, LasR/LasI (Passador *et al.* 1993) und RhlR/RhlI (Ochsner & Reiser 1995). LasI bildet vorwiegend den *autoinducer* N-(3-Oxododecanoyl)-Homoserinlaktone (3-O-C12-HSL) (Pearson *et al.* 1994) wohingegen RhlI N-Butanoyl-Homoserinlaktone (C4-HSL) (Pearson *et al.* 1995) synthetisiert. LasR und RhlR repräsentieren die spezifisch auf die entsprechenden Homoserinlaktone reagierenden Regulatorproteine. Neben den bereits genannten werden von *P. aeruginosa* noch weitere Homoserinlaktone synthetisiert, die jedoch eine geringere Bedeutung zu haben scheinen (Winzer & Williams 2001). Abgesehen von Homoserinlaktone werden bei *P. aeruginosa* auch zwei zyklischen Dipeptiden (Holden *et al.* 1999) und 2-Heptyl-3-Hydroxy-4-Quinolone (PQS) (Pesci *et al.* 1999) Signalfunktionen eingeräumt. Die Las bzw. Rhl *quorum sensing*-Systeme kontrollieren die Expression von Regulons teilweise überlappender Gensets, die insgesamt etwa 6 % des Genoms von *P. aeruginosa* ausmachen (Schuster *et al.* 2003; Wagner *et al.* 2003). Darunter sind eine Reihe von Virulenzfaktoren, wie Elastase, LasA Protease, Exotoxin A und Pyoverdine (van Delden & Iglewski 1998). Darüber hinaus werden gegen oxidativen Streß protektive Proteine wie Katalase und Superoxid Dismutase durch *quorum sensing* kontrolliert, sowie die Typ II-vermittelte Proteinsekretion (van Delden & Iglewski 1998). Bei der Entwicklung von Biofilmen spielt *quorum sensing* erst in späteren Reifestadien eine essentielle Rolle (Davies *et al.* 1998; de Kievit *et al.* 2001; Sauer *et al.* 2002).

I.4. Phänotypische Varianten von *Pseudomonas aeruginosa* bei Cystischer Fibrose

Die meisten CF-Patienten sind von einem oder wenigen *P. aeruginosa* Genotypen chronisch infiziert (Breitenstein *et al.* 1997), jedoch können selbst klonale Isolate unterschiedliche Kolonie-Morphologien aufweisen. Dieses Auftreten verschiedener phänotypischer Varianten bei *P. aeruginosa* wurde als „dissoziatives Verhalten“ beschrieben (Zierdt & Schmidt 1964). Bei dem Vergleich CF-assoziiierter Stämme von *P. aeruginosa* mit Umweltisolaten zeichnen sich Trends bei der Ausbildung seltener phänotypischer Eigenschaften ab:

- CF-assoziierte Isolate sind oft mukoid als Ergebnis einer Überexpression des Exopolysaccharids Alginat (Govan & Deretic 1996). Diese Überexpression läßt sich auf eine Mutation im Regulatorprotein MucB zurückführen (Govan & Deretic 1996), die durch Sauerstoff-Radikale, wie sie von PMNs während der inflammatorischen Antwort gebildet werden, induziert werden kann (Mathee *et al.* 1999).
- Sie verlieren häufig die O-spezifische Seitenketten ihres Lipopolysaccharids (R-Form), was ihre Sensitivität gegenüber Serum erhöht (Hancock *et al.* 1983). Da sich die Biosynthese-Wege des Alginats und des Lipopolysaccharids (LPS) in weiten Teilen überschneiden, liegt es nahe, daß diese einer gemeinsamen Regulation unterliegen.
- Sie sind oft nicht mehr motil, da sie keine Typ IV Pili oder Flagellen mehr besitzen (Luzar *et al.* 1985; Mahenthiralingam *et al.* 1994). Die gleiche Veränderung wird auch bei *P. aeruginosa* in einem Biofilm beobachtet (Whiteley *et al.* 2001).
- Sie zeigen eine verminderte Virulenz bei akuten respiratorischen Infektionen im Mäuse-Modell durch eine geringere Sekretion von Proteasen, Exotoxin A und Typ III sezernierter Effektorproteine (Luzar & Montie 1985; Burke *et al.* 1991; Roy-Burman *et al.* 2001).

Einige dieser Charakteristika treten nicht nur bei CF auf, sondern auch bei anderen chronischen Infektionen mit *P. aeruginosa* (Gilligan 1991; Hoiby 1994) und sind damit Ausdruck der Adaptation von *P. aeruginosa* an die chronische Besiedlung des Menschen.

Kürzlich wurde neben dem mukoiden ein weiterer Morphotyp von *P. aeruginosa* mit CF in Verbindung gebracht. Dieser Phänotyp wird aufgrund der Bildung von extrem kleinen Kolonien (1 - 3 mm Durchmesser nach 48 h Inkubation auf Columbia Blutagar bei 37 °C) als *small colony variant* (SCV) beschrieben (Abb. 1.4) (Häußler *et al.* 1999a).

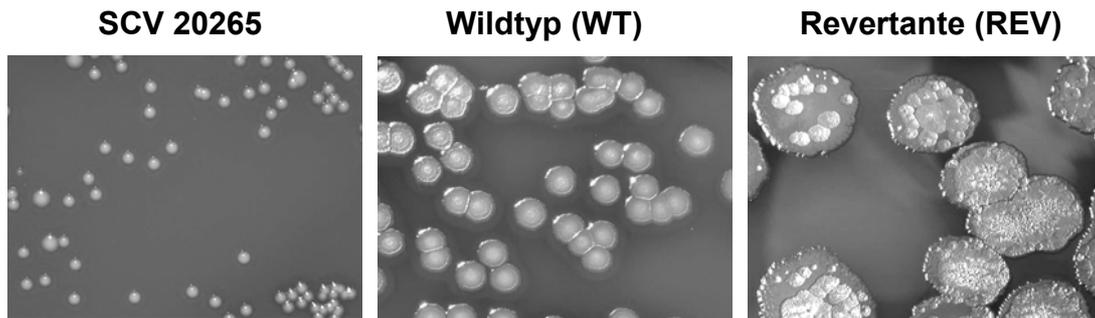


Abb. 1.4 Koloniemorphologie verschiedener klonaler Morphotypen von *P. aeruginosa* am Beispiel von 20265 SCV, ihrer in vitro generierten ‚Revertante‘ und dem Wildtyp.

Häußler *et al.* (1999) untersuchten Isolate von CF-Patienten, die in einem Zeitraum von 2 Jahren regelmäßig in der Pädiatrie und CF-Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover betreut wurden. Von diesen 86 *P. aeruginosa* positiven Patienten waren 33 mit SCVs kolonisiert. Nach seriellen Passagen in *Brain Heart Infusion* (BHI) Komplex-Medium konnten Revertanten aus den SCVs generiert werden, die große Kolonien bildeten. Der Morphotyp der SCVs ist also nicht stabil. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten keinen Unterschied zwischen SCVs und Revertanten bezüglich Zellgröße oder Morphologie feststellen. Einzelkolonien von SCVs wiesen jedoch 2,5- bis 16-fach weniger Bakterien auf als es Kolonien von Revertanten taten. Ob metabolische Beeinträchtigungen oder veränderte adhäsive Fähigkeiten ursächlich dafür sind konnte nicht geklärt werden.

Patienten mit SCVs wiesen eine stärkere Beeinträchtigung ihrer Lungenfunktion auf als Patienten ohne SCVs. Außerdem bildeten SCVs mit Reversionsfrequenzen von $< 10^{-4}$ eine 2 bis 8-fach höhere Resistenz gegenüber gebräuchlichen Antibiotika (Aminoglykoside, Quinolone, β -Lactame, Colistin) aus, die zur zur Behandlung von CF-Patienten eingesetzt werden. Der durch Antibiotikagabe verursachte selektive Druck könnte u.a. für das Entstehen von SCVs verantwortlich sein, da diese vermehrt aus Patienten isoliert wurden, die täglich das Aminoglykosid Tobramycin als antipseudomonale Aerosol-Therapie anwendeten.

Small colony Varianten sind bei *P. aeruginosa* schon länger bekannt (Bayer 1989). Ähnliche Morphotypen wurden auch bei einer Reihe weiterer bakterieller Erreger, wie *Staphylococcus aureus* (Lacey 1969; Bulger 1969), *Salmonella typhimurium* (Sasarman *et al.* 1970), *Enterobacter aerogenes* (Rusthoven *et al.* 1979), *Klebsiella pneumoniae* (Murray & Moellering 1982), *Escherichia coli* (Roggenkamp *et al.* 1998) und *Burkholderia pseudomallei* (Häußler *et al.* 1999b) beobachtet. Für die meisten dieser SCVs wird eine Einschränkung des aeroben respiratorischen Systems oder genauer der Häm Biosynthese

angenommen (Roggenkamp *et al.* 1998). Die SCVs von *S. aureus* und *E. coli* sind neben den SCVs von *P. aeruginosa* am besten charakterisiert, ihr Auftreten korreliert ebenfalls mit chronischen Infektionen (Proctor *et al.* 1995; Roggenkamp *et al.* 1998). SCVs von *E. coli* und *S. aureus* weisen eine Auxotrophie gegenüber Menadion oder Hemin auf, was in diesen Arten darauf hindeutet, daß das verlangsamte Wachstum auf eine Beeinträchtigung der Biosynthese von Menachinon und Cytochromen, beides essentielle Bestandteile der Elektronentransport-Kette, zurückzuführen ist. In der Tat zeigte eine *in vitro* Mutante des für die Häm-Biosynthese essentiellen *hemB* Gens in *S. aureus* einen SCV-Phänotyp (Von Eiff *et al.* 1997; Vaudaux *et al.* 2002), was ebenfalls für ein *hemB*-defizientes klinisches Isolat von *E. coli* der Fall war (Roggenkamp *et al.* 1998). Mutationen im *hemB* Gen verursachen also eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels und sind eine mögliche Ursache für das Auftreten von SCVs in *S. aureus* und *E. coli*.

Entsprechende metabolische Beeinträchtigungen konnten für die *P. aeruginosa* SCVs nicht gefunden werden, Häm in und Menadion im Medium konnten die Koloniegröße der SCVs nicht verändern (Häußler *et al.* 1999a). Die Entstehung von SCV-Phänotypen von *P. aeruginosa* wurde *in vitro* auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. So beschrieben Déziel *et al.* (2001) das Auftreten von SCVs bei Kultivierungen von *P. aeruginosa* 57RP in einem Biofilm. Drenkard & Ausubel (2002) erhielten SCVs, nachdem sie *P. aeruginosa* PA14 auf Kanamycin-haltigen LB-Platten kultivierten. Déziel *et al.* (2001) konnten zeigen, daß 57RP SCVs gegenüber dem Wildtyp eine Hyperpilierung der Typ IV Pili auf der Zelloberfläche aufwiesen, jedoch trotzdem eine verminderte *twitching*-Motilität besaßen. Außerdem waren die Flagellen-abhängigen Fortbewegungsarten Schwimmen und Schwärmen, sowie die allgemeine chemotaktische Orientierung der Bakterien beeinträchtigt. 57RP SCVs zeigten eine gesteigerte Fähigkeit zur Initiierung von Biofilmen, die mit einer starken Adhärenz zu abiotischen Oberflächen, erhöhter Hydrophobizität und Autoaggregation einherging. Es zeigten sich auch Unterschiede in der Sezernierung von Exoprodukten. So war der Gehalt von Pyocyanin und Pyoverdine erhöht, die Menge an Elastase im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt. Die 57RP SCVs wiesen darüber hinaus eine höhere Sensitivität gegenüber H₂O₂-Stress auf (Déziel *et al.* 2001).

Drenkard & Ausubel (2002) bestätigten die guten Biofilm-Bildungseigenschaften (Déziel *et al.* 2001) und die erhöhte Resistenz von SCVs gegen Antibiotika (Häußler *et al.* 1999a). Sie stellten fest, daß die Anzahl aus dem Wildtyp gebildeter SCVs von den *in vitro* Kulturbedingungen abhing. Daraus zogen sie den Schluß, daß das Auftreten von SCVs ein von den Umweltbedingungen induzierter Prozess sei und schlugen wie vor ihnen

auch Déziel et al. (2001) als Mechanismus eine gerichtete Phasenvariation vor. Drenkard & Ausubel (2002) identifizierten mit *pvrR* ein Gen, das *in trans* komplementiert PA14 SCVs Wildtyp-Eigenschaften verlieh. Andererseits bewirkte eine Mutagenese im Wildtyp keinen SCV-Phänotyp. Daraus ist zu schließen, daß *pvrR* vermutlich eine Rolle in der Morphotyp-Konversion spielt jedoch nicht allein verantwortlich zu sein scheint. Dieses Gen konnte in der Mehrzahl von getesteten CF- und Klinik-Isolaten sowie Standard-Laborstämmen nachgewiesen werden. In *P. aeruginosa* PAO1 konnte jedoch kein homologes Gen gefunden werden.

I.5. Expressionsanalyse mittels Proteom- und Transkriptomanalytik

Durch die Vielzahl von Genomsequenzierprojekten mit heute ca. 100 vollständig sequenzierten Pro- und 17 Eucaryonten und weit über 500 noch nicht abgeschlossenen Projekten (Stand 02/03; GOLD, *Genomes OnLine Database*, <http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/>) werden Erkenntnisse über kodierte Funktionen und die damit verbundenen potentiellen Fähigkeiten der betreffenden Organismen gesammelt. Erste Anhaltspunkte über die spezifische Funktion einzelner offener Leserahmen (*open reading frames*) werden über den *in silico* Vergleich mit bereits charakterisierten Genen bzw. Proteinen gewonnen. Darüber hinausgehende Analysen können entweder mit experimentellen Methoden der klassischen Biochemie oder mit modernen Hochdurchsatz-Verfahren der funktionellen Genomanalyse erfolgen. Letztere widmen sich dem Nachweis von tatsächlich exprimierten, also höchstwahrscheinlich funktionellen Genen (s. Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Hochdurchsatz-Verfahren zur Untersuchung bakterieller Genexpression.

Technik	Vorgehensweise	Literatur (u.a.)
<i>in vivo</i> Expressions Technologie (IVET)	Klonierung von chromosomalen DNA-Fragmenten in ein Reporterplasmid (Differentielle Fluoreszenz-Induktion, DFI, mit <i>enhanced green fluorescent protein EGFP</i> als Reporter gen)	(Mahan <i>et al.</i> 1993; Valdivia & Falkow 1997)
Transposon-Mutagenese	Genomweite Mutagenese mit stabil inserierenden Transposons zur Negativ-Selektion essentieller Gene	(Judson & Mekalanos 2000)
Subtraktive Hybridisierung (SH) und Weiterentwicklungen wie z.B. Repräsentative-Differenz-Analyse (RDA)	Subtrahierung von konstitutiv induzierten Genen durch Hybridisierung von cDNA (<i>driver</i>) mit einer Kontroll-cDNA-Bibliothek (<i>tester</i>)	(Plum & Clark-Curtiss 1994; Bowler <i>et al.</i> 1999)
<i>Differential Display</i>	PCR-Amplifikation von cDNA zu vergleichender Zellen, Elektrophorese, Reamplifikation von Produkten variierender Intensität	(Zhang & Normark 1996)
Transkriptom-Analyse mit DNA-Microarrays	Genexpressions-Analyse mit einer großen Anzahl immobilisierter Sonden (s.u.)	(de Saizieu <i>et al.</i> 1998; Richmond <i>et al.</i> 1999; Tao <i>et al.</i> 1999)
Proteom-Analyse	Proteinexpressionsanalyse mit Hilfe von 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließenden massenspektrometrischen Analysen (s.u.)	(Buchmeier & Heffron 1990; Abshire & Neidhardt 1993)

Im folgenden soll näher auf die Proteom- und Transkriptom-Analyse mit Hilfe von DNA-Microarrays eingegangen werden, da diese in der vorliegenden Studie und zuvor durchgeführten Arbeiten (Wehmhöner 2002) die zentralen Methoden bei dem Vergleich klonaler Morphotypen von *P. aeruginosa* darstellten.

Zur Erfassung des gesamten Proteinspektrums eines Organismus zu einem definierten Zeitpunkt, des Proteoms, werden vor allem die 2D-Gelelektrophorese (O'Farrell 1975) und massenspektrometrische Verfahren (Blackstock & Weir 1999; Mann *et al.* 2001) eingesetzt. Die Analytik des entsprechenden Pools an mRNA, des Trankriptoms, erfolgt hingegen vor allem mit Hilfe von DNA-Microarrays (Schena *et al.* 1995). Diese beiden Methoden haben

den Vorteil, daß eine große Anzahl von Einzelexperimenten gleichzeitig durchgeführt werden können. Mit der Hilfe der generierten Hypothesen können weiterführend gezielte Funktionsanalysen durchgeführt werden. So kann ein Organismus genomweit untersucht werden und es besteht die Möglichkeit, komplexe regulatorische Netzwerke mit einigen wenigen Experimenten aufzuklären. Die Kombination dieser Expressionsanalysen mit gezielter oder randomisierter Mutagenese einzelner Gene eines Organismus ermöglicht eine schnelle Funktionsanalyse von Genen und eine Aufklärung ihrer Bedeutung für den Organismus.

Beide Verfahren haben Vor- und Nachteile, ergänzen sich jedoch. Der Hauptvorteil der Transkriptom- gegenüber der Proteom-Analytik ist ihre Schnelligkeit. Aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften von Ribonukleinsäuren können alle exprimierten Gene gleichzeitig erfaßt werden, eine differenzierte Behandlung der verschiedenen RNA-Spezies ist nicht nötig. Die Proteom-Analyse ist vor allem durch die notwendige massenspektrometrische Analyse jedes einzelnen Proteins wesentlich zeitaufwendiger als die Transkriptom-Analytik. Darüber hinaus ist die Sensitivität der DNA-Microarray Technologie der bisher angewendeten Proteom-Analytik überlegen, da selbst die Expression einiger der gering exprimierten Regulatorgene durch Signalverstärkung nachweisbar ist. Bei der Proteom-Analyse können häufig nicht alle tatsächlich gebildeten Proteine auch detektiert werden. Dies liegt zum einen an der Hydrophobizität vieler, vor allem membranständiger Proteine, zum anderen an der nicht applizierbaren Amplifikation von Proteinen niedriger Kopienzahl (Wilkins *et al.* 1998). Der Nachteil an Transkript-Analysen ist jedoch generell, daß durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen die Menge an detektierter *messenger* RNA (mRNA) nicht immer mit der Menge an tatsächlich gebildeten Protein korreliert (Macdonald 2001). Darüber hinaus können - und dies ist besonders bei Eukaryonten der Fall - aus einem Transkript mehrere Proteine gebildet werden, die nur mittels Proteom-Analytik voneinander differenziert werden können. Somit kann eine Kombination beider Verfahren für die Aufklärung transkriptioneller und posttranskriptioneller Ereignisse sehr sinnvoll sein.

Die DNA-Microarray-gestützte Transkriptom-Analyse basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Komplementäre Nukleinsäure-Einzelstränge lagern sich dabei spezifisch über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren Purin- und Pyrimidinbasen aneinander. An definierten Positionen einer Immobilisierungsmatrix, die meist aus beschichteten Glas- oder Plastikobjektträgern oder Nylonmembranen besteht, werden Sequenzabschnitte zu untersuchender Gene, die sogenannten Sonden, abgelegt. Diese Sonden hybridisieren dann

mit fluoreszenz- oder radioaktiv-markierten Ziel-Nukleinsäuren aus den zu untersuchenden Organismen bzw. Geweben. Die im Organismus vorhandenen Ziel-Nukleinsäuren werden nach Abwaschen unspezifisch gebundener Nukleinsäuren über einen Scanner am Ort der Hybridisierung auf dem Chip identifiziert und quantifiziert. Über das Verhältnis von Signalintensitäten zweier verschiedener Hybridisierungen, die entweder auf zwei unterschiedlichen Trägern oder auf dem gleichen Träger unter Einsatz einer weiteren, differenzierbaren Markierung durchgeführt wurden, lassen sich direkte Vergleiche der Genexpressions-Niveaus anstellen.

Aufgrund der Probendichte spricht man bei DNA-Arrays auf Membranen auch von DNA-Macroarrays und bei besonders kleiner Matrix und dicht aufgetragenen Proben von DNA-Microarrays oder auch DNA-Chips. DNA-Microarrays können sich wiederum anhand der Art der immobilisierten Proben-DNA unterscheiden. Es können 500 bis 5000 Basen lange cDNAs (cDNA-Microarrays) (Schena *et al.* 1995) oder 20 bis 60 Basen lange Oligonukleotide (Oligonucleotid-Arrays) (Southern *et al.* 1992) als Sonden-DNA dienen. Die Sonden können direkt *in situ* auf dem Chip synthetisiert oder erst nach erfolgter Synthese auf dem Chip immobilisiert werden. Sind die Nukleinsäure-Spots kleiner als 250 μm spricht man auch von hochauflösenden DNA-Microarrays. Der wichtigste kommerzielle Anbieter von hochauflösenden DNA-Microarrays, die Firma Affymetrix, benutzt eine photolithographische Festphasen-Synthese, um 25mer Oligonukleotide *in situ* auf einer Glasmatrix zu synthetisieren (Fodor *et al.* 1991; Lipshutz *et al.* 1999). Photolabile Schutzgruppen auf Glassubstrat werden durch Licht, das selektiv durch eine photolithographische Maske strahlt, ortsgebunden für die *in situ* Oligosynthese aktiviert. Das Glassubstrat wird dann mit einer photolabilen DNA-Base geflutet, die an die definierten vorher beleuchteten Arraystellen bindet. Für die nächsten Positionen in den Sequenzen werden dann entsprechend andere photolithographische Masken benutzt und der Vorgang wiederholt. Für jede Base im Sonden-Oligo (pro Position) wird eine spezifische Maske benötigt. Der Vorteil ist die direkte Herstellung auf dem Chip, wodurch das mechanische Spotten entfällt. Die normierte Herstellungsweise der Affymetrix GeneChips trägt zu einer Standardisierung der Expressionsanalyse und der Ergebnisse bei. Ein anderes Verfahren, das mechanische Microspotten, ist wesentlich weniger aufwendig und kann mit kommerziell erhältlichen Robotern selbst durchgeführt werden. Dabei werden die präparierten DNA-Sonden über Kapillarkräfte durch einen Spotting-Roboter direkt auf die Trägermatrix aufgebracht. Bei einem sehr schnellen, Ink Jetting genannten Verfahren wird die DNA-Sonde über eine Art Tintenstrahldrucker-Düse piezoelektronisch auf das Substrat aufgeschossen.

DNA-Microarrays lassen sich neben der Expressionsanalyse auch für die Genomanalyse verwenden, indem zerstückelte und markierte genomische DNA hybridisiert wird, um z.B. Bakterien zu identifizieren oder Aussagen über die genetischen Übereinstimmungen verschiedener Stämme einer Bakterienart treffen zu können. Trotz der Einschränkung, daß nur Ergebnisse mit Sonden, die auf dem Chip repräsentiert sind, erhalten werden können, ist diese Art der Analyse besonders für die Diagnostik interessant. Mit speziell konstruierten DNA-Chips lassen sich auch Punktmutationen bzw. *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) und kleinere Insertionen und Deletionen nachweisen (Lipshutz *et al.* 1995; Pease *et al.* 1994).

Die ungeheuren Datenmengen, die vor allem genomweite Experimente ergeben, machen die Microarray-Technologie ohne Anwendung modernster Bioinformatik zur Detektion, Validierung und Auswertung der Signale undenkbar (Bassett *et al.* 1999; Hess *et al.* 2001). Nach der computergestützten Detektion und Validierung der Signale gibt es je nach Fragestellung verschiedene Arten der Auswertung. Paarweise Vergleiche von Expressionsniveaus aller Gene (Expressionssignaturen) einer Zellart mit einer anderen oder einer Kulturbedingung mit einer anderen, geben Aufschluß über differentiell exprimierte Gene. Um relevante, differentiell regulierte Gene einer paarweisen Expressionsanalyse zu extrahieren, müssen bestimmte Parameter anhand benutzerdefinierter Schwellenwerte abgefragt werden. Dieser Prozess des Filterns erfolgt mit Hilfe von Datenbanken.

Für eine integrative Analyse einer großen Anzahl von Daten und damit sehr komplexen Datensätzen werden Gruppierungsverfahren eingesetzt. Durch Gruppierungsverfahren können viele, multivariat beschriebene Untersuchungsobjekte in homogene Gruppen oder Cluster eingeteilt werden. Im Zusammenhang mit DNA-Microarray-Analysen können hier einerseits Zellen mit ähnlichen Expressionssignaturen und andererseits Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen (d.h. Expressionsniveaus eines Gens in verschiedenen Zellen bzw. unter verschiedenen Bedingungen) in überschaubare Gruppen aufgeteilt werden. Durch die so erreichte Reduzierung der Komplexität lassen sich große Datenmengen leichter überschauen (Wu 2001). So können anhand der Genexpression Zellen klassifiziert und Gene in einen Funktionszusammenhang gebracht werden. Auf Basis ihrer Expressionsprofile fallen in der Regel Gene unbekannter Funktion mit Genen bekannter Funktion in dieselben Cluster. So werden koexprimierte Gene zusammengefaßt, die vermutlich durch ähnliche Mechanismen reguliert werden und/oder ähnliche zelluläre Funktionen haben können (Eisen *et al.* 1998; Quackenbush 2001).

I.6. Stand der Forschung zur Charakterisierung von *P. aeruginosa* SCVs, isoliert von Patienten mit Cystischer Fibrose

Die vorliegende Arbeit baut auf der unter I.4 ausführlich beschriebenen Untersuchung klinischer SCV-Isolate aus CF-Patienten von Häußler *et al.* (1999) auf und erfolgte zeitlich überlappend mit der inzwischen abgeschlossenen Arbeit von Wehmhöner (2002) zur Proteomanalyse der SCVs 20265 und 61 und ihrer klonalen morphotypischen Varianten sowie weiteren phänotypischen Analysen von Häußler *et al.* (2003). Zur letzteren trug die vorliegende Arbeit die Expressions-Daten bei. Diesen Arbeiten sind entsprechende Diskussionsbeiträge im Kapitel Ergebnisse & Diskussion der vorliegenden Studie gewidmet. Kurz zusammenfassend konnten die Ergebnisse der Proteomanalyse von Wehmhöner (2002) zeigen, daß die SCV 20265

- eine verstärkte Proteinsekretion des Typ I (alkalische Protease AprA, AprX und Hämophore HasAp) aufweist
- eine erhöhte Typ III Proteinsekretion (Effektorproteine ExoT und ExoS, Porenproteine PopN, PcrV, PopB und PopD) zeigt
- Proteine zur Eisen-Aufnahme (u.a. Pyoverdin-Rezeptor FpvA, Pyochelin-Rezeptor FptA, Hämophore HasAp, alkalische Protease AprA) verstärkt bildet
- eine geringere Expression von Strukturproteinen des Flagellen-Apparates (Flagellen-Strukturproteine FlgK, FliD, FliC) aufweist.

In den phänotypischen Analysen von Häußler *et al.* (2003) wurde ein Pool von 12 Triplets aus klinischen Isolaten klonaler SCVs und Wildtypen und ihrer entsprechenden *in vitro* generierten Revertanten untersucht. Sechs SCVs zeigten ein starkes autoaggregatives Verhalten und unterschieden sich darin auch von den jeweiligen klonalen Wildtypen und Revertanten. Ausgehend von dieser Subgruppe wurden weitere Tests unternommen. Die wichtigsten Ergebnisse werden im folgenden zusammengefaßt:

- Alle SCVs zeigten eine stärkere Biofilm Bildung in Polystyren-Mikrotiterplatten als der Wildtyp, die Revertanten zeigten einen intermediären Phänotyp.
- Vier der sechs SCVs zeigten eine stärkere Assoziation mit der humanen Pneumozysten Zell-Linie A549 (ATCC CCL-185) als ihre Wildtypen.

- Alle SCVs zeigten eine höhere Hydrophobizität und 5 wiesen nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen mehr Pili auf als der Wildtyp (vgl. [Deziel *et al.* 2001]). Die Revertanten waren durch eine noch größere Anzahl an Pili gekennzeichnet. Mit Hilfe von Northern Hybridisierungen mit *P. aeruginosa* 20265 konnte eine differentielle Regulation von *pilA*, dem Typ IV Pilin Strukturprotein, nachgewiesen werden (vgl. Ergebnisse & Diskussion III.2.5).
- Alle SCVs zeigten ein gegenüber dem Wildtyp und der Revertante beeinträchtigtes Schwimmverhalten. Die Bewegung durch Pili-vermitteltes *twitching* korrespondierte mit der differentiellen Expression der Typ IV Pili, die SCVs bewegten sich schneller als die Wildtypen, die Revertanten zeigten die stärkste *twitching*-Motilität.
- Die SCVs wiesen bei Kokultivierungsexperimenten mit ihren Wildtypen in LB-Medium in der exponentiellen Phase ein geringeres Wachstum, in der stationären Phase jedoch eine höhere Überlebensrate auf (vgl. Ergebnisse & Diskussion III.1). In LB-Medium zeigten die SCVs wesentlich geringere autoaggregative Tendenzen als im sonst verwendeten Vogel-Bonner Minimalmedium.

I.7. Zielsetzung

In der vorliegenden Studie sollte mittels DNA-Microarray-Analysen das Transkriptom unterschiedlicher Morphotypen sequentieller klonaler *Pseudomonas aeruginosa* Isolate miteinander verglichen werden. Ein solcher genomweiter Transkriptom-Vergleich bietet die Möglichkeit, Hypothesen über die mikroevolutionären Adaptationen von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge zu generieren, um die Bedeutung von *small colony variants* (SCVs) für die persistente Besiedlung mit *P. aeruginosa* bei CF zu erhellen. Als Modellorganismus diente die aus einem chronisch mit *P. aeruginosa* infizierten CF-Patienten isolierte, autoaggregative SCV 20265. Diese sollte mit einem großwachsenden klonalen Morphotyp, der als Wildtyp bezeichnet wurde, sowie einer *in vitro* aus der SCV 20265 generierten Revertante verglichen werden. Dazu wurden genomweite Transkriptionssignaturen dieser klonalen Morphotypen nach Wachstum unter Standard-Laborbedingungen verwendet.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin, Anhaltspunkte zu den molekularen Ursachen der morphotypischen Konversion zu finden. Dazu sollte eine kleinwachsenden Mutante, die durch ungerichtete Tn5-Mutagenese aus dem großwachsenden Wildtyp der SCV 20265 erzeugt worden war, transkriptionell analysiert werden. Darüber hinaus sollten einzelne Gene, die in früheren Studien ursächlich mit der kleinen Kolonieform von SCVs in Zusammenhang gebracht worden waren, auf ihre Relevanz bei aus CF-Patienten isolierten *P. aeruginosa* SCVs untersucht werden.

II. Material und Methoden

II.1. Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* sowie die bereits vorhandenen und neukonstruierten Plasmide sind unter Nennung ihrer relevanten phäno- oder genotypischen Eigenschaften sowie ihrer Herkunft tabellarisch aufgelistet (Tab. 2.1 und Tab. 2.2). Die untersuchten *small colony variants* (SCVs) sowie ihre klonale Wildtypen wurden als sequentielle Isolate aus dem Respirationstrakt (meist Sputum) chronisch infizierter CF-Patienten isoliert. Dabei entstammen die als Wildtypen definierten Isolate aus älteren Proben als die SCVs. Die infizierten CF-Patienten wurden über Jahre hinweg regelmäßig in der Pädiatrischen Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) untersucht. Alle verwendeten SCV Morphotypen entstammen ausschließlich der Studie von Häußler *et al.* (1999a). Die Identifizierung der Spezies *P. aeruginosa* erfolgte im Institut für Medizinischen Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der MHH sowohl durch Beurteilung der Kolonie-Morphologie als auch durch die Fähigkeit von *P. aeruginosa* zum Wachstum bei 42 °C und der Produktion charakteristischer Pigmente bei der Kultivierung auf Columbia-Blutagar Festmedien. Außerdem dienten physiologisch-biochemische Charakteristika, die anhand des Metabolismusprofils im APILAB-System (API 20 NE, bioMérieux) charakterisiert wurden, zur Systematisierung. Die klonale Identität sequentieller Isolate wurde über Genotypisierung mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen nach Pulsfeld-Gelelektrophorese von *SpeI* geschnittener genomischer DNA überprüft.

Tab. 2.1 Verwendete Stämme von *Pseudomonas aeruginosa*

Stamm	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
PAO1 (DSM1707)	Referenzstamm, Wundisolat	(Holloway 1955)
PA14	Referenzstamm, klinisches Isolat	(Rahme <i>et al.</i> 1995)
20265 SCV	SCV, Klon G, hyperpilisiert, autoaggregativ	(Häußler <i>et al.</i> 1999a) (Häußler <i>et al.</i> 2003)
WT (20265)	schnell wachsender WT, klonal identisch mit 20265 SCV	(Häußler <i>et al.</i> 2003)
REV (20265)	schnell wachsend, <i>in vitro</i> generiert aus 20265 SCV Population	(Häußler <i>et al.</i> 1999a) (Häußler <i>et al.</i> 2003)
20265 SCV <i>exsA</i>	Insertionsmutation in <i>exsA</i> , Gm ^f	I. Attree (für diese Studie)

Tab. 2.1 Verwendete Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* (Fortsetzung)

Stamm	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
WT (20265) 25/C1	Tn5 Insertionsmutante der Lipoamid-Dehydrogenase <i>lpdG</i> , klein wachsend, Gm ^r	V. Wild, F. Bredenbruch, S. Häußler
10 SCV	SCV, hyperpiliert, autoaggregativ	(Häußler <i>et al.</i> 1999a) (Häußler <i>et al.</i> 2003)
WT (10)	schnell wachsender WT, klonal identisch mit 10 SCV	(Häußler <i>et al.</i> 2003)
REV (10)	schnell wachsend, <i>in vitro</i> generiert aus SCV 10 Population	(Häußler <i>et al.</i> 1999a) (Häußler <i>et al.</i> 2003)
29 SCV	SCV, hyperpiliert, autoaggregativ	(Häußler <i>et al.</i> 1999a) (Häußler <i>et al.</i> 2003)
WT (29)	schnell wachsender WT, klonal identisch mit 29 SCV	(Häußler <i>et al.</i> 2003)
REV (29)	schnell wachsend, <i>in vitro</i> generiert aus SCV 29 Population	(Häußler <i>et al.</i> 1999a) (Häußler <i>et al.</i> 2003)
33 SCV	SCV	(Häußler <i>et al.</i> 1999a)
WT (33)	schnell wachsender WT, klonal identisch mit 33 SCV	S. Häußler
REV (33)	schnell wachsend, <i>in vitro</i> generiert aus SCV 33 Population	(Häußler <i>et al.</i> 1999a)

Bezeichnung der Phänotypen: WT, Wildtyp; SCV, *small colony variant*; REV, Revertante; Gm^r, Gentamycinresistenz

Tab. 2.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
pBBR1MCS-3	<i>broad host range</i> , <i>mob</i> , <i>lacZ</i> α -polylinker, Tet ^r	(Kovach <i>et al.</i> 1995; Kovach <i>et al.</i> 1994)
pHemB	pBBR1MCS-3:: <i>hemB</i> 1359 bp <i>hemB</i> <i>SpeI/XbaI</i> -PCR-Fragment aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Tet ^r	Diese Arbeit
pED202	pUCP19:: <i>pvrR</i> ca. 3,5 kb <i>PstI</i> Fragment aus <i>P. aeruginosa</i> PA14, Cb ^r	(Drenkard & Ausubel 2002)

Bezeichnung der Phänotypen: Tet^r, Tetracyclinresistenz; Cb^r, Carbenicillinresistenz; *mob*, mobilisierbar, wenn RK2 Transfer-Funktionen *in trans* bereitgestellt werden

II.2. Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa*

II.2.1. Nährmedien

Die Anzucht der Stämme von *P. aeruginosa* fand entweder in Mineral- oder in Komplexmedium statt. Zur Herstellung fester Nährböden wurde vor dem Autoklavieren Agar in einer Konzentration von 1,5 % (w/v) zugegeben.

II.2.1.1. Vogel-Bonner Minimalmedium

Als Standardmedium wurde Vogel-Bonner Minimalmedium verwendet (Vogel & Bonner 1956). Es wurden verschiedene Stammlösungen angesetzt und nach Bedarf durch Vermischen gebrauchsfertiges Medium hergestellt.

10 x Puffer

10,5 g Citrat x H₂O
29,3 g NaNH₅PO₄ x 4 H₂O
42,2 g K₂HPO₄ x 3 H₂O
ad 500 ml Wasser bidest., pH 7,2

5 x Gluconat-Lösung

62,5 g Kalium- D- Gluconat
ad 250 ml Wasser bidest., steril
filtriert

50 x Magnesiumsulfat-Lösung

4,1 g MgSO₄ x 7 H₂O
ad 100 ml Wasser bidest.

Die Pufferstammlösung und die Magnesiumsulfat-Lösung wurden autoklaviert, die Gluconat-Lösung sterilfiltriert. Gebrauchsfertiges Vogel-Bonner Minimalmedium wurde durch Vermischung der Stammlösungen entsprechend ihrer Konzentrationen angesetzt, mit Wasser bidest. aufgefüllt und bei 4 °C aufbewahrt.

II.2.1.2. Luria Bertani Komplexmedium

Als Komplexmedium für Standard-Anzuchten von *P. aeruginosa* wurde LB-Medium (Sambrook *et al.* 1989) verwendet.

Luria-Bertani Medium (LB)

10 g Bacto-Pepton 140 (Gibco BRL)
5 g Hefeextrakt (Gibco BRL)
5 g NaCl
Wasser bidest. ad 1000 ml; pH 7,0

II.2.1.3. Columbia Blut-Agar (Becton Dickinson)

Dieser Komplexagar wird in der klinischen Bakteriologie als Standard-Agar verwendet und wurde in dieser Arbeit alternativ zu LB-Agar verwendet.

II.2.1.4. King's A und King's B Medium (King *et al.* 1954)

Zur Verstärkung der Pyocyanin-Produktion und Inhibierung der Pyoverdin-Produktion wurde *P. aeruginosa* in King Medium A angezogen. Die verstärkte Pyoverdin-Bildung und Inhibition der Pyocyanin-Produktion wurde durch Kultivierung in King Medium B erreicht.

<u>King A</u>		<u>King B</u>	
20,0 g	Bacto-Pepton 140 (Gibco BRL)	20,0 g	Bacto-Pepton 140 (Gibco BRL)
20,0 g	KOH	1,6 g	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O
5,5 ml	H ₂ SO ₄	3,0 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
3,3 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,0 g	Glycerin
10,0 g	Glycerin		Wasser bidest. ad 1000 ml; pH 7,2
	Wasser bidest. ad 1000 ml; pH 7,2		

II.2.1.5. Zusatz von Antibiotika

Zur Selektion auf Antibiotika-Resistenzen, die in mutagenisierten Stämmen oder auf Plasmiden enthalten waren, wurde Tetrazyklin in 50 % (w/v) Ethanol, Carbenicillin und Gentamycin in Wasser gelöst, autoklaviert und max. 55 °C warmem Medium zugegeben. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

	Stammlösung	Endkonzentration	Selektion auf
Gentamycin (Fluka)	100 µg/ml	100 ng/ml	SCV 20265 <i>exsA</i> WT (20265) <i>lpdG</i>
Tetrazyklin (Fluka)	15 µg/ml	100 ng/ml	pHemB
Carbenicillin (Serva)	30 µg/ml	300 ng/ml	pED202

II.2.2. Kulturbedingungen

II.2.2.1. Anzucht von Kulturen

Vorkulturen von 5 ml wurden in Capsenberg-Reagenzgläsern mit Bakterien von Agar-Platten inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm in einem Schüttelinkubator (New Brunswick Gyrotory Shaker) inkubiert. Die Hauptkulturen für RNA-Präparationen wurden mit Zellen der Vorkultur auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Die Anzucht der Hauptkulturen erfolgte in 100 ml Capsenberg-Erlenmeyerkolben bei einer Befüllung mit 20 ml Vogel-Bonner Medium. Die Hauptkulturen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkulturen inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,8 (logarithmische Wachstumsphase) bzw. nach 27 h (stationäre Phase) geerntet. Die SCV 20265 und der entsprechende Wildtyp haben eine Verdopplungszeit von ca. 1,5 h in Vogel-Bonner Minimal-Medium, während sich die Revertante von SCV 20265 etwa jede Stunde teilt (vgl. Ergebnisse & Diskussion III.1).

II.2.2.2. Bestimmung der Zelldichte

Das Wachstum der Kulturen wurde routinemäßig anhand der optischen Dichte (OD) bestimmt. Die Messung erfolgte in einem Spektralfotometer (Hitachi U-3000) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Zellsuspensionen wurden dabei so verdünnt, daß bei der anschließenden Messung eine OD₆₀₀ von 0,4 nicht überschritten wurde. Die oft bei stationären Kulturen auftretende intensive neongelbe Färbung bewirkte dabei nur einen geringen Fehler. Für Wachstumskurven wurden zusätzlich Proteinkonzentrationen (s. II.2.4) und eine Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt. Dazu wurden 50 µl Bakteriensuspension seriell in Lösung A oder 0,9 % (w/v) Saline verdünnt und 100 µl der verdünnten Suspension auf LB Agar-Platten ausplattiert. Die Anzahl der Kolonien auf den Platten wurde zum ausplattierten Volumen und zum Verdünnungsgrad ins Verhältnis gesetzt und die Lebendkeimzahl pro ml Ursprungssuspension bestimmt.

Lösung A

9,0 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O

1,5 g KH₂PO₄

Wasser bidest. ad 1000 ml, pH 7,0

II.2.2.3. Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Ständig benötigte Stämme wurden auf Agarplatten gehalten und konnten bis zu 2 Wochen bei 4 °C gelagert werden. Zur Dauerkonservierung wurden Glycerin-Suspensionen hergestellt (Ausubel *et al.* 1988; Sambrook *et al.* 1989). Dazu wurden in einem sterilen 2 ml-Schraubdeckelröhrchen 560 µl 40 % (w/v) Glycerin in LB-Medium mit 940 µl einer frisch gewachsenen Kultur gemischt und bei -70 °C aufbewahrt. Vorkulturen wurden aus der angetauten Stammkultur mit einer Impföse inokuliert. Die Reinheit der Kulturen wurde durch Ausstrich auf Komplexnährböden (Koloniemorphologie und Geruch) und gegebenenfalls Selektivagar (Antibiotika-Resistenzen) überprüft.

II.2.2.4. Zellernte

Zellen aus kleineren Kulturvolumina von bis zu 1,5 ml wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf-Zentrifuge 5415C) bei RT und 6000 g für 10 min pelletiert und in Lösung A (s. II.2.2.2.2) gewaschen. Bei größeren Volumina erfolgte die Ernte in einer gekühlten Zentrifuge (Sorvall RC5B Plus) in 50 ml-Pyrexröhrchen (15 min, 6000 g, 4 °C). Die Flüssigkeit über dem Zellpellet wurde anschließend vollständig abgenommen und die Zellen wurden, falls sie nicht sofort Verwendung fanden, bei -20 °C eingefroren. Zur RNA-Präparation wurden die Zellen in 14 bzw. 50 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt) für 3 min bei 3200 g, 4 °C zentrifugiert (Hettich Universal). Diese kurze Zeit reichte nicht aus, um alle Zellen zu pellettieren, doch war es hier entscheidender, kurze Zentrifugationszeiten einzuhalten. Zellen für die RNA-Präparation wurden immer sofort weiterverarbeitet und dazu kurz in Wasser bidest. resuspendiert.

II.2.3. Bestimmung von Pyocyanin und Pyoverdin in Zellüberständen

Die Produktion von Pyocyanin und Pyoverdin verschiedener Stämme und klonaler Morphotypen von *P. aeruginosa* wurde nach Wachstum in King's Medium A bzw. B quantitativ erfaßt. Dazu wurden die Zellen wie in Abschnitt II.2.2.1. beschrieben in das jeweilige Selektiv-Medium inokuliert. Nach definierten Kultivierungszeiten von 5, 23 und 45 h (mittlere log-Phase, frühe stationäre Phase, späte stationäre Phase) wurden Proben von 2 ml entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert. Die Messungen fanden in 96 *well* Mikrotiter-Platten statt. Für den Pyocyanin-Nachweis wurde die optische Dichte der Zellüberstände bei

695 nm gemessen (Titertek Multiskan MCC-340). Der Nachweis von Pyoverdin erfolgte durch Fluoreszenz-Messung des Überstandes bei 460 nm nach Anregung durch Licht der Wellenlänge 355 nm (Titertek Fluoroskan II). Eine Verdünnungsreihe mit Pyocyanin-haltigen Zellüberständen ergab eine lineare Beziehung zwischen Pyocyanin-Menge und gemessener OD bei 600 nm über einen weiten Konzentrationsbereich. Die Pyoverdin-Menge zeigte eine nicht lineare Beziehung zur gemessenen Fluoreszenz, so daß Pyoverdin-haltige Zellüberstände jeweils soweit verdünnt werden mußten bis ihre Fluoreszenz-Entwicklung in einen quasi-linearen Bereich fielen und damit untereinander vergleichbar waren.

II.2.4. Proteinbestimmung von Zellsuspensionen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Zellsuspensionen wurde eine Bradford-Proteinbestimmung (Bradford 1976) nach vorheriger NaOH-Lyse der Zellen (Schmidt *et al.* 1963); modifiziert) durchgeführt. Je nach Wachstumsphase wurden 1 – 2 ml Zellsuspension geerntet, mit 1 bzw. 0,25 ml 2 M NaOH versetzt, gut gemischt und 1 h bei 80 °C im Wasserbad inkubiert. Die lysierten Zellen wurden anschließend 2 min auf Eis gestellt und danach gründlich resuspendiert. Da die Proteinbestimmung nach Bradford in alkalischem Medium fehlerhaft ist (Ausubel *et al.* 1988) wurden die Zelllysate mit einem 40-fach größeren Volumen an Bradford-Reagenz versetzt. So wurden im 96-well Mikrotitermaßstab 5 µl Zelllysate mit 200 µl Bradford-Reagenz und zur Messung in Plastik-Meßküvetten 50 µl mit 2 ml Bradford-Reagenz gemischt. Nach 40 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm gegen das Bradford-Reagenz gemessen (Titertek Multiskan MCC-340 bzw. Hitach U-3000 Spektrophotometer). Als Referenz wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0 – 4 µg erstellt, deren Proben entsprechend der Bakteriensuspensionen behandelt wurden. Zelllysate von *P. aeruginosa* wies bei einer OD₆₀₀ von 1 eine Proteinkonzentration von etwa 50 µg/ml auf.

Bradford-Reagenz

70 mg Serva Blau G 250
50 ml 96 % (w/v) Ethanol
100 ml 85 % (w/v) H₃PO₄
Wasser bidest. ad 1000 ml

Nach dem Ansetzen wurde die Lösung zunächst 24 h stehen gelassen, dann filtriert und in einer Braunglasflasche aufbewahrt.

II.3. RNA-Arbeitstechniken

II.3.1. Vorbehandlung von Lösungen und Geräten

Kontaminierende RNasen in Lösungen und an Geräten wurden, soweit dies möglich war, durch Autoklavieren für 60 min bei 121 °C inaktiviert. Hitzelabile Geräte wurden mit sterilem bidest. Wasser abgewischt und anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol oberflächensterilisiert. Metallgeräte, wie Scheren, Skalpelle und Pinzetten wurden in 70 % (v/v) Ethanol getaucht und anschließend abgeflammt. Geräte für RNase freies Arbeiten wurden 5 h bei 250 °C gebacken. Hitzelabile Substanzen wurden in autoklaviertem Wasser bidest. bzw. Puffer gelöst und sterilfiltriert. Lösungen, die RNase-frei sein mußten, wurden mit 0,05 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, geschüttelt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert. Tris- bzw. acetat-haltige Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser bidest. angesetzt. RNase freie Gelkammern wurden 10 min in 3 % (v/v) H₂O₂ eingeweicht und mit 70 % (v/v) Ethanol gespült.

II.3.2. Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA erfolgte die Anzucht der Zellen in 20 ml Vogel-Bonner Mineralmedium (s. II.2.1.1) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 (logarithmisches Wachstum) bzw. für 27 h bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 3,0 (stationäre Phase). Die Schritte während der Lysis erfolgten extrem zügig, damit der Expressionsstatus der Bakterien erhalten blieb. Alle Schritte bis zur RNeasy Aufreinigung wurden auf Eis unter dem Abzug durchgeführt. Die hier verwendete Methode zur RNA-Isolierung basiert auf einem Protokoll von Tong et al. (1996), welches nach Oelmüller et al. (1990) verbessert wurde.

Dazu wurden 12 ml bzw. 3 ml frische Zellsuspension einer exponentiell bzw. stationär gewachsenen Bakterienkultur (ca. $9,6 \times 10^9$ Zellen) in 14 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt) geerntet. Anschließend wurden diese in 0,5 ml Wasser bidest. resuspendiert und sofort mit 7,5 ml einer auf 65 °C temperierten Lysis-Lösung (2,5 ml Lysis-Puffer, 5 ml Phenol [pH 5,5]) versetzt und 10 min stark geschüttelt. Durch das in der Lösung enthaltene heiße Phenol wurden bei der Lysis freigesetzte zelluläre RNasen sofort denaturiert (Oelmüller *et al.* 1990). Nach 5 min Inkubieren auf Eis wurden die Röhrchen 20 min bei 3500 g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und direkt in 3 ml Phenol/CHCl₃/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben, 5 min geschüttelt, 5 min ruhig auf Eis inkubiert und 10 min bei 3500 g und 4 °C zentrifugiert. Erneut wurde die wässrige Phase

abgenommen und direkt in 3 ml CHCl₃/Isoamylalkohol (24:1) gegeben, 2 min geschüttelt, 2 min ruhig auf Eis inkubiert und 10 min bei 3500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,5) und 2,5 Vol. 99 % (v/v) Ethanol (-20 °C temperiert) gegeben und langsam geschwenkt, so daß eine Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgte. Zur vollständigen Fällung geringer Mengen an Nukleinsäuren wurde der Ansatz über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 3500 g und 4 °C wurde das Pellet einmal in 5 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 15 min bei 3500 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit der Pipettenspitze angesaugt und in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 10 min Zentrifugation in einer gekühlten Tischzentrifuge (Eppendorf 5417R) wurden Ethanolreste soweit wie möglich entfernt. Das proteinfreie Pellet wurde unter ständigen Auf- und Abpipettieren mit anschließender 5-minütiger Inkubation auf Eis in 174,2 µl Wasser bidest. gelöst. Dann wurden 20 µl DNase-Puffer, 4,8 µl RNase-freie DNase (10 U/µl, also 5 U pro 1 x 10⁹ Zellen; Roche) und 1 µl RNasin oder SUPERaseIn (Promega bzw. Ambion) hinzugegeben. In 30 min bei 37 °C wurde die enthaltene DNA verdaut. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über RNeasy-Säulen (Qiagen) nach Handbuch aufgereinigt. Die Säulen haben laut Hersteller eine maximale Kapazität von 100 µg und dienen zur Aufreinigung von Transkripten von über 200 bp (nicht 5S rRNA und tRNAs). Die nachfolgenden Pipettierschritte konnten bei RT durchgeführt werden, alle Zentrifugationen fanden weiterhin bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge statt, es wurde so schnell wie möglich gearbeitet. In 200 µl RNA-Lösung wurden 700 µl RLT-Puffer (mit 10 % [v/v] β-Mercaptoethanol) und 500 µl 96 % (v/v) Ethanol eingemischt. Diese Mischung wurde in 2 Schritten à 700 µl auf eine Säule transferiert und jeweils 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein frisches Auffang-Röhrchen gesteckt und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer durch Zentrifugation für 15 s bzw. 2 min bei 8000 g gewaschen. In der Folge wurde die Säule in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und die gebundene RNA durch zweimalige 5 minütige Inkubation mit 30 µl Wasser bidest. bei 4 °C und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 8000 g von der Säule eluiert. Von 60 µl Eluat wurden 2 µl 1:50 mit Wasser verdünnt. Die RNA-Konzentration dieser Lösung wurde mittels UV-Absorption bestimmt (s. II.3.3). Zur Abschätzung der RNA-Qualität wurden 2 µl des Eluats auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel geladen.

Lysis-Puffer

2 %	SDS
3 mM	Na-Acetat, pH 5,5
0,1 % (w/v)	EDTA

DNase-Puffer (10 x)

500 mM	Na-Acetat, pH 6,5
100 mM	MgCl ₂
20 mM	CaCl ₂

II.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde fotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen Wasser bidest. bestimmt. Dabei wurden einer OD₂₆₀ von 1,0 in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen folgende Konzentrationen zugeordnet (Ausubel *et al.* 1988; Sambrook *et al.* 1989):

doppelsträngige DNA:	50 µg/ml
einzelsträngige DNA:	33 µg/ml
RNA:	40 µg/ml

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde außerdem die Absorption bei 280 nm ermittelt. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ liegt für reine DNA bei ca. 1,8 und für reine RNA bei ca. 2,0. Enthält die Nukleinsäurelösung Proteinverunreinigungen, äußern sich diese in niedrigeren OD₂₆₀/OD₂₈₀ Werten. Phenolverunreinigungen führen zu erhöhten Konzentrations-Werten, Ethanol-Spuren erniedrigen die gemessene Konzentration. Alternativ wurde die Konzentration geringer Nukleinsäuremengen mittels Vergleich von Fluoreszenzintensitäten nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel und Anfärbung mit Ethidiumbromid (s. II.4.5) abgeschätzt. Dazu wurde ein Standard bekannter Konzentration auf dem Gel mitgeführt.

II.3.4. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Nur vollständig denaturierte RNA läßt sich in Abhängigkeit von ihrer Länge elektrophoretisch auftrennen. Damit der denaturierte Zustand während der Elektrophorese erhalten bleibt werden Auftragspuffer und Gellösung mit Formaldehyd versetzt (Ausubel *et al.* 1988; modifiziert). Zur Kontrolle der RNA-Präparationen wurde die Elektrophorese in Mini-Gelkammern durchgeführt (5 x 7 cm, Gelvolumen 40 ml). Sollte die RNA anschließend auf eine Nylonmembran zwecks Hybridisierung übertragen werden (s. II.3.5), wurden große Blot-Gelkammern verwendet, die ein Probenvolumen von 15 x 65 µl zuließen (18 x 11 cm, Gelvolumen 220 ml). Die Kammern wurden jeweils mit 3 % (w/v) H₂O₂ und 70 % (w/v) Ethanol gereinigt. Die Agarose-Konzentration lag bei 1,2 % (w/v), als Elektrophoresepuffer wurde MOPS-Puffer eingesetzt. MOPS besitzt im Gegensatz zu Tris keine primäre Aminogruppen, die mit DEPC reagieren. Für Minigele wurde normale Agarose verwendet, für Blot-Gele wurde ausschließlich RNase freie Agarose (SeaKemGTG, Biozym) benutzt, die zunächst in 1 x MOPS-Puffer autoklaviert wurde. Die Agarose wurde in der Mikrowelle

aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 2,4 ml für Minigele bzw. 13,3 ml 37 % (w/v) Formaldehyd (0,7 M Endkonzentration) hinzugegeben.

Probenvorbereitung für die Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA

Mini-Gel	Blot-Gel	
2 µl	10 µg	RNA
1 µl	5 µl	MOPS-Puffer (10 x)
2 µl	10 µl	Formaldehyd (37 % (w/v))
5 µl	25 µl	Formamid
2 µl	9,5 µl	RNA-Auftragspuffer
	x µl	Wasser bidest.
	0,5 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
12 µl	60 µl	

Die RNA-Proben wurden anschließend 10 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und anzentrifugiert. Ebenso wurde mit dem RNA-Längenstandard (0,16 – 1,77 kb RNA-Leiter [Invitrogen]; s. II.4.5, Tab. 2.4) verfahren, von dem 5 µg auf Blot-Gele aufgetragen wurde. Blot-Gele wurden vor dem Auftragen der Proben einer Vorelektrophorese unterzogen (5 min, 60 V). Die Auftrennung erfolgte aufgrund des leicht flüchtigen und toxischen Formaldehyds unter einem Abzug. Die Feldstärke betrug dabei für Minigele konstant 5 V / cm (Laufzeit ca. 1 h) und für Blot-Gele 3 V / cm (Laufzeit ca. 5 h). Die Minigele wurden anschließend 15 min mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt, mindestens 2 x 15 min entfärbt und anschließend fotografiert. Die Elektrophorese der Blot-Gele wurde gestoppt, wenn die Lauffront des im Auftragspuffers enthaltenen Bromphenolblaus etwa zwei Drittel des Gels durchlaufen hatte. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht mit einem fluoreszierenden Lineal als Laufstreckenmaßstab fotografiert (Abb. 2.1).

10 x MOPS-Puffer

200 mM MOPS, pH 7,0
100 mM Na-Acetat
10 mM EDTA

RNA-Auftragspuffer

50 % (w/v) Glycerin
1 mM EDTA, pH 6,0
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

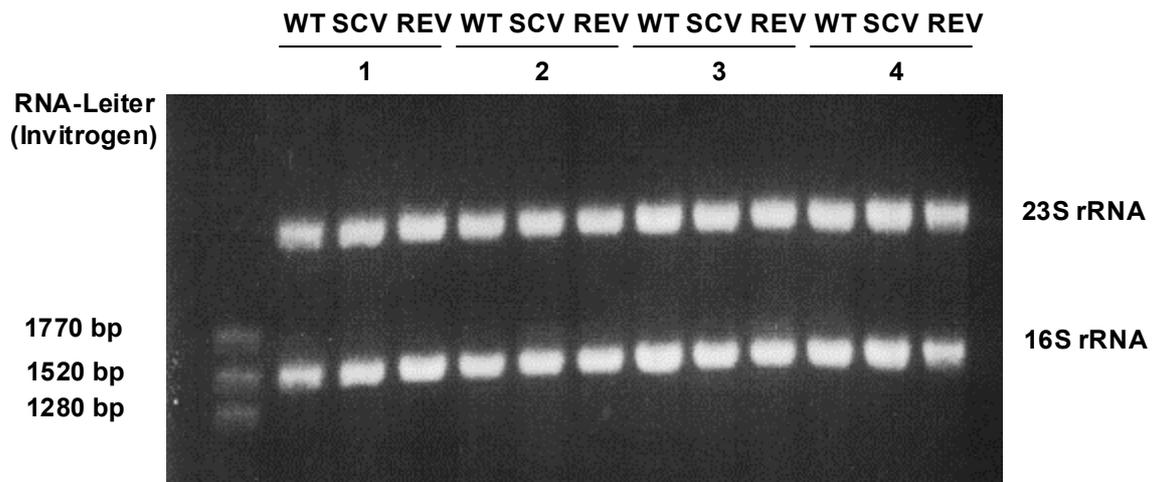


Abb. 2.1 Formaldehyd-Agarose-Gel vor dem anschließenden Northern-Blotten.

Anhand der distinkten Banden der großen ribosomalen RNAs (23S rRNA 2890 bp; 16S rRNA 1536 bp (Stover *et al.* 2000); 5S rRNA nicht abgebildet) kann die Güte der RNA insgesamt abgeschätzt werden. Anschließend wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen. Zum Hybridisieren mit unterschiedlichen Sonden wurde die Membran auseinandergeschnitten, so daß die Genexpression von jeweils SCV 20265 im Triplet mit dem Wildtyp und Revertante analysiert werden konnte.

II.3.5. Northern-Blotting

Zum Nachweis von Transkripten durch RNA-DNA-Hybridisierung wurde die zu analysierende Gesamt-RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (s. II.3.4) und mittels Kapillarkräften auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech) übertragen (Ausubel *et al.* 1988). Das zu blottende Gel wurde vor dem Zusammenbau der Blot-Apparatur 20 min in Wasser bidest. und 20 min in 20 x SSC gelegt. Für das Blotting wurden in einer Sandwich-Anordnung zwei Lagen Filterpapier, Gel, Membran, zwei Lagen Filterpapier und ein Stapel Papierhandtücher fest übereinandergelegt, so daß von der untersten Lage Filterpapier 20 x SSC Puffer aus einem Reservoir nach oben fließen konnte. Glasscheiben und Metallgerüste, die für diese Anordnung nötig waren, wurden zuvor 5 h bei 250 °C hitzesterilisiert. Die nun folgende Übertragungsprozedur wurde bei Raumtemperatur für mind. 20 h durchgeführt. Danach wurde die Lage der Geltaschen auf der Membran markiert und das Gel abgenommen. Durch kurzes Waschen mit 2 x SSC wurden an der Membran anhaftende Gelreste entfernt. Zur kovalenten Fixierung der übertragenen RNA auf der Membran wurde diese in Filterpapier und Aluminiumfolie eingeschlagen, 10 min bei RT und 20 min bei 65 °C getrocknet. Anschließend wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und von beiden Seiten mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (Stratalinker, Stratagene). Die Membran konnte im Anschluß

direkt zur Hybridisierung (s. II.3.7) eingesetzt oder in Haushaltsfolie eingeschweißt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

20 x SSC-Puffer

3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat, pH 7,0

II.3.6. Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin

DNA-Sonden für die Hybridisierung von Northern- und Southern Blots wurden gleichermaßen generiert. Die Primer zur PCR-Amplifikation genspezifischer Sonden-DNA wurden so gewählt, daß 500 – 600 bp große Fragmente aus dem zentralen kodierenden Bereich des jeweiligen Gens durch PCR mit genomischer DNA als Matrize amplifiziert werden konnten. Mindestens 45 μl eines PCR-Reaktionsansatzes wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und unter Zuhilfenahme des Gel Extraction Kits (Qiagen) aus dem Gel isoliert. Von der erhaltenen DNA-Lösung wurde 15 μl markiert. Vor der Markierung wurden die isolierten Fragmente hitzedenaturiert (10 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$) und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Markierung durch *random primer labelling* (Invitrogen) durchgeführt.

Bei dieser Methode werden Hexanukleotide, die mit statistischer Häufigkeit an DNA binden, an das Sondenfragment hybridisiert. Dort fungieren sie als Starter (*primer*) für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Während der Neusynthese von kurzen DNA-Strängen werden dann Digoxigenin-markierte Nukleotide eingebaut. Die Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten (Roche/Boehringer, Mannheim) ist eine nicht-radioaktive Methode zur Herstellung von DNA-Sonden. Dazu wird das Digoxigenin (DIG), ein Steroid-Molekül aus dem Fingerhut (*Digitalis*), über ein Spacer-Molekül mit dUTP verbunden. Als DIG-dUTP wird es als Nukleotid-Analogon durch das Klenow-Fragment während der *random-priming*-Reaktion in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut.

15 μl DNA (10 ng-3 μg) 10 min bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert, auf Eis abgekühlt
2 μl 10 x Hexanukleotid-Mix (Roche)
2 μl 10 x DIG-DNA Labelling Mix (Enzo)
1 μl Klenow-Polymerase (2 U/ μl) (Roche)
37 $^{\circ}\text{C}$, über Nacht

Zur Abtrennung von nicht eingebautem DIG-dUTP wurden die Sonden anschließend über Sephadex-Säulen aufgereinigt. Dazu wurden 1 ml Insulin-Spritzen mit Mull-Verband

verstopft und mit TE-äquilibrierten Sephadex G-50 befüllt. Diese Säulen wurden mit 3 ml TE-Puffer gespült und in einem Zentrifugen-Röhrchen hängend 45 s bei 1000 g trocken zentrifugiert. Unter die Spritze wurde anschließend ein 1,5 ml Reaktionsgefäß plaziert. Die Säule wurde mit 20 µl DIG-markierter DNA beladen, die vorher mit 172 µl TE-Puffer und 8 µl einer Farbstoff-Mischung (0,8 % [w/v] Dextranblau; 0,5 % [w/v] Phenolrot) versetzt wurde. Dann wurde die Sonde 30 s bei 1000 g zentrifugiert und die Gelfiltration nach einmaligen Waschen mit 200 µl TE-Puffer und Zentrifugation für 2 min bei 2000 g beendet.

II.3.7. RNA-DNA-Hybridisierung

Die Hybridisierungen wurden in Hybridisierungsöfen (Biometra) in großen Glas-Röhrchen oder in 50 ml Falcon-Röhrchen aus Plastik durchgeführt. Die Membran wurde mit der RNA-tragenden Seite nach innen in ein Röhrchen gelegt und mit 5x SSC-Lösung (s. II.3.5) bedeckt. Das Röhrchen wurde anschließend so lange geschwenkt, bis die Membran luftblasenfrei an der Wand haftete. Anschließend wurde die SSC-Lösung gegen die entsprechende Hybridisierungslösung ausgetauscht.

Zur Hybridisierung mit auf Nylonmembranen immobilisierter RNA wurde die Membran zunächst mit 25 ml (Glas-Röhrchen, Biometra) bzw. mit 10 ml (50 ml Falcon-Röhrchen) Hybridisierungslösung für 2 h bei 42 °C prähybridisiert. Die DNA-Sonde wurde für 15 min bei 95 °C (alte Sonde in Hybridisierungslösung 10 min 68 °C) denaturiert, in 10 ml Hybridisierungslösung (ca. 10 ng/ml DNA-Endkonzentration) aufgenommen und 16 h bei 42 °C mit den auf der Membran immobilisierten Nukleinsäuren hybridisiert. Unspezifisch an die Membran gebundene Sonde wurde durch mehrere Waschschriffe entfernt (5 min bei RT mit 6 x SSC, 0,3 % (w/v) SDS, 20 min bei 42 °C mit 2 x SSC + 3 % (w/v) SDS und 20 min bei 42 °C mit 0,2 x SSC + 3 % (w/v) SDS).

Die Detektion gebundener DIG-markierter Sonde erfolgte durch anti-Digoxigenin-dUTP Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase, die die Verbindung CDP-Star (Tropix) dephosphoryliert, das beim anschließenden Zerfall Licht der Wellenlänge 480 nm emittiert (Engler-Blum *et al.* 1993). Die Membran wurde zunächst 5 min in 200 ml Puffer I äquilibriert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsplätze auf der Membran wurde diese 30 min in 170 ml Puffer I mit 0,5 % (w/v) *Blocking*-Reagenz (Roche) geschwenkt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit einer 1:10000 Verdünnung des anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugats in 30 ml Puffer I mit 0,5 % (w/v) *Blocking*-Reagenz (Roche). Nach dreimaligem Waschen von jeweils 15 min mit Puffer I wurde die Membran

zwei Minuten in Puffer III äquilibriert und dann 5 min mit einer 10 ml 1:500 Verdünnung von CDP-Star (Tropix) in Puffer III inkubiert. Der Nachweis der Lumineszenz erfolgte unter Verwendung des Films X-OMAT bzw. Bio-MAX (beide von Kodak). Die Membranen konnten mit mäßigem Erfolg durch 5 minütige Inkubation in Wasser bidest., 20 min in 5 x SSC und 5 min in 95 °C heißer 0,1 % (w/v) SDS-Lösung regeneriert werden.

Hybridisierungslösung

50 % (w/v)	Formamid
5 x	Denhardt'sche Lösung
5 x	SSC
1 % (w/v)	SDS
100 µg/ml	Lachsspermien-DNA ^a

Denhardt'sche Lösung

2 % (w/v)	Ficoll (Typ 400)
2 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon (PVP-40)
2 % (w/v)	Rinderserumalbumin

^aDie DNA wurde durch Ultraschallbehandlung fragmentiert und vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung denaturiert (10 min bei 95 °C).

Puffer I

3 M	NaCl
0,1 M	Tris-HCl, pH 8,0
0,3 % (w/v)	Tween 20

Puffer III

100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl ₂

II.4. DNA-Arbeitstechniken

II.4.1. Vorbehandlung von Lösungen und Geräten

Kontaminierende DNasen in Lösungen und an Geräten wurden, soweit dies möglich war, durch Autoklavieren für 30 min bei 121 °C inaktiviert. Hitzelabile Geräte wurden mit sterilem Wasser bidest. abgewischt und anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol oberflächensterilisiert. Metallgeräte, wie Scheren, Skalpelle und Pinzetten wurden in 70 % (v/v) Ethanol getaucht und anschließend abgeflammt.

II.4.2. Isolierung von DNA aus Bakterien

II.4.2.1. Isolierung von Gesamt-DNA

Die Präparation von genomischer DNA aus Bakterienzellen erfolgte nach Chen *et al.* (1993). Aus einer über Nacht bei 37 °C gewachsenen Flüssigkultur von *P. aeruginosa* in LB-Medium wurden 2 ml 10 min bei 6000 g abzentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde mit 400 µl Lysispuffer und 132 µl einer 5 M NaCl-Lösung resuspendiert. Nach 10-15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat 30-60 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert, um die durch die Lyse entstandenen Zellreste abzutrennen. Der Überstand wurde mit 100 µg/ml RNase (Qiagen, Hilden) 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig mit einem Volumen Phenol/Chloroform vermischt und für 10 min bei mindestens 13000 g zentrifugiert, um die wässrige, DNA-haltige Phase von der organischen Phase und der aus Proteinen gebildeten Grenzschicht abzutrennen. Die Lösung wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt und vorsichtig geschüttelt. Die gefällte DNA wurde 30 min bei 13000 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Lysis-Puffer

40 mM	Tris-Acetat, pH 7,8 (HAc)
20 mM	Na-Acetat
1 mM	EDTA
1 % (w/v)	SDS

II.4.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmide mit hoher Kopienzahl wurden durch Anionenaustauschchromatographie mit dem QIAprep miniprep System (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers präpariert. Für die Isolierung wurden 1,5 ml einer LB-Kultur (mit entsprechenden Antibiotikazusätzen, vgl. II.2.1.5) 5 min bei 6000 g abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Puffer P1 resuspendiert. In diese Zellsuspension wurden 250 µl Puffer P2 vorsichtig eingemischt und dann 350 µl Puffer N3 dazugegeben. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 g wurde der Überstand durch eine QIAprep spin-Säule zentrifugiert (1 min, 13000 g). Die Säule wurde anschließend erst mit 0,5 ml Puffer PB, dann mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen, wobei jeweils für 1 min bei 13000 g zentrifugiert wurde. Um den Puffer PE restlos von der Säule zu entfernen, wurde ein weiteres Mal für 1 min bei 13000 g zentrifugiert. Zur Elution wurden 30 µl Wasser bidest. auf die Säule aufgetragen. Nach Inkubation für 1 min wurde die Säule ein letztes Mal für 1 min bei 13000 g zentrifugiert und die DNA so von der Säule in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert.

II.4.3. Generelle Techniken für die Arbeit mit DNA

II.4.3.1. Fällung von DNA

Zur Fällung der DNA wurde der wässrigen Lösung 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 5,2, oder 0,4 Vol. 5 M Ammoniumacetat (pH 7,5) zugesetzt. Anschließend wurde die DNA mit 2 Vol. 96 % (v/v) unvergälltem Ethanol oder 0,7 Vol. Isopropanol präzipitiert. Ethanol wurde dabei Isopropanol vorgezogen, da so weniger Salze kopräzipitieren. Je nach Art und Menge der DNA wurde diese 30 min bis 16 h bei 4 °C gefällt. Das Pellet wurde nach anschließender 20-minütiger Zentrifugation bei 13000 g mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde entsprechend ihrer Menge in 10 - 100 µl TE-Puffer oder in Wasser bidest. gelöst.

II.4.3.2. Phenolextraktion

Zur Abtrennung kontaminierenden Proteins aus DNA-Lösungen wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Falls notwendig wurde dazu das Volumen der DNA-Lösung mit TE-Puffer auf 200 µl erhöht. Für die anschließende Ethanol-fällung wurde dem Ansatz vor der Extraktion 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) zugesetzt. Zur Extraktion wurde 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt und untergemischt, so daß kurzzeitig eine homogene Emulsion entstand. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 13000 g für 5 min erreicht. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, ohne das in der Interphase befindliche Protein mitzuschleppen, und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde nötigenfalls so oft wiederholt bis sich kein Protein mehr in der Interphase befand.

Da Spuren gelösten Phenols enzymatische Modifikationen an der DNA inhibieren und UV-Konzentrationsbestimmungen maßgeblich verfälschen können, wurden Phenolreste durch Extraktion mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) aus der DNA-Lösung entfernt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

<u>TE-Puffer</u>		<u>Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol</u>	
10 mM	Tris/HCl, pH 8,0	25 Vol.	Phenol (äquilibriert mit TE-Puffer, pH 8,0)
1 mM	EDTA	24 Vol.	Chloroform
		1 Vol.	Isoamylalkohol

II.4.3.3. Dialyse von DNA

Isolierte genomische DNA wurde standardmäßig einer Dialyse zur Entfernung von Verunreinigungen unterzogen. Dazu wurden 20 ml TE-Puffer (s. II.4.3.2) in eine sterile Petrischale gefüllt und Membranfilter mit eine Porengröße von 0,05 µm und 13 mm Durchmesser (VMWP 01300 Membranfilter, Millipore) auf die Oberfläche gelegt. Maximal 50 µl Probe wurde auf die glatte Oberseite aufgebracht und mindestens 20 min dialysiert. Da das Volumen durch osmotische Effekte etwas zunahm, mußte eine erneute UV-Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden.

II.4.4. Enzymatische Manipulationen von DNA

II.4.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur qualitativen *in vitro*-Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR (Saiki *et al.* 1988) wurden Oligonukleotide (MWG Biotech) mit einer Anlagerungs-Tempertur zwischen 62 °C und 66 °C (meist 20-mere) als Primer eingesetzt und mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase Sequenzabschnitte chromosomaler DNA vervielfältigt. Zur Herstellung von Sonden für die Southern bzw. Northern Hybridisierung wurde *Taq*-Polymerase (InviTec) verwendet. Zur Herstellung des für Komplementationszwecke zu konstruierenderen *hemB*-Amplifikats wurde *Pfu*-Polymerase (Promega) mit einer 3'-5' Exonuklease-Aktivität verwendet. So konnten Fehler, die bei der DNA-Replikation entstehen können, minimiert werden. Die beiden Primer für die Initiierung der PCR sollten dabei möglichst folgende Charakteristika aufweisen:

- annähernd gleiche Schmelzpunkte
- am 3' Ende ein Paar aus Guanosin oder Cytosin
- keine hohen Homologien zu anderen Bereichen auf dem Genom (BLASTN unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> oder <http://blast.genome.ad.jp/> (Altschul *et al.* 1990))

Der Schmelzpunkt T_m manuell ausgewählter Primer wurde anhand der Faustformel

$$T_m = \sum [AT] \times 2 \text{ °C} + \sum [GC] \times 4 \text{ °C}$$

abgeschätzt (Rychlik *et al.* 1990). Alternativ wurden Primer mit dem Programm PRIMER3 unter http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi (Rozen & Skaletsky 2000) konstruiert. Die optimale Anlagerungs-Temperatur wurde für jedes Primer-Paar anschließend experimentell bestimmt.

Der Standard-Reaktionsansatz (*hot start*) hatte folgende Zusammensetzung:

<u>Ansatz I</u>	<u>Ansatz II mit <i>Taq</i>- bzw. <i>Pfu</i>-Polymerase</u>
0,5 µl DNA-Matrize (100 ng/µl)	5,0 µl 8 mM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech)
1,0 µl Primer [(+)-Strang] (100 pmol)	
1,0 µl Primer [(-)-Strang] (100 pmol)	0,5 µl <i>Taq</i> - bzw. <i>Pfu</i> DNA-Polymerase
2,5 µl DMSO	0,6 µl 10 x Reaktionspuffer
4,6 µl 10 x Reaktionspuffer	
3,0 µl MgCl ₂ (25 mM)	
ad 43,9 µl Wasser bidest.	

Die Komponenten des Ansatzes I wurden auf Eis in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (0,5 ml) pipettiert und mit 30 µl Paraffin überschichtet. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung des nachfolgend beschriebenen Standard-PCR-Programms in einem Thermocycler (Landgraf). Die Polymerase und Nukleinsäuren im Ansatz II wurden erst nach dem ersten Denaturierungs-Schritt in den Ansatz I eingemischt, da sich die lange Inkubation bei hohen Temperaturen nachteilig auf deren Stabilität auswirkt (*hot start*).

Reaktionsprogramm

1. Denaturierung		10 min, 98 °C
2. Amplifikation (30 Zyklen)	a) Denaturierung	30 s, 98 °C
	b) Anlagerung der Primer	1 min, T_m °C (s. Tab. 2.3)
	c) DNA-Synthese	1 min, 72 °C (<i>Taq</i> -Pol.) bzw. 75 °C (<i>Pfu</i> -Pol.)
3. Inkubation		10 min, 72 °C bzw. 75 °C
4. Aufbewahrung		4 °C

Die Anlagerungstemperatur entspricht der Schmelztemperatur T_m der verwendeten Primer (Tab. 2.3).

Tab. 2.3 Für die PCR verwendete Primer.

Gen ^a	Primer	Fragmentlänge	T_m
<i>gltA</i> (PA1580)	cit2 5'-CATGTCGACCGCCTCCTGCG-3' cit3 5'-GCTTCGTTTCGTCGCCCCCATG-3' (Spangenberg 1997)	672 bp	66 °C
<i>hasAp</i> (PA3407)	hasAp_f 5'-GGAGTTTTGGCATGAGCATT-3' hasAp_r 5'-AGGTGGAGTTGATCGACAGG-3'	516 bp	59 °C
<i>fur</i> (PA4764)	fur_f 5'-TGGTTGAAAATAGCGAACTTCG-3' fur_r 5'-GTAGAGCACCCAGATTGTGATCG-3'	385 bp	56 °C
<i>hemB</i> (PA5243)	hemB_f 5'-ATGACGATGGCTACGTCCTC-3' hemB_r 5'-TCTTAATTGTTCTGCGGCCT-3'	575 bp	57 °C
<i>hemB</i> (PA5243)	hemBfunc_f 5'-AAT CTAGAC GCAGCCTAACTCG-3' hemBfunc_r 5'-GT ACTAGT CATCTTCACTTCTGC-3' (funktionelles Genfragment mit <i>SpeI/XbaI</i> Schnittstellen)	1359 bp	2x 38 °C, 30x 55 °C
<i>pilA</i> (L37109)	1779 5'-CTTGATCGAACTGATGATCGTGG-3' 2089 5'-AATGCCAGACTAATGAGTAGATGG-3' (Spangenberg 1997)	643 bp	60 °C
<i>pvrR</i> (AF482691)	pvr2_f 5'-CCGGAAACCGACGAGACTCC-3' pvr2_r 5'-GCTGCATTGAGGCCGTTATCC-3'	597 bp	60 °C

^a PA-Nummer und Genname wurden vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen. Für nicht-PAO1 Gene wurde der GENBANK-Eintrag verwendet.

Die Dauer der Synthesereaktion wurde in Abhängigkeit von der Matrizenlänge gewählt, wobei 2 min pro kb zu synthetisierendem Fragment programmiert wurde. Nach Abschluß der PCR wurde der Ansatz auf Eis gehalten. Eine Probe von 10 µl wurde elektrophoretisch aufgetrennt (s. II.4.5), um die Amplifikation zu überprüfen. Bei einer Verwendung für präparative Zwecke wurde das Amplifikationsprodukt nach einer Elektrophorese aus dem Gel extrahiert (s. II.4.6).

II.4.4.2. Restriktionsspaltung

DNA wurde mit 10 U einer Restriktionsendonuklease pro µg DNA in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer für 3 h (kurze DNA-Fragmente) bzw. 24 h (genomische DNA) bei der empfohlenen Temperatur vollständig verdaut. Doppelverdau mit Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Puffer benötigten, erfolgten nach Möglichkeit in einem Puffersystem, in dem die Aktivität beider Enzyme maximal war. Alternativ dazu wurde der Verdau in zwei Schritten durchgeführt, wobei im zweiten Schritt die Salzkonzentration für das salzbedürftigere Enzym entsprechend erhöht wurde. Die Restriktionsverdau wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung (s. II.4.3.2) oder Zugabe des Auftragepuffers für die Agarose-Gelelektrophorese (s. II.4.5) abgestoppt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

In silico Restriktionskarten wurden mit dem *online* verfügbaren Programm WEBCUTTER 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) erstellt.

II.4.4.3. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine intra- oder intermolekulare Ligation von restriktionsverdauter Vektor-DNA zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe alkalischer Phosphatase abgespalten. Hierzu wurde dem Restriktionsansatz während der letzten 30 min des Verdau 1 U alkalische Phosphatase pro µg DNA (Roche) zugesetzt. Anschließend wurde das Enzym durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt und die DNA gefällt (s. II.4.3.2).

II.4.4.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden jeweils etwa 0,2 µg in Wasser bidest. oder TE-Puffer gelöste DNA eingesetzt, wobei die Konzentrationsverhältnisse so gewählt wurden, daß das zu ligierende Fragment in 2 - 5-fachen molaren Überschuß gegenüber der Vektor-DNA vorlag. Die Ligation erfolgte durch 1 U T4-DNA-Ligase in 1 x Ligase-Puffer (New Englands Biolabs) über Nacht bei 16 °C unabhängig davon, ob glatte oder kohäsive Enden miteinander verknüpft werden sollten. Das Ligationsprodukt wurde bis zur Transformation bei -20 °C gelagert.

II.4.5. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden durch Agarose-Gelelektrophorese in horizontalen Gelkammern aufgetrennt. Zur schnellen Analyse wurden Mini-Gelkammern mit einer Gelfläche von 5 x 7 cm (Gelvolumen 40 ml) verwendet. Der zur Ausformung der Taschen eingesetzte Kamm ermöglichte die Auftrennung von bis zu 18 Proben mit einem Volumen von 15 µl. Wurde eine Maxi-Gelkammer mit einer Gelfläche von 10 x 14 cm (Gelvolumen 120 ml) verwendet, konnten mit einem entsprechenden Kamm 25 Proben mit maximal 30 µl Volumen aufgetrennt werden. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde eine entsprechende Menge Agarose (genomische DNA: 0,8 % [w/v]; Fragmente bis 500 bp: 1 % [w/v]; Fragmente unter 500 bp: 1,5 - 2 % [w/v]) in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50 °C in eine Elektrophoresekammer gegossen. Der Kamm wurde sofort in die noch flüssige Agarose eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 Vol. des Auftragepuffers versetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei konstant 6 V / cm.

DNA-Auftragspuffer (6 x)

0,5 M EDTA pH 8,0
 15 % (w/v) Ficoll Typ 400 (Pharmacia)
 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
 0,1 % (w/v) Xylen-Cyanol

TBE-Puffer

90 mM Tris / Borat pH 8,2
 2 mM EDTA

Je nach erwarteten Fragmentgrößen wurden verschiedene Größenstandards verwendet (Tab. 2.4).

Tab. 2.4 Größenstandards für die DNA- und RNA-Gelelektrophorese [bp].

λ -DNA <i>Bst</i> EII (New England Biolabs)	pBluescript KS (Stratagene) <i>Msp</i> A1I (New England Biolabs)	100 bp Leiter (New England Biolabs)	0,16 – 1,77 kb RNA- Leiter (Invitrogen)
(14140)	941	1517	1770
8454 ^a	809	1200	1520
7242	518	1000	1280
6369	314	900	780
5686 ^a	243	800	530
4822	134	700	400
4324		600	280
3675		517	155
2323		500	
1929		400	
1371		300	
1264		200	
702		100	
224			
117			

^a Diese Fragmente tragen die cos-sites des λ -Phagen und können durch Hybridisierung ein zusätzliches Fragment von 14140 bp bilden.

Die Anfärbung der DNA erfolgte in verdünnter Ethidiumbromidlösung (10 μ g /ml). Nach etwa 15 min wurde das Gel für mind. 15 min in destilliertes Wasser gegeben und so von überschüssigem Ethidiumbromid befreit.

Zum Anfärben von sehr geringen Mengen partiell verdauter einzelsträngiger cDNA (s. II.5.2) wurde SYBRGreen I (Molecular Probes) verwendet. Die Sensitivität von SYBRGreen I für einzelsträngige cDNA ist laut Hersteller mindestens 25-fach höher als von Ethidiumbromid. SYBRGreen I wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in TBE gelöst. In einer undurchsichtigen Plastik-Box wurde das zu färbende Agarose-Gel 40 min mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend war keine Entfärbung notwendig.

Ethidiumbromid und Sybr Green I interkalieren in Nukleinsäuren, so daß einzelne DNA-Banden im UV-Licht (s. II.3.3) der Wellenlänge 320 nm sichtbar gemacht werden können. Ethidiumbromid gefärbte Gele wurden mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (MWG-Biotech) fotografiert, SYBRGreen I gefärbte Gele wurden von einer Polaroid-Kamera mit Gelb-Filter (Molecular Probes) aufgenommen.

II.4.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) konnten hochreine lineare DNA-Fragmente für Ligationsreaktionen, Transformation und die Herstellung von Sonden aus Agarose-Gelen isoliert werden. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung des zu isolierenden Fragmentes (s. II.4.5) wurde es mit einem Skalpell unter UV-Licht der Wellenlänge 320 nm aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Es wurde darauf geachtet, daß die Größe des Gelstückes möglichst gering war. Nach Zugabe von 3 Vol. (100 mg \approx 100 μ l) Puffer QG wurde der Ansatz bei 50 °C so lange inkubiert bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Ein Gelvolumen Isopropanol wurde dazugemischt, der gesamte Ansatz auf eine Qiaquick Säule aufgetragen und 1 min bei 13000 g zentrifugiert. Um zurückgebliebene Agarose vollständig von der Säule zu waschen, wurde 0,5 ml Puffer QG zugegeben und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert, um den Puffer restlos zu entfernen. Zum Eluieren der DNA wurden 30 μ l Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) auf die Säule pipettiert, danach wurde der Ansatz 1 min stehen gelassen und schließlich 1 min bei 13000 g auszentrifugiert.

II.4.7. Southern-Blotting

Zum Nachweis von DNA-Fragmenten durch Hybridisierung (Southern 1975) mit einer DNA-Sonde wurde die zu analysierende DNA elektrophoretisch in einem Maxi-Agarose-Gel aufgetrennt (s. II.4.5) und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Laufweiten wurden anhand der Marker (Längenstandards) unter Verwendung eines Lineals dokumentiert. Der Transfer der DNA erfolgte wie unter II.3.5 beschrieben, wobei keine Hitzesterilisierung der Apparatur nötig war. Als Laufpuffer wurde 0,4 M NaOH Lösung verwendet um die Übertragung großer DNA-Fragmente durch partielle alkalische Hydrolyse zu erleichtern. Nach 20 h wurde die Membran in eine Schale mit 50 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 6,5) überführt und nach 5 min Inkubation wie unter II.3.5 getrocknet und die DNA kovalent an die Membran gebunden. Die Membran konnte eingeschlagen in Haushaltsfolie bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

II.4.8. DNA-DNA-Hybridisierung

Die DNA-DNA bzw. Southern-Hybridisierung ähnelt der bereits geschilderten RNA-DNA bzw. Northern-Hybridisierung. Die verwendeten Temperaturen und Hybridisierungs- bzw. Wasch-Lösungen, sowie die Detektions-Puffer weichen jedoch ab.

Zunächst wurde die DNA-Sonde 15 min bei 95 °C denaturiert und dann in 20 ml auf 68 °C temperierte Hybridisierungslösung gegeben. Diese Mischung wurde in das Hybridisierungsröhrchen gegossen und 24 h bei 68 °C hybridisiert. Nach Entfernung der Sondenlösung wurde die Membran zweimal 30 min bei 68 °C mit Waschlösung im Hybridisierungssofen gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion analog zu II.3.7 jedoch mit anderen Pufferzusammensetzungen. Die Membranen können durch zweimaliges Waschen für 30 min in 0,2 M NaOH-Lösung mit 0,1 % (w/v) SDS regeneriert werden.

<u>Hybridisierungslösung</u>		<u>Waschlösung</u>	
500 mM	Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2	40 mM	Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2
1 mM	EDTA	1 % (w/v)	SDS
7 % (w/v)	SDS		
<u>Puffer I</u>		<u>Puffer III</u>	
100 mM	Tris-HCl, pH 7,5	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
150 mM	NaCl	100 mM	NaCl
		50 mM	MgCl ₂

II.4.9. Übertragung von DNA durch Elektroporation

Zur Übertragung von Plasmid-DNA wurde ein Protokoll von Enderle *et al.* (1998) verwendet. Dazu wurde *P. aeruginosa* oder *E. coli* so mit einem Impfspatel auf LB-Agar-Platten ausplattiert, daß sie nach 24 h Inkubation bei 37 °C einen konfluenten Rasen bildeten. Von der Hälfte einer bewachsenen Platte wurden die Zellen mit einer Impföse abgelöst und in 1 ml Wasser bidest. resuspendiert. Alternativ konnten auch 2 ml einer Flüssigkultur verwendet werden, aus der die Zellen mit 13000 g abzentrifugiert und anschließend in Wasser bidest. aufgenommen wurden. Diese Zellsuspension wurde wiederholt für jeweils 3 min bei 13000 g unter Wechsel des Wassers gewaschen. Erst wenn keine helle Schicht (Exopolysaccharid und Zelltrümmer) mehr auf dem Zellpellet zu sehen war und der Zellüberstand keine Färbung mehr aufwies, wurden die Zellen in 200 µl Wasser bidest. resuspendiert und auf Eis gestellt. Jeweils 90 µl Zellsuspension wurden mit maximal 10 µl DNA-Lösung versetzt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektroden-Abstand 0,2 cm; Biorad) überführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich am Grund der Küvette keine Luftblasen bildeten.

Anschließend wurden die Zellen in einem Gene Pulser II (Biorad) bei 2,5 kV und 25 μ F sowie 400 Ω (*P. aeruginosa*) bzw. 200 Ω (*E. coli*) elektroporiert. Die Zeitkonstante für die Entladung sollte optimalerweise 5 ms betragen. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium versetzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Resistenzausprägung wurden die Zellen dann 3 h im Heizblock bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Elektroporationsküvetten konnten wiederverwendet werden, nachdem sie gut mit Wasser bidest. gespült und mit 70 % (v/v) Ethanol gefüllt in einem Trockenschrank bei 80 °C getrocknet worden waren.

II.5. *P. aeruginosa* GeneChips (Affymetrix)

II.5.1. Der *P. aeruginosa* GeneChip

Der verwendete *P. aeruginosa* GeneChip der Firma Affymetrix wurde auf Initiative der Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Inc. (CFFTI, USA) konstruiert, nachdem die CFFTI bereits durch Finanzierung des Genomsequenzier-Projektes von *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.* 2000) den Grundstein dafür gelegt hatte. Auf dem *P. aeruginosa* GeneChip (Affymetrix) sind Sonden für 5549 Protein-kodierende Gene, für eines der vier rRNA-Operons (23S, 16S, 5S rRNA), für 18 der 63 tRNA Gene sowie für 199 ausgewählte intergenische Regionen des komplett sequenzierten und annotierten Genom von *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.* 2000) enthalten. Gene, die aufgrund von Genduplikationen mehrmals auf dem Genom vorkommen, wurden nur durch eine Sonde repräsentiert (Tab. 2.5).

Tab. 2.5 Aufgrund von Gen-Duplikationen im *P. aeruginosa* PAO1 Genom nicht auf dem GeneChip enthaltene Gene.

	Gen ^a	Protein
1	PA1512	sezerniertes Protein
2	PA1937	konserviert hypothetisches Protein
3	PA1938	konserviert hypothetisches Protein
4	PA2040	mögliche Glutamin Synthetase
5	PA2319	mögliche Transposase
6	PA2463	hypothetisches Protein
7	PA2690	mögliche Transposase
8	PA3186	Porin der äußeren Membran
9	PA3434	mögliche Transposase
10	PA3993	mögliche Transposase
11	PA4022	mögliche Aldehyde Dehydrogenase
12	PA4210	mögliches Protein der Phenazin-Biosynthese
13	PA4211	mögliches Protein der Phenazin-Biosynthese
14	PA4212	Phenazin-Biosynthese Protein PhzC
15	PA4213	Phenazin-Biosynthese Protein PhzD
16	PA4214	Phenazin-Biosynthese Protein PhzE
17	PA4215	mögliches Protein der Phenazin-Biosynthese
18	PA4216	mögliche Pyridoxamin 5'-Phosphat Oxidase
19	PA4277	Elongationsfaktor Tu
20	PA4797	mögliche Transposase
21	PA5267	sezerniertes Protein Hcp

^a PA-Nummern wurden vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen.

Außerdem sind Sonden für 117 Protein-kodierende Gene anderer Stämme von *P. aeruginosa* auf dem GeneChip enthalten. Mit dem *P. aeruginosa* GeneChip können somit 5986 unterschiedliche Sequenzabschnitte von *P. aeruginosa* analysiert werden. Als Kontrollen dienen 14 Gene von *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*. Die auf dem GeneChip enthaltenen Gen-Sequenzen entstammen der Sequenz-Datenbank GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und werden mit weiteren Informationen zum Aufbau des GeneChips in der Datenbank NETAFFX unter <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx> für den Benutzer zur Verfügung gestellt.

Auf Affymetrix GeneChips wird der zu analysierende Sequenzabschnitt entsprechend seiner Länge durch eine variierende Anzahl von 25-mer Oligonukleotiden repräsentiert (Lipshutz *et al.* 1999). Auf dem *P. aeruginosa* GeneChip werden Protein-kodierende Gene durch 8 – 13, tRNA-Gene durch 8 – 16 und intergenische Bereiche durch 13 – 122 solcher Oligonukleotid-Sonden abgedeckt. Jedes Oligonukleotid wird als Sondenzelle (*probe cell*) mit Hilfe einer speziellen fotolithographischen Technik auf einer Fläche von 20 µm x 20 µm *in situ* synthetisiert (Fodor *et al.* 1991). Das zum analysierenden Sequenzabschnitt komplementäre Oligonukleotid (*perfect match oligo*, PM) wird direkt neben ein Oligonukleotid mit einer eingefügten Fehlpaarung an Position 13 (*mismatch oligo*, MM) synthetisiert und bildet mit ihm ein Sondenpaar (*probe pair*). Das MM symbolisiert den Hintergrund der spezifischen Hybridisierung, und daher wird im Laufe der *in silico* Hybridisierungs-Analyse die Signalintensität des MM von der PM-Signalintensität abgezogen. Alle Sondenpaare, die zusammen einen Sequenzabschnitt auf dem GeneChip repräsentieren, werden als SONDENSET (*probe set*) bezeichnet (Abb. 2.2). Die Sondenpaare eines SONDENSETS werden auf dem 1,28 cm x 1,28 cm großen GeneChip verteilt. Dadurch wird die Auswirkung von lokalen Unregelmäßigkeiten bei der Hybridisierung (uneinheitliches Hybridisieren und Färben oder mechanische Schädigungen, wie z.B. Kratzer) auf die Datenerhebung vermindert.

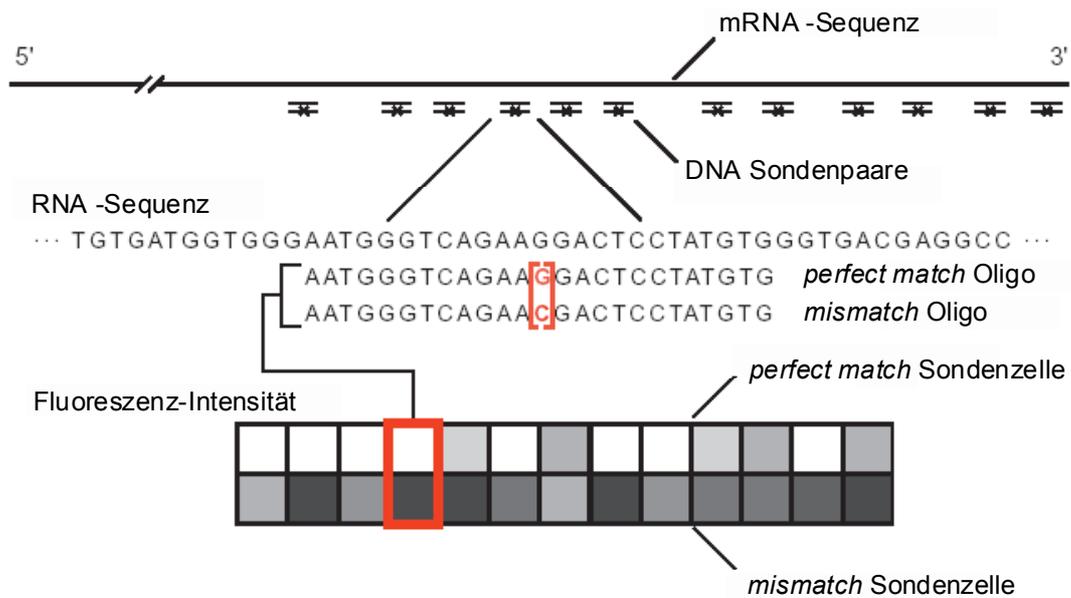


Abb. 2.2 Aufbau eines GeneChip Sondensets nach Lipshutz *et al.* (1999).

Eine Gen wird von einem Sondenset aus 25-mer Oligonukleotiden repräsentiert. Jede Sonde besteht aus einem zur cDNA-Sequenz perfekt komplementären Oligonukleotid (*perfect match* Oligo) und einem Oligonukleotid mit einem Basenaustausch an der Stelle 13 (*mismatch* Oligo).

II.5.2. Generierung von cDNA und Markierung mit Biotin

Zur Hybridisierung der GeneChips wurde isolierte RNA nach *random priming* mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mit DNase I in 50 – 200 bp große Stücke verdaut. Die jeweiligen Enden wurden anschließend durch Terminale Transferase mit einem Biotin-gekoppelten Nukleotid markiert (Abb. 2.3).

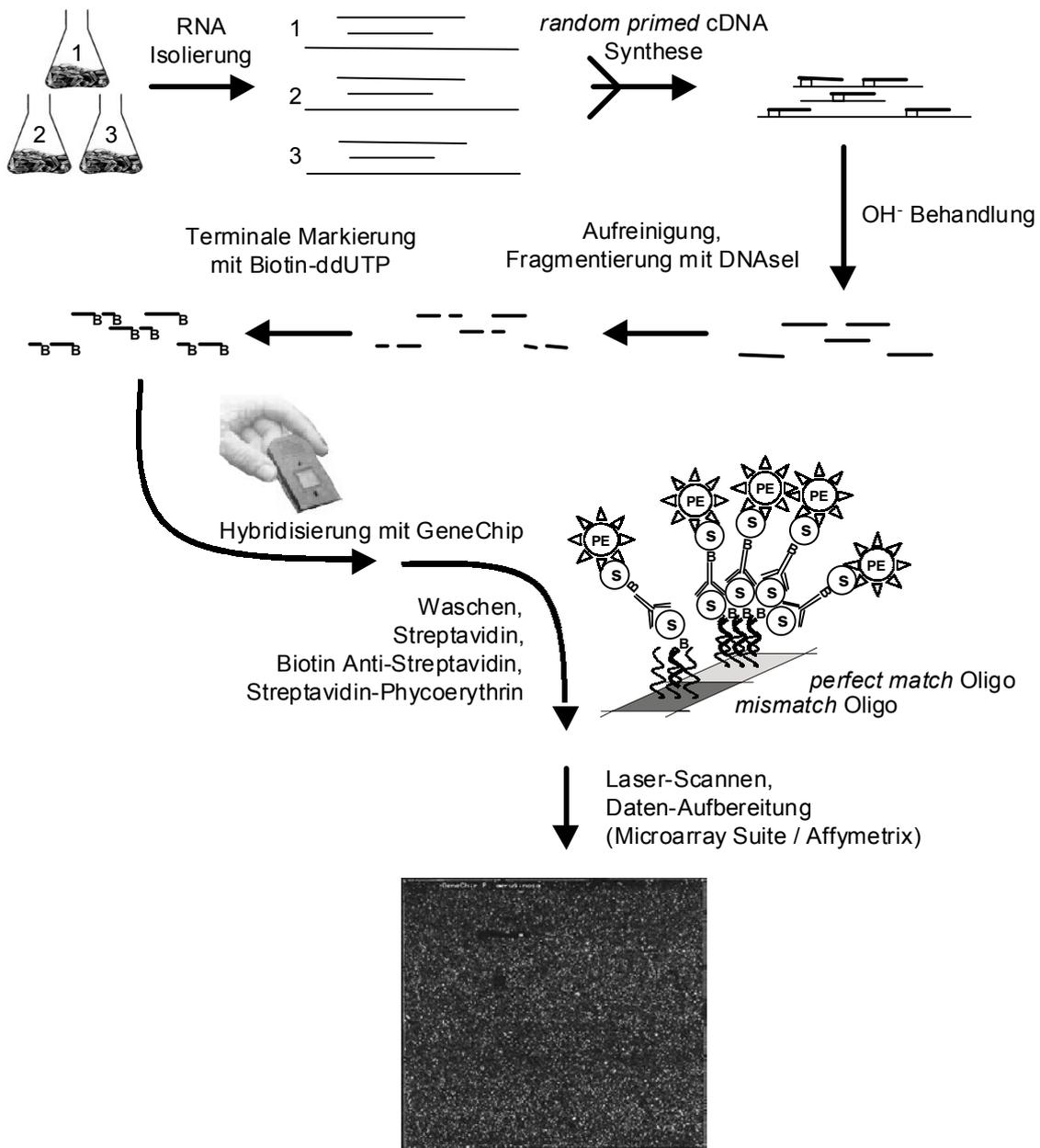


Abb. 2.3 Überblick der einzelnen Schritte eines GeneChip Experimentes.

Durch geringe Abweichungen bei der Anzucht oder der RNA-Präparation können Variationen in der Menge spezifischer mRNAs auftreten (s. Ergebnisse & Diskussion III.2.1). Um diese Abweichungen zu minimieren wurden jeweils drei RNA-Präparationen aus verschiedenen Hauptkulturen 1:1:1 gepoolt.

10 µg RNA wurden dann in 0,5 ml Reaktionsgefäßen entsprechend den Vorgaben von Affymetrix für den *P. aeruginosa* GeneChip weiterverarbeitet. Alle Inkubationen fanden in einem Thermocycler (Landgraf) statt. Bei Inkubationen über 37 °C verhinderte eine Überschichtung mit Paraffin die Verdunstung und Kondensation des Reaktionsansatzes am Deckel des Gefäßes.

Dem RNA-Pool wurden 25 ng/µl *random primer* (Invitrogen) und 186 pM *in vitro* Kontroll-Transkripte von 10 nicht-Pseudomonas Genen (zur Verfügung gestellt von S. Lory, Boston) hinzugegeben (Tab. 2.6).

Tab. 2.6 Kontroll-Transkripte.

	Spezies	Gen	Transkriptlänge [bp]	Finale Konzentration [pM]
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YEL002C / WBP1	1300	1
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YEL018W	840	2
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YEL024W / RIP1	650	10
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YER148W / SPT15	720	5
5	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>dapB</i>	740	1
6	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>lysA</i>	1320	5
7	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>pheB</i>	440	10
8	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>thrC</i>	1100	2
9	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>trpD</i>	1000	2
10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GAPDH	1000	5

Das Gemisch wurde mit Wasser bidest. auf 30 µl Endvolumen gebracht. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend zum Anlagern der Primer 10 min bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl cDNA Reaktions-Mix (5 x 1st strand buffer, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs, 25 U/µl SuperScript II [Invitrogen] und 0,5 U/µl SUPERaseIn [Ambion]) wurde der Ansatz 10 min bei 25 °C, 60 min bei 37 °C, 60 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C inkubiert. Zur Hydrolyse der RNA wurden dann 20 µl 1 N NaOH hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 65 °C wurde der Reaktions-Ansatz mit 20 µl 1 N HCl neutralisiert. Die cDNA wurde mit dem PCR Aufreinigungs Protokoll mit QIAquick Säulen (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und durch Messung der UV-Absorption quantifiziert. Dann

wurden 3 bis 5 μg cDNA mit 0,5 U/ μg DNaseI (Amersham Pharmacia Biotech) 10 min bei 37 °C in OnePhorAll Puffer (Amersham Pharmacia Biotech) fragmentiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 98 °C inaktiviert. Die fragmentierte cDNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

Für GeneChip Hybridisierungen ist eine Fragmentgröße von 50 – 200 bp optimal. Um zu überprüfen ob die Mehrheit der entstandenen cDNA Fragmente in diesem Größenbereich lag, wurden 5 μl des Ansatzes durch Elektrophorese mit einem 2 % (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt und mittels SYBRGreen (Molecular Probes) gefärbt (Abb. 2.4).

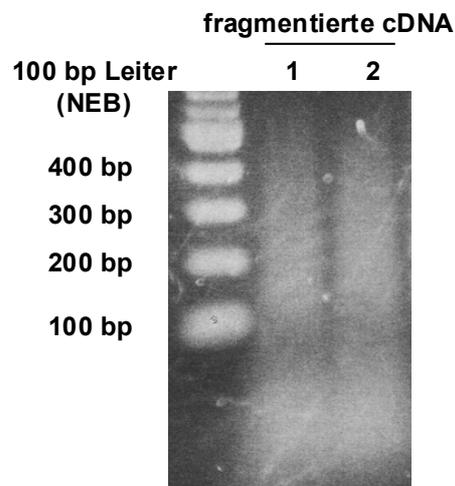


Abb. 2.4 Repräsentatives SYBR-Green gefärbtes Agarose-Gel fragmentierter cDNA.

Nach Fragmentierung weist der überwiegende Anteil der cDNA eine Größe von ca. 50 bis 200 bp auf. Der dunkle Bereich unterhalb 100 bp entsteht durch das auf gleicher Höhe laufende Bromphenolblau des Auftragspuffers.

Zur terminalen Markierung der cDNA-Fragmente wurde das Enzo BioArray Terminal Labeling Kit mit Biotin-ddUTP (Affymetrix) verwendet. Dazu wurden 1,5 - 4 μg Fragmentierungs-Produkt mit 5 x Reaktions Puffer, 10 x CoCl_2 -Lösung, 1 μl Biotin-ddUTP und 2 μl Terminaler Desoynukleotid-Transferase gemischt und in einem Endvolumen von 60 μl für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μl 0,5 M EDTA abgestoppt und die markierte cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

Es können Variationen in den geschilderten Schritten der RNA-Prozessierung sowie der Hybridisierung, den Waschvorgängen sowie Abweichungen der unterschiedlichen GeneChips zueinander auftreten (s. Ergebnisse & Diskussion III.2.1). Um dem Rechnung zu tragen, wurden aus jeweils drei verschiedenen Kulturen zwei cDNAs synthetisiert und mit je einem GeneChip hybridisiert. Pro Morphotyp und Wachstumsphase konnten so zwei GeneChips zur Datenanalyse herangezogen werden.

II.5.3. Markierung von genomischer DNA zur GeneChip-Hybridisierung

Zur Hybridisierung von genomischer DNA von 20265 SCV mit dem *P. aeruginosa* GeneChip wurden 15 µg genomische DNA von Zellen aus der stationären Wachstumsphase mit 75 U *Bst*UI (New England Biolabs) bei 60 °C für 16 h geschnitten. Dieses Restriktionsenzym wurde ausgewählt, da es laut *in silico* Restriktionskarten das *P. aeruginosa* Genom in 50 bis 200 bp große Fragmente schneidet. Nach Phenol-Extraktion und Fällung mit 0,7 Vol. Isopropanol wurde das DNA-Pellet in 48 µl Wasser bidest. gelöst. Anschließend wurden 3 µl der Lösung UV-quantifiziert und 5 µl zur Bestätigung der Fragmentgrößen wie unter II.4.5 beschrieben im 2 % (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt. Die restlichen 40 µl der fragmentierten DNA wurden wie unter II.5.2 beschrieben mit dem Enzo BioArray Terminal Labeling Kit (Affymetrix) mit Biotin markiert.

II.5.4. Hybridisierung von GeneChips

Zunächst wurden die bei 4 °C aufbewahrten GeneChips auf Raumtemperatur gebracht. Die Hybridisierungs-Lösung beinhaltete 51 µl fragmentierte und markierte cDNA (mind. 1 µg) in MES Hybridisierungs-Puffer (100 mM MES, 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.01 % Tween), 50 pM B2 Kontroll-Oligonukleotid (Affymetrix), 0,1 mg/ml Herings-Sperma DNA (Promega), 0,5 mg/ml BSA (Invitrogen) und 7 % DMSO in einem Endvolumen von 130 µl. Diese Lösung wurde durch das untere Septum in den GeneChip eingefüllt, während über das obere Septum durch eine eingesteckte Pipettenspitze entlüftet wurde. Nach einer 16 stündigen Inkubation bei 50 °C und 60 U/min im GeneChip Hybridisierungs-Ofen 640 (Affymetrix) wurde die Lösung wieder entfernt. Die hybridisierten GeneChips wurden in der Affymetrix *Fluidics station* 400 gewaschen und die Biotin-Markierung wurde nach einer Antikörper vermittelten Signal-Amplifikation über eine Streptavidin-Phycoerythrin Kopplung fluoreszenzmarkiert. Die *Fluidics Station* wird dabei über einen angeschlossenen Computer durch die AFFYMETRIX MICROARRAY SUITE 5.0 (MAS 5.0) gesteuert. Die GeneChips wurden zunächst 20 mal bei 25 °C mit einem Hochsalz-Puffer (6x SSPE [1,08 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA; pH 7,7] and 0.01 % Tween 20) und 60 mal bei 50 °C mit einem Niedrigsalz-Puffer (100mM MES, 0.1 M NaCl, 0.01 % Tween 20) gewaschen. Hybridisierte cDNA wurde dann mit einer Streptavidin-Lösung (10 µg/ml Streptavidin [Pierce Chemical] in PBS-Puffer, 2 mg/ml BSA, 100 mM MES, 0,1 M NaCl, 0,01 % Tween 20) für 10 min bei 25 °C markiert. Nach 40-maligen Waschen mit Niedrigsalz-Puffer bei 30 °C wurde der

GeneChip 10 min bei 25 °C mit einem Biotin Anti-Streptavidin Antikörper (5 µg/ml Biotin anti-Streptavidin [Vector Laboratories], 100 µg/ml Ziegen IgG [Sigma], 2 mg/ml BSA, 100 mM MES, 0,1 M NaCl, 0,01 % Tween 20) und 10 min bei 25 °C mit Streptavidin-Phycoerythrin (10 µg/ml Streptavidin-Phycoerythrin [Molecular Probes], 2 mg/ml BSA, 100 mM MES, 0,1 M NaCl, 0,01 % Tween 20) inkubiert. Zuletzt wurde überschüssige Fluoreszenz-Markierung durch 60 Waschschriffe mit Niedrigsalz-Puffer bei 30 °C entfernt.

Phosphat-gepufferte Saline (PBS)

7,5 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	
0,6 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	50 mM PO ₄ ²⁻ (Endkonzentration)
8,0 g	NaCl	
	ad 1000 ml Wasser bidest., pH 7,2	

II.5.5. Auslesen des GeneChips

Die GeneChips wurden zweimal hintereinander mit einem von MAS 5.0 gesteuerten HP GeneArray (Affymetrix) Scanner ausgelesen. Ein Laser induziert dabei die Fluoreszenz des Phycoerythrins bei 570 nm und detektiert sie mit einer Auflösung von 3 µm durch ein eingebautes konfokales Mikroskop. Pro Sondenzelle werden so 64 Pixel aufgenommen und als .DAT Datei gespeichert. Die Signale des Kontroll-Oligos B2, welches der Hybridisierungslösung zugegeben wurde (s. II.5.4), dienen als Orientierungen, anhand derer die MAS 5.0 automatisch Raster über das Bild legen kann, um die Pixel der jeweiligen Sondenzelle zuzuordnen. Anhand der Koordinaten der Sondenzelle wird anschließend automatisch in einer Datenbank der entsprechende Sequenzabschnitt herausgesucht und den detektierten Signalintensitäten zugeordnet.

Da die Intensitäten von Pixeln einer Sondenzelle aufgrund von Randeffekten nicht gleichmäßig auf der Fläche verteilt sind, wird das 70. Perzentil als Durchschnittswert angenommen. Das so entstehende Bild wird als .CEL Datei gespeichert (Abb. 2.5). Informationen zur Art des Experiments, zum verwendeten Wasch-Protokoll etc. können durch die .EXP Datei erfasst werden.

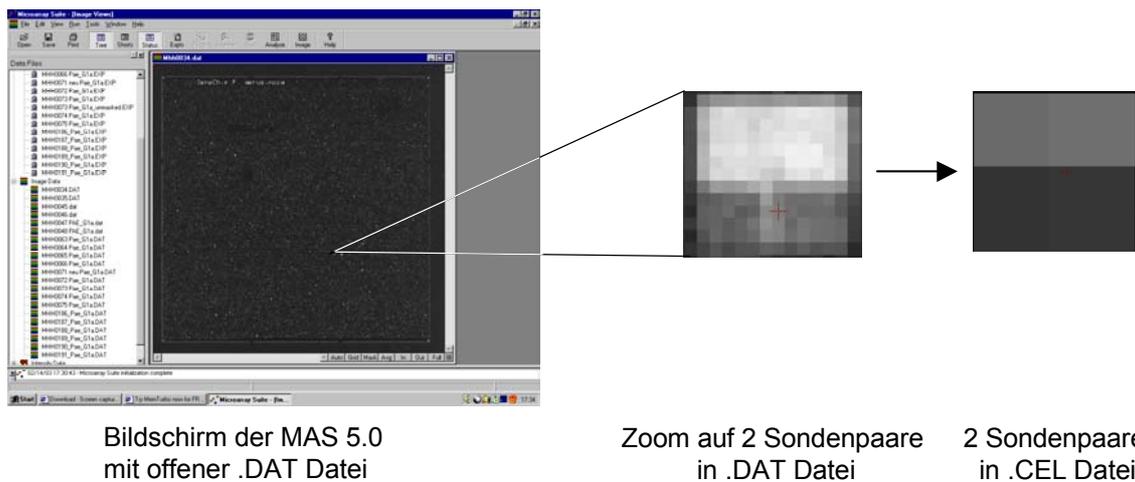


Abb. 2.5 Schema der *in silico* Arbeitsschritte der MAS 5.0 von .DAT zu .CEL anhand von 2 ausgewählten Sondenpaaren.

II.5.6. Auswertung einer GeneChip Hybridisierung

In den folgenden Abschnitten werden die grundlegende Prinzipien der Datenerhebung mit Affymetrix GeneChips erläutert. Alle Berechnungen werden automatisch *in silico* von der MAS 5.0 durchgeführt. Der Nutzer hat anschließend die Aufgabe, die Daten zu filtern. Alle Informationen zur Auswertung von Affymetrix *P. aeruginosa* GeneChips wurden aus *online* verfügbaren technischen Erläuterungen (*Technical Notes*) bezogen:

- http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/statistical_reference_guide.pdf
(Affymetrix 2001a)
- http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/statistical_algorithms_technote.pdf
(Affymetrix 2001b)
- http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/tunable_technote.pdf
(Affymetrix 2001c)

II.5.6.1. Hintergrundsubtraktion

Durch unspezifische Bindungen des Streptavidin-Phycoerythrin Konjugats an die GeneChip-Matrix entstehen Hintergrund-Signale, die von den spezifischen Signalen abgezogen werden müssen. Dazu teilt die MAS 5.0 die Fläche eines GeneChips in 16 Sektoren auf und bestimmt für jedes Sektorencentrum das Hintergrund-Signal. Dazu wird das 2. Perzentil jedes Sektors verwendet. Anschließend werden anhand der relativen Distanz jeder Sondenzelle zu den benachbarten Sektorencentren Wichtungsfaktoren berechnet (Abb. 2.6). Das Hintergrund-Signal jeder Sondenzelle entspricht nun dem addierten Produkt aus Wichtungsfaktoren und Hintergrund-Signalen der entsprechenden Sektoren.

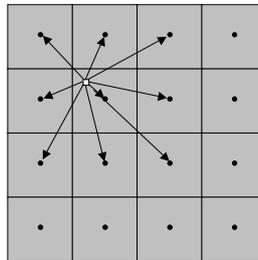


Abb. 2.6 Schema zur Bestimmung der Wichtungsfaktoren als Grundlage der Berechnung des Hintergrund-Signals.

II.5.6.2. Bestimmung von Signalkennwerten

Die Signalkennwerte einer GeneChip Hybridisierung setzen sich aus zwei Werten zusammen. Zunächst wird eine quantitative Angabe über die jeweilige Signalintensität eines Sondensets gemacht. Außerdem macht das Design des GeneChips (PM/MM, Sondensets) es möglich, eine qualitative Beurteilung - ob ein Sequenzabschnitt hybridisiert hat oder nicht - zu treffen. Beiden Erhebungen, die parallel erfolgen, liegen identische Primärdaten zugrunde, sie bilden jedoch voneinander unabhängige Kennwerte zur Bewertung von Expressionsdaten. Diese zweigleisige Beurteilung erhöht die Reliabilität der Genexpressions-Analyse, da nicht davon ausgegangen werden kann, daß alle Sondenpaare gleich gute Hybridisierungseigenschaften aufweisen. Zusätzlich wird der unterschiedlichen Anfälligkeit der Oligos gegenüber Kreuzhybridisierungen Rechnung getragen. Bei Expressionsanalysen kann es also vorkommen, daß trotz hoher Signalintensität ein Gen als „nicht signifikant exprimiert“ ausgegeben wird.

Die qualitative Beurteilung der Signalintensität (*detection*) erfolgt anhand des Signifikanzniveaus (MAS 5.0: *detection p-value*) der Expression. Ein Transkript kann entweder anwesend (MAS 5.0: *present*, P), abwesend (MAS 5.0: *absent*, A) oder marginal vorhanden (MAS 5.0: M) sein. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus wird eine Diskriminationsgröße R herangezogen, welche ein Maß für die Spezifität der Hybridisierung ist:

$$\text{Diskriminationsgröße R} \quad R = \frac{PM - MM}{PM + MM}$$

Die Diskriminationsgröße R wird für jedes Sondenpaar eines Sondensets berechnet und mit Hilfe eines nicht-parametrischen Wilcoxon Rang-Tests (Wilcoxon 1945) jeweils mit einem von Affymetrix empfohlenen Wert $\tau = 0,015$ verglichen. Je eindeutiger R aller Sondenpaare über τ liegt desto kleiner wird das Signifikanzniveau und desto verlässlicher hat das Sondenset Transkripte detektiert. Bei p-Werten $< 0,04$ gelten die Transkripte als anwesend (P), p-Werte zwischen 0,04 und 0,06 entsprechen einer marginalen Expression (M) und p-Werte $> 0,06$ weisen ein Transkript als abwesend (A) aus. Sondenpaare, deren Signalintensität sich jenseits der Sättigungsgrenze für den GeneChip befinden, werden von der Berechnung ausgeschlossen. Die von Affymetrix empfohlenen Grenzwerte für p können vom Benutzer verändert werden, was sich in der vorliegenden Studie nur bei der Genom-Analyse als nötig herausstellte (s. Ergebnisse & Diskussion III.2.2). Je niedriger die Grenzwerte gesetzt werden, desto strenger sind die Kriterien für einen als anwesend ausgegebenen Sequenzabschnitt. Die empfohlenen Grenzwerte wurden anhand ihrer Güte für GeneChip Hybridisierungen bestimmt, die von Affymetrix nach dem experimentellen Aufbau eines Lateinischen Quadrates durchgeführt wurden. Verschiedene Konzentrationen unterschiedlicher cDNAs wurden dazu in einen komplexen cDNA Hintergrund eingemischt und mit Hefe-, Mensch- und *E. coli*-GeneChips hybridisiert.

Die Signalintensität repräsentiert die Transkript-Anzahl eines spezifischen Gens. Die Berechnung beruht auf der *One-Step Tukey's Biweight*-Methode (Mosteller & Tukey 2002): Aus der MM-Intensität wird dabei ein sogenanntes Streusignal berechnet, das von der PM-Intensität subtrahiert wird. Die logarithmierten Werte der so bereinigten PM-Intensitäten werden dann entsprechend ihres Abstandes zum Median des gesamten Sondensets gewichtet. Der Wert eines Sondenpaars erhält umso mehr Gewicht, je näher er dem Median des gesamten Sondensets kommt. Damit vermeidet man die Überbewertung von „Ausreißern“. Der Durchschnitt aus den gewichteten Intensitätswerten repräsentiert dann die angegebene

Signalintensität. Weist ein MM ein höheres Signal als der PM auf, wird das Signal durch einen auf dem gewichtete Mittel aus PM und MM eines Sondensets basierenden Wert korrigiert (MAS 5.0: *imputing*).

II.5.7. Paarvergleiche von GeneChip Hybridisierungen

II.5.7.1. Normalisierung

In einem Vergleichsexperiment werden zwei GeneChip-Hybridisierungen miteinander verglichen, um Unterschiede der Genexpression zu detektieren und zu quantifizieren. Dabei entsteht jedoch folgendes Problem: Durch nicht vermeidbare leichte Unterschiede in der Menge und Markierung der hybridisierten cDNAs sowie durch Ungenauigkeiten der verwendeten GeneChips entsteht eine Fehlervarianz, die aus den Expressionswerten herauspartialisiert werden muß, um die Hybridisierungen einer Versuchsreihe untereinander vergleichbar zu machen. Dazu wird eine lineare Normalisierung vorgenommen, bei der ein Faktor bestimmt wird, der durch Multiplikation mit der mittleren Signalintensität eines jeden GeneChips einen willkürlich gesetzten Eichwert (hier: 150) erreicht. Mit diesem Faktor werden anschließend alle Signalintensitäten auf dem GeneChip mutipliziert. Um den Fehler zu korrigieren, der mit der globalen Normalisierung aller Sonden mit ihren unterschiedlichen Hybridisierungseigenschaften auf einen einzigen Durchschnittswert einhergeht, wird ein Korrekturwert (MAS 5.0: *perturbation value*) eingeführt. Anhand dieses Korrekturwertes (empfohlen wird 1,1) wird der gewählte Eichwert nach oben und unten korrigiert, um schließlich drei Eichwerte zu erhalten. Signalintensitätsunterschiede werden unter Verwendung dieser drei Eichwerte bestimmt und der konservativste der drei erhaltenen p-Werte wird zur Qualitätsabschätzung der differentiellen Geneexpression verwendet.

II.5.7.2. Bestimmung der differentiellen Expression

Bei dem Vergleich von Signalintensitäten verschiedener Hybridisierungen werden entsprechend den Prinzipien zur Detektion von Genexpressionen (s. II.5.6.2) mit den quantitativen Signalintensitäts-Verhältnissen sowie ihrer qualitativen Beurteilung zwei voneinander unabhängige Kennwerte erhoben.

Die Entscheidung, ob ein Gen reguliert ist oder nicht, wird durch die qualitative Beurteilung einer differentiellen Genexpression (MAS 5.0: *change*) und ihres Signifikanzniveaus (MAS 5.0: *change p-value*) wiedergegeben. Ein Transkript-Vergleich kann eine Erhöhung (MAS 5.0: *increased*, I), eine Verminderung (MAS 5.0: *decreased*, D), eine geringe Erhöhung (MAS 5.0: *marginal increased*, MI), eine geringe Verminderung (*marginal decreased*, MD) und keinerlei Veränderung (MAS 5.0: *not changed*, NC) als Ergebnis haben. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus jedes Vergleichs werden aufgrund des Normalisierungs-Korrekturwertes (s. II.5.7.1) insgesamt drei einseitige Wilcoxon Rang-Tests durchgeführt. Der konservativste p-Wert wird verwendet, um die Qualität der differentiellen Genexpression zu definieren. Er wird dazu mit den folgenden Signifikanzniveaus verglichen:

P-Werte $< 0,0025$ geben eine erhöhte (I), p-Werte zwischen $0,0025$ und $0,003$ eine kaum erhöhte (MI), p-Werte zwischen $0,003$ und $0,997$ eine nicht veränderte (NC), p-Werte zwischen $0,997$ und $0,9975$ eine kaum verminderte (MD) und p-Werte $> 0,9975$ eine verminderte (D) Expression an.

Die Höhe der differentiellen Expression eines Sondensets auf zwei miteinander verglichenen GeneChips wird als \log_2 transformierte Signalintensitäts-Verhältnisse (MAS 5.0: *signal log ratio*) angegeben. Die Berechnung basiert wiederum auf der *One-Step Tukey's Biweight*-Methode: Die \log_2 -transformierten Intensitäts-Verhältnisse aller Sondenpaare werden entsprechend ihres Abstandes zum Median des gesamten Sondensets gewichtet, was auch hier die Überbewertung von „Ausreißern“ vermeidet. Der Durchschnitt der gewichteten Intensitätswerte entspricht den \log_2 transformierten Signalintensitäts-Verhältnissen. Mit der *One-Step Tukey's Biweight*-Methode ist es möglich eine Schätzung über die Variation der Daten zu geben. Damit können zusätzlich zum Durchschnitt der \log_2 transformierten Signalintensitäts-Verhältnisse Angaben über die unteren und oberen Grenzen eines 95 % Konfidenz-Intervalls getroffen werden (MAS 5.0: *signal log ratio low* bzw. *signal log ratio high*).

Die von der MAS 5.0 berechneten Werte werden tabellarisch in der .CHP Datei aufgelistet (Abb. 2.7).

	Analysis Name	Probe Set Name	Signal	Detection	Detection p-value	Stat Common Pairs	Signal Log Ratio	Signal Log Ratio Low	Signal Log Ratio High	Change	Change p-value
1744	MHHstat45ag34	PA1715_pscB_at	8.7	A	0.789211	13	-5.3	-6.9	-3.7	D	0.999996
1745	MHHstat45ag34	PA1716_pscC_at	143.0	A	0.086477	13	-3.1	-4.5	-1.7	D	0.999934
1746	MHHstat45ag34	PA1717_pscD_at	73.6	A	0.723753	13	-3.8	-5.0	-2.6	D	0.999996
1747	MHHstat45ag34	PA1718_pscE_at	42.4	A	0.513937	13	-5.1	-6.2	-4.0	D	0.999995
1748	MHHstat45ag34	PA1719_pscF_at	56.0	A	0.809824	13	-4.2	-5.5	-2.8	D	0.999993
1749	MHHstat45ag34	PA1720_pscG_at	68.7	A	0.430652	13	-4.7	-6.4	-3.0	D	0.999996
1750	MHHstat45ag34	PA1721_pscH_at	75.2	A	0.376576	13	-3.0	-4.2	-1.7	D	0.999994
1751	MHHstat45ag34	PA1722_pscI_at	131.3	A	0.300090	13	-3.1	-4.4	-1.9	D	0.999996
1752	MHHstat45ag34	PA1723_pscJ_at	221.6	P	0.001488	13	-2.1	-2.8	-1.3	D	0.999820
1753	MHHstat45ag34	PA1724_pscK_at	63.0	A	0.376576	13	-2.9	-4.2	-1.6	D	0.999991
1754	MHHstat45ag34	PA1725_pscL_at	23.7	A	0.649648	13	-4.0	-6.4	-1.5	D	0.999946
1755	MHHstat45ag34	PA1726_bgkK_at	334.4	P	0.007953	13	0.5	-0.0	1.0	NC	0.099817
1756	MHHstat45ag34	PA1727_at	124.6	M	0.057926	13	1.5	0.7	2.4	MI	0.002677
1757	MHHstat45ag34	PA1728_at	81.8	A	0.124432	13	0.5	-0.3	1.3	NC	0.414540
1758	MHHstat45ag34	PA1729_at	357.5	P	0.009612	13	0.6	-0.1	1.3	NC	0.319227
1759	MHHstat45ag34	PA1730_at	9.5	A	0.972688	13	-0.5	-0.9	-0.1	NC	0.662416
1760	MHHstat45ag34	PA1731_at	100.9	A	0.403383	13	4.4	2.7	6.2	NC	0.026011
1761	MHHstat45ag34	PA1732_at	165.2	P	0.032015	13	0.9	0.4	1.5	NC	0.007125
1762	MHHstat45ag34	PA1733_at	67.0	A	0.403383	13	0.4	-0.3	1.2	NC	0.219277
1763	MHHstat45ag34	PA1734_at	76.6	A	0.649692	13	0.4	-0.5	1.2	NC	0.500000
1764	MHHstat45ag34	PA1735_at	48.2	A	0.569348	13	1.1	-0.4	2.5	NC	0.134621
1765	MHHstat45ag34	PA1736_at	120.4	M	0.043430	13	1.8	0.5	3.2	I	0.000657
1766	MHHstat45ag34	PA1737_at	78.7	A	0.350352	13	2.9	1.4	4.4	NC	0.008195
1767	MHHstat45ag34	PA1738_at	18.8	A	0.723753	13	2.1	0.3	3.9	NC	0.048099
1768	MHHstat45ag34	PA1739_at	16.8	A	0.901974	13	1.3	-0.3	2.9	NC	0.234581
1769	MHHstat45ag34	PA1740_at	10.2	A	0.983477	13	-1.4	-2.5	-0.2	NC	0.505066

Abb. 2.7 Auszug aus einer .CHP Datei eines Paarvergleiches.

Analysis name gibt die verglichenen GeneChip Hybridisierungen an (MHHstat45 wurde mit 34 verglichen). Der *probe set name* entspricht der PA-Nummer bzw. GENBANK-Eintrag sowie dem Namen eines Gens. Neben den Berechnungen des Paarvergleiches (*signal log ratio*, *signal log ratio low*, *signal log ratio high*, *change* und *change p-value*) werden auch die Berechnungen einer der beiden zugrundeliegenden Hybridisierungen (hier: MHHstat45) angegeben (*signal*, *detection*, *detection p-value*), die Referenz-Hybridisierung (hier: 34) wird nicht aufgeführt.

II.5.8. Auswertung eines Kreuzvergleichs von GeneChip Hybridisierungen

Es wurden pro Morphotyp von *P. aeruginosa* 20265 und Wachstumsphase je zwei GeneChips hybridisiert. Für den Vergleich zweier Morphotypen pro Wachstumsphase standen somit vier Hybridisierungen zur Verfügung. Die Hybridisierungen wurden einem Kreuzvergleich unterworfen (Abb. 2.8).

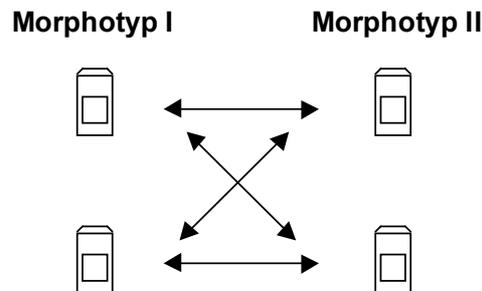


Abb. 2.8 Kreuzvergleich von GeneChip Hybridisierungen als Grundlage der Bestimmung von differentiell regulierten Genen.

Gene wurden als differentiell reguliert betrachtet, wenn sie innerhalb eines Kreuzvergleichs folgende Voraussetzungen erfüllten:

1. Alle Einzelvergleiche müssen eine signifikante differentielle Expression aufweisen, d.h. kein Einzelvergleich darf als „nicht verändert“ (NC) qualitativ beurteilt sein.
2. Alle Einzelvergleiche müssen ein \log_2 transformiertes Signalintensitäts-Verhältnis (*signal log ratio*) ≥ 1 (entspricht Signalintensitäts-Verhältnis ≥ 2) aufweisen. Dieser Wert wurde als Auflösungsgrenze von GeneChips vom Hersteller Affymetrix angegeben (s. Ergebnisse & Diskussion III.2.1) (Lipshutz *et al.* 1999).
3. Es dürfen keine Signalintensitäten miteinander verglichen werden, wenn für beide keine signifikante Expression (*detection* = A) nachgewiesen wurde. MAS 5.0 errechnet eine differentielle Regulation unter Umständen auch für Gene, die in beiden Hybridisierungen eines Vergleiches nicht signifikant exprimiert wurden.
4. RNA-Spezies mit einer Länge von unter 200 bp (5S rRNA und tRNAs) wurden generell nicht berücksichtigt, da diese durch die gewählte RNA-Präparationsmethode nicht verlässlich isoliert werden konnten (s. II.3.2).

Um diese und weitere Auswahlabfragen ausführen zu können, wurden die Daten aller Paarvergleiche in die relationelle Datenbank MICROSOFT ACCESS 97 eingelesen. Dadurch konnten die Ergebnisse auch mit von www.pseudomonas.com bezogenen aktuellen Daten der funktionellen Gen-Annotationen verknüpft werden. Für die endgültige tabellarische Darstellung der differentiell regulierten Gene wurden die \log_2 transformierten Signalintensitäts-Verhältnisse (*signal log ratios*) in MICROSOFT EXCEL 97 in lineare Signalintensitäts-Verhältnisse umgerechnet, sowie ihre arithmetischen Mittel und ihre Standardabweichungen bestimmt.

II.5.9. Software und Datenbanken zur funktionellen Annotation differentiell regulierter Gene

Folgende bioinformatische Anwendungen und Datenbanken halfen bei der anschließenden Deutung der Genexpressions-Daten:

Software

- BLAST (Homologie-Suche)
unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> oder <http://blast.genome.ad.jp/> (Altschul *et al.* 1990; Altschul *et al.* 1997)
- Cluster-Analyse mit CLUSTER und TREEVIEW *download* unter <http://rana.lbl.gov>. (Eisen *et al.* 1998)

Datenbanken

- *P. aeruginosa* Genom-Datenbanken
 - PSEUDOMONAS GENOME PROJECT DATABASE unter <http://www.pseudomonas.com> (Benson *et al.* 2002)
 - PSEURECA (Reannotation *P. aeruginosa* Genom) unter <http://maine.ebi.ac.uk:8000/services/pseureca/> (Weinel *et al.* 2003)
- Speziesübergreifende Genom-Datenbanken
 - GENBANK (Gen- und Protein Datenbank) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Benson *et al.* 2002)
 - NETAFFX (Sequenzen und Annotationen der GeneChip Sonden) unter <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>
 - SWISSPROT (Protein-Datenbank) unter <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/> (Bairoch & Apweiler 1996; O'Donovan *et al.* 2002)
 - COG (Datenbank von Clustern orthologer Gene) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/> (Tatusov *et al.* 2001)
 - PFAM (Proteinfamilien-Datenbank) unter <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml> (Bateman *et al.* 2002)
 - STRING (Datenbank möglicherweise interagierender Gene bzw. Proteine) unter http://dag.embl-heidelberg.de/newstring.cgi/show_input_page.pl (Snel *et al.* 2000)
 - KEGG (Kyoto Enzyklopädie von Genen und Genomen) unter <http://www.genome.ad.jp/kegg/> (Kanehisa *et al.* 2002)

II.6. Chemikalien und Materialien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Riedel-de Haen, Fluka oder Serva bezogen; sie hatten den Reinheitsgrad 'reinst' oder 'p.a.'. Besondere Chemikalien, Enzyme und Materialien stammten von folgenden Firmen:

Affymetrix	Enzo BioArray Terminal Labeling Kit, <i>P. aeruginosa</i> GeneChip, Oligonukleotid B2
Amersham Pharmacia Biotech	Desoxynukleotide, Hybond N+ Nylonmembran, OnePhorAll-Puffer, RNase-freie DNase, TEMED
Ambion	SUPERaseIn (RNase Inhibitor)
Becton Dickinson	Columbia Blut-Agar
Biozym	SeaKem GTG Agarose
Difco	Agar, Bacto-Pepton, Hefeextrakt
InVitec	<i>Taq</i> -Polymerase
Kodak	Biomax Röntgenfilm
Invitrogen	Bromphenolblau, Gentamycin, MOPS, <i>Random Primer</i> , Rinderserumalbumin, SuperScript II Reverse Transkriptase, RNA-Größenstandard, Serva Blau G-250, Xylencyanol FF
Molecular Probes	Streptavidin-Phycoerythrin, SYBRGreen, Gelb-Filter
MWG-Biotech	Oligodesoxynukleotide
New England Biolabs	DNA-Längenstandards, Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase
Pierce Chemical	Streptavidin
Promega	Herings-Sperma DNA, RNase Inhibitor, <i>Pfu</i> -Polymerase
Qiagen	Plasmid Spin Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, RNeasy Kit, RNase
Roche Molecular Biochemicals	alkalische Phosphatase, DNA Labelling and Detection Kit, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, RNase-freie DNaseI
Roth	Acrylamid-Lösungen (Rotiphorese-Gel 40), Ethidiumbromidlösung, Phenol-Lösungen (Rotiphenol), DEPC
Sigma	Ziegen IgG
Stratagene	pBluescriptKS
Vector Laboratories	Biotin anti-Streptavidin

III. Ergebnisse und Diskussion

III.1. Wachstumsparameter und phänotypische Unterschiede der klonalen Morphotypen von *P. aeruginosa* 20265 bei der Anzucht in Flüssigmedium

Die geringe Koloniegröße von *Small colony variants* (SCVs) auf Festmedien dient als erstes Klassifizierungsmerkmal dieser phänotypischen Variante (vgl. Abb. 1.1). Ob dieser Phänotyp sich auch in einem besonders langsamen Wachstum in Flüssig-Medien widerspiegelt sollte zunächst überprüft werden. Dazu wurden verschiedene Wachstumsparameter des in dieser Studie untersuchten Modell-SCVs *P. aeruginosa* 20265 und seiner klonalen Morphotyp-Varianten nach Wachstum in Vogel-Bonner Minimal-Medium ermittelt. Diese Daten waren darüber hinaus für eine kontrollierte Anzucht und Ernte für die anschließenden genomweiten Expressionsstudien mit dem *P. aeruginosa* GeneChip essentiell.

Zur Ermittlung von Wachstumsparametern wurden zwei unabhängige Wachstumsexperimente in aeroben Flüssigkulturen mit Vogel-Bonner Minimalmedium bei 37°C durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurden die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}), der Proteingehalt [$\mu\text{g/ml}$] und die Lebendzellzahl pro ml (*colony forming units, cfu*) in den Kulturen bestimmt. Die Ergebnisse wurden gemittelt (Abb. 3.1). Die Kulturen wurden mit in der frühen stationären Phase befindlichen Vorkulturen inokuliert. Dies bewirkte das Ausbleiben einer ausgeprägten lag-Phase.

Die SCV 20265 zeigt auch im flüssigen Medium ein gegenüber dem Wildtyp und der Revertante verlangsamtes Wachstum (Tab. 3.1). Die anhand der Lebendzellzahl-Entwicklung kalkulierte Verdopplungszeit der SCV 20265 weicht höchstwahrscheinlich aufgrund der ausgeprägten autoaggregativen Fähigkeiten von den auf anderen Parametern basierenden Verdopplungszeiten ab.

Tab. 3.1 Verdopplungszeiten klonaler Morphotypen von SCV 20265 in der exponentiellen Phase anhand verschiedener Wachstumsparameter.

	Verdopplungszeit (t_d ; 2 – 6 h) [min]		
	OD_{600}	Proteingehalt	Lebendzellzahl
WT (20265)	78	79	80
SCV 20265	87	84	137
REV (20265)	73	78	78

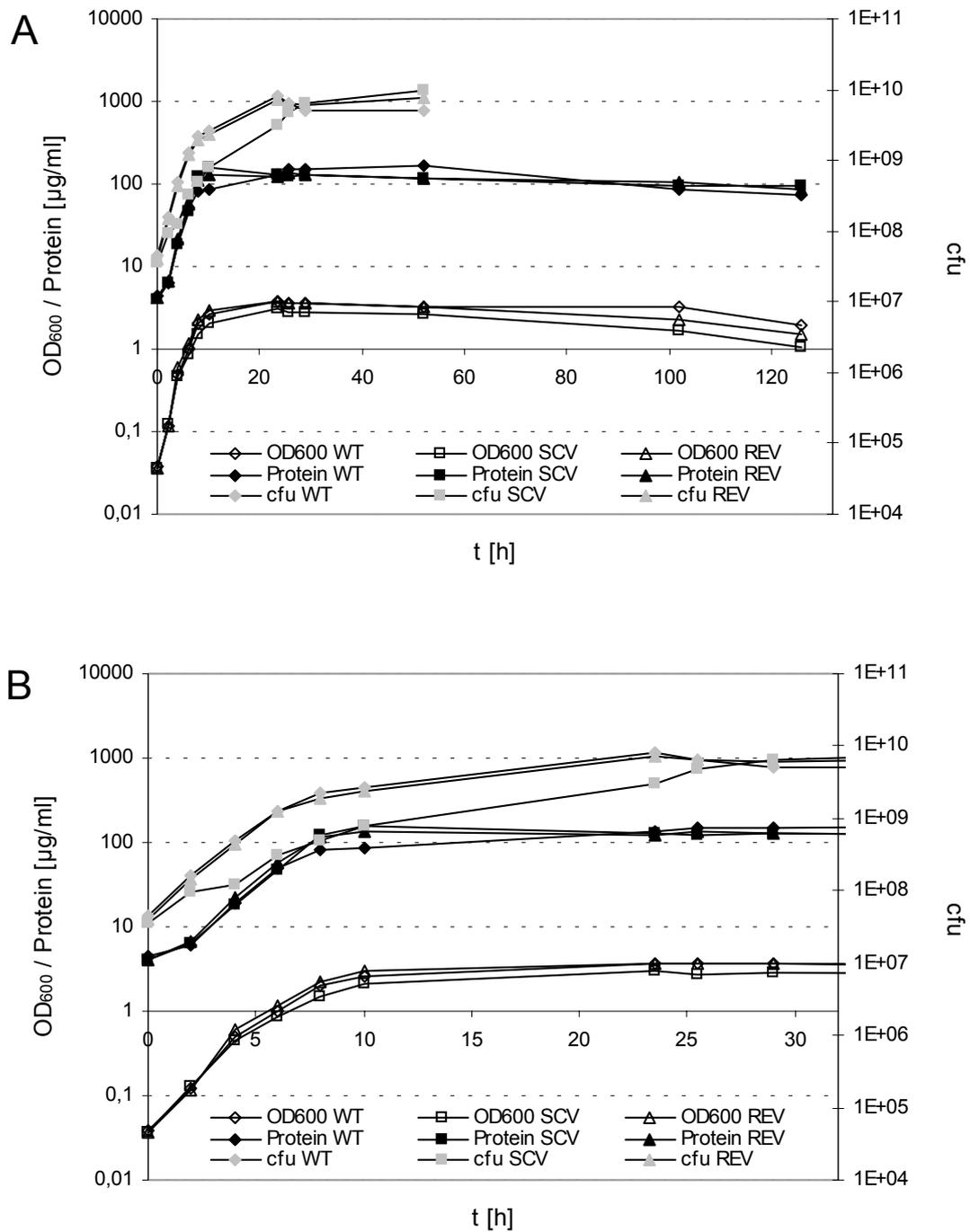


Abb. 3.1 Wachstumskurven von SCV 20265, Wildtyp und Revertante in Vogel-Bonner Minimalmedium.

Die Kultivierung erfolgte über 126 h (A), der Zeitraum bis 30 h ist zur besseren Übersicht noch einmal getrennt abgebildet (B). Folgende Wachstumsparameter wurden bestimmt: cfu, Lebendzellzahl pro ml; OD₆₀₀, optische Dichte bei 600 nm; Proteinkonzentration [µg/ml].

Der Übergang aller Morphotypen von der exponentiellen zur stationären Phase erfolgte nach 8 – 10 h bei einem Start-Inokulum von OD_{600} ca. 0,04. Nach ca. 100 h der Kultivierung begann die Absterbephase, die neben Abnahme der OD_{600} und des Proteingehalts durch starke Blasenbildung und erhöhte Viskosität der Flüssigkultur charakterisiert ist. Dadurch wurde es unmöglich, ab diesem Zeitpunkt eine aussagekräftige Lebendzellzahl-Bestimmung durchzuführen. Alle Morphotypen wiesen ähnliche Absterbekinetiken auf. Kokultivierungsexperimente konnten jedoch eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Überlebensrate der SCV 20265 in der stationären Phase zeigen (Häußler *et al.* 2003). Die SCV 20265 scheint also toleranter gegen die in der stationären Phase auftretenden Mangelbedingungen zu sein sowie besser an die durch Anhäufung toxischer Stoffwechselendprodukte auftretende Stresssituation angepaßt zu sein.

Anhand der ermittelten Wachstumskennwerte wurden die optimalen Zeitpunkte zur Ernte der Zellen für die anschließenden Expressionsanalysen ermittelt. Die Zellen der späten exponentiellen Phase wurden entsprechend bei einer OD_{600} von 0,8, Zellen der frühen stationären Phase nach 27 h geerntet. Dabei entsprechen einer OD_{600} von 1,0 ca. 1×10^9 Zellen. Die Bestimmung der Lebendzellzahl der SCV 20265 war durch die bereits erwähnte außergewöhnliche Autoaggregation stark fehlerbelastet und wurde deshalb für weitere Analysen nicht herangezogen.

Nach ca. 4 h Wachstum setzte in den SCV 20265 -Kulturen eine Biofilm-Bildung an der Glaswand der Kulturgefäße ein (Abb. 3.2). Die besonders ausgeprägten adhärierenden Eigenschaften der SCV 20265, die zur Anheftung an abiotische und biotische Oberflächen und zur Autoaggregation führen, waren in der Arbeitsgruppe um S. Häußler und I. Steinmetz Gegenstand intensiver Untersuchungen (Häußler *et al.* 2003). Dabei stellte sich heraus, daß SCVs in Bezug auf Adhärenz und Hydrophobizität eine sehr heterogene Gruppe bilden (Häußler *et al.* 2003). Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde eine Subgruppe aus einem Kollektiv von 12 SCVs und ihrer klonalen Morphotypen gebildet, in der Triplets klonaler Morphotypen zusammengefaßt sind, deren SCVs besonders aggregative Fähigkeiten zeigten. Die klonalen Morphotypen der SCV 20265 sowie der SCV 10, SCV 29, SCV 52, SCV 8226 und SCV 17997 bilden diese Subgruppe.



Abb. 3.2 SCV 20265, Wildtyp (WT) und Revertante (REV) nach exponentiellem Wachstum in Vogel-Bonner Minimalmedium.

Auf die durch Adhärenz hervorgerufenen Randbildung wird mit Pfeilen hingewiesen. SCV 20265 zeigt die stärkste Randbildung und die ausgeprägteste Pigment-Sezernierung. Die Revertante weist keine Randbildung auf.

Ein weiteres phänotypisches Merkmal der SCV 20265 fiel bei den Kultivierungsexperimenten auf. Nach 24 h zeigten die SCV-Kulturen im Gegensatz zum Wildtyp und der Revertante eine neongelbe Färbung, die auf die Sekretion von Pyoverdin hindeutet (King *et al.* 1954). Im weiteren Verlauf der Kultivierung intensivierte sich die Färbung besonders in der Kultur der SC 20265 und ging nach und nach in einen intensiven Grünton über. Dies weist auf eine Pyocyanin-Sekretion hin (King *et al.* 1954). Diese Unterschiede der klonalen Morphotypen der SCV 20265 in der Produktion von Pyoverdin und Pyocyanin zogen in dieser Arbeit weitere Untersuchungen nach sich (vgl. III.2.6 und III.2.7).

III.2. Genomweite Transkriptanalyse zum phänotypischen Vergleich klonaler Morphotypen von *P. aeruginosa* 20265

III.2.1. Kritische Evaluierung von Expressionsanalysen mit dem *P. aeruginosa* GeneChip

Die Reliabilität und Validität transkriptioneller Expressionsanalysen von Bakterien erfordert entsprechend robuste Protokolle und ein angemessenes experimentelles Design. Durch die geringe Halbwertszeit bakterieller mRNA von einigen Minuten (Grunberg-Manago 1999), ist die Menge an vorhandener mRNA immer eine Summe aus Transkriptionseffizienz und RNA-Stabilität. Dies stellt besondere Anforderungen an die Schnelligkeit der RNA-Präparation und die restlose Entfernung von RNasen. Darüber hinaus machen leicht auftretende graduelle Unterschiede bei der Bakterien-Anzucht und nachfolgenden Arbeitsschritten es nötig, besondere Sorgfalt bei der Planung und Validierung von Experimenten walten zu lassen. Um sicher sein zu können, daß die erzielten Ergebnisse der Wirklichkeit entsprechen und nicht Folge von zufälligen Ereignissen sind, ist die beste Kontrolle immer die Wiederholung des gesamten Experiments, während Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen könnten, so weit wie möglich konstant gehalten werden müssen (Lee *et al.* 2000; Beissbarth *et al.* 2000).

Der Einfluß von geringen Fluktuationen der Kulturbedingungen (Nährstoffangebot, Temperatur, Zell-Vitalität) und der RNA-Präparation auf gemessene Hybridisierungssignale wurde durch das Poolen von RNA aus drei Kulturen minimiert (Abb. 3.3). Diese Vorgehensweise wurde bisher nur bei Expressionsanalysen nicht klonaler Organismen angewendet, wo sie die individuellen Unterschiede der einzelnen Organismen unterdrücken soll. Dieses Vorgehen wurde in der vorliegenden Studie übernommen, um die kulturbedingten Abweichungen der Genexpressionen zu reduzieren.

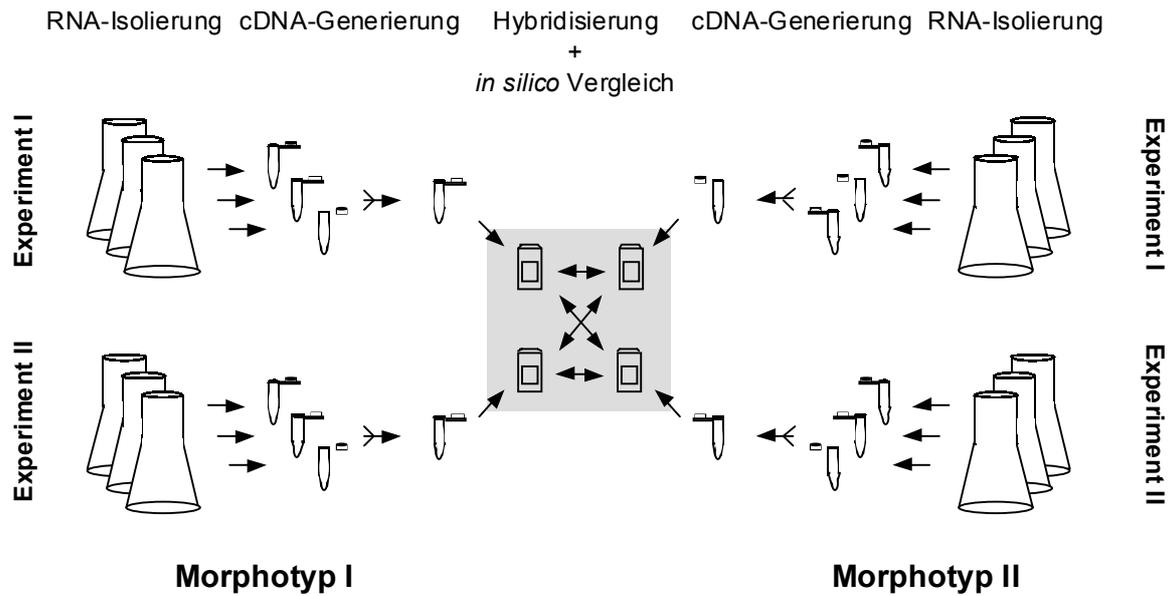


Abb. 3.3 Design einer gegenüber biologisch und experimentell bedingten Schwankungen robusten Analyse differentieller Genexpression mit Hilfe des *P. aeruginosa* GeneChips.

Vergleiche der Signalintensitäten aller Gene (N) von Replikaten (X , Y) untereinander ergaben Pearson Korrelationen von mindestens $r = 0,97$ (Abb. 3.4).

Pearson Korrelation r

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\left(\sqrt{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}\right) \left(\sqrt{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2}\right)}$$

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Daten bereits veröffentlichter GeneChip Analysen (z. B. [Lockhart *et al.* 1996; Lee *et al.* 2001]) und zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit der GeneChip Hybridisierungen.

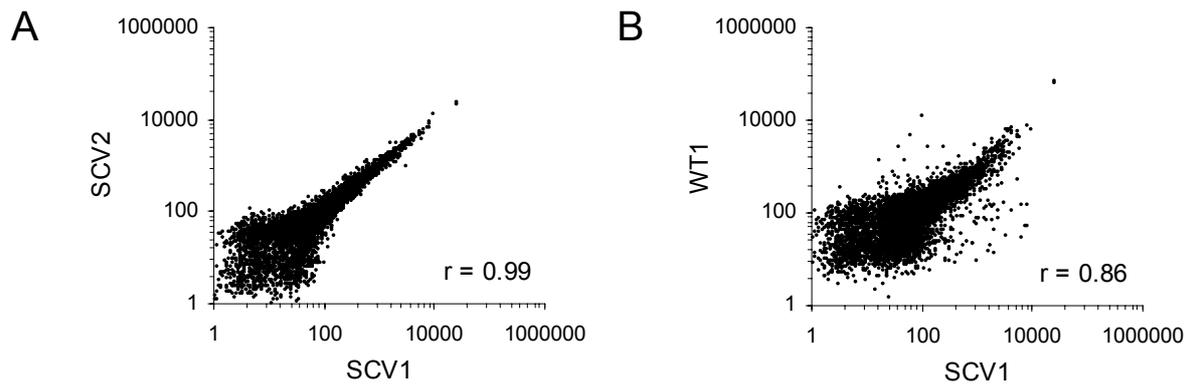


Abb. 3.4 Vergleich der normalisierten Signalintensitäten von GeneChip Hybridisierungen.

Abgebildet sind Einzelvergleiche von GeneChip Hybridisierungen eines Morphotyps (A) sowie verschiedener Morphotypen (B) nach Wachstum in der exponentiellen Phase. Je geringer die Unterschiede in den einzelnen GeneChip Hybridisierungen sind desto geringer ist die Streuung der normalisierten Signalintensitäten um eine imaginäre Gerade mit der Steigung 1. Die Pearson-Korrelation ist eine Möglichkeit das Ausmaß der Streuung zu messen. Die Wiederholung von Hybridisierungen des gleichen Morphotyps (A) zeigt eine hohe Übereinstimmung der Signalintensitäten oberhalb von 100 Fluoreszenzeinheiten, während der Vergleich verschiedener Morphotypen (B) eine große Streuung der Signalintensitäten mit einigen extrem starken Abweichungen aufweist. r , Pearson Korrelation aller Signalintensitäten der verglichenen Experimente

Durch Unterschiede in der cDNA-Generierung, der Hybridisierung und Färbung der GeneChips entstehen weitere Fluktuationen, die durch Wiederholung der Experimente reduziert werden sollen. Außerdem können so eventuelle fabrikationsbedingte Abweichungen der GeneChips untereinander minimiert werden. Pro Morphotyp und Wachstumsstadium wurde dazu je ein zusätzlicher GeneChip mit cDNA aus einem unabhängig generierten RNA-Pool hybridisiert. Durch Kreuzvergleiche der nun insgesamt vier zur Verfügung stehenden GeneChip-Analysen (zwei GeneChips pro Morphotyp und Wachstumsphase, vgl. Abb. 3.3) wurde die Anzahl von Genen, die in Einzelvergleichen noch als signifikant reguliert angesehen werden, drastisch reduziert (Abb. 3.5). Dies veranschaulicht, daß eine oder mehrere Wiederholungen eines Experimentes notwendig sind, um falsch positive Ergebnisse zu minimieren. Die Schnittmenge differentiell regulierter Gene verringert sich mit Zunahme beteiligter Einzelvergleiche asymptotisch und verändert sich vermutlich nach einem vierten Einzelvergleich nicht mehr dramatisch. Daraus ist zu schließen, daß Kreuzvergleiche mit je zwei GeneChips, die als *four-survival method* beschrieben sind (Chen *et al.* 2000; Bakay *et al.* 2002), besonders bei limitierten finanziellen Mitteln zu empfehlen ist. Darüber hinaus zeigt sich, daß vor allem Regulationen von unter 2-fach stark fehleranfällig sind, da sich hier die Abnahme der Schnittmenge differentiell regulierter Gene am eindrucksvollsten präsentierte. Entsprechend wurde zu dem Signifikanz-Kriterium des Wilcoxon Rang Tests (vgl. Material &

Methoden II.5.7.2) eine 2-fache Genregulation als Mindestniveau für die verlässliche Erfassung differentiell regulierte Gene eingeführt. Dieser Wert deckt sich mit dem vom Hersteller Affymetrix angegebenen Auflösungsgrenze von GeneChips (Lipshutz *et al.* 1999).

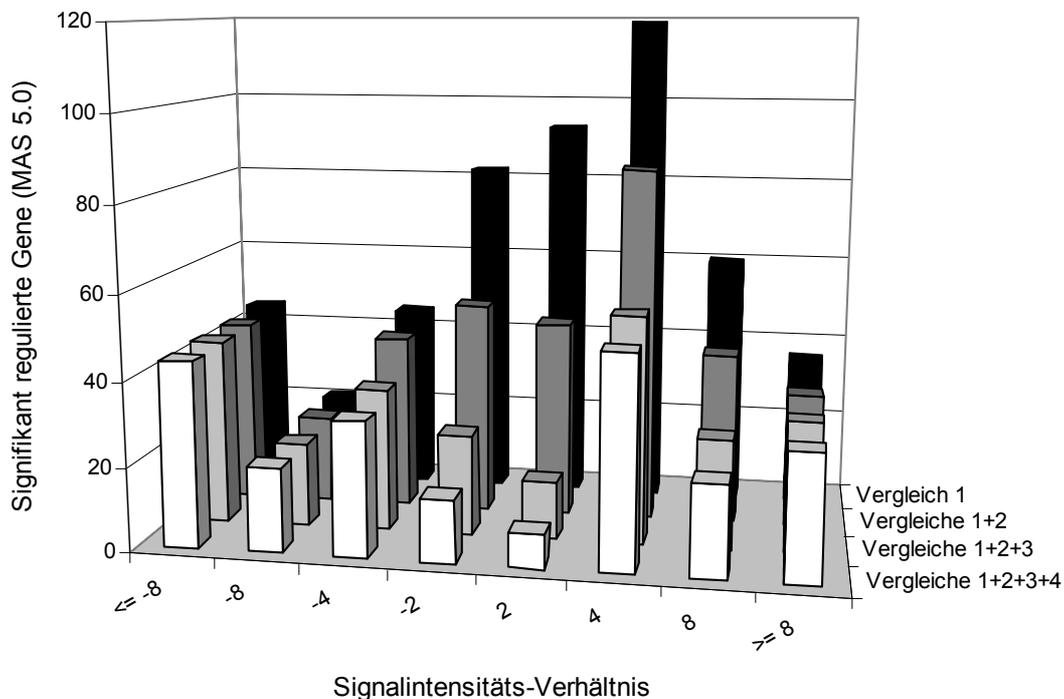


Abb. 3.5 Auswirkung der Einführung von Kreuzvergleichen auf die Anzahl regulierter Gene (Vergleich Wildtyp mit SCV 20265, exponentielle Phase).

Die asymptotische Abnahme der Schnittmenge konsistent regulierter Gene zeigt die Notwendigkeit einer Reproduzierung von Hybridisierungen und belegt, daß die Anwendung von vier Kreuzvergleichen die Rate an falsch positiven Genregulationen minimiert. Diese Abbildung zeigt darüber hinaus, daß eine Genregulation von unter 2-fach selten reproduzierbar ist. MAS 5.0, AFFYMETRIX MICROARRAY SUITE SOFTWARE 5.0

Die Reduzierung von falsch positiven Resultaten ist aufgrund der bereits diskutierten biologischen und experimentellen Fehlerquellen ein bei Microarray Experimenten viel diskutiertes Problem (Wu 2001; Nadon & Shoemaker 2002). Signifikanz-Tests wie der von der Affymetrix Microarray Suite (MAS 5.0) verwendete nicht-parametrische Wilcoxon Rang-Test sollen zur Fehlerminimierung bei DNA-Microarray-Analysen beitragen. Ein Problem ist dabei die hohe Anzahl von Einzeltests (Expression des Gens X unter der Bedingung I im Vergleich zur Expression des Gens X unter der Bedingung II), die bei dem *P. aeruginosa* GeneChip bei 5900 liegt. Diese führt zu einer Kumulation des Fehlers 1. Art (α). Durch diese α -Fehler Kumulierung wird es sehr wahrscheinlich, daß mindestens ein Einzeltest

fälschlicherweise als signifikant ausfällt. Eine Möglichkeit diesem Problem zu begegnen besteht darin, mit Hilfe einer Bonferroni-Korrektur α anhand der Anzahl der Einzeltests zu korrigieren (α/n). Diese Vorgehensweise scheint allerdings zu stringent für viele Microarray Analysen zu sein (Wu 2001), zumal sie nicht berücksichtigt, daß vor allem in Prokaryoten eine große Anzahl von Einzeltestungen aufgrund der Gen-Organisation in Operons nicht unabhängig voneinander sind. Aus diesen Gründen wurden Weiterentwicklungen der Bonferroni-Korrektur vorgestellt, bei denen der kleinste beobachtete p-Wert mit dem striktesten Grenzwert und die verbleibenden p-Werte mit entsprechend sukzessiv fallenden Grenzwerten verglichen werden (Shaffer 1995).

Andere Verfahren beinhalten *resampling* bzw. *bootstrap* Prozeduren (Westfall & Young 1993) oder Verfahren zur Schätzung der Rate falsch positiver Zuweisungen differentieller Genexpression (Tusher *et al.* 2001). Alle diese Prozeduren, Fehler aufgrund multipler Testungen zu korrigieren, erhöhen zwar die Spezifität, erniedrigen jedoch die Sensitivität der Analysen, so daß der Anteil an falsch negativen Datensätzen unter Umständen drastisch zunimmt. Um diesen Problemen der klassischen Statistik zu begegnen, wurde auch auf dem Bayes Theorem basierende Statistik (Shoemaker *et al.* 1999) auf Microarray-Daten angewendet (Long *et al.* 2001). Erst kürzlich wurde eine benutzerfreundliche Software präsentiert, die eine routinemäßige Anwendung dieses Konzeptes ermöglicht (Moloshok *et al.* 2002).

Ein weiterer Ansatz besteht darin, die Rate an falsch positiven Datensätzen mit Hilfe von Hybridisierungen unabhängig voneinander generierter cDNAs derselben Zellart abzuschätzen (Zapala *et al.* 2002). In Anlehnung an dieses Vorgehen wurden in der vorliegenden Studie zwei solcher Vergleiche mit dem Wildtyp und der Revertante (jeweils exponentielle Phase) durchgeführt. Dabei wurden je drei hybridisierte GeneChips einem dreifachen Kreuzvergleich unterzogen. Es ergab sich eine Rate von 0,0 % irrtümlich als differentiell reguliert definierten Genen. Aufgrund des finanziellen Aufwands konnte dieses Experiment nicht für alle Morphotypen und Wachstumsphasen wiederholt werden. Dieses initiale Ergebnis spricht jedoch dafür, daß in den vorliegenden Kreuzvergleich-Analysen das multiple Testen nur einen sehr geringen Anteil an falsch positiven Aussagen nach sich zieht.

Neben der Signifikanz der Regulation ist die Detektionssensitivität der Expressionssignale und die damit verbundene Regulationshöhe, d.h. der Expressionsunterschied in zu vergleichenden Zelltypen (hier Morphotypen), von Interesse. Affymetrix GeneChips haben eine Detektionssensitivität von etwa 1 pM Transkript. Diese Menge wird verlässlich detektiert und das entsprechende Gen korrekt als abgelesen definiert (*present*) (Chudin *et al.* 2002; Hill *et al.* 2000; Affymetrix 2001a). Anhand der von S. Lory (Boston, USA) zur Verfügung gestellten Kontrolltranskripte (vgl. Material & Methoden Tab. 2.6) konnte dieses Detektionslimit für die *P. aeruginosa* GeneChips der zweiten Generation weitgehend bestätigt werden. Der Konzentrationsbereich, in dem für GeneChips eine lineare Zunahme der Expressionshöhe zu verzeichnen ist, liegt bei 1 pM bis ca. 512 pM, jedoch werden nur in einem Bereich von 2 pM bis 32 pM Regulationsniveaus von 2-fach und zwischen 0,5 pM und 128 pM Regulationsniveaus von 4-fach robust als erhöhte Expression (*increased*) wiedergegeben (Affymetrix 2001a). Für die Routineanwendung im Labor wird ein Richtwert von ≥ 2 -fach differentieller Genexpression als mutmaßlich gering fehlerbelastet angegeben (Lipshutz *et al.* 1999). Die Einführung eines zusätzlichen Schwellenwerts bei einem Regulationsniveau von ≥ 2 -fach sollte die Signifikanz der erhaltenen Daten weiter erhöhen. Hier muß jedoch einschränkend bemerkt werden, daß für die meisten Gene Erkenntnisse fehlen, ab welcher Höhe die Änderung des Expressionsniveaus eine Rolle spielt. Somit bleibt fraglich, ob die Einführung eines Schwellenwertes von ≥ 2 -fach zur Analyse differentiell exprimierter Gene immer biologische Relevanz besitzt, d.h. ob Regulationen unter diesem Niveau generell keine Auswirkungen für die Zelle haben.

In der Anzahl von zeitgleich ablaufenden Expressionsanalysen ist die DNA-Microarray Analyse konkurrenzlos, sie muß sich jedoch bezüglich der detektierten Signaldifferenzen mit konventionellen Methoden der Genexpressionsanalyse wie Northern Blot Analysen, RNase Protektionsversuchen und Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktionen (RT-PCR) messen lassen. Viele Studien konnten bei Vergleichen von DNA Microarray Daten mit Ergebnissen konventioneller Methoden eine hohe Übereinstimmung feststellen (Chen *et al.* 1998; Iyer *et al.* 1999; Schena *et al.* 1996; Taniguchi *et al.* 2001; Wilson *et al.* 1999).

Eine Auswahl von Genen, die in den komparativen Genexpressionsanalysen auffielen (*hasAp*, *fur*, *pilA*), in Bezug zum SCV-Phänotyp von Interesse waren (*hemB*) oder als Kontrolle für mutmaßlich nicht regulierte Gene dienten (*gltA*) wurden mittels Northern Hybridisierungen untersucht und mit Ergebnissen von GeneChip Analysen verglichen (Tab. 3.2). Beide Methoden sind in Bezug auf die Regulationsqualität (korrekte Detektion hoch- bzw.

herunterregulierter Gene), Regulationshöhe und Reproduzierbarkeit vergleichbar. Dabei fiel besonders auf, daß bei einer Regulationshöhe von ca. ≥ 2 -fach eine 100 %ige Übereinstimmung beider Methoden bezüglich der Regulationsqualität zu verzeichnen war.

Tab. 3.2. Vergleich der Signalintensitäts-Verhältnisse von Northern Blot und GeneChip Analysen (exponentielle Wachstumsphase).

Gen ^b	Protein ^b	SCV / WT ^a		SCV / REV ^a	
		Northern Blot	GeneChip	Northern Blot	GeneChip
PA1580 (<i>gltA</i>)	Citrat Synthase	-1,2 (0,5)	1,4 (0,1)	-2,0 (0,5)	-1,3 (0,1)
PA3407 (<i>hasAp</i>)	Häm-Aufnahme Protein	-5,1 (1,3)	-2,7 (0,5)	3,1 (0,3)	2,5 (0,8)
PA4764 (<i>fur</i>)	Eisenaufnahme Regulationsprotein	-1,3 (0,3)	1,5 (0,1)	1,3 (0,3)	2,7 (0,4)
PA5243 (<i>hemB</i>)	δ -Aminolevulinsäure Dehydratase	1,0 (0,2)	1,3 (0,2)	-1,4 (0,2)	-1,1 (0,5)
L37109 (<i>pilA</i>)	Pilin Typ IV	18,3 (0,0)	7,3 (4,2)	-1,6 (0,2)	-1,1 (0,1)

^a Angegeben ist das arithmetische Mittel der Signalintensitäts-Verhältnisse, errechnet aus 3 unabhängigen Northern Hybridisierungen bzw. aus vier GeneChip-Kreuzvergleichen. In der Klammer befindet sich die Standardabweichung. Hochregulierte Gene haben positive, herunterregulierte Gene negative Werte. Für GeneChip-Analysen wurde für diese Gegenüberstellung die Signifikanz der Regulationsqualität nicht berücksichtigt.

^b PA-Nummer und Genname wurden überwiegend vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen. Für *pilA* als nicht-PAO1 Gene wurde statt PA-Nummer der GenBank-Eintrag angegeben.

III.2.2. Abdeckung des *P. aeruginosa* 20265 Genoms durch den *P. aeruginosa* GeneChip

Wie bereits erwähnt schwanken die Genomgröße und die Anzahl der Gene innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* (Schmidt *et al.* 1996), wohingegen die Sequenzdiversität ausgewählter konservierter Gene von *P. aeruginosa* sehr gering ist (Kiewitz & Tümmler 2000) (vgl. Einleitung I.1). Zur genomweiten Expressionsanalyse von *P. aeruginosa* 20265 SCV mit Hilfe des *P. aeruginosa* GeneChips muß berücksichtigt werden, daß dieser Oligonukleotid-Array auf der Genom-Sequenz des Stammes PAO1 (Stover *et al.* 2000) beruht. Neben den 5549 PAO1 spezifischen Genen sind nur eine begrenzte Auswahl von 117 Genen anderer Stämme von *P. aeruginosa* auf dem GeneChip repräsentiert, deren Sequenz in der Datenbank GENBANK verfügbar sind (vgl. <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). Es stellte sich also die Frage, wieviele der Gene von SCV 20265 und seiner klonalen Morphotypen mit dem GeneChip analysierbar sind.

Um diese Frage zu beantworten, wurde das Genom der SCV 20265 mit einer Restriktionsendonuklease fragmentiert und mit dem GeneChip hybridisiert. Die Genomgröße der SCV 20265 (zum Genotyp Klon G zugehörig), wurde über einen Vergleich der *SpeI*-Restriktionsfragmentgrößen nach Auftrennung im Pulsfeld-Gel mit dem *P. aeruginosa* Stamm C des Genotyps Klon C (Schmidt *et al.* 1996; B. Tümmler nach pers. Mitteilung) abgeschätzt. Die Genomgröße von *P. aeruginosa* 20265 beträgt ca. 6600 kb und ist damit 6 % größer als das Genom von *P. aeruginosa* PAO1.

Für die Untersuchung, welche und wieviele Gene von *P. aeruginosa* 20265 auf dem GeneChip repräsentiert sind, wurde das Signifikanzniveau entsprechend der Detektionssignale der nicht-Pseudomonas Gene angepaßt (Tab. 3.3). Anstatt des für die Expressionsanalyse verwendeten p-Wertes zur qualitativen Abschätzung einer Transkript-Präsenz (vgl. Material & Methoden II.5.6.2) wurde somit $p < 0,32$ als Schwellenwert bestimmt. Hybridisierungssignale mit p-Werten $< 0,32$ definieren das entsprechende Gen als „anwesend“.

Tab. 3.3. Signifikanz der Präsenz von Kontroll-Proben nach erfolgter GeneChip-Hybridisierung mit fragmentierter genomischer DNA von *P. aeruginosa* SCV 20265.

Kontroll-Proben (Affymetrix GeneChip)	p-Wert
AFFX-YEL002C_WPB1_at	0,861235
AFFX-YEL018W_at	0,960635
AFFX-YEL024W_RIP1_at	0,32083
AFFX-YFL039C_ACT1_at	0,88284
AFFX-YER148W_SPT15_at	0,951005
AFFX-YER022W_SRB4_at	0,5
AFFX-Athal_GAPDH_at	0,824011
AFFX-Athal_ubq_at	0,64131
AFFX-Athal_actin_at	0,837065
AFFX-Bsubtilis_dapB_at	0,810313
AFFX-Bsubtilis_lys_at	0,32083
AFFX-Bsubtilis_pheB_at	0,97214
AFFX-Bsubtilis_thrC_at	0,397977
AFFX-Bsubtilis_trpD_at	0,849473

Die fettgedruckten p-Werte sind maßgeblich für den anschließend definierten Schwellenwert von $p < 0,32$. Gene mit einem geringeren p-Wert wurden als „anwesend“ im Genom von SCV 20265 definiert.

Nach Adjustierung des Signifikanzniveaus ergab die Hybridisierung, daß 5069 PAO1-Gene (91 % der 5549 PAO1-Gene des GeneChips) und 46 nicht-PAO1-Gene (39 % der 117 zusätzlichen Gene anderer Stämme) signifikant mit dem Genom von 20265 hybridisierten. Die in *P. aeruginosa* 20265 fehlenden PAO1-Gene sind als Cluster gleichmäßig über das gesamte Genom von PAO1 verteilt (vgl. Anhang Abb. 6.1). Bei einer durchschnittlichen Gendichte von einem Gen pro 1125 bp (durchschnittliche Gen-Länge in PAO1 1105 bp) ergeben die mit *P. aeruginosa* 20265 hybridisierenden 5115 Gene eine Größe von ca. 5800 kb, die zusätzlichen 890 kb des Genoms können weitere 800 Gene beinhalten. Der *P. aeruginosa* GeneChip kann somit zur Transkript-Analyse von 5115 Genen verwendet werden, was einer Abdeckung von mindestens 87 % des Gesamtgenoms von *P. aeruginosa* 20265 entspricht. Bei der Durchführung von GeneChip-Experimenten mit *P. aeruginosa* 20265 muß also berücksichtigt werden, daß das Ergebnis zwar einem großen Teil der Expressionssignatur von *P. aeruginosa* 20265 und seinen klonalen Morphotypen unter der jeweiligen Bedingung entspricht, aber kein komplettes Bild liefert.

III.2.3. Überblick der Ergebnisse zur Genexpression im intermorphotypischen Vergleich

Zur genomweiten Untersuchung der verschiedenen klonalen Varianten von *P. aeruginosa* 20265 wurden diese *in vitro* bis zur späten exponentiellen bzw. frühen stationären Phase aerob in Vogel-Bonner Minimalmedium kultiviert (s. III.1). Die Genexpressionssignaturen der Varianten wurden entsprechend ihrer Wachstumsphase miteinander verglichen.

Von den 5115 auf dem GeneChip repräsentierten Genen von SCV 20265 (vgl. III.2.2), wurden 1018 (20 %) in keinem der Experimente mit klonalen Morphotypen von 20265 SCV oder ihren Mutanten exprimiert. Vermutlich wurden die Funktionen dieser Gene unter den gewählten Anzuchtbedingungen nicht benötigt.

Es konnten insgesamt 309 Gene von *P. aeruginosa* PAO1, 8 Gene anderer *P. aeruginosa* Stämme und 2 intergenische Regionen als differentiell reguliert bestimmt werden (s. Anhang Tab. 6.1). Von 42 % dieser regulierten Gene ist die Funktion bislang nicht bekannt, sie werden als „hypothetisch“ beschrieben (Konfidenzklasse 4, www.pseudomonas.com). Anhand der Anzahl differentiell regulierter Gene ließ sich der Ähnlichkeitsgrad der klonalen Morphotypen zueinander bestimmen. Es fiel dabei auf, daß sich die Genexpression von SCV 20265 besonders in der exponentiellen Phase des Wachstums stark von der des Wildtyps unterscheidet (163 Gene differentiell reguliert). Dieser Unterschied zwischen SCV 20265 und Wildtyp konnte auch für die Genexpression in der stationären Phase festgestellt werden, er war hier jedoch mit 83 differentiell exprimierten Genen nicht so ausgeprägt. Weiterhin fällt auf, daß in der stationären Phase die Genexpression von Revertante und SCV 20265 sehr ähnlich ist wohingegen in der exponentiellen Phase keine besonders hohe Ähnlichkeit festgestellt werden kann. Die Morphotyp-Konversion von SCV 20265 zur Revertante wirkt sich also besonders stark auf die exponentielle Phase aus.

Tab. 3.4 Anzahl und Regulationshöhe differentiell exprimierter Gene.

Regulationshöhe		Exponentielle Phase			Stationäre Phase		
		SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV
induziert	≥ 10	38	2	16	1	0	11
	5 – 10	13	17	5	10	0	10
	2 – 5	29	51	18	4	0	40
reprimiert	≥ 10	42	20	18	40	7	26
	5 – 10	18	4	6	20	3	8
	2 – 5	23	1	20	8	1	4
Gesamt		163	95	83	83	11	99

Funktionszuweisungen differentiell regulierter Gene erfolgten über Literatur- und Datenbank-Recherchen. Neben der bereits drei Jahre alten Annotation des *P. aeruginosa* PAO1 Genoms (Stover *et al.* 2000) wurde eine aktuelle Reannotation (Weinel *et al.* 2003) verwendet. Die Deutung aller differentiellen Gen-Regulationen innerhalb der einzelnen klonalen Morphotypen ist vor dem Hintergrund des heutigen Wissensstandes unmöglich. Es können jedoch anhand von ähnlichen Funktionen, Kolokalisierung in Operons oder ähnlicher Regulationsprofile Gene mit geringen Funktions-Informationen mit gut charakterisierten Genen in Zusammenhang gebracht werden.

In der vorliegenden Studie fiel auf, daß der Großteil der Regulationen bekannte Auswirkungen auf die Biofilm-Bildung, auf die Resistenz gegen Oxidantien und Antibiotika sowie auf die Typ III vermittelte Cytotoxizität hat. Differentielle Regulationen von Genen dieser Funktionsklassen könnten zu einer Persistenz der SCV 20265 im Habitat der CF-Lunge beitragen.

III.2.4. Differenziell regulierte Gene der Typ III-vermittelten Proteinsekretion

Das Typ III Sekretionssystem (TTSS) und seine sezernierten Effektorproteine gelten als die prominentesten Pathogenitätsfaktoren von *P. aeruginosa*. Pathogen wirkende Effektorproteine können über das TTSS in das extrazelluläre Milieu oder nach Kontaktaufnahme mit einer eukaryontischen Wirtszelle direkt in diese translociert werden. Solche Sekretionssysteme sind bei Gram-negativen human- und pflanzenpathogenen Bakterien weit verbreitet (Hueck 1998; Cornelis & Van Gijsegem 2000). Zur Injektion in die Wirtszelle werden Proteine zu Strukturen zusammengesetzt, die bei *Salmonella typhimurium* (Kubori *et al.* 2000), *Shigella flexneri* (Tamano *et al.* 2000) und enteropathogenen *E. coli* (Sekiya *et al.* 2001) eine nadelähnliche Form annehmen. Die Struktur des Translokons von *P. aeruginosa* wurde bisher nicht aufgeklärt, jedoch konnte mit dem Hrp Pilus von *P. syringae* erstmals eine pilusartige Struktur als Typ III Translokon identifiziert werden (Jin & He 2001). Aufgrund der hohen Homologie der Translokon-Proteine zu Proteinen des flagellaren Sockels kann die Sekretion von Flagellin und anderen Strukturproteinen im Rahmen der Flagellenassemblierung als Typ III Sekretion definiert werden, *P. aeruginosa* besitzt somit zwei TTSS (Nguyen *et al.* 2000; Aizawa 2001; Plano *et al.* 2001).

Tab. 3.5 Differentielle Expression von Genen der Typ III-vermittelten Proteinsekretion sowie transportierter Effektorproteine bei *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp und Revertante während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase.

Gen ^b	Protein ^b	Exponentielle Phase ^a			Stationäre Phase ^a		
		SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV
PA0044 (<i>exoT</i>) ^d	Exoenzym T	67,1 (27,0)	4,2 (1,5)	-15,3 (7,7)	-	-	-
PA1692	mögliches Translokationsprotein	9,6 (1,2)	3,4 (0,9)	-	-	-	-
PA1694 (<i>pscQ</i>)	Translokationsprotein	57,1 (46,1)	3,8 (1,0)	-20,9 (19,2)	-	-	-
PA1695 (<i>pscP</i>)	Translokationsprotein	7,1 (2,5)	2,6 (0,3)	-2,7 (0,9)	-	-	-
PA1696 (<i>pscO</i>)	Translokationsprotein	40,1 (1,4)	4,2 (0,6)	-10,2 (2,2)	-	-	-
PA1697	ATP-Synthase	10,6 (1,0)	3,4 (0,8)	-3,0 (0,5)	-	-	-
PA1698 (<i>popN</i>) ^d	Protein der äußeren Membran	29,9 (16,1)	5,2 (1,0)	-6,0 (2,6)	-	-	-
PA1699	konserviertes, hypoth. Protein	79,4 (20,4)	4,7 (0,7)	-16,2 (7,6)	-	-	-
PA1700	konserviertes, hypoth. Protein	36,9 (13,6)	5,2 (1,7)	-7,2 (6,0)	-	-	-
PA1701	konserviertes, hypoth. Protein	34,9 (10,3)	4,9 (1,6)	-7,9 (3,4)	-	-	-
PA1702	konserviertes, hypoth. Protein	43,0 (2,8)	7,0 (1,7)	-	-	-	-
PA1703 (<i>pcrD</i>)	Protein des Sekretionsapparates	7,7 (1,1)	3,3 (0,6)	-	-	-	-
PA1704 (<i>pcrR</i>)	Regulatorprotein	28,1 (4,5)	4,5 (0,6)	-	-	-	-
PA1705 (<i>pcrG</i>)	Regulatorprotein	5,9 (2,5)	-	-	-	-	-
PA1706 (<i>pcrV</i>) ^d	sezerniertes Protein	268,2 (173,3)	4,3 (1,0)	-54,7 (55,8)	26,0 (8,2)	-	-8,8 (3,4)
PA1707 (<i>pcrH</i>)	Regulatorprotein	42,7 (7,0)	4,2 (1,0)	-12,6 (3,0)	9,6 (5,4)	-	-
PA1708 (<i>popB</i>) ^d	Translokator-Protein	137,7 (33,4)	3,4 (0,8)	-37,9 (10,7)	7,5 (1,3)	-	-4,2 (0,4)
PA1709 (<i>popD</i>) ^d	Translokator-Protein	60,9 (4,0)	4,6 (1,1)	-12,0 (3,1)	-	-	-
PA1710 (<i>exsC</i>)	Exo S Synthese Protein C Vorstufe	13,1 (2,1)	4,0 (1,5)	-3,3 (0,6)	8,5 (1,5)	-	-5,6 (1,0)
PA1711	hypoth. Protein	11,3 (0,6)	3,2 (0,8)	-3,5 (0,7)	8,2 (0,9)	-	-5,0 (0,9)
PA1712 (<i>exsB</i>)	Exo S Synthese Protein B	5,3 (0,5)	2,8 (0,3)	-	8,2 (3,4)	-	-
PA1713 (<i>exsA</i>) ^c	Transkriptions-Regulator ExsA	5,6 (1,0)	-	-	-	-	-
PA1714 (<i>exsD</i>)	ExsA inhibierendes Protein	14,9 (0,0)	4,9 (1,1)	-3,4 (0,6)	-	-	-
PA1715 (<i>pscB</i>)	Export-Protein	45,7 (7,3)	5,6 (1,0)	-13,2 (3,0)	-	-	-
PA1716 (<i>pscC</i>)	sezerniertes Protein	9,0 (1,6)	3,2 (0,6)	-	-	-	-
PA1717 (<i>pscD</i>)	Export-Protein	24,2 (12,0)	5,6 (0,2)	-3,9 (0,9)	-	-	-
PA1718 (<i>pscE</i>)	Export-Protein	33,2 (2,2)	4,0 (0,2)	-8,5 (0,9)	-	-	-

Tab. 3.5 Differentielle Expression von Genen der Typ III-vermittelten Proteinsekretion sowie transportierter Effektorproteine bei *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp und Revertante während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase (Fortsetzung).

Gen ^b	Protein ^b	Exponentielle Phase ^a			Stationäre Phase ^a		
		SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV
PA1719 (<i>pscF</i>)	Export-Protein	42,3 (27,7)	3,6 (0,9)	-15,3 (11,0)	-	-	-
PA1720 (<i>pscG</i>)	Export-Protein	21,1 (6,0)	6,0 (0,6)	-	-	-	-
PA1721 (<i>pscH</i>)	Export-Protein	9,9 (2,4)	4,5 (1,1)	-	-	-	-
PA1722 (<i>pscI</i>)	Export-Protein	11,5 (3,4)	3,9 (0,9)	-3,9 (1,0)	-	-	-
PA1723 (<i>pscJ</i>)	Export-Protein	4,9 (0,7)	3,8 (0,3)	-	-	-	-
PA1724 (<i>pscK</i>)	Export-Protein	6,4 (1,4)	3,5 (0,8)	-	-	-	-
PA1725 (<i>pscL</i>)	Export-Protein	12,3 (4,3)	4,0 (0,7)	-	-	-	-
PA2191 (<i>exoY</i>) ^d	Adenylate Cyclase	31,7 (10,6)	6,8 (2,7)	-	-	-	-
PA3841 (<i>exoS</i>) ^d	Exoenzym S	90,6 (33,3)	3,9 (0,8)	-22,2 (11,2)	5,5 (1,9)	-	-
PA3842	mögliches Chaperon	29,6 (11,6)	3,2 (0,8)	-8,6 (3,8)	-	-	-
PA3843	hypoth. Protein	65,4 (6,4)	4,2 (0,9)	-16,8 (3,5)	-	-	-

^a Angegeben ist das arithmetische Mittel der Signalintensitäts-Verhältnisse aus vier Kreuzvergleichen. In der Klammer befindet sich die Standardabweichung. Hochregulierte Gene haben positive, herunterregulierte Gene negative Werte.

^b PA-Nummer, Gen- und Proteinname wurden vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen.

^c Die Expression war nur in 3 von 4 GeneChip Einzelvergleichen signifikant unterschiedlich.

^d Typ III sezernierte Proteine (Yahr *et al.* 1997; Cornelis & Van Gijsegem 2000).

Überraschenderweise konnte über die Genexpressionsanalyse nachgewiesen werden, daß die SCV 20265 während des exponentiellen Wachstums 33 der 36 Gene des TTSS Genclusters stärker als der Wildtyp exprimierte (Tab. 3.5). Besonders stark zeigte sich die differentielle Regulation bei den Effektor- und Porenproteinen, wie dem *exoS* Operon PA3841 (*exoS*) – PA3843, den monocistronisch vorliegenden Genen *exoT* und *exoY* sowie den im TTSS Gencluster kodierten Genen *popB*, *popD*, *popN* und *pcrV*. Diese wiesen bei der SCV 20265 eine mehr als 30-fach stärkere Expression auf als beim Wildtyp. Dabei wurde *pcrV* mit einer Hochregulation um das 270-fache als das am stärksten regulierte Gen der komparativen Expressionsanalyse identifiziert. Die Revertante weist einen intermediären Phänotyp auf, die Expression der Gene des TTSS lag zwischen dem Wildtyp und der SCV 20265. Die

Überexpression von ExoT, PopN, PcrV, PopB und PopD im Sekretom von SCV 20265 konnte durch die Arbeiten von Wehmhöner (2002) bestätigt werden, jedoch konnte dort kein Unterschied in der Expression zwischen Revertante und SCV 20265 festgestellt werden. Über die GeneChip gestützte genomische Analyse von SCV 20265 konnte nachgewiesen werden, daß dieses Isolat ExoU-defizient ist. Dieser Verlust von ExoU wird bei der überwiegenden Zahl von CF-Isolaten beobachtet (Dacheux *et al.* 2000; Feltman *et al.* 2001).

Bei *P. aeruginosa* wurden bisher die Proteine ExoS, ExoT, ExoY und ExoU (PepA) sowie PopB, PopD, PopN und PcrV als TTSS sezerniert charakterisiert (Yahr *et al.* 1997; Cornelis & Van Gijsegem 2000). ExoS und ExoT stimulieren die GTPase Aktivität von Rho GTPasen, woraus ein Rearrangement des Aktin Cytoskeletts der Wirtszelle resultiert (Goehring *et al.* 1999; Krall *et al.* 2000; Krall *et al.* 2002). ExoS besitzt außerdem eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität für Ras GTPasen (Barbieri 2000), welche Ras-vermittelte Signalkaskaden unterbrechen und zum unmittelbaren Tod der Zelle führen kann (Ganesan *et al.* 1999). ExoY ist ein Homolog zum *Bordetella pertussis* Adenylat Zyklyse Toxin (Yahr *et al.* 1998). Es erhöht nach Translokation den cAMP Spiegel in der Wirtszelle und verändert deren Morphologie (Yahr *et al.* 1998; Sawa *et al.* 1999). ExoU ist ein akut wirkendes Cytotoxin (Finck-Barbancon *et al.* 1997; Allewelt *et al.* 2000; Pukatzki *et al.* 2002). Zusätzlich zu diesen Effektorproteinen werden PcrV, PopB und PopD über das TTSS sezerniert (Yahr *et al.* 1997), welche einerseits eine Rolle in der Bildung von Poren zur Translokation von Effektorproteinen durch die Wirtszellmembran haben sollen (Frithz-Lindsten *et al.* 1998), andererseits bereits durch Bildung dieser Pore cytotoxisch wirken (Dacheux *et al.* 2001). Dem ebenfalls über das TTSS sezernierten Protein PopN wurde noch keine Funktion zugeschrieben, sein Homolog in *Yersinia sp.* spielt jedoch eine Rolle bei der Regulation der Aktivität des Translocons (Forsberg *et al.* 1991).

Das *exsA*-Gen zeigte ebenfalls in drei von vier Kreuzvergleichen eine verstärkte Expression in der SCV 20265 (Tab. 3.5). ExsA kontrolliert als Aktivator alle dem TTSS und seinen Effektorproteinen zugeordneten Operons (Yahr & Frank 1994; Hovey & Frank 1995; Yahr *et al.* 1995). ExsA gehört zu der Familie der AraC ähnlichen transkriptionellen Aktivatoren und bindet an der Konsensus-Sequenz TNAANA (Frank 1997). ExsA-regulierte Promotoren kontrollieren die Expression des Sekretionsapparats und der sezernierten Effektorproteine und werden ihrerseits durch Protein-Protein Wechselwirkungen von ExsD mit ExsA inhibiert (McCaw *et al.* 2002). Die Expression des TTSS und seiner Effektorproteine erfolgt vornehmlich in der späten exponentiellen Phase des bakteriellen Wachstums

(Dacheux *et al.* 2000; Ha & Jin 2001), wenn Signale, wie der Kontakt mit einer eukaryontischen Wirtszelle, Präsenz von Serum und Ca^{2+} Depletion vorhanden sind (Iglewski *et al.* 1978; Vallis *et al.* 1999). Diese Signale werden über einen intrazellulären Signalweg mit cAMP als Botenmolekül und Vfr als cAMP-bindendes Protein übertragen und kontrollieren zusammen mit ExsA die koordinierte transkriptionelle Aktivierung von fünf kolokalisierten Operons des Typ III Translokons (insgesamt 36 Gene), sowie des ExoS-Operons und der monocistronisch vorliegenden Gene, die für ExoT, ExoU und ExoY kodieren (Wolfgang *et al.* 2003).

Um die funktionelle Auswirkung der beobachteten differentiellen Regulation nachzuweisen, wurden *in vitro* Cytotoxizitätsversuche mit der Maus-Makrophagen Zelllinie J774.A1 und *in vivo* Infektionen von BALB/c Mäusen von D. Jordan aus der Arbeitsgruppe von I. Steinmetz durchgeführt. Bakterien wurden zur Stimulierung des Typ III Sekretionssystems in Ca^{2+} -depletiertem LB-Medium (Zusatz von 40 mM des Ca^{2+} -Chelators EGTA) bis in die späte exponentielle Phase angezogen und Makrophagen in einem Verhältnis von 10 Bakterien pro Makrophage infiziert. Die Cytotoxizität wurde durch den Nachweis des ausschließlich cytosolisch vorliegenden Enzyms Lactat Dehydrogenase mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Testsystems (*cytotoxicity detection kit*, Roche) aufgezeigt. Es wurde eine signifikant höhere Cytotoxizität von SCV 20265 im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Die Revertante wurde aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit zur SCV 20265 bezüglich der Typ III Sekretion nicht getrennt untersucht. Die beobachtete Cytotoxizität ist ExsA abhängig, da eine chromosomale *exsA knock-out* Mutation von SCV 20265 (SCV 20265 *exsA*), die für diese Studie von Ina Attree (Grenoble, Frankreich) konstruiert wurde, eine signifikant reduzierte Virulenz zur Folge hatte.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die beobachtete ExoU-unabhängige Cytotoxizität auf die Bildung kleiner Poren in der Makrophagen-Membran zurückzuführen ist, wie für den ebenfalls *exoU*-defizienten und stark cytotoxischen *P. aeruginosa* CHA beschrieben (Dacheux *et al.* 2001). Die dabei involvierten Proteine PopB, PopD und PcrV bilden 2,8 bis 3,5 nm große Poren (Dacheux *et al.* 2001), die eine schnelle Onkose (Schwellen der Zelle und des Nucleus, Blasenbildung an der Membran und verstärkte Vakuolisierung) der eukaryontischen Zelle zur Folge haben (Dacheux *et al.* 2000). Lysierte Zellen ziehen dann durch chemotaktische Signale ‚Schwärme‘ von *P. aeruginosa* an, die vermutlich das ausfließenden Cytosol als Nahrungsquelle nutzen (Dacheux *et al.* 2001). Die Gene *popB*,

popD und *pcrV* zeigten in SCV 20265 eine differentielle Regulation von über 60-fach gegenüber dem Wildtyp.

Neben den klonalen Varianten von 20265 SCV wurden vier weitere stark adhätierende SCVs und ihre Wildtypen in den Cytotoxizitätsversuchen getestet. Dabei zeigten die SCV 52 und die SCV 8226 genauso wie SCV 20265 eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Cytotoxizität. Zur Detektion sezernierter TTSS-Effektorproteine der SCV 52 und SCV 8226 wurden in Zusammenarbeit mit D. Jordan eindimensionale denaturierende Polyacrylamid-Gele mit Proteinen des Zellüberstandes durchgeführt. Nach Stimulierung der Typ III Sekretion durch Ca^{2+} -Depletion in LB- oder Vogel-Bonner Medium konnte eine signifikant erhöhte Sekretion der Typ III Effektorproteinen in SCV 52 und SCV 8226 nachgewiesen werden. Somit zeigte sich, daß die für diese Stämme detektierte Cytotoxizität ebenfalls Typ III vermittelt ist.

Diese Befunde konnten von D. Jordan durch *in vivo* Infektionsversuche mit BALB/c Mäusen bestätigt werden. Eine intranasale Infektion mit $\sim 10^8$ SCV 20265 machte sich bereits nach 48 h durch eine ausgeprägte Immobilität und hohe Atemfrequenz der Mäuse bemerkbar, wohingegen Mäuse, die mit dem Wildtyp oder mit SCV 20265 *exsA* infiziert waren, in ihrer Aktivität uneingeschränkt schienen. Nach 3 Tagen waren 75 % der mit SCV 20265 infizierten Mäuse verstorben, wohingegen nur 25 % der mit dem Wildtyp infizierten und 8 % der mit der *exsA* Mutante infizierten Mäuse tot aufgefunden worden waren. Zu späteren Zeitpunkten wurden die Unterschiede der Mortalitätsraten geringer, was darauf hindeutet, daß die TTSS vermittelte Virulenz sich vor allem in akuter Cytotoxizität äußert. Für die SCVs 52 und 8226 und den entsprechenden klonalen Wildtypen waren die Unterschiede der Mortalitätsraten nach 3 Tagen noch ausgeprägter als bei der SCV 20265 und ihrem Wildtyp. Abgesehen von der bereits getesteten Subgruppe aus 5 stark adhätierenden SCVs und ihren Wildtypen sollten in Zukunft auch andere SCVs außerhalb dieser Subgruppe auf ihre Cytotoxizität hin überprüft werden, um abschätzen zu können wie weit verbreitet dieser Phänotyp bei SCVs ist.

Viele Studien berichten, daß sich Stämme von *P. aeruginosa* aus chronisch infizierten CF-Lungen durch eine gegenüber Umweltisolaten verringerte Virulenz auszeichnen (Burke *et al.* 1991) (vgl. Einleitung I.4). Insbesondere sollen CF-Isolate geringere Mengen an Proteasen, Elastasen und Exotoxin A produzieren (Burke *et al.* 1991) und weniger Typ III sezernierte Effektorproteine, wie ExoT, ExoS and ExoU und PcrV (Roy-Burman *et al.* 2001). So hat sich die Meinung durchgesetzt, daß das Habitat der CF-Lunge einen Selektionsdruck zur Ausbildung eines avirulenten Phänotyps darstellt. Eine entsprechende zu Beginn dieser Arbeit aufgestellte Hypothese mußte durch die Entdeckung der gesteigerten Typ III Sekretion

und einhergehenden Virulenz von SCV 20265 und einigen weiteren Vertretern dieses Morphotyps verworfen werden. Dieser Befund wird durch das Auffinden von Antikörpern im Serum von chronisch infizierten Erwachsenen mit CF unterstützt, welche sich gegen Typ III Effektorproteine richten (Moss *et al.* 2001). Dies spricht für eine Sekretion dieser Proteine auch nach langem chronischen Infektionsverlauf (Moss *et al.* 2001). Es scheint, daß die Etablierung eines avirulenten Phänotyps nur eine von mehreren Möglichkeiten von *P. aeruginosa* ist, eine persistierende Infektion auszubilden. Manche Stämme bzw. Morphotypen erreichen jedoch das gleiche Ziel durch eine erhöhte Virulenz. Vakzinierungsversuche mit Typ III Effektorproteinen könnten helfen, CF-Patienten vor cytotoxischen Phänotypen von *P. aeruginosa* zu schützen. Aktive und passive Immunisierung über PcrV bewirkte bei Mäusen eine hohe Überlebensrate nach Infektion mit dem hoch cytotoxischen Stamm *P. aeruginosa* 103 und verminderte durch Entzündungsprozesse vermittelte Schäden am Lungenepithel (Sawa *et al.* 1999).

Desweiteren wurde bislang eine Invasion von *P. aeruginosa* in Epithelzellen als eine mögliche Überlebensstrategie vermutet, um sich dem Immunsystem bzw. während einer Therapie angreifenden antibiotischen Substanzen entziehen zu können. Solch ein invasives Verhalten von *P. aeruginosa* wurde besonders in Zusammenhang mit Infektionen der Augenhornhaut berichtet (Fleiszig *et al.* 1994; Fleiszig *et al.* 1995). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten SCV Morphotypen sind höchstwahrscheinlich nicht invasiv, da Typ III sezernierte ExoT und ExoS durch einen nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus einer aktiven Invasion oder passiven Internalisierung entgegenwirken (Cowell *et al.* 2000; Ha & Jin 2001).

III.2.5. Differentiell regulierte Gene von Motilitätsapparaten

P. aeruginosa ist dazu in der Lage, sich über Chemosensoren (Methyl-akzeptierende Chemotaxis-Proteine, MCP) gerichtet im Raum zu bewegen. Verschiedene Fortbewegungsarten können dabei zur Erlangung optimaler Nährstoff-Bedingungen dienen, *P. aeruginosa* vermag mittels Flagellen zu schwimmen und sich in Floß-ähnlichen Zellaggregaten schwärmend fortzubewegen (Fraser & Hughes 1999). Darüber hinaus ist *P. aeruginosa* mittels Pili zur Bewegung auf Oberflächen (sog. *twitching* oder *gliding*) befähigt (Mattick 2002).

Stämme von *P. aeruginosa* exprimieren entweder a-Typ oder b-Typ Flagellen (Lanyi 1970), die auf der Basis unterschiedlicher Aminosäuresequenzen der Flagellin-Untereinheiten eingeteilt werden können. So kodiert *fliC* von *P. aeruginosa* PAO1 für ein b-Typ Flagellin (Spangenberg *et al.* 1996) und *fliC* bzw. *flaA* von *P. aeruginosa* PAK für ein a-Typ Flagellin (Totten & Lory 1990; Arora *et al.* 1998). Beide besitzen eine Sequenzidentität von 71 % auf Nukleotid- und 63 % auf der Proteinebene (jeweils bezogen auf die längere Sequenz) (Spangenberg *et al.* 1996). Im Gegensatz zu den sehr konservierten b-Typ Flagellinen weisen Typ-a Flagelline untereinander eine hohe Größen-Variabilität und Sequenzdiversität auf (Brimer & Montie 1998), Darüber hinaus werden a-Typ Flagelline posttranslational glykosyliert, wofür mindestens eine bei *P. aeruginosa* PAK nachgewiesene Glykosylierungs-Insel von 16 kb (*orfA* – *orfN*) mit dafür notwendigen Genen in eines der beiden flagellaren Gencluster inseriert ist (Arora *et al.* 2001; R. Ramphal, nach pers. Mitteilung).

Die auf Hybridisierung des GeneChip gestützte Genom- und Genexpressions-Analyse zeigt, daß das Genom von 20265 SCV ein a-Typ Flagellin enthält. Ein Gen-Cluster, welches PA1086 – PA1096 (darunter *fliC*) umfaßt, ist gegen PAK-spezifische Gene (darunter *flaA* bzw. *fliC*) (Totten & Lory 1990; Arora *et al.* 1998; Arora *et al.* 2001) ausgetauscht. Darüber hinaus ist mit den Genen *orfA* – *orfG* und *orfN* ein Teil der Glykosylierungs-Insel im Genom von 20265 präsent.

Tab. 3.6 Differentielle Expression von Genen aus Motilitätsapparaten bei *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp und Revertante während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase.

Gen ^b	Protein ^b	Exponentielle Phase ^a			Stationäre Phase ^a		
		SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV
Typ IV Pili							
L37109 (<i>pilA</i>)	Pilin Typ IV	7,5 (4,4)	-	-5,6 (2,2)	5,2 (0,9)	-	-3,2 (0,5)
Flagellen							
PA1079 (<i>flgD</i>)	flagellares Basal-Körper Modifizierungs-Protein	-	-	-	-	-	-2,9 (0,5)
PA1080 (<i>flgE</i>)	flagellares Haken-Protein	-	-5,5 (1,6)	-	-	-	-
PA1082 (<i>flgG</i>)	flagellares Basal-Körper-Protein	-	-4,4 (1,4)	-	-	-	-
PA1085 (<i>flgJ</i>)	flagellares Protein	-	-4,2 (0,8)	-	-	-	-
AF332547 (<i>orfB</i>)	mögliches Acyl Transport Protein, Fettsäuresynthese, Glykosylierungs-Insel, PAK	-2,4 (0,3)	-3,7 (0,4)	-	-	-	-
AF332547 (<i>orfC</i>)	mögliche 3-Oxoacyl-[Acyl- Transport-Protein] Synthase, Glykosylierungs-Insel, PAK	-	-3,0 (0,5)	-	-	-	-
AF332547 (<i>orfF</i>)	große Untereinheit einer Dioxygenase, Glykosylierungs- Insel, PAK	-	-3,2 (0,2)	-	-	-	-
M57501 (<i>flaA</i>)	Flagellin a-Typ, PAK	-6,2 (1,0)	-13,6 (2,0)	-2,4 (0,2)	-3,2 (0,6)	-8,2 (1,8)	-2,4 (0,3)
L81176 (<i>fliD</i>)	flagellares Kappen-Protein, PAK	-3,0 (0,3)	-4,0 (0,5)	-	-	-2,6 (0,5)	-
L81176 <i>cds5</i>	FliS-Homolog, PAK	-	-2,8 (0,5)	-	-	-	-
L81176 <i>cds6</i>	unbekannte Funktion, PAK	-	-3,1 (0,6)	-	-	-6,5 (3,8)	-
PA1101 (<i>fliF</i>)	flagellares M-Ring Protein	-	-5,2 (2,9)	-	-	-	-
Regulatorproteine							
PA0762 (<i>algU</i>)	Sigma Faktor	2,9 (0,6)	-	-	-	-	-
PA0764 (<i>mucB</i>)	Negativ Regulator	-2,6 (0,5)	-	2,7 (0,3)	-	-	-
PA1098 (<i>fleS</i>)	2-Komponenten System Sensor	-	-	-	-	-	-2,6 (0,3)
PA1099 (<i>fleR</i>)	2-Komponenten System Regulator	-	-	-	-	-	-2,5 (0,3)

^a Angegeben ist das arithmetische Mittel der Signalintensitäts-Verhältnisse aus vier Kreuzvergleichen. In der Klammer befindet sich die Standardabweichung. Hochregulierte Gene haben positive, herunterregulierte Gene negative Werte.

^b PA-Nummer, Gen- und Proteinname wurden überwiegend vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen. Für nicht-PAO1 Gene werden statt PA-Nummer der GenBank-Eintrag sowie eine nähere Bezeichnung des einzelnen Gens angegeben.

Während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase sind mit *flaA* und *fliD* die Gene der Strukturproteine für das Flagellum und dessen distalem Ende Kappe im Vergleich SCV 20265 zum Wildtyp stark herunterreguliert (Tab. 3.6). Dieser Expressionsunterschied korrespondiert mit dem für SCV 20265 beobachteten verlangsamten Schwimmen (Häußler *et al.* 2003). Die Expressionsniveaus von *flaA*, *fliD* sowie weiterer Gene des flagellaren Apparats und einiger Gene der Glykosylierungs-Insel sind in der Revertante höher als in der SCV (Tab. 3.6). Die Ergebnisse von Wehmhöner (2002) bestätigen diese differentielle Regulation von FlaA (bzw. FliC), FliD und FlgK auf der Proteinebene.

Wie bereits in der Einleitung (vgl. Einleitung I.6) geschildert, wurde eine Überexpression des für die Pilin-Untereinheit kodierenden *pilA*-Gens in 20265 SCV und Revertante gegenüber dem Wildtyp durch Northern Hybridisierungen nachgewiesen und elektronenmikroskopisch funktionell bestätigt (Häußler *et al.* 2003) (Abb. 3.6). Es handelt sich dabei um eine *P. aeruginosa* Klon G-spezifische Sequenzvariante von *pilA* (Accession Number L37109 [Spangenberg *et al.* 1995]). GeneChip Hybridisierungen bestätigen die Ergebnisse des Northern Blots (Tab. 3.2, Tab. 3.6). Dieser Befund kann durch Proteom-Analysen nicht bestätigt werden, was vermutlich auf das niedrige Molekulargewicht von PilA zurückzuführen ist (Wehmhöner 2002). Die restlichen 28 Gene, deren kodierte Proteine funktionell der Pili-Biogenese zugeordnet werden (PilB – Z, FimT – V), scheinen transkriptionell nicht differentiell reguliert zu sein.

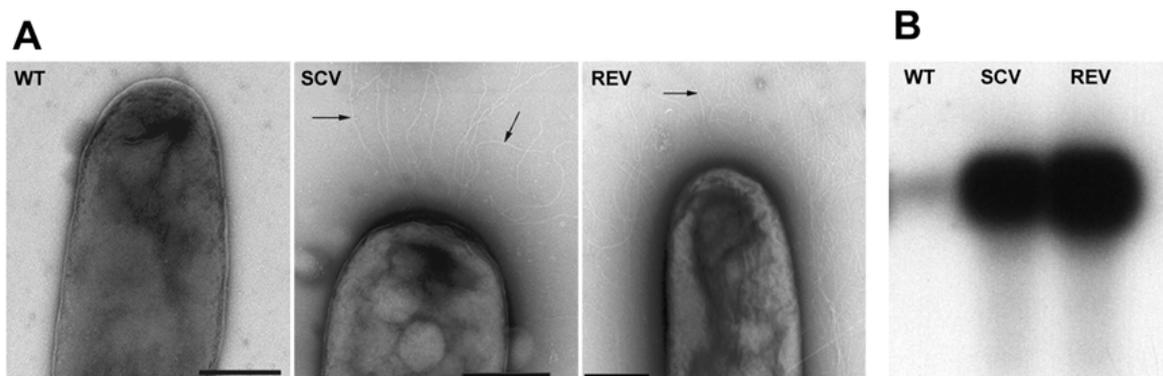


Abb. 3.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zelloberflächen (A) und Northern Hybridisierung von *pilA* (B) von *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp (WT) und Revertante (REV) (Häußler *et al.* 2003).

(A) Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Zellen aus den äußeren *twitching*-Zonen von 1 %igen LB-Agar Platten, die zuvor mit einem sterilen Zahnstocher beimpft und bei 37 °C für 48 h inkubiert worden waren, präpariert, auf ein Formvar-Gitter überführt und mit 2 % (w/v) Uranyl-Acetat negativ gefärbt. Auf Pili wird mit Pfeilen hingewiesen (Größenstandard = 1 µm).

(B) Nach exponentiellem Wachstum wurde RNA von SCV 20265, Wildtyp und Revertante 20265 mit einer *pilA*-Sonde hybridisiert. SCV 20265 und der Revertante zeigen eine erheblich gegenüber dem Wildtyp erhöhte Menge des ca. 660 bp *pilA*-Transkripts.

Entsprechend der differentiellen Expression von *pilA* in den klonalen Varianten zeigten SCV 20265 und die Revertante eine bessere *twitching*-Motilität als der Wildtyp. Déziel et al. (2001) konnten ebenfalls mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine Hyperpilierung ihrer *in vitro* generierten SCV von *P. aeruginosa* 57 RP nachweisen, jedoch zeigte hier die SCV trotz vermehrter Pilierung ein schlechteres *twitching* im Vergleich zum Wildtyp, dafür aber eine stark verbesserte Adhärenz an Polystyren (Deziel et al. 2001).

Die Reduktion von Flagellen wurde bereits in der Einleitung (vgl. I.4) als generelle phänotypische Eigenschaft CF-assoziiierter Stämme besprochen (Luzar et al. 1985; Mahenthiralingam et al. 1994). Dieser Phänotyp findet sich in bestimmten Entwicklungsphasen einer Biofilm-Etablierung wieder (Abb. 3.7). Diese Parallele ist bemerkenswert, da wiederholt nachgewiesen wurde, daß *P. aeruginosa* als Biofilm in CF-Lungen persistiert (vgl. Einleitung I.3) (Lam et al. 1980; Singh et al. 2000; Worlitzsch et al. 2002). Flagellen und Pili werden auch als Adhärenzfaktoren angesehen und sind nachgewiesenermaßen essentiell für das Anheften in der ersten Phase der Entstehung von Biofilmen (O'Toole & Kolter 1998; Semmler et al. 1999).

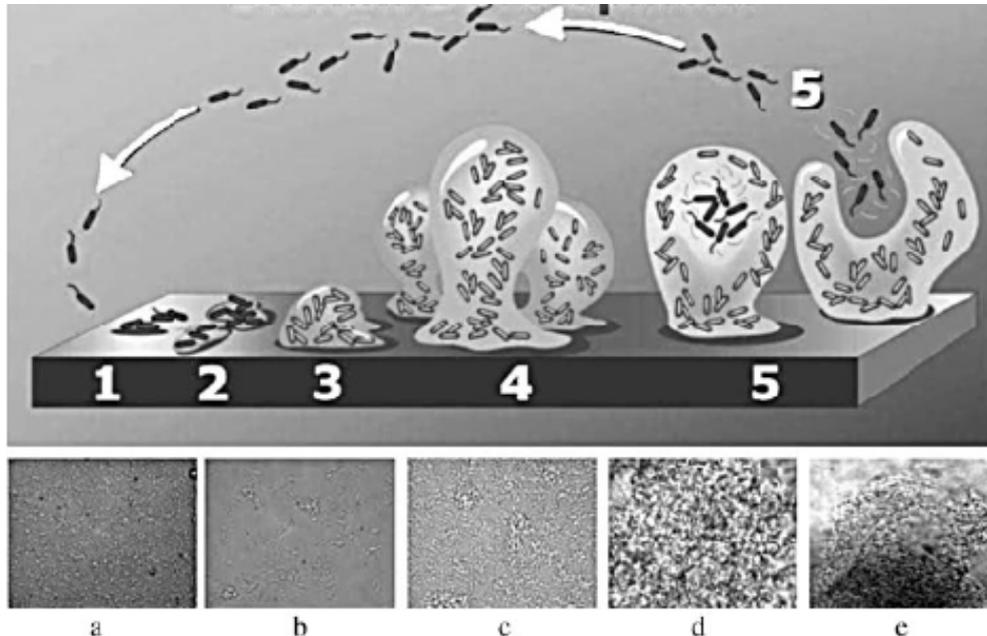


Abb. 3.7 Modell und lichtmikroskopische Aufnahmen von Entwicklungsphasen eines Biofilms nach Stoodley et al. (2002).

(1, a) Reversible Anheftung, transientser Kontakt mit der Substrat-Oberfläche über den Zellpol. (2, b) Irreversible Anheftung, Reorientierung zu longitudinaler Zellachse, Bildung von Mikrokolonien, Motilität verringert sich allmählich, Las *quorum sensing* wird aktiviert. (3, c) Reifungsstadium I, Zellen liegen in über 10 µm dicken Schichten vor, Rhl *quorum sensing* wird aktiviert. (4, d) Reifungsstadium II, maximale Dicke von bis zu 100 µm erreicht. (5, e) Dispersion, Biofilmintegrität herabgesetzt, motile Bakterien verlassen den Biofilm aus zentralen Bereichen und gehen zur planktonischen Lebensweise über.

Durch die vermutlich Flagellen- und Pili-vermittelte Erstkolonisierung einer Oberfläche entstehen zunächst vereinzelte Filme von der Dicke einer Zelle (O'Toole & Kolter 1998) (Abb. 3.7, 1). Das für die Flagellenkappe kodierende Strukturgen *fliD* ist dabei essentiell für die Adhärenz an Mucine des Lungenepithels (Arora *et al.* 1998). Die Produktion von Mucinen wird transkriptionell durch das Lipopolysaccharid (LPS) von *P. aeruginosa* aktiviert (Li *et al.* 1997). Mit Hilfe der elongations- und kontraktionsfähigen Typ IV Pili (Skerker & Berg 2001) vermag *P. aeruginosa* konfluente Filme und Mikrokolonien zu bilden (O'Toole & Kolter 1998) (Abb. 3.7, 2). Für dieses Pili-vermittelte *twitching* sind Flagellen nicht mehr nötig und stören vermutlich sogar bei der Fortbewegung. Nach der initialen Kolonisierung stabilisiert die Reduktion beider Zellanhängsel (Whiteley *et al.* 2001) und die erhöhte Produktion von Alginat die drei-dimensionale Struktur des Biofilms (Watnick & Kolter 1999; Hentzer *et al.* 2001) (Abb. 3.7, 3 und 4). Durch die Flagellen-Expression von Zellen innerhalb eines reifen Biofilms können sich Einzelzellen aus dem Zellverband lösen und sich zur Etablierung neuer Biofilme andere Lebensräume suchen (O'Toole *et al.* 2000; Stoodley *et al.* 2002) (Abb. 3.7, 5).

Der transkriptionelle Regulator AlgU könnte bei dem Umschalten von initialem Anheften zur Etablierung eines Biofilms beteiligt sein, da er neben seiner Rolle in der Regulation der Alginat-Biosynthese (Govan & Deretic 1996) einerseits als ein Repressor der Flagellen-Biosynthese (Garrett *et al.* 1999) und andererseits als ein Aktivator der Pili-Biosynthese (Whitchurch *et al.* 1996) wirken kann. Die SCV 20265 zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine Hochregulierung von *algU* sowie eine Herunterregulierung von *mucB*, das einen Anti-Sigma-Faktor kodiert, welcher AlgU durch Protein-Protein Interaktion inaktivieren kann (Rowen & Deretic 2000). Eine Auswirkung der differentiellen Regulation dieser Regulatorproteine auf die Expression von Genen der Alginat-Biosynthese konnte nicht nachgewiesen werden.

Die SCV 20265 scheint aufgrund ihrer Expressionssignatur in der Entwicklungsphase zwischen erster Anheftung und der Etablierung eines sessilen Biofilms arretiert zu sein. Die Überexpression von Typ IV Pili, dem bekanntesten Adhärenzfaktor von *P. aeruginosa*, kann eine Ursache für die erhöhte Fähigkeit zur Autoaggregation und Adhärenz zu biotischen und abiotischen Oberflächen von 20265 SCV gegenüber dem Wildtyp sein (Häußler *et al.* 2003). Die Reduktion dieser Fähigkeiten bei der Revertante, trotz der gegenüber der SCV erhöhten *pilA*-Expression, kann möglicherweise auf die verstärkte Expression mehrerer Gene des

flagellaren Apparates und die damit verbesserten Schwimm-Fähigkeiten (Häußler *et al.* 2003) der Revertante zurückgeführt werden.

Typ IV Pili können abgesehen von ihrer Rolle bei der Bildung von Biofilmen auch notwendig für die bakterielle Cytotoxizität oder Internalisierung in Wirtszellen sein (Comolli *et al.* 1999a; Hahn 1997). Besonders bei der kontaktabhängigen Cytotoxizität über Typ III sezernierte Effektorproteine erscheinen die Adhärenz-Eigenschaften von Typ IV Pili zum Aufbau eines engen Pathogen-Wirt Kontakts vorteilhaft (Comolli *et al.* 1999b) (vgl. III.2.4).

III.2.6. Differentiell regulierte Gene zur Aufnahme von Eisen

P. aeruginosa benötigt Eisen für die Respiration mit Sauerstoff oder mit oxidierten Stickstoff-Verbindungen (NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O). Unter aeroben Bedingungen ist die Versorgung mit Eisen problematisch, da bei pH 7 Fe^{3+} große, unlösliche Hydroxy-Aquo-Komplexe bildet und somit die Konzentration an freiem Eisen auf ca. 10^{-9} M sinkt (Ratledge & Dover 2000). Jedoch ist eine Fe^{3+} -Konzentration von 10^{-7} M nötig, um bakterielles Wachstum zu ermöglichen. Bakterien, die sich im menschlichen Wirt aufhalten, haben es noch schwerer, genug Eisen zu bekommen, da ca. 78 % des gesamten Eisens an Häm in Hämoglobin oder Myoglobin gebunden ist und weitere 15 % intrazellulär durch Ferritin immobilisiert werden. Die restlichen 7 % sind im Serum an Transferrin und in sekretorischen Flüssigkeiten an Lactoferrin gebunden, so daß die Konzentration an freiem, sofort verfügbarem Eisens auf 10^{-24} M sinkt (Wandersman & Stojiljkovic 2000; Braun 2001). Um trotzdem Eisen zu binden, hat *P. aeruginosa* mehrere Mechanismen entwickelt, welche die Sezernierung von Siderophoren und Hämophoren zum Eisen-Import, sowie Proteasen zur Spaltung der erwähnten Eisenbindungsproteine des Wirtsorganismus umfassen (vgl. Einleitung I.2).

Tab. 3.7. Differentielle Expression von Genen zur Aufnahme von Eisen bei *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp und Revertante während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase.

Gen ^b	Protein ^b	Exponentielle Phase ^a			Stationäre Phase ^a		
		SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV
PA2386 (<i>pvdA</i>)	L-Ornithin N5-Oxygenase	-	-	-	-8,4 (5,8)	-	3,5 (1,1)
PA2398 (<i>fpvA</i>)	Ferripyoverdin Rezeptor	-	-	-	-2,4 (0,5)	-	2,6 (0,3)
PA3407 (<i>hasAp</i>)	Häm-Aufnahme Protein	-	-	-	-8,2 (4,6)	-	6,0 (2,0)
PA3531 (<i>bfrB</i>)	Bacterioferritin	4,5 (1,3)	-	-3,5 (0,6)	-	-	-
PA3901 (<i>fecA</i>)	Fe(III) Dicitrat Transport-Protein	-22,2 (12,0)	-	-	-	-	-
PA4218	möglicher Transporter	19,0 (15,8)	-	-12,3 (7,2)	-	-	-
PA4221 (<i>fptA</i>)	Vorstufe des Fe(III)-Pyochelin Rezeptors	15,1 (2,6)	-	-11,0 (1,0)	-	-	-17,7 (15,7)
PA4223 (<i>pchH</i>)	mögliche ATP-bindende Komponente eines ABC- Transporters	5,6 (0,7)	-	-4,1 (0,8)	-	-	-2,9 (0,5)
PA4224 (<i>pchG</i>)	Pyochelin Biosynthese Protein	3,9 (1,0)	-	-3,4 (0,9)	-	-	-4,1 (1,5)
PA4225 (<i>pchF</i>)	Pyochelin Synthetase	37,0 (5,5)	-	-36,7 (20,2)	-	-	-
PA4226 (<i>pchE</i>)	Dehydroaeruginat Synthetase	37,4 (11,1)	-	-40,5 (16,9)	-	-	-
PA4228 (<i>pchD</i>)	Pyochelin Biosynthese Protein	14,2 (13,6)	-	-17,4 (16,7)	-	-	-
PA4229 (<i>pchC</i>)	Pyochelin Biosynthese Protein	34,2 (6,5)	-	-40,0 (17,3)	-	-	-4,4 (0,9)
PA4230 (<i>pchB</i>)	Salicylat Biosynthese Protein	24,3 (1,9)	-	-28,3 (8,4)	-	-	-
PA4231 (<i>pchA</i>)	Isochorismat Synthase	5,8 (0,4)	-	-	-	-	-
PA4764 (<i>fur</i>)	Eisenaufnahme Regulationsprotein	-	2,7 (0,4)	-	-	-	-
PA5531 (<i>tonB</i>)	TonB Protein	-3,8 (0,1)	-	-	-	-	-

^a Angegeben ist das arithmetische Mittel der Signalintensitäts-Verhältnisse aus vier Kreuzvergleichen. In der Klammer befindet sich die Standardabweichung. Hochregulierte Gene haben positive, herunterregulierte Gene negative Werte.

^b PA-Nummer, Gen- und Proteinname wurden vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen.

Während des exponentiellen und stationären Wachstums wiesen die SCV 20265 und die Revertante ein vergleichbares Transkriptionsprofil bezüglich der Eisenaufnahme-Systeme auf (Tab. 3.7). In der exponentiellen Phase war im Vergleich zum Wildtyp besonders auffällig, daß Gene zur Pyochelin-vermittelten Eisenaufnahme (*pch A-H*) sowie das *fptA*-Gen, kodierend für den Rezeptor für Pyochelin-Fe³⁺-Komplexe (Ankenbauer & Quan 1994) stark

induziert waren. Aufgrund der Lokalisierung von PA4218 (stromaufwärts und in gleicher Leserichtung kodiert wie *pch A-H*, *fpt*) und aufgrund des Transkriptionsprofils ist es wahrscheinlich, daß der kodierte „mögliche Transporter“ ein Teil des Pyochelin-Aufnahme-Operons ist. Die zum *pch* Cluster gehörenden Gene *pchI* und *pchR* (Reimann *et al.* 1998; Serino *et al.* 1997) zeigten keinerlei differentielle Regulation. Die Überexpression einiger Pyochelin-Biosynthese-Gene (*pchC*, *G*, *H*) sowie des Rezeptorgens *fptA* schien sich besonders im Vergleich zwischen Revertante und Wildtyp in der stationären Phase fortzusetzen. Die Relevanz des Pyochelin-Systems für das Überleben und die Virulenz-Entwicklung von *P. aeruginosa* im eukaryotischen Wirt machen Ergebnisse der *in vivo* Expressions-Technology (IVET) deutlich, die *fptA* als wichtigen Virulenzfaktor in der Infektion neutropenischer Mäuse ausweisen (Wang *et al.* 1996).

Als Marker für die Eisenversorgung kann die Expression des *bfrB* Gens dienen, das für das intrazelluläre Eisen-bindende Lagerungsprotein Bacterioferritin kodiert. Ein hohes Expressionsniveau von *bfrB* weist dabei auf einen hohen Eisenvorrat in der Zelle hin (Vasil & Ochsner 1999). So scheint eine uneingeschränkte Eisen-Versorgung von SCV 20265 und Revertante in der exponentiellen Phase vorzuliegen (Tab. 3.7 und Tab. 3.8). Der Wildtyp scheint im Vergleich dazu wenig Eisen zur Verfügung zu haben (Tab. 3.7), das *bfrB*-Transkript ist kaum nachweisbar (Tab. 3.8). In der stationären Phase scheint in allen drei Morphotypen kaum Eisen vorzuliegen, SCV, Wildtyp und Revertante weisen nur eine geringe Expression von *bfrB* auf (Tab. 3.8). Die beobachtete schwächere Expression des für die Siderophor-Aufnahme essentiellen *tonB* Gens (Takase *et al.* 2000) der SCV 20265 gegenüber dem Wildtyp scheint sich anhand der hohen *bfrB*-Expression von SCV 20265 in der exponentiellen Phase nicht folgeschwer auf die Eisenversorgung von SCV 20265 auszuwirken (Tab. 3.7).

Tab. 3.8 Expressionskennwerte des *bfrB*-Gens.

	Exponentielle Phase			Stationäre Phase		
	SCV	WT	REV	SCV	WT	REV
Expressionskennwerte ^a <i>bfrB</i>	549 (P,P)	101 (M,A)	389 (P,P)	90 (P,A)	58 (P,A)	76 (P,P)

^a Angegeben sind arithmetische Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die qualitative Beurteilung der zugrundeliegenden GeneChip Hybridisierungen. P, Transkript signifikant anwesend; M, Transkript marginal anwesend; A, Transkript signifikant abwesend

Der Wildtyp reagiert auf die anhand der *bfrB*-Expression mutmaßlich schlechte Eisenversorgung in der exponentiellen Phase durch die Induktion des *fecA* Gens, welches *P. aeruginosa* befähigt, artfremde Siderophore, wie Dicitrat von *E. coli*, aufzunehmen, sofern sie extrazellulär zur Verfügung stehen (Wagegg & Braun 1981; Ferguson *et al.* 2002). Da diese Siderophore nicht im verwendeten Medium vorlagen, verändert diese Geninduktion nicht die Situation des Wildtyps. Die Revertante zeigte wie die SCV eine eher geringe Expressionen von *fecA*, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

Die Repression der Gene *hasAp*, *pvdA* und *fpvA* in der SCV 20265 der stationären Phase (Tab. 3.7) waren vor dem Hintergrund bereits erzielter Ergebnisse unerwartet. Das *hasAp*-Gen (Letoffe *et al.* 1998), kodiert für eine der beiden Hämophoren von *P. aeruginosa* (Ochsner *et al.* 2000a). Das Gen *pvdA* (Visca *et al.* 1994) gehört zu der Gruppe der Pyoverdin Biosynthese-Gene *pvdA*, *D*, *E*, *F*. Pyoverdin ist neben Pyochelin das bedeutendste Fe³⁺-Siderophor von *P. aeruginosa* (vgl. Einleitung I.2). Das *fpvA*-Gen kodiert den entsprechenden Pyoverdin-Fe³⁺-Rezeptor (Folschweiller *et al.* 2000; Visca *et al.* 2002). HasAp fiel bereits in der Proteom-Analyse der klonalen Morphotypen von SCV 20265 als abundantes Protein des Sekretoms nach exponentiellem Wachstum auf. Während der stationären Phase wurde es jedoch in allen Morphotypen annähernd gleich stark sezerniert (Wehmhöner 2002). Demgegenüber ergab die Genexpressions-Analyse mittels Northern-Hybridisierung nach exponentiellem Wachstum die höchste Genexpression von *hasAp* im Wildtyp (Abb. 3.8, Tab. 3.2). Die GeneChip-Analysen waren für diesen Vergleich nicht signifikant unterschiedlich, zeigten jedoch in der stationären Phase eine signifikant erhöhte *hasAp* Expression des Wildtyps gegenüber der SCV und Revertante (Tab. 3.7). Die mögliche Ursachen für diese Diskrepanzen werden weiter unten diskutiert.

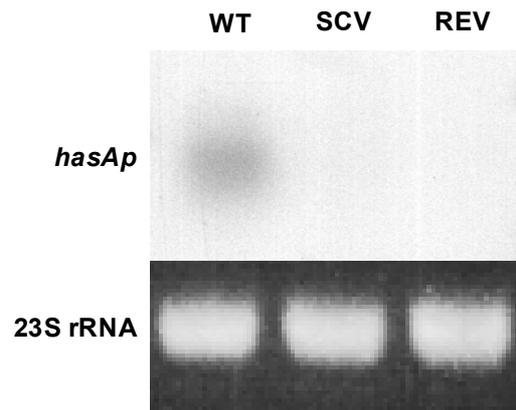


Abb. 3.8 Northern Hybridisierung von *hasAp* aus *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp (WT) und Revertante (REV) nach exponentiellem Wachstum.

RNA von SCV 20265, Wildtyp und Revertante 20265 wurde mit einer *hasAp*-Sonde hybridisiert. Ein ca. 940 bp *hasAp*-Transkript wurde für den Wildtyp nachgewiesen. Ein *hasAp*-Transkript war in SCV 20265 und Revertante kaum nachweisbar. Die abgebildeten 23S rRNA Banden des geblotteten RNA-Agarose-Gels dienen als Kalibrierungsmaßstab aufgetragener RNA-Mengen.

Die bereits bei den Wachstumsversuchen beobachteten unterschiedlich intensiven Färbungen der Flüssigkulturen von 20265 SCV, Wildtyp und Revertante ließen vermuten, daß sich diese in der Produktion der für *P. aeruginosa* charakteristischen Farbstoffe, des gelb gefärbten Pyoverdins bzw. des grün gefärbten Pyocyanins unterscheiden. Zur Prüfung der Fähigkeit zur Pyoverdin Produktion und -Sekretion wurden Kulturen in speziell für den Nachweis dieses Farbstoffes konzipiertem Komplex-Medium, King's A Medium (King *et al.* 1954) angezogen. In diesem Medium wird die Sekretion von Pyoverdin besonders stimuliert, die von Pyocyanin hingegen unterdrückt, so daß Mengenunterschiede in der Pyoverdin-Produktion und -Sekretion besonders gut sichtbar werden. Für diesen Versuch wurden zwei weitere Triplets von SCV, Wildtyp und Revertante aus der Subgruppe besonders autoaggregativer und adhäsiver SCVs (Häußler *et al.* 2003) herangezogen (Abb. 3.9).

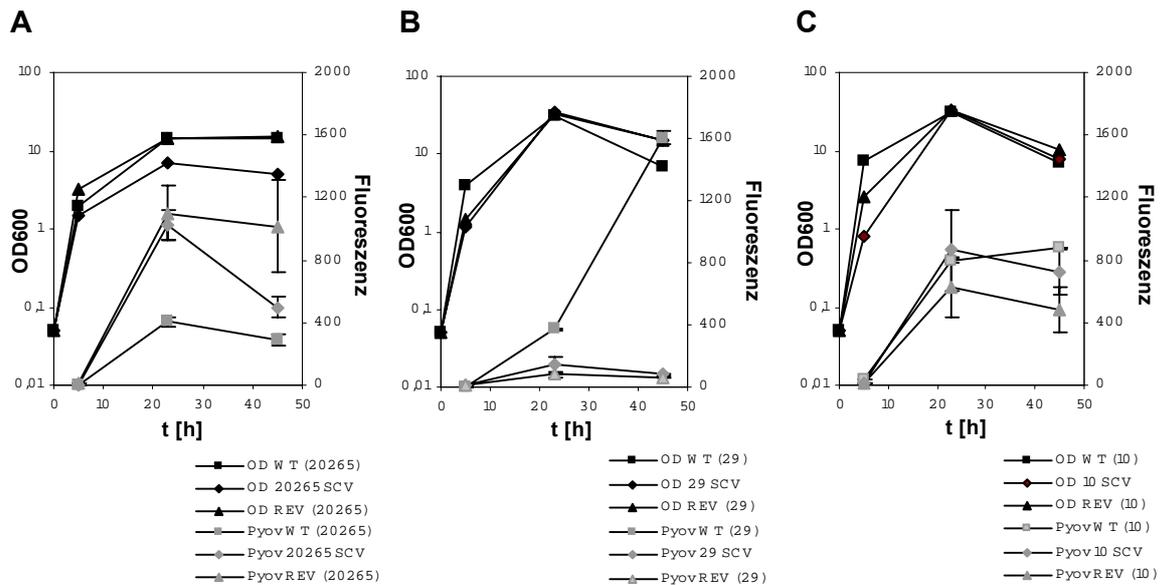


Abb. 3.9 Pyoverdin Produktion drei verschiedener Triplets klonaler Morphotypen.

Die SCV 20265 und ihre Revertante weisen eine höhere Pyoverdin-Sekretion auf als ihr klonaler Wildtyp (A). Die Menge sezernierten Pyoverdins kann jedoch aufgrund der abweichenden Ergebnisse für SCV 29 (B), SCV 10 (C) und ihre jeweiligen klonalen Morphotypen nicht als Charakteristikum bestimmter Morphotypen dienen.

Die Synthese und Sezernierung von Pyoverdin begann in der späten exponentiellen Phase (nach ca. 8 h), sezerniertes Pyoverdin sammelte sich dann in der frühen stationären Phase (nach ca. 23 h) im Medium an. Im Gegensatz zu den Wachstumsexperimenten mit Vogel-Bonner Minimalmedium entwickelte sich die Pyoverdin-Produktion bei der SCV 20265 und ihrer Revertante vergleichbar, der zugehörige Wildtyp sezernierte geringere Mengen. Auch bei einer SCV von *P. aeruginosa* 57 RP wurde eine Überproduktion von Pyoverdin berichtet (Deziel *et al.* 2001). Die Menge an sezerniertem Farbstoff scheint jedoch kein Charakteristikum bestimmter Morphotypen zu sein, da die Farbstoff-Produktion der klinischen Isolate 10 SCV und 29 SCV im Vergleich zu ihren klonalen Morphotypen ein anderes Muster ergab (Abb. 3.9).

Es läßt sich festhalten, daß bezüglich der Pyoverdin-Produktion und -Sekretion innerhalb der Subgruppe besonders autoaggregativer SCVs eine große Heterogenität herrscht. Die erhöhte Sekretion der Siderophore Pyoverdin von SCV 20265 und Revertante in der stationären Phase steht im Gegensatz zu der Expression von *pvdA* und *fpvA*, die im Wildtyp erhöht ist (Tab. 3.7).

Diese sich scheinbar widersprechenden Resultate zu HasAp und zur Pyoverdin Synthese und Sekretion sind möglicherweise auf eine unterschiedlich starke Sekretionsaktivität der klonalen Morphotypen oder auf posttranskriptionelle Regulationsprozesse zurückzuführen. Letztere können einerseits durch Inhibition der Translation durch kleine zur mRNA komplementäre RNAs herbeigeführt werden (Franch & Gerdes 2000). Andererseits können an die mRNA Proteine mit verschiedenen Funktionen binden. Diese können die mRNA vor Degradation durch RNAsen schützen aber auch die Bindung von Ribosomen verhindern. Sie können Sekundärstrukturen einführen, welche die Translationsinitiation verhindern oder verbessern oder auch Terminations/Antiterminationsprozesse der Translation ermöglichen (Nogueira & Springer 2000; Stulke 2002). Im Zusammenhang der posttranskriptionellen Regulation des Eisen-Metabolismus ist bei Eukaryonten das Fe-S Protein Aconitase bekannt (Hantke 2001). Ob Aconitase auch in Prokaryonten regulatorische Funktionen übernimmt ist jedoch noch ungeklärt (Hantke 2001).

Der globale Regulator für die Eisenaufnahme Fur, kodiert durch das *fur*-Gen (Vasil & Ochsner 1999; Hantke 2001), schien nicht zu den beschriebenen differentiellen Regulationen von Genen zur Eisenaufnahme beigetragen zu haben. Es konnte keine differentielle Regulation von *fur* zwischen SCV 20265 bzw. Revertante im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden, obwohl dies anhand der erwähnten Regulationsprofile zu erwarten gewesen wäre. Das *fur*-Gen zeigte sich sogar im Vergleich der SCV 20265 mit der Revertante als gering hochreguliert (Tab. 3.2, Tab. 3.7, Abb. 3.10). Vermutlich spielen bei den hier vorliegenden Expressionsprofilen andere Regulationsmechanismen eine Rolle, an denen Fur nicht beteiligt ist. Eine andere Möglichkeit ist, daß durch Mutationen während der adaptiven Radiation der Zelle in der CF-Lunge die Regulation der zellulären Eisen-Aufnahme von Fur entkoppelt wurde.

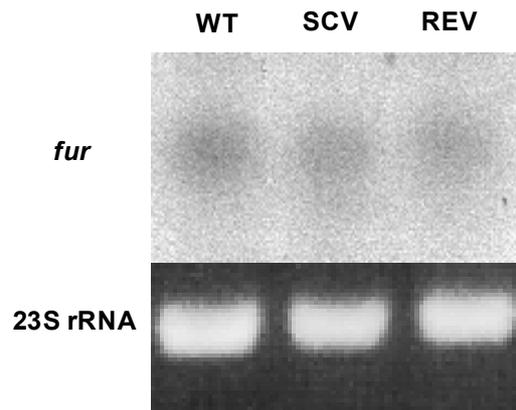


Abb. 3.10 Northern Hybridisierung von *fur* aus *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp (WT) und Revertante (REV) nach exponentiellem Wachstum.

RNA von SCV 20265, Wildtyp und Revertante 20265 wurde mit einer *fur*-Sonde hybridisiert. Es kann keine erhebliche differentielle Regulation des ca. 540 bp *fur*-Transkripts innerhalb der klonalen Morphotypen festgestellt werden. Die abgebildeten 23S rRNA Banden des geblotteten RNA-Agarose-Gels dienen als Kalibrierungsmaßstab aufgetragener RNA-Mengen.

Die Genexpressions-Analysen weisen darauf hin, daß die SCV 20265 während der exponentiellen Phase in der Lage ist extrazellulär zur Verfügung stehendes Eisen effektiver aufnehmen kann als seine klonalen Morphotypen und damit in Eisen-limitierten Umgebungen wie der menschlichen Lunge kompetitiver ist. Neuere Studien zeigen, daß Lactoferrin durch seine chelatorischen Eigenschaften die Entwicklung von Biofilmen inhibiert und so zur sogenannten angeborenen Immunität des Menschen beiträgt (Singh *et al.* 2002). Eine optimale Eisenaquirierung ist also essentiell für die Entwicklung eines Biofilms und damit für die Entstehung einer chronischen Infektion. Ob SCV 20265 bzw. weitere SCVs entsprechend adaptiert sind, muß in weiteren Studien bestätigt werden.

III.2.7. Differentiell regulierte Gene des anaeroben Wachstums und der oxidativen und antibiotischen Resistenz

P. aeruginosa bildet Biofilme in anaeroben Mukusplaques und verwendet vermutlich Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor (Worlitzsch *et al.* 2002). Bei der anaeroben NO_3^- -Respiration fällt NO als Intermediat an, das als starkes Oxidationsmittel eine antimikrobielle Aktivität besitzt (Fang 1997). Die Reaktion von NO mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt zur Synthese eines großen Spektrum zellschädigend wirkender Oxidationsmittel (Pacelli *et al.* 1995). Peroxynitrit (ONOO^-) ist ein besonders toxischer Vertreter einer solchen Reaktion (Lipton *et al.* 1993). ROS entstehen als Nebenprodukte der aeroben Atmung bei der Reaktion von Sauerstoff mit Flavoproteinen der Atmungskette (Massey 2000) und bei Fenton-Reaktionen mit Eisen als Katalysator (Touati 2000). Fenton-Reaktionen treten auch auf, wenn Eisen im extrazellulären Milieu durch die Siderophore Pyochelin (vgl. Einleitung I.2) gebunden wird (Coffman *et al.* 1990). Eine weitere Quelle reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies nach Besiedelung der Lunge ist der antibakterielle *oxidative burst* von neutrophilen Granulozyten (Witko-Sarsat *et al.* 2000), eines der wichtigsten Verteidigungsmechanismen gegen *P. aeruginosa* (Tümmler & Kiewitz 1999). Reaktiven Stickstoff-Intermediaten wurde eine modifizierende Wirkung auf DNA, Lipide und Proteine zugewiesen. Die Angriffspunkte an Proteinen sind vor allem Thiol-Gruppen aber auch Häm, Eisen-Schwefel-Cluster, phenolische und aromatische Gruppen oder Amine (Fang 1997). In der CF-Lunge persistierende *P. aeruginosa* müssen also Strategien entwickeln, die es vor dem teils durch anaerobe Respiration selbst verursachten und teils habitatbedingten oxidativen Stress schützen. Dazu gehört das Wachstum als Biofilm, da Biofilme eine nachweislich höhere Resistenz gegenüber oxidativem Streß besitzen (Hassett 1996; Hassett *et al.* 1999). Das Wachstum im Biofilm vermittelt ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika, die im Zuge einer antibakteriellen Therapie einen weiteren Streß für die Zellen bedeuten. Darüber hinaus besitzt *P. aeruginosa* neben Antibiotika-Efflux-Transportern zum energiegetriebenen Export von Antibiotika (Putman *et al.* 2000) zahlreiche resistenz-vermittelnde Proteine (Stover *et al.* 2000).

Tab. 3.8 Differentielle Expression von Genen des anaeroben Wachstums und der oxidativen und antibiotischen Resistenz bei *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp und Revertante während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase.

Gen ^b	Protein ^b	Exponentielle Phase ^a			Stationäre Phase ^a		
		SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV
Transport kleiner Moleküle							
PA1862 (<i>modB</i>)	Transport Protein für Molybdän	9,7 (2,0)	4,3 (0,7)	-	-	-	-
PA1863 (<i>modA</i>)	Molybdän-bindendes periplasmatisches Protein	5,5 (0,8)	6,3 (3,1)	-	-	-	-
PA3790 (<i>oprC</i>)	mögliches Kupfer-Aufnahme Protein der äußeren Membran	25,8 (11,3)	9,6 (7,5)	-	-	-	-
Disulfidbrücken-Bildung und Schutz vor oxidativem Stress							
PA0538 (<i>dsbB</i>)	Disulfidbrücken-Bildungs Protein	-24,6 (11,1)	-	6,2 (1,2)	-	-	7,1 (3,6)
PA2025 (<i>gor</i>)	Glutathion Reduktase	-	-	-	-4,4 (0,8)	-	16,7 (8,0)
PA2411	mögliche Thioesterase	-	-	-	-9,4 (4,6)	-	-
PA2475	mögliches Cytochrom P450	-16,3 (0,6)	-	^c	-	-	-
PA2476 (<i>dsbG</i>)	Thiol:Disulfide Austausch Protein	-58,9 (5,0)	-	56,0 (6,3)	-11,7 (1,1)	-	11,4 (1,8)
PA2477	mögliches Thiol:Disulfide Austausch Protein	-41,1 (5,6)	-	132,8 (49,2)	-14,6 (11,7)	-	37,0 (12,3)
PA2478	mögliches Thiol:Disulfide Austausch Protein	-111,7 (38,2)	-	217,0 (56,1)	-49,6 (5,2)	-	50,6 (22,9)
PA2827	konserviertes, hypoth. Protein	2,3 (0,2)	3,4 (0,4)	-	-	-	-
PA3331	Cytochrom P450	-	-	-	-3,1 (0,6)	-	7,6 (1,6)
PA5240 (<i>trxA</i>)	Thioredoxin	2,3 (0,1)	3,1 (0,7)	-	-	-	-
Zwei Komponenten Systeme							
PA2479	möglicher 2-Komponenten System Regulator	-13,9 (4,0)	-	9,2 (3,3)	-6,9 (1,7)	-	6,5 (2,0)
PA2480	möglicher 2-Komponenten System Sensor	-18,8 (4,8)	-	82,5 (52,3)	-3,8 (0,9)	-	6,5 (1,1)
Antibiotika-Resistenz							
PA4110 (<i>ampC</i>)	β-Lactamase	4,0 (1,7) ^d	-	-4,6 (1,8)	-	-	-
Translation, post-translationale Modifikation, Degradation							
PA3049 (<i>rmf</i>)	Ribosomen Modulationsfaktor	4,8 (0,3)	6,7 (2,6)	-	-	-	-

^a Angegeben ist das arithmetische Mittel der Signalintensitäts-Verhältnisse aus vier Kreuzvergleichen. In der Klammer befindet sich die Standardabweichung. Hochregulierte Gene haben positive, herunterregulierte Gene negative Werte.

^b PA-Nummer, Gen- und Proteinname wurden überwiegend vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen.

^c Die Expression war nur in 2 von 4 GeneChip Einzelvergleichen signifikant unterschiedlich.

^d Die Expression war nur in 3 von 4 GeneChip Einzelvergleichen signifikant unterschiedlich.

In der exponentiellen Wachstumsphase weist nur die SCV 20265 eine Überexpression der Gene *modA* und *modB* auf (Tab. 3.8). Diese Gene sind essentiell für die Aufnahme von Molybdat, welches für die Biosynthese des Molybdäncofaktors, einem Bestandteil der Nitrat-Dehydrogenase, notwendig ist (Self *et al.* 1999). Diese Gene werden bei *P. aeruginosa* unter anaeroben bzw. mikroaerophilen Bedingungen hochreguliert (G. Döring, nach pers. Mitteilung). Das gleiche trifft für *oprC* (PA3790) zu, dessen Genprodukt eine noch ungeklärte Rolle in der Kupferaufnahme spielt (Yoneyama & Nakae 1996) (Tab. 3.8). Kupfer ist unter anderem als Cofaktor in den aktiven Zentren der Ferrooxidase PcoA zur Fe²⁺-Aufnahme (Huston *et al.* 2002) und des vermutlich in der Detoxifikation von NO involvierten Azurins zu finden (Vijgenboom *et al.* 1997).

Eine Möglichkeit sich vor NO zu schützen besteht für *P. aeruginosa* darin, den grünen Farbstoff Pyocyanin zu sezernieren. Dieser Sekundärmetabolit aus der Stoffgruppe der Phenazine besitzt eine NO detoxifizierende Wirkung (Warren *et al.* 1990) und wird darüber hinaus als redoxaktiver Virulenzfaktor diskutiert (Kerr 2000). Wie bereits erwähnt, weisen die in den Expressionsstudien verwendeten Morphotypen SCV 20265, Wildtyp und Revertante in Kultur unterschiedliche Färbungen auf (vgl. III.1), was auch auf einen Unterschied in der Pyocyanin-Sekretion hindeutet. Analog zur Pyoverdin-Bestimmung (vgl. III.2.6) wurden neben den klonalen Morphotypen der SCV 20265 zwei weitere Triplets um die SCVs 10 und 29 in ihrer Fähigkeit zur Pyocyanin-Produktion und -Sekretion verglichen. Dazu wurden sie in stimulierendem King's B Medium (King *et al.* 1954) kultiviert und die Zellüberstände wurden anhand ihrer optischen Dichte bei 695 nm miteinander verglichen (Abb. 3.11).

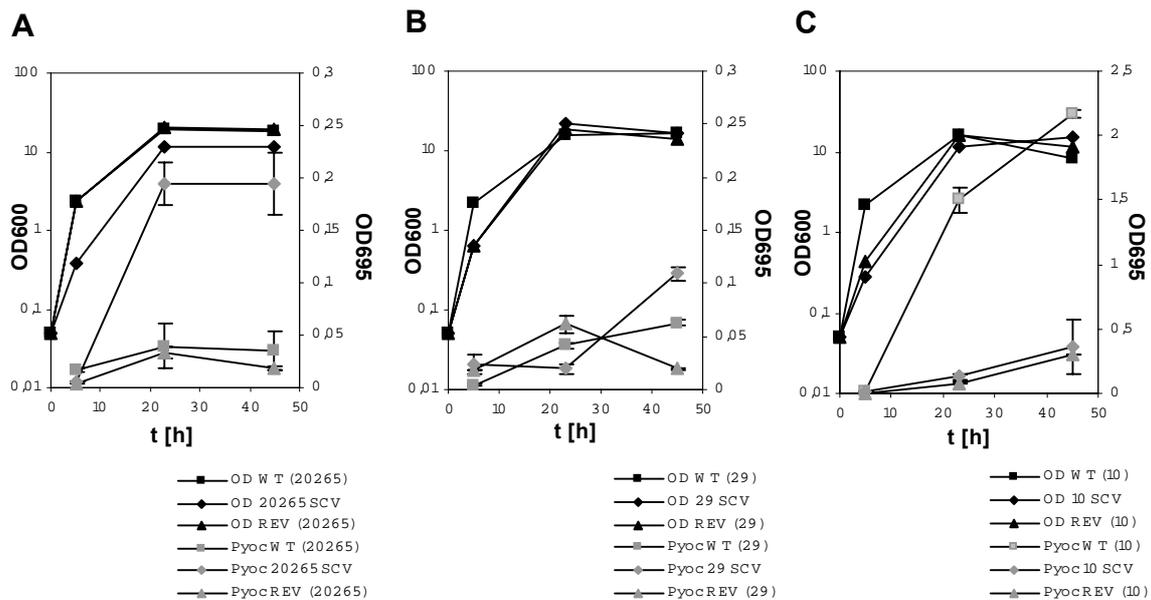


Abb. 3.11 Pyocyanin Produktion drei verschiedener Triplets klonaler Morphotypen.

Die SCV 20265 weisen eine gegenüber dem Wildtyp und der Revertante erhöhte Pyocyanin-Sekretion auf (A). Die Menge sezernierten Pyoverdins kann jedoch aufgrund der abweichenden Ergebnisse für SCV 29 (B), SCV 10 (C) und ihre jeweiligen klonalen Morphotypen nicht als Charakteristikum bestimmter Morphotypen dienen. Zu beachten ist die bei (C) veränderte Ordinaten-Einteilung der OD₆₉₅.

Die Synthese und Sezernierung von Pyocyanin begann analog zu Pyoverdin (vgl. III.2.6), in der späten exponentiellen Phase (nach ca. 8 h). Pyocyanin akkumulierte bis zur frühen stationären Phase (nach ca. 23 h) im Medium. Weiteres Kultivieren (bis ca. 45 h) in der stationären Phase führte nur bei dem Wildtyp der SCV 10 zu einem zusätzlichen starken Anstieg der Farbstoff-Menge. Auch in Bezug auf die Pyocyanin-Sekretion wiesen die unterschiedlichen klonalen Linien der Morphotypen kein einheitliches Bild auf. Der Wildtyp der SCV 10 zeigte die höchste Sekretion, die klonalen Morphotypen von SCV 29 dagegen keine großen Unterschiede. Pyocyanin wurde am stärksten von 20265 SCV innerhalb des klonalen Morphotyp-Triplets sezerniert, wohingegen sich der Wildtyp und die Revertante nicht stark unterschieden. Eine zur SCV 20265 ähnliche Überproduktion von Pyocyanin wurden bei einer SCV von *P. aeruginosa* 57 RP nachgewiesen (Deziel *et al.* 2001). Trotz der beobachteten gesteigerten Pyocyanin-Sekretion konnten für SCV 20265 keine in der Pyocyanin-Biosynthese involvierten Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden.

Aus der großen Zahl an protektiven Proteinen gegen oxidativen Stress wie Katalasen, Superoxid-Dismutasen und Peroxidasen (Zheng *et al.* 2001; Mongkolsuk & Helmann 2002) wurde in der vorliegenden Studie nur ein Gen, die Glutathion-Reduktase *gor* (PA2025), als

differentiell reguliert identifiziert (Tab. 3.8). In der stationären Phase ist das *gor*-Gen in der SCV 20265 und zugehöriger Revertante im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert. Die Thiol-Gruppen von reduziertem Glutathion stellen einen intrazellulären Schutz der Zelle gegen reaktive Stickstoff- und Sauerstoff Moleküle dar (Fang 1997). Demgegenüber zeigen die Proteinexpressionsstudien von Wehmhöner (2002) eine Überproduktion einer Thiol-Peroxidase (PA2532) und einer möglichen Peroxidase (PA3529) im Proteom stationärer Kulturen von SCV 20265 und der Revertante sowie eine verringerte Synthese eines möglichen vor ROS schützenden DNA-Bindeproteins (PA0962). Darüber hinaus wies das Chaperon GroEL (PA4385) eine Überexpression in SCV 20265 in beiden Wachstumsphasen auf (Wehmhöner 2002). Daraus ist zu schließen, daß sich anhand der Proteinexpression von SCV 20265 im Gegensatz zur Genexpression eine Adaptation der SCV 20265 an oxidativen Streß aufzeigen läßt. Diese differentielle Regulation vor Oxidantien schützenden Proteine ist zu vergleichen mit Proteom-Analysen von *P. aeruginosa* Biofilmen: Hier zeigten besonders spätere Entwicklungs-Stadien eine Überexpression der Superoxiddismutase (Sauer *et al.* 2002). In Vergleichsexperimenten anaerober und aerober Biofilme wurden die oben erwähnten Peroxidasen PA2532 und PA3529 in anaeroben Biofilmen überexprimiert (Yoon *et al.* 2002).

Wie bereits erwähnt, sind Thiol-Gruppen von Proteinen die primären Angriffsziele reaktiver oxidativer Verbindungen. Dadurch kann die Struktur der Proteine über Fehlfaltungen und/oder über die Bildung von Disulfidbrücken nah beieinanderliegender Thiol-Gruppen modifiziert werden (Stamler 1995). Peptid Methionin Sulfoxid Reduktasen reduzieren die durch Oxidation fehlgefalteten Proteine im Cytoplasma, die dafür notwendigen Reduktionsäquivalente beziehen sie von Thioredoxinen (Lowther *et al.* 2000). SCV 20265 und Revertante weisen eine erhöhte Expressionsrate der Gene PA2827 und *trxA* (PA5240) auf (Tab. 3.8). Das Gen *trxA* kodiert für ein Thioredoxin. PA2827 wurde als konserviert hypothetisch annotiert, jedoch besitzt das Gen eine konservierte Domäne (Pfam Domäne PF01641), die oft in Peptid Methionin Sulfoxid Reduktasen zu finden sind. Da jedoch das konservierte katalytische Zentrum von Peptid Methionin Sulfoxid Reduktasen fehlt, bleibt die Funktion von PA2827 weiter unklar.

Thioredoxine sind ebenfalls Lieferanten für Reduktionsäquivalente zur Isomerisierung fehlgefalteter Proteine im Periplasma (Collet & Bardwell 2002). Dies betrifft meist Proteine, die über den Typ II Sekretionsweg sezerniert werden. Thioredoxin gibt die Elektronen an das

membranständige Protein DsbD ab, welches die Elektronen auf DsbC und DsbG im Periplasma weiterleitet. Reduzierte DsbC und DsbG sind aktiv und überführen fehlgefaltete Proteine in native Proteine (reduktiver Weg). Neben diesem reduktiven Isomerisierungssystem existiert im Periplasma ein oxidativer Weg, der die in das Periplasma transportierten und noch im reduzierten Zustand vorliegenden Proteine oxidiert. Reduzierte Thiol-Gruppen eines Proteins werden oxidativ miteinander verknüpft und das Protein nimmt seine Tertiärstruktur an. Oxidiertes DsbA übernimmt die Reduktionsäquivalente der reduzierten Proteine und übergibt sie an das membranständige DsbB, welches die Elektronen über Ubichinon bzw. Menachinon in die aerobe bzw. anaerobe Atmungskette einschleust (Collet & Bardwell 2002).

Die Transkriptionsprofile von SCV 20265 und der Revertante zeigen in Kulturen der exponentiellen Phase eine extreme Repression von *dsbB* (PA0538) aus dem oxidativen Weg und *dsbG* (PA2476) aus dem reduktiven Weg (Tab. 3.8). DsbG wurde entsprechend auch im Proteom als differentiell reguliert gefunden (Wehmhöner 2002). Darüber hinaus sind neben *dsbG* zwei weitere Thiol-Disulfid Isomerisierungsproteine (PA2477, PA2478), die sich vermutlich im gleichen Operon wie *dsbG* befinden, mit *dsbG* coreguliert (Tab. 3.8). Die Regulation könnte von dem direkt benachbarten Zweikomponenten-System ausgehen. Das Zweikomponenten-System zeigt ein ähnliches Regulationsbild, was darauf hin weist, daß es noch mindestens einen weiteren Regulator für dieses Regulon geben muß. Das Expressionsprofil des stromaufwärts von *dsbG* liegenden Gens PA2475, eines Cytochrom P450, legt die Vermutung nahe, daß es sich hier um eine Operonstruktur PA2475-PA2478 handeln könnte (Abb. 3.12).

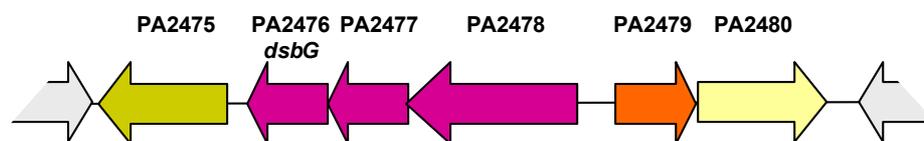


Abb. 3.12 Organisation des *dsbG* Operons (PA2475-2478) und eines nahegelegenen Zwei-Komponenten-Systems (PA2479-2480).

P450 Cytochrome ähneln Flavoproteinen nicht nur aufgrund ihrer hydroxylierenden Aktivität, sondern auch in ihrer Freisetzung von ROS (Goeptar *et al.* 1995). Ein weiteres Gen eines Cytochroms P450 (PA3331) erschien in der stationären Phase als herunterreguliert in SCV 20265 und Revertante (Tab. 3.8). Darüber hinaus zeigen Cluster-Analysen der

Signalintensitäten aller differentiell regulierten Gene, daß möglicherweise 11 weitere hypothetische und konserviert hypothetische Gene in einem Funktionszusammenhang zu *dsbB* und dem *dsbG*-Operon stehen könnten (Abb. 3.13).

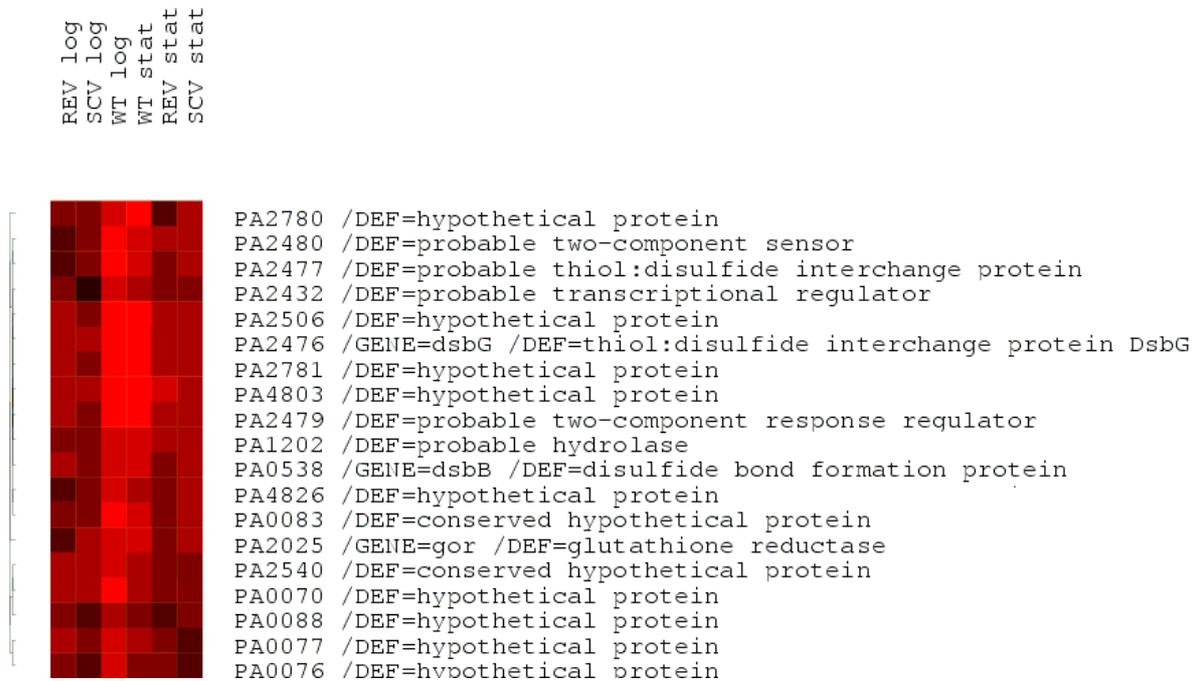


Abb. 3.13 Auszug aus einer genomweiten Cluster-Analyse von SCV 20265 und seinen klonalen Morphotypen nach exponentiellem und stationärem Wachstum.

Log₂ transformierte Signalintensitäten aller in den Morphotyp-Vergleichen aufgefallenen differentiell regulierten Gene wurden einer *complete linkage* hierarchischen Cluster-Analyse mit der Pearson-Korrelation als Distanz-Maß unterzogen. Eine Reihe von hypothetischen Genen zeigen ähnliche Expressionsprofile wie *dsbB* und Gene des *dsbG* Operons, was auf einen funktionellen Zusammenhang hindeuten könnte.

Eine Einschränkung der Proteinsekretion von SCV 20265 durch die Beeinträchtigung des Dsb-Systems konnten im Proteom nicht nachgewiesen werden (Wehmhöner 2002). Vielleicht wirkt sich die Repression der *dsb*- und funktionell verwandter Gene aber auch nicht auf die Sezernierungseffektivität sondern auf die Aktivität der sezernierten Proteine aus. Mißgefaltete Proteine werden unter den denaturierenden Bedingungen der von Wehmhöner (2002) verwendeten Proteinauftrennung nicht detektiert. Es liegen kaum funktionelle Daten für periplasmatisch gefaltete Typ II sezernierte Proteine vor, die nachgewiesene Funktionalität der Typ IV Pili für SCV 20265 und Revertante ist das einzige Beispiel (Häußler *et al.* 2003). Aktivitätstests Typ II sezernierter Enzyme wie Lipase, alkalische Protease und Elastase (Urban *et al.* 2001) könnten weitere Aufschlüsse darüber liefern ob die SCV 20265 einen

größeren Anteil von mißgefalteter und damit in ihrer Aktivität eingeschränkter Proteine über den Typ II Sekretionsweg sezerniert.

Ein weiteres Gen könnte in Zusammenhang mit einer möglichen Adaptation gegen oxidativen Stress stehen, und zwar das ausschließlich in SCV 20265 in der exponentiellen Phase hochregulierte und für den Ribosomen Modulationsfaktor kodierende Gen *rmf* (Tab. 3.8). Rmf wird bei Verminderung der Wachstumsrate wie z.B. beim Übergang in die stationäre Phase gebildet (Yamagishi *et al.* 1993). Rmf paßt die Translationsmaschinerie durch Dimerisierung der 50S ribosomalen Untereinheiten zu 100S Ribosomen an wachstumshemmende Bedingungen an und erhöht so die Überlebensrate stationärer Zellen (Yamagishi *et al.* 1993). Rmf könnte so auch zur Resistenz gegenüber Antibiotika beitragen, dies konnte jedoch bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wurde jedoch gezeigt, daß ein *P. aeruginosa* Biofilm auf die Präsenz des Aminoglykosids Tobramycin mit einer starken Induktion von *rmf* reagiert (Whiteley *et al.* 2001).

Eine mögliche Ursache der erhöhten Antibiotika-Resistenz von SCV 20265 (Häußler *et al.* 1999a) konnte anhand von Genexpressionsdaten nur durch die Hochregulation des *ampC* Gens belegt werden (Tab. 3.8). Dieses Gen kodiert für eine von vermutlich drei im Genom von *P. aeruginosa* PAO1 enthaltenen β -Lactamasen. β -Lactamasen inaktivieren β -Lactam Antibiotika direkt durch enzymatische Aufspaltung des β -Lactam-Rings und vermitteln so eine Resistenz (Lindberg & Normark 1986). Die *ampC* kodierte β -Lactamase ist induzierbar und wirkt vor allem gegen Cephalosporine (Bush *et al.* 1995).

Die komplexen Transkriptionsprofile redoxaktiver Proteine deuten auf eine vielschichtige Adaptation an das mit reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies durchsetzte Habitat der CF-Lunge hin. Eine Stressantwort, wie sie vor allem für *E. coli* sehr gut bekannt ist (Zheng *et al.* 2001; Mongkolsuk & Helmann 2002), konnte jedoch nicht nachvollzogen werden. In *E. coli* wird die Stressantwort über die Bildung von Disulfidbrücken hochreaktiver Cystein-Seitenketten in mindestens drei verschiedenen Regulatorklassen (OxyR, PerR, OhrR) vermittelt (Mongkolsuk & Helmann 2002). Das Regulatorprotein OxyR induziert im oxidierten Zustand u.a. die phasenvariable Expression des *flu*-Gens, welches für das Antigen 43 in *E. coli* kodiert (Henderson & Owen 1999). Die Expression des Antigens 43 wird vermutlich negativ über die Sekretion Disulfid-haltiger Fimbrien reguliert (Schembri & Klemm 2001) und bewirkt bei *E. coli* starke Autoaggregation, die Bildung von

Mikrokolonien und die Entwicklung von Biofilmen (Danese *et al.* 2000). Bei *P. aeruginosa* konnten keine Proteine mit Homologien zum Antigen 43 festgestellt werden, jedoch vier Proteine mit hohen Homologien zu OxyR (PA0133, PA0491, PA2601 und PA5344), von denen PA5344 nachweislich in die Regulation von oxidativem Stress und DNA Reparatur involviert ist (Ochsner *et al.* 2000b).

In vitro Suszeptibilitätstest gegen verschiedene ROS und NO bzw. ihren Reaktionsprodukten neben Kokultivierungen mit aktivierten neutrophilen Granulozyten könnten funktionelle Hinweise über die unterschiedliche Anfälligkeit der verschiedenen Morphotypen von SCV 20265 gegenüber oxidativem Stress liefern. Hinweise über eine besondere Anpassung von SCV 20265 an das anaerobe Milieu im Mucus von CF-Lungen könnten zum Beispiel über den Vergleich der lag-Phasen von Bakterienkulturen nach einem Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen näher untersucht werden. Ob es bei *P. aeruginosa* in Analogie zu *E. coli* eine Verbindung zwischen Redoxstatus und autoaggregativen Fähigkeiten gibt, bleibt zu klären. Dies könnte sich als besonders interessant herausstellen, da bislang die molekulare Natur des Adhärenzfaktors von SCV 20265 und anderen SCVs der Subgruppe nicht eindeutig aufgeklärt ist (vgl. III.2.5 und III.3.2).

III.3. Mögliche Ursachen des SCV Morphotyps

P. aeruginosa muß sich unterschiedlichsten Habitaten anpassen und in der Lage sein, auf ständig wechselnde nischenspezifische Umweltfaktoren zu reagieren, um als ubiquitär vorkommendes opportunistisches Pathogen zu überleben. Diese ubiquitäre Lebensweise spiegelt sich in der Größe des *P. aeruginosa* Genoms (vgl. Einleitung I.1) wider, welches die regelmäßige Besiedlung eines breiten Nischen-Spektrums ermöglicht (Stover *et al.* 2000). Ständige Veränderungen von Umweltfaktoren einer ökologischen Nische bewirken einen starken Selektionsdruck auf Bakterien und führen zur Selektion von stress-resistenten Phänotypen. Die regulierte Expression von Genen reicht hier unter Umständen nicht aus, um den Veränderungen zu begegnen. Entweder entwickeln die Bewohner der Nische Adaptationsmechanismen, meist über chromosomale Mutationen oder Rearrangements, oder sie haben einen Selektionsnachteil und sind damit gegenüber stress-resistenteren Phänotypen oder anderen angepaßten Spezies nicht konkurrenzfähig. Abgesehen von abiotischen und biotischen Streßfaktoren ist *P. aeruginosa* als Pathogen Antibiotika oder den Attacken des Immunsystems des Wirtes ausgesetzt. Die chronisch infizierte CF-Lunge birgt darüber hinaus durch die ständig ablaufenden Entzündungsprozesse und die damit einhergehenden Gewebeschädigungen einen extrem heterogenen und sich verändernden Lebensraum (Rainey & Moxon 2000). Der Nachweis, daß sich phänotypische Varianten von Pseudomonaden innerhalb kürzester Zeit in einer heterogenen Umwelt bilden wurde bereits geführt (Rainey & Travisano 1998). Das Auftreten von phänotypischen Varianten als Ausdruck von Adaptations- und Differenzierungsprozessen ist für *P. aeruginosa* schon länger bekannt und wurde als „dissoziatives Verhalten“ beschrieben (Zierdt & Schmidt 1964). Muköse *P. aeruginosa* (Govan & Deretic 1996) und SCVs (Häußler *et al.* 1999a) sind Beispiele solcher Varianten und werden durch ihr verändertes makroskopisches Erscheinungsbild leicht erkannt. Die Bildung von phänotypischen Varianten ist also ein Produkt mikroevolutionärer Prozesse.

Die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen für die Ausbildung von SCVs können unterschiedlicher Natur sein.

Aufgrund der Übereinstimmung von Fragmentlängen *SpeI* verdauter genomischer DNA und der damit festgestellten klonalen Identität der in dieser Arbeit untersuchten Morphotypen können Rekombinationen (Insertions- und Deletions-Ereignisse) großer Sequenzabschnitte (Schmidt *et al.* 1996; Römling *et al.* 1997; Larbig 2002) weitgehend ausgeschlossen werden.

Mögliche Ursachen der Ausbildung von SCVs sind einerseits differentielle Genregulationen, die nach einem „Alles oder Nichts“ Prinzip einen ausgeprägten und leicht zu differenzierenden Phänotyp zur Folge haben. Beispiel für die durch die Regulatorproteine OxyR (vgl. III.2.7) oder Lrp in Wechselwirkung mit Dam-Methylasen verursachten Phasenvariationen sind die Expression des Antigens 43 (Henderson & Owen 1999) (vgl. III.2.7) und der P Fimbrien bei *E. coli* (van der Woude *et al.* 1996).

Andererseits können Mutationen die Ausbildung phänotypischer Varianten auslösen, welche somit ursächlich mit einer genetischen Variation verknüpft sind (Massey & Buckling 2002). Diese Mutationen treten aufgrund von Fehlern bei der DNA-Replikation und mangelnder Genauigkeit der DNA-Reparaturmechanismen genomweit auf, haben jedoch eine geringe Frequenz. Mutationsraten können jedoch auch bei sog. Hypermutatoren genomweit erhöht sein (Giraud *et al.* 2001), was unter Umständen sogar durch Umweltfaktoren reguliert sein kann (McKenzie & Rosenberg 2001). Weiterhin sind erhöhte Mutationsraten beschrieben, die auf spezifische Sequenzbereiche beschränkt sind (Moxon *et al.* 1994; Henderson *et al.* 1999). Unter normalen Umständen werden einzelne Mutationen durch die zelleigene DNA-Reparaturmaschinerie schnell repariert. Genomweit erhöhte Mutationsraten wurden andererseits in sogenannten Hypermutatoren klinischer Isolate von *P. aeruginosa* (Oliver *et al.* 2000) und anderen pathogenen Bakterien, wie *Neisseria meningitidis* (Richardson *et al.* 2002), *E. coli* und *Salmonella* (LeClerc *et al.* 1996; Denamur *et al.* 2002) gefunden. *P. aeruginosa* Hypermutatoren konnten aus einem großen Anteil (36 %) von untersuchten CF-Patienten isoliert werden und sind auf Mutationen in Genen der DNA-Reparatur (*mutS*, *mutL*, *uvrD*) zurückzuführen (Oliver *et al.* 2000; Oliver *et al.* 2002). Hypermutatoren sind vermutlich ein Produkt adaptiver Prozesse, da sie bei *E. coli* spontan bei *in vitro* Versuchen zur Langzeit-Adaptation an neue Umweltbedingungen auftreten (Sniegowski *et al.* 1997). In *P. aeruginosa* wurden über das Insertionselement IS6100 vermittelte Insertions/Inversions Ereignisse großer chromosomaler Segmente für Defekte in *mutS* verantwortlich gemacht (Kresse *et al.* 2003).

Die Erhöhung genomweiter Mutationsraten kann auch durch Umweltfaktoren, wie Nahrungsmangel in der stationären Wachstumsphase, induziert werden. So werden zum Beispiel bei der zellulären SOS Antwort DNA-Polymerasen wie DinB (Pol IV) aktiviert, deren DNA-Replikation stark fehleranfällig ist (McKenzie & Rosenberg 2001).

Im Gegensatz zu genomweit erhöhten Mutationsraten sind chromosomal kodierte phänotypische Schalter, sog. *contingency loci*, bekannt, deren Sequenzabfolge geradezu darauf ausgelegt ist, leicht zu mutieren und eine starke phänotypische Antwort zu induzieren.

Diese Phasenvariationen können reversibel ($Aus \Leftrightarrow An$) oder irreversibel ($Aus \Rightarrow An$) sein (Henderson *et al.* 1999) und können über Umwelteinflüsse regulierbar sein. Allgemein tragen sie bei pathogenen Bakterien zur Adhärenz und Virulenz sowie zur Protektion vor dem Immunsystem des Wirts bei (Moxon *et al.* 1994; Henderson *et al.* 1999; Bayliss *et al.* 2001).

In dieser Arbeit wurde besonders auf mögliche mutative Ursachen des SCV-Morphoytyps eingegangen. Mutative Ereignisse sind durch das Auffinden von Hypermutatoren in der CF-Lunge (Oliver *et al.* 2000) als wichtiger Adaptationsmechanismus für *P. aeruginosa* sehr wahrscheinlich. Mutative Ereignisse werden darüber hinaus auch für den mukoiden Phänotyp von *P. aeruginosa* verantwortlich gemacht (Govan & Deretic 1996).

III.3.1. Die SCV 20265 weist keine Mutation im *hemB*-Gen zur Häm-Biosynthese auf

SCVs von *S. aureus* und *E. coli* wurden als *hemB*-Mutanten beschrieben (Von Eiff *et al.* 1997; Vaudaux *et al.* 2002; Roggenkamp *et al.* 1998). Eine Mutation im *hemB*-Gen führt zur funktionellen Beeinträchtigung der kodierten δ -Aminolevulinsäure-Dehydratase, einem essentiellen Enzym für die Häm-Biosynthese, und damit zu einem verlangsamten Wachstum. Zunächst mußte entsprechend überprüft werden ob es sich bei den *P. aeruginosa* SCVs nicht ebenfalls um *hemB*-Mutanten handelt.

Versuche zur Aufhebung eines möglichen Defektes durch die Zugabe von Häminen in das Wachstumsmedium hatten keine Auswirkungen auf die Koloniemorphologie von *P. aeruginosa* SCVs (Häubler *et al.* 1999a). Genauere molekularbiologische Analysen mit SCV 20265 sollten Gewißheit liefern, ob das *hemB*-Gen in diesem Morphotyp intakt ist und exprimiert wird. Mittels Southern-Hybridisierungen konnten keine größeren Deletionen oder Insertionen im *hemB*-Gen festgestellt werden (Abb. 3.14, A), Northern Analysen zeigten entsprechend eine gleichermaßen hohe Genexpression in den klonalen Morphotypen (Abb. 3.14, B, Tab. 3.2).

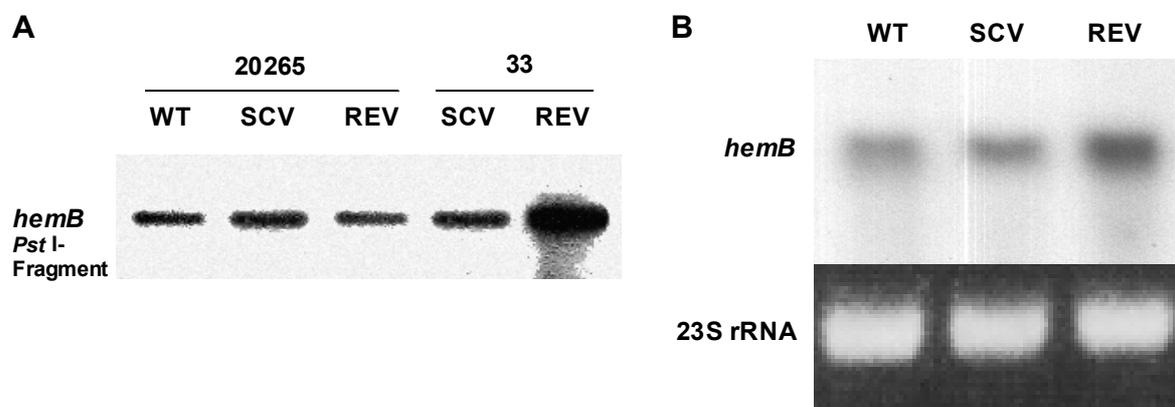


Abb. 3.14 Southern (A) und Northern Hybridisierungen (B) mit einer *hemB*-Sonde.

(A) Genomische DNA von SCV 20265, Wildtyp und Revertante sowie SCV 33 und Revertante wurde *Pst*I verdaut, und mit einer *hemB*-Sonde hybridisiert. Entsprechend der *hemB*-Lokalisierung im PAO1-Genom wurden ausnahmslos 2273 bp großen DNA-Fragmente detektiert. Es können somit keine DNA-Rearrangements festgestellt werden.

(B) Nach exponentiellem Wachstum wurde RNA von SCV 20265, Wildtyp und Revertante 20265 mit der unter (A) verwendeten *hemB*-Sonde hybridisiert. Es kann keine erhebliche differentielle Regulation des ca. 1470 bp *hemB*-Transkripts innerhalb der Morphotypen festgestellt werden. Die abgebildeten 23S rRNA Banden des geblotteten RNA-Agarose-Gels dienen als Kalibrierungsmaßstab aufgetragener RNA-Mengen.

Die GeneChip basierten Genom- und Expressions-Analysen bestätigten diese Resultate. In Zusammenarbeit mit S. Häußler wurde ein Versuch zur *in trans* Komplementierung von SCV 20265 mit dem *hemB*-Gen durchgeführt. Damit sollte sichergestellt werden, daß keine in der Expressionsanalyse unsichtbaren Punktmutationen die Ursache für eine letztlich funktionell beeinträchtigt HemB-Enzym sind. Das *hemB*-Gen wurde dazu mitsamt eines stromaufwärts gelegenen Sequenzabschnittes von 229 bp, der die Ribosomen-Bindestelle sowie einen potentiellen σ^{70} -Promoter enthielt und eines 119 bp langen stromabwärts anschließenden Sequenzabschnittes über PCR amplifiziert. Mit Hilfe entsprechend konstruierter Primer wurde eine *SpeI* und eine *XbaI* Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das PCR-Fragment wurde in pBBR1MCS-3 kloniert, einem Vektor mit breitem Wirtsspektrum und einer Tetrazyklinresistenz als Selektionsmarker (Kovach *et al.* 1994; Kovach *et al.* 1995) (Abb. 3.15).

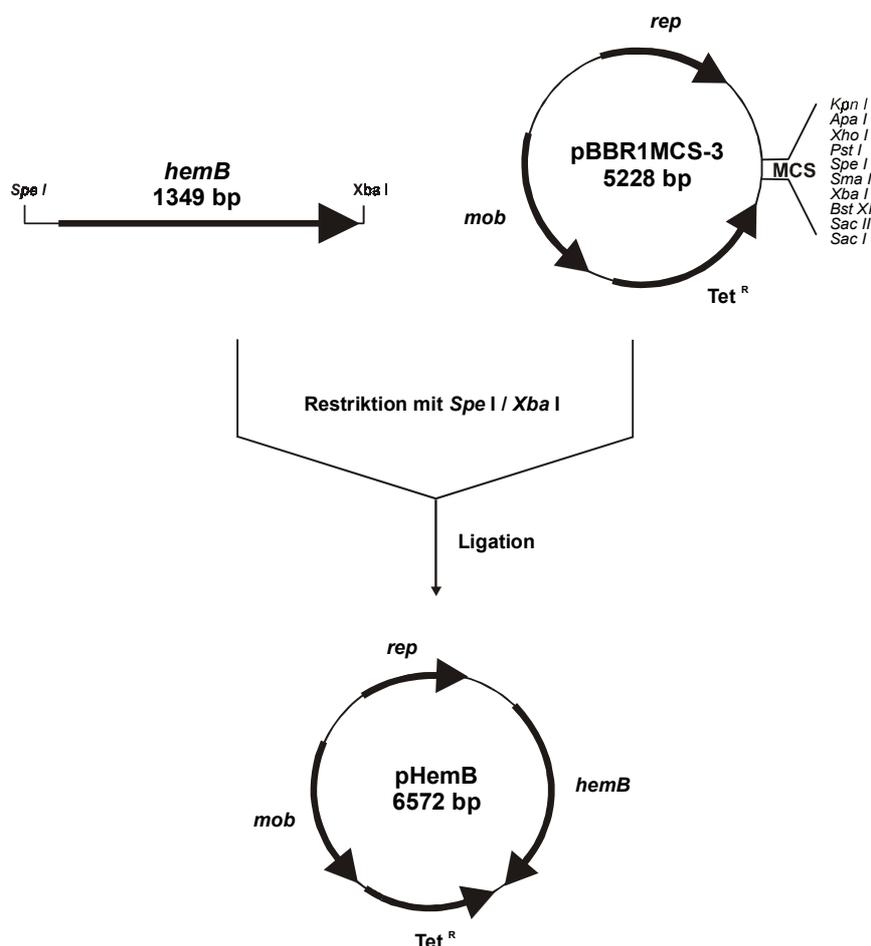


Abb. 3.15 Klonierungsschema eines funktionellen *hemB*-Gens in pBBR1MCS-3.

In ein 1349 bp PCR-Fragment, welches das *hemB*-Gen sowie 229 bp der 5'-Region enthält (σ^{70} -Promoter und Ribosomen-Bindestelle), wurden über entsprechende Primer *SpeI* und *XbaI* Restriktionsschnittstellen eingeführt. Über diese wurde das Fragment in den *broad host range* Vektor pBBR1MCS-3 mit Tetrazyklin-Resistenz (Kovach *et al.* 1994; Kovach *et al.* 1995) kloniert, woraus der Vektor pHemB resultierte. Mit diesem Vektor wurde anschließend versucht den *small colony*-Phänotyp von SCV 20265 zu komplementieren.

Mit dem Konstrukt pHemB wurde SCV 20265 über Elektroporation transformiert. Die Bereitstellung eines funktionellen *hemB*-Gens *in trans* führte jedoch wie vermutet zu keiner Vergrößerung des Koloniedurchmessers von SCV 20265 pHemB.

Durch den Nachweis eines *hemB*-Gens und *hemB*-Transkriptes sowie einer ergebnislosen Komplementation mit einem funktionellen *hemB*-Gen in SCV 20265 kann ein Gendefekt von *hemB* für SCV 20265 als Ursache für die Morphotyp-Konversion ausgeschlossen werden. Da sich die Komplementierung mit Hämin nicht auf das Wachstumsverhalten der in unserer Arbeitsgruppe untersuchten SCVs auswirkte (Häußler *et al.* 1999a) spricht viel dagegen, die Befunde für *E. coli* und *S. aureus* auf *P. aeruginosa* zu übertragen. Gleiches gilt vermutlich für SCVs des mit *P. aeruginosa* nah verwandten Pathogen *Burkholderia pseudomallei*, des Erregers der Melioidose. Die *B. pseudomallei* SCVs sind ebenfalls nicht durch Häminzugabe zu komplementieren (Häußler *et al.* 1999b).

III.3.2. Eine Mutation des *lpdG*-Gens bewirkt einen SCV 20265 ähnlichen aber nicht identischen Phänotyp

Falls die Morphotyp-Konversion Ausdruck einer Mutation eines einzelnen Gens von *P. aeruginosa* ist, müßte eine genomweit angelegte Tn5-Transposonmutagenese mit dem Wildtyp der SCV 20265 die *in vivo* auftretenden evolutiven mutativen Ereignisse *in vitro* modellieren können. Diese Experimente wurden von V. Wilde und F. Bredenbruch aus der Arbeitsgruppe um S. Häußler (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene) durchgeführt.

Als Ergebnis der Tn5-Mutagenese konnte eine Reihe von unterschiedlichen Mutanten gefunden werden, die ein kleines Koloniewachstum aufweisen (S. Häußler, pers. Mitteilung). Dieser Versuch beweist, daß Mutationen in verschiedenen Genen zu kleinem Koloniewachstum, vergleichbar mit SCV 20265, führen können. Diese klein-wachsenden Mutanten sind in Bezug auf weitere phänotypische Merkmale, wie zum Beispiel Autoaggregation, in verschiedene Klassen aufzuteilen, was die bereits angesprochene große Heterogenität der aus klinischen Proben isolierten SCVs (Häußler *et al.* 2003) erklären könnte.

Die phänotypischen Eigenschaften der Wildtyp Tn5-Mutante 25/C1 sind denen der SCV 20265 besonders ähnlich. Neben der Ausbildung von kleinen Kolonien zeigte diese Mutante eine verstärkte Autoaggregation in flüssigem Vogel-Bonner Minimalmedium und eine Hyperpilierung, nachgewiesen durch initiale elektronenmikroskopische Untersuchungen. Die beobachtete Autoaggregation und Hyperpilierung waren jedoch nicht ganz so ausgeprägt, wie bei SCV 20265. Die Sequenzierung des mutierten Gens wies eine Insertion des Tn5 Transposon im *lpdG*-Gen (PA1587) nach (S. Häußler, pers. Mitteilung). Das *lpdG*-Gen kodiert für eine Lipoamide Dehydrogenase-Glc (E.C. 1.8.1.4). Die Lipoamid Dehydrogenase-Glc ist eine Untereinheit des aus drei Enzymen bestehenden Multienzymkomplexes der im Citrat-Zyklus aktiven α -Ketoglutarat Dehydrogenase. Das *lpdG*-Gen ist entsprechend in einem Operon lokalisiert, in dem mit der Succinat-Dehydrogenase (*sdhA-D*; PA1581-PA1584), den anderen beiden Untereinheiten der α -Ketoglutarat Dehydrogenase (*sucA-B*; PA1585-PA1586) sowie der Succinyl-CoA-Synthetase (*sucC-D*; PA1588-PA1589) weitere Enzyme des Citrat-Zyklus organisiert sind. Die hier durchgeführte genomweite Expressionsanalyse der Mutante 25/C1 mit *P. aeruginosa* GeneChips sollte aufklären ob die Mutation des *lpdG*-Gens im Wildtyp ähnliche Regulationsprofile induziert, wie sie für die SCV 20265 gefunden wurden. Damit sollten Rückschlüsse auf die Ursachen der Entstehung der SCV 20265 gewonnen werden.

Tab. 3.9 Differentielle Genexpression der Tn5 Mutante 25/C1 im Vergleich zu dem Wildtyp (20265) während der exponentiellen Wachstumsphase.

Gen ^a	Protein ^a	Signalintensitäts-Verhältnisse ^b
Citrat-Zyklus		
PA1581 (<i>sdhC</i>)	Succinat Dehydrogenase (C Untereinheit)	3,2 (0,9)
PA1582 (<i>sdhD</i>)	Succinat Dehydrogenase (D Untereinheit)	2,6 (0,6)
PA1585 (<i>sucA</i>)	α -Ketoglutarat Dehydrogenase (E1 Untereinheit)	2,5 (0,2)
PA4829 (<i>lpd3</i>)	Dihydrolipoamid Dehydrogenase 3	30,2 (23,8)
PA1077 (<i>flgB</i>)	flagellares Basal-Körper Protein	11,8 (3,7)
Flagellen		
PA1078 (<i>flgC</i>)	flagellares Basal-Körper Protein	17,9 (14,0)
PA1079 (<i>flgD</i>)	flagellares Basal-Körper Modifizierungs-Protein	5,0 (2,8)
PA1080 (<i>flgE</i>)	flagellares Haken Protein	3,3 (0,8)
PA1082 (<i>flgG</i>)	flagellares Basal-Körper Protein	2,7 (0,2)
AF332547 (<i>orfC</i>)	mögliche 3-Oxoacyl-[Acyl-Transport-Protein] Synthase von Glykosylierungs-Insel. PAK	2,7 (0,3)
AF332547 (<i>flgK</i>)	mit flagellarem Haken assoziiertes Protein, PAK	2,1 (0,1)
Cup Fimbrien		
PA2128	Fimbrien Protein	39,4 (8,7)
PA2129	Pili-Assemblierungs Chaperon	20,2 (13,8)
PA2130	mögliches usher Protein	7,3 (4,7)
PA2131	hypothetisches Protein	11,4 (11,1) ^c
PA2132	mögliches Pili-Assemblierungs Chaperon	14,7 (1,0)
PA2133	mögliches Signal-Transduktions Protein, EAL Domäne	8,0 (1,8) ^d
Sonstige Gene mit Funktionszusammenhang		
M29695 <i>cds1</i>	6 -N-Acetyltransferase; Gentamycin- Resistenz vermittelndes Protein, kodiert auf dem integrierten Tn5 Transposon	27,3 (14,4)
PA0997 (<i>pqsB</i>)	Homolog zu β -Keto-Acyl-[Acyl-Transportprotein]-Synthase	9,1 (8,0)
PA0998 (<i>pqsC</i>)	Homolog zu β -Keto-Acyl-[Acyl-Transportprotein]-Synthase	4,6 (1,4)
PA1072 (<i>braE</i>)	Transport Protein verzweigter Aminosäuren	6,4 (3,8)
PA1505 (<i>moaA2</i>)	Molybdopterin-Biosynthese Protein A2	5,2 (2,1)
PA1546 (<i>hemN</i>)	Sauerstoff-unabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase	2,7 (0,4)
PA1984	mögliche Aldehyd Dehydrogenase	5,9 (2,9)
PA2164	mögliche Glycosyl-Hydrolase	3,3 (0,7)
PA2359	möglicher Transkriptionsregulator	4,7 (3,0)
PA3438 (<i>folE1</i>)	GTP Cyclohydrolase I	6,2 (2,9)
PA3832 (<i>holC</i>)	DNA-Polymerase III, chi Untereinheit	5,0 (2,9)
PA3834 (<i>valS</i>)	Valyl-tRNA Synthetase	2,6 (0,3)
PA4242 (<i>rpmJ</i>)	50S ribosomales Protein L36	3,0 (0,6)
PA4425	mögliche Phosphoheptose Isomerase	2,5 (0,3)
PA4461	mögliche ATP-bindende Komponente eines ABC Transporters	2,6 (0,4)
PA4827	mögliche N-Hydroxyarylamin O-Acetyltransferase	6,2 (2,7)
PA4843	möglicher Zwei-Komponenten-System Response Regulator, GGDEF Domäne	2,4 (0,2)

Tab. 3.9 Differentielle Genexpression der Tn5 Mutante 25/C1 im Vergleich zu dem Wildtyp (20265) während der exponentiellen Wachstumsphase (Fortsetzung).

Gen ^a	Protein ^a	Signalintensitäts-Verhältnisse ^b
Sonstige Gene mit Funktionszusammenhang (Fortsetzung)		
PA5210	mögliche Sekretionssystem ATPase	3,6 (0,5)
PA5272 (<i>cyaA</i>)	Adenylat Cyclase	4,9 (1,0)
PA5530	möglicher MFS Dicarboxylat-Transporter	6,5 (1,2)
Hypothetische Proteine		
PA1189	konserviertes hypothetisches Protein	4,1 (1,8)
PA1333	hypothetisches Protein	2,6 (0,3)
PA1465	hypothetisches Protein	3,2 (0,6)
PA2027	hypothetisches Protein	3,9 (0,9)
PA2126	konserviertes hypothetisches Protein	3,3 (0,7)
PA2127	konserviertes hypothetisches Protein	6,1 (4,7)
PA2134	hypothetisches Protein	3,1 (0,8)
PA2159	konserviertes hypothetisches Protein	2,5 (0,2)

^a PA-Nummer, Gen- und Proteinname wurden vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen. Für nicht-PAO1 Gene werden statt PA-Nummer der GenBank-Eintrag sowie eine nähere Bezeichnung des einzelnen Gens angegeben.

^b Angegeben ist das arithmetische Mittel der Signalintensitäts-Verhältnisse aus vier Kreuzvergleichen. In der Klammer befindet sich die Standardabweichung. Hochregulierte Gene haben positive, herunterregulierte Gene negative Werte.

Die genomweite Transkriptanalyse der aus der Tn5 Mutagenese hervorgegangenen Wildtyp-Mutante 25/C1 erbrachte keinen Hinweis auf eine Ähnlichkeit der Genexpressionsprofile zur SCV 20265 (vgl. Tab. 3.9 mit Anhang Tab. 6.1).

Die Mutante 25/C1 zeichnete sich durch mehr als 40 im Vergleich zum Wildtyp induzierte Gene aus, wohingegen sich kein Gen als reprimiert zeigte (Tab. 3.9). Dieses auffällige Ergebnis spiegelte vermutlich den Versuch des Organismus wider, den Gendefekt im *lpdG*-Gen zu kompensieren. Bezeichnend erscheint in diesem Zusammenhang die Induktion der Gene *sdhC* (PA1581) und *sdhD* (PA1582), welche Succinat Untereinheiten kodieren sowie die gesteigerte Expression von *sucA* (PA1585), kodierend für eine der Untereinheiten der α -Ketoglutarat Dehydrogenase. Weitere stromaufwärts zum mutierten Gen *lpdG* (PA1587) liegende Gene des Operons waren weniger als 2-fach induziert (PA1583, PA1584) oder nicht signifikant reguliert (PA1586). Die Induktion eines der drei Gene für Dihydrolipoamid Dehydrogenasen im Genom von *P. aeruginosa* ist höchstwahrscheinlich ein Beispiel für eine

kompensatorische Induktion eines funktionell eng verwandten Gens. Die Dihydrolipoamid Dehydrogenase 3 (Lpd3) liegt monocistronisch im Genom vor und konnte bereits bei *P. putida* als kompensatorisches Enzym der im Citrat-Zyklus aktiven Dihydrolipoamid Dehydrogenase charakterisiert werden (Burns *et al.* 1989). Offenbar ist jedoch die Komplementierung in dem Fall der Mutante 25/C1 von *P. aeruginosa* ungenügend und resultiert in einem beeinträchtigten Wachstum. Interessanterweise induziert diese metabolische Beeinträchtigung einige Gene des flagellaren Basalkörpers sowie des kürzlich beschriebenen CupA Systems für Pili-vermittelte Oberflächenadhärenz (Croft *et al.* 2000). Die Induktion des CupA Operons bei Typ IV Pili defizienten Mutanten befähigt diese, einen Biofilm auf abiotischen Oberflächen zu bilden (Vallet *et al.* 2001). Vermutlich ist die Ausbildung dieses Systems verantwortlich für den schon beschriebenen autoaggregativen Phänotyp von 25/C1 und die elektronenmikroskopisch dokumentierten Zellanhängsel.

Die Expression von cup-Pili und der entsprechende autoaggregative Phänotyp kann möglicherweise auf die Kontrolle von intrazellulären Signalkaskaden zurückgeführt werden, in denen Proteine mit GGDEF- und EAL-Domänen involviert sind (D'Argenio *et al.* 2002). Das in der Transkriptanalyse der Mutante 25/C1 differentiell exprimierte Response Regulator Gen PA4843 (Tab. 3.9) besitzt eine GGDEF-Domäne und kann zusammen mit dem im cup-Operon lokalisierten PA2133 (Tab. 3.9), das eine EAL Domäne aufweist, mit der Induktion der cup-Pili in Zusammenhang stehen. Im *P. aeruginosa* PAO1 Genom treten GGDEF und EAL Domänen häufig auf, 23 Proteine beinhalten EAL Domänen und 33 Proteine GGDEF Domänen (PFAM Datenbank <http://pfam.wustl.edu>). Beide Domänen sind oft miteinander oder mit anderen regulatorisch aktiven Domänen in Proteinen kombiniert (Croft *et al.* 2000; Galperin *et al.* 2001). Die Funktion dieser Domänen wurde für *Acetobacter xylinum* beschrieben, in dem ein GGDEF Protein zyklisches di-GMP synthetisiert, das von einem EAL Protein wieder abgebaut werden kann (Tal *et al.* 1998). Zyklisches di-GMP wirkt in *A. xylinum* als intrazelluläres Signalmolekül und kontrolliert die Synthese von Cellulose (Tal *et al.* 1998). Eine ähnliche Signaltransduktion findet sich bei autoaggregativen Varianten von *S. typhimurium*, bei denen ein GGDEF Protein die Bildung von adhäsiven Fimbrien und die Synthese von Cellulose vermittelt (Römling *et al.* 2000; Zogaj *et al.* 2001). Entsprechend könnte zyklisches di-GMP vom GGDEF Response Regulator PA4843 gebildet werden und die Induktion der cup-Pili Biosynthese einleiten. Mit fortschreitender Synthese baut dann PA2133 das Signalmolekül wieder ab und bewirkt so eine negative Rückkopplung und Ausbalancierung der cup-Pili Regulation. Außer bei den erwähnten *A. xylinum* und

S. typhimurium wird bei einer Reihe von Proteobakterien eine erhöhte Autoaggregation über Response Regulatoren mit GGDEF Domänen reguliert (u.a. *Caulobacter crescentus* [Hecht & Newton 1995], *Yersinia pestis* [Jones *et al.* 1999], *Burkholderia cepacia* [Huber *et al.* 2002], *P. fluorescens* [Spiers *et al.* 2002], *P. aeruginosa* [D'Argenio *et al.* 2002] und *Vibrio cholerae* [Bomchil *et al.* 2003]).

Der Mechanismus der Autoaggregation bei der SCV 20265 konnte über Proteom- und Transkriptom-Analysen nicht eindeutig aufgeklärt werden. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, daß eine erhöhte Expression adhäsiver Fimbrien bzw. Pili eine Rolle spielt. Diese könnte mit einer gesteigerten Synthese von Exopolysacchariden einhergehen. *P. aeruginosa* PAO1 vermag zwar aufgrund seines genetischen Repertoires keine Cellulose zu bilden, jedoch sind Glykogen Biosynthese Gene vorhanden (Stover *et al.* 2000). Möglicherweise zeigt *P. aeruginosa* eine ähnliche koordinierte Regulation von adhäsiven Fimbrien mit Enzymen des Glykogen-Metabolismus wie *E. coli* (Jackson *et al.* 2002). Der genomweite transkriptionelle Vergleich der klonalen Morphotypen der SCV 20265 (Anhang Tab. 6.1) konnte jedoch keine differentiell regulierten GGDEF- oder EAL-Domänen enthaltene Gene sowie keine differentielle Expression von Genen für die Glykogen-Biosynthese nachweisen. Da jedoch 13 % des Genoms von *P. aeruginosa* 20265 SCV nicht durch den GeneChip abgedeckt sind (vgl. III.2.2), bleiben eventuelle differentielle Regulationen der entsprechenden nicht analysierbaren Gene unbeachtet. Die Proteom-Analyse von Wehmhörer (2002) müßte diese jedoch abdecken, es wurde jedoch bei den analysierten SCV 20265 und SCV 61 keine differentiell exprimierten Proteine der Exopolysaccharid-Biosynthese gefunden. Differentiell exprimierte EAL Proteine wurden ebenfalls nicht beobachtet, jedoch mit PA3343 ein membranständiges Protein mit GGDEF Domäne, welches in der SCV 61 gegenüber der Revertante überexprimiert ist (von SCV 61 stand zur Zeit dieser Analysen kein Wildtyp zur Verfügung). Im Triplet klonaler Morphotypen der SCV 20265 wurden keine GGDEF und EAL Proteine differentiell exprimert (Wehmhörer 2002).

Obwohl es aufgrund der angenommenen Funktionen der differentiell regulierten Gene keinen direkten Hinweis auf eine Ähnlichkeit zwischen SCV 20265 und der Mutante 25/C1 gibt, scheinen doch Parallelen hinsichtlich der Expression von adhäsiven Pili zu bestehen. Die Induktion der cup-Pili der Wildtyp-Mutante 25/C1 zur Initiierung eines Biofilms als Reaktion auf eine stoffwechselphysiologische Beeinträchtigung ist mit der Induktion von Typ IV Pili bei SCV 20265 in der CF-Lunge zu vergleichen. Mutationen, die sich direkt oder indirekt auf die Zellfitness auswirken und damit eventuell ein vermindertes Wachstum nach sich ziehen,

bewirken die Bildung eines Biofilms und damit einen sessilen Lebensstil, der zur Persistenz von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge beitragen kann. Diese autoaggregative Verhaltensweise könnte über intrazelluläre Signalkaskaden kontrolliert sein, bei denen zyklisches di-GMP als Signalmolekül dient.

III.3.3. Die Überexpression des *pvrR*-Gens führt zu einer Komplementation des SCV Phänotyps

Drenkard & Ausubel (2002) identifizierten mit *pvrR* einen möglichen Zwei-Komponenten Response Regulator mit EAL Domäne in *P. aeruginosa* PA14, welcher nach *in trans* Komplementationen von *in vitro* generierten *P. aeruginosa* PA14 SCVs und einigen anderen SCVs klinischer Isolate diese in schnell wachsende Morphotypen revertierte. Die Koloniemorphologien der Revertanten und der PA14 Wildtypen waren identisch. Genomische Deletionen von *pvrR* konnten jedoch keine Konversion vom Wildtyp zur SCV induzieren. Lediglich die Frequenz des Auftretens von SCVs in der Wildtyp-Population erhöhte sich in *pvrR* Mutanten geringfügig (Drenkard & Ausubel 2002). Das Gen *pvrR* scheint zwar Auslöser für die Reversion von SCV zu Revertante zu sein, ist aber nicht allein für die Konversion von Wildtyp zur SCV zuständig. Das *pvrR*-Gen liegt im PA14 Genom zwischen einem Fusionsgen aus einem Response Regulator Gen und einer Sensor Histidin-Kinase sowie einer eventuell zu *pvrR* entsprechenden Sensor Histidin-Kinase (GENBANK AF482691).

Das *pvrR*-Gen ist nicht auf dem GeneChip repräsentiert. Wie jedoch PCR-Analysen zeigen konnten, scheint das Genom von SCV 20265 *pvrR* oder ein Gen mit sehr ähnlicher Sequenz und Länge zu enthalten (Abb. 3.16). Somit gehört *pvrR* zu den 13 % der Gene von SCV 20265, die nicht auf dem GeneChip repräsentiert sind.

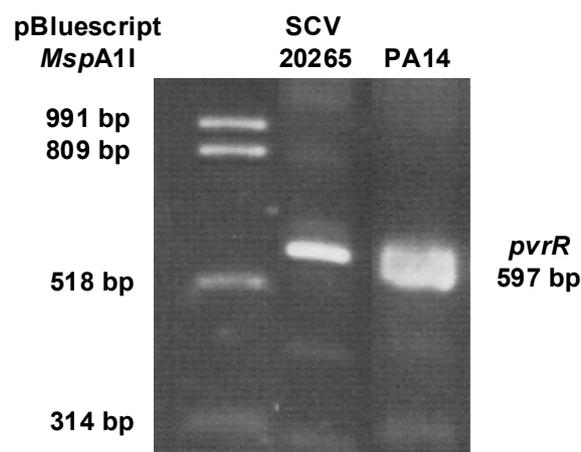


Abb. 3.16 Amplifizierung des *pvrR*-Gens über Polymerase-Kettenreaktion in SCV 20265 und PA14.

Das im Genom von *P. aeruginosa* PA14 lokalisierte *pvrR*-Gen (GENBANK AF482691) wurde damit auch im Genom von *P. aeruginosa* SCV 20265 nachgewiesen.

Die Beobachtungen, die Drenkard & Ausubel (2002) nach Komplementation von SCVs mit *pvrR* gemacht hatten, sollten mit den in dieser Studie untersuchten SCVs verifiziert werden. Dazu wurde das von Eliana Drenkard zur Verfügung gestellte Plasmid pED202 für Komplementationsversuche verwendet. Das Plasmid pED202 besteht aus dem Vektor pUCP19 (Schweizer 1991) mit einem in der *PstI*-Schnittstelle klonierten ca. 3,5 kb großen DNA-Fragment, welches *pvrR* als einziges komplettes Gen umfaßt (Drenkard & Ausubel 2002). SCV 20265, SCV 29 und SCV 33 wurden mittels Elektroporation mit pED202 transformiert, mittels Plasmid-Präparation wurde die Präsenz von pED202 in Carbenicillin-resistenten Klonen nachgewiesen.

Die *in trans* Komplementierung mit pED202 führt bei allen verwendeten SCVs zu einer großen Kolonieform, die eindeutig von der Größe der SCV-Kolonie zu unterscheiden ist und denen der Wildtypen bzw. Revertanten stark ähnelt (Abb. 3.17, A). Die komplementierte SCV 20265 weist eine ähnliche Kolonieform und –größe auf wie der Wildtyp, der Morphotyp der Revertante weicht davon stark ab (Abb. 3.17, A). SCV 29 pED202 weist nur eine transiente Komplementierung des Koloniemorphotyps auf. Zunächst erscheinen neben großen, dem Wildtyp und der Revertante ähnlichen Kolonien kleine, SCV-ähnliche Kolonien im Ausstrich eines zuvor groß gewachsenen Klons. Nach erneutem Überimpfen großer Klone, weisen alle Kolonien SCV-Größe auf (Abb. 3.17, A), sind jedoch weiterhin resistent gegen Carbenicillin und beherbergen das Plasmid pED202.

In vitro Kultivierungen der komplementierten SCV 20265 in Vogel-Bonner Mineralmedium zeigen, daß diese keine autoaggregative Fähigkeiten mehr aufweist, die Adhärerung an der Glaswand des Kulturgefäßes bleibt aus (Abb. 3.17, B).

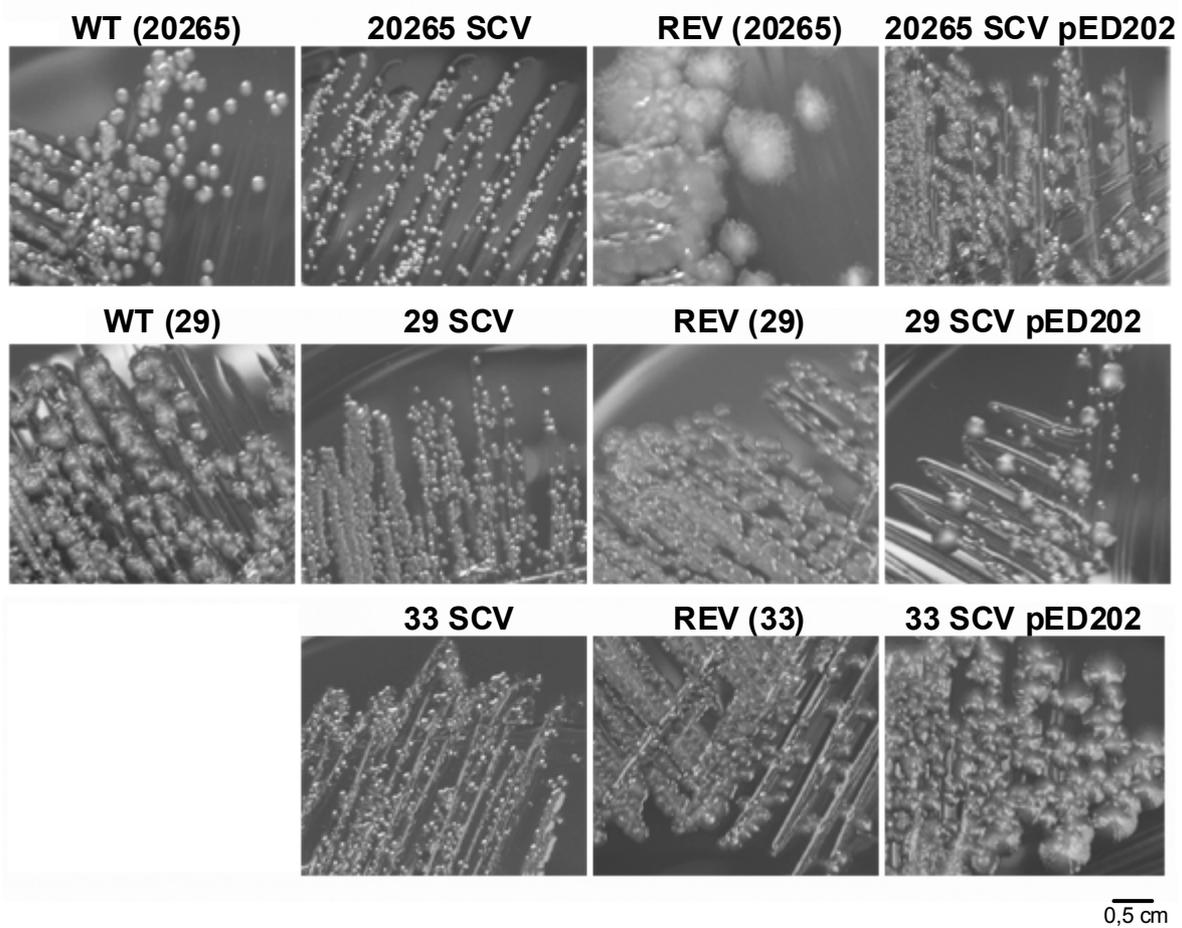
A**B**

Abb. 3.17 Morphotypen der pED202 transformierten SCVs auf Columbia Blut-Agar (A) und in Vogel-Bonner Minimalmedium (B).

(A) Alle mit pED202 transformierten SCVs weisen eine erhöhte Koloniegröße auf. Dieser Morphotyp ist nur bei 29 SCV nicht stabil und führt erst zu einer Mischkultur und nach weiterer Passage zum SCV Morphotyp.

(B) pED202 komplementiert in Flüssigmedium den autoaggregative Phänotyp von SCV 20265.

Aufbauend auf der bereits geführten Diskussion (vgl. III.3.2), die GGDEF- und EAL-Domänen in einen möglichen Signaltransduktionsweg zur Ausbildung eines autoaggregativen Phänotyps einbezieht, könnte *pvrR* mittels der EAL-Domäne in einer Schlüsselposition einer solchen Signalkaskade stehen, die durch Umweltreize, wie vermutlich eine Beeinträchtigung des Stoffwechsels und langsames Wachstum, ausgelöst wird. PvrR degradiert dabei zyklod-GMP, welches von einem unbekanntem GGDEF Protein (evtl. PA4843, Tab. 3.9) gebildet wird. Verringert sich der zyklod-GMP Spiegel, wie z.B. durch eine Überexpression von *pvrR*, führt dies zu einer Überexpression von adhäsiven Pili und möglicherweise einer gesteigerten Produktion eines bisher noch nicht charakterisierten Exopolysaccharides.

Genomweite Expressionsanalysen mit der pED202-komplementierten SCV 20265 könnten Hinweise auf die involvierten Signalkaskaden liefern.

Drenkard & Ausubel (2002) postulieren, daß die Phänotyp-Konversion über einen *contingency locus* bzw. einen phänotypischen Schalter kontrolliert wird, der einen abrupten Wechsel vom Wildtyp- zum SCV-Phänotyp vermittelt. Je nach verwendetem Medium und Kultivierungstemperatur konnten sie variierende Frequenzen von 10^{-1} bis 10^{-7} Kanamycin-resistenter SCVs *in vitro* aus *P. aeruginosa* PA14 generieren. Die höchste Frequenz erhielten sie bei der Kultivierung auf Kanamycin-haltigen Minimalmedien, die niedrigsten auf Komplexmedien (Drenkard & Ausubel 2002). Dies spricht für eine umweltbedingte Regulation der Phänotyp-Konversion, wie sie im Rahmen von Phasenvariationen bekannt sind (vgl. III.3.3). Das Gen *pvrR* scheint durch diesen postulierten phänotypischen Schalter beeinflussbar zu sein.

Im Rahmen von Phasenvariationen kommt es oft zu DNA-Rearrangements (vgl. III.3.3). Falls der *pvrR*-Lokus in solchen DNA-Umstrukturierungen involviert ist, sollten PCR-Analysen und Sequenzierungen dieses Lokus in den klonalen Morphotypen von SCV 20265 entsprechende Daten liefern können. Entsprechende Untersuchungen zum nicht-pathogenen, rauhe-Kolonie-Phänotyp von *Pseudomonas tolaasii* konnten eine Duplikation eines kurzen DNA-Fragments als verursachendes Ereignis feststellen (Han *et al.* 1997).

Um den Mechanismus der Morphotyp-Konversion allein einer Phasenvariation zuzuordnen, müßten die aus SCVs generierten Revertanten identisch mit den klonalen Wildtypen sein, was für die von Drenkard & Ausubel (2002) beschriebenen phänotypischen Varianten zutrifft. Die Ergebnisse von Häußler *et al.* (2003) an einer Subgruppe autoaggregativer SCVs und ihren klonalen Morphotypen aus klinischen CF-Proben können dies jedoch nicht bestätigen. Die Genexpressions-Analysen mit SCV 20265 und ihren klonalen Morphotypen bestätigen

eindrucksvoll den von Häußler et al. (2003) beschriebenen intermediären Phänotyp der Revertanten. Bereits die Anzahl der differentiell regulierten Gene gibt Aufschluß über den Ähnlichkeitsgrad der klonalen Morphotypen (vgl. Tab. 3.4). Die Unterschiede der Revertante mit dem Wildtyp zeigen sich in einem großen Spektrum funktioneller Genklassen: Zu beobachten sind differentielle Genexpressionen des Typ III Sekretionsapparates inklusive der sezernierten Effektorproteine, verschiedener Systeme zur Eisenaufnahme und Motilität sowie von potentiell gegen oxidativen und antibiotischen Streß wirkenden Gene.

Der genomweite Vergleich von Genexpressionsprofilen der klonalen Morphotypen bestätigt den hohen Grad der Ähnlichkeit von SCV und Revertante in der stationären Phase (Abb. 3.18). In der stationären Phase ist der Unterschied von SCV und Revertante zum Wildtyp gering. Zusammen mit der ausgeprägten Ähnlichkeit der Genexpression von Wildtyp und Revertante in der exponentiellen Phase könnten diese Ergebnisse für eine Phasenvariation als Mechanismus der Morphotyp-Konversion sprechen. Der dennoch große Unterschied des Phänotyps von Revertante und Wildtyp könnte darauf beruhen, daß die hier vorliegenden Ergebnisse mit klinischen Isolaten gewonnen wurden. Zwischen der Infektion eines CF-Patienten mit dem Wildtyp bzw. seiner Isolierung und der Ausbildung einer SCV bzw. seiner Isolierung können mehrere Mutationserereignisse eingetreten sein, die in einer stark selektiven Umwelt, wie einer therapierten CF-Lunge, zur adaptativen Radiation des Bakteriums geführt haben können (Rainey & Travisano 1998; Rainey & Moxon 2000).

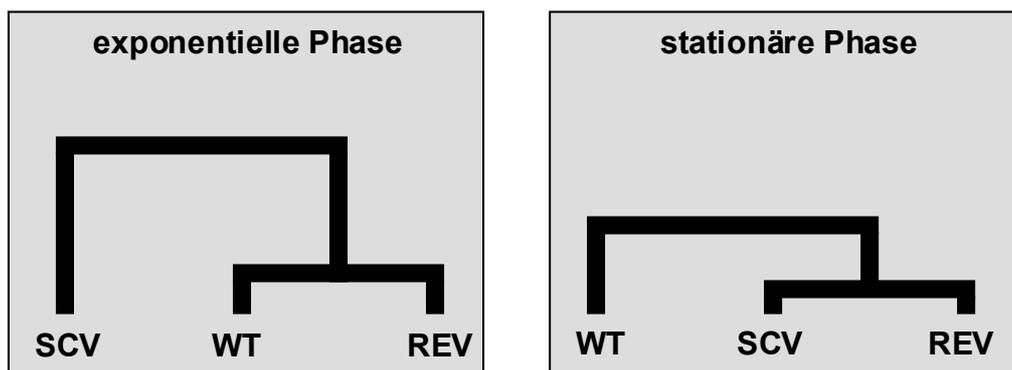


Abb. 3.18 Intermorphotypische Ähnlichkeit der Genexpressions-Profile.

Es wurden die genomweiten Genexpressionsprofile der Morphotypen mittels *complete linkage hierarchical clustering* mit Pearson Korrelationen als Distanz-Maß miteinander verglichen. Je ähnlicher sich zwei Morphotypen sind, desto kürzer sind die vertikalen Strecken zwischen ihnen.

Es ist an sequentiellen klinischen Isolaten schwer nachzuvollziehen wieviele mutative Ereignisse zwischen den als Wildtyp definierten Isolaten und den SCVs liegen. Bei einer Reversion der SCV entsteht also möglicherweise ein Phänotyp, der dem unmittelbaren Vorfahren der SCV entspricht, jedoch nicht selbst als Isolat vorliegt. Drenkard & Ausubel (2002) stellten ihre Hypothese der Phasenvariation als Mechanismus der Morphotyp-Konversion in *P. aeruginosa* nach Arbeiten mit *in vitro* generierten SCVs auf, die direkt aus ihren entsprechenden Wildtypen entstanden waren.

Vermutlich beginnt die Ausbildung morphotypischer Varianten klinischer CF-Isolate von *P. aeruginosa* mit einem starken selektiven Druck durch das sich dynamisch verändernde Habitat der CF-Lunge (Rainey & Moxon 2000). Einzelne Mutationen könnten hier die Adaptation an einen anaeroben Lebensraum, der durch fortschreitende Entzündungsprozesse mit einhergehenden Schädigungen des Epithels gekennzeichnet ist, unterstützen. Darüber hinaus könnten durch Mutationen protektive Mechanismen gegen reaktive Oxidantien und Antibiotika vermittelt werden. Solche fitnessteigernden Mutationen wären besonders in Hypermutatoren stabil, da diese durch Defekte einzelner Gene des DNA-Fehlpaarungsreparatursystems (Oliver *et al.* 2000; Oliver *et al.* 2002) mutierte DNA nicht oder nur langsam reparieren. Einbußen in der Fitness der Zelle können durch kompensatorische Mutationen reduziert werden (Levin *et al.* 2000; Giraud *et al.* 2001; Massey & Buckling 2002). Außerdem erfolgen in unregelmäßigen Abständen Reversionen von Hypermutatoren zu nicht-Mutatoren (Taddei *et al.* 1997a; Taddei *et al.* 1997b). Somit kann ein Teil der Bakterienzellen einen eventuellen, durch eine erhöhte Mutationsrate erworbenen Selektionsvorteil auch nutzen. Klinische Isolate von langzeit-infizierten CF-Patienten stellen somit verschiedene Resultate einer Vielzahl von evolutionären Prozessen dar. Die Art und Schnelligkeit einer solchen Evolution ist vermutlich abhängig von den jeweils kolonisierenden *P. aeruginosa* Stämmen und von den besiedelten Patienten. SCVs sind somit ein Beispiel für eine besonders augenfällige phänotypische Variation. Zwei Szenarien zur Konversion von Wildtyp zu SCV sind also möglich: Die Konversion könnte einerseits das Resultat einer (gesteigerten) randomisierten Mutagenese sein, wobei die Reversion von SCV zur Revertante eine Art kompensatorische Mutation sein könnte, die den langsam wachsenden Phänotyp wieder aufhebt und damit den Spiegel an zyklischen di-GMP hebt. Andererseits könnte sich dem Adaptationsprozess durch randomisierte Mutagenese und Selektion eine Phasenvariation anschließen, welche die Bildung von SCVs aus schnell wachsenden Wildtypen auslösen könnte.

IV. Zusammenfassung

In der Pathogenese der Cystischen Fibrose (CF) bedeuten chronische respiratorische Infektionen mit *P. aeruginosa* die schwerwiegendste Komplikation. Klinische klonale Isolate von *P. aeruginosa* aus CF-Patienten bilden nach Wachstum auf diagnostischen Festmedien verschiedenartige Kolonieformen (Morphotypen), eine Eigenart, die bereits 1964 als „dissoziatives Verhalten“ von *P. aeruginosa* beschrieben wurde. Lange Zeit richtete sich der Fokus auf muköse Phänotypen von *P. aeruginosa*, bis 1999 die *small colony variants* (SCVs) mit chronischen Infektionen von CF-Lungen korreliert werden konnten (Häußler *et al.* 1999a). Diese werden im Routine-Betrieb diagnostischer Labors aufgrund ihrer Größe leicht übersehen. Sie korrelieren jedoch mit einer besonders schlechten Lungenfunktion der CF-Patienten, weshalb eingehendere Untersuchungen einen Einfluß auf neuartige Therapien zur Bekämpfung chronischer Infektionen mit *P. aeruginosa* haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden eine SCV (*P. aeruginosa* 20265), eine *in vitro* generierte schnell wachsende Revertante und ein klonaler Wildtyp anhand ihrer Expressionssignaturen miteinander verglichen. Hierdurch sollten Hypothesen bezüglich der Adaptations-Mechanismen der SCV 20265 an das Habitat der CF-Lunge generiert werden, um damit Rückschlüsse auf ihre Rolle in der Pathogenese ziehen zu können.

Das Wachstum von SCV 20265 in Flüssigkultur ist gegenüber dem Wildtyp und der Revertante verlangsamt, was auf eine metabolische Beeinträchtigung hindeuten könnte. Gleichzeitig zeigt die SCV 20265 ein starkes autoaggregatives Verhalten. Damit gehört die SCV 20265 zu einer Subgruppe von sechs SCVs, die innerhalb eines Kollektivs von 12 vorliegenden SCVs besonders starke autoaggregative Fähigkeiten im Vergleich zu ihren klonalen Morphotypen aufweisen.

Um genomweit klonale Morphotypen anhand ihrer Unterschiede in der Nutzung ihres genetischen Repertoires zu untersuchen, wurden Genexpressionsprofile mittels *P. aeruginosa* GeneChips (Affymetrix) erhoben. Ein Versuchsaufbau wurde etabliert, bei dem durch Poolen von mehreren Bakterien-Kulturen und durch die Verwendung von Kreuzvergleichen bei der Expressionsanalyse differentielle Genregulationen verlässlich und valide detektiert werden konnten.

Mit dem *P. aeruginosa* GeneChip lassen sich in einem Experiment 87 % des 6600 kb großen Genoms der SCV 20265 analysieren. Insgesamt konnte anhand der GeneChip-Analysen die differentielle Regulation von 309 Genen im exponentiellem bzw. stationären Wachstumsstadium der klonalen Morphotypen von SCV 20265 in Vogel-Bonner Minimalmedium nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der GeneChip-Analysen decken sich dabei weitgehend mit Northern-Hybridisierungen, die zusätzlich für einzelne Gene durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse sind in der Abbildung 3.19 zusammengefaßt.

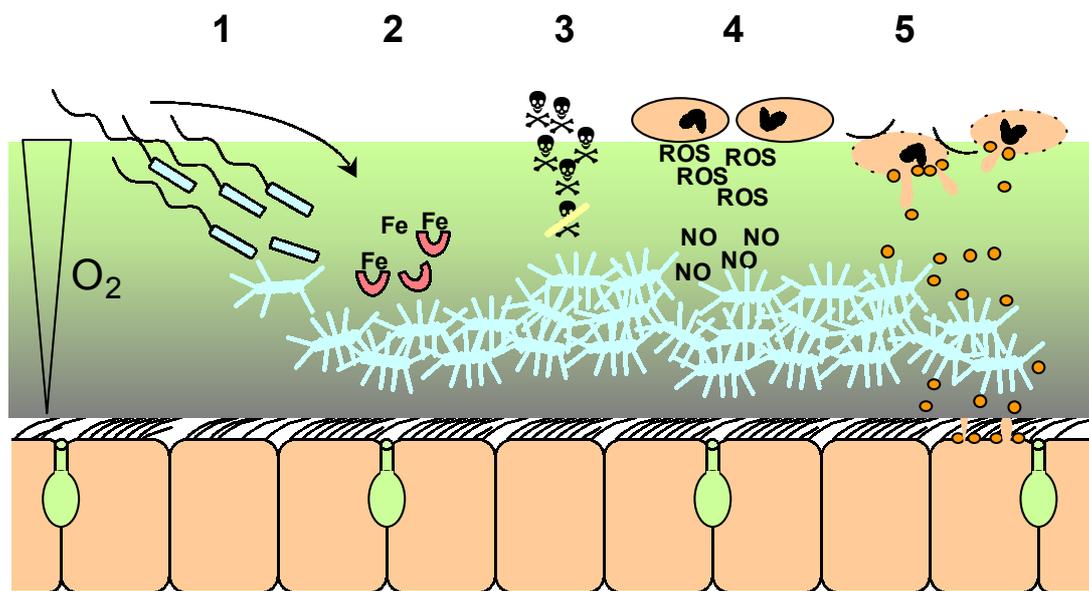


Abb. 3.19 Adaptationsmechanismen von SCV 20265 an die CF-Lunge (vgl. Abb. 1.2 und 1.3).

- (1) *P. aeruginosa* 20265 wandert passiv oder aktiv über Flagellen in das hypooxische Milieu des Mukus ein und baut unter Verlust der Flagellen und Aufbau von Pili einen Biofilm auf.
- (2) Eine optimale Eisen-(Fe)-Versorgung über Pyochelin und die Hämophore HasA unterstützt die Biofilmbildung.
- (3) Der Aufbau eines Biofilms, die verminderte Zellaktivität und die Induzierung abbauender Enzyme vermitteln eine erhöhte Resistenz gegenüber in den Mukus diffundierenden Antibiotika.
- (4) Redoxaktive Proteine werden differentiiell reguliert und vermitteln eine Anpassung gegenüber Oxidantien wie NO , welches bei der Nitrat-Atmung entsteht, und reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), die von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden.
- (5) Die Typ III-vermittelte Sezernierung von Porenproteinen wirkt cytotoxisch auf neutrophile Granulozyten bzw. Makrophagen und Epithelzellen. Ausfließendes Cytosol wird von *P. aeruginosa* verwertet.

Der Vergleich der klonalen Morphotypen von SCV 20265 weist die differentielle Regulierung von Genen nach, die der bakteriellen Motilität dienen. Die SCV 20265 zeigt im Gegensatz zum Wildtyp und der Revertante einerseits eine geringere Genexpression des a-Typ Flagellins, des flagellaren Kappen-Proteins sowie eines Gens zur Flagellen-Glykosylierung. Andererseits ist die Transkription des Typ IV Pilins in SCV 20265 im Gegensatz zum Wildtyp hochreguliert, was zu einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren Hyperpilierung führt (Abb. 3.19, 1).

Gene zur Eisenaquirierung, wie zur Biosynthese des Siderophors Pyochelin und zur Aufnahme von Pyochelin-Fe³⁺-Komplexen sowie zur Lagerung gebundenen Eisens sind in SCV 20265 im Gegensatz zum Wildtyp induziert, was auf eine verbesserte Eisenversorgung schließen läßt (Abb. 3.19, 2). Die erhöhte Sekretion der Siderophore Pyoverdin sowie die proteomanalytisch nachgewiesene verstärkte Proteinexpression der Hämophore HasAp (Wehmhöner 2002) konnte anhand transkriptioneller Daten für die SCV 20265 nicht bestätigt werden, was auf mögliche posttranskriptionelle Regulationen hindeutet.

Die ausgeprägten autoaggregativen und Eisen-bindenden Eigenschaften der SCV 20265 haben einen vorteilhaften Einfluß auf die Etablierung eines Biofilms. Ein Biofilm wirkt u.a. als Diffusions-Barriere schützend vor Antibiotika. Zusätzlich induziert die SCV 20265 mit dem Ribosomenmodulationsfaktor ein vermutlich protektiv wirkendes Protein. Durch die ebenfalls von SCV 20265 induzierte β -Lactamase entsteht ein spezifischer Schutz vor β -Lactam-Antibiotika (Abb. 3.19, 3).

Die konstitutive Induktion von Genen der anaeroben Atmung könnte auf eine Adaptation der SCV 20265 an Sauerstoff-arme Milieus der CF-Lunge hindeuten. Darüber hinaus lassen sich die differentielle Regulation redoxaktiver Proteine und die verstärkte Sekretion von Pyocyanin als besondere Adaptationsmechanismen der SCV 20265 gegenüber Redox-Stress auffassen. Dieser Streß kann über eine erhöhte NO-Synthese während der Atmung mit Nitrat als Elektronenakzeptor sowie durch den *oxidative burst* neutrophiler Granulozyten als Abwehrmechanismus des kolonisierten Wirtes vermittelt werden (Abb. 3.19, 4).

Als prominentester Pathogenitätsfaktor von *P. aeruginosa* wurde das Typ III Proteinsekretionssystem in der SCV 20265 induziert. Darüber hinaus ist die Genexpression der Typ III sezernierten Effektorproteine gegenüber dem Wildtyp um einen Faktor von 30 erhöht, das cytotoxisch wirkende ExoU ist nicht im Genom enthalten. Eine ExoU unabhängige Virulenz von SCV 20265 gegenüber J774 Makrophagen *in vitro* und Balb/C Mäusen *in vivo* konnte von D. Jordan festgestellt werden und für zwei weitere autoaggregative SCVs bestätigt werden. Der vornehmlich beobachtete avirulente Phänotyp von *P. aeruginosa* Isolaten aus chronisch infizierten Lungen kann demnach nicht für alle Morphotypen von *P. aeruginosa* angenommen werden (Abb. 3.19, 5).

Die molekulare Ursache des SCV-Phänotyps beruht höchstwahrscheinlich auf mikroevolutionären Prozessen in der stark selektiv wirkenden CF-Lunge. *In vitro* generierte Tn5-Mutanten mit SCV-Morphotyp unterstützen diese Annahme. Eine Mutation des *hemB*-Gens, wie sie als Ursache von SCVs in *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* beschrieben ist, kann bei der SCV 20265 nicht festgestellt werden. Hingegen können andere Mutationen, wie die der Lipoamid-Dehydrogenase-Glc, einen SCV-Phänotyp auslösen und darüber hinaus zur Induktion von adhäsiven Pili führen. Der SCV-Phänotyp von SCV 20265 und zwei weiteren autoaggregativen SCVs läßt sich durch die Überexpression des EAL-Domänen-Proteins PvrR komplementieren, wie bereits für andere *P. aeruginosa* SCVs beschrieben (Drenkard & Ausubel 2002). Möglicherweise sind an den pleiotropen Effekten, die bestimmte Mutationen nach sich ziehen, intrazelluläre Signalkaskaden beteiligt. Hier könnte zyklisches di-GMP, welches von Proteinen mit GGDEF-Domänen gebildet wird, als Signalmolekül wirken. Durch den Abbau des Signalmoleküls von Proteinen mit EAL-Domänen könnten diese Signalkaskaden unterbrochen und damit der SCV-Phänotyp aufgehoben werden.

Die hier beschriebenen Adaptationsmechanismen von SCV 20265 können als Ausgangspunkte für gezielte Experimente an weiteren SCVs dienen. Letztendlich könnte das Wissen um die Existenz von SCVs und ihre Anpassungsstrategien die Entwicklung von neuen Therapien gegen chronisch infizierende *P. aeruginosa* vorantreiben.

V. Literaturverzeichnis

- Abshire K. Z. & Neidhardt F. C. (1993) Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. *J Bacteriol.* 175: 3734-3743.
- Aebi C., Bauernfeind A., Döring G., Przyklenk B., Schneider I., & Schöni M. H. (2001) Mikrobiologie. In: *Cystische Fibrose* (eds D. Reinhardt, M. Götz, R. Kramer, and M. H. Schöni) pp. 74-119. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Affymetrix (2001a) New statistical algorithms for monitoring gene expression on GeneChip probe arrays. Affymetrix Inc.
- Affymetrix (2001b) Statistical algorithm reference guide. Affymetrix Inc.
- Affymetrix (2001c) Fine Tuning your data analysis. Affymetrix Inc.
- Aizawa S. I. (2001) Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett.* 202: 157-164.
- Allewelt M., Coleman F. T., Grout M., Priebe G. P., & Pier G. B. (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect.Immun.* 68: 3998-4004.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., & Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215: 403-410.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., & Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Ankenbauer R. G. & Quan H. N. (1994) FptA, the Fe(III)-pyochelin receptor of *Pseudomonas aeruginosa*: a phenolate siderophore receptor homologous to hydroxamate siderophore receptors. *J.Bacteriol.* 176: 307-319.
- Anzai Y., Kim H., Park J. Y., Wakabayashi H., & Oyaizu H. (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 50 Pt 4: 1563-1589.
- Arora S. K., Ritchings B. W., Almira E. C., Lory S., & Ramphal R. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect.Immun.* 66: 1000-1007.
- Arora S. K., Bangera M., Lory S., & Ramphal R. (2001) A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 9342-9347.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., & Struhl K. (1988) Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and J. Wiley & Sons, New York.
- Bairoch A. & Apweiler R. (1996) The SWISS-PROT protein sequence data bank and its new supplement TREMBL. *Nucleic Acids Res.* 24: 21-25.
- Bakay M., Chen Y. W., Borup R., Zhao P., Nagaraju K., & Hoffman E. P. (2002) Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. *BMC.Bioinformatics.* 3: 4.

- Ball C. A., Dolinski K., Dwight S. S., Harris M. A., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Scafe C. R., Sherlock G., Binkley G., Jin H., Kaloper M., Orr S. D., Schroeder M., Weng S., Zhu Y., Botstein D., & Cherry J. M. (2000) Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database. *Nucleic Acids Res.* 28: 77-80.
- Baltimore R. S., Christie C. D., & Smith G. J. (1989) Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am.Rev.Respir.Dis.* 140: 1650-1661.
- Barbieri J. T. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *Int.J.Med.Microbiol.* 290: 381-387.
- Bassett D. E., Jr., Eisen M. B., & Boguski M. S. (1999) Gene expression informatics--it's all in your mine. *Nat.Genet.* 21: 51-55.
- Bateman A., Birney E., Cerruti L., Durbin R., Etwiller L., Eddy S. R., Griffiths-Jones S., Howe K. L., Marshall M., & Sonnhammer E. L. (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 30: 276-280.
- Bayer A. S. (1989) Clinical utility of new quinolones in treatment of osteomyelitis and lower respiratory tract infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 8: 1102-1110.
- Bayliss C. D., Field D., & Moxon E. R. (2001) The simple sequence contingency loci of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *J.Clin.Invest* 107: 657-662.
- Bear C. E., Li C. H., Kartner N., Bridges R. J., Jensen T. J., Ramjeesingh M., & Riordan J. R. (1992) Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68: 809-818.
- Beissbarth T., Fellenberg K., Brors B., Arribas-Prat R., Boer J., Hauser N. C., Scheideler M., Hoheisel J. D., Schutz G., Poustka A., & Vingron M. (2000) Processing and quality control of DNA array hybridization data. *Bioinformatics.* 16: 1014-1022.
- Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Rapp B. A., & Wheeler D. L. (2002) GenBank. *Nucleic Acids Res.* 30: 17-20.
- Bergen G. A. & Shelhamer J. H. (1996) Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 10: 297-325.
- Blackstock W. P. & Weir M. P. (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17: 121-127.
- Bomchil N., Watnick P., & Kolter R. (2003) Identification and Characterization of a *Vibrio cholerae* Gene, *mbaA*, Involved in Maintenance of Biofilm Architecture. *J.Bacteriol.* 185: 1384-1390.
- Bosshammer J., Fiedler B., Gudowius P., von der H. H., Römling U., & Tümmler B. (1995) Comparative hygienic surveillance of contamination with pseudomonads in a cystic fibrosis ward over a 4-year period. *J.Hosp.Infect.* 31: 261-274.
- Bowler L. D., Hubank M., & Spratt B. G. (1999) Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 145: 3529-3537.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.

- Braun V. (2001) Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int.J.Med.Microbiol.* 291: 67-79.
- Breitenstein S., Walter S., Bosshammer J., Römling U., & Tümmler B. (1997) Direct sputum analysis of *Pseudomonas aeruginosa* macrorestriction fragment genotypes in patients with cystic fibrosis. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 186: 93-99.
- Brimer C. D. & Montie T. C. (1998) Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *J Bacteriol.* 180: 3209-3217.
- Britigan B. E., Roeder T. L., Rasmussen G. T., Shasby D. M., McCormick M. L., & Cox C. D. (1992) Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. *J.Clin.Invest* 90: 2187-2196.
- Britigan B. E., Railsback M. A., & Cox C. D. (1999) The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect.Immun.* 67: 1207-1212.
- Buchmeier N. A. & Heffron F. (1990) Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 248: 730-732.
- Bulger R. J. (1969) In vitro studies on highly resistant small colony variants of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *J Infect.Dis.* 120: 491-494.
- Burke V., Robinson J. O., Richardson C. J., & Bundell C. S. (1991) Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathology* 23: 145-148.
- Burns G., Sykes P. J., Hatter K., & Sokatch J. R. (1989) Isolation of a third lipoamide dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J.Bacteriol.* 171: 665-668.
- Bush K., Jacoby G. A., & Medeiros A. A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob.Agents Chemother.* 39: 1211-1233.
- Buttner D. & Bonas U. (2002) Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends Microbiol* 10: 186-192.
- Chen J. J., Wu R., Yang P. C., Huang J. Y., Sher Y. P., Han M. H., Kao W. C., Lee P. J., Chiu T. F., Chang F., Chu Y. W., Wu C. W., & Peck K. (1998) Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 51: 313-324.
- Chen W. P. & Kuo T. T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21: 2260.
- Chen Y. W., Zhao P., Borup R., & Hoffman E. P. (2000) Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J.Cell Biol.* 151: 1321-1336.
- Christie P. J. (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol.Microbiol* 40: 294-305.
- Chudin E., Walker R., Kosaka A., Wu S. X., Rabert D., Chang T. K., & Kreder D. E. (2002) Assessment of the relationship between signal intensities and transcript concentration for Affymetrix GeneChip arrays. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0005.

- Coffman T. J., Cox C. D., Edeker B. L., & Britigan B. E. (1990) Possible role of bacterial siderophores in inflammation. Iron bound to the *Pseudomonas* siderophore pyochelin can function as a hydroxyl radical catalyst. *J.Clin.Invest* 86: 1030-1037.
- Collet J. F. & Bardwell J. C. (2002) Oxidative protein folding in bacteria. *Mol.Microbiol.* 44: 1-8.
- Comolli J. C., Waite L. L., Mostov K. E., & Engel J. N. (1999a) Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.* 67: 3207-3214.
- Comolli J. C., Hauser A. R., Waite L., Whitchurch C. B., Mattick J. S., & Engel J. N. (1999b) *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity *in vitro* and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect.Immun.* 67: 3625-3630.
- Cornelis G. R. & Van Gijsegem F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu.Rev.Microbiol.* 54: 735-774.
- Costerton J. W., Stewart P. S., & Greenberg E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Cowell B. A., Chen D. Y., Frank D. W., Vallis A. J., & Fleiszig S. M. (2000) ExoT of cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* prevents uptake by corneal epithelial cells. *Infect.Immun.* 68: 403-406.
- Croft L., Beatson S. A., Whitchurch C. B., Huang B., Blakeley R. L., & Mattick J. S. (2000) An interactive web-based *Pseudomonas aeruginosa* genome database: discovery of new genes, pathways and structures. *Microbiology* 146: 2351-2364.
- D'Argenio D. A., Calfee M. W., Rainey P. B., & Pesci E. C. (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J.Bacteriol.* 184: 6481-6489.
- Dacheux D., Toussaint B., Richard M., Brochier G., Croize J., & Attree I. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect.Immun.* 68: 2916-2924.
- Dacheux D., Goure J., Chabert J., Usson Y., & Attree I. (2001) Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol.Microbiol.* 40: 76-85.
- Danese P. N., Pratt L. A., Dove S. L., & Kolter R. (2000) The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol.Microbiol.* 37: 424-432.
- Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., & Greenberg E. P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
- de Bentzmann S., Plotkowski C., & Puchelle E. (1996a) Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154: S155-S162.
- de Bentzmann S., Roger P., Dupuit F., Bajolet-Laudinat O., Fuchey C., Plotkowski M. C., & Puchelle E. (1996b) Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect.Immun.* 64: 1582-1588.

- de Kievit T. R., Gillis R., Marx S., Brown C., & Iglewski B. H. (2001) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1865-1873.
- de Saizieu A., Certa U., Warrington J., Gray C., Keck W., & Mous J. (1998) Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 16: 45-48.
- Denamur E., Bonacorsi S., Giraud A., Duriez P., Hilali F., Amorin C., Bingen E., Andremont A., Picard B., Taddei F., & Matic I. (2002) High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Bacteriol.* 184: 605-609.
- Deziel E., Comeau Y., & Villemur R. (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.* 183: 1195-1204.
- Donlan R. M. & Costerton J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- Drenkard E. & Ausubel F. M. (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416: 740-743.
- Eisen M. B., Spellman P. T., Brown P. O., & Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95: 14863-14868.
- Enderle P. J. & Farwell M. A. (1998) Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25: 954-6, 958.
- Engler-Blum G., Meier M., Frank J., & Müller G. A. (1993) Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal. Biochem.* 210: 235-244.
- Esteve-Nunez A., Caballero A., & Ramos J. L. (2001) Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 335-52, table.
- Fang F. C. (1997) Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest* 99: 2818-2825.
- Feltman H., Schulert G., Khan S., Jain M., Peterson L., & Hauser A. R. (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147: 2659-2669.
- Fergie J. E., Shema S. J., Lott L., Crawford R., & Patrick C. C. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. *Clin. Infect. Dis.* 18: 390-394.
- Ferguson A. D., Chakraborty R., Smith B. S., Esser L., van der Helm D., & Deisenhofer J. (2002) Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* 295: 1715-1719.
- Finck-Barbancon V., Goranson J., Zhu L., Sawa T., Wiener-Kronish J. P., Fleiszig S. M., Wu C., Mende-Mueller L., & Frank D. W. (1997) ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* 25: 547-557.
- Fleiszig S. M., Zaidi T. S., Fletcher E. L., Preston M. J., & Pier G. B. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* invades corneal epithelial cells during experimental infection. *Infect. Immun.* 62: 3485-3493.

- Fleiszig S. M., Zaidi T. S., & Pier G. B. (1995) *Pseudomonas aeruginosa* invasion of and multiplication within corneal epithelial cells *in vitro*. *Infect.Immun.* 63: 4072-4077.
- Fodor S. P., Read J. L., Pirrung M. C., Stryer L., Lu A. T., & Solas D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767-773.
- Folschweiller N., Schalk I. J., Celia H., Kieffer B., Abdallah M. A., & Pattus F. (2000) The pyoverdinin receptor FpvA, a TonB-dependent receptor involved in iron uptake by *Pseudomonas aeruginosa* (review). *Mol.Membr.Biol.* 17: 123-133.
- Forsberg A., Viitanen A. M., Skurnik M., & Wolf-Watz H. (1991) The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol* 5: 977-986.
- Franch T. & Gerdes K. (2000) U-turns and regulatory RNAs. *Curr.Opin.Microbiol* 3: 159-164.
- Frank D. W. (1997) The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol.Microbiol.* 26: 621-629.
- Fraser G. M. & Hughes C. (1999) Swarming motility. *Curr.Opin.Microbiol* 2: 630-635.
- Frithz-Lindsten E., Holmstrom A., Jacobsson L., Soltani M., Olsson J., Rosqvist R., & Forsberg A. (1998) Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.* 29: 1155-1165.
- Galan J. E. & Collmer A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
- Galperin M. Y., Nikolskaya A. N., & Koonin E. V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol.Lett.* 203: 11-21.
- Ganesan A. K., Vincent T. S., Olson J. C., & Barbieri J. T. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S disrupts Ras-mediated signal transduction by inhibiting guanine nucleotide exchange factor-catalyzed nucleotide exchange. *J Biol.Chem.* 274: 21823-21829.
- Garrett E. S., Perlegas D., & Wozniak D. J. (1999) Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *J.Bacteriol.* 181: 7401-7404.
- Gilligan P. H. (1991) Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 4: 35-51.
- Giraud A., Radman M., Matic I., & Taddei F. (2001) The rise and fall of mutator bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.* 4: 582-585.
- Goehring U. M., Schmidt G., Pederson K. J., Aktories K., & Barbieri J. T. (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol.Chem.* 274: 36369-36372.
- Goeptar A. R., Scheerens H., & Vermeulen N. P. (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev.Toxicol.* 25: 25-65.
- Goldman M. J., Anderson G. M., Stolzenberg E. D., Kari U. P., Zasloff M., & Wilson J. M. (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88: 553-560.

- Gordon S. M., Serkey J. M., Keys T. F., Ryan T., Fatica C. A., Schmitt S. K., Borsh J. A., Cosgrove D. M., III, & Yared J. P. (1998) Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit. *Ann Thorac Surg* 65: 95-100.
- Govan J. R. & Deretic V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol.Rev.* 60: 539-574.
- Green S. K., Schroth M. N., Cho J. J., Kominos S. K., & Vitanza-jack V. B. (1974) Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl.Microbiol.* 28: 987-991.
- Grunberg-Manago M. (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu.Rev.Genet.* 33: 193-227.
- Guzzo J., Duong F., Wandersman C., Murgier M., & Lazdunski A. (1991) The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *Mol.Microbiol.* 5: 447-453.
- Ha U. & Jin S. (2001) Growth phase-dependent invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and its survival within HeLa cells. *Infect.Immun.* 69: 4398-4406.
- Hahn H. P. (1997) The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* 192: 99-108.
- Han B., Pain A., & Johnstone K. (1997) Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Mol.Microbiol.* 25: 211-218.
- Hancock R. E., Mutharia L. M., Chan L., Darveau R. P., Speert D. P., & Pier G. B. (1983) *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect.Immun.* 42: 170-177.
- Hancock R. E. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin.Infect.Dis.* 27 Suppl 1: S93-S99.
- Hantke K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.* 4: 172-177.
- Hardalo C. & Edberg S. C. (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev.Microbiol.* 23: 47-75.
- Hassett D. J. (1996) Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J.Bacteriol.* 178: 7322-7325.
- Hassett D. J., Ma J. F., Elkins J. G., McDermott T. R., Ochsner U. A., West S. E., Huang C. T., Fredericks J., Burnett S., Stewart P. S., McFeters G., Passador L., & Iglewski B. H. (1999) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol.Microbiol.* 34: 1082-1093.
- Häußler S., Tümmler B., Weissbrodt H., Rohde M., & Steinmetz I. (1999a) Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin.Infect.Dis.* 29: 621-625.
- Häußler S., Rohde M., & Steinmetz I. (1999b) Highly resistant *Burkholderia pseudomallei* small colony variants isolated in vitro and in experimental melioidosis. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 188: 91-97.

- Häußler S., Ziegler I., Lottel A., v.Götz F., Rohde M., Tümmler B., Wehmhöner D., Saravanamuthu S., & Steinmetz I. (2003) Highly adherent small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J.Med.Microbiol.* 52: 295-301.
- Hecht G. B. & Newton A. (1995) Identification of a novel response regulator required for the swarmer- to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J.Bacteriol.* 177: 6223-6229.
- Henderson I. R. & Owen P. (1999) The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and *oxyR*. *J.Bacteriol.* 181: 2132-2141.
- Henderson I. R., Owen P., & Nataro J. P. (1999) Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol.Microbiol.* 33: 919-932.
- Henderson I. R., Cappello R., & Nataro J. P. (2000) Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol.* 8: 529-532.
- Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G. J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., & Parsek M. R. (2001) Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J.Bacteriol.* 183: 5395-5401.
- Hess K. R., Zhang W., Baggerly K. A., Stivers D. N., & Coombes K. R. (2001) Microarrays: handling the deluge of data and extracting reliable information. *Trends Biotechnol.* 19: 463-468.
- Hill A. A., Hunter C. P., Tsung B. T., Tucker-Kellogg G., & Brown E. L. (2000) Genomic analysis of gene expression in *C. elegans*. *Science* 290: 809-812.
- Hirano S. S. & Upper C. D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64: 624-653.
- Hoiby N. (1993) Antibiotic therapy for chronic infection of *Pseudomonas* in the lung. *Annu.Rev.Med.* 44: 1-10.
- Hoiby N. (1994) Diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis: East meets West. *Thorax* 49: 531-532.
- Hoiby N., Krogh J. H., Moser C., Song Z., Ciofu O., & Kharazmi A. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. *Microbes.Infect.* 3: 23-35.
- Holden M. T., Ram C. S., de Nys R., Stead P., Bainton N. J., Hill P. J., Manefield M., Kumar N., Labatte M., England D., Rice S., Givskov M., Salmond G. P., Stewart G. S., Bycroft B. W., Kjelleberg S., & Williams P. (1999) Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol.Microbiol.* 33: 1254-1266.
- Holloway B. W. (1955) Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Gen.Microbiol.* 13: 572-581.
- Hovey A. K. & Frank D. W. (1995) Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J.Bacteriol.* 177: 4427-4436.
- Huber B., Riedel K., Kothe M., Givskov M., Molin S., & Eberl L. (2002) Genetic analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111. *Mol.Microbiol.* 46: 411-426.
- Hueck C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62: 379-433.

- Huston W. M., Jennings M. P., & McEwan A. G. (2002) The multicopper oxidase of *Pseudomonas aeruginosa* is a ferroxidase with a central role in iron acquisition. *Mol.Microbiol.* 45: 1741-1750.
- Iglewski B. H., Sadoff J., Bjorn M. J., & Maxwell E. S. (1978) *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75: 3211-3215.
- Iyer V. R., Eisen M. B., Ross D. T., Schuler G., Moore T., Lee J. C., Trent J. M., Staudt L. M., Hudson J., Jr., Boguski M. S., Lashkari D., Sharon D., Botstein D., & Brown P. O. (1999) The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283: 83-87.
- Jackson D. W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J. W., Hart M. E., & Romeo T. (2002) Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 184: 290-301.
- Jacob-Dubuisson F., Kuehn M., & Hultgren S. J. (1993) A novel secretion apparatus for the assembly of adhesive bacterial pili. *Trends Microbiol* 1: 50-55.
- Jin Q. & He S. Y. (2001) Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* 294: 2556-2558.
- Jones H. A., Lillard J. W., Jr., & Perry R. D. (1999) HmsT, a protein essential for expression of the haemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis*. *Microbiology* 145: 2117-2128.
- Jones K. L., Hegab A. H., Hillman B. C., Simpson K. L., Jinkins P. A., Grisham M. B., Owens M. W., Sato E., & Robbins R. A. (2000) Elevation of nitrotyrosine and nitrate concentrations in cystic fibrosis sputum. *Pediatr.Pulmonol.* 30: 79-85.
- Judson N. & Mekalanos J. J. (2000) Transposon-based approaches to identify essential bacterial genes. *Trends Microbiol.* 8: 521-526.
- Kanehisa M., Goto S., Kawashima S., & Nakaya A. (2002) The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res.* 30: 42-46.
- Kerr J. R. (2000) Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors. *Infect Dis Rev* 2: 184-194.
- Kiewitz C., Larbig K., Klockgether J., Weinel C., & Tümmler B. (2000) Monitoring genome evolution ex vivo: reversible chromosomal integration of a 106 kb plasmid at two tRNA(Lys) gene loci in sequential *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates. *Microbiology* 146: 2365-2373.
- Kiewitz C. & Tümmler B. (2000) Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J.Bacteriol.* 182: 3125-3135.
- King B. S., Ward M. K. W., & Roney D. E. (1954) Media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J.Lab.Clin.Med.* 44: 301-305.
- Kluytmans J. (1997) Surgical infections including burns. In: *Prevention and control of nosocomial infections* (ed R. P. Wenzel) pp. 841-865. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Knowles M. R. & Boucher R. C. (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J.Clin.Invest* 109: 571-577.
- Koster M., Bitter W., & Tommassen J. (2000) Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int.J.Med.Microbiol.* 290: 325-331.

- Kovach M. E., Phillips R. W., Elzer P. H., Roop R. M., & Peterson K. M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16: 800-802.
- Kovach M. E., Elzer P. H., Hill D. S., Robertson G. T., Farris M. A., Roop R. M., & Peterson K. M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- Krall R., Schmidt G., Aktories K., & Barbieri J. T. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect.Immun.* 68: 6066-6068.
- Krall R., Sun J., Pederson K. J., & Barbieri J. T. (2002) In vivo rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect.Immun.* 70: 360-367.
- Kresse A. U., Dinesh S. D., Larbig K., & Römling U. (2003) Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol.Microbiol.* 47: 145-158.
- Kubori T., Sukhan A., Aizawa S. I., & Galan J. E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 10225-10230.
- Lacey R. W. (1969) Dwarf-colony variants of *Staphylococcus aureus* resistant to aminoglycoside antibiotics and to a fatty acid. *J Med Microbiol* 2: 187-197.
- Lam J., Chan R., Lam K., & Costerton J. W. (1980) Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect.Immun.* 28: 546-556.
- Lanyi B. (1970) Serological properties of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Type-specific thermolabile (flagellar) antigens. *Acta Microbiol Acad.Sci.Hung.* 17: 35-48.
- Larbig K. (2002) Intraklonale Genomdiversität in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Fachbereich Chemie, Universität Hannover.
- LeClerc J. E., Li B., Payne W. L., & Cebula T. A. (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* 274: 1208-1211.
- Lee J. M., Zhang S., Saha S., Santa A. S., Jiang C., & Perkins J. (2001) RNA expression analysis using an antisense *Bacillus subtilis* genome array. *J.Bacteriol.* 183: 7371-7380.
- Lee M. L., Kuo F. C., Whitmore G. A., & Sklar J. (2000) Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 9834-9839.
- Letoffe S., Redeker V., & Wandersman C. (1998) Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol.Microbiol.* 28: 1223-1234.
- Levin B. R., Perrot V., & Walker N. (2000) Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 154: 985-997.
- Li J. D., Dohrman A. F., Gallup M., Miyata S., Gum J. R., Kim Y. S., Nadel J. A., Prince A., & Basbaum C. B. (1997) Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 967-972.
- Lindberg F. & Normark S. (1986) Contribution of chromosomal beta-lactamases to beta-lactam resistance in enterobacteria. *Rev.Infect.Dis.* 8 Suppl 3: S292-S304.

- Lipshutz R. J., Morris D., Chee M., Hubbell E., Kozal M. J., Shah N., Shen N., Yang R., & Fodor S. P. (1995) Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* 19: 442-447.
- Lipshutz R. J., Fodor S. P., Gingeras T. R., & Lockhart D. J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat.Genet.* 21: 20-24.
- Lipton S. A., Choi Y. B., Pan Z. H., Lei S. Z., Chen H. S., Sucher N. J., Loscalzo J., Singel D. J., & Stamler J. S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632.
- Lockhart D. J., Dong H., Byrne M. C., Follettie M. T., Gallo M. V., Chee M. S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., & Brown E. L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat.Biotechnol.* 14: 1675-1680.
- Long A. D., Mangalam H. J., Chan B. Y., Toller L., Hatfield G. W., & Baldi P. (2001) Improved statistical inference from DNA microarray data using analysis of variance and a Bayesian statistical framework. Analysis of global gene expression in *Escherichia coli* K12. *J.Biol.Chem.* 276: 19937-19944.
- Lowther W. T., Brot N., Weissbach H., Honek J. F., & Matthews B. W. (2000) Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 6463-6468.
- Lugtenberg B. J., Dekkers L., & Bloemberg G. V. (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu.Rev.Phytopathol.* 39: 461-490.
- Luzar M. A. & Montie T. C. (1985) Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.* 50: 572-576.
- Luzar M. A., Thomassen M. J., & Montie T. C. (1985) Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition. *Infect.Immun.* 50: 577-582.
- Lyczak J. B., Cannon C. L., & Pier G. B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 15: 194-222.
- Macdonald P. (2001) Diversity in translational regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13: 326-331.
- Mahajan-Miklos S., Tan M. W., Rahme L. G., & Ausubel F. M. (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47-56.
- Mahajan-Miklos S., Rahme L. G., & Ausubel F. M. (2000) Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Mol.Microbiol.* 37: 981-988.
- Mahan M. J., Slauch J. M., & Mekalanos J. J. (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259: 686-688.
- Mahenthalingam E., Campbell M. E., & Speert D. P. (1994) Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect.Immun.* 62: 596-605.
- Mann M., Hendrickson R. C., & Pandey A. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu.Rev.Biochem.* 70: 437-473.

- Marcus H. & Baker N. R. (1985) Quantitation of adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to hamster tracheal epithelium. *Infect.Immun.* 47: 723-729.
- Massey R. C. & Buckling A. (2002) Environmental regulation of mutation rates at specific sites. *Trends Microbiol.* 10: 580-584.
- Massey V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem.Soc.Trans.* 28: 283-296.
- Mathee K., Ciofu O., Sternberg C., Lindum P. W., Campbell J. I., Jensen P., Johnsen A. H., Givskov M., Ohman D. E., Molin S., Hoiby N., & Kharazmi A. (1999) Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145: 1349-1357.
- Mattick J. S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu.Rev Microbiol.* 56: 289-314.
- McCaw M. L., Lykken G. L., Singh P. K., & Yahr T. L. (2002) ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol.Microbiol* 46: 1123-1133.
- McKenzie G. J. & Rosenberg S. M. (2001) Adaptive mutations, mutator DNA polymerases and genetic change strategies of pathogens. *Curr.Opin.Microbiol.* 4: 586-594.
- Mendelson M. H., Gurtman A., Szabo S., Neibart E., Meyers B. R., Policar M., Cheung T. W., Lillienfeld D., Hammer G., Reddy S., *et al.* (1994) *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. *Clin.Infect.Dis.* 18: 886-895.
- Mercenier A., Simon J. P., van der Woude C., Haas D., & Stalon V. (1980) Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 144: 159-163.
- Migula W. (1891) Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe 1, 235-238.
- Moloshok T. D., Klevecz R. R., Grant J. D., Manion F. J., Speier W. F., & Ochs M. F. (2002) Application of Bayesian decomposition for analysing microarray data. *Bioinformatics.* 18: 566-575.
- Mongkolsuk S. & Helmann J. D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol.Microbiol.* 45: 9-15.
- Morais P. V., Mesquita C., Andrade J. L., & da Costa M. S. (1997) Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. *Appl.Environ.Microbiol.* 63: 851-856.
- Morrison A. J., Jr. & Wenzel R. P. (1984) Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev.Infect.Dis.* 6 Suppl 3: S627-S642.
- Moss J., Ehrmantraut M. E., Banwart B. D., Frank D. W., & Barbieri J. T. (2001) Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. *Infect.Immun.* 69: 1185-1188.
- Mosteller F. & Tukey J. W. (2002) Data Analysis and Regression: A Second Course in Statistics. Addison-Wesley, Reading, MA.
- Moxon E. R., Rainey P. B., Nowak M. A., & Lenski R. E. (1994) Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr.Biol.* 4: 24-33.

- Murray B. E. & Moellering R. C., Jr. (1982) In-vivo acquisition of two different types of aminoglycoside resistance by a single strain of *Klebsiella pneumoniae* causing severe infection. *Ann.Intern.Med.* 96: 176-180.
- Nadon R. & Shoemaker J. (2002) Statistical issues with microarrays: processing and analysis. *Trends Genet.* 18: 265-271.
- Nelson K. E., Weinel C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins D. S., V, Fouts D. E., Gill S. R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R. T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Lee P. C., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J., Timmis K. N., Dusterhoft A., Tummeler B., & Fraser C. M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ.Microbiol.* 4: 799-808.
- Nguyen L., Paulsen I. T., Tchieu J., Hueck C. J., & Saier M. H., Jr. (2000) Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J Mol.Microbiol Biotechnol.* 2: 125-144.
- Niederman M. S., Rafferty T. D., Sasaki C. T., Merrill W. W., Matthay R. A., & Reynolds H. Y. (1983) Comparison of bacterial adherence to ciliated and squamous epithelial cells obtained from the human respiratory tract. *Am.Rev.Respir.Dis.* 127: 85-90.
- Nogueira T. & Springer M. (2000) Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. *Curr.Opin.Microbiol* 3: 154-158.
- O'Donovan C., Martin M. J., Gattiker A., Gasteiger E., Bairoch A., & Apweiler R. (2002) High-quality protein knowledge resource: SWISS-PROT and TrEMBL. *Brief.Bioinform.* 3: 275-284.
- O'Farrell P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250: 4007-4021.
- O'Toole G. A. & Kolter R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol.Microbiol.* 30: 295-304.
- O'Toole G., Kaplan H. B., & Kolter R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu.Rev.Microbiol.* 54: 49-79.
- Ochsner U. A. & Reiser J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 6424-6428.
- Ochsner U. A., Johnson Z., & Vasil M. L. (2000a) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146: 185-198.
- Ochsner U. A., Vasil M. L., Alsabbagh E., Parvatiyar K., & Hassett D. J. (2000b) Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. *J.Bacteriol.* 182: 4533-4544.
- Oelmüller U., Schlegel H. G., & Friedrich C. G. (1990) Differential stability of mRNA species of *Alcaligenes eutrophus* soluble and particulate hydrogenases. *J Bacteriol.* 172: 7057-7064.
- Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., & Blazquez J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1254.

- Oliver A., Baquero F., & Blazquez J. (2002) The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol.Microbiol.* 43: 1641-1650.
- Pacelli R., Wink D. A., Cook J. A., Krishna M. C., DeGraff W., Friedman N., Tsokos M., Samuni A., & Mitchell J. B. (1995) Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *J.Exp.Med.* 182: 1469-1479.
- Park M. K., Myers R. A., & Marzella L. (1992) Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin.Infect.Dis.* 14: 720-740.
- Passador L., Cook J. M., Gambello M. J., Rust L., & Iglewski B. H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260: 1127-1130.
- Pearson J. P., Gray K. M., Passador L., Tucker K. D., Eberhard A., Iglewski B. H., & Greenberg E. P. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 197-201.
- Pearson J. P., Passador L., Iglewski B. H., & Greenberg E. P. (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 1490-1494.
- Pease A. C., Solas D., Sullivan E. J., Cronin M. T., Holmes C. P., & Fodor S. P. (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 5022-5026.
- Pesci E. C., Milbank J. B., Pearson J. P., McKnight S., Kende A. S., Greenberg E. P., & Iglewski B. H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 11229-11234.
- Pier G. B., Grout M., Zaidi T. S., Olsen J. C., Johnson L. G., Yankaskas J. R., & Goldberg J. B. (1996) Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271: 64-67.
- Plano G. V., Day J. B., & Ferracci F. (2001) Type III export: new uses for an old pathway. *Mol.Microbiol* 40: 284-293.
- Plum G. & Clark-Curtiss J. E. (1994) Induction of *Mycobacterium avium* gene expression following phagocytosis by human macrophages. *Infect.Immun.* 62: 476-483.
- Pollack M. (1995) *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Principles and practice of infectious diseases*. (eds G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin) pp. 1980-2003. Churchill Livingstone, New York.
- Poole K., Zhao Q., Neshat S., Heinrichs D. E., & Dean C. R. (1996) The *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene encodes a novel TonB protein. *Microbiology* 142: 1449-1458.
- Poole K. & Srikumar R. (2001) Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr.Top.Med.Chem.* 1: 59-71.
- Proctor R. A., van Langevelde P., Kristjansson M., Maslow J. N., & Arbeit R. D. (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin.Infect.Dis.* 20: 95-102.

- Pukatzki S., Kessin R. H., & Mekalanos J. J. (2002) The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 3159-3164.
- Putman M., van Veen H. W., & Konings W. N. (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64: 672-693.
- Quackenbush J. (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat.Rev.Genet.* 2: 418-427.
- Rahme L. G., Stevens E. J., Wolfort S. F., Shao J., Tompkins R. G., Ausubel F. M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902.
- Rahme L. G., Ausubel F. M., Cao H., Drenkard E., Goumnerov B. C., Lau G. W., Mahajan-Miklos S., Plotnikova J., Tan M. W., Tsongalis J., Walendziewicz C. L., & Tompkins R. G. (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 8815-8821.
- Rainey P. B. & Bailey M. J. (1996) Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome. *Mol.Microbiol.* 19: 521-533.
- Rainey P. B. & Travisano M. (1998) Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* 394: 69-72.
- Rainey P. B. & Moxon E. R. (2000) Microbiology. When being hyper keeps you fit. *Science* 288: 1186-1187.
- Ramphal R. & Pyle M. (1983) Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect.Immun.* 41: 339-344.
- Ratledge C. & Dover L. G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* 54: 881-941.
- Reimann C., Serino L., Beyeler M., & Haas D. (1998) Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the *pchEF* genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 144: 3135-3148.
- Richard P., Le Floch R., Chamoux C., Pannier M., Espaze E., & Richet H. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J.Infect.Dis.* 170: 377-383.
- Richardson A. R., Yu Z., Popovic T., & Stojiljkovic I. (2002) Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 6103-6107.
- Richmond C. S., Glasner J. D., Mau R., Jin H., & Blattner F. R. (1999) Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27: 3821-3835.
- Roggenkamp A., Sing A., Hornef M., Brunner U., Autenrieth I. B., & Heesemann J. (1998) Chronic prosthetic hip infection caused by a small-colony variant of *Escherichia coli*. *J.Clin.Microbiol.* 36: 2530-2534.
- Römling U., Wingender J., Müller H., & Tümmler B. (1994) A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl.Environ.Microbiol.* 60: 1734-1738.
- Römling U., Schmidt K. D., & Tümmler B. (1997) Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J.Mol.Biol.* 271: 386-404.

- Römling U., Rohde M., Olsen A., Normark S., & Reinkoster J. (2000) AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol.Microbiol.* 36: 10-23.
- Rowen D. W. & Deretic V. (2000) Membrane-to-cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Mol.Microbiol.* 36: 314-327.
- Roy-Burman A., Savel R. H., Racine S., Swanson B. L., Revadigar N. S., Fujimoto J., Sawa T., Frank D. W., & Wiener-Kronish J. P. (2001) Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J.Infect.Dis.* 183: 1767-1774.
- Rozen S. & Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol.Biol.* 132: 365-386.
- Rusthoven J. J., Davies T. A., & Lerner S. A. (1979) Clinical isolation and characterization of aminoglycoside-resistant small colony variants of *Enterobacter aerogenes*. *Am.J Med* 67: 702-706.
- Rychlik W., Spencer W. J., & Rhoads R. E. (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18: 6409-6412.
- Sabra W., Kim E. J., & Zeng A. P. (2002) Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology* 148: 3195-3202.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., & Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiman L. & Prince A. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J.Clin.Invest* 92: 1875-1880.
- Sambrook J., Fritsch E. F., & Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Sasarman A., Sanderson K. E., Surdeanu M., & Sonea S. (1970) Hemin-deficient mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 102: 531-536.
- Sauer K., Camper A. K., Ehrlich G. D., Costerton J. W., & Davies D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J.Bacteriol.* 184: 1140-1154.
- Sawa T., Yahr T. L., Ohara M., Kurahashi K., Gropper M. A., Wiener-Kronish J. P., & Frank D. W. (1999) Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat.Med.* 5: 392-398.
- Schembri M. A. & Klemm P. (2001) Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *EMBO J.* 20: 3074-3081.
- Schena M., Shalon D., Davis R. W., & Brown P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P. O., & Davis R. W. (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 10614-10619.

- Schmidt K., Liaanen-Jensen S., & Schlegel H. G. (1963) Die Carotinoide der *Thiorhodaceae*. *Arch. Mikrobiol.* 117-126.
- Schmidt K. D., Tümmler B., & Römling U. (1996) Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J.Bacteriol.* 178: 85-93.
- Schuster M., Lostroh C. P., Ogi T., & Greenberg E. P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J.Bacteriol.* 185: 2066-2079.
- Schweizer H. P. (1991) *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* 97: 109-121.
- Sekiya K., Ohishi M., Ogi T., Tamano K., Sasakawa C., & Abe A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 11638-11643.
- Self W. T., Grunden A. M., Hasona A., & Shanmugam K. T. (1999) Transcriptional regulation of molybdoenzyme synthesis in *Escherichia coli* in response to molybdenum: ModE-molybdate, a repressor of the *modABCD* (molybdate transport) operon is a secondary transcriptional activator for the *hyc* and *nar* operons. *Microbiology* 145: 41-55.
- Semmler A. B., Whitchurch C. B., & Mattick J. S. (1999) A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145: 2863-2873.
- Serino L., Reimann C., Visca P., Beyeler M., Chiesa V. D., & Haas D. (1997) Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated *pchDCBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 179: 248-257.
- Shaffer J. P. (1995) Multiple hypothesis testing. *Annu.Rev.Psychol.* 561-584.
- Shoemaker J. S., Painter I. S., & Weir B. S. (1999) Bayesian statistics in genetics: a guide for the uninitiated. *Trends Genet.* 15: 354-358.
- Simel D. L., Mastin J. P., Pratt P. C., Wissemann C. L., Shelburne J. D., Spock A., & Ingram P. (1984) Scanning electron microscopic study of the airways in normal children and in patients with cystic fibrosis and other lung diseases. *Pediatr.Pathol.* 2: 47-64.
- Singh P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., & Greenberg E. P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407: 762-764.
- Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., & Welsh M. J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417: 552-555.
- Skerker J. M. & Berg H. C. (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 6901-6904.
- Smith J. J., Travis S. M., Greenberg E. P., & Welsh M. J. (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85: 229-236.
- Snel B., Lehmann G., Bork P., & Huynen M. A. (2000) STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res.* 28: 3442-3444.
- Sniegowski P. D., Gerrish P. J., & Lenski R. E. (1997) Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* 387: 703-705.

- Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98: 503-517.
- Southern E. M., Maskos U., & Elder J. K. (1992) Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics* 13: 1008-1017.
- Spangenberg C., Fislage R., Sierralta W., Tümmler B., & Römling U. (1995) Comparison of type IV-pilin genes of *Pseudomonas aeruginosa* of various habitats has uncovered a novel unusual sequence. *FEMS Microbiol.Lett.* 127: 158.
- Spangenberg C., Heuer T., Burger C., & Tümmler B. (1996) Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 396: 213-217.
- Spangenberg C. (1997) Sequenzdiversität von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Fachbereich Chemie, Universität Hannover.
- Spiers A. J., Buckling A., & Rainey P. B. (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146: 2345-2350.
- Spiers A. J., Kahn S. G., Bohannon J., Travisano M., & Rainey P. B. (2002) Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and Phenotypic Bases of Wrinkly Spreader Fitness. *Genetics* 161: 33-46.
- Stamler J. S. (1995) S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 196: 19-36.
- Stanier R. Y., Palleroni N. J., & Doudoroff M. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J.Gen.Microbiol.* 43: 159-271.
- Stewart P. S. & Costerton J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
- Stoodley P., Davies D. G., & Costerton J. W. (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu.Rev.Microbiol.*
- Stover C. K., Pham X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrenner P., Hickey M. J., Brinkman F. S., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K., Wu Z., Paulsen I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E., Lory S., & Olson M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
- Stulke J. (2002) Control of transcription termination in bacteria by RNA-binding proteins that modulate RNA structures. *Arch.Microbiol* 177: 433-440.
- Stutts M. J., Cotton C. U., Yankaskas J. R., Cheng E., Knowles M. R., Gatzky J. T., & Boucher R. C. (1985) Chloride uptake into cultured airway epithelial cells from cystic fibrosis patients and normal individuals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82: 6677-6681.
- Stutts M. J., Canessa C. M., Olsen J. C., Hamrick M., Cohn J. A., Rossier B. C., & Boucher R. C. (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269: 847-850.
- Suter S. (1994) The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 150: S118-S122.

- Taddei F., Matic I., Godelle B., & Radman M. (1997a) To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends Microbiol.* 5: 427-428.
- Taddei F., Radman M., Maynard-Smith J., Toupance B., Gouyon P. H., & Godelle B. (1997b) Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* 387: 700-702.
- Takase H., Nitanaï H., Hoshino K., & Otani T. (2000) Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect.Immun.* 68: 4498-4504.
- Tal R., Wong H. C., Calhoon R., Gelfand D., Fear A. L., Volman G., Mayer R., Ross P., Amikam D., Weinhouse H., Cohen A., Sapir S., Ohana P., & Benziman M. (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J.Bacteriol.* 180: 4416-4425.
- Tamano K., Aizawa S., Katayama E., Nonaka T., Imajoh-Ohmi S., Kuwae A., Nagai S., & Sasakawa C. (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J* 19: 3876-3887.
- Taniguchi M., Miura K., Iwao H., & Yamanaka S. (2001) Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. *Genomics* 71: 34-39.
- Tao H., Bausch C., Richmond C., Blattner F. R., & Conway T. (1999) Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J.Bacteriol.* 181: 6425-6440.
- Tatusov R. L., Natale D. A., Garkavtsev I. V., Tatusova T. A., Shankavaram U. T., Rao B. S., Kiryutin B., Galperin M. Y., Fedorova N. D., & Koonin E. V. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 29: 22-28.
- Totten P. A. & Lory S. (1990) Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. *J.Bacteriol.* 172: 7188-7199.
- Touati D. (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch.Biochem.Biophys.* 373: 1-6.
- Tümmler B. & Kiewitz C. (1999) Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol.Med.Today* 5: 351-358.
- Tusher V. G., Tibshirani R., & Chu G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 5116-5121.
- Urban A., Leipelt M., Eggert T., & Jaeger K. E. (2001) DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 183: 587-596.
- Usher L. R., Lawson R. A., Geary I., Taylor C. J., Bingle C. D., Taylor G. W., & Whyte M. K. (2002) Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J.Immunol.* 168: 1861-1868.
- Valdivia R. H. & Falkow S. (1997) Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277: 2007-2011.
- Vallet I., Olson J. W., Lory S., Lazdunski A., & Filloux A. (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 6911-6916.

- Vallis A. J., Yahr T. L., Barbieri J. T., & Frank D. W. (1999) Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect.Immun.* 67: 914-920.
- van Delden C. & Iglewski B. H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg.Infect.Dis.* 4: 551-560.
- van der Woude C., Pierard A., Kley-Raymann M., & Haas D. (1984) *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J.Bacteriol.* 160: 928-934.
- van der Woude M., Braaten B., & Low D. (1996) Epigenetic phase variation of the pap operon in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* 4: 5-9.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., & Swings J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol.Rev.* 60: 407-438.
- Vasil M. L. & Ochsner U. A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol.Microbiol.* 34: 399-413.
- Vaudaux P., Francois P., Bisognano C., Kelley W. L., Lew D. P., Schrenzel J., Proctor R. A., McNamara P. J., Peters G., & Von Eiff C. (2002) Increased Expression of Clumping Factor and Fibronectin-Binding Proteins by *hemB* Mutants of *Staphylococcus aureus* Expressing Small Colony Variant Phenotypes. *Infect.Immun.* 70: 5428-5437.
- Vijgenboom E., Busch J. E., & Canters G. W. (1997) In vivo studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that *azu* expression is under control of *rpoS* and ANR. *Microbiology* 143: 2853-2863.
- Visca P., Ciervo A., & Orsi N. (1994) Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdinin biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 176: 1128-1140.
- Visca P., Leoni L., Wilson M. J., & Lamont I. L. (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol.Microbiol* 45: 1177-1190.
- Vogel H. J. & Bonner D. M. (1956) Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J.Biol.Chem.* 218: 97-106.
- Von Eiff C., Heilmann C., Proctor R. A., Woltz C., Peters G., & Götz F. (1997) A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J.Bacteriol.* 179: 4706-4712.
- Voulhoux R., Ball G., Ize B., Vasil M. L., Lazdunski A., Wu L. F., & Filloux A. (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* 20: 6735-6741.
- Wagegg W. & Braun V. (1981) Ferric citrate transport in *Escherichia coli* requires outer membrane receptor protein fecA. *J Bacteriol.* 145: 156-163.
- Wagner V. E., Bushnell D., Passador L., Brooks A. I., & Iglewski B. H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: Effects of growth phase and environment. *J.Bacteriol.* 185: 2080-2095.
- Wandersman C. & Stojiljkovic I. (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr.Opin.Microbiol.* 3: 215-220.

- Wang J., Mushegian A., Lory S., & Jin S. (1996) Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* selection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 10434-10439.
- Warren J. B., Loi R., Rendell N. B., & Taylor G. W. (1990) Nitric oxide is inactivated by the bacterial pigment pyocyanin. *Biochem.J.* 266: 921-923.
- Watnick P. I. & Kolter R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol.Microbiol* 34: 586-595.
- Wehmhöner D. (2002) Proteomanalyse unterschiedlicher Morphotypen von *Pseudomonas aeruginosa*, isoliert von Patienten mit zystischer Fibrose. Dissertation. Fachbereich Biologie, Universität Hannover.
- Weinel C., Ermolaeva M., & Ouzounis C. A. (2003) PseuRECA: A platform for reannotation and contextual analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 genome. *Bioinformatics* in press.
- Westfall P. H. & Young S. S. (1993) Resampling-Based Multiple Testing, Examples and Methods for p-Value Adjustment. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Whitchurch C. B., Alm R. A., & Mattick J. S. (1996) The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 9839-9843.
- Whiteley M., Bangera M. G., Bumgarner R. E., Parsek M. R., Teitzel G. M., Lory S., & Greenberg E. P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413: 860-864.
- Wiblin R. T. (1997) Nosocomial pneumonia. In: *Prevention and control of nosocomial infections*. (ed R. P. Wenzel) pp. 807-819. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Wilcoxon F. (1945) Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics* 119-122.
- Wilkins M. R., Gasteiger E., Sanchez J. C., Bairoch A., & Hochstrasser D. F. (1998) Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 19: 1501-1505.
- Wilson M., DeRisi J., Kristensen H. H., Imboden P., Rane S., Brown P. O., & Schoolnik G. K. (1999) Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 12833-12838.
- Winzer K. & Williams P. (2001) Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int.J.Med.Microbiol.* 291: 131-143.
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., & Halbwachs-Mecarelli L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80: 617-653.
- Woese C. R. & Fox G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74: 5088-5090.
- Wolfgang M. C., Lee V. T., Gilmore M. E., & Lory S. (2003) Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev.Cell* 4: 253-263.
- Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K. C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas J. R., Randell S., Boucher R. C., & Döring G. (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J.Clin.Invest* 109: 317-325.

- Wu T. D. (2001) Analysing gene expression data from DNA microarrays to identify candidate genes. *J Pathol.* 195: 53-65.
- Xu K. D., McFeters G. A., & Stewart P. S. (2000) Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 146: 547-549.
- Yahr T. L. & Frank D. W. (1994) Transcriptional organization of the trans-regulatory locus which controls exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 176: 3832-3838.
- Yahr T. L., Hovey A. K., Kulich S. M., & Frank D. W. (1995) Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *J.Bacteriol.* 177: 1169-1178.
- Yahr T. L., Mende-Mueller L. M., Friese M. B., & Frank D. W. (1997) Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J.Bacteriol.* 179: 7165-7168.
- Yahr T. L., Vallis A. J., Hancock M. K., Barbieri J. T., & Frank D. W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 13899-13904.
- Yamagishi M., Matsushima H., Wada A., Sakagami M., Fujita N., & Ishihama A. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. *EMBO J.* 12: 625-630.
- Yoneyama H. & Nakae T. (1996) Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiology* 142: 2137-2144.
- Yoon S. S., Hennigan R. F., Hilliard G. M., Ochsner U. A., Parvatiyar K., Kamani M. C., Allen H. L., DeKievit T. R., Gardner P. R., Schwab U., Rowe J. J., Iglewski B. H., McDermott T. R., Mason R. P., Wozniak D. J., Hancock R. E., Parsek M. R., Noah T. L., Boucher R. C., & Hasset D. J. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev.Cell* 3: 593-603.
- Zapala M. A., Lockhart D. J., Pankratz D. G., Garcia A. J., Barlow C., & Lockhart D. J. (2002) Software and methods for oligonucleotide and cDNA array data analysis. *Genome Biol.* 3: SOFTWARE0001.
- Zhang J. P. & Normark S. (1996) Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* 273: 1234-1236.
- Zheng M., Wang X., Templeton L. J., Smulski D. R., LaRossa R. A., & Storz G. (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J.Bacteriol.* 183: 4562-4570.
- Zierdt C. H. & Schmidt P. J. (1964) Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 87: 1003-1010.
- Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., & Römling U. (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol.Microbiol.* 39: 1452-1463.

VI. Anhang

Tab. 6.1 Differentielle Genexpression^a bei *P. aeruginosa* 20265 SCV, Wildtyp und Revertante während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase.

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA0039		4.1 (0.2)	2.9 (0.4)			2.2 (0.1)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0044_exoT	67.1 (27.0)	4.2 (1.5)	-15.3 (7.7)				exoenzyme T	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA0046		3.6 (0.9)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0047		6.3 (2.1)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0059_osmC			3.1 (0.4)				osmotically inducible protein OsmC	Adaptation, protection
PA0070	-16.7 (2.0)		24.4 (8.1)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins
PA0073	-4.7 (0.2)						probable ATP-binding component of ABC transporter	Transport of small molecules
PA0075	-11.3 (6.6)		4.7 (2.2)				probable phosphoprotein phosphatase	Putative enzymes
PA0076	-25.2 (12.4)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0077	-7.5 (3.2)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0082	-15.4 (7.1)		30.1 (17.7)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0083	-20.6 (3.1)		15.8 (3.8)			8.6 (6.8)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0084	-10.8 (3.7)		5.6 (1.1)				conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0085	-15.5 (1.9)		30.3 (26.3)				conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0086	-4.9 (0.7)		4.3 (0.5)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0088	-8.4 (3.9)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0090	-12.5 (4.5)						probable ClpA/B-type chaperone	Translation, post-translational modification, degradation
PA0102	2.4 (0.3)	5.4 (0.6)					probable carbonic anhydrase	Central intermediary metabolism
PA0126	-4.9 (1.0)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0146				-2.8 (0.8)			conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0176				-2.2 (0.2)			probable chemotaxis transducer	Adaptation, protection; Chemotaxis
PA0187				-2.3 (0.1)			hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0194		-2.8 (0.6)				2.3 (0.3)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown; Putative enzymes
PA0316_serA	3.0 (0.2)						D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA0427_oprM						-2.3 (0.2)	outer membrane protein OprM precursor	Membrane proteins; Transport of small molecules; Antibiotic resistance and susceptibility
PA0443						2.5 (0.3)	probable transporter	Membrane proteins; Transport of small molecules
PA0444				-2.4 (0.2)			N-carbamoyl-beta-alanine amidohydrolase	Nucleotide biosynthesis and metabolism
PA0460	4.3 (0.7)		-3.4 (0.3)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0471	-5.1 (0.8)						probable transmembrane sensor	Membrane proteins; Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems
PA0472	-3.4 (1.0)						probable sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcriptional regulators
PA0537	-2.6 (0.2)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0538_dsbB	-24.6 (11.1)		6.2 (1.2)			7.1 (3.6)	disulfide bond formation protein	Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA0563	-5.9 (0.4)		4.8 (1.9)				conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0567						3.1 (1.1)	conserved hypothetical protein	Membrane proteins;Hypothetical, unclassified, unknown
PA0633	-6.2 (2.5)						hypothetical protein	Related to phage, transposon, or plasmid
PA0636	-5.4 (1.0)						hypothetical protein	Related to phage, transposon, or plasmid
PA0639	-3.0 (0.7)						conserved hypothetical protein	Related to phage, transposon, or plasmid
PA0659	-2.1 (0.1)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA0733		-2.9 (0.6)					probable pseudouridylate synthase	Transcription, RNA processing and degradation
PA0762_algU	2.9 (0.6)						sigma factor AlgU	Transcriptional regulators
PA0764_mucB	-2.6 (0.5)		2.7 (0.3)				negative regulator for alginate biosynthesis MucB	Cell wall / LPS / capsule;Transcriptional regulators;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA0795_prpC						2.1 (0.2)	citrate synthase 2	Carbon compound catabolism;Central intermediary metabolism
PA0805		5.5 (2.6)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0833	4.8 (0.2)		-4.1 (0.4)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA0853	2.0 (0.1)						probable oxidoreductase	Putative enzymes
PA0854_fumC2			-2.7 (0.1)				fumarate hydratase	Carbon compound catabolism;Energy metabolism
PA0867		3.3 (0.3)	2.7 (0.1)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0869_pbpG	-3.2 (0.3)						D-alanyl-D-alanine-endopeptidase	Cell wall / LPS / capsule
PA0887_acsA				10.0 (1.8)		-11.1 (2.1)	acetyl-coenzyme A synthetase	Carbon compound catabolism;Central intermediary metabolism
PA0968	-2.4 (0.3)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1001_phnA						-2.4 (0.3)	anthranilate synthase component I	Adaptation, protection
PA1076		4.5 (2.9)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1079_flgD						-2.9 (0.5)	flagellar basal-body rod modification protein FlgD	Motility & Attachment;Cell wall / LPS / capsule
PA1080_flgE		-5.5 (1.6)					flagellar hook protein FlgE	Motility & Attachment;Cell wall / LPS / capsule
PA1082_flgG		-4.4 (1.4)					flagellar basal-body rod protein FlgG	Motility & Attachment;Cell wall / LPS / capsule
PA1085_flgJ		-4.2 (0.8)					flagellar protein FlgJ	Motility & Attachment;Cell wall / LPS / capsule
PA1098_fleS						-2.6 (0.3)	two-component sensor	Two-component regulatory systems
PA1099_fleR						-2.5 (0.3)	two-component response regulator	Transcriptional regulators;Two-component regulatory systems;Motility & Attachment
PA1101_fliF		-5.2 (2.9)					flagellar M-ring protein	Motility & Attachment;Cell wall / LPS / capsule
PA1137						-5.0 (2.9)	probable oxidoreductase	Putative enzymes
PA1155_nrdB				-2.4 (0.5)			ribonucleoside reductase, small chain	Nucleotide biosynthesis and metabolism
PA1200	-3.4 (0.4)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1202	-9.6 (1.2)		9.7 (2.7)	-5.8 (2.2)		4.5 (0.5)	probable hydrolase	Putative enzymes
PA1245				-5.4 (1.1)		4.2 (0.5)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA1248_aprF				-4.0 (2.1)			alkaline protease secretion protein AprF	Protein secretion/export apparatus;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA1441		-3.6 (0.7)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1467	-3.2 (0.9)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1471				-3.0 (0.5)			hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1474					-3.9 (2.2)		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA1494	-3.6 (0.7)			-3.0 (0.6)		2.9 (0.4)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1545					-3.8 (1.4)	-2.4 (0.4)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1546_hemN	2.7 (0.3)						oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PA1571	2.5 (0.2)	3.8 (0.5)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1589_sucD	2.3 (0.2)						succinyl-CoA synthetase alpha chain	Energy metabolism
PA1592_i				-3.1 (1.1)			hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1597		5.4 (3.7)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1624						-2.5 (0.1)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1673	2.7 (0.7)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1692	9.6 (1.2)	3.4 (0.9)					probable translocation protein in type III secretion	Protein secretion/export apparatus
PA1694_pscQ	57.1 (46.1)	3.8 (1.0)	-20.9 (19.2)				translocation protein in type III secretion	Protein secretion/export apparatus
PA1695_pscP	7.1 (2.5)	2.6 (0.3)	-2.7 (0.9)				translocation protein in type III secretion	Protein secretion/export apparatus
PA1696_pscO	40.1 (1.4)	4.2 (0.6)	-10.2 (2.2)				translocation protein in type III secretion	Protein secretion/export apparatus
PA1697	10.6 (1.0)	3.4 (0.8)	-3.0 (0.5)				ATP synthase in type III secretion system	Protein secretion/export apparatus
PA1698_popN	29.9 (16.1)	5.2 (1.0)	-6.0 (2.6)				outer membrane protein PopN	Membrane proteins;Protein secretion/export apparatus
PA1699	79.4 (20.4)	4.7 (0.7)	-16.2 (7.6)				conserved hypothetical protein in type III secretion	Hypothetical, unclassified, unknown;Protein secretion/export apparatus
PA1700	36.9 (13.6)	5.2 (1.7)	-7.2 (6.0)				conserved hypothetical protein in type III secretion	Hypothetical, unclassified, unknown;Protein secretion/export apparatus
PA1701	34.9 (10.3)	4.9 (1.6)	-7.9 (3.4)				conserved hypothetical protein in type III secretion	Hypothetical, unclassified, unknown;Protein secretion/export apparatus
PA1702	43.0 (2.8)	7.0 (1.7)					conserved hypothetical protein in type III secretion	Hypothetical, unclassified, unknown;Protein secretion/export apparatus
PA1703_pcrD	7.7 (1.1)	3.3 (0.6)					type III secretory apparatus protein PcrD	Protein secretion/export apparatus
PA1704_pcrR	28.1 (4.5)	4.5 (0.6)					transcriptional regulator protein PcrR	Transcriptional regulators
PA1705_pcrG	5.9 (2.5)						regulator in type III secretion	Protein secretion/export apparatus
PA1706_pcrV	268.2 (173.3)	4.3 (1.0)	-54.7 (55.8)	26.0 (8.2)		-8.8 (3.4)	type III secretion protein PcrV	Protein secretion/export apparatus
PA1707_pcrH	42.7 (7.0)	4.2 (1.0)	-12.6 (3.0)	9.6 (5.4)			regulatory protein PcrH	Protein secretion/export apparatus;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA1708_popB	137.7 (33.4)	3.4 (0.8)	-37.9 (10.7)	7.5 (1.3)		-4.2 (0.4)	translocator protein PopB	Protein secretion/export apparatus
PA1709_popD	60.9 (4.0)	4.6 (1.1)	-12.0 (3.1)				translocator protein PopD	Protein secretion/export apparatus
PA1710_exsC	13.1 (2.1)	4.0 (1.5)	-3.3 (0.6)	8.5 (1.5)		-5.6 (1.0)	exoenzyme S synthesis protein C precursor	Protein secretion/export apparatus;Translation, post-translational modification, degradation
PA1711	11.3 (0.6)	3.2 (0.8)	-3.5 (0.7)	8.2 (0.9)		-5.0 (0.9)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1712_exsB	5.3 (0.5)	2.8 (0.3)		8.2 (3.4)			exoenzyme S synthesis protein B	Protein secretion/export apparatus;Translation, post-translational modification, degradation
PA1714	14.9 (0.0)	4.9 (1.1)	-3.4 (0.6)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1715_pscB	45.7 (7.3)	5.6 (1.0)	-13.2 (3.0)				type III export apparatus protein	Protein secretion/export apparatus

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA1716_pscC	9.0 (1.6)	3.2 (0.6)					type III secretion protein PscC	Protein secretion/export apparatus
PA1717_pscD	24.2 (12.0)	5.6 (0.2)	-3.9 (0.9)				type III export protein PscD	Protein secretion/export apparatus
PA1718_pscE	33.2 (2.2)	4.0 (0.2)	-8.5 (0.9)				type III export protein PscE	Protein secretion/export apparatus
PA1719_pscF	42.3 (27.7)	3.6 (0.9)	-15.3 (11.0)				type III export protein PscF	Protein secretion/export apparatus
PA1720_pscG	21.1 (6.0)	6.0 (0.6)					type III export protein PscG	Protein secretion/export apparatus
PA1721_pscH	9.9 (2.4)	4.5 (1.1)					type III export protein PscH	Protein secretion/export apparatus
PA1722_pscI	11.5 (3.4)	3.9 (0.9)	-3.9 (1.0)				type III export protein PscI	Protein secretion/export apparatus
PA1723_pscJ	4.9 (0.7)	3.8 (0.3)					type III export protein PscJ	Protein secretion/export apparatus
PA1724_pscK	6.4 (1.4)	3.5 (0.8)					type III export protein PscK	Protein secretion/export apparatus
PA1725_pscL	12.3 (4.3)	4.0 (0.7)					type III export protein PscL	Protein secretion/export apparatus
PA1730				-3.0 (0.5)		2.4 (0.3)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1731				-2.2 (0.2)			conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1732						2.2 (0.2)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1733						2.6 (0.1)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1782	-2.5 (0.4)			-2.5 (0.3)			probable serine/threonine-protein kinase	Adaptation, protection
PA1842	4.1 (0.9)			-2.8 (0.9)			hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1852		4.5 (1.3)				2.8 (0.2)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1862_modB	9.7 (2.0)	4.3 (0.7)					molybdenum transport protein ModB	Transport of small molecules
PA1863_modA	5.5 (0.8)	6.3 (3.1)					molybdate-binding periplasmic protein precursor ModA	Transport of small molecules
PA1871_lasA				-2.3 (0.4)			LasA protease precursor	Translation, post-translational modification, degradation; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA1901				-9.1 (5.9)			phenazine biosynthesis protein PhzC	Hypothetical, unclassified, unknown; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA1924						8.9 (5.5)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1967				-4.5 (1.3)	-3.7 (1.3)		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1984		-4.1 (1.7)	-10.5 (7.7)	8.7 (1.7)		-9.8 (1.5)	probable aldehyde dehydrogenase	Putative enzymes
PA1999				3.8 (1.1)		-8.7 (0.8)	probable CoA transferase, subunit A	Amino acid biosynthesis and metabolism; Carbon compound catabolism
PA2000						-6.3 (1.0)	probable CoA transferase, subunit B	Amino acid biosynthesis and metabolism; Carbon compound catabolism
PA2001_atoB						-4.4 (0.9)	acetyl-CoA acetyltransferase	Central intermediary metabolism; Fatty acid and phospholipid metabolism
PA2003_bdhA						-3.9 (0.9)	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	Carbon compound catabolism
PA2025_gor				-4.4 (0.8)		16.7 (8.0)	glutathione reductase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers; Amino acid biosynthesis and metabolism
PA2027				-3.9 (0.9)		4.5 (0.7)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2047	-7.2 (3.3)						probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators
PA2069				-2.1 (0.0)			probable carbamoyl transferase	Putative enzymes
PA2166	-3.2 (0.4)		3.1 (0.5)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2191_exoY	31.7 (10.6)	6.8 (2.7)					adenylate cyclase ExoY	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA2193_hcnA						3.5 (1.0)	hydrogen cyanide synthase HcnA	Central intermediary metabolism
PA2204		-2.2 (0.3)					probable binding protein component of ABC	Transport of small molecules

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA2233				-3.0 (0.6)			probable glycosyl transferase	Putative enzymes
PA2235				-12.0 (1.5)			hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2247_bkdA1				-3.2 (1.2)		5.3 (2.3)	2-oxoisovalerate dehydrogenase (alpha subunit)	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA2248_bkdA2				-3.8 (0.7)		4.0 (0.7)	2-oxoisovalerate dehydrogenase (beta subunit)	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA2249_bkdB				-6.8 (4.7)			branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase (lipoamide component)	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA2259_ptxS	2.3 (0.1)						transcriptional regulator PtxS	Transcriptional regulators;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA2270	-3.1 (0.5)						probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators
PA2300_chiC						3.3 (0.6)	chitinase	Carbon compound catabolism
PA2304	-6.0 (3.6)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2305				-6.4 (4.9)			probable non-ribosomal peptide synthetase	Putative enzymes
PA2384				-4.3 (0.4)		4.9 (0.8)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2386_pvdA				-8.4 (5.8)		3.5 (1.1)	L-ornithine N5-oxygenase	Adaptation, protection
PA2390	-10.4 (4.5)						probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA2398_fpvA				-2.4 (0.5)		2.6 (0.3)	ferripyoverdine receptor	Transport of small molecules
PA2407						2.1 (0.1)	probable adhesion protein	Motility & Attachment
PA2408				-9.1 (2.2)			probable ATP-binding component of ABC transporter	Transport of small molecules
PA2409				-9.2 (5.9)			probable permease of ABC transporter	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA2411				-9.4 (4.6)			probable thioesterase	Adaptation, protection;Putative enzymes
PA2412				-2.8 (0.3)		3.9 (1.0)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2413				-4.9 (3.4)			probable class III aminotransferase	Putative enzymes
PA2422						-3.1 (0.4)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2424						15.2 (8.8)	probable non-ribosomal peptide synthetase	Adaptation, protection
PA2432	-21.6 (12.5)		16.1 (12.4)			4.6 (2.4)	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators
PA2433	-3.4 (0.4)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2441	5.0 (1.2)	15.4 (6.2)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2442_gcvT2	-3.6 (1.2)						glycine cleavage system protein T2	Amino acid biosynthesis and metabolism;Central intermediary metabolism
PA2450	-3.3 (1.0)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2475	-16.3 (0.6)						probable cytochrome P450	Adaptation, protection;Putative enzymes
PA2476_dsbG	-58.9 (5.0)		56.0 (6.3)	-11.7 (1.1)		11.4 (1.8)	thiol:disulfide interchange protein DsbG	Chaperones & heat shock proteins;Translation, post-translational modification, degradation
PA2477	-41.1 (5.6)		132.8 (49.2)	-14.6 (11.7)		37.0 (12.3)	probable thiol:disulfide interchange protein	Putative enzymes;Membrane proteins
PA2478	-111.7 (38.2)		217.0 (56.1)	-49.6 (5.2)		50.6 (22.9)	probable thiol:disulfide interchange protein	Putative enzymes;Membrane proteins
PA2479	-13.9 (4.0)		9.2 (3.3)	-6.9 (1.7)		6.5 (2.0)	probable two-component response regulator	Transcriptional regulators;Two-component regulatory systems
PA2480	-18.8 (4.8)		82.5 (52.3)	-3.8 (0.9)		6.5 (1.1)	probable two-component sensor	Two-component regulatory systems

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA2506	-82.0 (9.8)		34.0 (9.1)	-18.6 (3.1)		15.6 (2.6)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2537	-13.4 (6.7)						probable acyltransferase	Fatty acid and phospholipid metabolism
PA2538	-7.5 (0.4)		2.8 (0.5)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA2540	-5.1 (1.8)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2580	-3.9 (1.3)						conserved hypothetical protein	Putative enzymes
PA2684	-4.4 (0.3)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2694	-4.3 (0.8)						probable thioredoxin	Energy metabolism
PA2711	-3.0 (0.3)						probable periplasmic spermidine/putrescine-binding protein	Transport of small molecules
PA2747		5.1 (2.4)	3.7 (1.4)	4.4 (0.8)		-2.7 (0.1)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2755_eco	-4.5 (1.1)		4.1 (0.1)				ecotin precursor	Translation, post-translational modification, degradation
PA2780	-12.6 (6.8)		21.3 (13.7)	-23.6 (11.5)		85.3 (22.7)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2781	-26.6 (9.4)		49.1 (49.9)	-14.3 (4.0)		22.9 (13.5)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2805		4.2 (0.6)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2827	2.3 (0.2)	3.4 (0.4)					conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2853_oprl						2.3 (0.1)	outer membrane lipoprotein Oprl precursor	Membrane proteins
PA2883	2.8 (0.7)	4.4 (0.7)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3021	-3.7 (0.8)		3.2 (1.3)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3031	2.9 (0.4)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3038						-3.2 (1.0)	probable porin	Transport of small molecules
PA3049_rmf	4.8 (0.3)	6.7 (2.6)					ribosome modulation factor	Translation, post-translational modification, degradation
PA3126_ibpA		5.3 (1.8)					heat-shock protein IbpA	Chaperones & heat shock proteins
PA3161_himD		2.5 (0.1)					integration host factor beta subunit	DNA replication, recombination, modification and repair;Transcription, RNA processing and degradation;Translation, post-translational modification
PA3205						2.9 (0.7)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3214		2.4 (0.3)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3234						-4.1 (2.0)	probable sodium:solute symporter	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA3235						-17.8 (9.5)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA3245_minE		2.5 (0.3)					cell division topological specificity factor MinE	Cell division
PA3250						2.2 (0.1)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3274						2.7 (0.4)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3286	4.1 (0.1)	3.0 (0.5)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3307		-2.4 (0.4)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3329						11.4 (8.7)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3330				-7.4 (6.1)			probable short chain dehydrogenase	Putative enzymes
PA3331				-3.1 (0.6)		7.6 (1.6)	cytochrome P450	Adaptation, protection;Carbon compound catabolism
PA3332						3.2 (0.8)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3369				6.5 (0.4)		-4.9 (0.3)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA3370				4.5 (0.6)		-4.0 (0.2)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA3371						-3.1 (0.2)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3407_hasAp				-8.2 (4.6)		6.0 (2.0)	heme acquisition protein HasAp	Transport of small molecules

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA3445			-4.5 (1.9)				conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3517		-5.4 (2.7)					probable lyase	Carbon compound catabolism
PA3530			10.8 (6.1)				conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3531_bfrB	4.5 (1.3)		-3.5 (0.6)				bacterioferritin	Transport of small molecules;Adaptation, protection
PA3552	-2.6 (0.5)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3611	-4.2 (0.6)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3631		-2.3 (0.2)					conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3662		-3.0 (0.5)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3691		-2.0 (0.1)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3716	-2.7 (0.3)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3720						-10.0 (6.3)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3729	-5.6 (1.3)		3.1 (0.6)				conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3779						-5.3 (2.9)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3790_oprC	25.8 (11.3)	9.6 (7.5)					outer membrane protein OprC	Transport of small molecules
PA3813_iscU		-2.2 (0.2)					probable iron-binding protein IscU	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PA3819	4.0 (0.0)	2.3 (0.2)					conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA3841_exoS	90.6 (33.3)	3.9 (0.8)	-22.2 (11.2)	5.5 (1.9)			exoenzyme S	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA3842	29.6 (11.6)	3.2 (0.8)	-8.6 (3.8)				probable chaperone	Chaperones & heat shock proteins;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA3843	65.4 (6.4)	4.2 (0.9)	-16.8 (3.5)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3901_fecA	-22.2 (12.0)						Fe(III) dicitrate transport protein FecA	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA3931			-3.8 (1.7)				conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3989_holA				-8.5 (2.7)			DNA polymerase III, delta subunit	DNA replication, recombination, modification and repair
PA4031_ppa				-3.3 (1.2)	2.8 (0.6)		inorganic pyrophosphatase	Central intermediary metabolism
PA4110_ampC			-4.6 (1.8)				beta-lactamase precursor	Adaptation, protection
PA4139	16.2 (14.1)	11.9 (5.4)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4148				-20.5 (2.8)	21.8 (4.4)		probable short-chain dehydrogenase	Putative enzymes
PA4195			-2.8 (0.6)				probable binding protein component of ABC transporter	Transport of small molecules
PA4217				-6.5 (1.9)			probable FAD-dependent monooxygenase	Putative enzymes
PA4218	19.0 (15.8)		-12.3 (7.2)				probable transporter	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA4220	21.3 (3.1)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4221_fptA	15.1 (2.6)		-11.0 (1.0)			-17.7 (15.7)	Fe(III)-pyochelin receptor precursor	Transport of small molecules
PA4223	5.6 (0.7)		-4.1 (0.8)			-2.9 (0.5)	probable ATP-binding component of ABC transporter	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA4224	3.9 (1.0)		-3.4 (0.9)			-4.1 (1.5)	pyochelin biosynthetic protein PchG	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA4225_pchF	37.0 (5.5)		-36.7 (20.2)				pyochelin synthetase	Transport of small molecules;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA4226_pchE	37.4 (11.1)		-40.5 (16.9)				dihydroaeruginic acid synthetase	Transport of small molecules;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA4228_pchD	14.2 (13.6)		-17.4 (16.7)				pyochelin biosynthesis protein PchD	Transport of small molecules;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA4229_pchC	34.2 (6.5)		-40.0 (17.3)			-4.4 (0.9)	pyochelin biosynthetic protein PchC	Transport of small molecules;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA4230_pchB	24.3 (1.9)		-28.3 (8.4)				salicylate biosynthesis protein PchB	Transport of small molecules;Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA4231_pchA	5.8 (0.4)						salicylate biosynthesis isochorismate synthase	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate);Transport of small molecules
PA4290						-4.6 (2.0)	probable chemotaxis transducer	Adaptation, protection;Chemotaxis
PA4309_pctA						-14.2 (10.7)	chemotactic transducer PctA	Adaptation, protection;Chemotaxis
PA4317	-56.5 (28.1)		15.2 (9.5)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA4323	-2.2 (0.3)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4326						-2.4 (0.1)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4370	-2.7 (0.4)						outer membrane metalloproteinase precursor	Membrane proteins
PA4389	2.4 (0.2)	2.2 (0.3)					probable short-chain dehydrogenase	Putative enzymes
PA4469						-2.4 (0.2)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4470_fumC1						2.4 (0.2)	fumarate hydratase	Energy metabolism
PA4471						-2.4 (0.3)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4482_gatC		-2.7 (0.4)					Glu-tRNA(Gln) amidotransferase subunit C	Translation, post-translational modification, degradation
PA4489	-2.8 (0.6)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4490	-5.2 (0.8)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4491	-5.5 (1.2)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4495	-3.2 (0.6)					2.2 (0.1)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4501						-4.3 (1.9)	probable porin	Transport of small molecules
PA4513	-4.2 (0.4)						probable oxidoreductase	Putative enzymes
PA4515	-3.2 (0.4)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4523						-2.6 (0.5)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4563_rpsT						2.8 (0.5)	30S ribosomal protein S20	Translation, post-translational modification, degradation;Central intermediary metabolism
PA4570	-2.5 (0.3)					-4.4 (0.5)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4607						-2.7 (0.7)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4611	2.6 (1.0)	4.7 (2.9)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4624			5.7 (1.8)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4625		3.6 (0.9)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4633						-6.1 (4.6)	probable chemotaxis transducer	Adaptation, protection;Chemotaxis
PA4674		5.1 (2.4)					conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4675	-2.3 (0.1)						probable TonB-dependent receptor	Transport of small molecules
PA4764_fur		2.7 (0.4)					ferric uptake regulation protein	Transcriptional regulators
PA4803	-9.4 (2.4)		14.9 (0.8)			-8.5 (1.6)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4826			13.7 (0.5)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4843		-5.4 (1.2)				-2.8 (0.4)	probable two-component response regulator	Transcriptional regulators;Two-component regulatory systems
PA4847_accB						-2.6 (0.5)	biotin carboxyl carrier protein (BCCP)	Fatty acid and phospholipid metabolism
PA4893_ureG						-2.5 (0.4)	urease accessory protein UreG	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PA4909						-5.9 (1.8)	probable ATP-binding component of ABC	Transport of small molecules

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
PA5015_aceE				-2.4 (0.4)		2.2 (0.1)	pyruvate dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism;Energy metabolism
PA5016_aceF						2.3 (0.3)	dihydrolipoamide acetyltransferase	Carbon compound catabolism;Energy metabolism
PA5061				-4.2 (1.3)		5.3 (1.0)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5073	-2.5 (0.4)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5095	-2.9 (0.7)						probable permease of ABC transporter	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA5113	-5.1 (1.6)		4.1 (0.8)				hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA5163_rmlA				-3.2 (0.4)			glucose-1-phosphate thymidyltransferase	Cell wall / LPS / capsule
PA5174	2.2 (0.2)						probable beta-ketoacyl synthase	Fatty acid and phospholipid metabolism
PA5178			2.2 (0.3)	-3.3 (0.5)		2.6 (0.3)	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5217			2.7 (0.4)				probable binding protein component of ABC iron transporter	Transport of small molecules
PA5222				-7.2 (1.1)			hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5240_trxA	2.3 (0.1)	3.1 (0.7)					thioredoxin	Nucleotide biosynthesis and metabolism;Translation, post-translational modification
PA5274_rnk						2.3 (0.2)	nucleoside diphosphate kinase regulator	Transcriptional regulators
PA5287_amtB						2.2 (0.2)	ammonium transporter AmtB	Membrane proteins;Transport of small molecules
PA5304_dadA				-5.1 (1.6)		3.0 (0.3)	D-amino acid dehydrogenase, small subunit	Amino acid biosynthesis and metabolism;Energy metabolism
PA5313						-2.5 (0.2)	probable pyridoxal-dependent aminotransferase	Putative enzymes
PA5316_rpmB						2.6 (0.7)	50S ribosomal protein L28	Translation, post-translational modification, degradation
PA5317		-2.9 (0.3)					probable binding protein component of ABC dipeptide transporter	Transport of small molecules
PA5339	2.5 (0.4)						conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5355_glcD	-6.5 (7.1)						glycolate oxidase subunit GlcD	Central intermediary metabolism;Carbon compound catabolism
PA5424			3.9 (0.8)				conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA5429_aspA						-2.6 (0.4)	aspartate ammonia-lyase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA5461	3.1 (0.7)	2.7 (0.3)					hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5470				-7.2 (3.4)			probable peptide chain release factor	Translation, post-translational modification, degradation
PA5481	-2.9 (0.7)						hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5482			2.8 (0.3)			-2.3 (0.4)	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown;Membrane proteins
PA5531_tonB	-3.8 (0.1)						TonB protein	Transport of small molecules
L37109_cds1	7.5 (4.4)		-5.6 (2.2)	5.2 (0.9)		-3.2 (0.5)	L37109 /GENE=pilA /PROD=type 4 pilin /FEATURE=cds1 /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa type IV pilin (pilA) gene, complete cds.	
L81176_cds3	-3.0 (0.3)	-4.0 (0.5)				-2.6 (0.5)	L81176 /GENE=fliD /PROD=flagellar cap /FEATURE=cds3 /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa flagellin (fliC) gene, partial cds; FlaG (flaG), flagellar cap (fliD), FliS (fliS), and FleQ (fleQ) genes, complete cds; and unknown genes.	
L81176_cds5		-2.8 (0.5)					L81176 /GENE= /PROD=unknown /FEATURE=cds5 /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa flagellin (fliC) gene, partial cds; FlaG (flaG), flagellar cap (fliD), FliS (fliS), and FleQ (fleQ) genes, complete cds; and unknown genes.	

Gen Name / GENBANK-Eintrag ^b	Exponentielle Phase			Stationäre Phase			Protein Name / GENBANK Definition ^b	Funktion ^b
	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV	SCV/WT	SCV/REV	WT/REV		
L81176_cds6		-3.1 (0.6)			-6.5 (3.8)		L81176 /GENE= /PROD=unknown /FEATURE=cds6 /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa flagellin (fliC) gene, partial cds; FlaG (flaG), flagellar cap (fliD), FliS (fliS), and FleQ (fleQ) genes, complete cds; and unknown genes.	
M57501_cds	-6.2 (1.0)	-13.6 (2.0)	-2.4 (0.2)	-3.2 (0.6)	-8.2 (1.8)	-2.4 (0.3)	M57501 /GENE=flaA /PROD=flagellin /FEATURE=cds /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa flagellin (flaA) gene, complete cds.	
AF332547_orfB	-2.4 (0.3)	-3.7 (0.4)					putative acyl carrier protein - fatty acid biosynthesis, from glycosylation island genes in strain PAK	
AF332547_orfC		-3.0 (0.5)					putative 3-oxoacyl (acyl carrier protein) synthase - fatty acid biosynthesis, from glycosylation island genes in strain PAK	
AF332547_orfF		-3.2 (0.2)					large subunit aromatic dioxygenase from glycosylation island genes in strain PAK	
ig_5130767_5131427				-6.8 (3.1)		7.0 (4.2)	Intergenic region between PA4639 and PA4640, 5130767-5131427, (+) strand	
ig_727608_721556	2.8 (0.4)	2.7 (0.3)		3.4 (0.8)			Intergenic region between PA0701 and PA0702, 721556-727608, (-) strand	

^a Angegeben ist das arithmetische Mittel der Signalintensitäts-Verhältnisse aus vier Kreuzvergleichen. In der Klammer befindet sich die Standardabweichung. Hochregulierte Gene haben positive, herunterregulierte Gene negative Werte.

^b PA-Nummer, Gen- und Proteinname wurden überwiegend vom *P. aeruginosa* PAO1 Genom-Projekt (<http://www.pseudomonas.com>) übernommen. Für nicht-PAO1 Gene werden statt PA-Nummer der GenBank-Eintrag sowie eine nähere Bezeichnung des einzelnen Gens angegeben.

PAO1 Genom [kb]

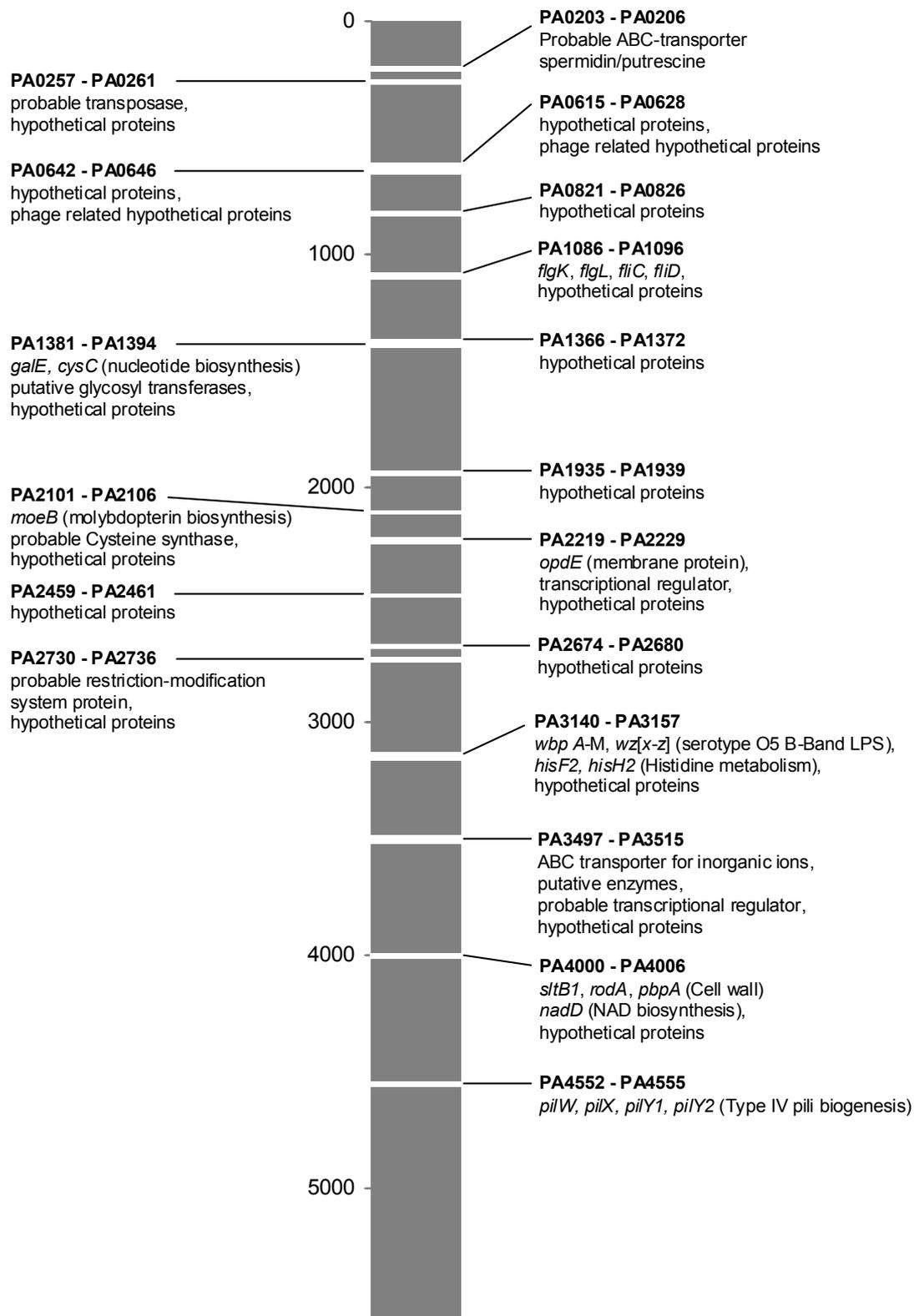


Abb. 6.1 Gene von *P. aeruginosa* PAO1, die nicht im Genom von *P. aeruginosa* 20265 enthalten sind. Gen-Cluster von mind. 3 Genen sind näher beschrieben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Franz Robin Paul von Götz
Adresse	Marienstrasse 92, 30171 Hannover
Geburtstag/-ort	02.06.1974 in Köln
Familienstand	verheiratet
Kinder	ein Sohn, geb. 22.08.2002

Schulabschluß

05/1993	Abitur, Otto-Hahn-Gymnasium, Gifhorn
---------	--------------------------------------

Zivildienst

10/1993 – 09/1994	Deutsches Rotes Kreuz / Notfunkdienst, Gifhorn
-------------------	--

Hochschulausbildung

10/1994 – 02/2000	Studium der Biologie (Diplom) Georg-August-Universität, Göttingen
11/1998 – 01/2000	Diplomarbeit „Zur Rolle des <i>yadF</i> -Gens im CO ₂ -Stoffwechsel von <i>Escherichia coli</i> “ Dr. B. Kusian, Prof. Dr. B. Bowien Abteilung Molekularphysiologie Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen
04/2000 - 03/2003	Dissertation „Transkriptomanalyse verschiedener Morphotypen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , isoliert von Patienten mit Cystischer Fibrose“ PD Dr. I. Steinmetz, Prof. Dr. D. Bitter-Suermann / Prof. Dr. Dr. B. Tümmler Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene / Klinische Forschergruppe „Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“ Medizinische Hochschule, Hannover
seit 04/2003	wissenschaftlicher Angestellter bei PD Dr. I. Steinmetz Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Medizinische Hochschule, Hannover

Wissenschaftliche Publikationen

- **v. Götz, F.**, Wehmhöner, D., Häußler, S., Lauber, J., Attree, I., Jordan, D., Buer, J., Tümmler, B. und Steinmetz, I. (2003) Expression analysis of a cytotoxic and biofilm forming small-colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a cystic fibrosis lung. *Mol. Microbiol.*: submitted
- Häußler, S., Ziegler, I., Lottel, A., **v. Götz, F.**, Rohde, M., Tümmler, B., Wehmhöner, D., Saravanamuthu, S. und Steinmetz, I. (2003) Highly adherent small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J. Med. Microbiol.* 52: 295-301
- Salunkhe, P., **v. Götz, F.**, Wiehlmann, L., Lauber, J., Buer, J. und Tümmler, B. (2002) Gene-Chip expression analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to paraquat-induced superoxide stress. *Genome Letters* 4: 165-174

Poster

- **v. Götz, F.**, Häußler, S., Lauber, J., Buer, J., Tümmler, B. und Steinmetz, I. (2003) Transcriptional Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* small colony variant (SCV). Report of the European Graduate College *Pseudomonas*: Biotechnology and Pathogenicity, Hannover, 24.1.2003
- **v. Götz, F.**, Salunkhe, P., Juhas, M., Häußler, S., Lauber, J., Buer, J., Tümmler, B. und Steinmetz, I. (2002) Transcriptional Analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. Genomics in Infectious Diseases, 2nd International Conference, Würzburg, 1.-3.5.2002