

Proteomanalyse unterschiedlicher Morphotypen von
Pseudomonas aeruginosa,
isoliert von Patienten mit zystischer Fibrose

Vom Fachbereich Biologie der Universität

Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Dirk Wehmhöner

geboren am 1.9.1970 in Soltau

2003

Referent: Prof. Dr. D. Bitter-Suermann

Korreferent: Prof. Dr. A. Brakhage

Tag der Promotion: 17.12.2002

Abstract

The focus of this study was the analysis of morphotypic variants of the gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from Cystic Fibrosis patients where this opportunistic pathogen regularly causes infections of the lung. These chronic *Pseudomonas* infections today represent the main cause of death in these patients since many other pathogens which cause infections of CF patients can be treated more efficiently by antibiotics than *P. aeruginosa*.

In previous studies it had been shown that beside the emergence of other morphotypic variants during the adaptation of *P. aeruginosa* to the lung habitat, also so called Small Colony Variants (SCV's) can frequently be recovered from the chronically infected patients. These SCV morphotypes represent slow growing subpopulations of the present *P. aeruginosa* strains which are characterized by increased resistance to various antibiotic substances and which can revert to the fast growing phenotype *in vitro*. Furthermore, the SCV morphotype shows increased biofilm formation properties and an increased fitness under nutrient depleted conditions in stationary phase liquid cultures. To investigate the unclear impact of the SCV's in persistent lung infections, the aim of this study was to characterize potential mechanisms of adaptation which could contribute to the survival of the pathogens in the CF lung.

In comparative proteome studies, using two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, the profiles of protein expression were compared between the isolated SCV's and the corresponding clonal identical wildtypes and revertants. For these studies several different clinical isolates were used and the protein extracts of different growing phases were analysed to detect also proteins whose expression regulated depending on the growing-phase. Whole cell extracts, secretory protein extracts and also biochemical protein fractions were analyzed to increase the number of experimental accessible proteins. Several differences in the protein expression patterns could be observed between the different morphotypes and differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry, either by MALDI/TOF peptide mass fingerprints or by peptide sequencing by ESI-MS/MS. Furthermore, two dimensional gels of *P. aeruginosa* protein extracts were used for western blotting experiments using sera of infected CF patients in the aim to get new insights into the host immune response to the proteome of *P. aeruginosa*.

The comparative proteome analyses revealed an increased type III secretion and an earlier induced type I secretion in the SCV morphotypes. Furthermore the identification of several

proteins which were observed to be overexpressed by the SCV morphotype gave evidence of an adaptation of this morphotype to iron depleted conditions.

A functional examination of the differentially expressed proteins in addition to the observed increased biofilm forming properties and the increased fitness of this morphotype in stationary phase cultures lead to the hypothesis that the SCV morphotype is a variant specially adapted to the chronic infection in the lung.

keywords: ``*Pseudomonas aeruginosa*`, ``SCV`, ``proteome``

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abkürzungen	4
1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.2. Zystische Fibrose und Infektionen des Respirationstraktes	10
2.3. 'Small Colony Variants'	14
2.4. Proteomanalyse	19
2.5. Zielsetzung der Arbeit	24
3. Material und Methoden	26
3.1 Materialien und Bezugsquellen	26
3.1.1. Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel	26
3.1.2. Enzyme	27
3.1.3. Bakterienstämme	27
3.1.4. Geräte	28
3.1.5. Computerprogramme	28
3.1.6. Datenbanken	29
3.1.7. Medien und Standardpuffer	30
3.1.8. Antikörper und Seren	31
3.1.9. Sonstige Materialien	31
3.2. Kultivierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
3.2.1. Standardkultivierung	32
3.2.2. Supplementierung und Depletion der Standardmedien	33
3.3. Herstellung von Proteinextrakten für die zweidimensionale Gelelektrophorese	34
3.3.1. Gesamtzellextrakte	34
3.3.2. Proteinextrakte der Kulturüberstände	36
3.3.3. Fraktionierung von Proteingemischen	37
3.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Extrakte	38

3.4. Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten	39
3.5. SDS-PAGE als zweite Dimension der 2D-Elektrophorese	43
3.6. Klassische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
3.7. Färbung, Dokumentation und Konservierung von Proteingelen	48
3.7.1. Silberfärbung	48
3.7.2. Klassische Coomassie-Färbung	49
3.7.3. Färbung mit kolloidalem Coomassie	49
3.7.4. Fluoreszenzfärbung	50
3.7.5. Dokumentation der Gele	51
3.7.6. Konservierung von Proteingelen	51
3.8. Immunologischer Nachweis von Proteinen	52
3.8.1. Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen	52
3.8.2. Detektion mit Seren und Antikörpern	52
3.8.3. Chemolumineszenzdetektion	54
3.9. Auswertung von 2D-Gelen	54
3.10. Identifizierung von Proteinen	55
3.10.1. Vorbehandlung der Proben für MS und Proteasenbehandlung	56
3.10.2. Aufreinigung der Peptide	58
3.10.3. MALDI-TOF-MS	59
3.10.4. Massenspektrometrische Sequenzierung durch MS/MS	61
3.10.5. Auswertung der Rohdaten und Identifizierung der Proteine in Datenbanken	63
3.10.6. N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman-Abbau	64
4. Ergebnisse	65
4.1. Analyse des zweidimensionalen Proteinmusters der verwendeten <i>P. aeruginosa</i>-Stämme	65
4.1.1. Auftrennung zellulärer und sekretorischer Proteine	65
4.1.2. Auswahl geeigneter Gradienten	68
4.1.3. Zeitliche Dynamik der zweidimensionalen Proteinmuster	71
4.1.4. Vergleich der untersuchten <i>P. aeruginosa</i> Stämme	74
4.1.5. Fraktionierung von Proteingemischen	78
4.2. Vergleichende Untersuchungen zwischen Wildtyp, 'Small Colony Variants' und Revertanten	83
4.2.1. Vergleichende Proteomuntersuchungen von 'Small Colony Variants' und Revertanten verschiedener Stämme	83

4.2.2.	Proteomanalyse der 'Small Colony Variants' und Revertanten der klinischen Isolate 61 und 20265 und Identifizierung differentiell exprimierter Proteine	89
4.2.3.	Vertiefende Proteomanalyse der drei unterschiedlichen Morphotypen des Stammes 20265	100
4.2.4.	Zusammenfassende Analyse aller identifizierter differentiell exprimierter Proteine	109
4.2.5.	Das Proteom unter dem Einfluß der Verfügbarkeit von Eisen	118
4.3.	Antigene im zweidimensionalen Proteinmuster klinischer <i>P. aeruginosa</i>-Stämme	124
5.	Diskussion	130
5.1.	Die Adaptation der SCV's an die chronische Infektion	130
5.1.1.	Die 'Small Colony Variants' zeigen eine verstärkte Proteinsekretion des Typs I und des Typs III.	130
5.1.2.	Die Sekretion der drei über Proteinsekretion des Typs I exportierten Proteine AprA, AprX und HasAp wird bei den SCV's früher induziert.	131
5.1.3.	Die Proteinsekretion des Typs III ist bei den SCV's erhöht.	132
5.1.4.	Die SCV's scheinen an Eisenmangelbedingungen adaptiert zu sein.	135
5.1.5.	Die SCV's zeigen eine verstärkte Biofilmbildung.	139
5.1.6.	Bewertung weiterer differentiell exprimierter Proteine	140
5.2.	Identifizierung von Protein-Antigenen	143
5.3.	Abschließende Bewertung und Ausblick	143
6.	Literaturverzeichnis	145
7.	Eidesstattliche Versicherung	160
8.	Lebenslauf	161
9.	Danksagung	162

Abkürzungen

2D-GE	zweidimensionale Gelelektrophorese
AA	Acrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest. / demin.	destilliertes / demineralisiertes Wasser
ASB 14	N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Vernetzungsgrad [%]
CF	Zystische Fibrose
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-di-Methylammonio)-1-Propan-Sulfonat
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Punkte pro Inch
DTT	Dithiothreitol (1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
GSP	<i>general secretory pathway</i>
h	Stunde
H ₂ O _{demin}	demineralisiertes Wasser
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kb bzw. kbp	Kilobasen bzw. Kilobasenpaare
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Leupeptin	N-Acetyl-Leu-Leu-Arginal x 1/2 H ₂ SO ₄ x H ₂ O
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
min	Minute
mRNA	'messenger' RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Pefablock SC	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid

PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
POD	Peroxidase
ppm	Teile pro Millionen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SB	Sulfobetaine
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Totalacrylamid-Konzentration
TBP	Tributylphosphin
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit (Time Of Flight)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VB-Medium	Vogel-Bonner-Medium
Vol	Volumenanteil
v/v	Volumen / Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Masse / Volumen

1. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung morphotypischer Varianten des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*. Diese morphotypischen Varianten wurden von an zystischer Fibrose erkrankten Patienten isoliert, bei denen dieses Bakterium im Krankheitsverlauf regelmäßig chronische Infektionen der Lunge verursacht, welche heute die häufigste Todesursache für diese Patientengruppe darstellen.

In vorhergehenden mikrobiologischen Untersuchungen von Patientenmaterial konnte im Verlauf solcher Lungeninfektionen regelmäßig das Auftreten sogenannter 'Small Colony Variants' (SCV's) nachgewiesen werden. Bei diesen SCV's handelt es sich um langsamwachsende Varianten der in der Lunge vorliegenden *P. aeruginosa* Stämme, welche ein erhöhtes Antibiotikaresistenzprofil aufweisen und zum großwachsenden Morphotyp revertieren können. Es wurde bei diesen SCV's weiterhin eine verstärkte Autoaggregation der Bakterienzellen sowie eine erhöhte Fitness der Variante unter stationären Kulturbedingungen beobachtet.

Die unklare Rolle dieser SCV's im Infektionsverlauf wurde in dieser Arbeit mit dem Ziel der Aufklärung potentiell vorliegender Adaptationsmechanismen untersucht. Durch vergleichende Proteomanalysen mittels zweidimensionaler Proteingelelektrophorese wurden die Proteinexpressionsprofile der isolierten SCV's mit denen der jeweils klonal identischen Revertanten und Wildtypformen verglichen. Bei diesen Untersuchungen wurden verschiedene klinische *P. aeruginosa* Isolate verwendet und die Proteinexpressionsprofile unterschiedlicher Wachstumsphasen der vergleichenden Analyse unterzogen, um auch Proteine zu erfassen, deren Produktion erst zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert wird. Darüberhinaus wurden Proteinfractionen analysiert und neben zellulären auch Exoproteine durch Untersuchung der Kulturüberstände einbezogen. Hierdurch sollte die Anzahl der der Untersuchung zugänglichen Proteine maximiert werden. Bei diesen Analysen konnten zahlreiche Abweichungen der Proteinexpressionsmuster zwischen den Morphotypen reproduzierbar beobachtet werden. Diese abweichend exprimierten Proteine konnten massenspektrometrisch durch 'MALDI/TOF-Peptidmassenfingerprints' sowie massenspektrometrische Peptidsequenzierung durch Tandemmassenspektrometrie identifiziert werden. Darüber hinaus konnte die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese in ergänzenden Untersuchungen genutzt werden, um durch 'Western'-Hybridisierungen bisher

unbekannte Protein-Antigene zu identifizieren und so neue Erkenntnisse über die Immunantwort der CF-Patienten auf das Proteom von *P. aeruginosa* zu gewinnen.

Bei den vergleichenden Proteomanalysen konnte eine erhöhte Typ III Sekretion sowie eine frühzeitig induzierte Typ I Sekretion der SCV's nachgewiesen werden. Außerdem führten zahlreiche bei den SCV's überexprimierte Proteine zu der Theorie einer bei diesem Morphotyp vorliegenden Adaptation an Eisenmangelbedingungen.

Eine funktionelle Betrachtung aller bei den SCV's abweichend exprimierten Genprodukte führte gemeinsam mit der Beobachtung der erhöhten Biofilmbildung und der erhöhten Fitness der SCV's unter Mangelbedingungen zu der Hypothese eines an einen chronischen, persistierenden Infektionsverlauf besonders angepassten Morphotyps.

Schlagworte: „*Pseudomonas aeruginosa*“, „SCV“, „Proteom“

2. Einleitung

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Bei *Pseudomonas aeruginosa* handelt es sich um gramnegatives, polytrich polar begeißeltes Stäbchenbakterium. Taxonomisch zählt die Gattung *Pseudomonas* zur Familie der *Pseudomonadaceae*, welche in die Gamma-Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet wird.

Pseudomonas aeruginosa ist ein ubiquitär vorkommender Organismus und gilt als weit verbreiteter Boden- und Feuchtkeim. Gegenüber dem Vorkommen von Nährstoffen zeigt sich *P. aeruginosa* äußerst anspruchslos und kann daher aus der Umwelt fast überall dort isoliert werden, wo ein feuchtes Milieu herrscht und zumindest Spuren organischer Substanzen vorkommen. Darüberhinaus ist *P. aeruginosa* ein fakultativ pathogenes Bakterium.

Entdeckt wurde *P. aeruginosa* als pathogener Keim im Jahre 1882 und wurde zunächst nur in Verbindung mit dem von ihm verursachten blau-grünen Eiter gebracht. Heute jedoch ist bekannt, dass *P. aeruginosa* an einer Vielzahl unterschiedlicher Infektionen beteiligt sein kann (Pollack, 2000).

Allerdings sind die Abwehrmechanismen gesunder Menschen in der Regel in der Lage, den Erreger abzuwehren. Zu schweren Infektionen mit *P. aeruginosa* kommt es nur bei bestimmten prädisponierten Patientengruppen. Aus diesem Grund wird das Bakterium auch als ein opportunistisch pathogener Erreger bezeichnet. Bedeutende Prädispositionen für eine Infektion mit *P. aeruginosa* sind einerseits eine Schwächung der Immunabwehr, sei es pathologisch bedingt oder durch eine medikamentöse Immunsuppression, und andererseits offene Wunden der Häute oder Schleimhäute (Woods und Vasil, 1994). Liegen solche Wunden vor, beispielsweise bei Verbrennungspatienten, kann *P. aeruginosa* invasive Lokalinfectionen verursachen, die unter Umständen septisch generalisieren können. Eine wichtige Rolle spielt *P. aeruginosa* weiterhin bei CF-Patienten, bei denen es im Verlaufe der Krankheit in den allermeisten Fällen zu einer chronischen Infektion des Respirationstraktes durch *P. aeruginosa* kommt.

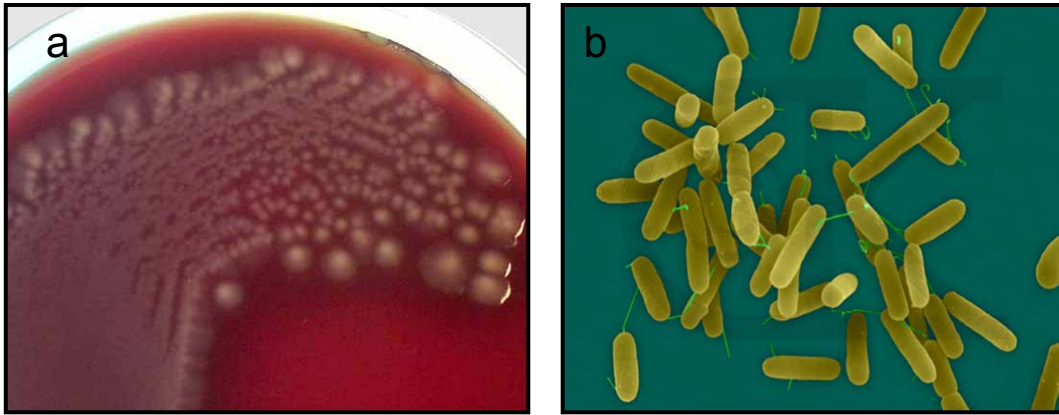


Abb. 1: Das gramnegative Stäbchenbakterium *Pseudomonas aeruginosa*. a: Kolonien von *P. aeruginosa* auf einem Blutagar-Festkulturmedium, b: rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einiger Zellen von *P. aeruginosa* in Falschfarbendarstellung.

Pseudomonas aeruginosa ist aufgrund seines Bedrohungspotentials für geschwächte und immunsupprimierte Menschen vor allem in Krankenhäusern sehr gefürchtet, denn ein beträchtlicher Anteil aller nosokomialen Infektionen geht auf dieses Bakterium zurück. So gilt *P. aeruginosa* beispielsweise als ein häufiger Erreger nosokomialer Pneumonien und auch andere nosokomial erworbene Infektionen wie beispielsweise Harnwegsentzündungen werden häufig durch dieses Bakterium verursacht.

Ein besonderes Problem und eine der Ursachen dieser zahlreichen Infektionen in Krankenhäusern ist die natürlich vorhandene hohe Resistenz des Keimes gegenüber einer größeren Anzahl gebräuchlicher Antibiotika.

Für diese ungewöhnlich hohe natürliche Resistenz von *P. aeruginosa* sind verschiedene Ursachen maßgeblich.

Ein bedeutender Grund für die erhöhte Antibiotikaresistenz des Erregers ist der Aufbau seiner äußeren Zellmembran. Diese Membran stellt wie bei anderen gramnegativen Bakterien auch eine semipermeable Barriere gegenüber dem umgebenden Milieu dar. Die unspezifische Aufnahme kleinerer hydrophiler Moleküle wie z. B. β -Lactam-Antibiotika kann hier nur über wassergefüllte Kanäle erfolgen, welche von bestimmten Membranproteinen, den Porinen gebildet werden. Diese Porine sind damit ursächlich für die Permeabilitätseigenschaften der Membran und im Falle von *P. aeruginosa* liegt diese Membranpermeabilität immerhin um den Faktor 12 bis 100 niedriger als beispielsweise bei *E. coli* (Hancock, 1998). Allein durch

diese starke Abschottung gegenüber der Umgebung ist schon eine deutlich erhöhte Resistenz des Bakteriums gegeben. Es wird vermutet, dass die Hauptgründe dieser Impermeabilität der Membran gegenüber vielen Antibiotika im strukturellen Aufbau des Hauptporins OmpF liegen (Bellido et al., 1992).

Einen weiteren Mechanismus der natürlichen Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* stellen die sogenannten Eflux-Systeme dar (Poole et al., 1993). Hierbei handelt es sich um Proteinkomplexe, welche den aktiven Transport einer Vielzahl unterschiedlicher Substanzen aus der Zelle heraus bewirken (Poole und Strikumar, 2001). Diese Effluxsysteme oder auch Effluxpumpen sind aus drei Elementen aufgebaut, einem Protonenantiporter in der Cytoplasmamembran, einem kanalformendem Protein in der äußeren Membran sowie einem periplasmatischen Membranfusionsprotein, welches die beiden anderen Elemente verbindet. Mit diesem System verfügen die Bakterien durch aktive Entgiftung der Zelle über einen natürlichen Schutz gegen viele Antibiotika

Einen letzten sehr wirkungsvollen natürlichen Schutz des Bakteriums gegen Antibiotika stellen die biochemischen Fähigkeiten von *P. aeruginosa* dar. Der Erreger verfügt nämlich von Natur aus sowohl über eine auf dem bakteriellen Chromosom codierte β -Lactamase, als auch über eine Kanamycin-Phosphotransferase, deren Gen ebenfalls chromosomal lokalisiert ist.

Diese genannten Mechanismen, verbunden mit dem durch hohen Antibiotikaeinsatz induziertem Selektionsdruck, bewirken eine derart erhöhte Antibiotikaresistenz des Bakteriums, dass *P. aeruginosa* im klinischen Bereich als Problemkeim betrachtet werden muß.

2.2. Zystische Fibrose und Infektionen des Respirationstraktes

Bei der zystischen Fibrose (CF, 'Cystic Fibrosis'), auch als Mukoviszidose bezeichnet, handelt es sich um eine monogene erbliche Erkrankung. Erstmals als klinisches Syndrom beschrieben wurde die zystische Fibrose im Jahre 1938 (Anderson, 1938) und bereits wenig später erkannte man den der Erkrankung zugrunde liegenden rezessiven Vererbungsweg. Bei den hellhäutigen Bevölkerungsgruppen ist die zystische Fibrose mit einem Auftreten von

etwa einem Fall pro 3000 Neugeborener die häufigste schwere autosomal rezessiv vererbte Krankheit, bei dunkelhäutigen und orientalischen Personen tritt die Erkrankung seltener auf. Im Jahre 1989 wurde erkannt, dass die Ursache der Erkrankung eine Mutation des CFTR-Gens ('cystic fibrosis transmembrane conductance regulator') auf dem menschlichen Chromosom 7 ist (Riordan et al., 1989). Durch die Mutation dieses Gens kommt es in den Epithelien zu einer Störung des transepithelialen Transportes von Chloridionen. Diese Störung resultiert in einer deutlich erhöhten NaCl-Konzentration sowie erhöhter Viskosität aller Körpersekrete der betroffenen Patienten.

Durch die Verdickung der Sekrete exokriner Drüsen können diese häufig nicht abfließen und verstopfen die Ausführungsgänge. Hierdurch kommt es in der Regel in vielen Organen wie beispielsweise dem Pankreas oder der Galle zu größeren Problemen. Die nicht abfließenden Sekrete rufen häufig Entzündungsreaktionen hervor, wodurch in den betroffenen Organen vermehrt Bindegewebe und sackartige Erweiterungen ausgebildet werden. Diese Veränderungen haben zu dem Namen zystische Fibrose geführt.

Eine noch größere Gefahr aber geht für die CF-Patienten von dem durch die gestörte Sekretion veränderten Milieu im Respirationstrakt aus. Hier nämlich kommt es verstärkt zu bakteriellen Infektionen, welche zu chronischen Lungenentzündungen führen. Diese chronischen Infektionen des Respirationstraktes führen zu Gewebsschädigungen der pulmonalen Epithelien und verminderter Lungenfunktion. Die Erkrankung der Lunge ist heute bei CF-Patienten mit über 90% die häufigste Todesursache (Boat et al., 1989).

Die erste Infektion der Lunge kann durch verschiedene Erreger erfolgen. Beispiele hierfür sind *S. aureus* und *H. influenzae*, später gefolgt von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *Aspergillus spec.*. Das weitaus größte Problem in der Therapie der chronisch infizierten CF-Lunge stellt heute der opportunistisch pathogene Erreger *P. aeruginosa* dar. Der Hauptgrund hierfür ist die oben bereits beschriebene hohe natürliche Resistenz dieses Keimes. Durch diese Resistenz ist *P. aeruginosa* seit der Verfügbarkeit wirksamer Antibiotika, mit denen die anderen Erreger erfolgreich bekämpft werden können, zu der größten Bedrohung der infizierten CF-Patienten geworden. Etwa 80-90 % aller CF-Patienten leiden heute unter durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen Atemwegsinfektionen und den damit verbundenen Komplikationen (Pier, 1998). Dies ist erst seit dem routinemäßigen Einsatz von Antibiotikatherapien der Fall, die die Lebenserwartung der Patienten dramatisch erhöht haben. Zuvor spielte der Keim bei Infektionen der Lunge nur eine geringe Rolle, weil die

Patienten in der Regel schon im Kindes- und Jugendalter verstarben. Die Bedeutung von *P. aeruginosa* bei dieser Patientengruppe nahm erst mit dem Erreichen höherer Lebensalter und damit fortgeschrittenerer Infektionsstadien zu. In einer Untersuchung der Lungengewebsproben von 14 verstorbenen CF-Patienten im Jahre 1946 beispielsweise konnte nur bei einem einzigen der Erreger *P. aeruginosa* (damals noch *P. pyocyanea*) isoliert werden (Di Sant' Agnese et al., 1946). Durch den erfolgreichen Einsatz von Antibiotika hat *P. aeruginosa* *S. aureus* als Hauptproblemkeim bei der zystischen Fibrose abgelöst.

Eine Infektion mit dem Erreger *P. aeruginosa* bei CF-Patienten beginnt typischerweise im Alter von acht bis zwölf Jahren im Rahmen eines "normalen" viralen oder bakteriellen Infektes der oberen Luftwege, bei dem dann auch *P. aeruginosa* auftritt. Es gibt allerdings auch Patienten, die bereits im Kleinkindesalter infiziert sind und andererseits auch solche, die auch im Erwachsenenalter noch keine *Pseudomonas*-Infektion erworben haben. Es konnte interessanterweise nachgewiesen werden, dass die Art der Mutation des CFTR-Gens die Wahrscheinlichkeit einer frühzeitigen Infektion determiniert (Kubesch et al., 1993).

Nach dem Abklingen des akuten Infektes werden die *P. aeruginosa* - Bakterien bei den CF-Patienten dann aber oft nicht wieder eradiziert, sondern besiedeln im Folgenden dauerhaft die Epithelien der Lunge.

Nach Besiedlung der Lunge erfolgt dann in der Regel eine umfangreiche Adaption des Erregers an das dortige Habitat. Während die Bakterien zu Beginn der Infektion den typischen Phänotyp eines Umweltisolates zeigen unterliegen sie im Folgenden einer Umwandlung in den sogenannten mucoiden Phänotyp. Der Ausgangsphänotyp ist hierbei von hoher Beweglichkeit und verfügt über vollständige Lipopolysaccharidstrukturen. Der angepasste mucoiden Phänotyp hingegen zeigt nur noch eine stark eingeschränkte Motilität, produziert kein vollständiges Lipopolysaccharid mehr und sekretiert in der Regel nur noch reduzierte Mengen an Proteasen, Exotoxinen und Siderophoren. Die augenscheinlichste Veränderung des mucoiden Phänotyps aber ist die immens erhöhte Produktion des Exopolysaccharides Alginate. Mit diesem Alginate umgeben sich die Bakterien mit einer schleimigen Hülle. Beim Kultivieren dieses Phänotyps auf einem Festmedium lassen sich die schleimig glänzenden Kolonien deutlich von denen des Ausgangstyps unterscheiden, der eher raue Kolonien bildet.

Die aus Alginate bestehende Schleimhülle schützt die in der Lunge in Mikrokolonien wachsenden Bakterien wirkungsvoll vor dem Abwehrsystem des Patienten (Pier et al., 1990) und erschwert eine effektive Antibiotikatherapie beispielsweise mit Tobramycin durch die

resultierende Diffusionsbarriere (Hentzer et al., 2001). Eine *P. aeruginosa* - Lungeninfektion der chronischen Phase mit dem Auftreten des mucoiden Phänotyps lässt sich in der Regel nie wieder eradizieren.

Mucoide *P. aeruginosa* Phänotypen können im chronischen Infektionsstadium bei bis zu 90% der CF-Patienten nachgewiesen werden, während diese Anpassung bei *P. aeruginosa* - Infektionen anderer Art praktisch nicht auftritt (Govan und Deretic, 1996).

Da sich die *P. aeruginosa* - Bakterien bei einer vorliegenden Lungeninfektion nicht eradizieren lassen kommt es bei den CF-Patienten im Laufe des Infektionsverlaufes zu immer stärkeren Gewebsschädigungen in der Lunge, die schließlich die Lungenfunktion massiv reduzieren.

Diese Gewebeschäden haben zwei verschiedene Ursachen.

Eine Ursache ist die Tatsache, dass *P. aeruginosa* in der Lunge, wenn auch beim mucoiden Typ zum Teil in reduzierter Form, Virulenzfaktoren ausschüttet die teilweise das Gewebe angreifen. In diesem Zusammenhang wären hier an erster Stelle einige sekretorische Proteine zu nennen wie beispielsweise die Elastase und die alkalische Protease, die die interzellulären Verbindungen des Organs zur Auflösung bringen (Galloway, 1993), weiterhin das Exotoxin A, welches die Proteinsynthese des Wirtsorgans durch Modifizierung des eukaryontischen Elongationsfaktors EF2 verhindert, sowie das Exotoxin S (wie Exo A eine ADP-Ribosyltransferase), welches andere eukaryontische Proteine wie Zytoskelettproteine oder GTP-Bindeproteine inaktiviert (Coburn, 1992). Schließlich die Phospholipasen C (unter anderem hämolytische Wirkung), aber auch die Siderophore Pyocyanin und Pyochelin, welche unter anderem die Bildung von Hydroxylradikalen katalysieren und damit ebenfalls zur Gewebsschädigung beitragen.

Mindestens ebenso entscheidend für die entstehenden Gewebsschäden ist aber auch noch ein anderer Umstand. Die Anwesenheit der Bakterien in der Lunge führt nämlich zu einer chronischen Stimulation des Abwehrsystems. Neben einer hohen Konzentration an Antikörpern liegt in der Lunge damit auch eine hohe Dichte an Granulozyten und Makrophagen vor. Gehen diese Zellen zugrunde, so setzen sie enzymatische Zellbestandteile frei, die ebenfalls zytotoxisch sind und das Lungenepithel angreifen. Aufgrund der hohen Konzentration an phagozytierenden Zellen in der Lunge kommt es dadurch zu Gewebsschädigungen und Narbenbildung.

Mit dem routinemäßigen Einsatz von Antibiotika, insbesondere Aminoglycosiden und Polymyxinen, ist es heute möglich, die chronische Lungeninfektion der CF-Patienten über einen längeren Zeitraum in Grenzen zu halten. Mit dieser Behandlung kann der Krankheitsverlauf günstig beeinflusst und die Lungenfunktion über Jahre relativ stabil gehalten werden. Von einer Heilung der Krankheit oder einer Verhinderung bakterieller Infektionen kann aber heute noch nicht die Rede sein. Ansätze, Vakzinierungstherapien zu entwickeln, um die CF-Patienten gegen *P. aeruginosa* zu impfen und damit die Infektion zu verhindern oder zumindest abzuschwächen waren bisher nicht erfolgreich.

Die Lebenserwartung eines CF-Patienten beträgt heute etwa 30 bis 40 Jahre. Vor dem Einsatz der Antibiotikatherapien hingegen verstarb ein Großteil der Patienten noch im Kindesalter. Durch die heutige Möglichkeit der Lungentransplantation lässt sich die Lebenserwartung der CF-Patienten darüberhinaus noch einmal erhöhen.

2.3. 'Small Colony Variants'

Mit dem Begriff 'Small Colony Variants' (SCV's) werden im allgemeinen langsamwachsende Teilpopulationen von Bakterien bezeichnet, die bei der Kultivierung auf Festmedien eine weitaus geringere Koloniegröße aufweisen als normalwachsende Formen des selben Stammes. Derartige SCV's wurden bereits bei einigen pathogenen Bakterien beschrieben.

Das Interesse an den SCV's gilt aber weniger ihrer geringen Koloniegröße, das Auftreten kleinwüchsiger Kolonien ist schon seit langem bekannt (Wise, 1956; Zierdt und Schmidt, 1964), als vielmehr der Tatsache, dass dieser besondere Morphotyp mehrfach im Verlauf chronischer und persistierender Infektionen nachgewiesen wurde. Es liegt also die Vermutung nahe, dass es sich ähnlich wie bei dem oben beschriebenen Beispiel des mucoiden *P. aeruginosa* Phänotyps bei den SCV's um eine an die besondere Form der Infektion adaptierte Variante des pathogenen Stammes handeln könnte. Hinweise auf die mögliche Rolle der 'Small Colony Variants' bei der Persistenz von Infektionen wurden beispielsweise für *S. aureus* (Abele-Horn et al., 2000; Kahl et al., 1998; Proctor et al., 1994), *E. coli* (Roggenkamp et al., 1998) und auch für *P. aeruginosa* (Häußler et al., 1999 a) beschrieben. Die beschriebenen SCV's von *S. aureus* (Kahl et al., 1998) und *P. aeruginosa* (Häußler et al., 1999 a) sind hierbei von besonderem Interesse, weil es sich hierbei um SCV's handelte, welche im Rahmen einer chronischen Lungeninfektion von CF-Patienten auftraten.

Von der Annahme ausgehend, dass es sich bei den SCV's um einen an das bei einer Infektion herrschende umgebende Milieu adaptierten Phänotyp handelt der die Wahrscheinlichkeit einer persistierenden Infektion erhöht, ist eine weitere für mehrere pathogene Bakterien beschriebene Beobachtung von allergrößter klinischer Bedeutung: die gegenüber dem großwachsenden Phänotyp nochmals deutlich erhöhte Antibiotikaresistenz. Daten über resistente 'Small Colony Variants' liegen für *S. aureus* (Proctor et al., 1998), *B. pseudomallei* (Häußler et al., 1999 b) sowie für *P. aeruginosa* (Häußler et al., 1999 a) vor.

SCV's bei *P. aeruginosa*

Während der bereits erwähnte mucoide Morphotyp bei *P. aeruginosa* hinsichtlich der zu seiner Ausbildung führenden Mechanismen bereits sehr gut untersucht wurde (Martin et al., 1993) und als Standardbeispiel einer Adaption eines Erregers an die besondere Situation einer chronischen Infektion gilt, liegen über die 'Small Colony Variants' des Bakteriums bis heute vergleichsweise wenige Erkenntnisse vor.

Wenn man die Ausbildung adaptierter *P. aeruginosa* Morphotypen bei einer chronischen Infektion bewerten will, ist es von Bedeutung zu wissen, dass sich die bei Infektionen nachweisbaren Stämme keinesfalls als pathogene Untergruppe von den in der Umwelt lebenden *P. aeruginosa* Stämmen abgrenzen lassen. Vielmehr sind die pathogenen, in Infektionen gefundenen *P. aeruginosa* Stämme von den aus der Umwelt isolierten weder genetisch noch funktionell zu unterscheiden (Foght et al., 1996; Römling et al., 1994). Die opportunistischen Erreger müssen damit über eine beträchtliche Anpassungsfähigkeit an die verschiedensten Umweltmilieus verfügen. Es wird davon ausgegangen, dass das Habitat der Lunge eines CF-Patienten für die Erreger aufgrund der dortigen besonders problematischen Faktoren wie beispielsweise hohe Zelldichte, Notwendigkeit der Anheftung an Oberflächen, beschränkte Verfügbarkeit von Nährstoffen, microaerophile Bedingungen im Schleim und Bedrohung durch das Abwehrsystem des Wirtes, eine besondere Herausforderung darstellt, die zur Ausbildung an besondere Nischen adaptierter Morphotypen führt (Oliver et al., 2000).

Die Hypothese, dass die *P. aeruginosa* 'Small Colony Variants' einen dieser adaptierten Morphotypen darstellen der von besonderer Bedeutung bei der persistierenden Lungeninfektion von CF-Patienten ist, führte zu dem in dieser Arbeit durchgeführten Projekt der näheren Untersuchung dieser Variante.

Über die SCV's von *P. aeruginosa* bei zystisch fibrotischer Lungeninfektion ist bekannt, dass diese im fortgeschrittenen Infektionsverlauf regelmäßig aus dem Sputum der Patienten isoliert werden können. Im Rahmen einer Studie der Medizinischen Hochschule Hannover in den Jahren 1996 bis 1998 beispielsweise konnten bei 33 von insgesamt 86 getesteten, chronisch mit *P. aeruginosa* infizierten CF-Patienten *P. aeruginosa* SCV's isoliert werden (Häußler et al., 1999 a). Diese SCV's zeigten nach 48 stündiger Inkubation auf Müller-Hinton-Festmedien erst eine durchschnittliche Koloniegröße von 1-3 mm Durchmesser und wiesen bei insgesamt 12 getesteten in der Klinik gebräuchlichen Antibiotika eine erhöhte Resistenz auf (die minimale wachstumshemmende Konzentration war bei allen 12 getesteten Substanzen um den Faktor 2 bis 8 gegenüber dem großwachsenden Morphotyp erhöht). Von klinischer Bedeutung war außerdem die Erkenntnis, dass das Auftreten dieser SCV's mit einer verminderten Lungenfunktion korrelierte. Eine testweise Kultivierung der SCV's auf Minimalmedium ergab, dass es sich bei dieser langsamwachsenden Form nicht wie im Falle bestimmter *S. aureus* SCV's beschriebenen um Auxotrophiemutanten handeln konnte.

Von großem Interesse war bei den *P. aeruginosa* SCV's weiterhin die Beobachtung, dass bei Kultivierung der Bakterien *in vitro* mit teilweise sehr hoher Frequenz zum großwachsenden Morphotyp revertierte Bakterien isoliert werden konnten. Diese Revertanten zeigten allerdings, wenn auch großwachsend, eine dennoch gegenüber dem Ausgangsmorphotyp abweichende Koloniemorphologie (Abb. 2).

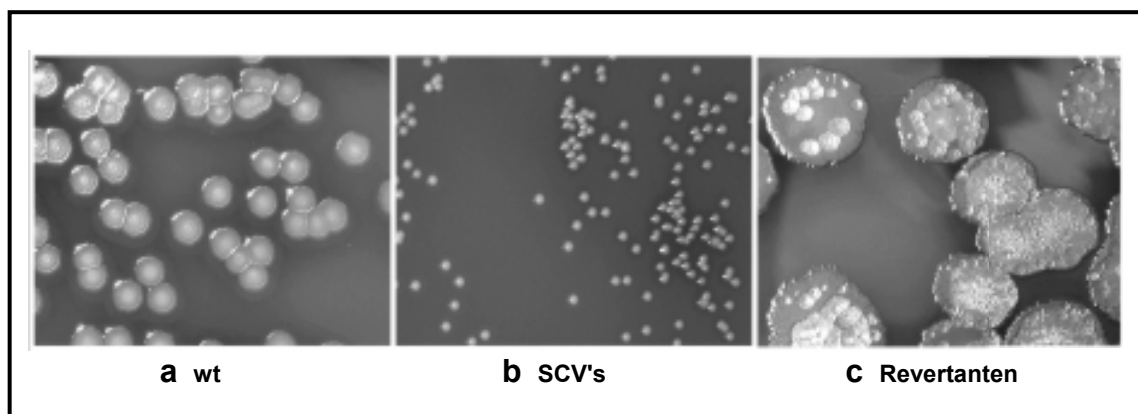


Abb. 2: Kolonien der unterschiedlichen Morphotypen des klinischen *P. aeruginosa* Stammes 20265. Die Abbildung zeigt Fotos der Kolonien auf Müller-Hinton Blutagar kultivierter *P. aeruginosa* Bakterien. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden bei 37°C. Zu sehen ist der Wildtyp (a), die 'Small Colony Variants' (b) und die *in vitro* isolierten Revertanten (c). Die abgebildeten Fotos sind untereinander maßstabsgerecht.

Wie am Beispiel des Stammes 20265 in der Abbildung zu erkennen ist, weisen die 'Small Colony Variants' eine gegenüber dem Wildtyp drastisch verminderte Koloniegröße auf. Die Revertanten hingegen zeigen ein großflächiges Wachstum mit flacher Koloniemorphologie.

Im Rahmen einer chronischen Infektion der Lunge eines CF-Patienten ist auf dem Lungenepithel kein gleichmäßig verteiltes Auftreten der *P. aeruginosa* Bakterien zu beobachten, sondern vielmehr das lokal geballte Wachstum in sogenannten Mikrokolonien (Lam et al., 1980). Diese Art des Wachstums wird auch mit dem Begriff Biofilm bezeichnet und stellt eine Verteidigungsstrategie gegen das Abwehrsystem des Patienten dar (Pier et al., 1990).

Der entscheidende initiiierende Schritt zum Aufbau eines solchen Biofilmes ist zunächst die Anheftung der Bakterien an die epitheliale Oberfläche, gefolgt von dem Aufbau weiterer Zellschichten. Im Falle nicht mucoider großwachsender Formen von *Pseudomonas aeruginosa* wurden für diesen Schritt die Pili als entscheidende Komponente beschrieben (Woods et al., 1980) indem sie als Adhäsine die Biofilmbildung initiieren (Hahn, 1997; Vallet et al., 2001). Aber auch die Flagellen scheinen hier eine wichtige Rolle zu spielen (Arora et al., 1998). *In vitro* wurde nachgewiesen, dass die Flagellen für den beim ersten Kontakt erfolgenden Anheftungsschritt ausschlaggebend sind und zu einem zellulären 'Monolayer' auf einer Oberfläche führen, die Pili aber für den weiteren Aufbau der Mikrokolonie unerlässlich sind (O' Toole und Kolter, 1998). Bei den mucoiden Morphotypen hingegen wird dieser wichtige Schritt der Anheftung an Epithelzellen von dem Exopolysaccharid Alginate übernommen, welches auch die entscheidende Rolle für den Aufbau und Zusammenhalt des Biofilms übernimmt (Ramphal und Pier, 1985; Davies et al., 1993; Hentzer et al., 2001).

Die SCV's zeigen keine Überexpression von Alginate und über die Fähigkeit dieses Morphotyps, Biofilme zu bilden, war bis vor kurzem noch nichts bekannt. Kürzlich wurde jedoch in zwei verschiedenen Untersuchungen beschrieben, dass die SCV's noch weitaus effektivere Biofilmbilder als die großwachsenden Morphotypen zu sein scheinen.

In einer auf Umweltisolate bezogenen Untersuchung wurde eine Korrelation des Auftretens von SCV's mit der Ausbildung von Biofilmen nachgewiesen (Déziel et al., 2001). Die SCV's wurden zudem als motilitätsdefizient beschrieben und zeigten eine derartige Tendenz zur Anheftung und Autoaggregation, dass es auch in Flüssigkulturen zur Ausbildung von Zellklumpen kam. Hinzu kam die Beobachtung einer starken Überexpression von

Pilusstrukturen, die als Erklärung für das starke Adhärenzverhalten der SCV's herangezogen wird.

Diese Erkenntnisse deckten sich weitestgehend mit den bei der Untersuchung der SCV's in unserem Labor beobachteten charakteristischen Eigenschaften dieses Morphotyps. Auch die SCV-Isolate aus der Lunge von CF-Patienten zeigten bei längerer Kultivierung in Flüssigmedium deutliche Klumpenbildung und Anheftung an Glasoberflächen der Kulturgefäße (Abb. 3). In diesem Zusammenhang konnte bei den autoaggregativen SCV's weiterhin elektronenmikroskopisch eine vermehrte Pilusbildung beobachtet sowie eine erhöhte Hydrophibizität der bakteriellen Oberfläche bestimmt werden. Bei vier von sechs getesteten Stämmen konnte außerdem eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Anheftungsrate an eine eukaryontische Zelllinie nachgewiesen werden (Häußler et al., 2002). Schließlich konnte in Kultivierungsexperimenten in gemeinsamen Flüssigkulturen von SCV's, Revertanten und Wildtyp eine erhöhte Fitness der SCV's in stationären Kulturen nachgewiesen werden. Bei einer Kultivierung über den Zeitraum von vier Tagen setzten sich die SCV's gegenüber den Revertanten und Wildtypformen durch, während diese hingegen in der exponentiellen Kulturphase einen Wachstumsvorteil aufwiesen. Die SCV's scheinen also einen Selektionsvorteil unter den Mangelbedingungen einer stationären Kultur zu haben.

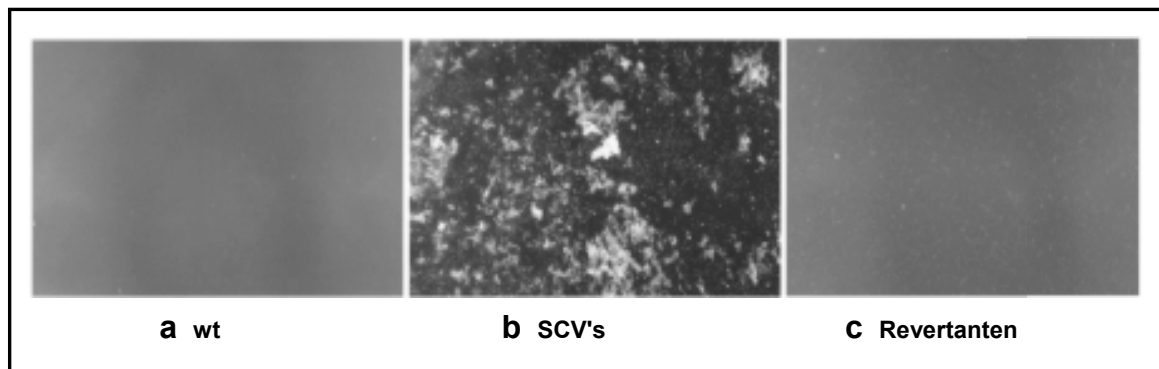


Abb. 3: Autoaggregation der SCV's bei Kultivierung in Flüssigmedium. Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* Flüssigkulturen. Die Kultivierung erfolgte in Vogel-Bonner Medium für 24 Stunden bei 37°C. Zu sehen ist der Wildtyp (a), die 'Small Colony Variants' (b) und die *in vitro* isolierten Revertanten (c). Die SCV's zeigen eine deutliche Klumpenbildung.

Die genannten Erkenntnisse über die SCV's der CF-Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* lassen die Hypothese zu, dass es sich um einen an Mangelbedingungen und Antibiotikadruck adaptierten Phänotyp handelt, der darüberhinaus außergewöhnliche Fähigkeiten zur Biofilmbildung zeigt. Mit diesen Eigenschaften sind die SCV's offensichtlich sehr gut an einen persistierenden chronischen Infektionsverlauf angepaßt.

2.4. Proteomanalyse

Unter dem Begriff Proteom versteht man die Gesamtheit aller von einem Genom exprimierten Proteine. Im Gegensatz zum Genom, welches die Gesamtheit aller Erbinformationen eines Organismus enthält, ist das Proteom nicht statischer Natur, sondern unterliegt zahlreichen verschiedenen Einflüssen.

Zu diesen Einflüssen zählen an erster Stelle die Regulationsmechanismen einer jeden Zelle, die über die Expression eines Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt und damit über die Bildung eines RNA-Transkriptes und schließlich über die Synthese eines Proteines entscheiden. Es ist nicht davon auszugehen, dass Zellen existieren, die zu einem Zeitpunkt alle vorhandenen Gene exprimieren. Aus diesem Grund liegt in jeder Zelle zu einem definierten Zeitpunkt immer nur ein Teil des Proteoms vor. Die Gesamtheit aller unter definierten Bedingungen zu einem Zeitpunkt exprimierten Proteine in einer Zelle oder einem Gewebe wird daher als Protein-Expressionsprofil bezeichnet und ist von dem Begriff Proteom abzugrenzen.

Die Proteomforschung, wie sie heute betrieben wird, wurde erst durch umfangreiche Erkenntnisse der Genomforschung im Rahmen der Genomsequenzierungsprojekte ermöglicht. Während die Genomforschung Informationen über die Anlagen und grundsätzlichen Fähigkeiten eines Organismus liefern kann, analysiert die Proteomforschung sozusagen die Gesamtheit der "Werkzeuge", die einem Organismus oder einem Gewebe unter bestimmten Umständen tatsächlich zur Verfügung stehen, man bezeichnet die Forschungsprojekte bei der diese beiden methodischen Felder Hand in Hand gehen daher auch als funktionelle Genomanalyse.

Im Rahmen der funktionellen Genomanalyse ist neben der Proteomforschung eine zweite relativ junge Forschungsrichtung zu nennen, die Transkriptomanalyse. Das Transkriptom stellt die Gesamtheit der von einer Zelle oder einem Gewebe exprimierten 'messenger-RNA's' dar und die Erforschung dieses Transkriptoms wurde ebenfalls erst durch die Daten der Genomforschung sowie die Entwicklung geeigneter Techniken ('RNA-Expressionsanalyse-arrays', bzw. 'DNA-arrays') in jüngerer Zeit ermöglicht. Die Erforschung des Transkriptoms durch 'DNA-arrays', auch als DNA-Chips bezeichnet, (Chee et al., 1996) einerseits und die Proteomanalyse andererseits ergänzen sich, liefern aber dennoch Ergebnisse eines unterschiedlichen Informationsgehaltes, so dass sie nicht direkt konkurrieren und keine dieser beiden Forschungsrichtungen in der Lage ist, die andere zu ersetzen.

Sowohl Transkriptom- als auch Proteomanalyse weisen entscheidende Vorteile, aber auch Nachteile gegenüber dem jeweiligen anderen Forschungsansatz auf.

Ein unbestrittener Vorteil der Transkriptomanalyse ist die, sofern erst einmal ein geeigneter Chip etabliert wurde, überragend schnelle und simple Identifizierung aller zum Zeitpunkt der Probenentnahme transkribierten Gene. Die RNA-Expressionsanalyse mit Hilfe eines solchen Chips ist relativ schnell durchzuführen und eine Identifizierung der entsprechenden Gene erfordert dann keinerlei weitere Analysen mehr, weil jede DNA-Sonde auf dem Chip über eine definierte Position verfügt und damit eine direkte Zuordnung des bei einer Hybridisierung der Probe erhaltenen Signals zu dem entsprechenden Gen erfolgen kann. Mit einem einzigen Experiment läßt sich damit bereits ein Aussage über die Expression aller Gene treffen, deren Untersuchung der Chip durch die entsprechenden vorhandenen Oligonukleotide erlaubt. Bei der Proteomanalyse hingegen muß jedes einzelne Protein zunächst massenspektrometrisch analysiert und mit den gewonnenen Daten identifiziert werden. Einen weiteren entscheidenden Vorteil der Transkriptomanalyse gegenüber der Proteomanalyse stellt die apparative Zugänglichkeit aller Transkripte dar. In der Proteomanalyse, deren mit Abstand wichtigste Untersuchungsmethode heute die zweidimensionale Proteingelelektrophorese ist, kann dagegen ein gewisser Anteil der Proteine bis heute der Untersuchung nicht zugänglich gemacht werden. Ein Grund hierfür ist die hohe Hydrophobizität zahlreicher Proteine. Unter den bis heute entwickelten methodischen Bedingungen der 2D-Gelelektrophorese kann ein Teil des Proteoms bisher nicht geeignet für eine Untersuchung solubilisiert werden und ist der Proteomanalyse somit nicht zugänglich. Ähnliches gilt für diejenigen Proteine, deren Kopienzahl in der Zelle so gering ist, dass sie in der Proteomforschung nicht nachgewiesen werden können. Im

Gegensatz zur Untersuchung von Nukleinsäuren, wo dies leicht möglich ist, existiert für Proteine bis heute keine Amplifikationstechnik, die die Analyse von Proteinen erlauben würde deren vorliegende Menge für eine direkte Untersuchung zu gering ist.

Trotz der genannten Nachteile der Proteomanalyse gegenüber der Transkriptomanalyse bleibt die Erforschung des Proteoms zum Verständnis der Vorgänge in der Zelle unverzichtbar, weil nur die Proteomanalyse das Verständnis zahlreicher Vorgänge ermöglicht. Das Transkriptom kann hier trotz seiner guten methodischen Zugänglichkeit stets nur indirekte Daten liefern.

Eine Transkriptionsanalyse nämlich zeigt zwar Regulationen und Regulons auf, kann auch beim Vergleich verschiedener Zellen, Gewebe oder Organismen Expressionsunterschiede untersuchen und die Auswirkung äußerer Einflüsse auf die Expression des Genoms erklären, eine genaue Antwort auf die der Zelle zur Verfügung stehenden Werkzeuge, die Proteine, kann sie aber strenggenommen nicht geben.

Auch wenn dies meistens so ist, so muß nämlich die Transkriptmenge nicht zwangsläufig mit der Menge des vorliegenden Proteins korrelieren.

Die heutigen Erkenntnisse über Proteinexpression haben beispielsweise zur Aufklärung einer ständig wachsenden Anzahl postranskriptioneller Regulationsmechanismen geführt, deren Auswirkung die Transkriptionsanalyse nicht erfassen kann.

Derartig kontrollierte Transkripte werden häufig aufgrund der Ausbildung von Sekundärstrukturen im Normalfall gar nicht translatiert. Erst im Falle einer Aufhebung der Sekundärstrukturen durch aktivierende Proteine kann es zu einer Translation kommen, wie beispielsweise bei den Kälteschockproteinen der CspA-Familie aus *E. coli* (Nogueira und Springer, 2000).

Ein anderer untersuchter translationaler Regulationsmechanismus ist die spezifische Bindung von Repressorproteinen an mRNAs, welche die Initiation der Translation verhindern. Auch Faktoren, welche die Translation während der Elongationsphase unterbrechen, wurden bereits beschrieben (MacDonald, 2001).

Im Falle von *Pseudomonas aeruginosa* beispielsweise wurde schon vor längerer Zeit durch vergleichende Analysen zwischen LacZ-Fusionsproteinen und Transkriptlevel die translationelle Regulation der Gene *algC* (Phosphomannomutase) (Fujiwara und Chakrabarty, 1994) und *lasB* (Elastase) indirekt beobachtet. Im Falle der Elastase ist diese Translationskontrolle eisenreguliert (Brumlik und Storey, 1992).

Im Vergleich zu den Kenntnissen über regulative Vorgänge bei der Transkription sind die Kenntnisse über Regulationsvorgänge auf Translationsebene aber noch relativ gering.

Eine weitere Tatsache, die die in der Zelle vorhandene Menge einzelner Proteine beeinflusst und die durch das Transkriptom nicht abgebildet wird ist die zum Teil erheblich unterschiedliche Stabilität der verschiedenen Proteine, beziehungsweise eventuelle gezielte Abbauvorgänge von Proteinen. Proteine können auch bei niedrigem Transkriptlevel in vergleichsweise hoher Kopienzahl vorliegen, wenn sie sehr stabil sind. Es kommen aber auch Enzyme vor, die vergleichsweise geringe Halbwertszeiten aufweisen und daher bei Bedarf der Neusynthese bedürfen.

Von großer Bedeutung ist weiterhin die Tatsache, dass von jedem Gen zunächst nur eine definierte mRNA gebildet wird, am Ende der Proteinsynthese aber mehrere verschiedene Genprodukte stehen können..

Die ehemals formulierte 'ein Gen - ein Protein' - Hypothese kann heute so nicht mehr aufrechterhalten werden.

In Eukaryonten beispielsweise kann ein und dieselbe prä-mRNA durch alternatives 'Splicing' in mehrere verschiedene mRNAs überführt werden. Diese verschiedenen mRNAs werden von den Oligonukleotidsonden der DNA-Chips in der Regel nicht differenziert. Durch das alternative 'Splicing' kann ein Gen mehrere verwandte aber verschiedene Proteine kodieren.

Nicht nur bei Eukaryonten sondern auch im bakteriellen Bereich kommen zudem eine Vielzahl ko- und posttranslationaler Modifizierungen und Prozessierungen vor. Zur Bezeichnung der verschiedenen möglichen Genprodukte verwendet man hier auch den Begriff Protein-Spezies.

Der sequenzierte Organismus *E. coli* beispielsweise verfügt über 4285 annotierte Gene aber über geschätzte 1,3 Genprodukte pro Gen (Gooley und Packer, 1997). Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* schätzt man etwa drei Genprodukte pro Gen und bei Säugetieren geht man gar von durchschnittlich etwa zehn möglichen Genprodukten pro Gen aus. In der Proteomanalyse ist es im Gegensatz zum transkriptionellen Ansatz nicht nur möglich, diese verschiedenen Proteinspezies zu diskriminieren, es kann auch eine genaue Analyse der Art der vorliegenden Modifikation durchgeführt werden und Aussagen über die Menge des modifiziert vorliegenden Anteils eines Proteins getroffen werden.

Schließlich ist es bei der Proteomanalyse auch noch möglich, durch Fraktionierung der untersuchten Extrakte die Lokalisation von Proteinen in bestimmten Zellkompartimenten zu ergründen. Ebenfalls eine Information, die sich anhand von reinen Nukleinsäuresequenzen nur in einigen Fällen aufgrund von detektierten Signalpeptiden oder Transmembrandomänen gewinnen läßt.

Seit der Überwindung des Meilensteines der erstmaligen kompletten Sequenzierung der Erbinformation eines selbständig lebensfähigen Organismus (*Haemophilus influenzae*) im Jahre 1995 (Fleischmann et al., 1995) mit einer Genomgröße von 1830 kbp ist die Entwicklung auf diesem Gebiet rasant vorangegangen. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bereits 80 Sequenzierungsprojekte mikrobieller Genome abgeschlossen und weitere 123 mikrobielle Genome werden derzeit sequenziert. Die bei diesen Projekten gewonnenen Daten machen die heutigen Proteom- und Transkriptomanalysen erst möglich.

Nur mit Hilfe kompletter Genomsequenzinformationen können Proteine durch rasche massenspektrometrische Methoden wie den MALDI/TOF-Fingerprint identifiziert werden.

Die Methode der denaturierenden zweidimensionalen Proteingelelektrophorese ist heute in der Proteomforschung die Methode der Wahl. Seit ihrer erstmaligen Beschreibung im Jahre 1975 (O' Farrel, 1975) hat sie zahlreiche Weiterentwicklungen und Verbesserungen erfahren. Insbesondere die Entwicklung der immobilisierten pH-Gradienten (Bjellqvist et al., 1982) hat gegenüber den zuvor eingesetzten Trägerampholyten zu entscheidenden Verbesserungen der Reproduzierbarkeit der Gele geführt (Görg et al., 1991; Blomberg et al., 1995).

Dennoch stößt die Proteomforschung permanent auch an die Beschränkungen dieser Methode. Zwar wurden die zur Auftrennung zur Verfügung stehenden pH-Bereiche erweitert und die Möglichkeiten der Proteinsolubilisierung immer weiter optimiert, doch die Probleme der Unzugänglichkeit sehr hydrophober sowie in geringer Kopienzahl in der Zelle vorhandener Proteine konnten bisher nicht zufriedenstellend gelöst werden (Wilkins et al., 1998). Trotzdem ist die Proteomanalyse unter Verwendung dieser Methode heute in der Lage, eine Vielzahl von funktionellen Fragen bei der Untersuchung biologischen Materials zu beantworten und fundierte Expressionsdaten für die überwiegende Mehrheit aller in einem Organismus synthetisierten Proteine zu liefern.

Zudem ist absehbar, dass die Proteomforschung mit der 2D-Elektrophorese nicht am Endpunkt der Entwicklung angekommen ist. Neu entwickelte Methoden wie beispielsweise

die sogenannte ICAT-Analyse ('isotope-coded affinity tag peptide labelling') (Gygi et al., 1999) haben gute Aussichten, die Proteomanalyse in Zukunft in vielen Laboren durch gelfreie Untersuchungsverfahren zu ergänzen und die Grenzen der derzeitigen Analytik entscheidend auszudehnen (Haynes und Yates, 2000).

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Der Gegenstand dieser Arbeit war die nähere Untersuchung der aus der Lunge von CF-Patienten isolierten 'Small colony Variants' des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*.

Über diesen speziellen Morphotyp lagen zu Beginn der Arbeit Daten über das Auftreten bei den chronisch infizierten Patienten, die erhöhte Antibiotikaresistenz, die Korrelation des Auftretens beim Patienten mit verschlechterter Lungenfunktion und über die Fähigkeit zur Reversion zum großwachsenden Phänotyp vor. Weiterhin konnten die oben genannten Erkenntnisse bezüglich der verstärkten Biofilmbildung der SCV's gewonnen werden, es lagen zu Beginn der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen jedoch keinerlei biochemische oder molekularbiologische Daten über den zu untersuchenden Morphotyp vor.

Es wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass es sich bei den SCV's um einen an das Habitat der CF-Lunge besonders adaptierten Phänotyp handelt, der möglicherweise entscheidend zur Persistenz der Infektion beiträgt.

Aufgrund des bei Arbeitsbeginn absehbaren Abschlusses des *P. aeruginosa* Genomsequenzierungsprojektes sollte der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die vergleichende Proteomanalyse gelegt werden. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese sollten die drei vorhandenen Morphotypen Wildtyp, SCV's und Revertanten verschiedener Patientenisolatate vergleichend untersucht werden um durch Analyse der jeweiligen Proteinexpressionsprofile erste Hinweise auf grundlegende Unterschiede der Morphotypen auf molekularer Ebene zu gewinnen. Bei der vergleichenden Analyse sollten die eingesetzten Methoden angepasst werden um einen möglichst großen Anteil der exprimierten Proteine der Untersuchung zugänglich zu machen.

Beim Nachweis morphotypisch spezifisch differentiell exprimierter Proteine sollten diese identifiziert werden um mögliche Hinweise auf das zu Grunde liegende Prinzip des

Adaptationsvorganges zu gewinnen. Beim Vorliegen solcher Hinweise sollte diesen gegebenenfalls durch Untersuchung der Expression der betreffenden Proteine unter veränderten Bedingungen näher nachgegangen werden.

Neben der Aufklärung der Veränderung des Proteinexpressionsprofils beim Übergang vom Wildtyp zum SCV sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob sich Revertanten und Wildtyp hinsichtlich ihres Proteinexpressionsprofils unterscheiden. Es bestand die Frage, ob die beobachtete Reversion nur die Wachstumsgröße betrifft, oder ob sie relativ vollständig verlief und auch das Proteinexpressionsprofil reverterte.

Weiterhin sollte in ergänzenden Experimenten die Möglichkeit der Identifizierung immunogener bakterieller Proteine im Rahmen einer Lungeninfektion eines CF-Patienten durch *Pseudomonas aeruginosa* getestet werden und solche Proteine nach Möglichkeit identifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Bezugsquellen

3.1.1. Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Immobiline-Lösungen, IPG-buffer, plusone ReadySol-IEF (Acrylamid-Bisacryl- amidlösung, T=40%); Repel-Silan (Dimethyldi- chlorsilan; Trägerampholyte (Pharmalyte)
Baker (Phillipsburg, USA)	Harnstoff (ultrarein)
Biomol (Hamburg)	DTT; CHAPS; Leupeptin; Pefablock
Bio-Rad (München)	Trägerampholyte (Bio-Lyte); Bio-Rad Protein Assay
Bruker Daltronik (Bremen)	α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
Fluka (Deisenhofen)	Acrylamido-Puffer; Tributylphosphin
Merck (Darmstadt)	Iodacetamid
Molecular Probes (Leiden, Niederlande)	SYPRO Ruby Protein Gel Stain
Roche Diagnostics (Mannheim)	Lumi-Light Chemolumineszenzsubstrat
Roth (Karlsruhe)	RBS 30 (Reinigungsmittel); Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid / Bis-acrylamidlösung, T=40%); SDS; Silikonöl M 100
Serva (Heidelberg)	Coomassie Brilliant Blue G-250; Coomassie Brilliant Blue R-250
Sigma (Deisenhofen)	ASB 14; BSA (Fraktion V); FAST RED TR/Naphtol- Reagenz
Sinus (Heidelberg)	Trägerampholyte (Sinulyte)

Alle nicht aufgeführten Standardchemikalien und Lösungsmittel wurden in der Reinheitsstufe *pro analysi* von einer der folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg); Baker (Phillipsburg, NY, USA); Fluka (Deisenhofen); Merck (Darmstadt); Riedel de Haën (Seelze); Roth (Karlsruhe); Serva (Heidelberg); Sigma (Deisenhofen)

3.1.2. Enzyme

Benzonase (Endonuklease)	Merck (Darmstadt)
Proteinase K (aus <i>Tritirachium album</i>)	Sigma (Deisenhofen)
Trypsin (porcine, sequencing grade, modified)	Promega (Mannheim)

3.1.3. Bakterienstämme

- *P. aeruginosa* PAO1

B. Holloway, 1955

- *P. aeruginosa* Patientenisolat

Bei sämtlichen untersuchten klinischen *P. aeruginosa* - Kulturen handelte es sich um Stämme, welche aus dem Respirationstrakt chronisch infizierter CF-Patienten der Medizinischen Hochschule Hannover isoliert wurden. Die 'Small-Colony Variants' sowie die Revertanten dieser verwendeten Stämme wurden überwiegend bereits hinsichtlich Zellmorphologie und Resistenzprofil näher untersucht (Häußler et al., 1999 a).

Zum Teil wurden weitere Isolate zur Untersuchung herangezogen, insbesondere die mit den oben genannten Morphotypen klonal identischen Wildtypisolate aus den selben Patienten. Die Identifizierung der Spezies *P. aeruginosa* erfolgte in diesen Fällen sowohl durch Beurteilung der Kolonie-Morphologie, Fähigkeit zum Wachstum bei 42°C und Produktion charakteristischer Pigmente bei Kultivierung auf Columbia-Blutagar Festmedien und McConkey Festmedien als auch durch physiologisch-biochemische Identifizierung mittels Bestimmung des Metabolismusprofils im APILAB-System (API 20 NE, bioMérieux). Die Überprüfung der klonalen Identität verschiedener *P. aeruginosa* Isolate der selben Patienten erfolgte über Genotypisierung mittels des genomischen SpeI Restriktionsfragmentmusters in der Pulsfeld-Gelelektrophorese.

3.1.4. Geräte

API _{LAB} -System API 20 NE	bioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich)
CCD-Kamera LAS-1000 und Intelligent Dark Box	Fujifilm (Vertrieb: raytest, Straubenhardt)
Electrophoresis Power Supply EPS 600 / EPS 3500 XL	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Flachbettscanner Powerlook III	Umax Systems (Willich)
Geltrockner Easy Breeze	Hofer (Amersham Pharmacia Biotech)
IPGphor Fokussierungssystem	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Iso-Dalt Elektrophoresesystem	Hofer (Amersham Pharmacia Biotech)
MALDI-TOF-MS Bruker-Reflex	Bruker Daltronik (Bremen)
Milli Q Wasserreinigungssystem	Millipore (Eschborn)
Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckmann (Gladenbach)
PhastSystem Elektrophoresekammer und PhastSystem Development Unit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Photometer Spectronic 20 Genesys	Spectronic Instruments (Leeds, Großbritannien)
Proteinsequenzierer Procise 494 A	Applied Biosystems (Langen)
Quadrupol-MS QTOF II	Micro-mass
SpectraMax 250 Mikrotiter-Photometer	MWG-Biotech (Ebersberg)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (München)
Ultraschall-Desintegrator 'Sonifier 250'	Branson Ultrasonics (Danbury, Conn., USA)

3.1.5. Computerprogramme

AIDA-advanced image data analyser 2.1	raytest Isotopenmeßgeräte GmbH (Straubenhardt)
Bruker Data Analysis for TOF 1.6g	Bruker Daltronik (Bremen)
Doctor pH	Hofer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
GPMW 4.2	Lighthouse Data (Odense, Dänemark)
Image Reader LAS-1000	Fujifilm (Vertrieb: raytest, Straubenhardt)
Knexus /MS 2000.11.2	ProteoMetrics (Winnipeg, Manitoba, Kanada)
MassLynx 4.0	Micromass (Manchester, Groß-Britannien)
Phoretix 2D	Nonlinear Dynamics (Newcastle upon Tyne, UK)
Protein Prospector v.3.4.1	University of California San Francisco - Mass Spectrometry Facility (San Francisco, USA)

SOFTmax Pro	Molecular Devices (München)
Sonar	ProteoMetrics (Winnipeg, Manitoba, Kanada)
Z3 Version 2.0	Compugen (Tel Aviv, Israel)

3.1.6. Datenbanken

Gen- und Proteinsequenzen, Annotierungsdaten

- Datenbank des *P. aeruginosa* Genomprojektes
http://pseudomonas.com/current_annotation.html
- *P. aeruginosa* Genomdatenbank der University of Queensland
<http://pseudomonas.bit.uq.edu.au/>
- Entrez NCBI
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/index.html>
- NCBI *P. aeruginosa* complete genome
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/framk?db=Genome&gi=163>
- "SWISS-PROT (Protein knowledgebase)" und "TrEMBL (Computer-annotated supplement to SWISS-PROT)"
<http://us.expasy.org/sprot/>

Datenbankabfragen unter Verwendung von Sequenz- und MS-Daten

BLASTP-Homologiesuche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
PeptIdent	http://us.expasy.org/tools/peptident.html
ProteinProspector	http://prospector.ucsf.edu/
Knexus	Zugriff auf NCBI-Datenbanken über http://www.proteometrics.com
Sonar ms/ms	Zugriff auf NCBI-Datenbanken über http://www.proteometrics.com

3.1.7. Medien und Standardpuffer

Als Lösungsmittel diente bei allen nachfolgenden Lösungen soweit nicht anders angegeben $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$ (milliQ).

Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook et al., 2001)

10 g Bacto-Trypton $\cdot \text{l}^{-1}$

10 g NaCl $\cdot \text{l}^{-1}$

5 g Hefeextrakt $\cdot \text{l}^{-1}$

Nach Lösen der Substanzen in H_2O wurde das Medium mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden 1,5% Agar zugesetzt.

Vogel-Bonner-Medium (modifiziert nach Vogel et al., 1956)

3,3 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

10 mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$

28 mM $\text{NaNH}_5\text{PO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$

37 mM K_2HPO_4

Die Substanzen wurden in 600ml H_2O gelöst. Die Lösung wurde mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und anschließend autoklaviert. Als Kohlenstoffquelle wurden 50,13g Kalium-D-gluconat ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{KO}_7$) in 200ml H_2O gelöst, die Lösung sterilfiltriert und die beiden Lösungen vereinigt. Anschließend wurde das Medium mit sterilem H_2O auf ein Volumen von 1000ml aufgefüllt.

TBS

20 mM Tris-Base

137 mM NaCl

Mit HCl einzustellen auf pH = 7,6

TBS-T

TBS mit Zusatz von 0,2% Tween 20

3.1.8. Antikörper und Seren

Antikörper

- Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc_γ Fragment Specific
- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgA + IgG + IgM (H+L)

Beide: Jackson ImmunoResearch (Vertrieb: dianova, Hamburg)

Seren

Alle verwendeten Humanseren stammten von an zystischer Fibrose erkrankten Patienten der Medizinischen Hochschule Hannover und wurden innerhalb der letzten zehn Jahre in unterschiedlichen Stadien des Infektionsverlaufes entnommen.

3.1.9. Sonstige Materialien

Biomax Light Film	Kodak (Stuttgart)
Cellophane sheets 33x38 cm	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Chelex 100 molecular biology grade	Bio-Rad (München)
GelBond-PAG-Film (FMC Bioproducts)	Vertrieb durch Biozym (Hess.Oldendorf)
Immobiline DryStrips	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
LMW Molekulargewichtsstandard (MW 14,4 – 94 kDa)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
PVDF-Membran (Roti-PVDF)	Roth (Karlsruhe)
ReadyStrip IPG Strips	Bio-Rad (München)
SERDOLIT MB-1 Ionenaustauscher	Serva (Heidelberg)
ZipTip _{C18} , ZipTip _{μC18}	Millipore (Eschborn)

3.2. Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1. Standardkultivierung

Die Kultivierung der *P. aeruginosa* Stämme zur Herstellung von Proteinextrakten erfolgte überwiegend in Vogel-Boner-Minimalmedium, aber auch in LB-Komplexmedium und auf LB-Festmedien. Für die Herstellung von Festmedien wurde dem Flüssigmedium 1,5% Agar zugesetzt, woraufhin dieses autoklaviert und, auf etwa 50°C abgekühlt, in Kunststoff-Petrischalen gegossen wurde.

Zur Präparation von Proteinextrakten wurden stets zunächst 5 ml-Vorkulturen direkt aus einer tiefgefrorenen Stammkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Zur Herstellung von Extrakten aus Flüssigkulturen wurden dann 200 oder 400 ml Vogel-Bonner- bzw. LB-Medium in 1000 bzw. 2000 ml Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:1000 mit der Vorkultur inokuliert und bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte bei 37°C mit 200 rpm in einem Inkubator geschwenkt. Die Kontrolle des Wachstums erfolgte hierbei durch Bestimmung der optischen Dichte der Kultur bei $\lambda = 600$ nm im Photometer. Sollten Extrakte von auf Festmedien gewachsenen Bakterien präpariert werden, so wurde die Vorkultur mit Flüssigmedium im Verhältnis 1:1000 verdünnt und hiervon je 50 μ l auf mehrere Agar-Festmedien ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C wurden die Bakterienkolonien beim Erreichen der gewünschten Koloniegröße mit PBS unter Verwendung eines Zellschabers von den Festmedien abgewaschen. Von allen zur Herstellung von Proteinextrakten verwendeten Kulturen wurden zum Zeitpunkt der Kulturente stets Kontrollausstriche auf LB-Festmedien durchgeführt, um das Vorliegen des entsprechenden Phänotyps zu verifizieren und Kontaminationen auszuschließen.

Für die Dauerkonservierung von *P. aeruginosa* - Stämmen wurden diese in Flüssigkulturen bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen mit 0,2 Vol sterilem Glycerin durchmischt, zu je 1,5 ml in sterile Cryoröhrchen aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.2.2. Supplementierung und Depletion der Standardmedien

In der vorliegenden Arbeit wurden weiterhin Einflüsse verschiedener Spurenelemente, insbesondere Eisen, auf wachsende Kulturen der betrachteten *P. aeruginosa* Stämme untersucht. Um den Einfluss der Verfügbarkeit solcher Substanzen auf das Proteinexpressionsmuster der Bakterien zu analysieren, wurde das oben beschriebene Minimalmedium (VB-Medium) in verschiedenen Experimenten vor der Kultivierung von enthaltenen Verunreinigungen gesäubert. In weiteren Experimenten wurden verschiedene Spurenelemente demselben Medium in definierter Menge zugesetzt.

Zur Aufreinigung des Mediums wurde das Ionenaustauschmaterial Chelex 100 (molecular biology grade, Bio-Rad) eingesetzt, mit welchem Kulturmedien von metallischen Kationen befreit werden können um den Einfluss dieser Substanzen auf kultivierte Organismen zu untersuchen (Niven et al., 1999).

Das verwendete Vogel-Bonner-Medium wurde zu diesem Zweck in einem Erlenmeyerkolben mit Chelex 100 in der hydrogenierten Form ($2\text{g} \cdot 100\text{ ml}^{-1}$) versetzt und mindestens zwei Stunden geschwenkt. Hierbei wurde steril gearbeitet, um spätere Kontaminationen durch Sterilfilter auszuschließen. Anschließend wurde das Gemisch für einige Minuten ruhiggestellt und das Medium dekantiert. Die hierbei und in allen weiteren Schritten verwendeten Glasgefäße wurden zuvor 4 Stunden mit verdünnter Salpetersäure von Metallionen gereinigt und mit Milli Q H_2O nachgespült (nach Cox, 1994).

Die Supplementierung der Kulturen erfolgte in einigen Experimenten mit zwei- und dreiwertigen Eisenionen (Endkonzentration $10\ \mu\text{M FeSO}_4$ und $30\ \mu\text{M Eisenzitat}$).

In weiteren Experimenten wurde außerdem zusätzlich eine Spurenelementlösung (modifiziert nach Neidhardt et al., 1974) verwendet. Diese Lösung ($4\ \text{mM H}_3\text{BO}_3$, $5\ \text{mM CaCl}_2$, $0,3\ \text{mM CoCl}_2$, $0,1\ \text{mM CuSO}_4$, $0,8\ \text{mM MnCl}_2$, $0,1\ \text{mM ZnSO}_4$) wurde dem fertigen Medium vor der Kultivierung im Verhältnis 1:10.000 zugegeben.

3.3. Herstellung von Proteinextrakten für die zweidimensionale Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinextrakte verschiedener *P. aeruginosa* Stämme hergestellt und die Proteinexpressionsprofile der verschiedenen klinisch zu beobachtenden Morphotypen elektrophoretisch analysiert. Mit dem Ziel, eine möglichst hohe Anzahl von Genprodukten zu erfassen, wurden diese Untersuchungen sowohl bei unterschiedlichen Kulturbedingungen und Kultivierungszeiten als auch unter Verwendung von verschiedenen Proteinfractionen durchgeführt. Während sich zytosolische Proteine in der zweidimensionalen Elektrophorese in der Regel unter Verwendung herkömmlicher Gesamtzellextrakte gut darstellen lassen, wurden zur Untersuchung von sekretorischen Proteinen sowie von Proteinen der Zelloberfläche sogenannte Kulturüberstandsextrakte von in Minimalmedium gewachsenen Bakterien eingesetzt. Weiterhin wurden Gesamtproteinextrakte mit dem Ziel der Anreicherung hydrophober Proteine fraktioniert um schlechter zugängliche Membranproteine ebenfalls in der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersuchen zu können. Darüberhinaus wurden besonders hydrophobe Proteinfractionen in der klassischen SDS-PAGE analysiert.

3.3.1. Gesamtzellextrakte

Die Herstellung sogenannter Gesamtzellextrakte hatte zum Ziel, einen möglichst großen Anteil der intrazellulär und membrangebunden vorliegenden Proteine in einem mit der zweidimensionalen Elektrophorese kompatiblen Puffersystem in hinreichend hoher Proteinkonzentration in Lösung zu bringen und hierbei nach Möglichkeit störende Substanzen wie beispielsweise Nukleinsäuren und Lipide zu entfernen.

Die zu untersuchenden Bakterien wurden zu diesem Zweck zunächst niederzentrifugiert (10min, 4°C, 5000 rpm, Beckmann JA-10 Rotor) und der Zellschlag zur Entfernung störender extrazellulärer Substanzen wie beispielsweise Salze und metabolische Endprodukte zweimalig in Phosphatpuffer (10 mM, pH=7,5) gewaschen.

Für die Zellyse wurde im Folgenden ein modifizierter Solubilisierungspuffer verwendet, welcher im wesentlichen auf den Rezepten von Görg et al. (2000) unter Verwendung zugesetzten Thioharnstoffes (Rabilloud et al., 1997; Rabilloud, 1998) beruhte. Dieser Puffer

ist identisch mit dem für die isoelektrische Fokussierung verwendeten Proben- und Rehydrierungspuffer und sollte bereits im Schritt der Zellyse eine optimale Solubilisierung möglichst vieler Proteine ermöglichen (Rabilloud, 1999).

Solubilisierungspuffer für die isoelektrische Fokussierung im IPG-System

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
DTT	30 mM
Tris-Base	5 mM
Pefablock SC	1 mM
Leupeptin	2 μ M
CHAPS	4 % w/v
Ampholyte pH 3-10	0,5 % v/v

Bei der Herstellung des Solubilisierungspuffers wurde zunächst eine 9 molare Harnstofflösung für 10 Minuten mit SERDOLIT MB-1 (Serva) behandelt und danach filtriert, um ionische Verunreinigungen des Harnstoffes zu entfernen. Anschließend wurden die übrigen Komponenten sukzessive in Lösung gebracht. Der Puffer wurde entweder direkt verwendet oder aliquotiert bei -20°C gelagert und nur einmal aufgetaut. Erwärmungen des Puffers über 25°C wurden vermieden, da durch verstärkte Zersetzung des Harnstoffes unter diesen Bedingungen während der isoelektrischen Fokussierung durch Carbamoylierung von Aminosäureresten Artefakte hervorgerufen werden können. Die Zugabe von Tris-Base zum Solubilisierungspuffer diente der Erhöhung des pH-Wertes, da unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart multivalenter Ionen (wie den verwendeten Trägerampholyten) eine Kondensation von DNA gefördert wird (Bloomfield, 1997) wodurch der während der isoelektrischen Fokussierung störende Einfluss der DNA verringert werden kann (Anderson, 1991). Eine Erhöhung des pH-Wertes führt hierbei weiterhin dazu, daß sich Proteinmoleküle generell als Anionen verhalten und somit nicht in die kondensierten Komplexe eingebunden werden (Rabilloud, 1996). Aufgrund dieser Tatsache lassen sich die DNA-Ampholyt-Komplexe ohne Verlust von Proteinen durch Ultrazentrifugation abtrennen und somit die störenden Einflüsse von DNA auf die isoelektrische Fokussierung verhindern.

Die Bakterien wurden in einem geeigneten Volumen Solubilisierungspuffer (2-10 ml) aufgenommen und anschließend durch Ultraschall, unterstützt durch die denaturierende

Eigenschaft des Puffers, lysiert. Hierzu wurde die Probe in ein Glasröhrchen überführt und, auf Eis gekühlt, mittels eines Branson Sonifiers 250 mit einem Spitzendurchmesser von 4 mm beschallt. Der Ultraschallaufschluß erfolgte bei einer Begrenzung von Leistungsabgabe und Pulsdauer auf jeweils 50% für dreimal 45 s, wobei zwischen den Beschallungen einminütige Pausen eingelegt wurden um eine zu starke Erwärmung der Probe zu verhindern. Nach mikroskopischer Kontrolle des Zellaufschlusses wurden die Zelltrümmer 20 Minuten bei 4000 g und 15°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend erneut für 45 Minuten bei 50.000 g und 15°C in einer Beckmann Mini-Ultrazentrifuge zentrifugiert um störende Membranbestandteile und andere unlösliche Substanzen zu entfernen. Im Folgenden wurde die Proteinkonzentration des erhaltenen Überstandes bestimmt und die Probe konnte dann direkt für die 2D-GE eingesetzt werden. Nicht sofort benötigte Proben wurden bei -70°C gelagert.

3.3.2. Proteinextrakte der Kulturüberstände

Für die Herstellung von Proben zur Untersuchung der in den Kulturüberständen, also extrazellulär, vorhandenen Proteinen wurde zur Vermeidung von Kontaminationen der Extrakte mit Medienbestandteilen zur Kultivierung stets Minimalmedium verwendet.

200-400 ml einer derartigen Kultur wurden bei Erreichen der gewünschten Zelldichte schonend zentrifugiert (10 min, 4°C, 3000 rpm, Beckmann JA-10 Rotor) und der Überstand zur kompletten Entfernung eventuell verbliebener Bakterien mit einem Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert. Das Filtrat wurde daraufhin mit einer 10%igen Natriumdesoxycholat-Lösung bis auf eine Endkonzentration von 200 mg/l verrührt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde unter Rühren eine 30%ige TCA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 6% zugegeben und die Proteine durch mindestens zweistündige Inkubation bei 4°C präzipitiert. Dieses Präzipitat wurde in einem Beckmann JA-10 Rotor 30 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C niederzentrifugiert.

Die im Niederschlag verbliebene Trichloressigsäure würde bei direkter Verwendung als Probe eine effektive Solubilisierung der Proteine verhindern, weshalb zur Aufreinigung eine zweite Fällung der Proteine mit Aceton durchgeführt wurde (Ausubel et al., 1996). Hierzu wurde der Niederschlag in 5 ml eiskaltem Wasser aufgenommen und in einem Falcon-Gefäß mit 40ml tiefgekühltem Aceton (-20°C) versetzt. Dieses Gemisch wurde für mindestens zwei Stunden bei -20°C inkubiert und anschließend in einer Falcon-Schwenkrotorzentrifuge

45 Minuten bei 0°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde zur Entfernung des Acetons einige Minuten bei Raumtemperatur angetrocknet und darauf in einem geeigneten Volumen Solubilisierungslösung (0,5-2,0 ml) aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden durch 30 minütige Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 13.000 rpm und 15°C entfernt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration konnte der gewonnene Überstand direkt für die 2D-GE eingesetzt werden.

3.3.3. Fraktionierung von Proteingemischen

Bei der Analyse komplexer Proteingemische in der zweidimensionalen Gelelektrophorese können zahlreiche Proteine nicht ohne weiteres dargestellt werden weil sie entweder nur in zu geringer Menge vorliegen oder aber aufgrund ihrer inhärenten Hydrophobizität entweder durch Präzipitationsvorgänge verloren gehen, oder aber im IPG in der näheren Umgebung ihres isoelektrischen Punktes an die Acrylamidmatrix adhäreren (Adessi et al., 1997; Rabilloud et al., 1997). Derartige Probleme können jedoch teilweise durch Methoden zur Anreicherung dieser Proteine umgangen werden. Um das Expressionsprofil der Membranproteine der in dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämme näher zu analysieren wurden aus diesem Grund komplexe Gemische zellulärer Proteine fraktioniert.

Mit dem Ziel, die hydrophoben Membranproteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese der Subproteomanalyse zugänglich zu machen wurde hierbei nach dem Grundprinzip der differentiellen Solubilisierung vorgegangen (Molloy et al., 1998).

Zu diesem Zweck wurde ein in Phosphatpuffer gewaschenes Zellpellet in Trispuffer (40 mM, pH = 9,5) aufgenommen und wie oben beschrieben mit einem Ultraschallgerät aufgeschlossen. Nach 15 minütigem Schütteln der erhaltenen Suspension wurden die im Puffer nicht löslichen Bestandteile durch Zentrifugation (15 min, 12.000 g, 10°C) abgetrennt und für den nächsten Extraktionsschritt verwendet. Der Überstand hingegen wurde lyophilisiert, in Solubilisierungslösung aufgenommen, und konnte dann nach Bestimmung der Proteinkonzentration als hydrophile Fraktion in der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht werden.

Der unlösliche Niederschlag dieses ersten Extraktionsschrittes wurde zweimal in Trispuffer (40 mM, pH = 9,5) gewaschen, anschließend in einem SpeedVac-Konzentrator getrocknet und dann in einem Standardsolubilisierungspuffer ohne Thioharnstoff (8 M Harnstoff,

4% w/v CHAPS, 30 mM DTT, 10 mM Tris-Base, 0,5% v/v Trägerampholyte 3-10) aufgenommen. Nach 15 minütiger Behandlung im Ultraschallbad bei Raumtemperatur wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 15°C abgetrennt. Der klare Überstand konnte als zweite Fraktion elektrophoretisch analysiert werden, während der Niederschlag erneut zweimal in 40 mM Tris, pH 9,5 gewaschen und dann eingetrocknet wurde.

Im dritten Extraktionsschritt wurde der zuvor unlösliche Niederschlag in einer verbesserten Solubilisierungslösung aufgenommen (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2% w/v ASB 14, 2 mM TBP, 10 mM Tris-Base, 0,5% v/v Trägerampholyte 3-10), in welcher das Reduktionsmittel DTT durch das ungeladene Reagenz Tributylphosphin ersetzt wurde um die reduzierenden Bedingungen während der Fokussierung aufrecht erhalten zu können. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit der Präzipitation von Proteinen während der IEF verringern (Herbert et al., 1998). Weiterhin wurden in dieser Lösung Thioharnstoff (Rabilloud et al., 1998) und Amidosulfobetaine (ASB 14) eingesetzt (Chevallet et al., 1998; Molloy et al., 1999; Santoni et al., 1999;) um die solubilisierenden Eigenschaften zu verstärken.

Nach 15 minütiger Ultraschallbehandlung wurden unlösliche Bestandteile erneut durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand als hydrophobe Proteinfraction in der 2D-GE untersucht. Die selbst im verbesserten Solubilisierungspuffer unlöslichen Bestandteile wurden aufbewahrt, um durch klassische SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt zu werden.

3.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Extrakte

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung erfolgte stets nach der von M. Bradford im Jahre 1976 beschriebenen Methode, welche auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von ‚Coomassie brilliant blue G-250‘ bei der Bindung an Proteine basiert. Verwendet wurde hierfür der kommerziell erhältliche ‚Bio-Rad Protein Assay‘. Geeignete Verdünnungen der jeweiligen Probe in einem Volumen von 10 µl wurden in einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Reagenz (1:5 mit H₂O verdünnt) durchmischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurde unter Berücksichtigung eines Referenzwertes, welcher mit proteinfreier Lösung ermittelt wurde, die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm im Mikrotiter-Photometer bestimmt. Parallel wurden verschiedene BSA-Lösungen bekannter Konzentration auf dieselbe Art photometrisch bestimmt, um eine

Protein-Eichkurve innerhalb des dynamischen Bereiches der Messung von 100-1000 $\mu\text{g Protein} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Probenkonzentration) zu erhalten. Sämtliche Proben wurden hierbei zur Ausgleichung von Messfehlern dreifach gemessen. Die Datenaufnahme sowie die Umrechnung der gemittelten Messwerte in Proteinkonzentrationen erfolgte mittels des Computerprogrammes SOFTmaxPro.

3.4. Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten

Zur Analyse der Proteinexpressionsmuster der untersuchten Stämme von *P. aeruginosa* wurde die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese eingesetzt (O'Farrell, 1975). Für die erste Dimension dieser Methode, die isoelektrische Fokussierung, wurde die Methode der IEF mittels immobilisiertem pH-Gradienten gewählt (Bjellqvist et al., 1982; Righetti, 1990). Die zweite Dimension der 2D-Elektrophorese erfolgte in der Laufrichtung der Elektrophorese um 90° versetzt durch eine SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Die isoelektrische Fokussierung von Proteinen macht sich die amphotere Natur der Proteine zunutze, ihre Eigenschaft also, je nach umgebendem pH-Milieu nach außen positive oder auch negative Nettoladungen aufzuweisen. Am isoelektrischen Punkt jedoch (pI), welcher für jedes Protein charakteristisch ist, beträgt die Nettoladung eines jeden Proteins Null, so dass die Migration des Proteins im elektrischen Feld an diesem Punkt endet, es also auf den isoelektrischen Punkt fokussiert wird.

Für die isoelektrische Fokussierung wurden überwiegend kommerziell erhältliche IPG-Gelstreifen der Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Immobiline DryStrip, 18 cm) und Bio-Rad (ReadyStrip IPG Strip, 17 cm) verwendet. In einzelnen Experimenten wurde zur Erweiterung des Spektrums verfügbarer Gradienten jedoch auf die manuelle Herstellung solcher Gelstreifen zurückgegriffen.

Herstellung der IPG-Gele

Um für die isoelektrische Fokussierung geeignete Bedingungen zu schaffen, müssen mit Hilfe eines Gradientenmischers Gele mit einem internen Ladungsträger-Gradienten gegossen werden. Die verwendeten Ladungsträger („Immobiline“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech bzw. „Acrylamido-Puffer“ der Firma Fluka) ergeben durch ihre lokal

unterschiedliche Konzentration einen über die gesamte Geldistanz kontinuierlichen pH-Gradienten. Beim Auspolymerisieren des Gels polymerisieren diese Ladungsträger als Acrylamid-Derivate mit in die Gelmatrix ein, so dass der Gradient im Gegensatz zur klassischen IEF, welche ausschließlich auf einem mittels Trägerampholyten aufgebautem pH-Gradienten beruht, keinen nachträglichen Veränderungen mehr unterliegt.

Um einen bestimmten pH-Wert innerhalb eines solchen Gels puffern zu können, benötigt man mindestens zwei Acrylamidpuffer, eine Säure und eine Base. Auf dem Markt sind insgesamt dreizehn verschiedene Acrylamidpuffer erhältlich, definiert durch ihren jeweiligen pK-Wert. Hiermit ist es möglich, beliebige pH-Gradienten innerhalb des weiten Bereiches von pH 3,0 bis pH 12,0 herzustellen (Görg et al., 2000; Görg et al., 1998).

Die Menge der jeweils einzusetzenden Acrylamidpuffer wurde im Einzelfall mit Hilfe des Computerprogrammes Doctor pH (Hoefer) errechnet. Für jedes Gel wurden anhand dieser ermittelten Mengenangaben zwei sogenannte Starterlösungen (T = 4 %, C = 3 %), eine saure und eine basische, hergestellt (nach R. Westermeier, 2001). Die saure oder auch schwere Starterlösung wurde mit 3,75 g Glycerin durchmischt, um später beim Gießen einen stabilisierenden Dichtegradienten zu erzeugen. Beiden Lösungen wurden zudem 1,88 ml 40%ige Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (plusone ReadySol IEF) und 7,5 µl TEMED (100%) zugegeben, worauf sie durch Auffüllen mit Milli Q H₂O auf ein Volumen von 15 ml gebracht wurden. Anschließend wurden beide Lösungen durch Zugabe von TEMED (saure Lösung) bzw. 4 M HCl (basische Lösung) in 3 µl - Schritten auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Die Lösungen wurden anschließend entgast und zur späteren Verzögerung der Polymerisation auf 4°C temperiert. Die zur Gießkassette gehörende Glasplatte mit aufgeklebten Gummispacern (Amersham Pharmacia Biotech) wurde mit etwa 5 ml Repel-Silan („Antihaft-Silan“) silanisiert und nach Verdunsten des Lösungsmittels zur Entfernung von Chloridionen vorsichtig mit Milli Q H₂O gespült und mit einem weichen Papiertuch abgerieben. Die andere Platte wurde mit 2 ml Milli Q H₂O benetzt, worauf mit einem Rollenquetscher ein als Trägerfolie dienender GelBond-PAG-Film mit der hydrophilen Seite nach oben aufgewalzt und das überschüssige Wasser abgesaugt wurde. Nach Zusammenbau der Kassette wurde diese ebenfalls auf 4°C abgekühlt. 13,5 ml der basischen (leichten) Lösung wurden anschließend in das Reservoir (hintere Röhre) eines ebenfalls vorgekühlten Gradientenmischers gegeben, worauf der Verbindungskanal des Mischers durch kurzes Öffnen des hinteren Hahnes entlüftet wurde. Ein identisches Volumen saurer (schwerer)

Lösung wurde in die Mischkammer (vordere Röhre) gegeben und eine Peristaltikpumpe mit Silikonschläuchen an den Gradientenmischer angeschlossen. Der Abflußschlauch wurde in das obere Ende der abgekühlten Gießkassette geführt und zu den Starterlösungen unter Rühren je 9,5 µl 40% (w/v) APS zugegeben. Nach Öffnen der beiden Hähne des Gradientenmischers wurden die Lösungen unter moderatem Rühren eines Magnetkerns in der Mischkammer innerhalb einer Gießdauer von etwa 6 min in die Gießkassette gepumpt, welche darauf über Nacht erschütterungsfrei bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Am nächsten Tag wurde die Kassette unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und auseinandergebaut. Das fest auf dem GelBond-PAG-Film haftende Gel wurde zunächst viermal für 15 Minuten in Milli Q H₂O auf einem Laborschüttler gewaschen, darauf für 1 h in 2% Glycerin inkubiert und anschließend über Nacht unter einem Luftstrom bei 30°C getrocknet (Umluft-Brutschrank). Das getrocknete Gel wurde mit einer Schutzfolie (Amersham Pharmacia Biotech) abgedeckt und mit einer Fotoschere in 3 mm breite Streifen mit einer Gellänge von 18 cm geschnitten. Hierbei wurde die saure Seite der Streifen durch Abschneiden einer Ecke markiert. Diese Streifen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Rehydratisierung der Streifen

Im Unterschied zum ursprünglichen Verfahren der Rehydratisierung der IPG-Streifen in einer Rehydratisierungskammer wurde es durch Einsatz des IPGphor-Elektrophoresesystems (Amersham Pharmacia Biotech) möglich, Rehydratisierung und Fokussierung in der selben Kammer durchzuführen (Choe et al., 2000). Hierbei wurden die Proteinproben bereits vor der Rehydratisierung dem Rehydratisierungspuffer zugemischt um durch das direkte Einquellen der Proteine ins Gel auf den späteren Einsatz von Probenapplikationsbechern verzichten zu können (Rabilloud et al., 1994; Sanchez et al., 1997).

Als Rehydratisierungspuffer diente die bereits oben als Solubilisierungspuffer beschriebene Lösung, mit dem Unterschied, dass die enthaltenen Trägerampholyte dem pH-Gradienten der jeweiligen Fokussierung angepasst wurden. Eine geeignete Probenmenge (20-50 µg Gesamtprotein für Silberfärbung, 300-600 µg Gesamtprotein für Coomassiefärbung) wurde in Rehydratisierungspuffer auf ein Endvolumen von 360 µl verdünnt und zur späteren Kontrolle der Migration mit Bromphenolblau angefärbt.

Die Elektrodendrähte der Keramik-Fokussierungskammern des IPGphor-Systems wurden mit dünnen Filterpapierplättchen abgedeckt und diese mit jeweils 20 µl Rehydratisierungspuffer angefeuchtet. Die Probenlösung wurde mit einer Pipette im mittleren Bereich der

Fokussierungskammer verteilt und ein IPG-Streifen nach Abziehen der Schutzfolie mit der Gelseite nach unten unter Vermeidung von Luftblasen und Beachtung der richtigen Orientierung des pH-Gradienten aufgelegt. Anschließend wurde das Gel zum Schutz vor Verdunstung mit Silikonöl überschichtet und die Kammer mit dem zugehörigen Kunststoffdeckel verschlossen. Mit allen weiteren Proben wurde identisch verfahren. Da das IPGphor-System die isoelektrische Fokussierung von bis zu zwölf unterschiedlichen Proteinproben ermöglicht, wurden zu vergleichende Proteinextrakte der unterschiedlichen Kulturen stets parallel im selben Lauf und somit unter absolut identischen Bedingungen aufgetrennt.

Die eigentliche Rehydratisierung der Gelstreifen erfolgte dann für die Dauer von 4 Stunden bei 20°C ohne Spannung und für weitere 10 Stunden bei der gleichen Temperatur und einer Spannung von 30 V. Hierbei soll die bereits während der Einquellphase angelegte leichte Spannung den Eintritt insbesondere hochmolekularer Proteinmoleküle in die Gelmatrix verbessern und somit Verluste reduzieren (Görg et al., 1999).

Isoelektrische Fokussierung

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte im IPGphor-System in einem Spannungsgradienten, bei welchem die Spannung kontinuierlich von einem Ausgangswert von 100 V bis auf einen Maximalwert von 8000 V gesteigert wurde. Hierbei wurde eine konstante Temperatur von 20°C aufrechterhalten und den Herstellerempfehlungen entsprechend ein limitierender Oberwert des Stromflusses von 50 μ A pro IPG-Streifen einprogrammiert. Die Steigung des Spannungsgradienten wurde gegebenenfalls den physikalischen Beschaffenheiten der Proben angepasst (Bei sehr sauberen Proteinproben mit geringer Leitfähigkeit können steilere Gradienten eingesetzt werden als bei Proben mit Verunreinigungen, welche die Leitfähigkeit erhöhen).

Die Fokussierung unter Standardbedingungen erfolgte bis zum Erreichen eines Wertes von 120 kVh woraus sich eine Gesamtdauer der 1. Dimension (Rehydratisierungsdauer + Fokussierungsdauer) von etwa 48 h ergab. Wurden teilweise schlechtere Auftrennungsergebnisse beobachtet, so wurde die Fokussierungsdauer jedoch in Einzelfällen auf bis zu 250 kVh ausgedehnt. Nach Beendigung des Gradientenprogrammes wurden die Streifen zügig aus der Elektrophoresekammer herausgenommen und entweder sofort äquilibriert und in der 2. Dimension aufgetrennt, oder aber bis zu einer späteren Auftrennung bei -20°C gelagert.

3.5. SDS-PAGE als zweite Dimension der 2D-Elektrophorese

In der zweiten Dimension der 2D-Elektrophorese werden die Proteine, gegenüber der Laufrichtung der IEF um 90° versetzt, nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Hierzu wurde die Methode der diskontinuierlichen Glycin-SDS-PAGE nach Laemmli (1970) angewendet. Eingesetzt wurde zu diesem Zweck das vertikale ISO-DALT-Elektrophoresesystem (Hoefer), welches aufgrund seiner Abmessungen (Gelgröße: 20,3 x 25,4 x 0,15 cm) das Auflegen der relativ langen IPG-Streifen erlaubt. Weiterhin ermöglicht dieses System das gleichzeitige Giessen von über 20 Acrylamidgradientengelen und die gleichzeitige elektrophoretische Auftrennung bis zu zehn solcher Gele, ein entscheidender Vorteil hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Proteinmuster der parallel aufgetrennten Proben.

Herstellung der Acrylamidgele

Für die Auftrennung der untersuchten bakteriellen Proteingemische erwiesen sich 2D-Gele mit einem Acrylamidgradienten von 12-15% T als gut geeignet. Zur Herstellung dieser Gele wurde der Gelgießstand des Elektrophoresesystems der Anweisung des Herstellers entsprechend mit bis zu 23 Gelkasseten (Scharnierglasplatten mit aufgeklebten Abstandhaltern) bestückt und zusammengebaut. Für das Giessen der Gele wurden jeweils 1100 ml einer 'leichten' Lösung (38,96% v/v Rotiphorese Gel 30 Acrylamidlösung; 375 mM Tris, pH=8,6; 0,1% SDS) und einer 'schweren' Lösung (48,70% v/v Rotiphorese Gel 30 Acrylamidlösung; 8% v/v Glycerin; 375 mM Tris, pH=8,6; 0,1% SDS) benötigt. Die Lösungen wurden zur Verzögerung der Polymerisationsgeschwindigkeit zwei Stunden im Kühlschrank kaltgestellt und direkt vorm Giessen der Gele unter Rühren mit 11,0 ml 10% w/v APS und 1,57 ml 10% v/v TEMED (leichte Lösung), bzw. 5,5 ml 10% w/v APS und 0,42 ml 10% v/v TEMED (schwere Lösung) vermischt. Anschließend erfolgte das Giessen der Gele mit Hilfe eines Gradientenmischers durch kontinuierliches Unterschichten mit zunehmend 'schwererer' Acrylamidlösung durch eine Öffnung in der Unterseite des Gießstandes. Da im ISO-Dalt-System üblicherweise auf ein Sammelgel verzichtet werden kann, wurde die Trenngellösung unmittelbar nach Beendigung des Gradientengießvorganges in allen Gelkasseten mit etwas wassergesättigtem 1-Butanol überschichtet. Nach zwei weiteren Stunden wurde die erfolgte Polymerisation kontrolliert, woraufhin die Gele zur Vermeidung von Austrocknung mit Gelpuffer (375 mM Tris, pH=8,6; 0,1% SDS)

überschichtet und zur Optimierung der Porenstruktur über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Kassetten dem Gießständer entnommen, von Acrylamidresten an der Außenseite und Butanolresten auf der Geloberseite gereinigt und entweder sofort für die zweite Dimension der 2D-GE verwendet oder aber bis zu drei Wochen bei 4°C gelagert. Für diese Lagerung wurden Kunststoffbehälter verwendet, in welchen durch mit Gelpuffer getränktem Papier eine feuchte Atmosphäre aufrechterhalten wurde.

Äquillibrierung der IPG-Streifen

Da erste und zweite Dimension der 2D-GE in äußerst unterschiedlichen Puffersystemen durchgeführt werden, ist es notwendig, die IPG-Streifen vor der Durchführung der zweiten Dimension auf das Puffersystem der Tris-Glycin-SDS-PAGE einzustellen. Insbesondere die Beladung der Proteine mit SDS im Anschluss an die IEF ist Voraussetzung für einen effizienten Transfer der Proteine in das 2D-Gel. Erreicht wird dies durch Inkubation der IPG-Streifen in einem Äquillibrierungspuffer, welcher neben den Komponenten des SDS-PAGE-Puffersystems noch Glycerin zur Vermeidung eventueller durch die IPG's hervorgerufener elektroosmotischer Effekte enthält (Görg et al., 1985). Weiterhin wird mit der Äquillibrierung eine erneute Reduzierung von Cysteinresten in den aufgetrennten Proteinen durch Behandlung mit DTT verbunden um einen denaturierten Zustand der Proteine zu gewährleisten und somit die Qualität des späteren zweidimensionalen Musters zu verbessern. In einem zweiten Schritt wird dann Iodacetamid eingesetzt, um die reduzierten Cysteinreste durch S-Carboxyamidomethylierung zu schützen und die erneute Ausbildung von Disulfidbrücken somit dauerhaft zu verhindern. Dieses Iodacetamid besitzt überdies die Eigenschaft, überschüssiges DTT des vorangegangenen Schrittes abzufangen und somit durch das Reduktionsmittel hervorgerufene Artefakte (horizontale artifizielle Linien sowie vertikales 'Schmierer' der Proteinspots) zu verhindern (Görg et al., 1987).

Die Durchführung der Äquillibrierung erfolgte durch 15 minütiges Schwenken der IPG-Streifen in Äquillibrierungslösung A (50 mM Tris-HCl, pH=8,6; 6 M Harnstoff; 30% w/v Glycerin; 2% w/v SDS; 1% w/v DTT) bei Raumtemperatur in Plexiglasblöcken mit eingefrästen Schlitzten, woraufhin die Lösung mit einer Pipette abgezogen und durch Äquillibrierungslösung B (50 mM Tris-HCl, pH=8,6; 6 M Harnstoff; 30% w/v Glycerin; 2% w/v SDS; 4% w/v Iodacetamid) ersetzt wurde. Nach erneutem 15 minütigem Schwenken wurde auch diese Lösung entfernt.

SDS-PAGE im ISO-DALT-System

Nach Entfernung überschüssiger Iodacetamidlösung durch Abtupfen der IPG-Streifen mit Whattman-Papier wurden diese unter Vermeidung von Lufteinschlüssen auf die Acrylamidgele der zweiten Dimension aufgelegt. Hierbei war zügig zu arbeiten, um die Diffusion der Proteine in den weichen IPG-Gelen (Acrylamidkonzentration 4%) zu minimieren. Neben den IPG-Streifen wurde gegebenenfalls ein Gelstückchen mit eingequollenem Molekulargewichtsstandard (LMW-Marker: 14,4 - 94 kDa, Amersham Pharmacia Biotech) plaziert.

Um bereits im Bereich der Streifen ein möglichst homogenes Feld zu erzielen und stärkere Diffusion der Proteine durch deren Übertritt in die flüssige Pufferphase zu verhindern, wurde 1% w/v Agarose (niedrige Elektroendosmose, Biomol) in SDS-Laufpuffer (200 mM Glycin, 24 mM Tris-Base, 0,1% w/v SDS, pH=8,6) durch Aufkochen gelöst und bis zum oberen Rand der Glasplatten auf die Streifen gegossen. Zuvor wurde die Agaroselösung mit etwas Bromphenolblau angefärbt, um während der elektrophoretischen Auftrennung die Migration verfolgen zu können.

Die anschließende Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 10°C über Nacht. Hierbei wurden die Obergrenzen von 40 mA pro Gel und 200 V Spannung nicht überschritten. Erreichte die Bromphenolblaufront am nächsten Tag die Unterseite der Gele, wurden diese aus der Elektrophoresekammer herausgenommen und von den Glasplatten gelöst. Anschließend wurden sie entweder sofort für einen Western-Transfer vorbereitet oder aber zwecks Durchführung einer Proteinfärbung zunächst für mindestens zwei Stunden in Fixierungslösung (10% v/v Essigsäure, 40% v/v Ethanol) geschwenkt.

3.6. Klassische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Qualität hergestellter Proteinextrakte in Vorversuchen zu testen sowie um geeignete Verdünnungsstufen präparierter Humanseren für Westernblots zu ermitteln wurde auf die vergleichsweise simple Methode der klassischen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zurückgegriffen (Laemmli, 1970). Diese Methode stellt eine rasche Möglichkeit dar, komplexe Proteingemische hinsichtlich der apparenten Massen der enthaltenen Proteine aufzutrennen.

Das Prinzip der Methode basiert auf der Denaturierung der enthaltenen Proteine durch Aufkochen in Gegenwart des anionischen Detergens Natrium-Dodecylsulfat sowie des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol, wobei die Proteine durch Anlagerung des Dodecylsulfates eine negative Ladung erhalten, sowie der anschließenden Auftrennung der Proteine im Spannungsfeld in einer Polyacrylamid-Gelmatrix. Die raschere Migration niedermolekularer Proteine resultiert in einer Auftrennung hinsichtlich der apparativen Masse.

Diese Auftrennung wurde im Einzelfall durch Auswahl geeigneter Acrylamidkonzentrationen der eingesetzten Trenngele optimiert, teilweise unter Verwendung von Acrylamidgradientengelen. Verwendet wurden entweder selbst angefertigte Gele in einem klassischen Vertikalelektrophoresesystem oder aber die kommerziell erhältlichen Horizontal-Minigele des PhastSystems (Amersham Pharmacia Biotech).

Bei Verwendung des PhastSystems erfolgte die Auftrennung im automatisierten Programm entsprechend der Herstellerangaben und die Gele wurden anschließend in der PhastSystem Development Unit vollautomatisiert - entsprechend der Protokolle des Herstellers - mit Silbernitrat gefärbt.

Im klassischen Vertikalsystem erfolgten die Herstellung der Gele, die Elektrophorese und die anschließende Färbung unter Verwendung der folgenden Lösungen:

Sammelgelpuffer (vierfach konzentriert)

0,5 M Tris/HCl, pH=6,8

SDS-Laufpuffer (zehnfach konzentriert)

3,03 % (w/v) Tris-Base

14,04 % (w/v) Glycin

1,00 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer (vierfach konzentriert)

1,5 M Tris/HCl, pH=8,8

Probenpuffer (zweifach konzentriert)

8 M Harnstoff

0,5 M Tris/HCl, pH=6,8

20 % (v/v) Glycerin

10 % (w/v) SDS

5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Nach Reinigung der Glasplatten und Zusammenbau der Gießkassette wurde zunächst das Trenngel bis zu einer Höhe von etwa 1,5 cm unterhalb des oberen Randes der Glasplatten gegossen und die Lösung mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach Polymerisierung des Geles wurde das Butanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegeben und ein geeigneter Plastikkamm zur Formung der Probenaschen zwischen die Glasplatten eingeführt. Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel entsprachen den folgenden Angaben, wobei die Acrylamidkonzentration der Trenngele im Einzelfall durch Anpassung der verwendeten Volumina an Acrylamidlösung und Wasser angepasst wurde.

Trenngel (15% AA)

5 ml Trenngelpuffer (vierfach)
10 ml Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid- /
Bis-Acrylamidlösung)
4,7 ml H₂O
200 µl 10 % (w/v) SDS
20 µl TEMED
80 µl 10 % (w/v) APS (frisch angesetzt)

Sammelgel (5,7% AA)

2,5 ml Sammelgelpuffer (vierfach)
1,9 ml Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid- /
Bis-Acrylamidlösung)
5,4 ml H₂O
100 µl 10 % (w/v) SDS
5 µl TEMED
50 µl 10 % (w/v) APS (frisch angesetzt)

Nach vollständiger Polymerisierung der Gele wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermischt und 5 min bei 95°C unter Schütteln inkubiert. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer gespannt, diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Plastikkämme entfernt. Geeignete Volumina der abgekühlten Proben wurden in die Probenaschen pipettiert und die Elektrophorese daraufhin mit einer Feldstärkenbegrenzung von 10 V / cm Trenndistanz bei Zimmertemperatur durchgeführt. Beim Austritt der Bromphenolblaufront aus der Unterseite der Gele wurden die Gelkassetten entnommen. Die Gele wurden anschließend entweder für einen Western-Proteintransfer vorbereitet oder aber mit Coomassie angefärbt.

3.7. Färbung, Dokumentation und Konservierung von Proteingelen

3.7.1. Silberfärbung

Zur Anfärbung der Proteine in analytischen 2D-Gelen diente als sensitivste verwendete Methode die Silbernitratfärbung. Diese Methode bietet gegenüber einer Coomassiefärbung zwar den Vorteil einer etwa um den Faktor zehn höheren Sensitivität, weist jedoch auch einige Nachteile auf. So ergeben sich bei der Analyse silbergefärbter 2D-Gele beispielsweise Probleme hinsichtlich der Quantifizierbarkeit der Proteinspots weil die Intensität der Anfärbung noch stärker als bei der Coomassiefärbung nicht nur von der Proteinmenge, sondern auch von den chemischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins beeinflusst wird. Ein weiteres Problem stellen Proteine dar, welche in sehr großer Menge vorliegen. Hier kommt es bei der Silberfärbung häufig zu einem Effekt der Negativfärbung, die Proteinspots werden in ihrem Zentrum mit zunehmender Proteinmenge wieder heller. Schließlich ergibt sich bei einer Färbung mit Silbernitrat der Nachteil, dass Proteinspots nur in stark eingeschränktem Maße der Analyse durch massenspektrometrische Methoden zugänglich sind.

Dennoch ist die Silberfärbung bei der Proteomanalyse in der Regel unverzichtbar, da sie die Analyse von Proteinextrakten mit geringer Proteinkonzentration ermöglicht, einem Problem, welches gerade bei der Fraktionierung von Extrakten häufig nicht anders umgangen werden kann. Auch bei der Analyse von komplexen Extrakten mit ausreichender Proteinkonzentration bietet die Silberfärbung den Vorteil, im Vergleich zur Coomassiefärbung insgesamt eine erheblich größere Anzahl von Proteinspots darstellen zu können. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit regelmäßig auch silbergefärbte 2D-Gele in die vergleichende Proteomanalyse mit einbezogen. Nach Erprobung verschiedener in der Literatur beschriebener Färbemethoden mit Silbernitrat erwies sich die Silberfärbung nach H. Blum et al. (1987) als am geeignetsten.

Durchführung der Färbung

Die mit dem ISO-DALT-System erstellten 2D-Gele weisen im Unterschied zum zugrunde liegenden Färbeprotokoll (Blum et al., 1987) eine Stärke von 1,5 mm auf. Die unveränderte Anwendung des Originalprotokolles führt daher zu einer verstärkt auftretenden Hintergrundanfärbung, weshalb die Methode wie im Folgenden beschrieben modifiziert

wurde. Alle folgenden Schritte wurden unter Verwendung eines Laborschüttlers bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach mindestens zweistündiger Inkubation der Gele in Fixierungslösung (10% v/v Essigsäure, 40% v/v Ethanol) wurden diese dreimal 45 min in 30% Ethanol gewaschen und daraufhin für exakt 1 min in Sensitivierungslösung ($0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) vorbehandelt, gefolgt von dreimaligem Waschen für je 2 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$. Hierauf folgte das Färben der Gele für 20 min in Silbernitratlösung (0,2% w/v AgNO_3 , 0,02% v/v 36,5%ige Formaldehyd-Lösung, frisch angesetzt) und nochmaliges Waschen für 2 x 1 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$. Die Entwicklungsreaktion der gefärbten Gele erfolgte über eine Dauer von 7 min in Entwicklerlösung (3% w/v Na_2CO_3 , 0,05 % v/v 36,5%ige Formaldehyd-Lösung, $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, frisch angesetzt), worauf diese zweimal 1 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gewaschen wurde und die Reaktion daraufhin durch zehnmünütige Inkubation in EDTA-Lösung (0,37 %) gestoppt wurde. Nach anschließendem zweimaligen Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ konnten die Gele analysiert und dokumentiert werden.

3.7.2. Klassische Coomassie-Färbung

Die klassische Coomassie-Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 wurde aufgrund ihrer unproblematischen schnellen Durchführbarkeit vor allem bei eindimensionalen Proteingelen und bei auf Membranen immobilisierten Proteinen angewendet. Bei der Anfärbung von 2D-Gelen wurde auf die im Abschnitt 3.7.3 beschriebene sensitivere kolloidale Coomassie-Färbung zurückgegriffen.

Die Gele bzw. Membranen wurden zur Anfärbung 2 Stunden in Färbelösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250) geschwenkt und der blaue Hintergrund anschließend für mehrere Stunden mit Entfärberlösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure) bei wiederholtem Auswechseln der Lösung ausgewaschen.

3.7.3. Färbung mit kolloidalem Coomassie

Die Färbung von Proteingelen mit kolloidalen Coomassie Brilliant Blue G-250 weist gegenüber der klassischen Färbemethode die Vorteile höherer Sensitivität, verbesserter Quantifizierbarkeit und reduzierter Hintergrundanfärbung auf. Bei der Analyse der

vergleichsweise dicken Gele des ISO-Dalt-Systems erwiesen sich diese Vorteile, insbesondere des reduzierten Färbehintergrundes, als so erheblich, dass präparative Coomassie-2D-Gele trotz des höheren Zeitaufwandes generell anhand eines abgewandelten Protokolls, basierend auf der Färbemethode nach V. Neuhoff et al., (1988) gefärbt wurden.

Für diese Färbung wurden zwei Stammlösungen verwendet.

Färbelösung A

10 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2 % (w/v) H_3PO_4 (85 %)
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$

Färbelösung B

5% (w/v) CBB G-250
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$

Vor Beginn der Färbung wurden 2 vol Lösung B mit 98 vol Lösung A gemischt und in einer Schottflasche zur Ausbildung der Kolloide mindestens 4 h auf einem Laborschüttler heftig geschüttelt. Anschließend wurde Methanol bis zu einer Endkonzentration von 20% zugegeben und die Lösung erneut 30 min geschüttelt. Die zuvor mit Fixierungslösung behandelten Gele wurden dann über Nacht in dieser Färbelösung geschwenkt und im Anschluß 24 h in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gewaschen. Hierbei wurde das Wasser in regelmäßigen Abständen gewechselt.

3.7.4. Fluoreszenzfärbung

Zur Analyse bestimmter Proteinspots, welche in der Coomassiefärbung aufgrund unzureichender Menge der entsprechenden Proteine nicht mehr dargestellt werden konnten, wurde bei zweidimensionalen Gelen in Einzelfällen auf eine Fluoreszenzfärbung zurückgegriffen. Diese Färbung weist im Vergleich zur beschriebenen Coomassie-Färbung den Vorteil höherer Sensitivität einerseits und besserer Quantifizierbarkeit der in den Spots enthaltenen Proteinmenge andererseits auf (Steinberg et al., T.H., McNamara et al., 2001). Im Gegensatz zur noch sensitiveren Silbernitratfärbung sind bei der Fluoreszenzfärbung bei späterer massenspektrometrischer Analyse der Proteinproben keine störenden Einflüsse auf die erzielten MS-Spektren zu beobachten (Lopez et al., 2000; Lauber et al., 2001).

Die 2D-Gele wurden in der kommerziell erhältlichen SYPRO Ruby Färbelösung (Molecular Probes) eine Stunde geschwenkt und anschließend 30 min in Milli Q H_2O gewaschen (Malone et al., 2001).

3.7.4. Dokumentation der Gele

Zur dauerhaften Dokumentation und Auswertung der Proteinmuster wurden digitalisierte Aufnahmen der gefärbten Gele erstellt. Hierzu wurde bei Coomassie- und Silberfärbungen ein Flachbettscanner mit Durchlichtaufsatz (Umax) verwendet. Gescannt wurde stets mit einer Auflösung von 300 dpi. Farbfotos wurden hierbei nur zum Zwecke der besseren Anschaulichkeit erstellt, für die spätere Auswertung mittels Gelanalysesoftware hingegen wurden ausschließlich Bilddateien mit 256 Graustufen verwendet. Diese wurden zur Sicherstellung der Kompatibilität mit der Analysesoftware im 'tagged image file format' (tiff) auf dem PC abgespeichert. Zur Verbesserung der optischen Qualität der Bilder wurde auf die monochromatische Scannfunktion des Gerätes zurückgegriffen. So wurden Coomassiegele für Graustufenbilder mit komplementärem Rotlicht gescannt wodurch ein besserer Kontrast in den erstellten Bildern erzielt wurde.

Gele mit Fluoreszenzfärbung hingegen wurden in einem Videokamerasystem (CCD-Kamera LAS-1000 und Intelligent Dark Box, Fujifilm) fotografiert. Auf die Kamera wurde zu diesem Zweck ein UV-Filter aufgeschraubt, da die Anregung der Fluoreszenz über eine UV-Quelle (Wellenlänge = 330nm) erfolgte.

3.7.5. Konservierung von Proteingelen

Die erstellten zweidimensionalen Proteingele wurden im Anschluß an die Auswertung und nach dem eventuellen Ausstechen zu analysierender Proteinspots durch Trocknen konserviert. Hierzu wurde ein 'Easy Breeze' Gel Trockner der Firma Hoefer verwendet. Die zu trocknenden Gele wurden 30 Minuten in Konservierungslösung (20% v/v Ethanol, 2% v/v Glycerin) geschwenkt und anschließend zwischen zwei eingeweichte Zellophanfolien gelegt. Überschüssige Flüssigkeit und eingeschlossene Luftblasen wurden ausgestrichen und die Gele mit den Folien nach Anweisung des Herstellers fest in die zugehörigen Kunststoffrahmen eingespannt. Die Trocknung erfolgte dann im Luftstrom bei Raumtemperatur über Nacht.

Derartig konservierte Gele wurden staubgeschützt gelagert, um eventuelle spätere Analysen der archivierten Proteinproben zu ermöglichen (Shevchenko et al., 2001).

3.8. Immunologischer Nachweis von Proteinen

3.8.1. Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Membranen ("Western-Blot") erfolgte elektrophoretisch im sogenannten 'semi-dry'-System. Hierzu wurde das Trans-Blot SD Transfersystem der Firma Bio-Rad verwendet.

Vier Bögen Whatmanpapier wurden auf eine geeignete Größe zurechtgeschnitten, in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 0,1% w/v SDS, 20% v/v Methanol, pH 8,5) getränkt und auf die anodale Elektrodenplatte des Systems aufgelegt. Ein Bogen PVDF-Membran (Roth) identischer Abmessungen wurde einige Sekunden mit Methanol benetzt, anschließend mit Transferpuffer gespült und unter Vermeidung von Luft einschläüssen auf das Papier gelegt. Der zu analysierende Bereich des 2D-Gels wurde aus dem Gel ausgeschnitten, 2 Minuten in Transferpuffer inkubiert und anschließend auf die Membran überführt und mit 4 weiteren ebenfalls puffergetränkten Bögen Whatmanpapier abgedeckt. Eventuell eingeschlossene Luftblasen wurden daraufhin mit Hilfe eines Glasröhrchens aus dem Stapel herausgedrückt und dieser schließlich mit der Kathodenplatte abgedeckt.

Der Transfer der Proteine erfolgte dann für die Dauer von 90 min bei einer Stromstärke von 0,9 mA pro cm² Membran- bzw. Gelfläche. Hierbei wurde der Anweisung des Herstellers des Transfersystems entsprechend ein Spannungslimit von 25 V einprogrammiert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran unverzüglich entnommen und entweder zwecks Anfärbung in Coomassie-Lösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250) gelegt oder aber zwecks Immunodetektion zunächst für 2 Stunden in Blocklösung (5% w/v Magermilchpulver, 1% w/v BSA, 0,02% v/v Tween 20, 0,02% v/v Gelatine, in TBS gelöst) zur Absättigung der Membranoberfläche inkubiert.

3.8.2. Detektion mit Seren und Antikörpern

Die immunologische Detektion der geblotteten Gele verfolgte in der Regel das Ziel, die Immunantwort von CF-Patienten zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden verschiedene unbehandelte Humansenen von CF-Patienten unterschiedlichen Infektionsstadiums verwendet.

Die zu untersuchenden Seren wurden zunächst im Verhältnis 1:10 in Blocklösung verdünnt und aliquotiert bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Reduzierung nicht proteinspezifischer Signale wurde vor der Detektion eine Immunpräzipitation der in den Seren enthaltenen nicht proteinbindenden Antikörper durchgeführt.

Hierzu wurde der Zelniederschlag einer stationär gewachsenen 5 ml *Pseudomonas aeruginosa* Kultur in 740 µl H₂O aufgenommen und 10 µl einer Proteinase K Stammlösung (10 mg/ml) zugegeben. Anschließend erfolgte die enzymatische Spaltung der enthaltenen bakteriellen Proteine bei 55°C über Nacht, woraufhin die Proteinase durch zweistündige Inkubation des Ansatzes bei 95°C deaktiviert wurde. Zur Durchführung der Präzipitation wurden 250 µl dieses Ansatzes mit 750 µl des verdünnten Serums gemischt und über Nacht bei 5°C unter Schütteln inkubiert. Die Abtrennung der mit Nichtproteinbestandteilen wie beispielsweise Polysacchariden präzipitierten Antikörper erfolgte darauf durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge. Der Überstand mit den proteinbindenden Antikörpern wurde vor Verwendung für die Detektion bis auf eine Endverdünnung von 1:250 bis 1:750 weiter in Blocklösung verdünnt. Die geeigneten Verdünnungen wurden hierbei gegebenenfalls durch Vorversuche mit geblotteten eindimensionalen Minigelen ermittelt.

Bei Verwendung aufgereinigter kommerziell erhältlicher Antikörper hingegen konnten diese direkt in Blocklösung verdünnt werden. Hierbei wurden Verdünnungen zwischen 1:2000 und 1:7500 verwendet.

Die abgesättigte Membran wurde mit der antikörperhaltigen Blocklösung bedeckt und für mindestens 2 h oder aber über Nacht geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit Wasser abgespült und überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen für je 15 min entfernt (Waschlösung 1: TBS-T; Waschlösung 2: TBS-T + 0,5 M NaCl; Waschlösung 3: TBS-T + 0,5% v/v Triton X-100). Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung des peroxidasegekoppelten sekundären Anti-Human-IgA/G/M - Antikörpers (Jackson Immuno-Research, Verdünnung 1:8000 in Blocklösung) durch zweistündige Inkubation auf einem Laborschüttler. Überschüssige sekundäre Antikörper wurden anschließend wie bereits oben beschrieben abgewaschen und die Membran daraufhin in TBS gelegt.

3.8.3. Chemolumineszenzdetektion

Die Detektion der sekundären Antikörper auf den Membranen erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen 'Lumi-Light' Chemolumineszenz POD-Substrates (Roche Molecular Biochemicals). Das Prinzip dieses Reagenzes beruht auf der Umsetzung von Peroxid durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase und einer anschließenden Chemolumineszenzreaktion des sogenannten Luminols, welche zur Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm führt.

Peroxidlösung und Luminol/Enhancer Lösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Unter abgedunkelten Verhältnissen wurde die Membran mit dieser Lösung benetzt und 5 min inkubiert woraufhin sie zur Vermeidung von Austrocknung zwischen zwei transparente Folien gelegt wurde.

Die Dokumentation des Signals erfolgte dann entweder durch Auflegen eines lichtempfindlichen Filmes (Biomax Light Film, Kodak; Exponierungszeit: 5 s bis zu 45 s) in der Dunkelkammer oder aber durch ein Videokamerasystem (CCD-Kamera LAS-1000 und Intelligent Dark Box, Fujifilm; Exponierungsdauer: 10 s bis zu 5 min)

3.9. Auswertung von 2D-Gelelen

Die hergestellten zweidimensionalen Proteingele waren hinsichtlich auftretender Veränderungen im Proteinmuster, und hierbei insbesondere hinsichtlich vorliegender Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten Morphotypen zu analysieren.

Die einfachste und schnellste Möglichkeit des Vergleiches bestand in der Betrachtung getrockneter Gele auf dem Leuchtschirm, wobei die Proteinmuster übereinander geschoben werden konnten und Proteinspots abweichender Quantität relativ leicht erkannt werden konnten.

Zur detaillierteren Auswertung wurde weiterhin auf spezielle Computerprogramme zurückgegriffen. Eingesetzt wurde hier überwiegend das Programm Phoretix 2D (Nonlinear Dynamics), aber auch das Programm Z3 2.0 (Compugen). Die Auswertung wurde anhand der Handbücher der Programme durchgeführt. Grundsätzlich läuft diese in drei nacheinander abfolgenden Schritten ab. Zunächst erfolgt die Detektion der Spots, dann das sogenannte 'matchen', also die Zuordnung aller Spots zu den Spots der Vergleichsgele und schließlich der

Vergleich der Proteinkomposition hinsichtlich auftretender und nichtauftretender Spots und deren Quantität. Für alle drei Schritte bieten die Programme entsprechende Algorithmen, welche nach manueller Abstimmung geeigneter Parameter eine Teilautomatisierung ermöglichen. Dennoch ist insbesondere in den ersten beiden Schritten stets eine umfassende manuelle Nachbearbeitung der Ergebnisse erforderlich um sinnvolle Daten zu erzielen. In der Spotdetektion beispielsweise waren nicht automatisch erkannte Spots manuell nachzueditieren sowie Bereiche mit hoher Proteindichte manuell in einzelne Spots aufzutrennen, weil dieses vom Programm teilweise nicht geleistet werden konnte.

Grundsätzlich wurde das Programm Phoretix 2D bevorzugt, wenn die Unterschiede bestimmter Proteinspots näher untersucht werden sollten, da dieses Programm hierfür detailliertere Funktionen bietet. Das Programm Z3 war erst im späteren Verlauf dieser Arbeit verfügbar und wurde dann für Vergleiche des Gesamtproteinmusters bevorzugt, da es erheblich verbesserte Möglichkeiten der Proteinspotzuordnung (beispielsweise durch die Anpassung von Laufmusterunterschieden) bietet und einen insgesamt erheblich geringeren Zeitaufwand für die Auswertung erfordert.

3.10. Identifizierung von Proteinen

Moderne massenspektrometrische Methoden zur Proteinidentifizierung wie der Peptidmassenfingerprint durch MALDI-TOF MS (Karas und Hillenkamp, 1988; Hillenkamp et al., 1991) oder die Peptidsequenzierung durch MS/MS stellen gegenüber der klassischen N-terminalen Aminosäuresequenzierung durch sogenannten Edman-Abbau (Edman, 1950; Edman und Begg, 1967) einen gewaltigen Fortschritt hinsichtlich Zeitaufwand und benötigter Probenmenge dar (Yates, 1998). Allerdings erfordert eine Methode wie der MALDI-Fingerprint umfassende Genomsequenzinformationen über den zu untersuchenden Organismus, da die bekannte Gensequenz Voraussetzung für die erfolgreiche Identifizierung des entsprechenden Proteins ist. Da das *Pseudomonas aeruginosa* Genomprojekt innerhalb des zeitlichen Verlaufes dieser Arbeit abgeschlossen wurde, musste auf die Methode der Edman-Sequenzierung nur in Einzelfällen zurückgegriffen werden. Die folgenden Abschnitte beziehen sich daher ausschließlich auf massenspektrometrische Methoden, während auf die Edman-Sequenzierung nur kurz im letzten Abschnitt eingegangen wird.

3.10.1. Vorbehandlung der Proben für MS und Proteasenbehandlung

Bei der Durchführung aller folgenden Schritte wurde stets mit in Wasser gewaschenen Handschuhen gearbeitet, um eine Kontamination der Proben durch Keratin (z.B. aus Hautschuppen) oder PEG ("Weichmacher" der Handschuhe) zu vermeiden.

Das in Wasser gewaschene 2D-Gel wurde auf eine Glasplatte gelegt und die ausgewählten Proteinspots mit einem Korkbohrer von 1-2 mm Durchmesser in ihrem Zentrum ausgestochen. Darauf wurden die Gelstücke mittels eines Skalpells kleingehackt und in Eppendorfgefäße überführt. Nach 15 minütigem Waschen in Bicarbonatpuffer (50 mM NH_4HCO_3) zur Abpufferung im Gel verbliebener Essigsäure und zweimaligem 20 minütigem Waschen in 50% Acetonitril zwecks Auswaschen von störendem Coomassie und Dehydrierung der Gelmatrix wurden die Gelstückchen in einem SpeedVac-Konzentrator im Vakuum für 30 min getrocknet.

Für einen erfolgreichen Peptidmassenfingerprint ist ein einheitlich modifizierter Zustand aller Aminosäureseitenketten im analysierten Protein von besonderer Wichtigkeit, da ansonsten im Peptidspektrum zusätzliche Peptidmassen der nicht- bzw. anders modifizierten Peptide eine sichere Zuordnung zu den Massen eines bestimmten Proteins der Peptidmassendatenbank erschweren würden. Um einen einheitlich modifizierten Zustand aller Cysteinseitenketten im Protein zu gewährleisten wurden die Proben daher nachfolgend erneut reduziert und die freien Schwefelgruppen S-carboxyamidomethyliert.

Hierzu wurden die Gelstückchen mit einer Lösung von 20mM DTT und 100 mM NH_4HCO_3 knapp überschichtet und 30 min bei 56°C inkubiert, woraufhin der Überstand entfernt und durch etwas Acetonitril ersetzt wurde, um das Gel einige Minuten zu dehydrieren. Nach Verwerfen des Acetonitrils erfolgte die dauerhafte Umsetzung der Cysteine mit einer 55mM Iodacetamidlösung für 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Wiederum wurden die Gelstückchen nach Verwerfen der Iodacetamidlösung wie oben beschrieben dehydriert und anschließend mit 200µl 100mM NH_4HCO_3 gewaschen, um nach erneuter Dehydrierung in der SpeedVac getrocknet zu werden.

Zur spezifischen Spaltung der Proteine in definierte Peptide wurde modifiziertes und somit gegen Autodigestion geschütztes Trypsin der Firma Promega verwendet. Dieses wurde nach Angaben des Herstellers zunächst für 15min bei 30°C in 50mM Essigsäure aktiviert und anschließend in einer 1:100 Verdünnung in 50mM NH_4HCO_3 direkt für die enzymatische Reaktion eingesetzt. Hierzu wurden die getrockneten Gelstückchen im Eppendorfgefäß mit

ca. 15-30 µl Trypsinlösung knapp bedeckt und im rehydrierten Zustand über Nacht bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Proteinfragmente in mehreren Schritten aus der Gelmatrix eluiert. Hierzu wurden zunächst 20µl 25mM NH₄HCO₃ zugegeben und die Probe für 15 min bei 37°C geschüttelt, woraufhin weitere 60µl Acetonitril zugegeben wurden. Nach erneutem 15 minütigem Schütteln bei 37°C wurde der Überstand (Eluat 1) in ein neues Gefäß überführt. Die zweite Eluierung erfolgte mit 50µl 5% Ameisensäure und anschließender Zugabe der gleichen Menge Acetonitril ebenfalls bei jeweils 15 minütigem Schütteln bei 37°C. Anschließend wurden die beiden Eluate vereinigt und in der SpeedVac eingetrocknet.

Guanidierung von Lysinresten

Bei der tryptischen Spaltung von Proteinen entstehen Peptide mit terminalen Lysinen und solche mit Argininen. Eine Analyse größerer Anzahlen von Maldi-TOF Spektren zeigt eine deutliche Überrepräsentation der Massen argininhaltiger Peptide, wohingegen die Massenwerte der Peptide mit terminalem Lysin häufig verlorengehen (Krause et al., 1999).

Diese apparative Unzugänglichkeit der lysinhaltigen Peptide kann durch chemische Umsetzung der Lysine zu Homoarginin umgangen werden (Hale et al., 2000; Brancia et al., 2001). Aus diesem Grunde wurde im Verlaufe dieser Arbeit dazu übergegangen, eine Modifizierung der Proben durch Guanidierung der Lysine vorzunehmen (Kimmel, 1967; Beardsley et al., 2002).

Zur Guanidierung der Lysine wurden die eluierten Peptide nicht wie oben beschrieben gänzlich lyophilisiert, sondern das Eluat in der SpeedVac nur bis auf ein Volumen von ca. 20µl eingengt. Dieses Konzentrat wurde im Verhältnis 1:1 mit einer frisch angesetzten 0,5M O-Methylisoharnstoff-Lösung (pH = 10,5) versetzt. Nachdem der pH-Wert erneut kontrolliert und gegebenenfalls auf einen Wert von mindestens 8 eingestellt wurde, wurde die Probe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1% TFA in Wasser abgestoppt und die Probe damit gleichzeitig für die ZipTip-Aufreinigung angesäuert.

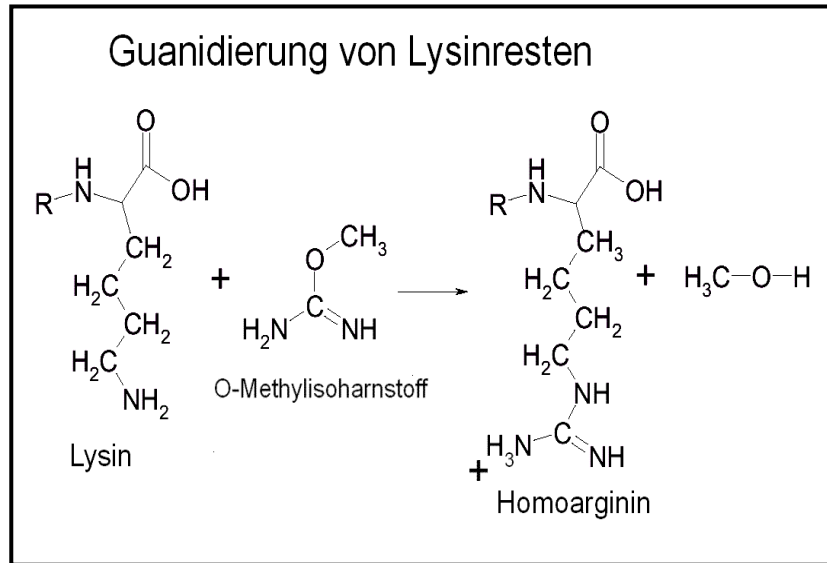


Abb. 4: Guanidierung von Lysinresten. Durch die Umsetzung von Lysinen zu Homoarginin können die entsprechenden Peptide massenspektrometrisch besser dargestellt werden. Es ergibt sich eine Massenzunahme des Peptides von 42,02 Da.

3.10.2. Aufreinigung der Peptide

Zwecks Entsalzung und Aufkonzentrierung der zu untersuchenden Peptide wurden die Proben mit ZipTips der Firma Millipore vorbehandelt. Hierbei handelt es sich um Pipettenspitzen mit eingebrachtem Chromatographiematerial geringen Volumens, in welchem die Peptide gebunden, gewaschen, und anschließend in sehr kleinen Volumina wieder eluiert werden können. Zur unmittelbaren Eluierung der gesamten Probe auf ein MALDI-Target wurden ZipTip_{μC18} (Volumen des Chromatographiematerialbettes 0,2 μl; Elutionsvolumen ≤ 1 μl) eingesetzt. Wurde hingegen in Eppendorfgefäße eluiert, um einen Teil der Probe für eventuelle MS/MS-Analysen aufzubewahren, so wurden ZipTip_{C18} ausgewählt (Materialbett: 0,6 μl; Elutionsvolumen: 1-4 μl).

Lyophilisiert vorliegende Peptide wurden vor der Aufreinigung in 10 μl Waschlösung (0,5% Ameisensäure, 5% Methanol) in Lösung gebracht. Im Falle einer zuvor durchgeführten Guanidierung hingegen wurde lediglich der pH-Wert der Probe überprüft, welcher für die ZipTip-Reinigung im sauren Bereich liegen muss. Gegebenenfalls wurde dieser mit TFA eingestellt und die Proben konnten direkt weiterverwendet werden.

Die ZipTips wurden zunächst durch mehrmaliges Pipettieren einer Lösung von 0,5% Ameisensäure und 65% Methanol gewaschen und anschließend durch Pipettieren von Waschlösung äquillibriert. Anschließend erfolgte das Binden der Peptide am Trägermaterial durch zehnmaliges langsames Pipettieren der Probe, gefolgt von der Aufreinigung durch fünfmaliges Pipettieren von je 10 µl frischer Waschlösung. Anschließend wurden die gereinigten Peptide durch mehrmaliges herauf- und herunter - Pipettieren von 5 µl Elutionslösung (0,5% Ameisensäure, 65% Methanol) in ein Eppendorfgefäß eluiert. Zur Vorbereitung der MS-Analyse wurden dann 0,5 µl Eluat mit 0,5 µl matrixgesättigter Elutionslösung durchmischt (Matrix: α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) und diese Probe auf einen Probenpunkt des sogenannten MS-Targets plaziert.

Sollte hingegen wegen geringerer Probenmenge alternativ direkt auf ein MALDI-Target eluiert werden, so wurde der Elutionslösung zuvor α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure bis zur Sättigung (ca. 10 µg/ml) zugegeben und dann mit dieser Lösung und einem Volumen von 1 µl direkt aus dem ZipTip auf einen Probenspot des Targets eluiert.

Die Proben auf den Targets wurden anschließend bei Zimmertemperatur eingetrocknet und innerhalb der Zeitdauer eines halben Tages (maximal) im Massenspektrometer analysiert.

3.10.3. MALDI-TOF MS

Die Methode des 'Peptidmassenfingerprintes' basiert auf der massenspektrometrischen Bestimmung der Massen möglichst vieler spezifischer Fragmente (Peptide) eines Proteins nach einer enzymatischen Spaltung. Die erhaltenen Massenwerte stellen in ihrer Gesamtheit ein individuelles Peptidmassenmuster ("Fingerabdruck") eines jeden Proteins dar und können so zur Identifizierung des Proteins durch Suche in speziellen Peptidmassendatenbanken verwendet werden. Diese Datenbanken basieren teilweise auf klassischen Proteindatenbanken sowie zum überwiegenden Teil auf errechneten hypothetischen Peptidmassen, abgeleitet von vorhergesagten offenen Leserahmen im Genom. Die Menge dieser Informationen ist seit der Durchführung zahlreicher Genomsequenzierungsprojekte erheblich angewachsen. Der Abschluß des *Pseudomonas aeruginosa* Genomprojektes (Stover et al., 2000) und die Bereitstellung ständig aktualisierter Genominformationen in Onlinedatenbanken (Croft et al., 2000) ermöglichte den Einsatz des Peptidmassenfingerprintes als Standardmethode zur Proteinidentifizierung in dieser Arbeit.

Zur Messung exakter Peptidmassen diente die Methode der MALDI/TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization / Time Of Flight - Mass Spectrometry). Bei dieser Methode wird eine metallische Oberfläche (das sogenannte Target), auf welcher die zu messenden Peptide mit einer Matrixsubstanz (z.B. α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) kokristallisiert wurden, in das Gerät eingebracht und dieses evakuiert. Bei der Messung werden die Peptide dann durch einen gepulsten Laserbeschuss niedriger Energie ionisiert, wobei die verwendete Matrixsubstanz als Protonendonator dient. Anschließend werden die Peptidionen im elektrischen Feld beschleunigt, in einer Reflektoreinheit umgelenkt, um schließlich auf die Detektionseinheit des Gerätes zu treffen (Abb. 5). Die Messung der exakten Flugzeit ermöglicht dann im kalibrierten System die Ermittlung des Masse- zu Ladungs-Verhältnisses (m/z). Die Ladung eines Peptidpeaks im Spektrum wiederum läßt sich anhand des Isotopenspektrums des Peptides ermitteln was eine sehr präzise Bestimmung der Peptidmasse ermöglicht. Die Auswertung der Massen wird durch den Umstand erleichtert, dass in der MALDI/TOF-MS im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Methoden fast ausschließlich einfachgeladene Peptide messbar sind (Karas et al., 2000).

Verwendet wurde ein Reflex MALDI/TOF Massenspektrometer der Firma Bruker-Daltronik, welches durch Umrüstung auf 'Delayed Extraction Fähigkeit' (Brown und Lennon, 1995) modifiziert wurde und über einen N_2 -Laser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) verfügt. Nach Einschleusung des Proben Targets wurde das Gerät evakuiert und die Peptidproben nacheinander im 'delayed-extraction Modus' bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV und einer Reflektorspannung von 21,5 kV gemessen. Die Messungen erstreckten sich über einen Zeitraum von mindestens 100 Laserimpulsen und die Messwerte wurden automatisch aufaddiert. Hierbei wurde der Fokusbereich des Lasers zur Optimierung der Spektren gegebenenfalls langsam über den Probenbereich geführt und die Laserspannung angepaßt.

Eine Kalibrierung der Meßwerte erfolgte durch Eichpeptide bekannter Masse, welche auf einzelne Probenpunkten des Targets aufgetragen worden waren und zur Kalibrierung der Werte der jeweils benachbarten Probenspots herangezogen wurden. Die derartig erhaltenen Spektren lieferten in der Regel klar auswertbare Peptidmassen im Bereich von etwa 800-3000 Da bei einer Massenungenauigkeit von 150 ppm und weniger.

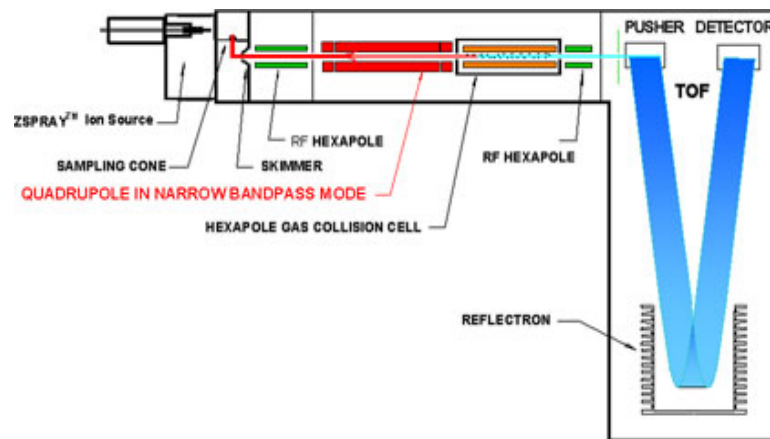


Abb. 6: Schematische Darstellung eines QTOF-Massenspektrometers. Im Quadrupol wird ein einzelnes Peptid ausgewählt und in die Kollisionszelle des Gerätes geführt. Dort kommt es zur unspezifischen Spaltung der Peptide, woraufhin die Massen- zu Ladungsverhältnisse der entstandenen Fragmente in einer 'Time Of Flight-Einheit' bestimmt werden.

Im QTOF-Massenspektrometer (Abb. 6) wird die eingesprühete Probe ionisiert und im elektromagnetischen Feld beschleunigt. In der Quadrupol-Einheit des Gerätes läßt sich dann ein einzelnes in der Probe enthaltenes Peptid auswählen und gezielt in die sogenannte Kollisionszelle führen. In dieser Kollisionszelle kommt es durch Kollision der Peptidmoleküle mit Argonatomen zur unspezifischen Fragmentierung des Peptides. Die resultierenden Fragmente treten daraufhin in die 'Time Of Flight-Einheit' des Gerätes ein und werden hier, wie bereits vom MALDI/TOF-MS bekannt, beschleunigt, reflektiert und schließlich detektiert. Auch hier erlaubt die Messung der Flugzeit die Bestimmung der molekularen Massen- zu Ladungsverhältnisse. Anhand des Isotopenspektrums des sogenannten Mutterpeptides, also des Peptides, welches zur Fragmentierung ausgewählt wurde, kann die Ladung desselben bestimmt werden und mit dieser Information die Massen der Fragmente ermittelt werden. Die Fragmentierungen können an unterschiedlichen Bindungen innerhalb der Peptide auftreten, jedoch werden im Fragmentspektrum fast ausschließlich die sogenannten 'b' und 'y' Fragmente detektiert. Es handelt sich hierbei um die C- und N-terminalen Fragmente einfachfragmentierter Peptidmoleküle, bei welchen eine beliebige Peptidbindung gespalten wurde. Durch Analyse der Massendifferenzen in diesem Spektrum kann auf die Aminosäuresequenz des Peptides zurückgeschlossen werden.

3.10.5. Auswertung der Rohdaten und Identifizierung der Proteine in Datenbanken

MALDI/TOF-MS

Die in der massenspektrometrischen Analyse erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogrammes 'Data Analysis for TOF 1.6g' (Bruker Daltronik) ausgewertet. Im Anschluss an die automatische Detektion der im Spektrum enthaltenen Peaks mussten die Resultate manuell überprüft und nachbearbeitet werden. Detektierte Peaks, welche von anderen Isotopenformen als dem monoisotopischen Peptid herrührten, wurden entfernt, da zur Datenbanksuche ausschließlich die monoisotopischen Massenwerte herangezogen wurden. Ebenso wurden Peaks, welche offensichtlich nicht von Peptiden sondern von Verunreinigungen stammten, erkennbar an dem im Spektrum charakteristischen Isotopenmuster der Peptide, entfernt. Eventuell nicht automatisch erkannte monoisotopische Peptidpeaks wurden nachträglich manuell detektiert. Anschließend wurde eine Peptidmassenliste generiert, welche zur Datenbanksuche herangezogen wurde.

Die Datenbanksuche wurde entweder mit dem internetbasierten Suchwerkzeug PeptIdent (<http://us.expasy.org/tools/peptident.html>) oder aber über Zugriff auf einen Computerserver der GBF Braunschweig mit dem Computerprogramm Protein Prospector (University of California) durchgeführt. Mit dem Programm Protein Prospector wurde in einer lokal installierten NCBI-Datenbank gesucht, welche unter anderem die kompletten Genomsequenzinformationen von *Pseudomonas aeruginosa* umfasste. Diese Datenbank wurde in regelmäßigen Abständen aktualisiert, um neu hinzugefügte Annotierungen zu erfassen.

Im späteren Verlauf wurde zusätzlich das Programm Knexus /MS (ProteoMetrics) verfügbar. Mit Hilfe dieses Programmes wurde es möglich, die manuelle Spektrenanalyse zu umgehen und die Schritte der Peakdetektion einerseits und Datenbanksuche in einer NCBI-Onlinedatenbank andererseits voll zu automatisieren. Bei Einsatz dieses Programmes wurde dann nur noch bei nicht absolut sicher identifizierten Proteinen auf die manuelle Analyse zurückgegriffen. Dies war zum Beispiel bei problematischen MS-Spektren der Fall.

QTOF-MS

Zur Auswertung der QTOF-Rohdaten wurde das Computerprogramm MassLynx 4.0 (Micromass) nach den Angaben des Anwenderhandbuches eingesetzt. Das Spektrum des Mutterpeptides wurde anhand der Massendifferenzen der verschiedenen Isotopformen auf die Ladung desselben überprüft. Diese Ladung wurde dem Fragmentspektrum zugewiesen, wodurch die Massenbestimmung der Fragmente automatisch erfolgte. Zur Analyse der Fragmentdaten wurde manuell ein Zeitfenster von einsetzender bis hin zu vollständiger Fragmentierung ausgewählt und die Messwerte automatisch aufaddiert. Die Zuordnung der Massendifferenzen zu den im Spektrum enthaltenen Fragmentserien und die daraus resultierende Sequenzbestimmung erfolgte automatisiert.

Die Datenbanksuche mit den erhaltenen Informationen erfolgte über das Datenbanksuchhilfsmittel Sonar ms/ms (Proteometrics) in einer vollständigen NCBI-Datenbank im Internet.

3.10.5. N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman-Abbau

Auf N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman-Abbau wurde nur in Einzelfällen vor der Verfügbarkeit des QTOF-Massenspektrometers zurückgegriffen.

Die im zweidimensionalen Gel enthaltenen Proteine wurden zu diesem Zweck auf PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie R-250 angefärbt. Die zu analysierenden Proteinspots wurden anschließend aus der Membran ausgeschnitten und in der Abteilung Strukturanalyse der GBF Braunschweig sequenziert. Hierzu wurde ein Proteinsequenzierer Procise 494 A (Applied Biosystems) verwendet. In der Regel konnten im Anschluß an den automatisierten Sequenzierungsvorgang N-terminale Sequenzen von etwa 20 Aminosäuren erzielt werden. Mit diesen Informationen wurden sogenannte BLASTP-Homologiesuchen in Internetdatenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse des zweidimensionalen Proteinmusters der verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Erfahrungen in der Proteomanalyse beim Organismus *Pseudomonas aeruginosa* vor. Aus diesem Grund mussten zunächst geeignete Versuchssprotokolle etabliert und für die durchzuführenden Untersuchungen optimiert werden. Dies betraf sowohl die Vorgehensweise bei der Herstellung der Proteinextrakte und den damit verbundenen Einsatz geeigneter Solubilisierungslösungen als auch die sinnvolle Auswahl von pH-Gradienten in der isoelektrischen Fokussierung und von Acrylamidgradienten in der zweiten Dimension der 2D-GE.

Weiterhin wurden Methoden zur Fraktionierung der komplexen Proteingemische gefunden und geeignet modifiziert, um eine möglichst große Zahl an Proteinen der zweidimensionalen Proteingelanalyse zugänglich zu machen.

Schließlich wurden auch unterschiedliche Färbemethoden ausgetestet und geeignete Protokolle für die jeweiligen Untersuchungen standardisiert.

4.1.1. Auftrennung zellulärer und sekretorischer Proteine

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese der zu untersuchenden *P. aeruginosa* Stämme wurde zunächst von zwei unterschiedlichen Ansätzen ausgegangen. Einerseits sollten hochkomplexe sogenannte Gesamtzellextrakte untersucht und hierbei eine möglichst große Anzahl an Proteinen der Untersuchung zugänglich gemacht werden. Andererseits sollten aber auch sekretorische Proteine untersucht werden. Aus diesem Grund wurden sowohl aus den Zelniederschlägen als auch aus den Überständen von Flüssigkulturen Proteinextrakte angefertigt.

Zelluläre Proteinextrakte

Zur Optimierung der Präparation von *Pseudomonas aeruginosa* Gesamtzellextrakten wurden zunächst verschiedene in der Literatur der Proteomanalyse für andere bakterielle

Organismen beschriebene Verfahren getestet. Dies betraf zum einen die Methoden des Zellaufschlusses wie beispielsweise den Einsatz eines Ultraschallstabes (Qi et al., 1996), die Lyophilisierung des Zelniederschlages vor der Aufnahme in Solubilisierungslösung (Molloy et al., 1998), das Aufkochen der Zellen in Lysepuffer (Pridmore et al., 1999) oder aber auch den Einsatz einer 'french press' (Langen et al., 1997). Weiterhin wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Solubilisierungslösungen getestet und die erzielten Resultate verglichen.

Hinsichtlich der Qualität der erzielten Gele und der Standardisierbarkeit der etablierten Protokolle erwies sich die Methode des Ultraschallaufschlusses als am geeignetsten. Den entscheidenden Vorteil gegenüber der 'french press' stellte die Möglichkeit dar, den Aufschluss ohne späteren Pufferwechsel direkt in Solubilisierungslösung durchführen zu können. Mit dieser Präparationstechnik konnten die zweidimensionalen Proteingele mit den meisten klar aufgetrennten Proteinspots erzielt werden. Durch die Beschallung in Solubilisierungslösung konnte darüberhinaus eine weitaus effektivere Zellyse als in herkömmlichen Pufferlösungen erzielt werden. Nach anfänglicher Kontrolle des Zellaufschlusses im Phasenkontrastmikroskop konnten Beschallungsdauer und Zentrifugationszeiten standardisiert werden.

Von den getesteten Solubilisierungslösungen konnten mit der verbesserten Lösung mit 2 molarer Thioharnstoffkonzentration nach Rabilloud (1998) die besten Resultate erzielt werden.

Die 2D-Gele wurden mit verschiedenen in der Literatur beschriebenen Färbemethoden gefärbt und die Resultate verglichen. Als sensitivste der getesteten Färbemethoden erwies sich die Silbernitratfärbung nach Blum (1987). Diese Färbung zeigte verglichen mit anderen Silberfärbeprotokollen bei den vorliegenden 2D-Gelen die geringste Hintergrundanfärbung bei höchster Sensitivität. Da die Färbemethode ursprünglich für weitaus kleinere und dünnere Acrylamidgele beschrieben worden war, wurden die Zeitdauern der einzelnen Schritte der Färbung modifiziert und für die in dieser Arbeit erstellten 2D-Gele optimiert. Dieses modifizierte Protokoll wurde für die Anfärbung analytischer 2D-Gele standardisiert.

Bei der Anfärbung präparativer 2D-Gele konnten mit kolloidaler Coomassiefärbung (Neuhoff, 1988) erheblich bessere Resultate als mit herkömmlicher Coomassiefärbung erzielt werden. Auch im Vergleich zu kommerziell erhältlichen kolloidalen

Coomassielösungen erwies sich das Färbeprotokoll nach Neuhoff als sensitiver. Daher wurde diese Färbemethode für die Färbung präparativer 2D-Gele standardisiert.

Nach Etablierung der Färbemethoden wurden probenabhängig geeignete Proteinmengen ermittelt, welche in den späteren vergleichenden Gelanalysen standardmäßig in jedem 2D-Gel analysiert wurden.

Proteinextrakte der Kulturüberstände

Zur Untersuchung der extrazellulär vorhandenen *P. aeruginosa* Proteine wurden verschiedene Verfahren getestet, mit dem Ziel, die in den Kulturüberständen vorhandenen Proteine für die 2D-GE aufzukonzentrieren. Um eine Kontamination der bakteriellen Proteine mit Medienbestandteilen zu vermeiden wurde in den Flüssigkulturen ausschließlich mit Minimalmedium gearbeitet.

Die Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration mittels einer Filtron-Membran (Ausschlußmasse: 10 kDa) führte nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Das erhaltene Retentat war von viskoser Konsistenz, offensichtlich aufgrund enthaltener Biopolymere. Dies verhinderte eine effektive isoelektrische Fokussierung und führte zu horizontaler Streifenbildung in den 2D-Gelen. Außerdem konnten mittels der Ultrafiltration keine ausreichenden Proteinkonzentrationen erreicht werden, die die Anfertigung präparativer 2D-Gele erlaubt hätten.

Versuche mit verschiedenen Proteinpräzipitationstechniken zeigten zunächst das Problem, dass die präzipitierten Proteine für die 2D-Analyse anschließend nicht mehr vollständig solubilisiert werden konnten. Dieses Problem konnte schließlich mit einer kombinierten TCA/Aceton-Präzipitation umgangen werden. Mit Hilfe der TCA-Präzipitation war es möglich, auch größere Volumina an Untersuchungsmaterial einzusetzen. Die anschließende Acetonbehandlung führte zu einer Reinigung des Probenmaterials von verbliebener Säure, wodurch der Verlust an Probenmaterial im darauffolgenden Solubilisierungsschritt minimiert werden konnte.

Auf diese Weise konnten Proteinproben mit ausreichend hoher Konzentration hergestellt werden und die hiermit anfertigten 2D-Gele zeigten ein klares Proteinmuster ohne störende Probeneinflüsse.

4.1.2. Auswahl geeigneter Gradienten

Ein zweidimensionales Proteingel kann stets nur einen Ausschnitt aus dem Gesamtproteom darstellen. Neben Faktoren wie der unzureichenden Menge oder der Hydrophobizität verschiedener in der Probe enthaltener Proteine ist dieser Ausschnitt durch die Auswahl der Auftrennungsbedingungen begründet. Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt der untersuchten Proteine müssen innerhalb der Grenzen liegen, die im apparativen System vorgegeben sind, um eine Darstellung der Proteinspots im Gel zu erlauben.

Da sich die zweidimensionalen Proteinmuster verschiedener Organismen zum Teil erheblich unterscheiden, ist eine Anpassung der pH-Gradienten in der IEF sowie der Porengröße der Polyacrylamidgele in der zweiten Dimension der 2D-GE erforderlich, um die Auftrennung der untersuchten Proteine zu optimieren.

In den anfänglichen Analysen der *P. aeruginosa* Gesamtzellextrakte wurde zunächst mit weiten pH-Gradienten (pH 3-10) gearbeitet (Abb. 7a). In diesen 2D-Gelen konnten bei Silberfärbung mit Hilfe der 2D-Auswertesoftware ca. 800 bis 1000 Proteinspots detektiert werden. Im Proteinmuster dieser Gele zeigte sich eine Anhäufung der meisten Proteinspots im leicht sauren Bereich. Aus diesem Grund wurden weitere 2D-Analysen mit engeren pH-Gradienten (pH 4-7) durchgeführt. Die Auftrennung in diesem Bereich mit hoher Dichte an Proteinspots konnte hierdurch verbessert werden (Abb. 7b). Weiterhin wurden verschiedene Acrylamidkonzentrationen bei der Herstellung der SDS-Gele für die zweite Dimension getestet. Nach dem anfänglichen Einsatz einer homogenen Acrylamidkonzentration von 15% T (Abb. 7a) wurde schließlich ein Acrylamidgradient von 12-15% T für alle weiteren Standarduntersuchungen ausgewählt. Dieser Gradient führte zu einer verbesserten Auflösung im höhermolekularen Bereich der Gele und zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Spots im zweidimensionalen Proteinmuster (Abb. 7b).

In derartigen Gelen konnten trotz des Wegfallens von Proteinspots aus den Randbereichen der vorherigen Gele weitaus mehr Proteinspots detektiert werden (ca. 1200 bis 1500, abhängig von der Probe). Diese höhere Anzahl von Proteinspots ist zum einen durch die höhere Auflösung zu erklären, wodurch eng beieinander liegende Proteinspots voneinander getrennt werden konnten und zum anderen durch die insgesamt höhere

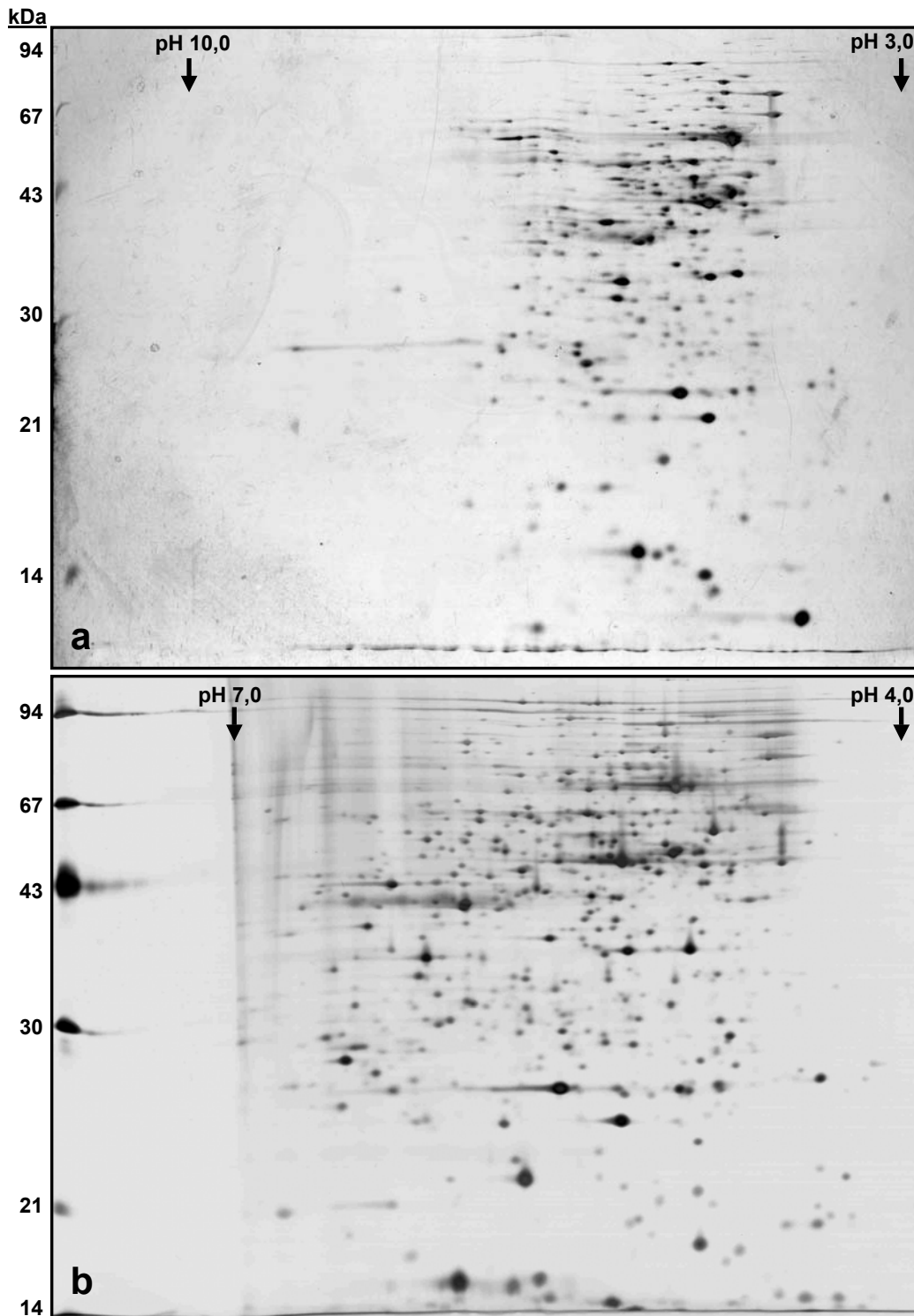


Abb. 7: Zweidimensionales Proteinmuster eines *P. aeruginosa* Gesamtzellextraktes bei verschiedenen Auftrennungsbedingungen. a: pH-Gradient 3-10, Acrylamidkonzentration im Gel homogen 15%, Proteinmenge 25 µg, Silberfärbung; b: pH-Gradient 4-7, Acrylamidkonzentrationsgradient in vertikaler Richtung 12-15%, Proteinmenge 35 µg, Silberfärbung. Durch bessere Ausnutzung der zur Auftrennung zur Verfügung stehenden Gelfläche und höhere Auslösung sind in Gel b etwa doppelt so viele Proteinspots wie in Gel a detektierbar.

Proteinauftragsmenge, welche im flacheren Gradienten durch das Auswandern von Probenbestandteilen ermöglicht wird. Durch diese erhöhte Auftragsmenge wurden auch weitere schwächer exprimierte Proteine in den Gelen sichtbar.

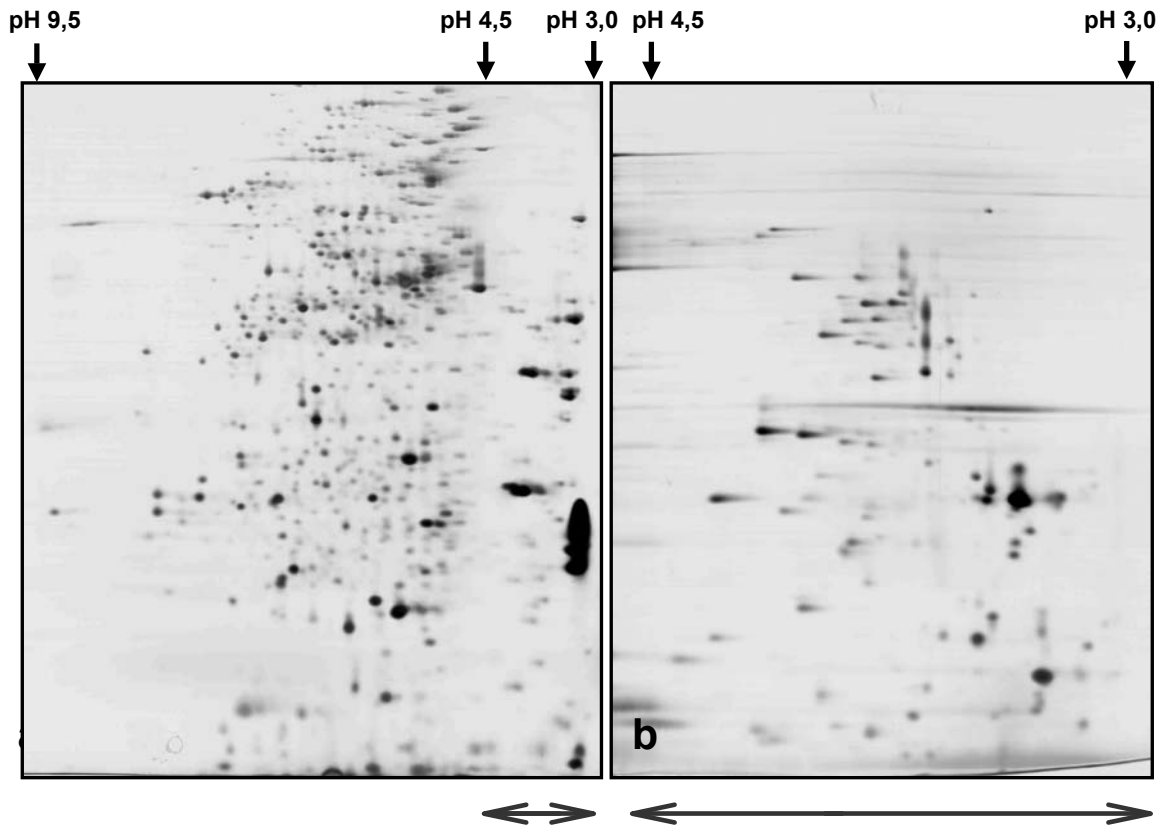


Abb. 8: Hochauflösung eines speziellen Bereiches des zweidimensionalen Proteinmusters im Zoom-Gel. Dargestellt sind Ausschnitte zweier verschiedener 2D-Gele in welchen der gleiche Proteinextrakt in einem weiten und in einem sehr schmalen pH-Bereich aufgetrennt wurde. Der verwendete Proteinextrakt wurde aus dem Kulturüberstand einer spätexponentiellen *P. aeruginosa* Kultur präpariert. **a:** Auftrennung im pH-Gradienten 3-10, Auftragsmenge: 25 µg Protein, die sekretorischen Proteine im rechten (sauren) Bereich des Gels sind nur unvollständig in Einzelspots aufgetrennt. **b:** Auftrennung im selbst angefertigten IPG pH 3-5, Auftragsmenge: 50 µg Protein, die Proteine im pH-Bereich 3-5 wurden hochauflösend aufgetrennt und sind so der weiteren Analyse zugänglich.

Auch bei der Untersuchung der Proteinextrakte der Kulturüberstände konnten enge pH-Gradienten (sogenannte Zoom-Gele) erfolgreich eingesetzt werden um gezielt einzelne Gruppen von Proteinen näher zu untersuchen. Mit Hilfe selbst hergestellter immobilisierter pH-Gradienten, welche nicht kommerziell erhältlich waren, war es

beispielsweise möglich, auch vergleichsweise schlecht auftrennbare Proteine im Randbereich der herkömmlichen weiten pH-Gradienten der gezielten Analyse zugänglich zu machen (Abb 8).

Solche 2D-Analysen in extremen pH-Bereichen stellen jedoch einen Sonderfall dar. In der standardisierten Vorgehensweise wurde auch bei den Untersuchungen der Kulturüberstandsproteine in der Regel der pH-Gradient 4-7 bevorzugt, da hier die größte Anzahl an Proteinen innerhalb eines Experimentes untersucht werden konnte.

4.1.3. Zeitliche Dynamik der zweidimensionalen Proteinmuster

Durch vergleichende 2D-Gelanalyse von Proteinextrakten, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung präpariert worden waren, wurde schnell deutlich, dass das Proteinexpressionsmuster der verwendeten *P. aeruginosa* Stämme während des Wachstums der Kulturen einer beträchtlichen Dynamik unterliegt.

Aus diesem Grund wurden die zeitlichen Veränderungen im Proteinmuster während der Kultivierung bei den verwendeten Stämmen näher untersucht. Der Beobachtungszeitraum dieser Untersuchungen erstreckte sich von der frühen exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von 0,5 bis hin zur Eintrittsphase in stationäre Kulturen. Die maximal erreichten optischen Dichten der Kulturen variierten bei den untersuchten Stämmen zwischen $OD_{600} = 1,2$ und $OD_{600} = 2,7$, wobei die Dauer der Kultivierung bei allen Stämmen in Minimalmedium etwa 2,5 Tage betrug.

Die Versuche zeigten, dass hinsichtlich der Dynamik der Proteinmuster deutlich zwischen Gesamtzellextrakten einerseits und Kulturüberstandsextrakten andererseits unterschieden werden muss. Während die Gesamtzellextrakte ein relativ konstantes Proteinmuster aufwiesen, konnten bei den Proteinen der Kulturüberstände bei allen *P. aeruginosa* Stämmen um so stärkere zeitliche Veränderungen beobachtet werden.

In den 2D-Mustern der Gesamtzellextrakte konnten bis zu 80% der Proteinspots über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg detektiert werden. Allerdings konnte über diese Beobachtung hinaus bei vielen weiteren Proteinspots eine Zunahme der Proteinmenge über den Kultivierungszeitraum festgestellt werden. Seltener wurde eine zeitlich bedingte relative Abnahme der Intensität einzelner Proteinspots im 2D-Muster beobachtet.

Bei den Analysen der Kulturüberstände hingegen war eine annähernd vollständige Veränderung der Proteinmuster zu beobachten. In den zweidimensionalen Proteingelen der

Frühstadien der Kulturen waren nur äußerst reduzierte Proteinmuster sowie bei der Extraktpräparation eine sehr geringe Probenausbeute zu beobachten. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer wurden die Proteinextrakte dann aber bei allen untersuchten Stämmen zunehmend komplexer. Auch die Gesamtausbeute an Proteinmenge aus einem identischen Probenvolumen vervielfachte sich von der frühen bis zur späten Wachstumsphase. Die überwiegende Anzahl der detektierten Proteinspots konnte überhaupt erst in den späteren Stadien der Kultivierung beobachtet werden. In Abb. 9 sind zur Veranschaulichung zwei 2D-Gele einer Kultur dargestellt, welcher zum Zeitpunkt des Erreichens einer optischen Dichte von 1,0 sowie von 2,0 Überstandsproben entnommen wurden. Es läßt sich leicht erkennen, dass die Anzahl an Proteinspots in diesem Versuch während des Wachstums dramatisch zugenommen hat. Einzelne, im Frühstadium dominierende Proteine, scheinen im zeitlichen Verlauf auch abzunehmen. Dies ist jedoch höchstwahrscheinlich auf den relativen Anteil dieser Proteine an der Gesamtproteinmenge zurückzuführen und nicht unbedingt auf ihre absolute Menge.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die zeitlichen Veränderungen der Proteinzusammensetzung waren von Bedeutung für die durchzuführenden vergleichenden Proteomanalysen der unterschiedlichen Morphotypen der *P. aeruginosa* Stämme.

Diese wurden im folgenden ebenfalls mit Extrakten verschiedener Kultivierungszeitpunkte geplant um ein umfassendes Bild eventueller Expressionsunterschiede im Verlaufe der Wachstumsstadien zu erhalten. Beim direkten Vergleich von Proteinextrakten unterschiedlicher Kulturen hingegen wurden Kultivierungsdauer und Kulturdichte strikt gleichgehalten um die zeitlichen Veränderungen des Proteoms beim Vergleich der Morphotypen ausschließen zu können.

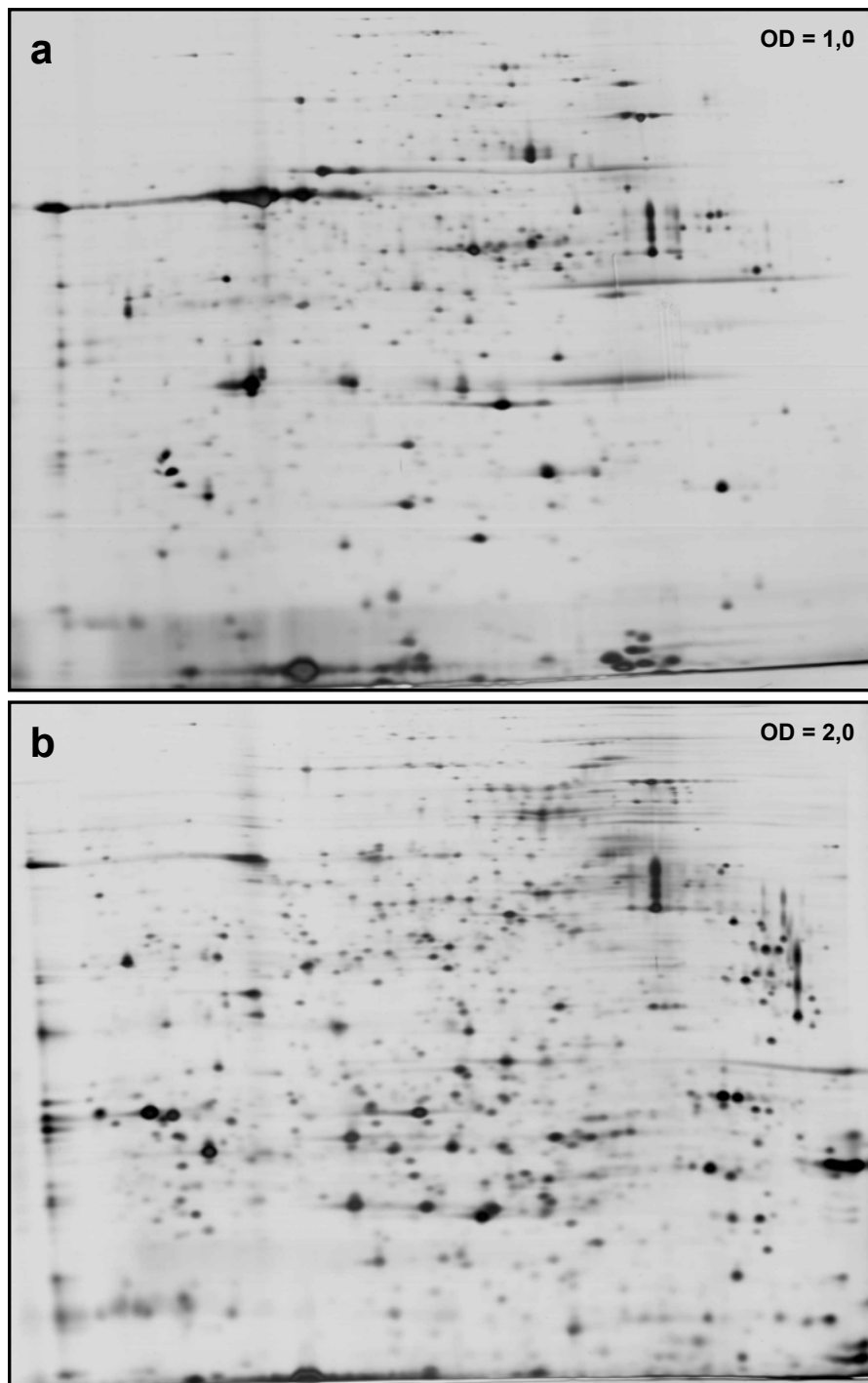


Abb. 9: Zeitliche Veränderungen im zweidimensionalen Proteinmuster des Kulturüberstandes einer wachsenden *P. aeruginosa* Kultur. Aufgetrennt wurden zwei zeitlich versetzt entnommene Proteinproben einer *P. aeruginosa* Kultur in VB-Minimalmedium. Die aufgetragene Probenmenge betrug jeweils 35 µg der aus den Kulturüberständen präparierten Proteine. Die Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt. a: zweidimensionales Proteinmuster der Überstandsproteine bei einer optischen Dichte von 1,0; Kultivierungszeit 17 Stunden; b: zweidimensionales Proteinmuster der Überstandsproteine bei einer optischen Dichte von 2,0; Kultivierungszeit 40 Stunden. Die Anzahl an Proteinspots im späteren Extrakt ist beträchtlich erhöht.

4.1.4. Vergleich der untersuchten *P. aeruginosa* Stämme

Zu Beginn der Experimente wurden insgesamt sechs verschiedene *Pseudomonas aeruginosa* Stämme zur Proteomanalyse herangezogen. Es handelte sich hierbei zum Einen um den Referenzstamm PA01 und zum Anderen um fünf Patientenisolate der Medizinischen Hochschule Hannover mit den Bezeichnungen 33, 61, 211, 17997 und 20265.

Von jedem dieser Stämme stand sowohl ein SCV-Isolat als auch ein *in vitro* isolierter revertierter Phänotyp zur Verfügung, im Falle des Referenzstammes PA01 lag selbstverständlich die Wildtypform des Stammes vor und es handelte sich hier auch bei dem 'Small Colony'-Typ um ein *in vitro*-Isolat. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnten dann von den Stämmen 211 und 20265 auch die klonal identischen Wildtypformen aus eingelagerten Sputumproben der selben Patienten isoliert werden.

Wenn Erkenntnisse über das Proteinexpressionsprofil oder aber auch nur Informationen über einzelne bereits identifizierte Proteine eines Stammes auf einen anderen Stamm übertragen werden sollen, ist dies nur möglich, wenn die Spots im Proteinmuster beim Vergleich der 2D-Gele der Stämme einander zugeordnet werden können. Dies wiederum ist aber nur bei einer größeren Ähnlichkeit der 2D-Muster praktikabel. Aus diesem Grund war die Fragestellung von Interesse, in welchem Umfang Unterschiede in den zweidimensionalen Proteinmustern der verschiedenen Stämme zu beobachten sein würden.

Eine vergleichende 2D-Analyse führte auch bei dieser Untersuchung zu dem Ergebnis, dass das extrazelluläre Subproteom eine weitaus höhere Variabilität aufweist als jenes der zellulären Extrakte.

Beim zweidimensionalen Vergleich der Gesamtzellextrakte war es durchaus möglich, Proteine einzelner Stämme den entsprechenden Proteinen der anderen Stämme aufgrund ihrer Position im charakteristischen 2D-Muster zuzuordnen. Ein Beispiel für die Ähnlichkeit der 2D-Muster unterschiedlicher Stämme findet sich in Abb. 10. Es ist hier klar zu erkennen, dass die Proteinmuster der abgebildeten Stämme PA01 und 20265 eine hohe Gemeinsamkeit aufweisen und eine Zuordnung identifizierter Proteinspots auch stammübergreifend ohne Probleme möglich ist. Diese Tatsache ist für vergleichende

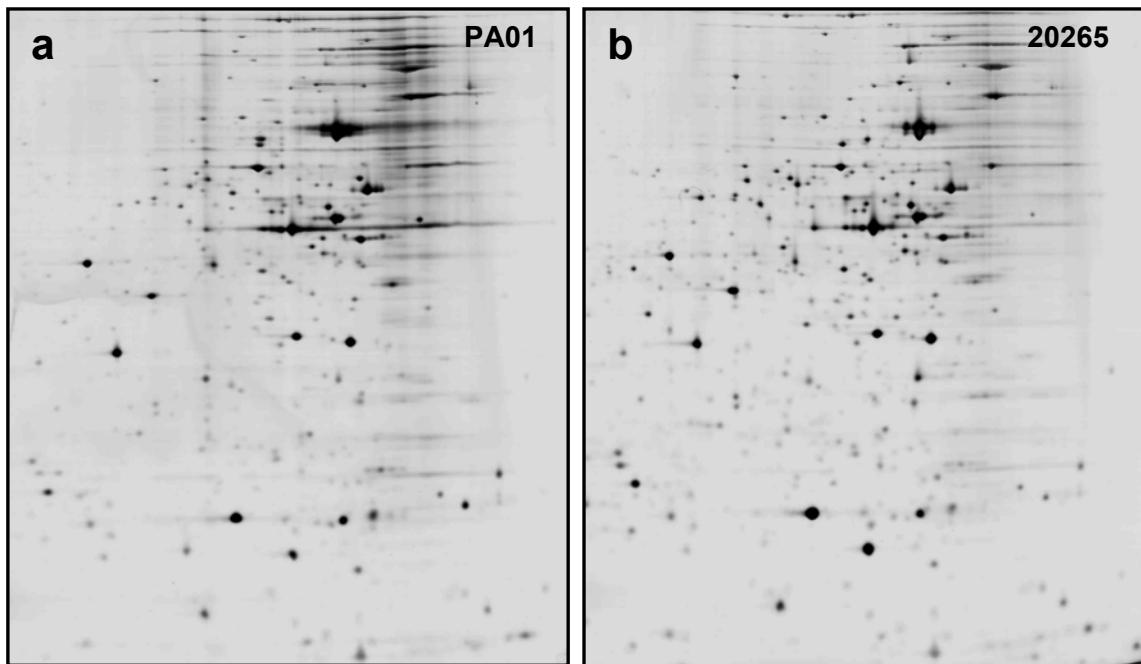


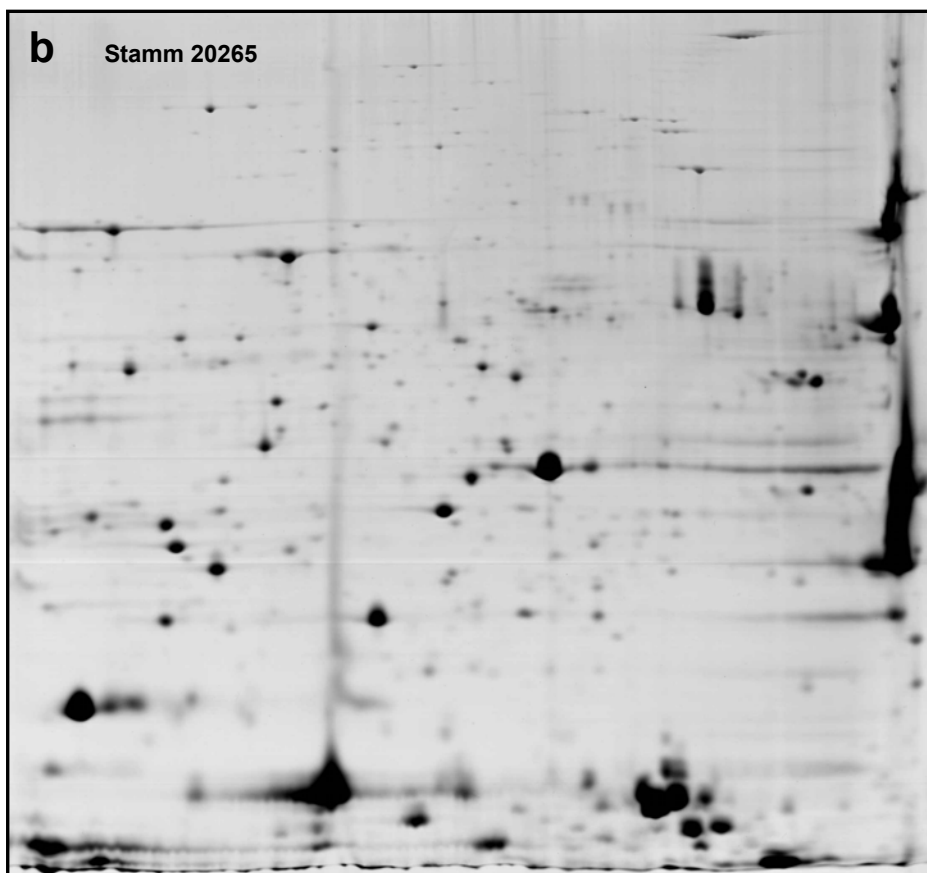
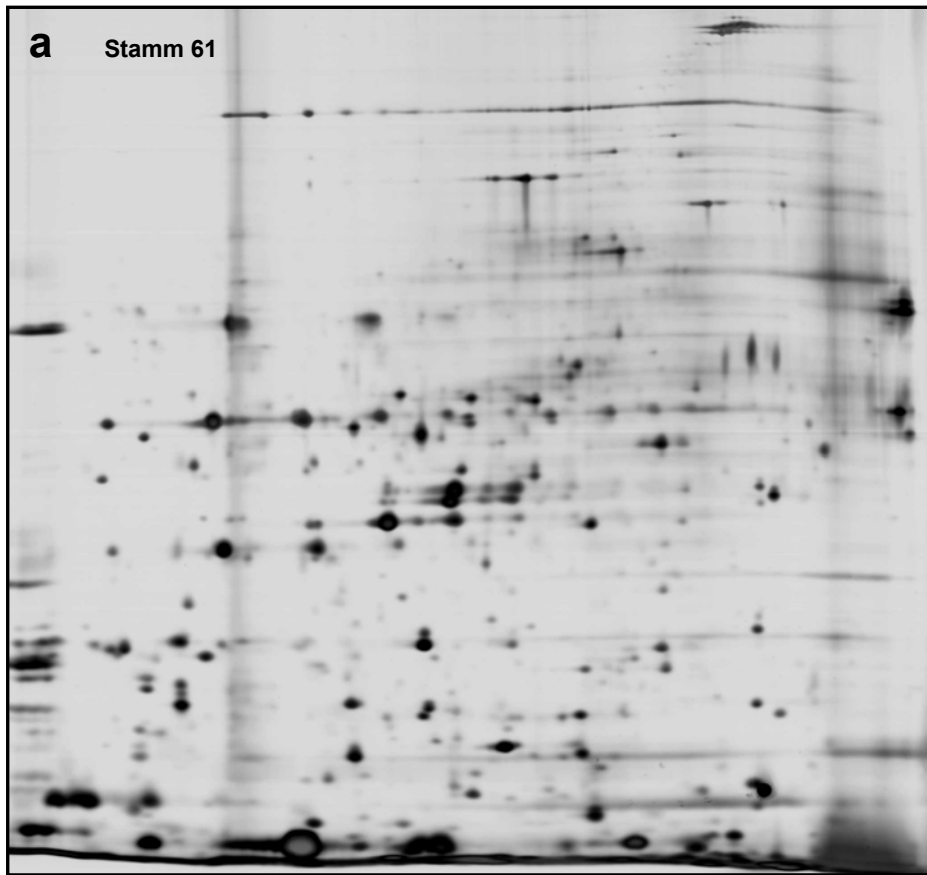
Abb. 10: Vergleich der 2D-Muster zellulärer Proteine verschiedener *P. aeruginosa* Stämme. Dargestellt sind die 2D-Gele von Gesamtzellextrakten zweier verschiedener *P. aeruginosa* Stämme. Die Präparation der Extrakte erfolgte bei einer Kulturdichte von $OD_{600} = 2,0$. Die IEF erfolgte im pH-Gradienten 4-7, die Auftragsmenge betrug jeweils $30 \mu\text{g}$ Protein, die Gele wurden mit Silbernitrat angefärbt. a: 2D-Proteinmuster des Stammes PA01; b: 2D-Proteinmuster des Stammes 20265. Die Proteinmuster der verschiedenen Stämme weisen eine hohe Gemeinsamkeit auf und lassen sich leicht einander zuordnen.

Analysen der unterschiedlichen Morphotypen von Vorteil, da sich einmal gewonnene Erkenntnisse über die Identität von Proteinspots auf andere Stämme übertragen lassen.

Ein gänzlich anderes Bild zeigte sich bei der Analyse der Überstandsproteinextrakte. Die zweidimensionale Gelanalyse lieferte beim Vergleich der Proteinmuster dieser Extrakte derartig große Unterschiede, dass eine Zuordnung von einzelnen Spots zu anderen Stämmen in den meisten Fällen nicht ohne weiteres möglich war.

Ein Beispiel für diese zu beobachtenden Unterschiede ist in Abb. 11 dargestellt. Es werden in dieser Abbildung die zweidimensionalen Muster der Proteine der Kulturüberstände dreier verschiedener *P. aeruginosa* Stämme bei einer Kulturdichte von $OD_{600} = 1,0$ verglichen. Es ist leicht zu erkennen, dass die Proteinmuster der unterschiedlichen Stämme sich derartig unterscheiden, dass eine Zuordnung einzelner Proteinspots zwischen den Stämmen nur in Einzelfällen möglich ist. Beim hier nicht abgebildeten Referenzstamm PA01 waren im Kulturüberstand zu diesem Kulturzeitpunkt sogar derartig wenige Proteine zu finden, dass es kaum möglich war, bei annehmbaren Kulturvolumina ein aussagekräftiges 2D-Gel anzufertigen.

Das Ergebnis dieser Versuche hatte zur Folge, dass vergleichende Analysen der Überstandsproteine der verschiedenen Morphotypen für jeden Stamm separat zu erfolgen hatten und Erkenntnisse über einen Stamm nicht ohne weiteres auf andere Stämme übertragen werden konnten.



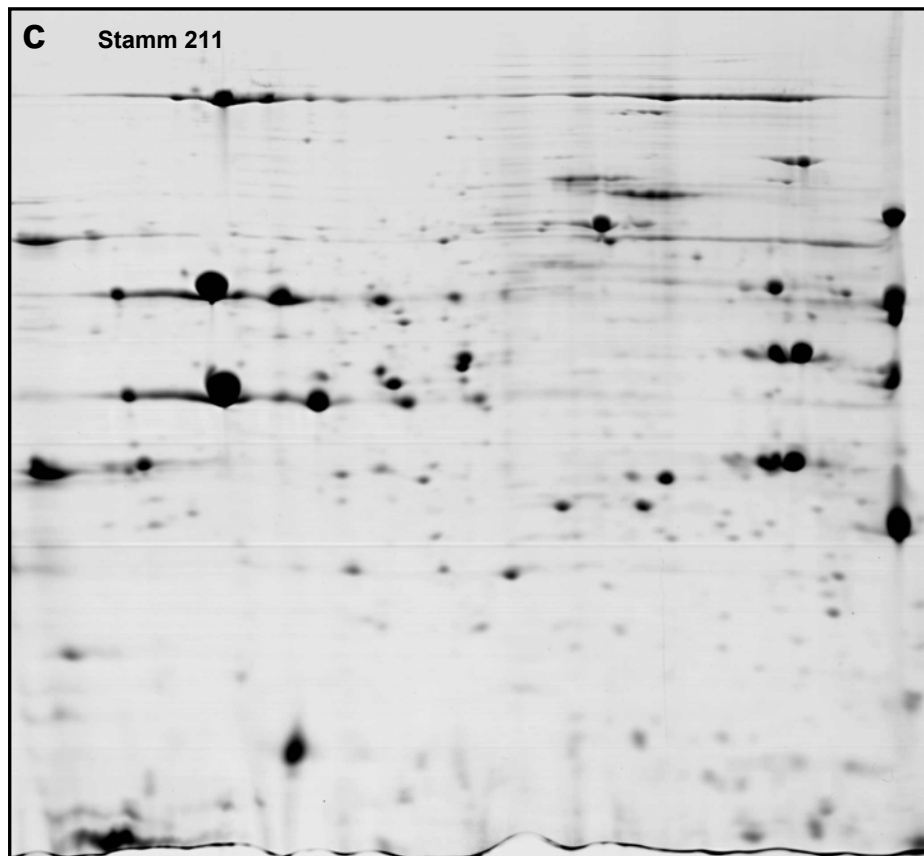


Abb. 11: Vergleich der 2D-Muster von Proteinextrakten der Kulturüberstände verschiedener *P. aeruginosa* Stämme. Die Kulturüberstandsextrakte wurden beim Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 1,0$ angefertigt. Die IEF wurde im pH-Gradienten 4-7 durchgeführt. Aufgetragen wurden jeweils 300 μg Gesamtproteinmenge. Die Anfärbung erfolgte mit kolloidalem Coomassie. Die zweidimensionalen Proteinmuster dieser Überstandsextrakte der verschiedenen Stämme unterscheiden sich derartig erheblich, dass eine Zuordnung einzelner Proteinspots zwischen den Stämmen nur in Einzelfällen möglich ist. a: Klinikisolat 61; b: Klinikisolat 20265; c: Klinikisolat 211.

4.1.5. Fraktionierung von Proteingemischen

Die Fraktionierung von Proteinextrakten vor der Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese stellt eine Möglichkeit dar, die Anzahl der methodisch zugänglichen Proteine weiter zu erhöhen. Eine Fraktion, in welcher im Vergleich zum Ausgangsextrakt eine weitaus geringere Anzahl verschiedener Proteine enthalten ist erlaubt eine weitaus höhere Auftragsmenge eines jeden in der Fraktion enthaltenen Proteins. Durch diese Tatsache kann es ermöglicht werden, im 2D-Gel der Fraktion Proteinspots darzustellen, welche im Gel des komplexeren Extraktes aufgrund zu geringer Proteinmenge niemals sichtbar wären.

Über dieses einfache Mengenproblem hinaus ist es aber auch möglich, in der Fraktionierung gezielt Proteine anzureichern, welche aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften schlecht für die 2D-Elektrophorese zugänglich sind. Dies kann beispielsweise über eine Affinitätschromatographie geschehen oder aber auch wie in dieser Arbeit durch gezielte Anreicherung hydrophober Proteine mittels der Methode der differentiellen Solubilisierung (Molloy et al., 1998).

Hydrophobe Proteine gehen in der zweidimensionalen Proteingelelektrophorese oft verloren. Andererseits aber waren beispielsweise Membranproteine in dieser Arbeit ein Untersuchungsobjekt von hohem Interesse. Schließlich können Membranproteine wichtige Funktionen hinsichtlich der Antibiotikaresistenz, der Nährstoffversorgung, aber auch im Zusammenhang des Adhärenzverhaltens bakterieller Zellen übernehmen.

Da Membranproteine in der Regel durch eine hohe Hydrophibizität gekennzeichnet sind wurden sie gezielt in einer hydrophoben Fraktion angereichert und in der 2D-Gelelektrophorese analysiert.

Im Rahmen dieser Fraktionierung wurden drei Fraktionen für die zweidimensionale Gelanalyse gewonnen, eine hydrophile Fraktion, welche in Trispuffer löslich war, eine mittlere Fraktion, welche in Harnstofflösung lösliche Proteine enthielt, sowie eine hydrophobe Fraktion, deren Proteine sich nur in einer verstärkten Solubilisierungslösung effektiv auflösen ließen. In Abb. 12 sind die zweidimensionalen, silbernitratgefärbten 2D-Gele dieser Fraktionen dargestellt, gewonnen aus einer auf Festmedien kultivierten *P. aeruginosa* Kultur. Es ist zu erkennen, dass dem vergleichsweise komplexen Proteinmuster der hydrophilen Fraktion ein äußerst reduziertes Muster der hydrophoben Proteine gegenübersteht. In der hydrophoben Fraktion konnten schlecht zugängliche Proteine dargestellt werden, welche in der hydrophilen Fraktion nicht, und in der mittleren Fraktion nicht in der bei der hydrophoben Fraktion erreichten Konzentration enthalten waren.

Um die Zusammensetzung einer solchen Fraktion zu überprüfen wurden präparative Gele angefertigt um einige der Proteinspots massenspektrometrisch identifizieren zu können. Hierbei war jedoch die limitierende Proteinmenge problematisch, die hydrophobe Fraktion enthielt nämlich nur noch wenige Prozente der ausgangs zur Verfügung stehenden Gesamtproteinmenge. Zudem zeigte sich die Anfärbbarkeit der hydrophoben Spots mit Coomassie als sehr verschieden gegenüber der Silberfärbung. Dennoch wurden zwecks

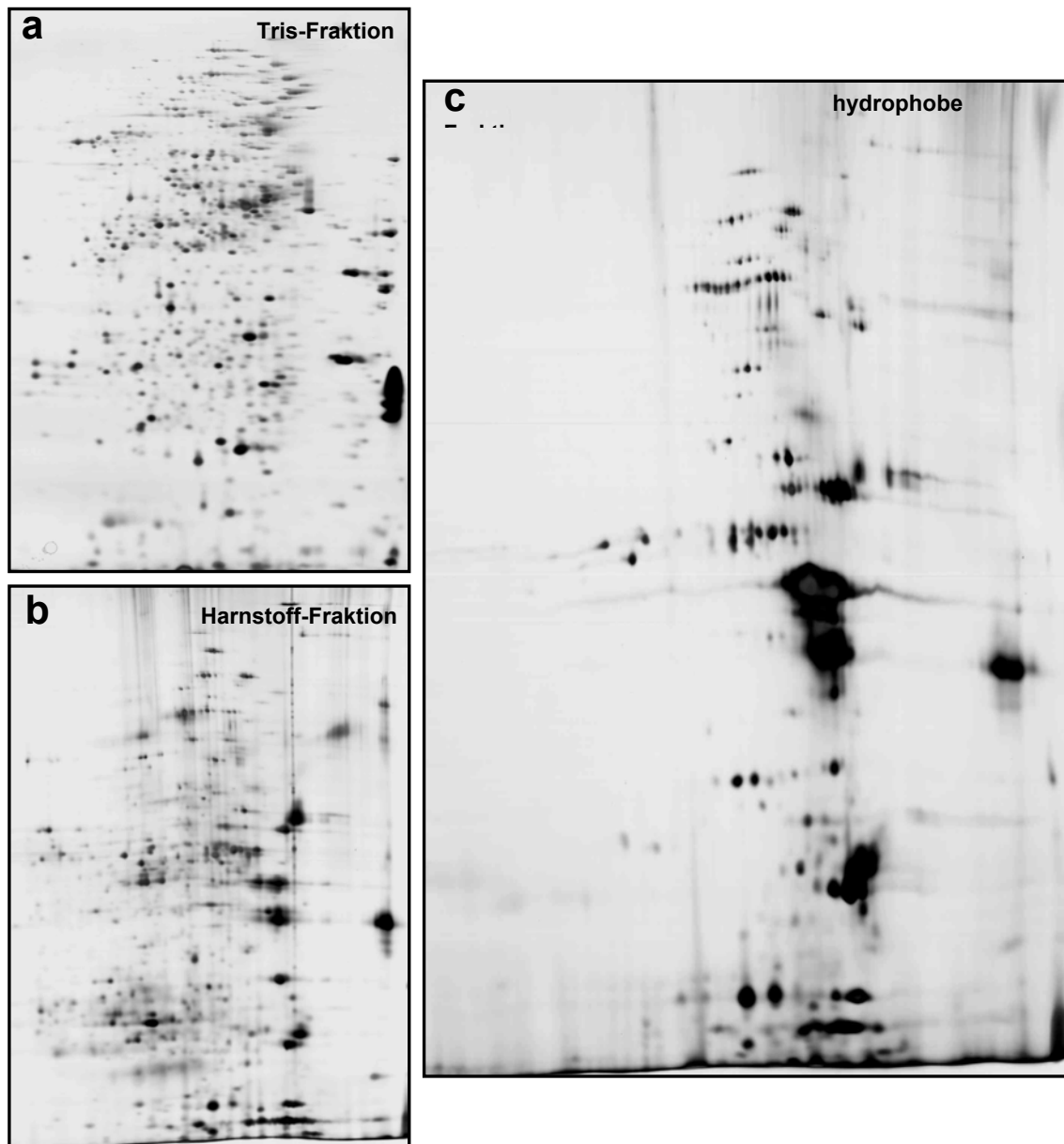


Abb. 12: Fraktionierung zellulärer Proteine zur Anreicherung hydrophober Proteine.

P. aeruginosa wurde auf LB-Festmedien kultiviert. Die zellulären Proteine wurden schrittweise nach dem Prinzip der differentiellen Solubilisierung (Molloy, 1998) in Lösung gebracht. Die Proteine wurden im pH-Gradienten 3-10 aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt. Dem komplexen Gemisch hydrophiler cytosolischer Proteine steht eine geringe Anzahl nur in verbesserter Solubilisierungslösung effektiv löslicher hydrophober Proteine gegenüber. a: hydrophile Fraktion in Tris-Puffer; b: mittlere Fraktion in Harnstofflösung; c: hydrophobe Fraktion in verbesserter Solubilisierungslösung.

Beurteilung der Fraktion einige Spots massenspektrometrisch analysiert. Abb. 13 zeigt ein solches präparatives Gel einer hydrophoben Fraktion, aus welchem 10 Spots herausgestochen und mit einem MALDI/TOF-MS Peptidmassenfingerprint identifiziert werden konnten.

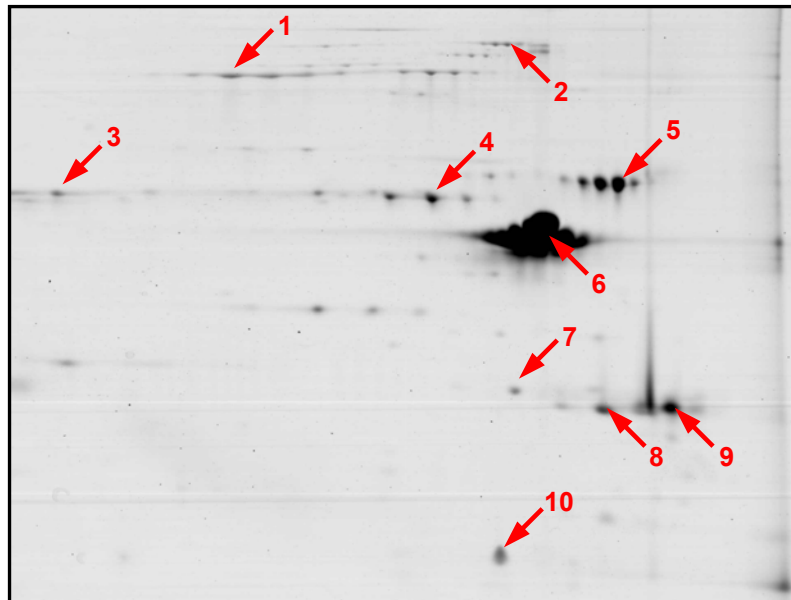


Abb. 13: Identifizierung einiger Proteine einer hydrophoben Fraktion. Eine hydrophobe Proteinfraction wurde im pH-Gradienten 4-7 aufgetrennt und das Gel mit Coomassie angefärbt. Die markierten Spots wurden ausgestochen und durch MALDI/TOF-MS analysiert.

Als Ergebnis der Analyse konnten 7 unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Bei den übrigen 3 Spots handelte es sich um Fragmente bzw. modifizierte Formen der bereits identifizierten Proteine. Alle 7 Proteine waren Proteine der äußeren bakteriellen Zellmembran ('outer membrane' Proteine). Eine Übersicht über diese Proteine findet sich in Tab. 1. Die hydrophobe Fraktion stellte damit tatsächlich einen Extrakt von Membranproteinen dar. Allerdings handelte es sich bei den identifizierten 'outer membrane' Proteinen in allen Fällen um Porine mit einer geringen Anzahl an Transmembrandomänen. Noch stärker hydrophobe Proteine mit einer höheren Anzahl an Membrandomänen schienen nur noch durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese der nach der Fraktionierung im verbliebenen restlichen unlöslichen Bestandteil enthaltenen Proteine zugänglich zu sein.

Zwei der in diesem Versuch identifizierten Proteine wurden bisher noch nicht beschrieben, sondern nur aufgrund der Genomsequenzinformationen vorhergesagt. Es handelte sich hierbei um die Proteine mit den Pseudomonas-Annotierungsnummern PA3648 und PA4661. Im Falle des Proteins PA3648 wurde durch eine Sequenzhomologieanalyse ein vorliegendes 'outer membrane Protein' vorhergesagt, die Funktion des Proteins PA4661 hingegen ist bisher unbekannt.

Tab. 1: Übersicht der in einer hydrophoben Proteinfraction enthaltenen und identifizierten Proteine. Die angegebene Nummer entspricht der Kennzeichnung in Abb. 13, in drei Fällen wurden Abbaufragmente, bzw. modifizierte Formen der Proteine identifiziert, zwei identifizierte Proteine wurden bisher nicht beschrieben, die Fraktion scheint fast ausschließlich 'outer membrane Proteine' zu enthalten.

Nr.	Gen	Proteinbezeichnung / Funktion	kDa	Datenbank-Nr.
1	oprC	'outer membrane' Protein C, / vermutl. Kupfertransport	79,3	PA3790
2	-	hypothetisches 'outer membrane' Protein	88,4	PA3648
3	oprE	'outer membrane' Porin E1 / anaerobisch induziert	49,7	PA0291
4	oprE	'outer membrane' Porin E1 / anaerobisch induziert	49,7	PA0291
5	oprD	'outer membrane' Protein D	48,4	PA0958
6	oprF	'outer membrane' Protein F / Hauptstrukturporin	37,6	PA1777
7	oprD	Fragment des 'outer membrane' Protein D	Fragm.	PA0958
8	oprG	'outer membrane' Protein G	25,2	PA4067
9	oprF	C-terminales Fragment des 'outer membrane' Protein F	Fragm.	PA1777
10	-	hypothetisches Protein, unbekannte Funktion	18,4	PA4661

4.2. Vergleichende Untersuchungen zwischen Wildtyp, 'Small Colony Variants' und Revertanten

Die Proteomanalysen der verschiedenen *P. aeruginosa* Morphotypen wurden in dieser Arbeit in mehreren Phasen durchgeführt. Zunächst wurden die Proteinexpressionsmuster der 'Small Colony Variants' und der Revertanten mehrerer klinischer Stämme vergleichend analysiert um einen stammübergreifenden Überblick über die Unterschiede der Proteinexpressionsprofile zu gewinnen. Anschließend wurden zwei klinische Stämme zur näheren Analyse ausgewählt und differentiell exprimierte Proteine identifiziert. Im weiteren Verlauf konnte die Wildtypform eines der beiden Stämme isoliert werden. Die Erkenntnisse über die Unterschiede der Proteinexpressionsprofile zwischen den unterschiedlichen Morphotypen wurden daraufhin durch eine umfassende vergleichende Analyse aller drei Morphotypen und die Identifizierung weiterer unterschiedlich exprimierter Proteine vertieft. Schließlich wurden die Auswirkungen der Verfügbarkeit, bzw. des Mangels an Eisen und anderen Spurenelementen auf die Expression der morphotypisch differentiell regulierten Gene untersucht.

4.2.1. Vergleichende Proteomuntersuchungen von 'Small Colony Variants' und Revertanten verschiedener Stämme

Vergleichende Proteomuntersuchungen wurden mit den 'Small Colony Variants' und den Revertanten von fünf klinischen *P. aeruginosa* Stämmen sowie dem Referenzstamm PA01 durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden bei allen Stämmen sowohl die Gesamtzellextrakte als auch die Proteine der Kulturüberstände in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und die zweidimensionalen Proteinmuster vergleichend analysiert. Diese Analysen wurden mit Extrakten aus Kulturen unterschiedlicher Wachstumsphasen durchgeführt. Direkte Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Morphotypen beschränkten sich in einem Experiment aber immer auf Kulturen mit identischer optischer Dichte.

Sofern die Proteinmuster der verschiedenen Stämme aufgrund ihrer Ähnlichkeit eine Zuordnung der Proteinspots zuließen, wurde nach stammübergreifenden gemeinsamen Mustern der Proteinexpressionsunterschiede zwischen den Morphotypen gesucht. Hierbei

wurden von jedem zu untersuchenden Morphotyp mindestens drei verschiedene 2D-Gele der Extrakte unabhängiger Bakterienkulturen angefertigt um kultivierungsbedingte Einflüsse auf das Proteinexpressionsmuster herauszufiltern und die morphotypisch spezifische differentielle Expression zu reproduzieren.

Vergleichende 2D-Analyse der Gesamtzellextrakte

Gesamtzellextrakte wurden sowohl von Flüssigkulturen unterschiedlicher Wachstumsphasen, als auch von auf Festmedien kultivierten Bakterien angefertigt und in der 2D-Elektrophorese analysiert. Da bei der Kultivierung auf Festmedien im Gegensatz zu den Flüssigkulturen ein klar erkennbarer phänotypischer Unterschied zwischen den Kulturen vorlag, wurde mit diesen Untersuchungen begonnen.

Die zweidimensionalen Proteinmuster der Gesamtzellextrakte wiesen bei allen analysierten Stämmen eine äußerst hohe Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Morphotypen auf. Bei allen untersuchten Wachstumsphasen und Kultivierungsarten der Kulturen der 'Small Colony Variants' und der Revertanten war es ohne Schwierigkeit möglich, die Proteinspots der mit den Extrakten der beiden Morphotypen angefertigten 2D-Gele untereinander zuzuordnen.

Es stellte sich heraus, dass bei diesen Gesamtzellextrakten nur eine äußerst geringe Anzahl der im Gel darstellbaren Proteine deutliche, reproduzierbare und in mehreren Stämmen nach ähnlichem Muster zu beobachtende Unterschiede hinsichtlich ihrer Quantität zeigten.

In Abb. 14 sind die 2D-Gele der auf Festmedien kultivierten 'Small Colony Variants' und Revertanten zweier verschiedener untersuchter Stämme dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die zweidimensionalen Proteinmuster dieser Zellextrakte nur geringfügige Unterschiede aufweisen. Die Gemeinsamkeiten im Muster der unterschiedlichen Morphotypen eines Stammes sind noch höher als jene zwischen den gleichen Morphotypen unterschiedlicher Stämme. Zwei Proteine, welche bei den abgebildeten und auch bei den übrigen untersuchten Stämmen bei den Revertanten stärker exprimiert wurden als bei den 'Small' Colony Variants' sind in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet.

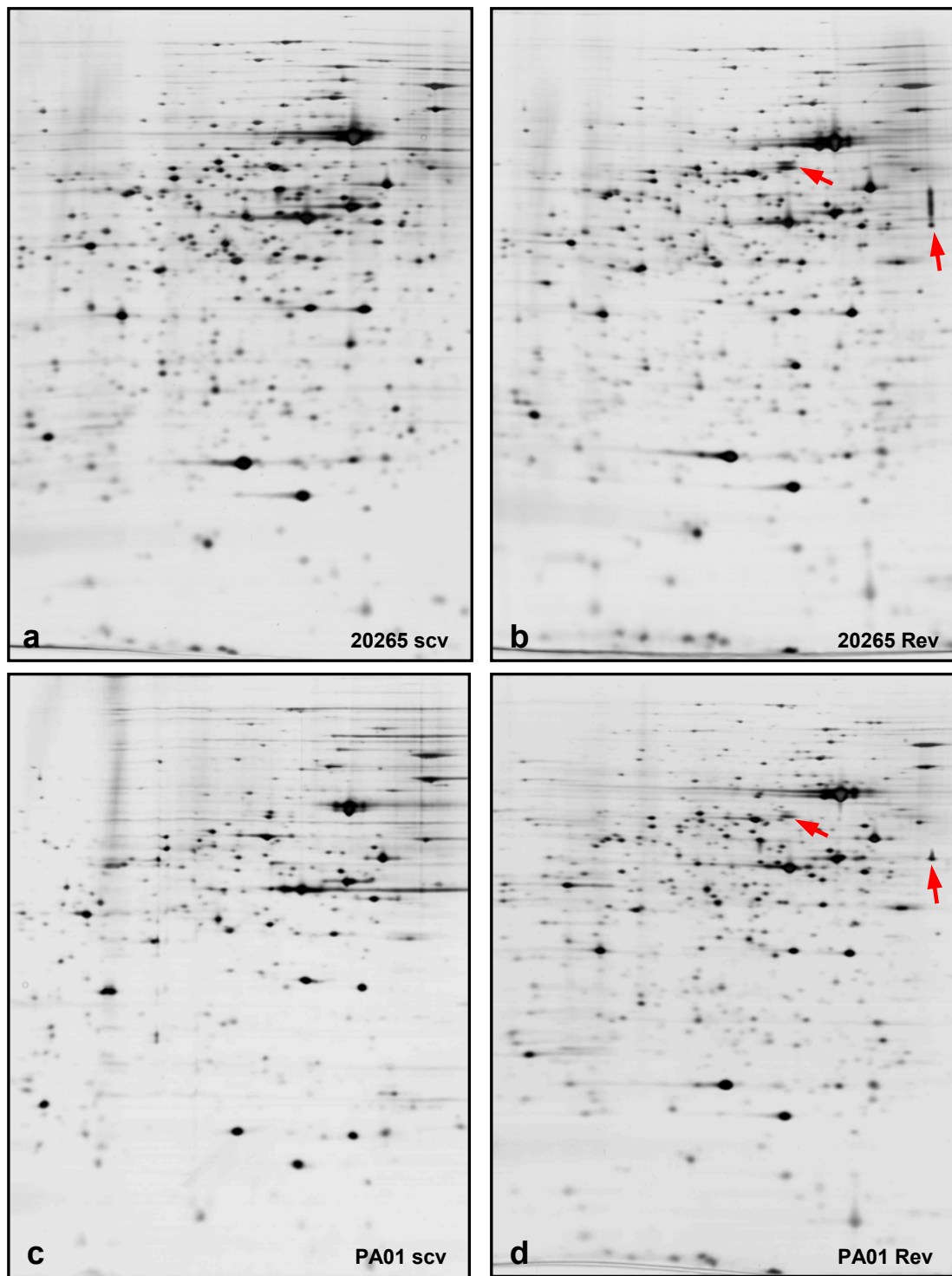


Abb. 14: Vergleich der zweidimensionalen Muster zellulärer Proteine der SCV's und Revertanten der Stämme 20265 und PA01. Die Bakterien wurden auf LB-Festmedien kultiviert. Die Gesamtzellextrakte wurden im pH-Gradienten 4-7 aufgetrennt und die 2D-Gele mit Silbernitrat angefärbt. Die Proteinmuster der Zellextrakte weisen nur geringfügige Unterschiede auf. Zwei Proteinspots, welche bei mehreren Stämmen bei den Revertanten stärker exprimiert vorlagen wurden in der Abbildung bei beiden Stämmen mit Pfeilen markiert. a: SCV's des Stammes 20265; b: Revertanten des Stammes 20265; c: SCV's des Stammes PA01; d: Revertanten des Stammes PA01.

Vergleichende 2D-Analyse der extrazellulären Proteine

Auch Proteinextrakte der in den Kulturüberständen vorliegenden Proteine wurden von den sechs Untersuchungsstämmen zu unterschiedlichen Kulturzeitpunkten angefertigt und durch 2D-GE vergleichend untersucht.

Anders als bei den Gesamtzellextrakten wiesen die erhaltenen 2D-Muster zahlreiche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Morphotypen auf. Bei jedem einzelnen untersuchten Stamm konnte eine große Anzahl an Proteinen beobachtet werden, die in den Kulturüberständen von SCV's und Revertanten in deutlich unterschiedlicher Menge vorlagen.

Dieses Phänomen der unterschiedlichen Variabilität der einzelnen Proteine in den Zellextrakten einerseits und den Kulturüberständen andererseits konnte bereits beim Vergleich der verschiedenen Stämme beobachtet werden (Abschnitt 4.1.4.). Allerdings war die Art der nun beobachteten morphotypisch spezifischen Variabilität deutlich anders als die zuvor untersuchte stammspezifische Variabilität. Während es bei der vergleichenden Analyse der unterschiedlichen *P. aeruginosa* Stämme nämlich größtenteils nicht gelang, die Proteinspots in den zweidimensionalen Mustern denen anderer Stämme zuzuordnen, war dies beim Vergleich der Gele unterschiedlicher Morphotypen eines Stammes in der Regel ohne Schwierigkeiten möglich. Beim Vergleich der 2D-Gele der verschiedenen Morphotypen war nämlich leicht ein gemeinsames Spotmuster zu erkennen und die Zuordnung der Proteinspots konnte mit Hilfe der Gelanalysesoftware zu einem hohen Prozentsatz erfolgen. Das Ergebnis des morphotypischen Vergleiches der Kulturüberstandsproteine waren also deutliche Proteinexpressionsunterschiede aber ein gemeinsam zugrunde liegendes zweidimensionales Proteinmuster. Beim Vergleich verschiedener Stämme hingegen muß man von einem grundsätzlich anderen Muster sprechen.

Abbildung 15 veranschaulicht den Vergleich der Proteinmuster von SCV's und Revertanten anhand von drei unterschiedlichen Stämmen. Die abgebildeten 2D-Gele wurden mit Extrakten angefertigt, welche aus Flüssigkulturen der späten exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 1,5$ präpariert wurden. Leicht sind zahlreiche Unterschiede der Spotintensitäten zwischen den verschiedenen Morphotypen zu erkennen.

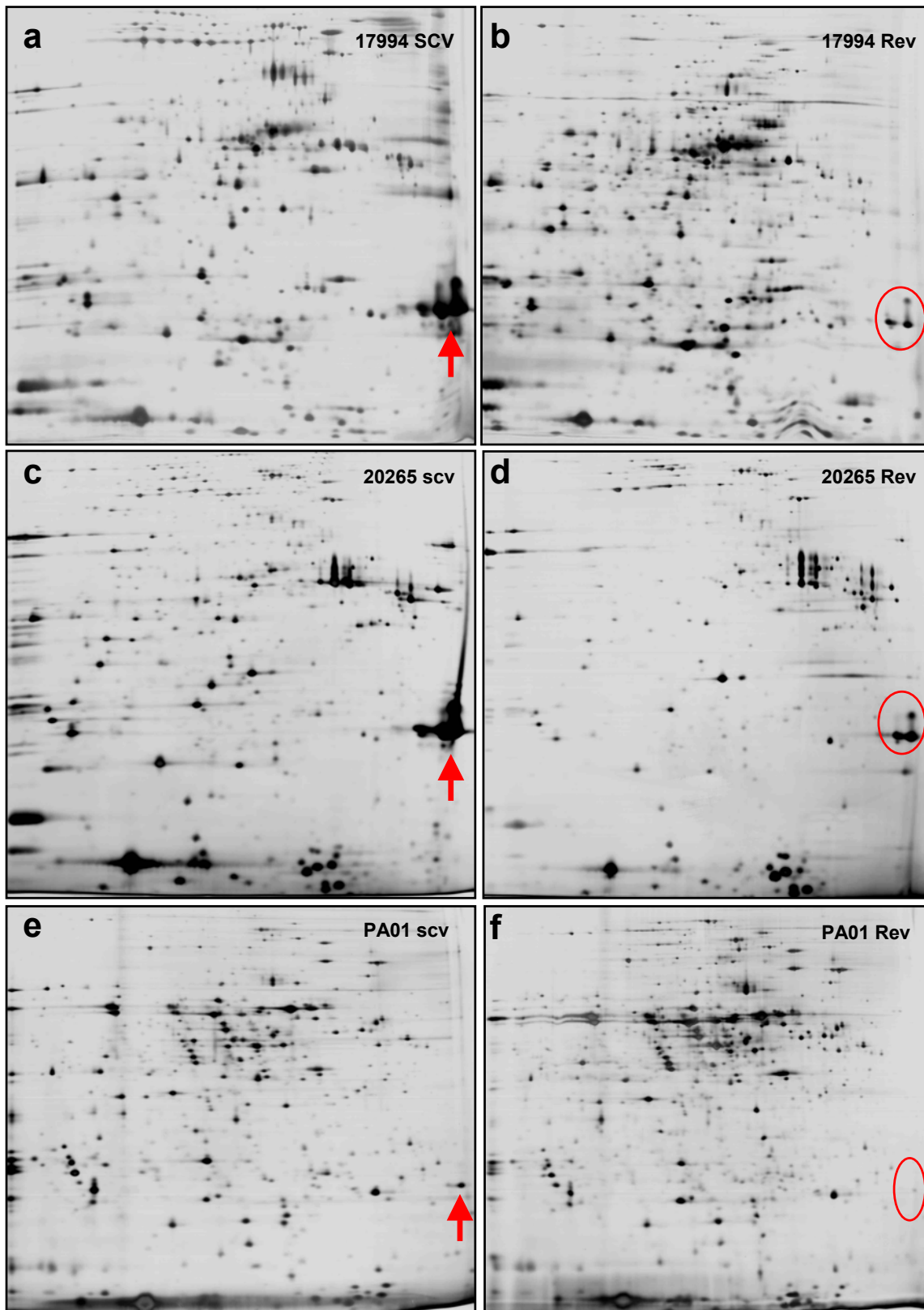


Abb. 15: Vergleich der 2D-Proteinmuster extrazellulärer Proteine von SCV's und Revertanten bei drei ausgewählten Stämmen. Die Proteine wurden aus Kulturüberständen der spätexponentiellen Wachstumsphase präpariert ($OD_{600} = 1,5$), im pH-Gradienten 4-7 aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt. Die Auftragsmenge betrug jeweils $35\mu\text{g}$. Das markierte Protein war bei allen Stämmen in den Kulturüberständen der SCV's (Pfeil) in

deutlich größerer Menge vorhanden als in denen der Revertanten (Ellipse). a: SCV's des Stammes 17997; b: Revertanten des Stammes 17997; c: SCV's des Stammes 20265; d: Revertanten des Stammes 20265; e: SCV's des Stammes PA01; f: Revertanten des Stammes PA01.

Da die Zuordnung der einzelnen Spots zu denen der anderen Stämme allerdings nur stark eingeschränkt möglich ist, muss die genaue Analyse und Identifizierung der Proteine für jeden Stamm separat erfolgen. Bei einem Protein allerdings ist leicht zu erkennen, dass dieses bei allen drei Stämmen in den SCV's deutlich überexprimiert vorliegt, bei den klinischen Stämmen sogar noch weitaus stärker als beim Laborstamm PA01. Die gleiche morphotypisch spezifische Expression dieses Proteins (in der Abbildung mit einem Pfeil markiert) konnte auch bei den anderen untersuchten Stämmen beobachtet werden. Auf die Identifizierung dieses sowie zahlreicher weiterer differentiell exprimierter Proteine, welche aufgrund des andersartigen Proteinmusters nicht sicher entsprechenden Proteinspots in den Gelen aller sechs Stämme zugeordnet werden konnten wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

Beim Vergleich der 2D-Proteinmuster unterschiedlicher Wachstumsphasen fiel weiterhin auf, dass ein großer Teil der Proteinexpressionsunterschiede der unterschiedlichen Morphotypen erst im Verlauf zunehmender Zelldichte auftrat, weil die entsprechenden Proteinspots in der frühen exponentiellen Phase noch gar nicht sichtbar waren. Darüberhinaus wurden allerdings auch Proteinspots erkannt, die über den gesamten Kultivierungszeitraum einen deutlichen Intensitätsunterschied zwischen den beiden Morphotypen aufwiesen. Schließlich gab es auch eine Reihe von Proteinen, welche nur im frühen Kulturstadium einen deutlichen Mengenunterschied bei den beiden Morphotypen aufwiesen, offensichtlich also Proteine, deren Synthese in dem einen oder anderen Phänotyp zu einem früheren Zeitpunkt induziert wurde, die dann in der späteren Phase des Kulturwachstums aber in beiden Morphotypen gebildet wurden.

Alle diese detaillierten Unterschiede im Proteinprofil der SCV's und Revertanten wurden im folgenden durch genauere Analysen und massenspektrometrische Identifizierungen unter Verwendung der beiden Stämme 20265 und 61 näher untersucht.

4.2.2. Proteomanalyse der 'Small Colony Variants' und Revertanten der klinischen Isolate 61 und 20265 und Identifizierung differentiell exprimierter Proteine

Bei der massenspektrometrischen Identifizierung differentiell exprimierter Proteine wurde der Schwerpunkt auf die Stämme 20265 und 61 gelegt. Diese klinischen Isolate waren gegenüber dem Referenzstamm PA01 zur Untersuchung einer klinischen Fragestellung klar zu bevorzugen, denn der Stamm PA01 stammt nicht von CF-Patienten, sondern wurde im Jahre 1952 aus einer Brandwunde isoliert und seitdem unter Laborbedingungen weiterkultiviert. Während *P. aeruginosa* PA01 ein Chromosom mit einer Größe von 6264 kbp aufweist, kann diese bei Klinikisolaten von 4900 bis 7000 kbp variieren. Durch eine Analyse des Stammes PA01 alleine können also in der Regel nicht alle für klinische Fragestellungen entscheidenden Mechanismen untersucht werden.

Die beiden ausgewählten Stämme wiesen gegenüber den anderen Klinikisolaten zudem den Vorteil eines sehr gleichmäßigen Wachstums der unterschiedlichen Morphotypen auf. Bei den Stämmen 33, 211 und 17997 hingegen zeigten die verschiedenen Morphotypen bei der Kultivierung in Minimalmedium unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten. Die SCV's des Stammes 211 wuchsen in diesem Medium sogar derartig schlecht, dass in Kultivierungsexperimenten unter den für die Proteomuntersuchungen standardisierten Bedingungen nur eine maximale optische Dichte der Kultur von $OD_{600} = 0,6$ erreicht wurde. Angesichts der gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung vergleichbarer Kulturbedingungen (Abschnitt 4.1.3.), welche bei den genannten Stämmen durch die unterschiedlichen Wachstumsraten nicht garantiert werden konnten, wurde bei diesen Stämmen auf eine aufwendige massenspektrometrische Analyse verzichtet.

Für die massenspektrometrische Identifizierung wurden Proteinextrakte verschiedener Wachstumsstadien der beiden Stämme in präparativen 2D-Gelen aufgetrennt. Diese Gele wurden im Vergleich zu den analytischen, silbernitratgefärbten Gelen etwa mit der zehnfachen Proteinmenge beladen und im Anschluss an die Elektrophorese mit kolloidaler Coomassielösung gefärbt. Auch hier wurden stets mehrere unabhängig hergestellte Extrakte eines jeden Stammes, Morphotyps und Kultivierungszeitpunktes aufgetrennt um die beobachteten Unterschiede in den Proteinmustern auch in der Coomassiefärbung zu reproduzieren.

Bei reproduzierbaren Unterschieden der 2D-Proteinmuster von SCV's und Revertanten wurden die entsprechenden Proteinspots für die massenspektrometrische Analyse ausgewählt. Die Identifizierung der vorliegenden Proteine erfolgte dann über MALDI/TOF-MS-'Peptidmassenfingerprints'.

Identifizierung ausgewählter sekretorischer Proteine

Ein besonderes Interesse galt unter anderem einem vergleichsweise hoch exprimierten, in den Kulturüberständen vorliegenden Protein, bei welchem bei den vorangegangenen Untersuchungen eine deutliche Überexpression bei den SCV's aller untersuchter Stämme beobachtet worden war (siehe Abschnitt 4.2.1.). Zur Untersuchung dieses sehr sauren und daher im Randbereich normaler pH-Gradienten fokussierten Proteins wurden Überstandsextrakte in einem speziellen engen pH-Gradienten (pH 3-5) aufgetrennt. Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang die Identifizierung des Proteins als HasAp ('heme acquisition protein', PA3407), einem sekretorischen Protein, welches auch als Hämophore bezeichnet wird und welches durch die extrazelluläre Bindung von Häm, beispielsweise aus Hämoglobinen heraus über die anschließende Bindung an den bakteriellen Rezeptor HasR (PA3408) zur Eisenversorgung des Bakteriums beiträgt. Darüberhinaus konnten in diesen 2D-Analysen zwei weitere morphotypisch unterschiedlich exprimierte Proteine identifiziert werden, die so weit im sauren Bereich fokussiert waren, dass sie aus den pH 4-7 Gradienten während der Fokussierung teilweise hinausliefen. Hierbei handelte es sich um die ebenfalls sekretorische alkalische Protease AprA und um das zu AprA homologe Protein AprX, welches kürzlich erstmals beschrieben wurde und ebenfalls sezerniert wird (Duong et al., 2001), welches aber noch nicht eingehend funktionell untersucht wurde.

Die 2D-Gele, welche zur Identifizierung dieser Proteine dienen sind in Abb. 16 dargestellt. In dieser Abbildung wird an diesem Beispiel auch die Bedeutung der Untersuchung eines solchen Expressionsunterschiedes über einen längeren Kultivierungszeitraum hinweg verdeutlicht. Zu sehen sind in abgebildeten Ausschnitten der 2D-Gele die unterschiedlichen extrazellulär vorliegenden Proteinmengen bei SCV's und Revertanten in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (16 Stunden Kultivierung, $OD_{600} = 1,0$) sowie in der späten Wachstumsphase (36 Stunden, $OD_{600} = 2,0$) und in der stationären Kulturphase (70 Stunden, OD_{600} ca. 2,5).

Das Protein HasAp wird von den SCV's bereits zu einem frühen Kulturzeitpunkt in großer Menge sezerniert und kann auch in den späteren Stadien in ähnlicher Menge beobachtet werden. Bei den Revertanten hingegen ist dieses Protein in dem frühen Extrakt noch nicht im Kulturüberstand zu finden, in den späteren Kulturstadien wird es dann allerdings in vergleichbarer Menge wie bei den SCV's sezerniert.

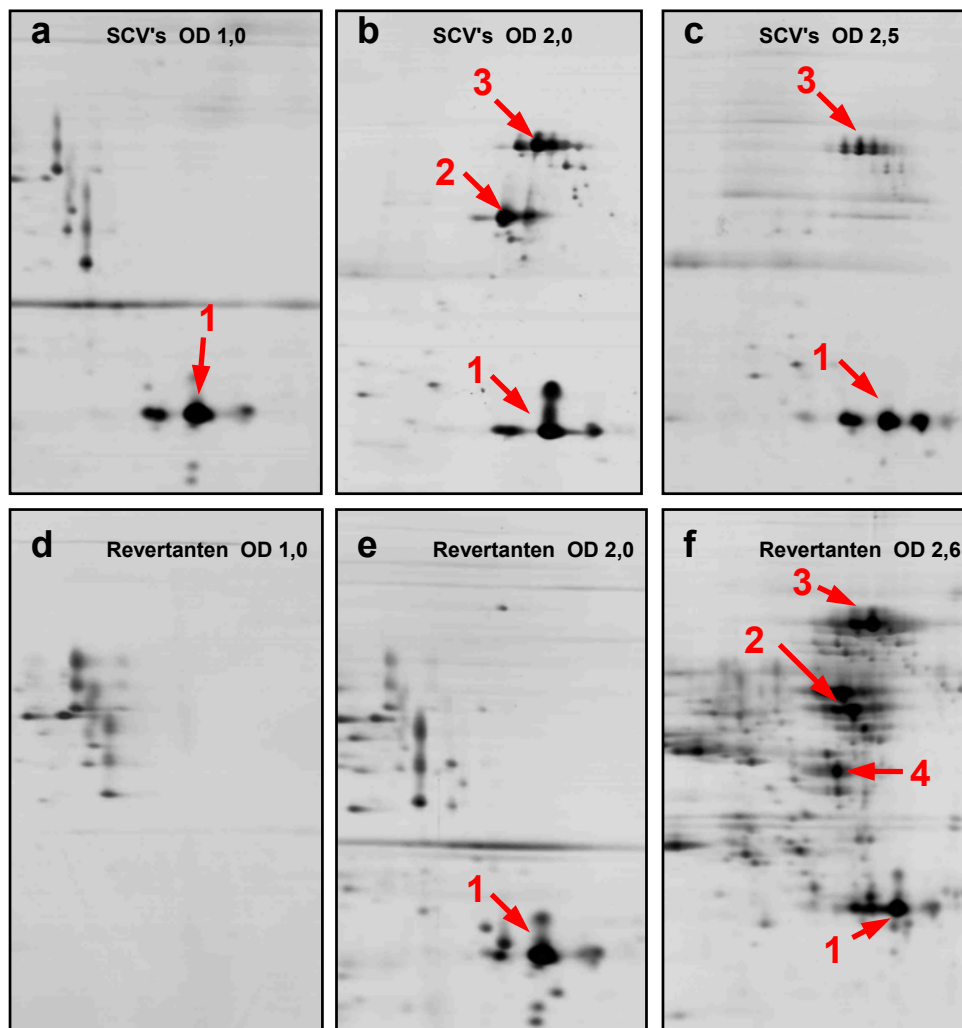


Abb. 16: Untersuchung des Expressionsmusters ausgewählter sekretorischer Proteine bei SCV's und Revertanten über einen längeren Kultivierungszeitraum. Abgebildet sind Ausschnitte aus dem sauren Bereich von 2D-Gelel mit sekretorischen Proteinen von SCV's (a-c) und Revertanten (d-f) des Stammes 20265. Die Extrakte wurden aus Überständen von Bakterienkulturen der folgenden Wachstumsphasen präpariert: a+d: mittlere exponentielle Wachstumsphase, Kultivierungsdauer 16 Stunden, $OD_{600} = 1,0$; b+e: späte Wachstumsphase, Kultivierungsdauer 36 Stunden, $OD_{600} = 2,0$; c+f: stationäre Kulturphase, Kultivierungsdauer 70 Stunden, $OD_{600} = 2,5$ (SCV's) bzw. 2,6 (Revertanten). Die markierten Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert; 1: HasAp, 2: AprX, 3: AprA, 4: Fragment des Proteins AprA. Bei den Apr-Proteinen ist ein ähnliches, wenn auch zeitverzögertes Phänomen zu beobachten. Bei den Revertanten werden diese Proteine erst mit dem Eintritt in die stationäre Phase sezerniert, bei den SCV's geschieht dies bereits in einem früheren Kulturstadium. In der stationären Phase ist dann bei den SCV's nur noch wenig Apr-Protein zu finden, diese Tatsache lässt sich aber durch Degradations- und

Autolysevorgänge erklären. Untermauert wird dies durch die Analyse zahlreicher kleinerer Proteinspots, welche allesamt als Fragmente der Apr-Proteine identifiziert wurden (in der Abbildung ist nur eins gekennzeichnet, Nr. 4). In Abb. 16f sind im rechten oberen Bereich beispielsweise zahlreiche Spots zu erkennen, welche allesamt als Fragmente der Apr-Proteine identifiziert wurden.

Auch das Protein HasAp war in den Gelen nicht nur in einem Spot nachzuweisen. Vielmehr handelt es sich um drei dicht nebeneinander liegende Spots, also offensichtlich modifizierte Formen des Proteins, welche leicht hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes abweichen, und einen Spot, welcher im Gel im Bereich leicht höheren Molekulargewichtes lief. Alle diese Proteinspots konnten erfolgreich als HasAp identifiziert werden.

Durchführung der Proteinidentifizierung am Beispiel des Proteins HasAp

Die Identifizierung dieser Proteinspots durch 'Peptidmassenfingerprint' wird im Folgenden am Beispiel der Identifizierung des Proteins HasAp verdeutlicht. Bei dieser Proteinidentifizierung handelt es sich um ein gut nachvollziehbares Beispiel, weil die tryptische Spaltung dieses niedermolekularen Proteins nur in einer vergleichsweise geringen Anzahl an Peptiden resultiert und das MALDI-Spektrum daher gut überschaubar ist.

Das in der MALDI-Analyse erhaltene Peptidmassenspektrum (Abb. 17) wies neben den Massen der beiden zur internen Kalibrierung zugegebenen Eichpeptide nur vier klare Peptidmassen auf. Die monoisotopischen Massenwerte dieser Peptide (2265,18 Da; 3064,61 Da; 4040,15 Da und 4620,26 Da) wurden zur Datenbanksuche (SWISS-PROT und TrEMBL) herangezogen.

Diese Datenbanksuche lieferte beim Vergleich aller Peptidmassen bakterieller Proteine aufgrund der geringen Anzahl an Peptidmassen nur ein passendes Protein, HasAp aus *Pseudomonas aeruginosa*. Die in der Datenbank angegebenen (theoretisch errechneten)

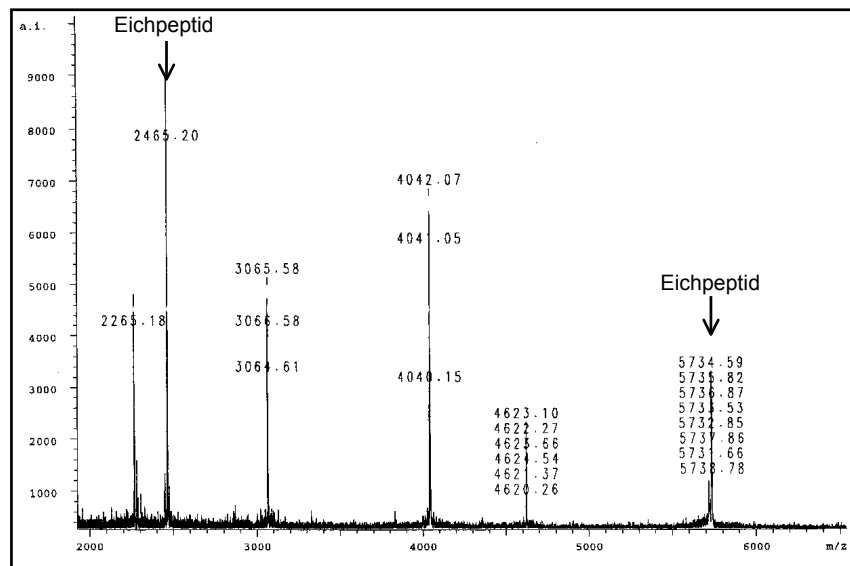


Abb. 17: Peptidmassenspektrum der MALDI/TOF-MS Analyse des Proteins HasAp. Die analysierte Proteinprobe stammt aus einem Proteinspot eines 2D-Gels (Abb. 16). Zur internen Kalibrierung der Messung wurden zwei Eichpeptide zugegeben (2465,20 und 5734,59 Da). Die übrigen vier Peaks stellen die Peptidmassen der analysierten Probe dar. Die verschiedenen Massenangaben der Peaks beziehen sich auf die unterschiedlichen Isotopenformen der Peptide. Zur Datenbanksuche wurden nur die Massen der monoisotopischen Peptide (jeweils niedrigste Massen) verwendet.

Werte für Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt des Proteins (MW: 20902,94 Da; pI: 4,29) stimmten zudem mit der im Gel beobachteten Position des analysierten Proteinspots sehr gut überein. In Abb. 18 ist die Ergebnismeldung dieser Datenbanksuche mit dem Suchwerkzeug PeptIdent dargestellt. Es sind hier die zugeordneten Peptide mit ihren Molekulargewichten und Positionen im Protein angegeben. Weiterhin sind in der angegebenen Gesamtaminosäuresequenz des Proteins die Bereiche der zugeordneten Peptide hervorgehoben. Von den gemessenen vier Peptidmassen konnten drei dem Protein zugeordnet werden. Diese drei Peptide decken bereits 44,9 % der Gesamtsequenz des Proteins ab.

Zur Ermittlung der in der massenspektrometrischen Messung nicht erhaltenen fehlenden Peptidmassen wurde die Aminosäuresequenz des Proteins HasAp mit dem Analyseprogramm PeptideMass (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>) einer theoretischen Trypsinspaltung unterzogen. Erhalten wurden hierbei die in Tabelle 2 angegebenen Massenwerte von insgesamt sechs Peptiden. Unter diesen Peptiden befand sich eines mit einer Masse von nur 656,3 Da, welches damit in einem nicht für die

HASAP (HEME ACQUISITION PROTEIN HASAP). - Pseudomonas aeruginosa 44.9% of sequence covered:					
user mass	matching mass	Δmass (Dalton)	MC	position	peptide sequence
4040.15	4039.9730	-0.1769	0	89-129	LDSIALGDTLTGGASSGGYA LDSQEVSFSNLGLDSPIAQG R
3064.61	3064.4799	-0.13	0	60-88	STASDAAFIAGGDLHYTLFS NPSHTLWGK
2265.18	2265.1795	-0.0004	0	136-157	VVYGLMSGDSSALQGQIDAL LK

1	11	21	31	41	51	
1	msisisystt	ysgwtvadyl	adwsayfgdv	nhrpgqvvdg	sntggfnpgp	fdgsqyalkS 60
61	TASDAAFIAG	GDLHYTLFSN	PSHTLWGKLD	SIALGDTLTG	GASSGGYALD	SQEVSFSNLG 120
121	LDSPIAQGRd	gtvhkVVYGL	MSGDSSALQG	QIDALLKavd	pslsinstfd	qlaaagvaha 180
181	tpaaaaaevg	vvgvqelphd	lalaa			

Abb. 18: Identifizierung des Proteins HasAp durch Datenbanksuche und Peptidmassenzuordnung. Dargestellt ist die Suchergebnismeldung des Datenbanksuchwerkzeuges PeptIdent. Die Suche ergab das Protein HasAp als einziges zuzuordnendes bakterielles Protein. Von den vier gemessenen Peptidmassen konnte eine (4620,26 Da) nicht zugeordnet werden. Die übrigen drei Peptide sind im oberen Teil der Abbildung tabellarisch mit ihren gemessenen Massen, den Masseneinträgen der Datenbank, den daraus resultierenden Massenabweichungen, eventuell ausgelassenen tryptischen Schnittstellen (MC: 'missed cleavage sites') und ihrer Position im Protein aufgelistet. Im unteren Bereich der Abbildung ist die vollständige Aminosäuresequenz des Proteins HasAp angegeben, die Bereiche der zugeordneten Peptide sind durch Großschreibung hervorgehoben. Die prozentuale Abdeckung der zugeordneten Peptide an der Gesamtsequenz beträgt 44,9 %.

Zuordnung verwendeten Massenbereich liegt. Da in diesem niedermolekularen Bereich nämlich häufig Verunreinigungen der Proben gemessen werden und niedermolekulare Massen zudem nicht sehr spezifisch sind, wurden für die Datenbanksuchen stets nur gemessene Peptidmassen oberhalb von 800 Da ausgewählt. Ein weiteres theoretisch ermitteltes Trypsinfragment (6353,9 Da) hingegen lag aufgrund seines hohen Molekulargewichtes außerhalb des Meßbereiches der standardisierten MALDI/TOF-Analyse.

Von größerem Interesse war ein theoretisches Fragment mit der Masse 4606,37 Da. Dieses Fragment nämlich wies gegenüber dem nicht zugeordneten gemessenen Peptid (4620,26 Da) eine Massendifferenz von 13,89 Da auf. Dieser Wert entspricht ziemlich

Tab. 2: Theoretisch ermittelte Peptidmassen der tryptischen Spaltung des Proteins HasAp. Mit dem Analyseprogramm PeptideMass wurde die Aminosäuresequenz des Proteins HasAp in Trypsinfragmente zerlegt. Angegeben sind die Massen der resultierenden Peptide in Da, ihre Position im Protein, sowie die Aminosäuresequenz.

Masse	Position	Peptidsequenz
6353.91	1-59	MSISISYSTTYSGWTVADYLADWSAYFGDVNHRPGQVVDG SNTGGFNPGPFDGQSQYALK
4606.37	158-205	AVDPSLSINSTFDQLAAAGVAHATPAAAAAEVGVVGVQEL PHDLALAA
4039.97	89-129	LDSIALGDTLTGGASSGGYALDSQEVSFSNLGLDSPIAQGR
3064.48	60-88	STASDAAFIAGGDLHYTLFSNPSHTLWGK
2265.18	136-157	VVYGLMSGDSSALQGQIDALLK
656.34	130-135	DGTVHK

exakt der bei einer Aminosäuremethylierung resultierenden Massenzunahme von 14,01 Da. Die Differenz zwischen 13,89 und 14,01 Da (0,12 Da) liegt innerhalb des Bereiches üblicher Meßwertungenauigkeiten. Eine teilweise vorliegende Methylierung würde auch die Tatsache der Auftrennung des Proteins in drei dicht nebeneinander liegende Proteinspots im 2D-Gel erklären, denn die Methylierung einer geladenen Aminosäure führt zu einer leichten Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Proteins.

Betrachtet man unter der Annahme einer vorliegenden Methylierung das entsprechende Peptid von 4606,37 Da als ebenfalls zugeordnet, so ergäbe sich eine Abdeckung der zugeordneten Peptide von 66,90 % der Gesamtproteinsequenz. Diese prozentuale Abdeckung ist bereits außergewöhnlich hoch und lässt eine gesicherte Identifizierung zu.

Identifizierung weiterer Proteine aus den Kulturüberständen der Stämme 20265 und 61

Im Anschluß an die nähere Untersuchung der sauren sekretorischen Proteine wurden vergleichbare Untersuchungen im mittleren pH-Bereich durchgeführt.

Kulturüberstandsextrakte der Stämme 20265 und 61 wurden in 2D-Gelen der pH-Gradienten 4-7 und 3-6 aufgetrennt und zahlreiche morphotypisch spezifisch differentiell exprimierte Proteine identifiziert. Als Beispiele sind eine 2D-Analyse des

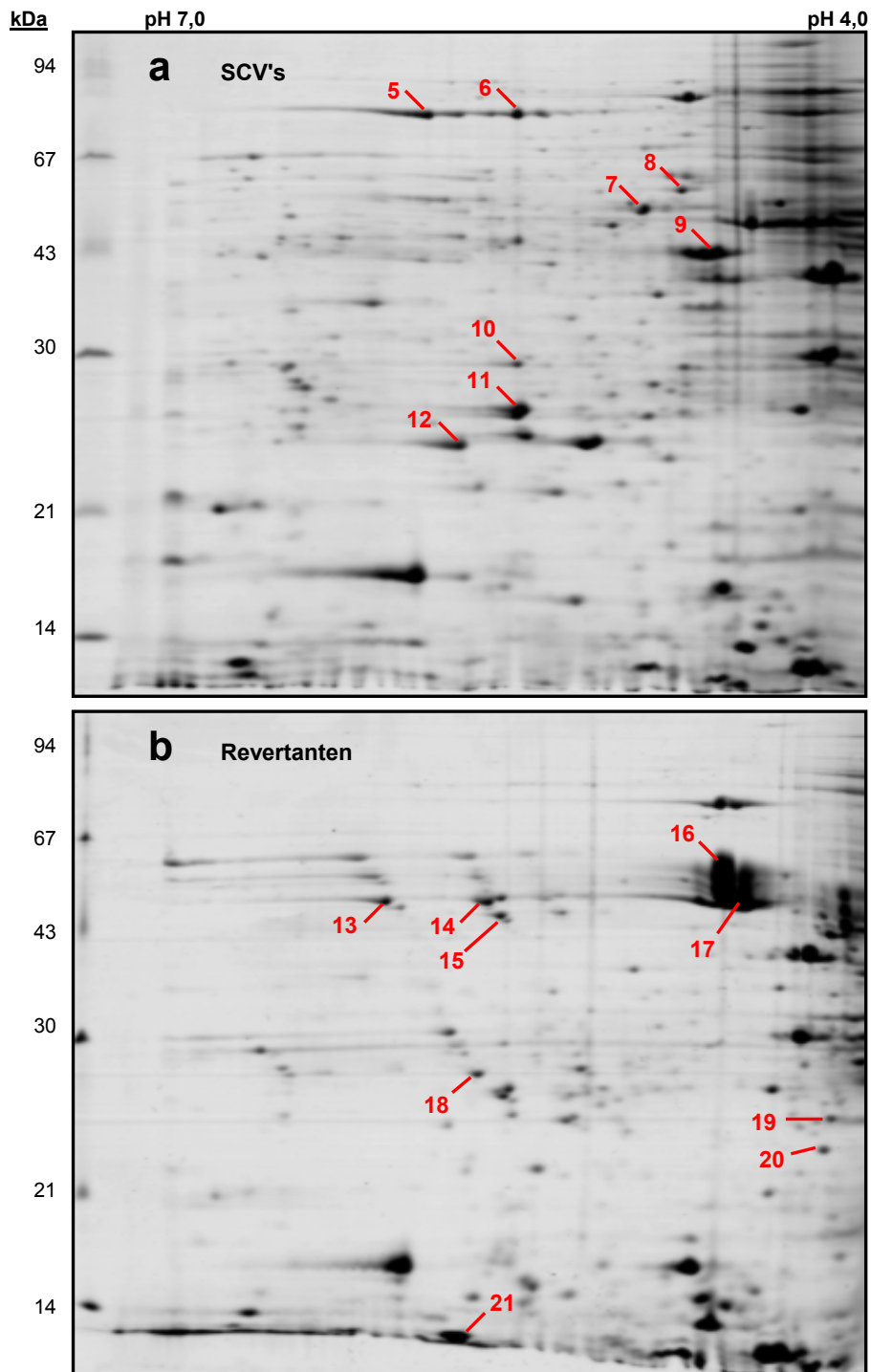


Abb. 19: Vergleichende 2D-Analyse aus Kulturüberständen gewonnener Proteine des Stammes 20265 beim Eintritt in die stationäre Kulturphase. Die Kultivierungsdauer betrug 48 Stunden bis zum Erreichen einer Kulturdichte von $OD_{600} = 2,3$. Der Proteinextrakt wurde im pH-Gradienten 4-7 aufgetrennt, die 2D-Gele wurden mit Coomassie gefärbt. Die markierten Proteine, welche bei SCV's und Revertanten in unterschiedlicher Menge vorlagen, wurden zur massenspektrometrischen Analyse ausgestochen. **a:** Kulturüberstandsextrakt der SCV's; **b:** Kulturüberstandsextrakt der Revertanten.

Stammes 20265 beim Eintritt in die stationäre Kulturphase bei einer optischen Dichte der Kultur von 2,3 (Abb. 19) sowie des Stammes 61 in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte der Kultur von 0,8 (Abb. 20) dargestellt. In den Tabellen 3 bzw. 4 sind die anhand dieser Gele identifizierten Proteine aufgelistet.

Tab. 3: Übersicht identifizierter Proteine aus Kulturüberstandsextrakten des Stammes 20265. Aufgelistet sind die mittels der in Abb. 19 dargestellten 2D-Gele identifizierten Proteine. Die angegebene Nummer entspricht der Kennzeichnung in dieser Abbildung. In der Spalte Expression ist der jeweilige Morphotyp angegeben, bei dem das Protein in größerer Menge auftritt.

Nr.	Gen	Proteinbezeichnung	Expression	kDa	Datenbank-Nr.
5	oprC	'outer membrane' Protein C	SCV's	79,30	PA3790
6	fptA	Fe(III)-Pyochelin Rezeptor	SCV's	76,00	PA4221
7	-	'malic enzyme'	SCV's	45,43	PA5046
8	atpD	ATP Synthase beta Kette	SCV's	49,50	PA5554
9	oprF	'outer membrane' Porin F	SCV's	37,64	PA1777
10	aotJ	Arginin / Ornithin bindendes Protein	SCV's	28,00	PA0888
11	-	Peroxidase	SCV's	21,92	PA3529
12	ycel	nicht klassifiziertes hypothetisches Protein	SCV's	20,76	PA0423
13	fliD	'flagellar capping protein'	Revertanten	49,45	PA1094
14	fliD	'flagellar capping protein'	Revertanten	49,45	PA1094
15	fliD	Fragment des 'flagellar capping protein'	Revertanten	Fragm.	PA1094
16	fliC	Typ A Flagellin	Revertanten	39,50	PA1092
17	fliC	Typ A Flagellin	Revertanten	39,50	PA1092
18	fliD	Fragment des 'flagellar capping protein'	Revertanten	Fragm.	PA1094
19	aprX	Fragment von AprX	Revertanten	Fragm.	PA1245
20	aprX	Fragment von AprX	Revertanten	Fragm.	PA1245
21	aprA	Fragment der alkalischen Metalloprotease	Revertanten	Fragm.	PA1249

Bei der Betrachtung der Proteinmuster fällt auf, dass in den Überstandsextrakten früherer Wachstumsstadien der SCV's weitaus mehr Proteine vorliegen als in denen der Revertanten. Diese Tatsache konnte bei allen untersuchten Stämmen gleichermaßen beobachtet werden. Offensichtlich wird die Proteinsekretion bei den SCV's generell schon bei geringerer Kulturdichte induziert. Erst in späteren Extrakten tauchen dann auch

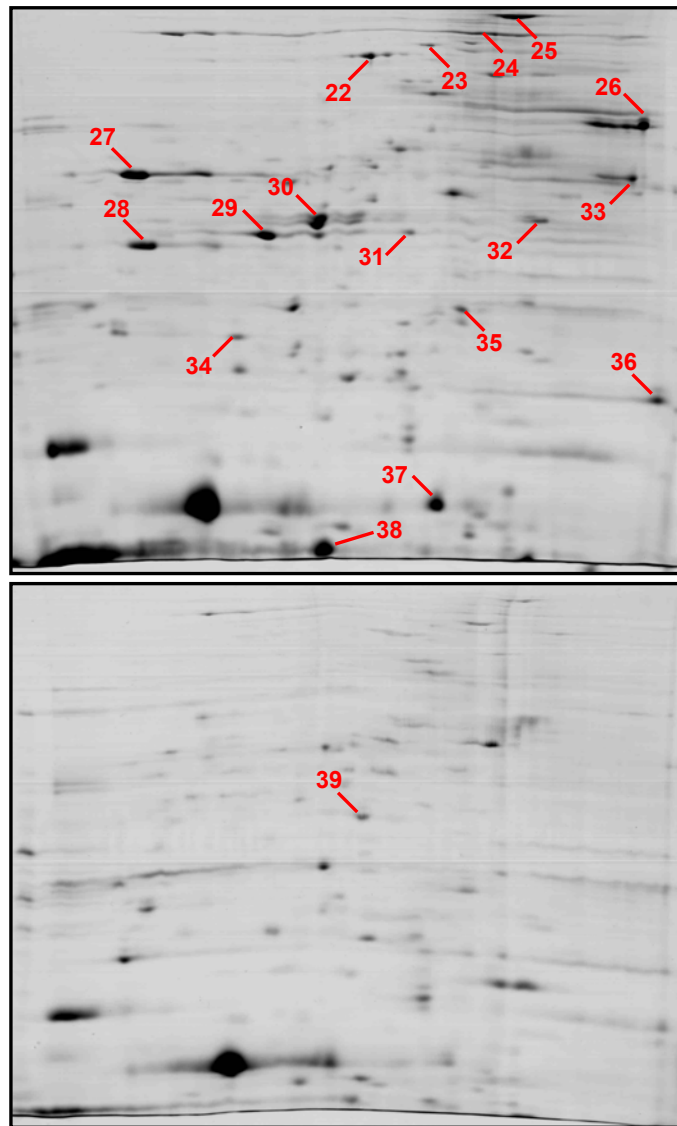


Abb. 20: Vergleichende 2D-Analyse aus Kulturüberständen gewonnener Proteine des Stammes 61 in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase. Die Kultivierungsdauer betrug 18 Stunden bis zum Erreichen einer Kulturdichte von $OD_{600} = 0,7$. Der Proteinextrakt wurde im pH-Gradienten 4-7 aufgetrennt, die 2D-Gele wurden mit Coomassie gefärbt. Die markierten Proteine, welche bei SCV's und Revertanten in unterschiedlicher Menge vorlagen, wurden zur massenspektrometrischen Analyse ausgestochen. **a:** Kulturüberstandsextrakt der SCV's; **b:** Kulturüberstandsextrakt der Revertanten.

vermehrt Proteine auf, die bei den Revertanten in stärkerem Maße als bei den SCV's exprimiert werden. Weiterhin wird anhand der 2D-Gele deutlich, dass in den Überständen der Kulturen nicht nur die intakten Proteine, sondern ebenfalls eine große Anzahl von Abbauprodukten zu finden sind. Dies ist angesichts der stark exprimierten nachgewiesenen Proteasen allerdings nicht weiter verwunderlich. Überraschender ist hin-

Tab. 4: Übersicht identifizierter Proteine aus Kulturüberstandsextrakten des Stammes 61.

Aufgelistet sind die mittels der in Abb. 20 dargestellten 2D-Gele identifizierten Proteine. Die angegebene Nummer entspricht der Kennzeichnung in dieser Abbildung. In der Spalte Expression ist der jeweilige Morphotyp angegeben, bei dem das Protein in größerer Menge auftritt.

Nr.	Gen	Proteinbezeichnung	Expression	kDa	Datenbank-Nr.
22	-	hypothetischer 'outer membrane' Rezeptor	SCV's	80,94	PA4675
23	-	hypothetisches protein	SCV's	74,24	PA0781
24	-	hypothetisches protein	SCV's	100,65	PA0572
25	-	hypothetisches protein	SCV's	219,85	PA4625
26	aprA	alkalische Metalloprotease	SCV's	50,43	PA1249
27	cbpD	'chitin binding protein'	SCV's	42,36	PA0852
28	cbpD	'chitin binding protein'	SCV's	42,36	PA0852
29	cbpD	'chitin binding protein'	SCV's	42,36	PA0852
30	cbpD	'chitin binding protein'	SCV's	42,36	PA0852
31	etfA	Elektronentransfer Flavoprot. α -Untereinh.	SCV's	31,40	PA2951
32	aprA	Fragment der alkalischen Metalloprotease	SCV's	Fragm.	PA1249
33	aprX	AprX-Protein	SCV's	41,42	PA1245
34	-	Fragment eines hypothetischen Proteins	SCV's	Fragm.	PA1784
35	-	hypothetisches protein	SCV's	26,23	PA1784
36	-	hypothetisches protein	SCV's	21,33	PA4063
37	-	hypothetisches protein	SCV's	17,37	PA5481
38	-	nicht in Datenbank	SCV's	-	-
39		hypothetisches protein	Revertanten	35,01	PA0754

gegen zunächst die Tatsache, dass viele der identifizierten Proteine nicht als sekretorisch zu bezeichnen sind, obwohl sie aus den Überständen der Kulturen präpariert wurden. Die Anzahl derartiger Proteine in diesen Extrakten nahm während der Experimente stets mit zunehmender Kulturdichte weiter zu. Schließlich ist festzustellen, dass die Analyse des Stammes 61 einen größeren Anteil lediglich aufgrund von Genomsequenzinformationen postulierter und bisher noch nicht untersuchter Proteine lieferte, als die des Stammes 20265.

4.2.3. Vertiefende Proteomanalyse der drei unterschiedlichen Morphotypen des Stammes 20265

Die Isolierung der Wildtypform des Stammes 20265 aus dem Sputum desselben CF-Patienten, von dem auch die 'Small Colony Variants dieses Stammes isoliert worden waren (die Überprüfung der klonalen Identität der Isolate erfolgte durch Restriktionsanalyse und Auftrennung der Restriktionsfragmente in der Pulsfeld-Gelelektrophorese), ermöglichte es, die Unterschiede des Proteinexpressionsprofils zwischen allen drei Morphotypen dieses klinischen Isolates eingehender zu studieren. Zusätzlich zu den zwischen Revertanten und SCV's bereits beobachteten Expressionsunterschieden konnten gemeinsame Abweichungen im Muster der Proteinprofile der SCV's und der Revertanten im Vergleich zu der Wildtypform beobachtet und die entsprechenden Proteine identifiziert werden. Hierdurch war es möglich, die Erkenntnisse über die Veränderung des bakteriellen Proteoms im Rahmen der morphotypischen Adaption des Erregers deutlich zu erweitern.

Es wurden im Rahmen dieser Untersuchungen zahlreiche 2D-Analysen durchgeführt, anhand von zwei Beispielen (Gesamtzellextrakte und Überstandsextrakte) dieser vergleichenden Proteomuntersuchungen werden die Abweichungen der Muster im folgenden verdeutlicht. Die Identifizierung der Proteine erfolgte sowohl durch MALDI/TOF-MS als auch durch QTOF-Analysen.

Vergleichende Proteomanalyse der Gesamtzellextrakte von Wildtyp, SCV's und Revertanten des Stammes 20265

Im Rahmen der vergleichenden Proteomanalyse der Gesamtzellextrakte von SCV's und Revertanten wurden zuvor nur eine vergleichsweise geringe Anzahl differentiell exprimierter Proteine beobachtet. Mit der Einbeziehung des Wildtypes des Stammes 20265 in die Untersuchungen jedoch konnten einige weitere Proteine beobachtet werden, die gemeinsame Abweichungen ihrer Expression bei SCV's und Revertanten gegenüber der Wildtypform zeigten. Diese Anpassung der Proteinexpression beim Übergang von der Wildtypform zur SCV-Form scheint also bei der Reversion zum großwachsenden Phänotyp erhalten zu bleiben. Abb. 21 zeigt den Vergleich von drei 2D-Gelen zellulärer

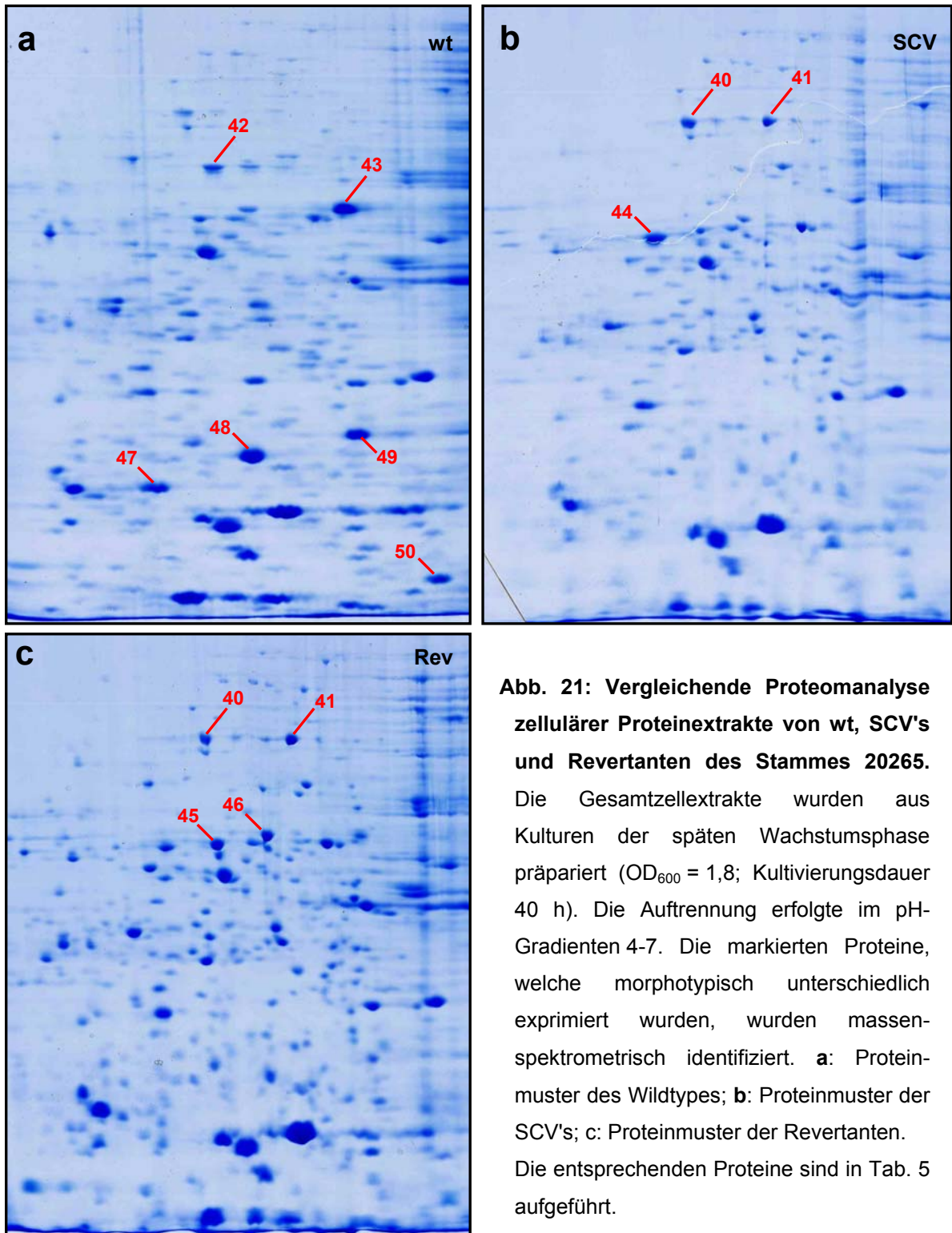


Abb. 21: Vergleichende Proteomanalyse zellulärer Proteinextrakte von wt, SCV's und Revertanten des Stammes 20265. Die Gesamtzellextrakte wurden aus Kulturen der späten Wachstumsphase präpariert ($OD_{600} = 1,8$; Kultivierungsdauer 40 h). Die Auftrennung erfolgte im pH-Gradienten 4-7. Die markierten Proteine, welche morphotypisch unterschiedlich exprimiert wurden, wurden massenspektrometrisch identifiziert. **a:** Proteinmuster des Wildtypes; **b:** Proteinmuster der SCV's; **c:** Proteinmuster der Revertanten. Die entsprechenden Proteine sind in Tab. 5 aufgeführt.

Proteinextrakte der unterschiedlichen Morphotypen in der späten exponentiellen Wachstumsphase. Man erkennt bei Betrachtung der Gele, dass einige Proteine bei SCV's und Revertanten gegenüber dem Wildtyp deutlich schwächer exprimiert werden (Nr. 42,43, 47-50). Andere Proteine werden bei SCV's und Revertanten deutlich überexprimiert (Nr. 40, 41) und wiederum andere besonders stark nur bei den SCV's (Nr. 44) oder den Revertanten (Nr. 45, 46). In Tab. 5 sind die anhand der abgebildeten Gele identifizierten Proteine aufgelistet. Alle in weiteren nicht abgebildeten Analysen identifizierten Proteine werden in Abschnitt 4.2.4. erläutert.

Tab. 5: Übersicht identifizierter Proteine aus Gesamtzellextrakten des Stammes 20265.

Aufgelistet sind die mittels der in Abb. 21 dargestellten 2D-Gele identifizierten Proteine. Die angegebene Nummer entspricht der Kennzeichnung in dieser Abbildung. In der Spalte Expression sind die jeweiligen Morphotypen angegeben, bei denen das Protein zu diesem Kultivierungszeitpunkt in größerer Menge auftritt. Das Protein Zytotoxin verfügt über keine *P.a.*-Datenbanknummer, weil das entsprechende Gen im Genom des sequenzierten Stammes PA01 offensichtlich nicht vorliegt und somit nicht in die Datenbank des Genomprojektes aufgenommen wurde. Das Protein konnte aber problemlos durch Suche in NCBI-Datenbanken identifiziert werden.

Nr.	Gen	Proteinbezeichnung	Expression	kDa	Datenbank-Nr.
40	oprC	'outer membrane' Protein C	SCV, Rev.	79,30	PA3790
41	fptA	Fe(III)-Pyochelin Rezeptor	SCV, Rev.	76,00	PA4221
42	-	hypothetisches Protein	wt	60,36	PA1494
43	chiC	Chitinase	wt	53,08	PA2300
44	exoS	Exoenzym S	SCV, (Rev.)	48,51	PA3841
45	gabD	Sukzinat-Semialdehyddehydrogenase	Revertanten	51,39	PA0265
46	kauB	Aldehyddehydrogenase	Revertanten	53,35	PA5312
47	dsbG	'thiol:disulfide interchange protein'	wt	28,15	PA2476
48	-	hypothetisches Protein	wt	24,92	PA4495
49	ctx	Zytotoxin	wt	30,68	-
50	-	DNA-bindendes Streßprotein	wt	17,47	PA0962

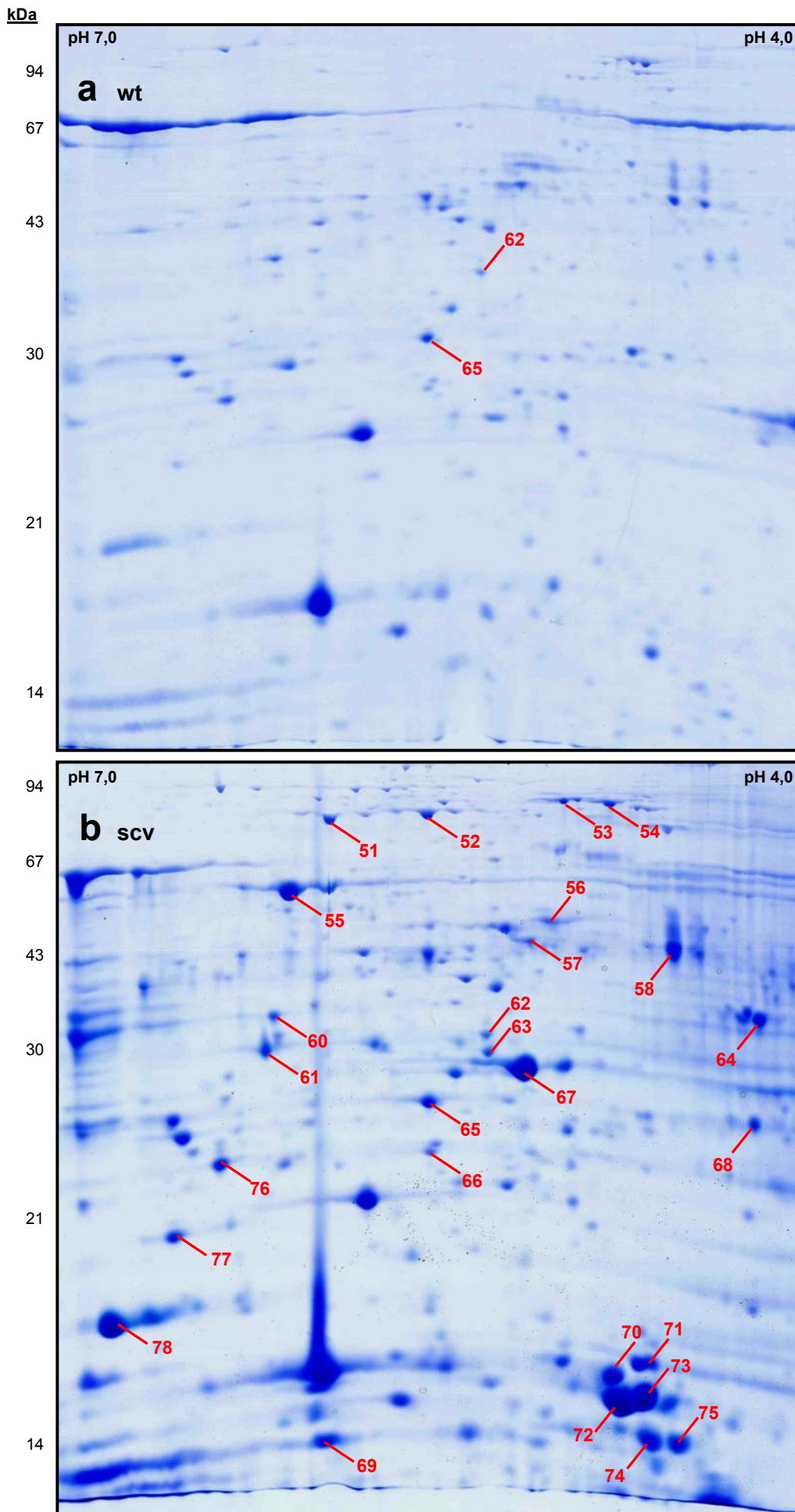
Vergleichende Proteomanalyse der Kulturüberstände von Wildtyp, SCV's und Revertanten des Stammes 20265

Auch beim Vergleich der Proteinmuster der Kulturüberstandsextrakte konnten durch Einbeziehung des Wildtypes zahlreiche weitere Expressionsunterschiede zwischen diesem und den anderen Morphotypen beobachtet und die entsprechenden Proteine identifiziert werden. Die beobachteten Unterschiede der zweidimensionalen Proteinmuster werden hier an einer beispielhaften 2D-Analyse von Überstandsextrakten der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 22) verdeutlicht und die weiteren identifizierten Proteine in vollständiger Form im Abschnitt 4.2.4. aufgeführt. In der Abbildung sind die Proteine markiert, die bei den verschiedenen Morphotypen in unterschiedlicher Quantität auftraten und daher massenspektrometrisch identifiziert wurden. Diese Proteine sind in Tab. 6 zur Übersicht aufgeführt.

Auch bei der Analyse dieser 2D-Gele der Kulturüberstandsextrakte ist festzustellen, dass eine Reihe von Proteinen bei den SCV's und den Revertanten eine ähnliches Expressionsmuster zeigen, welches aber deutlich von dem des Wildtyps abweicht.

Beim Vergleich der zweidimensionalen Proteinmuster der Kulturüberstände von SCV's und Revertanten wurde festgestellt, dass die Sekretion bei den Revertanten später einsetzte als bei den SCV's und in den früheren Kulturüberständen der Revertanten nur sehr wenige Proteine zu beobachten waren. Vergleicht man nun diese Beobachtung mit der abgebildeten 2D-Analyse von Kulturüberständen aller dreier Morphotypen zu einem mittleren Kultivierungszeitpunkt ($OD_{600} = 1,2$; Abb. 22), so läßt sich feststellen, dass beim Wildtyp auch in dieser Wachstumsphase insgesamt noch deutlich weniger Proteine im Kulturüberstand vorliegen als bei den Revertanten. Es konnte darüberhinaus in weiteren Analysen beobachtet werden, dass die Sekretion beim Wildtyp keinesfalls einfach nur zu einem noch späteren Zeitpunkt einsetzte als bei den Revertanten, sondern, dass auch im weiteren Kulturwachstum eine gegenüber den anderen Morphotypen verminderte Proteinsekretion vorlag.

Es ist also festzustellen, dass bei den SCV's insgesamt eine gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Proteinsekretion vorliegt, während die Revertanten eine gegenüber den SCV's wiederum leicht verminderte Proteinsekretion zeigen, die zudem erst zu einem späteren Kultivierungszeitpunkt induziert wird.



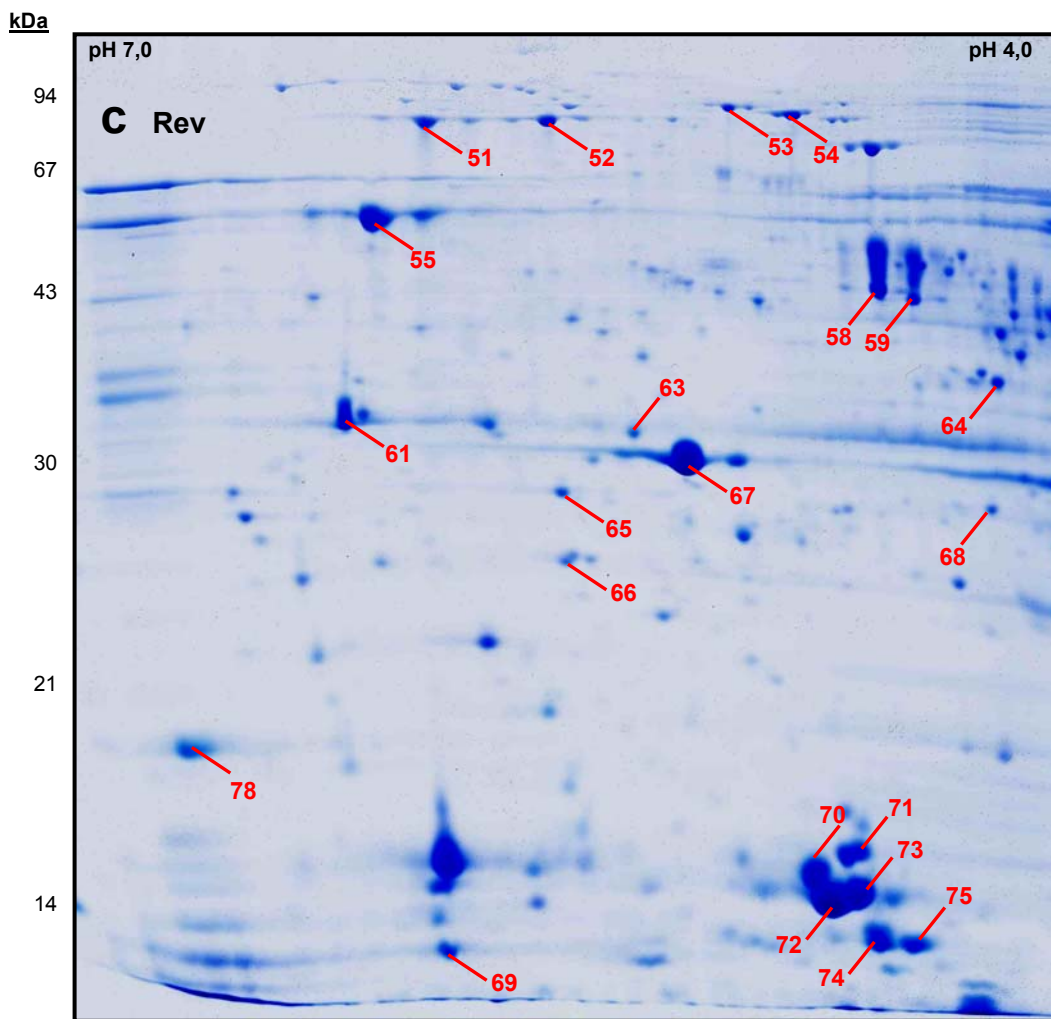


Abb. 22: Vergleichende Proteomanalyse von Proteinextrakten der Kulturüberstände von wt, SCV's und Revertanten des Stammes 20265. Die Proteinextrakte wurden aus Kulturen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase präpariert ($OD_{600} = 1,2$; Kultivierungsdauer 27 h). Die Auftrennung erfolgte im pH-Gradienten 4-7. Die markierten Proteine, welche morphotypisch unterschiedlich exprimiert wurden, wurden massenspektrometrisch identifiziert. a: Proteinmuster des Wildtyps; b: Proteinmuster der SCV's; c: Proteinmuster der Revertanten. Die entsprechenden Proteine sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Übersicht identifizierter Proteine aus Proteinextrakten der Kulturüberstände des Stammes 20265. Aufgelistet sind die in Abb. 22 markierten differentiell exprimierten Proteine. Die angegebene Nummer entspricht der Kennzeichnung in dieser Abbildung. In der Spalte Expression sind die jeweiligen Morphotypen angegeben, bei denen das Protein zu diesem Kultivierungszeitpunkt in größerer Menge auftritt, stehen diese in Klammern, so bedeutet dies leicht verminderte Expression.

Nr.	Gen	Proteinbezeichnung	Expression	kDa	Datenbank-Nr.
51	oprC	'outer membrane' Porin C	SCV, Rev.	79,30	PA3790
52	fptA	Fe(III)-Pyochelin Rezeptor	SCV, Rev.	76,00	PA4221
53	fvpA	Ferripyoverdin Rezeptor	SCV, Rev.	91,15	PA2398
54	-	hypothetisches Protein	SCV, Rev.	74,24	PA0781
55	exoS	Exoenzym S	SCV, Rev	48,51	PA3841
56	atpD	ATP Synthase beta Kette	SCV, (wt)	49,50	PA5554
57	-	'malic enzyme'	SCV, (wt)	45,43	PA5046
58	fliC	Typ A Flagellin	Rev, (SCV)	39,50	PA1092
59	fliC	Typ A Flagellin	Rev, (SCV)	39,50	PA1092
60	-	ABC Eisentransporter (putativ)	SCV	36,39	PA5217
61	popD	'translocator protein' PopD	SCV, Rev.	31,29	PA1709
62	-	hypothetisches Protein	SCV	35,01	PA0754
63	popN	'outer membrane' Protein PopN	SCV, Rev.	31,30	PA1698
64	aprA	Fragment der alkal. Metalloprotease	SCV, (Rev.)	Fragm.	PA1249
65	aotJ	Arginin / Ornithin bindendes Protein	SCV, (Rev.)	28,00	PA0888
66	tsaA	Peroxidase	SCV, Rev.	21,92	PA3529
67	pcrV	Typ III Sekretions Protein PcrV	SCV, Rev.	32,27	PA1706
68	aprA	Fragment der alkal. Metalloprotease	SCV, (Rev.)	Fragm.	PA1249
69	popD	Fragment von PopD	SCV, Rev.	Fragm.	PA1709
70	exoS	Fragment von Exoenzym S	SCV, Rev.	Fragm.	PA3841
71	exoS	Fragment von Exoenzym S	SCV, Rev.	Fragm.	PA3841
72	exoS	Fragment von Exoenzym S	SCV, Rev.	Fragm.	PA3841
73	exoT	Fragment von Exoenzym T	SCV, Rev.	Fragm.	PA0044
74	exoS	Fragment von Exoenzym S	SCV, Rev.	Fragm.	PA3841
75	popB	Fragment von PopB	SCV, Rev.	Fragm.	PA1708
76	-	hypothetisches Protein	SCV, (Rev)	21,33	PA4063
77	-	hypothetisches Protein	SCV, (Rev	16,98	PA3785
78	-	hypothetisches Protein	SCV, Rev.	15,50	PA0315

Identifizierung einzelner Proteine mittels massenspektrometrischer Peptidsequenzierung

Unter den zahlreichen in diesem Abschnitt genannten Proteinen befanden sich eine Reihe solcher, die zunächst nicht mit Sicherheit mit dem standardisierten MALDI-Peptidmassenfingerprint identifiziert werden konnten. In diesen Fällen wurde auf eine massenspektrometrische Peptidsequenzierung mittels QTOF-MS-Analyse zurückgegriffen um die unsicheren MALDI-Daten zu verifizieren.

Die Auswertung einer solchen QTOF-Analyse wird im Folgenden am Beispiel der Identifizierung des Proteins PopD exemplarisch für diese Art von Untersuchungen zusammengefasst.

Nachdem die Probe nicht sicher durch Peptidmassenfingerprint identifiziert werden konnte, wurde durch QTOF-Massenspektrometrie wie in Abschnitt 3.10.4. beschrieben ein Trypsinfragment zur unspezifischen Fragmentierung in der Kollisionszelle des Gerätes ausgewählt und die Massen- zu Ladungsverhältnisse der resultierenden Bruchstücke über den Zeitraum fortschreitender Fragmentierung gemessen.

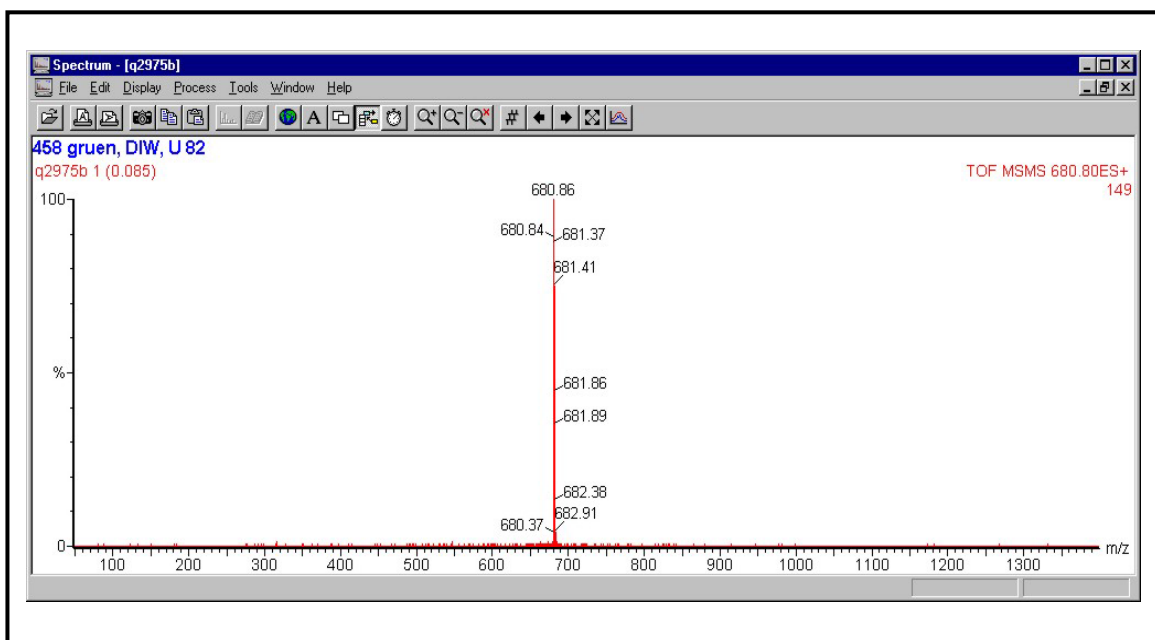


Abb. 23: TOF-Spektrum eines ausgewählten Mutterions in der QTOF-Analyse. Zu sehen ist der Massenpeak (bei 680 m/z) des in der Quadropol-Einheit selektierten Trypsinfragmentes (Mutterion der Peptidfragmente). Das Spektrum ist frei von anderen Peptiden.

Die Auswertung der Meßdatei erfolgte anschließend mit Hilfe des Programmes MassLynx.

Zunächst wurde das Peptidspektrum auf Reinheit des ausgewählten Mutterions (zur Fragmentierung selektiertes ionisiertes Peptid) überprüft (Abb. 23).

Anschließend wurde die Ladung des Mutterions durch die Differenzwerte der Isotopenformen des Peptides bestimmt. Hierzu wurde der Ausschnitt des Peptidpeaks vergrößert (nicht dargestellt). Im Falle des oben abgebildeten Peptides lag ein doppelgeladenes Mutterion vor (Abstände der Isotopenpeaks 0,5). Das Peptid hatte also eine Masse von etwa 1360 Da (680×2).

Nach Zuweisung des Ladungswertes zum Mutterion wurden die Fragmentierungsdaten desselben analysiert und ein Zeitfenster von beginnender bis zur abgeschlossenen Fragmentierung manuell ausgewählt. Die in diesem Zeitfenster enthaltenen Meßwerte wurden automatisiert aufaddiert wodurch sich das in Abb. 24 dargestellte Fragmentierungsspektrum ergab.

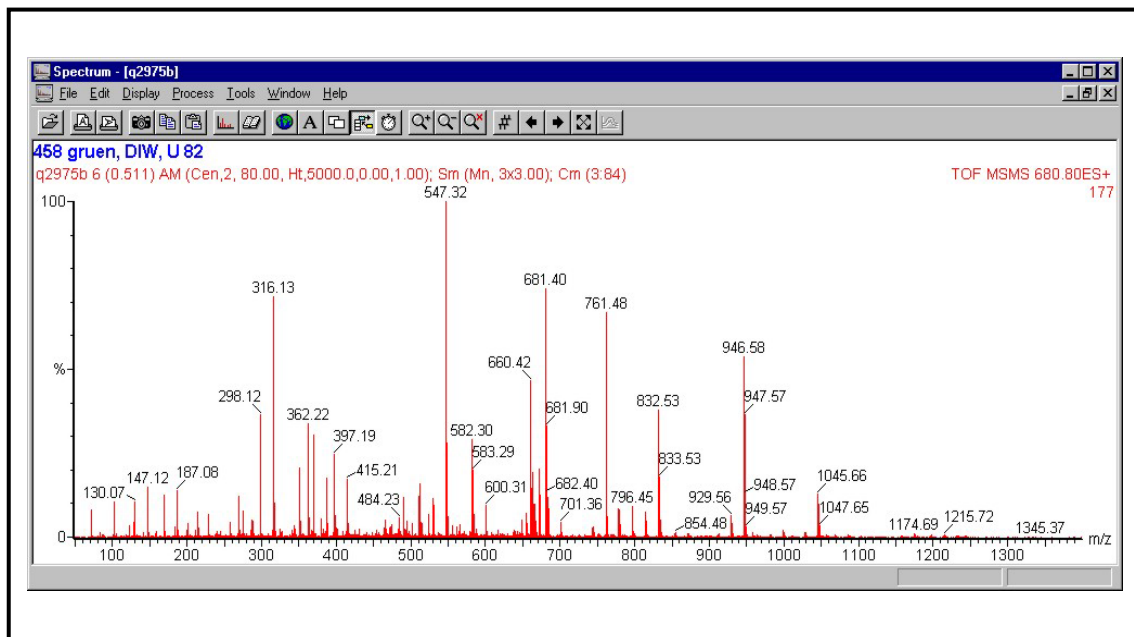


Abb. 24: Fragmentierungsspektrum des ausgewählten Peptides in der QTOF-MS Analyse. Die Peaks entsprechen den Massen- zu Ladungsverhältnissen der aus der unspezifischen Peptidfragmentierung resultierenden Ionen. Aus den Massendifferenzen der Fragmente läßt sich die Aminosäuresequenz des Peptides ableiten.

Durch Kenntnis der Ladung ließen sich die Massenwerte der Fragmentpeaks des Spektrums bestimmen. Das abgebildete Spektrum enthält die Massenpeaks verschiedener sogenannter Serien. Unterschiedliche Serien enthalten Fragmente die aus dem Bruch unterschiedlicher Bindungstypen im Peptid resultieren. Es dominieren im Spektrum aber die sogenannte b- und die y-Serie. Diese Serien enthalten die Massen der an einer beliebigen Peptidbindung einfach gespaltenen Peptidionen. Es überlagern sich im Spektrum also die Massenserien der C- und der N-terminalen Bruchstücke.

Die Errechnung der Massendifferenzen und die Zuordnung dieser Differenzwerte zu den Massen der entsprechenden Aminosäuren erfolgte vollautomatisiert.

Ebenso automatisiert wurde die folgende Datenbanksuche durchgeführt, indem die Daten direkt in das Suchprogramm Sonar MS/MS (ProteoMetrics) übernommen wurden.

Im oben gezeigten Beispiel wurde eine sichere Identifizierung durch Zuordnung der Aminosäuresequenz "EGEVNATIGQSQK" an der Position 244 des Proteins PopD erzielt.

Diese Vorgehensweise wurde anschließend stets mit weiteren Mutterionen wiederholt um die Identifizierung abzusichern.

4.2.4. Zusammenfassende Analyse aller identifizierter differentiell exprimierter Proteine

In dieser Arbeit wurde gezielt nach Proteinen gesucht, welche von einzelnen Morphotypen der untersuchten Stämme anders als von den anderen Morphotypen exprimiert werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden insgesamt etwa 250 Proteinspots aus 2D-Gelen verschiedenster Proteinextrakte ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert.

Die Zahl unterschiedlicher identifizierter Proteine war allerdings weitaus geringer. Der Hauptgrund hierfür waren zahlreiche Fragmente und modifizierte Formen von Proteinen in den Extrakten, so dass ein und das selbe Protein oftmals in einer beträchtlichen Anzahl von unterschiedlichen Spots im 2D-Gel nachgewiesen wurde. Auch die teilweise schwierige Zuordnung von Spots in den 2D-Gelen zu denen andersartiger Extrakte führte in zahlreichen Fällen zur wiederholten Identifizierung der gleichen Proteine. Einzelne Proteine wurden auf diese Art und Weise bis zu zehn mal unabhängig voneinander

erfolgreich identifiziert. Schließlich erfolgten auch eine Reihe von Analysen ohne den Erfolg einer gesicherten Identifizierung aufgrund mangelnder Qualität der erhaltenen Spektren.

Auch wenn die Zahl der identifizierten, morphotypisch spezifisch differentiell exprimierten Proteine also nicht unüberschaubar groß ist, wird der Überblick doch durch die wachstumsphasenbedingten Expressionsunterschiede zwischen den analysierten *P. aeruginosa* Morphotypen erschwert. Hinzu kommt die Tatsache, dass Proteine im Einzelfall teils in einem Morphotyp und teils in zwei Morphotypen gegenüber den /dem anderen als überexprimiert beobachtet wurden und zum Teil auch in allen drei Morphotypen in unterschiedlicher Menge gebildet wurden.

Die in den vorherigen Kapiteln abgebildeten 2D-Gele können zudem nur beispielhaft die Beobachtungen über das Muster der unterschiedlichen Proteinexpression wiedergeben und keinen vollständigen Gesamtüberblick bieten.

Aus diesen Gründen werden in den folgenden Tabellen alle identifizierten morphotypisch differentiell exprimierten Proteine mit den gewonnenen Daten über ihr Expressionsprofil zusammengefasst.

Die Daten wurden zu diesem Zweck in vier unterschiedliche Tabellen aufgegliedert. In Tabelle 7 sind alle Proteine aufgeführt, die entweder in den SCV's oder in den Revertanten des Stammes 20265 zu irgendeinem Kultivierungszeitpunkt als überexprimiert gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen wurden. Identifizierte Proteine des Stammes 61 fehlen hier, sofern sie im Stamm 20265 nicht nachgewiesen werden konnten, da von diesem Stamm die Wildtypform nicht verfügbar war. Es finden sich in dieser Tabelle nähere Informationen zu Funktion und Klassifizierung der entsprechenden Proteine, sowie die Angabe, in welchem Morphotyp die Überexpression zu beobachten war. Tabelle 8 enthält die gleichen Angaben aller identifizierten Proteine, die in Revertanten oder SCV's gegenüber dem Wildtyp als vermindert exprimiert beobachtet wurden. Es sind daher auch einige wenige Proteine in beiden Tabellen zu finden, sofern sie bei einem Morphotyp gegenüber dem Wildtyp überexprimiert vorhanden waren, in dem anderen Morphotyp aber nur vermindert exprimiert wurden. In Tabelle 9 sind diejenigen Proteine des Stammes 61 aufgeführt, die nicht den identifizierten Proteinen des Stammes 20265 zugeordnet werden konnten und mit den gleichen Informationen versehen. In Tabelle 10 schließlich findet sich eine Übersicht über alle identifizierten Proteine mit Informationen

über den zeitlichen Verlauf der Expression, die Art des Extraktes, aus dem die Proteine analysiert wurden und dem Stamm, in welchem der Expressionsunterschied beobachtet wurde. Die in den Tabellen angegebenen Molekulargewichte bezeichnen bei allen Proteinen welche eine Prozessierung erfahren den Massen der unprozessierten 'Precursor'-Formen. dieser Proteine.

Tab. 7: Proteine mit nachgewiesener Überexpression bei SCV's oder Revertanten.

Aufgeführt sind Proteine, bei denen entweder bei SCV's oder bei Revertanten oder aber bei beiden Morphotypen eine Überexpression gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden konnte. Die angegebene Klassifizierung entspricht der aktuellen Annotierungsdatenbank des Genomsequenzierungskonsortiums (www.pseudomonas.com). Der angegebene 'confidence level' (cl) gibt die Qualität der angegebenen funktionellen Informationen über das jeweilige Protein an: level 1: Funktion experimentell in *P. aeruginosa* nachgewiesen; level 2: Funktion eines stark homologen Gens in einem anderen Organismus nachgewiesen ; level 3: Funktion postuliert aufgrund konservierter Aminosäuremotive, struktureller Eigenschaften oder begrenzter Homologie zu bekannten Genen; level 4: Funktion unbekannt. Bei Molekulargewicht und pl handelt es sich um theoretische Werte. In der Spalte Expression ist angegeben, bei welchem Morphotyp die Überexpression beobachtet wurde.

Nr.	Gen	Beschreibung	Klassifizierung	cl	kDa	pl	Expr.
PA0044	exoT	Exoenzym T / sekretorische ADP-Ribosyltransferase	sekretierte Faktoren	1	48,53	5,5	SCV Rev.
PA0265	gabD	Sukzinat-Semialdehyd-Dehydrogenase	Biosynthese, Metabolismus	2	51,39	5,1	SCV Rev.
PA0315	-	hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	15,50	6,6	SCV
PA0572	-	hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	100,65	6,1	SCV
PA0588	(yeaG)	konserviertes hypothetisches Protein, 88% Ähnlichkeit zum hypothetischen Protein YeaG aus <i>E. coli</i>	nicht klassifiziert	4	73,99	5,6	SCV
PA0781	-	hypothetisches Protein, 37% Ähnlichkeit zum Protein PhuR (outer membrane Hemin Rezeptor), C-terminale Rezeptor-Region	nicht klassifiziert	4	74,24	5,0	SCV Rev.
PA0888	aotJ	Arginin / Ornithin - bindendes Protein AotJ, sturktuelles Motiv der extrazellulären substratbindenden Proteine der Familie 3	Transport	1	28,00	6,43	SCV
PA1086	flgK	'flagellar hook associated protein 1'	Bewegung, Anheftung	2	71,73	4,6	Rev.

Nr.	Gen	Beschreibung	Klassifizierung	cl	kDa	pl	Expr.
PA1092	fliC	Flagellin (Typ A), flagellares Filamentprotein	Bewegung, Anheftung	1	39,50	4,7	Rev.
PA1094	fliD	'flagellar capping protein FliD'	Bewegung, Anheftung	1	49,45	6,5	Rev.
PA1245	aprX	hypothetisches Protein, sekretiert über Typ I Sekretion	sekretierte Faktoren	4	41,42	4,3	SCV Rev.
PA1249	aprA	alkalische Metalloproteinase	sekretierte Faktoren	1	50,43	4,2	SCV Rev.
PA1588	sucC	Succinyl-CoA Synthase, beta-Kette	Energiemetabolismus	2	41,81	5,8	SCV Rev.
PA1698	popN	Typ III - Sekretions 'outer membrane' Protein PopN	Membranproteine, Proteinsekretion	1	31,30	5,4	SCV Rev.
PA1706	pcrV	Typ III - Sekretionsprotein PcrV	Proteinsekretion	1	32,27	5,0	SCV Rev.
PA1708	popB	'translocator protein' PopB, Typ III Sekretion	Proteinsekretion	1	39,97	6,1	SCV Rev.
PA1709	popD	'translocator outer membrane protein' PopB, Typ III Sekretion	Proteinsekretion		31,29	5,8	SCV Rev.
PA2395	-	hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	31,07	5,5	SCV
PA2398	fpvA	'outer membrane' -Ferripyoverdin Rezeptor	Transport	1	91,15	5,4	SCV Rev.
PA2452	-	hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	33,94	10,0	SCV
PA2532	tpx	Thiol Peroxidase	Adaption, Schutz	2	17,23	5,16	SCV
PA3407	hasAp	'heme acquisition protein' HasAp	Transport, sekretierte Faktoren	1	20,90	4,2	SCV
PA3529	(tsaA)	putative Peroxidase, 88% Ähnlichkeit zur Alkylhydrogen-Peroxidreduktase aus <i>L. pneumophila</i>	Adaption, Schutz, putative enzyme	3	21,92	5,4	SCV Rev
PA3655	tsf	Elongationsfaktor Ts	Translation	2	30,69	5,2	SCV
PA3785	-	konserviertes hypothetisches Protein, mit vorhergesagtem Signalpeptid	nicht klassifiziert	4	16,98	6,3	SCV
PA3790	oprC	putatives Kupfertransport 'outer membrane' Porin OprC	Membranproteine Transport	1	79,30	6,0	SCV
PA3841	exoS	Exoenzym S, ADP-Ribosyltransferase	sekretierte Faktoren	1	48,51	5,5	SCV Rev.
PA4063	-	hypothetisches Protein mit vorhergesagtem Signalpeptid	nicht klassifiziert	4	21,33	5,9	SCV

Nr.	Gen	Beschreibung	Klassifizierung	cl	kDa	pl	Expr.
PA4221	fptA	Fe(III)-Pyochelin 'outer membrane' Rezeptor	Transport	1	76,00	5,3	SCV Rev
PA4265 PA4277	tufA/ tufB	Elongationsfaktor Tu	Translation	2	43,37	5,2	SCV
PA4385	groEL	GroEL Protein	Chaperone und Hitzeschock	1	57,05	5,0	SCV Rev
PA5046	-	'malic enzyme', Malat-Dehydrogenase	Metabolismus	2	45,43	5,0	SCV
PA5217	-	putative bindende Komponente des ABC Eisentransporters, Signalpeptid vorhergesagt	Transport	3	36,39	6,0	SCV
PA5312	kauB	putative Aldehyd-Dehydrogenase	putative Enzyme	3	53053	5,4	SCV Rev.

Tab. 8: Proteine mit reduzierter Expression bei SCV's oder Revertanten. Aufgeführt sind Proteine, die entweder bei SCV's oder bei Revertanten oder aber bei beiden Morphotypen schwächer als beim Wildtyp exprimiert wurden. Der angegebene 'confidence level' (cl) gibt die Qualität der angegebenen funktionellen Informationen über das jeweilige Protein an (siehe Tab. 7). Bei Molekulargewicht und pl handelt es sich um theoretische Werte. In der Spalte Expression ist angegeben, bei welchem Morphotyp die abgeschwächte Expression beobachtet wurde.

Nr.	Gen	Beschreibung	Klassifizierung	cl	kDa	pl	Expr.
PA0291	oprE	Porin E1, anaerobisch induziertes 'outer membrane Porin OprE	Membranproteine	1	49,65	5,2	SCV Rev.
PA0423	yceI	konserviertes hypothetisches Protein, 84% Ähnlichkeit zum hypothetischen Protein YceI aus <i>E. coli</i>	nicht klassifiziert	4	20,76	6,1	Rev.
PA0572	-	hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	100,65	6,1	Rev.
PA0852	cbpD	'chitin binding protein' CbpD	sekretierte Faktoren	1	42,36	6,4	SCV Rev.
PA0962	-	putatives DNA bindendes Streßprotein	Adaption, Schutz	3	17,47	5,0	SCV Rev
PA1092	fliC	Flagellin (Typ A), flagellares Filamentprotein	Bewegung, Anheftung	1	39,50	4,7	SCV

Nr.	Gen	Beschreibung	Klassifizierung	cl	kDa	pI	Expr.
PA1094	fliD	'flagellar capping protein FliD'	Bewegung, Anheftung	1	49,45	6,5	SCV
PA1494	-	konserviertes hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	60,63	5,7	SCV Rev.
PA1777	oprF	Hauptporin und 'outer membrane' Strukturporin OprF	Membranpro- teine, Transport	1	37,64	4,9	SCV Rev.
PA2300	chiC	Chitinase	Kohlenstoff- Katabolismus	2	53,08	5,2	SCV Rev.
PA2476	dsbG	'thiol:disulfide interchange protein' DsbG, Signalpeptid, vermutlich periplasmatisch	Modifikation	2	28,15	6,5	SCV Rev.
PA2623	icd	Isocitrat Dehydrogenase, (Oxalsukzinat Dehydrogenase)	Biosynthese und Metabolismus	2	45,73	5,1	SCV Rev.
PA2951	etfA	Elektronentransfer Flavoprotein	Energiemetabo- lismus	2	31,40	5,0	SCV Rev.
PA4495	-	hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	24,92	4,8	SCV Rev.
PA4761	dnaK	Dnak Protein (Hsp70)	Schutz Hitzeschock	2	68,5	4,8	Rev.
PA5046	-	'malic enzyme', Malat-Dehydrogenase	Metabolismus	2	45,43	5,0	Rev.
PA5554	atpD	ATP Synthase beta Kette	Energiemetabo- lismus	2	49,50	4,9	Rev.
NCBI A60690	ctx	Zytotoxin (Leucocidin), periplasmatisch akkumuliert bis zur bakteriellen Lyse	Toxine	1	31,78	5,3	SCV Rev.

Tab. 9: Übersicht der morphotypisch differentiell exprimierten Proteine beim Stamm 61.

Aufgeführt sind Proteine, die bei SCV's und Revertanten des Stammes 61 unterschiedlich exprimiert wurden und dem Proteinstmuster des Stammes 20265 nicht sicher zugeordnet werden konnten und damit noch nicht in den oberen Tabellen aufgeführt sind. Der angegebene 'confidence level' (cl) gibt die Qualität der angegebenen funktionellen Informationen über das jeweilige Protein an (siehe Tab. 7). Bei Molekulargewicht und pI handelt es sich um theoretische Werte. In der Spalte Expression ist angegeben, bei welchem Morphotyp die stärkere Expression beobachtet wurde.

Nr.	Gen	Beschreibung	Klassifizierung	cl	kDa	pI	Expr.
PA0754	-	hypothetisches Protein mit vorhergesagtem Signalpeptid	nicht klassifiziert	4	35,01	5,6	Rev.
PA1784	-	hypothetisches Protein, 40% Ähnlichkeit zur Alginate Lyase aus <i>K. pneumoniae</i>	nicht klassifiziert	4	26,23	4,9	SCV
PA2069	-	putative Carbamoyl Transferase	putative Enzyme	3	64,16	5,8	SCV
PA2782	-	hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	22,73	4,86	SCV
PA3162	rpsA	30S ribosomales Protein S1	Translation	2	61,97	4,8	SCV
PA3332	-	konserviertes hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	15,96	5,4	SCV
PA3343	-	hypothetisches Protein, 5 Transmembranomänen vorhergesagt	nicht klassifiziert	4	44,07	8,7	SCV
PA3648	-	putatives 'outer membrane' Protein unbekannter Funktion	Membranproteine	3	88,38	5,0	SCV
PA4266	fusA1	Elongationsfaktor G	Translation	2	78,11	5,1	SCV
PA4602	glyA3	Serin Hydroxymethyltransferase	Biosynthese und Metabolismus	2	45,42	5,7	Rev.
PA4625	-	hypothetisches Protein	nicht klassifiziert	4	219,85	4,9	SCV
PA4675	-	putativer TonB abhängiger 'outer Membrane' Rezeptor	Transport	3	80,94	5,3	SCV
PA4922	azu	Azurin, periplasmatisch	Energiemetabolismus	1	14,10	5,7	Rev.
PA5481	-	hypothetisches Protein mit vorhergesagtem Signalpeptid	nicht klassifiziert	4	17,37	5,3	SCV

Tab. 10: Expressionsmuster der identifizierten Proteine bei den unterschiedlichen Morphotypen der Stämme 20265 und 61. Die Tabelle gibt einen Überblick über alle identifizierten, morphotypisch differentiell exprimierten Proteine. Es ist die Art der Extrakte angegeben, in denen das entsprechende Protein nachweisbar war (U: Überstandsextrakt, Z: zellulärer Extrakt) und die Stämme, in deren Extrakten es identifiziert wurde. In den Spalten "Expression" sind die vorliegenden Mengen der Proteine in der früheren bis mittleren Wachstumsphase (1), sowie in der späteren bis stationären Phase (2) graphisch dargestellt: (-): kein Protein im Gel sichtbar, (+): schwach exprimiertes Protein, (++) : mittlere Proteinexpression, (+++) : starke Proteinexpression, (++++): sehr starke Proteinexpression. Bei Proteinen, die nur im Stamm 61 nachgewiesen wurden ist keine Expression für den Wildtyp angegeben.

Nr.	Prot.	Extrakt	Stamm	Expression wt		Expression SCV		Erpression Rev.	
				1	2	1	2	1	2
PA0044	ExoT	U	20265	-	-	+	++	+	++
PA0265	GabD	Z	20265	+	++	++	++	++	+++
PA0291	OprE	U	20265	-	+++	-	++	-	+
PA0315	-	U	20265	+	++	+++	++	+	++
PA0423	(Ycel)	U	20265	+++	+++	+++	+++	+	++
PA0572	-	U	20265, 61	+	+++	+++	+++	-	++
PA0588	(YeaG)	Z	20265	-	+	+	++	+	+
PA0754	-	U, Z	61			-	+	+	++
PA0781	-	U	20265, 61	-	+	++	+++	+	++
PA0852	CbpD	U	20265	+	+++	+	+	-	-
PA0852	CbpD	U, Z	61			+++	+++	+	++
PA0888	AotJ	U	20265	+	++	++	+++	+	++
PA0962	-	Z	20265	+	+++	+	+	+	+
PA1086	FlgK	U	20265	+	++	+	+	++	++
PA1092	FliC	U, Z	20265	++	+++	++	++	+++	++++
PA1094	FliD	U	20265	-	++	-	+	-	+++
PA1245	AprX	U	20265, 61	-	++	+++	+++	+	+++
PA1249	AprA	U	20265, 61	-	+++	+++	++++	+	++++
PA1494	-	U, Z	20265	+	+++	+	++	+	+
PA1588	SucC	U	20265	-	++	+	+++	+	+
PA1698	PopN	U	20265	-	+	+	+++	+	+++
PA1706	PcrV	U	20265	+	+	+++	+++	+++	+++
PA1708	PopB	U	20265	+	++	+++	++	+++	++
PA1709	PopD	U, Z	20265	+	++	+++	+++	++	+++
PA1777	OprF	U, Z	20265, 61	++	++++	-	+++	-	++
PA1784	-	U	61			+	+++	-	-
PA2069	-	Z	61			-	++	-	-

PA2300	ChiC	U, Z	20265, 61	+	+++	+	++	+	+
Nr.	Prot.	Extrakt	Stamm	Expression wt		Expression SCV		Erpression Rev.	
				1	2	1	2	1	2
PA2395	-	U	20265	-	-	-	++	-	+
PA2398	FpvA	U	20265	-	++	++	++	+	++
PA2452	-	U	20265	+	+++	+++	+++	++	+++
PA2476	DsbG	U, Z	20265	+	+++	-	+	-	-
PA2532	tpx	U, Z	20265, 61	+	+	+	++	+	++
PA2623	ICD	U, Z	20265, 61	+	+++	+	++	+	+
PA2782	-	U	61			-	++	-	-
PA2951	EtfA	U, Z	20265, 61	+	++	+	+	+	+
PA3162	RpsA	U	61			+	++	+	+
PA3332	-	Z	61			+	+	-	-
PA3343	-	U, Z	61			+	++	+	+
PA3407	HasAp	U	20265	++	++++	+++	++++	+	+++
PA3529	-	U, Z	20265, 61	+	+	+	+++	+	++
PA3648	-	U	61			+	+++	+	+
A3655	Tsf	U, Z	20265	-	+	-	++	-	+
PA3785	-	U	20265	+	+	++	++	+	+
PA3790	OprC	U, Z	20265	+	+	++	+++	+	++
PA3841	ExoS	U	20265, 61	+	+++	+++	+++	+++	+++
PA4063	-	U	20265, 61	+	+	++	+	+	-
PA4221	FptA	U, Z	20265, 61	-	+	++	+++	+	+++
PA4265/ PA4277	TufA / TufB	U, Z	20265, 61	+	++	+	++	+	+
PA4266	FusA	U, Z	61			-	++	-	+
PA4385	GroEL	U, Z	20265, 61	+	+	++	++	+	++
PA4495	-	U, Z	20265	+	+++	+	+	-	+
PA4602	GlyA3	Z	61			+	+	++	++
PA4625	-	U	61			++	++	+	+
PA4675	-	U	61			+++	+++	+	++
PA4761	DnaK	U, Z	20265, 61	+	++	+	++	+	+
PA4922	AZU	Z	61			+	+	++	+++
PA5046	-	U	20265	-	+	-	++	-	-
PA5217	-	U	20265	-	+	+	++	-	+
PA5312	KauB	Z	+	+	++	++	+++	+	+++
PA5481	-	U	61			+++	+++	+	++
PA5554	AtpD	U	20265	+	++	-	+	-	+
NCBI A60690	CTX	Z	20265	+	+++	+	+	+	++

4.2.5. Das Proteom unter dem Einfluß der Verfügbarkeit von Eisen

Bei der näheren Betrachtung der bei den analysierten SCV's überexprimierten Proteine fiel auf, dass eine Reihe dieser Proteine funktionelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Es handelt sich hierbei nämlich um Proteine, welche eine Rolle bei der Sicherstellung der Versorgung der Bakterien mit essentiellen Nährstoffen und Spurenelementen, vor allem mit Eisen, spielen.

Zu nennen wären hier vor allem die folgenden identifizierten überexprimierten Proteine:

- FpvA → 'outer membrane' Rezeptor für die Siderophore Pyoverdin zum gezielten Transport von Eisen in die Zelle
- FptA → Fe(III) Pyochelin 'outer membrane' Rezeptor, Eisenversorgung über Bindung der Siderophore Pyochelin
- HasAp → "Haemophore", bindet extrazellulär Häm mit hoher Affinität und schleust es über den Rezeptor PhuR in die Zelle ein.
- PA5217 → putative Bindungskomponente des ABC-Eisentransportsystems
- OprC → 'outer membrane' "Kupfertransport"-Porin
- AprA → alkalische Protease, extrazellulärer Proteinabbau führt zur Freisetzung von Nährstoffen und Spurenelementen.
(AprX?)

Mit Ausnahme des Proteins OprC, welches für den Transport von Kupferionen zuständig ist, tragen diese Proteine direkt oder indirekt zur Aufnahme von Eisen bei. Bekanntlich stellt die begrenzte Verfügbarkeit von Eisen für Bakterien gerade im Verlauf von Infektionen häufig ein limitierendes Wachstumshemmnis dar. Die Tatsache der Überexpression der oben aufgeführten "Werkzeuge" des Bakteriums zum Erwerb dieses entscheidenden Elementes könnte also von Bedeutung für eine "erfolgreiche" Persistenz der Infektion sein. Hinzu kommt eine größerer Anzahl identifizierter aber zur Zeit noch nicht klassifizierter Membranproteine, welche bei den SCV's ebenfalls eine Überexpression aufweisen. Unter diesen Proteinen könnten sich weitere befinden, die im Zusammenhang der Eisenaufnahme eine Rolle spielen. Einen Hinweis hierfür gibt es beispielsweise beim durch die SCV's überexprimierten Protein PA0781, welches nicht klassifiziert ist, aber eine 37%ige Ähnlichkeit zum Protein PhuR ('outer membrane'

Hemin Rezeptor) aufweist, oder auch beim gleichfalls überexprimierten Protein PA4675, welches eine 62%ige Ähnlichkeit zum 'ferric aerobactin' Rezeptor aus *E. coli* (ebenfalls ein Rezeptor einer eisenbindenden Siderophore) zeigt.

Aufgrund dieser Hinweise einer möglicherweise vorliegenden Anpassungsstrategie der SCV's an eine chronische Infektion der pulmonalen Epithelien wurde der Einfluß der Verfügbarkeit des Elementes Eisen auf das Proteinprofil näher untersucht.

Im Rahmen dieser Versuche wurden Wildtyp- und Revertantenkulturen von metallischen Ionen depletiert, um zu untersuchen, ob die beobachtete Überexpression der Eisenaquisitionsproteine auch bei diesen Morphotypen unter akuten Mangelbedingungen auftritt. Weiterhin wurden SCV-Kulturen mit Eisenverbindungen supplementiert um zu analysieren, ob die beobachtete Überexpression der angesprochenen Gene bei diesem Morphotyp konstitutiver Natur ist, oder, ob lediglich eine abweichende Regulation vorliegt.

Aus diesem Kulturmaterial wurden wie bei den bereits beschriebenen Proteomanalysen Gesamtzell- und Kulturüberstandsextrakte unterschiedlicher Kultivierungsstadien angefertigt und diese durch 2D-GE analysiert.

Um die Auswirkung der Eisensupplementierung auf eine Kultur von *P. aeruginosa* SCV's zu verdeutlichen ist in Abb. 25 das zweidimensionale Proteinmuster des Extraktes eines in der früheren Wachstumsphase entnommenen Kulturüberstandes einer mit 10µM FeSO₄ und 30µM Eisencitrat supplementierten SCV-Kultur dem einer parallel unter Standardbedingungen gewachsenen Kultur gegenübergestellt.

Tatsächlich ist beim Anblick der 2D-Gele auf den ersten Blick zu erkennen, dass die Expression der normalerweise bei den SCV's überexprimierten Proteine AprA, AprX und HasAp durch die Supplementation des Mediums mit Eisen praktisch vollständig unterbunden wurde. Diese Proteine sind bei den SCV's also keineswegs konstitutiv überexprimiert, sondern ihre Synthese wird durch ausreichendes Eisenangebot im Medium umgehend negativ reguliert. Bezogen auf diese drei Proteine entspricht die Expression damit eher der einer Revertantenkultur in dieser Wachstumsphase. Ein anderes Bild ergibt sich allerdings bei der Betrachtung der Proteine ExoS und PopD. Die Expression dieser ohnehin schon bei den SCV's überexprimierten Proteine wurde durch die Zugabe der

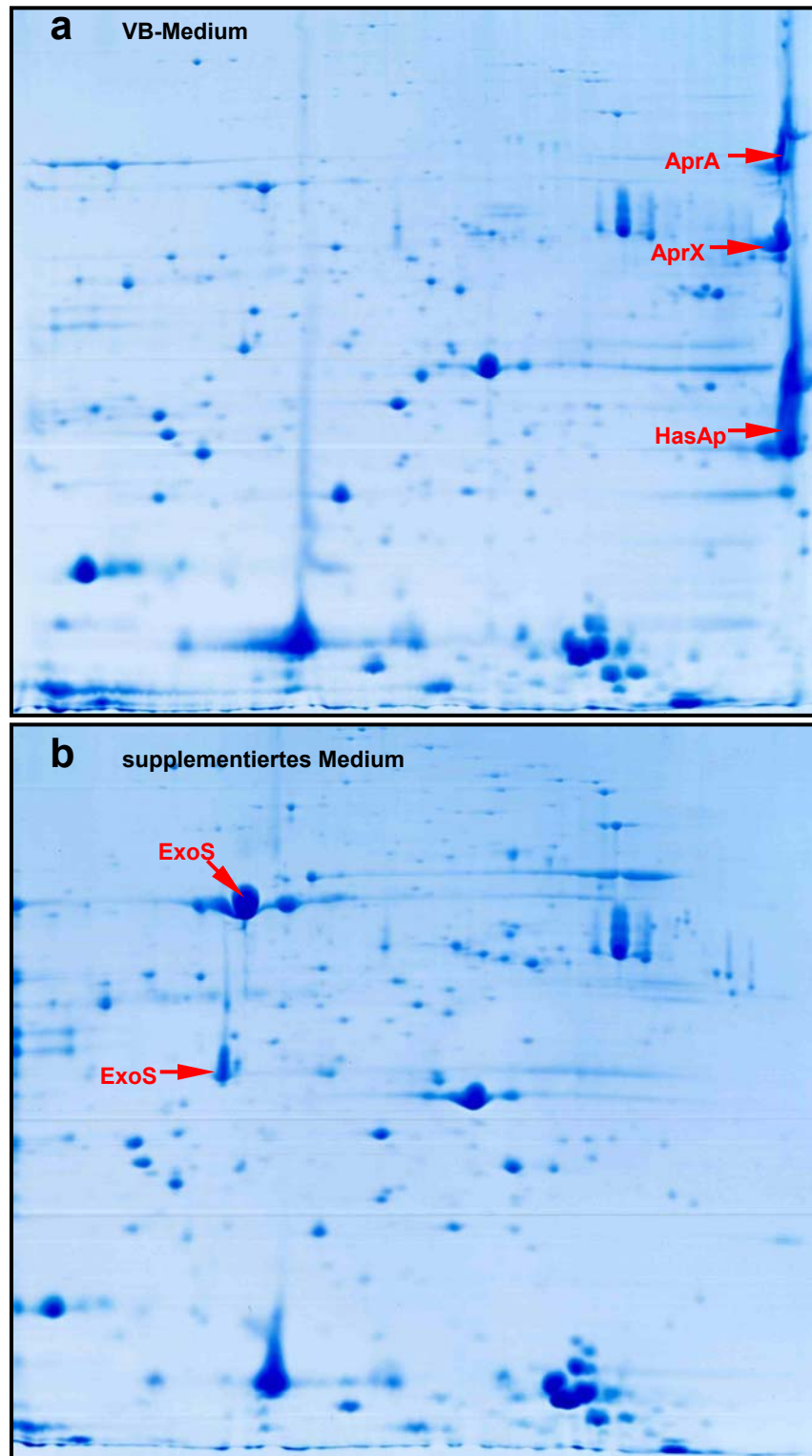


Abb. 25: 2D-Analyse des Einflusses der Supplementierung von Eisen auf das Proteinprofil der SCV's. Die Abbildung zeigt die zweidimensionalen Proteinmuster der Kulturüberstands-extrakte einer unter Standardbedingungen gewachsenen SCV-Kultur (a) und einer mit 10 μM FeSO_4 und 30 μM Eisencitrat supplementierten Kultur. Die Proteinextrakte wurden nach 17 stündiger Kultivierung bei einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,8$ präpariert. Die Auftrennung erfolgte im pH-Gradient 4-7.

Eisensalze zum Medium nochmals verstärkt. Es wird damit deutlich, dass bei den SCV's keinesfalls einfach Gruppen bestimmter Proteinen dauerhaft gegenüber den anderen Morphotypen überexprimiert werden weil diese etwa durch Mutation eines Regulators nicht mehr negativ reguliert werden können, sondern, dass die SCV's einfach eine abweichende Genregulation zeigen. Weitere derartige Supplementationsexperimente führten zu dem Ergebnis, dass im Verlauf der späteren Wachstumsphasen der Kulturen noch eine ganze Reihe weiterer Proteine durch die Supplementierung mit Eisensalzen nur vermindert exprimiert wurden. Mit Ausnahme des Proteins FptA handelte es sich hierbei jedoch größtenteils um Proteine, die bei den SCV's zuvor nicht als überexprimiert beobachtet worden waren.

In weiteren Analysen wurden die Auswirkungen von Eisenmangelbedingungen auf das Proteom der Revertanten und des Wildtyps untersucht. Hierzu wurde das verwendete Vogel Bonner Medium wie im Kapitel 3.2.2. beschrieben unter Verwendung des Ionenaustauschmaterials CHELEX 100 von enthaltenen Eisenionen gereinigt. Dieser Ionenaustauscher bindet mit hoher Affinität Fe^{2+} - Ionen, allerdings auch andere metallische Ionen, so dass von einer Depletion auch anderer Spurenelemente ausgegangen werden musste. Dieses Problem konnte allerdings nicht umgangen werden, da bei einer Zugabe der Salze anderer Spurenelemente zum gereinigten Medium von einer erneuten Kontamination mit Eisen ausgegangen werden musste. Eine massenspektrometrische Bestimmung des Eisengehaltes normalen Vogel-Bonner Mediums ergab beispielsweise eine Eisenkonzentration von 2,5 μM , obwohl in dem Medium eigentlich keine Eisensalze enthalten sein sollten. Es ist also hier von Verunreinigungen der anderen verwendeten Salze auszugehen. Bakterien benötigen zum optimalen Wachstum nur etwa Eisenkonzentrationen von 0,3-1,8 μM . Dies macht deutlich, dass eine Verwendung von Salzen der Reinheitsstufe *pro Analysisi* für Depletionskulturen ohne weitere Reinigung nicht möglich ist.

Trotz mehrmaliger Durchführung der Kultivierungen mit unabhängig aufgereinigten Medienansätzen gelang es bei diesen Depletionsexperimenten nicht, in den zweidimensionalen Proteinmustern der frühen Kulturextrakte nennenswerte Unterschiede zu beobachten. In den Extrakten der späteren Wachstumsphasen allerdings waren deutliche Unterschiede der Proteinexpressionsprofile festzustellen. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass es mit der angewendeten Methode der Medienaufreinigung nicht

möglich war, das Medium so komplett von Eisen zu befreien, dass die Kulturen von Beginn an unter Eisenmangelbedingungen wuchsen.

Ein Beispiel einer 2D-Analyse einer depletierten Revertantenkultur ist in Abb. 26 dargestellt. Das Proteinmuster des Kulturüberstandsextraktes der depletierten Kultur beim Eintritt in die stationäre Kulturphase wird hier mit dem einer Standardkultur verglichen. Deutlich ist zu erkennen, dass die Depletion des Mediums eine drastische Erhöhung der im Überstand vorliegenden Proteinmenge zur Folge hatte. Die Abgabe von Proteinen in das Medium wird durch die Depletion offensichtlich stark gefördert.

Auf den ersten Blick könnte man das 2D-Gel der Depletionskultur fast für den Extrakt einer Kultur von SCV's halten, da diese in den 2D-Gelen der Überstandsextrakte später Kultivierungsphasen stets ein deutlich komplexeres Proteinmuster als Wildtyp und Revertanten aufwiesen. Beim näheren Vergleich mit einem SCV-Gel wird aber deutlich, dass die bei der Depletionskultur der Revertanten zu beobachtenden Proteinspots zum großen Teil andere sind als die bei den SCV's verstärkt beobachteten. Es liegen somit deutliche Unterschiede zwischen dem Proteinmuster der unter Eisenmangelbedingungen kultivierten Revertanten und dem der SCV's vor. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den SCV's nicht etwa um Bakterien in einer Art Hungerzustand handelt, die aufgrund möglicherweise verstärkter Membranbarrieren nur unter Schwierigkeiten Eisen aquirieren können. Das Proteinexpressionsprofil der 'Small Colony Variants' zeigt deutliche Abweichungen vom Profil unter Mangelbedingungen kultivierter großwachsender Morphotypen. Der Proteinexpression der SCV's müssen daher andere Regulationseinflüsse als die in einer Mangelsituation wirksamen zugrunde liegen.

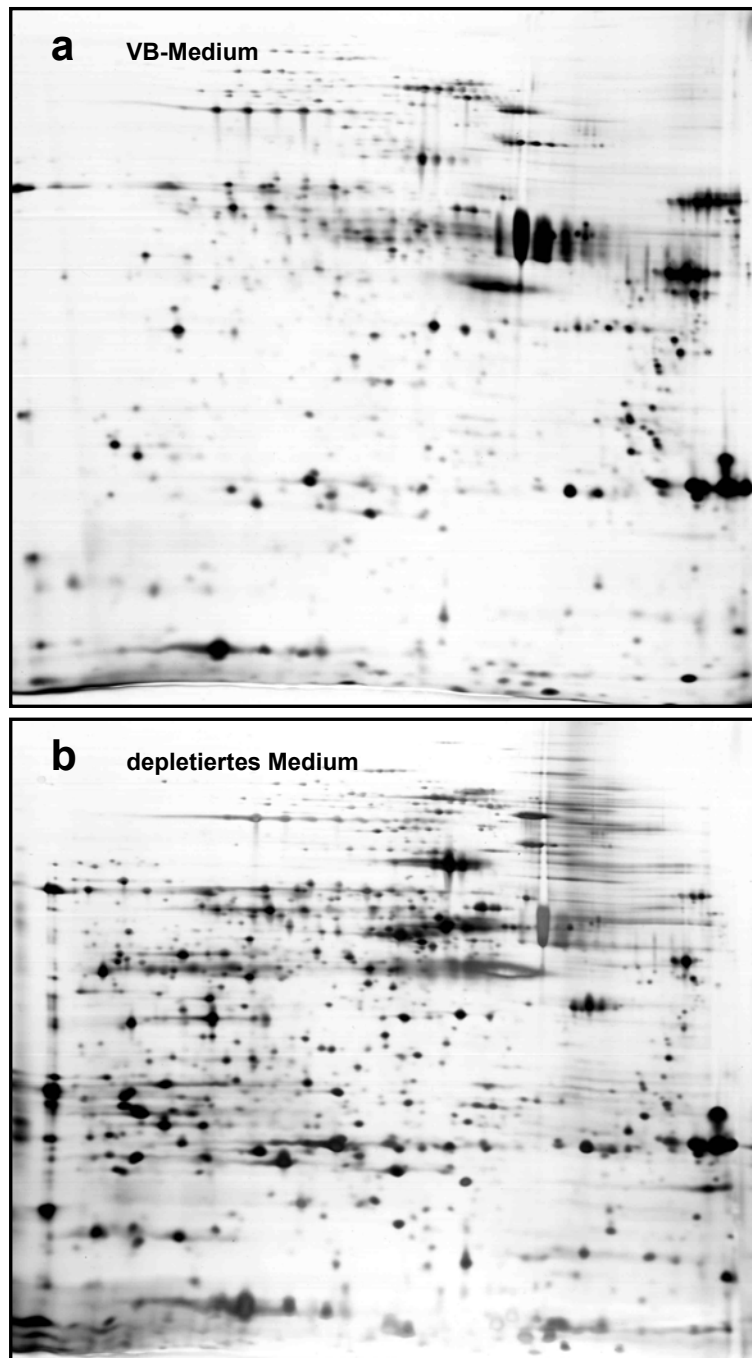


Abb. 26: 2D-Analyse des Proteinprofils unter Eisenmangebedingungen bei Revertanten des Stammes 20265. Die Abbildung zeigt die zweidimensionalen Proteinmuster der Kulturüberstandsextrakte einer unter Standardbedingungen gewachsenen Revertanten-Kultur (a) und einer in depletiertem Medium gewachsenen Kultur des Stammes 20265. Die Proteinextrakte wurden nach 48 stündiger Kultivierung beim Eintritt in die stationäre Kulturphase präpariert. Die Standardkultur erreichte zu diesem Zeitpunkt eine Dichte von $OD_{600} = 2,3$, die Kultur im depletierten Medium wuchs allerdings nur bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 1,75$.

4.3. Antigene im zweidimensionalen Proteinmuster klinischer

P. aeruginosa-Stämme

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ermöglicht es durch die hierbei erzielte hohe Auflösung in Kombination mit einem Western-Transfer (Towbin et al., 1979) vom Antikörper erkannte Proteine direkt im Gel in reiner Form nachzuweisen und zu identifizieren. Somit kann diese Technik beispielsweise angewendet werden, um Proteine mit starken antigenen Eigenschaften im Rahmen eines Infektionsverlaufes zu identifizieren und damit eventuell neue Targets für Vakzinierungsstrategien zu finden.

Da die Erkenntnisse über immunologische Vorgänge im Rahmen einer chronischen pulmonalen Infektion des Erregers *P. aeruginosa* nicht sehr umfangreich sind, wurden in dieser Arbeit einige Experimente mit zweidimensionalen Westernblots durchgeführt, um die Immunantwort infizierter CF-Patienten zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden bei der Hybridisierung keine aufgereinigten Antikörper eingesetzt, sondern die Humansenen von CF-Patienten mit chronischen *P. aeruginosa* Infektionen des Respirationstraktes. Unterschiedliche *P. aeruginosa* Proteinextrakte wurden zweidimensional aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit den Humansenen, wobei verschiedene Experimente mit Seren von Patienten unterschiedlichen Infektionsverlaufes untersucht wurden. Zur Kontrolle wurden stets auch Seren nicht infizierter Personen getestet. Die erhaltenen chemolumineszenzdetektierten 2D-Blots wiesen je nach Extrakt und Serum eine unterschiedliche Anzahl von Signalen auf. Es war zu erkennen, dass die Anzahl und Intensität der Chemolumineszenzsignale deutlich mit dem Stadium des Infektionsverlaufes korrelierte. Auf den Kontrollblots waren keine nennenswerten Signale zu beobachten. Die Erkennung der Proteine der *P. aeruginosa* - Extrakte durch die in den Seren enthaltenen Antikörper war also spezifisch für die infizierten CF-Patienten. Eigentliches Ziel der Arbeiten sollte es aber sein, die den Signalen entsprechenden Proteinspots in einem Vergleichsgel zuzuordnen und diese zu identifizieren. Mit dieser Vorgehensweise sollten sich neue Kenntnisse über immunogene Eigenschaften von Proteinen gewinnen lassen. Von allen getesteten Proteinextrakten wurden die klarsten und deutlichsten Signale mit Kulturüberstandsextrakten der stationären Wachstumsphase erzielt. In diesen sehr späten Extrakten sind einerseits auch zahlreiche bakterielle

Oberflächenproteine zu finden, welche oftmals ein Ziel der Immunantwort darstellen und andererseits konnten mit diesen Extrakten vergleichsweise gute Hybridisierungen erzielt werden, die nicht so stark wie bei zellulären Extrakten durch störende andere Zellbestandteile verschmiert wurden.

In Abb. 27 sind zwei solcher 2D-Westernhybridisierungen dargestellt. Aufgetrennt wurden hier zwei verschiedene bakterielle Kulturüberstandsextrakte, die aber beide in der stationären Kulturphase präpariert wurden. Allerdings erfolgte die Hybridisierung in den beiden Blots mit zwei verschiedenen Serenpools. Die hierbei eingesetzten Pools von Seren enthielten jeweils das Serum fünf verschiedener Patienten ähnlichen Infektionsverlaufes. Bei den in der Abbildung dargestellten Westernanalysen wurde mit Serenpools vergleichsweise schwerer Infektionsverläufe gearbeitet.

Es ist klar zu erkennen, dass die beiden verschiedenen Immunodetektionen trotz sehr ähnlicher Proteinmuster der eingesetzten 2D-Gele zum Teil deutliche Abweichungen zeigen. Selbst bei den hier verwendeten Pools von CF-Seren wird also die Variabilität der Immunantwort der Patienten deutlich. Noch klarer war dies bei der Analyse der Seren einzelner Patienten zu erkennen, jedoch eigneten sich diese Versuche nicht so gut zur Identifizierung mehrerer immunogener Proteine, da bei Verwendung nicht gepoolter Seren die Anzahl der Signale im Blot erheblich geringer war. Die abgebildeten Westernblots stellen also die Summe der Immunantwort von jeweils fünf Patienten dar.

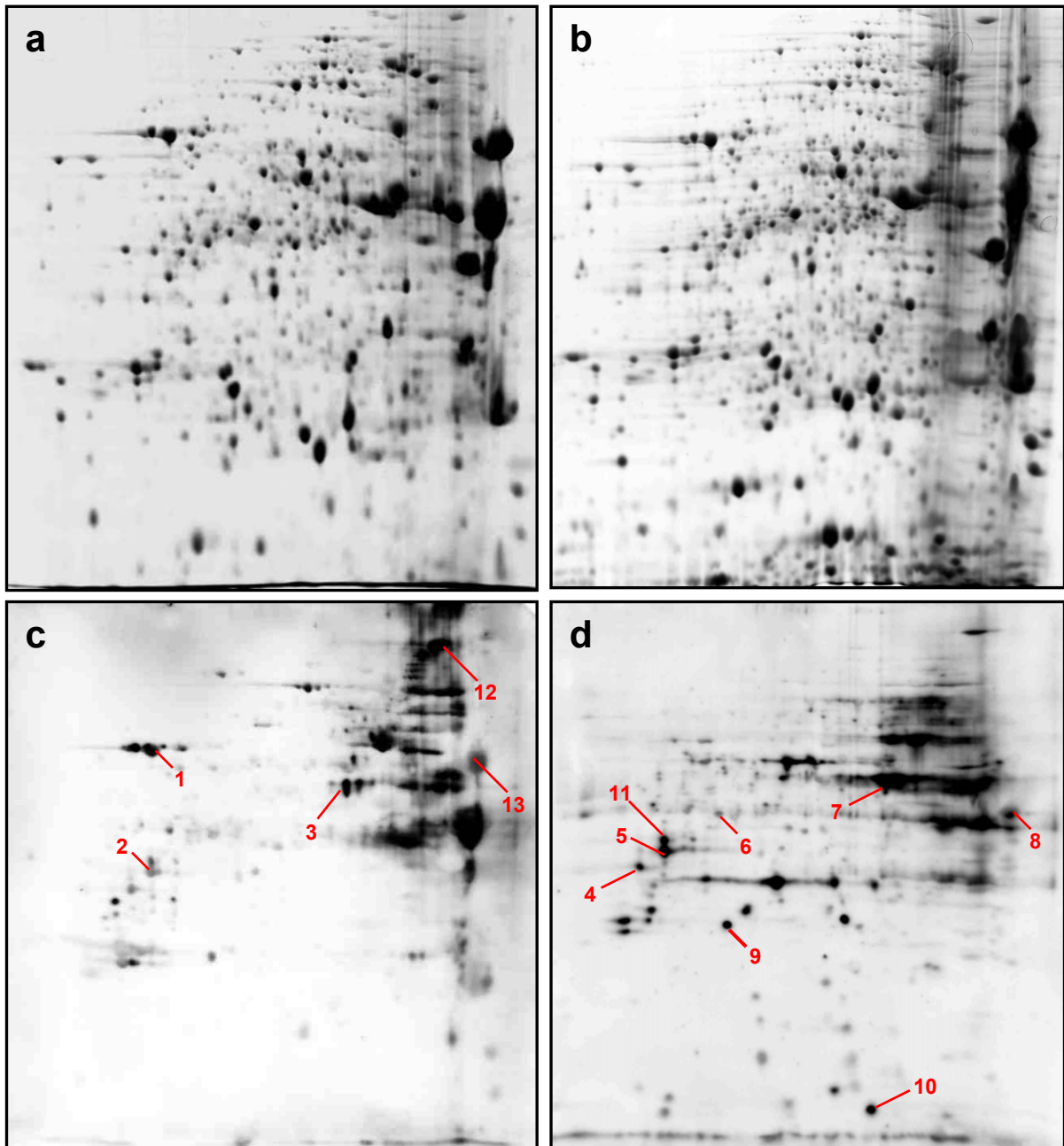


Abb. 27: Immunologische Detektion von Antigenen im zweidimensionalen Proteinmuster von *P. aeruginosa* durch Western-Blot. Die Kulturüberstandsextrakte wurden in einem nichtlinearen pH 3-10 Gradienten aufgetrennt. Die Hybridisierung der immobilisierten Proteine erfolgte mit Humanseren von CF-Patienten mit *P. aeruginosa* Infektion. a+b: Vergleichsgele mit Coomassiefärbung, c+d: Immunodetektion der Antigene. a ist das Vergleichsgel zu Blot c, b ist das Vergleichsgel zu Blot d. Die markierten Proteine mit antigenen Eigenschaften konnten bei dieser Analyse identifiziert werden: 1: ExoS; 2: PopD; 3: OprF; 4: YrbE; 5: popD; 6: PA0660; 7: OprF; 8: Fragment AprA; 9: PA4401; 10: Fragment popD; 11: PA3883; 12: PA1494; 13: AprX.

Erheblich problematischer als beim Vergleich gefärbter 2D-Gele war in diesen Versuchen die sichere Zuordnung der Signale im Blot zu den entsprechenden Proteinspots in den parallel angefertigten gefärbten 2D-Gelen, aus welchen diese ausgestochen und massenspektrometrisch identifiziert werden sollten. Zwar gab es einzelne Gruppen von Signalen, die durch ihre charakteristische Anordnung und Form leicht zugeordnet werden konnten, doch es gab auch Bereiche auf den Membranen in denen das Muster der Chemolumineszenzsignale derartig vom zu vergleichenden Proteinspotmuster abwich, dass hier keine gesicherte Zuordnung erfolgen konnte. Auch durch das Übereinanderhalten der getrockneten 2D-Gele und der Blotfotos sowie durch den Einsatz von 2D-Gelanalyse-Software konnte dieses Problem nicht immer gelöst werden. Schließlich muß beim Vergleich der Signale verschiedener Gele auch immer mit leichten Laufunterschieden gerechnet werden, die Muster sind niemals absolut deckungsgleich. Wenn also die Anordnung der Spots zu vergleichender Muster stark abweicht, kann auch mit Hilfe der Analyseprogramme keine sichere Zuordnung mehr erfolgen.

Erschwert wurden die Untersuchungen zudem durch die Tatsache, dass eine Reihe von Signalen der Immundetektion derartig großflächig waren, dass ebenfalls keine absolut gesicherte Zuordnung erfolgen konnte, da in den Vergleichsgelen in diesen Fällen im Bereich des Signals eine größere Anzahl von Proteinspots zu finden war.

Weiterhin konnte bei einer ganzen Reihe von Signalen der Immundetektion gesichert festgestellt werden, dass in den entsprechenden Bereichen der Vergleichsgele gar keine Proteinspots vorhanden waren. Es handelte sich hierbei also um sehr schwach exprimierte Proteine, deren vorliegende Menge unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Färbung lag, die aber offensichtlich hoch immunogen waren. Es wurde versucht, diese Proteine in den entsprechenden Bereichen der 2D-Gele quasi blind auszustechen, doch gesicherte Erkenntnisse konnten bei diesen Proteinen nicht gewonnen werden. Zum einen waren die erhaltenen massenspektrometrischen Daten dieser Versuche aufgrund der zu geringen Proteinmenge nicht von guter Qualität und zum anderen ließ sich im Falle einer Identifizierung des MS-Spektrums nicht gesichert sagen, ob es sich tatsächlich um das immunogene Protein handelte. Schließlich war es möglich dass sich in den analysierten Bereichen noch weitere nicht anfärbbare Proteine befanden. Ohne visuelle Kontrolle ist hier keine gesicherte Schlußfolgerung möglich.

Tab. 11: Identifizierte Antigene im Proteom von *P. aeruginosa*. Die angegebenen Proteine lieferten in Western-Blot Analysen unter Verwendung von Humanseren von CF-Patienten mit *P. aeruginosa* Infektion klare Signale und konnten durch Zuordnung der Signale zu den Proteinspots in parallel angefertigten mit Coomassie gefärbten 2D-Gelen identifiziert werden.

PA-Nr.	Gen	Protein	kDa	pI
PA0139	ahpC	Alkyl-Hydroperoxid Reduktase	20,54	5,9
PA0244	-	hypothetisches Protein	29,69	5,3
PA0407	gshB	Glutathion Synthetase	35,70	5,7
PA0552	pgk	Phosphoglyceratkinase	40,40	5,3
PA0660	-	hypothetisches Protein	34,81	5,86
PA0755	-	putatives Porin	46,98	7,8
PA0953	-	putatives Thioredoxin	16,90	5,1
PA1092	fliC	Flagellin, flagellares Filamentprotein	39,50	4,7
PA1245	aprX	putativ sekretiertes Protein der Typ I Sekretion	41,42	4,3
PA1245	aprA	sekretorische alkalische Metalloprotease	50,43	4,2
PA1494	-	konserviertes hypothetisches Protein	60,65	5,7
PA1708	popB	'translocator protein' PopB, Typ III Sekretion	39,97	6,1
PA1709	popD	'translocator outer membrane protein', Typ III Sekretion	31,29	5,8
PA1777	oprF	'outer membrane' Porin F	37,64	4,9
PA1833	yhfP	putative Oxidoreduktase	34,55	5,4
PA1844	-	hypothetisches Protein	16,44	8,9
PA2491	-	putative Oxidoreduktase	36,83	5,4
PA3407	hasAp	Haemophore ('heme acquisition protein')	20,90	4,2
PA3821	secD	Sekretionsprotein SecD	67,67	8,8
PA3841	exoS	Exoenzym S, ADP-Ribosyltransferase	48,51	5,5
PA3883	-	Putative Dehydrogenase, kurze Kette	29,43	9,8
PA4385	groEL	60 kD Chaperonin	57,09	5,0
PA4401		putative Glutathion S-Transferase	23,79	5,5
PA4455	yrbE	putative Permease des ABC Transportersystems	28,28	6,7
PA4917	-	hypothetisches Protein	22,46	8,9

Es ist also festzustellen, dass die Identifizierung aller immunogener Proteine, die auf den angefertigten Blots Signale lieferten mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist.

Eine Teil der immunogenen Proteinspots allerdings konnte in den Versuchen gesichert identifiziert werden. Aufgrund der verwendeten Extrakte der stationären Kulturphasen handelte es sich bei vielen der identifizierten immunogenen Proteinspots allerdings um Degradationsprodukte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden diese in der Darstellung der Abb. 27 weitestgehend ausgelassen.

Durch alle diese aufgeführten Schwierigkeiten war die Anzahl erfolgreich neu identifizierter und gesichert den Signalen der Immundetektion zugeordneter Proteine pro analysiertem 2D-Gel deutlich geringer als bei den bisherigen Proteomanalysen. Es wurden daher die Daten mehrerer Versuche gesammelt. Die hierbei sicher als immunogen identifizierten Proteine sind in Tab. 11 aufgelistet.

Wie in der Tabelle zu lesen sind unter den immunogenen Proteinen einige bereits zuvor identifizierte sekretorische (AprA, AprX, HasAp, Exo S) und Oberflächenproteine (PopB, PopD, FliC, OprF). Hinzu kamen einige neu identifizierte Oberflächenproteine wie z.B. YrbE, secD und das putative Porin PA0755.

Immunogene Eigenschaften solcher Proteine entsprechen durchaus den Erwartungen. Darüber hinaus konnten aber auch eine Reihe zytosolischer Proteine als immunogen identifiziert werden (z.B. GroEL, YhfP, GshB), was zuvor nicht vermutet wurde. Wahrscheinlich stellen diese Proteine während der Infektion nach der Freisetzung aus lysierten Bakterien ein Ziel der Immunabwehr dar.

Hinzu kamen in diesen Untersuchungen die Informationen über antigene Eigenschaften einer größeren Anzahl von Proteinen, die bisher noch nie nachgewiesen wurden und nur aufgrund von offenen Leserahmen im *P. aeruginosa* Chromosom postuliert wurden (z.B. PA0244, PA1844, PA2491). In diesen Fällen stellt sowohl der erstmalige Nachweis dieser Proteine als auch die Tatsache der immunogenen Eigenschaften derselben eine neue Erkenntnis dar, die erst bei näherer funktioneller Analyse der entsprechenden Proteine bewertet werden kann.

5. Diskussion

5.1. Die Adaption der SCV's an die chronische Infektion

5.1.1. Die 'Small Colony Variants' zeigen eine verstärkte Proteinsekretion des Typs I und des Typs III.

In *Pseudomonas aeruginosa* existieren mindestens drei grundsätzlich verschiedene Sekretionssysteme. Diese werden als Typ I, beziehungsweise ABC-Transportersystem (ABC = 'ATP binding cassette'), Typ II, auch als GSP-System bezeichnet (GSP = 'general sekretory pathway'), sowie als Typ III-Sekretionssystem bezeichnet.

Der Großteil der Exoproteine wird in *P. aeruginosa* durch Sekretion des Typs II über den Mechanismus des MTB ('main terminal branch') des GSP ('general sekretory pathway') exportiert (Tommasen, 1992; Pugsley, 1993; Russel, 1998). Hierbei handelt es sich um einen in zwei Schritte zu unterteilenden Prozess. Im ersten Schritt wird das zu exportierende Protein signalpeptidvermittelt über den sogenannten sec-Apparat ins Periplasma transportiert (Wickner und Leonard, 1996). Im zweiten Schritt wird dann die Tranlokation des Proteins durch die äußere Membran von einem aufwendigen Sekretionsapparat durchgeführt. Dieser Sekretionsapparat besteht in *P. aeruginosa* aus mindestens 12 verschiedenen Genprodukten, den sogenannten Xcp-Proteinen (xcp - 'extracellular protein deficient') (Filloux et al., 1998). Kürzlich wurde zusätzlich erstmals noch ein zweites, unabhängiges Typ II Sekretionssystem für *P. aeruginosa* beschrieben, das hxc-System (hxc - homologous to xcp) (Ball et al., 2002). Über Typ II Sekretion werden in *P. aeruginosa* beispielsweise Elastase, Lipase, alkalische Phosphatase, Phospholipasen und das Exotoxin A exportiert (Filloux et al., 1998).

Bei der Proteinsekretion des Typs I hingegen handelt es sich um einen Prozess welcher in einem Schritt abläuft. Der hierbei involvierte Sekretionsapparat setzt sich aus drei Proteinen zusammen. Eines dieser Proteine ist das ATP-Protein (eine ATPase), welches in der inneren Membran lokalisiert ist. Hinzu kommt das MFP-Protein ('membrane fusion protein') und ein in der äußeren Membran lokalisiertes Sekretionsprotein (Binet, 1996).

Das Proteinsekretionssystem des Typs III findet man in erster Linie bei pathogenen Bakterien. Es stellt ebenfalls einen in einem Schritt ablaufenden Prozess dar. Unter Ausnutzung dieses Systems sind pathogene Bakterien in der Lage, Effektorproteine direkt in

eukaryontische Zellen zu injizieren (Hueck, 1998; Anderson und Schneewind, 1999). Der Injektionsapparat dieses Systems ist homolog zum Flagellenapparat und in der Lage, die Sekretion der Exoproteine über die Barriere von drei biologischen Membranen zu vermitteln, da neben den beiden Membranen des Bakteriums auch noch die Membran der Zielzelle überwunden werden muss (McNab, 1999; Young et al., 1999). Der Mechanismus der Typ III Sekretion wurde beispielsweise am Modell der Gattung *Yersinia* (Yop-Gene) recht gut untersucht und liegt bei *P. aeruginosa* (Pop-Gene) in homologer Form vor (Yahr et al., 1997; Frithz-Lindsten et al., 1998).

Bei der Analyse der Kulturüberstandsextrakte der verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Morphotypen fielen bei den SCV's keine über Typ II Sekretion exportierten Proteine als überexprimiert auf. Allerdings konnten zahlreiche Proteine bei den SCV's als überexprimiert beobachtet und anschließend identifiziert werden, die über das Typ I Sekretionssystem, insbesondere aber auch über das Typ III Sekretionssystem exportiert werden, oder aber zu den Komponenten dieser Systeme zählen.

5.1.2. Die Sekretion der drei über Proteinsekretion des Typs I exportierten Proteine AprA, AprX und HasAp wird bei den SCV's früher induziert.

ABC-Transportersysteme sind weitverbreitet und in der Regel sehr substratspezifisch. Zur Familie der ABC-Transporter zählen in *P. aeruginosa* zahlreiche Im- und Exportsysteme niedermolekularer Verbindungen und Biopolymere.

Bis vor wenigen Jahren war allerdings nur ein einziges Proteinexportsystem dieses Typs bei *P. aeruginosa* bekannt und für dieses Typ I Sekretionssystem wiederum nur ein exportiertes Substrat, die alkalische Protease AprA (Guzzo et al., 1991; Duong et al., 1992). In jüngerer Zeit wurden jedoch zwei weitere über Typ I Sekretion exportierte Proteine bekannt, die Hämophore HasAp ('heme acquisition protein') (Létoffé et al., 1998) sowie das noch nicht funktionell untersuchte Protein AprX (Duong et al., 2001).

Das Protein AprX zählt zur selben Transkriptionseinheit wie die Protease AprA und die Proteine AprD, AprE und AprF, welche den Sekretionsapparat bilden. AprA und AprX werden also über den gleichen Transporter sezerniert. Die Spezifität des Transportes wird hierbei anders als bei der Typ II Sekretion nicht über ein N-terminales Signalpeptid

gewährleistet, sondern über ein 60 Aminosäuren umfassendes C-terminales Sekretionssignal (Duong et al., 1996).

Das Protein HasAp hingegen wird über einen anderen spezifischen ABC-Transporter exportiert.

Bemerkenswerterweise wurden in dieser Arbeit alle diese drei bekannten, über ABC-Transportsysteme sezernierten Exoproteine AprA, AprX und HasAp bei den SCV's als gegenüber dem Wildtyp und den Revertanten abweichend exprimiert beobachtet und identifiziert. Bei allen drei Proteinen konnte im Falle der SCV's ein deutlich früheres Auftreten dieser Proteine in den Extrakten der Kulturüberstände beobachtet werden als bei Wildtyp und Revertanten (siehe Abschnitt 4.2.2.). Es ist also zu schlussfolgern, dass bei den 'Small Colony Variants' eine Veränderung der Regulation der Typ I Proteinsekretion vorliegt, die zu einer früheren Sekretion dieser Proteine führt.

Vom Protein HasAp ist bekannt, dass es unter direkter Kontrolle des Regulatorgens *fur* ('ferric uptake regulator') steht (Ochsner et al., 2000). Dieser Regulator Fur spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation zahlreicher Gene beim Wachstum unter eisenlimitierten Bedingungen. Es handelt sich hierbei um ein DNA-bindendes Proteindimer, welches bei Bindung des Kofaktors Fe(II) durch Bindung an die sogenannten 'Fur-Boxen' eisenregulierter Gene die Transkription dieser Gene unterbindet (Prince et al., 1993; Ochsner et al., 1995). In Abwesenheit von intrazellulärem Fe(II) dissoziiert dieser Repressor und gibt die Transkription der *fur*-regulierten Gene frei.

Auch für die alkalische Protease wurde bereits eine eisenabhängige Regulation beschrieben (Shigematsu et al., 2001).

Im Falle der SCV's kann eine Veränderung dieser Regulationsmechanismen postuliert werden, die zu einer Expression aller drei über Typ I Sekretion exportierter Proteine bereits zu einem früheren Kultivierungszeitpunkt führt.

5.1.3. Die Proteinsekretion des Typs III ist bei den SCV's erhöht.

Beim bestuntersuchten, in *Pseudomonas aeruginosa* über Typ III Sekretion exportierten Protein handelt es sich um das zytotoxische Protein ExoS. Bei den vergleichenden 2D-Analysen der Kulturüberstände wurde festgestellt, dass dieses Exoprotein bei den SCV's überexprimiert wird. Neben ExoS wurde noch ein weiteres durch Typ III Sekretion

exportiertes Protein gleichermaßen als überexprimiert identifiziert: ExoT. Neben ExoS und ExoT wird in *P. aeruginosa* höchstwahrscheinlich noch ein drittes Protein über Typ III Sekretion exportiert: ExoU. Dieses ExoU-Protein wird allerdings nicht von allen *P. aeruginosa* Stämmen gebildet (Finck-Barbançon et al., 1997). Zusätzlich zu den sekretorischen Proteinen ExoS und ExoT waren auch die Proteine PopB, PopD, PopN und PcrV bei den SCV's überexprimiert, bei diesen vier Proteinen handelt es sich um Komponenten des Typ III Sekretionsapparates.

Die beobachtete Überexpression dieser sechs Proteine gibt einen deutlichen Hinweis auf eine verstärkte Typ III Sekretion der SCV's.

Bei ExoS handelt es sich um eine ADP-Ribosyltransferase, welche homologe Sequenzbereiche zum Zytotoxin YopE pathogener *Yersinia* Arten aufweist (Frithz-Lindsten et al., 1997). Es wurde nachgewiesen, dass *P. aeruginosa* dieses Protein über Typ III Sekretion in eukaryontische Zellen injizieren kann, wo es einen zytotoxischen Effekt hat. In den Zielzellen wurde eine Zerstörung der eukaryontischen Aktinfilamente nachgewiesen, was bei Experimenten mit HeLa-Zellen eine Abrundung dieser Zellen zur Folge hatte. Bei Expression des *exoS*-Gens in transfizierten *Yersinia*-Stämmen wurde zudem ein anti-phagozytotischer Effekt auf Makrophagen nachgewiesen. Aus diesem Grund wird das ExoS Protein als Element einer bakteriellen Strategie zur Verhinderung eukaryontischer Phagozytose postuliert (Frithz-Lindsten et al., 1997). In jüngeren Untersuchungen wurde dem N-terminalen Bereich des Exoproteins zudem noch eine weitere Funktion zugeschrieben. Dieser Proteinbereich soll in eukaryontischen Zellen unter Einbeziehung niedermolekularer GTPasen der Rho-Familie einen Aktin-reorganisierenden Effekt ohne zytotoxische Aktivität bewirken (Barbieri, 2000). Vom Gen *exoS* ist weiterhin bekannt, dass dessen Expression der Induktion bedarf. Einerseits wurde diese Induktion bei *in vitro* Kulturen beim Erreichen einer bestimmten Kulturdichte beobachtet, andererseits wurde eine Induktion der Produktion von ExoS beim Kultivieren in Kontakt mit eukaryontischen Zellen beschrieben (Vallis et al., 1999).

Beim Exoprotein ExoT, welches auch als Exo53 bezeichnet wird, handelt es sich um ein Protein mit sehr hoher Homologie in Bezug auf ExoS. Ursprünglich nahm man sogar an, die beiden Proteine könnten das Produkt ein und desselben Genes sein, weshalb man den Namen Exo53 als anzunehmende 53 kDa-Form des 49 kDa Proteins ExoS verwendete. Die beiden Proteine werden jedoch von verschiedenen Genen kodiert (Liu et al., 1997), welche in weit distanziert liegenden Bereichen des sequenzierten *P. aeruginosa* PA01-Chromosoms liegen

(PA0044 und PA3841). Analysen haben jedoch erwiesen, dass ExoT nur über etwa 0,2% der spezifischen ADP-Ribosyltransferaseaktivität von ExoS verfügt.

Die Gene *pcrG*, *pcrH*, *pcrV*, *popB* und *popD* liegen in *P. aeruginosa* in einem gemeinsamen Operon vor, welches homolog zum Operon *lcrGVHpopBD* pathogener *Yersinia* Spezies ist (Hauser et al., 1998). Die Genprodukte dieses Operons sind Komponenten des Typ III Sekretionsapparates, wobei PopB beispielweise für die Bildung der Poren in der eukaryontischen Membran der Zielzelle verantwortlich gemacht wird (Frithz-Lindsten et al., 1998).

Von den fünf Genprodukten dieses Operons wurden drei (die Proteine PcrV, PopB und PopD) in den durchgeführten 2D-Analysen identifiziert weil sie bei den SCV's gegenüber den anderen Morphotypen als überexprimiert beobachtet wurden. Die Tatsache, dass die beiden übrigen Proteine nicht beobachtet wurden, könnte an ihrer niedermolekularen Natur liegen. Das Protein PcrG beispielsweise hat ein Molekulargewicht von nur 10,9 kDa und wäre damit in den durchgeführten zweidimensionalen Auftrennungen in der Lauffront der Elektrophorese zu finden gewesen. Weiterhin wurde das Protein PopN, ebenfalls eine Komponente des Typ III Sekretionssystems, bei den SCV's als überexprimiert beobachtet. Das Gen *popN* ist auf dem Chromosom des sequenzierten Stammes PA01 in der Nähe des beschriebenen *pcrGVHpopBD* - Operons lokalisiert, gehört aber einer anderen Transkriptionseinheit an.

Wenn man vom Protein ExoU absieht, welches von den untersuchten Stämmen vermutlich nicht produziert wird, konnte bei den SCV's also die Überexpression der beiden durch Typ III Sekretion exportierten Exoproteine sowie die Überexpression von vier entscheidenden Komponenten des Typ III Sekretionssystems beobachtet werden.

Diese Beobachtung kann als ein deutlicher Hinweis auf die verstärkte Typ III Sekretion insgesamt und die damit einhergehende Schädigung eukaryontischer Zellen sowie die damit in Zusammenhang gebrachte Strategie der Verhinderung eukaryontischer Phagozytose gesehen werden.

Die SCV's scheinen also im Rahmen der Adaption an das Milieu der CF-Lunge in verstärktem Ausmaße Wirtszellen zu schädigen und höchstwahrscheinlich die Phagozytose durch Makrophagen effektiver zu verhindern als die anderen untersuchten Morphotypen.

5.1.4. Die SCV's scheinen an Eisenmangelbedingungen adaptiert zu sein.

Pseudomonas aeruginosa benötigt als aerober Organismus das Element Eisen unter anderem als Kofaktor für zahlreiche Enzyme der Atmungskette. Obwohl Eisen das vierthäufigste Element der Erde ist und von biologischen Organismen nur in sehr geringen Mengen benötigt wird, ist es dennoch häufig im umgebenden Milieu wachsender Mikroorganismen nicht in ausreichender Menge verfügbar. Auch im Rahmen einer Infektion stellt die mangelnde Verfügbarkeit von Eisen für *P. aeruginosa* wie für andere Bakterien auch oft ein limitierendes Wachstumshemmnis dar (Bullen, 1981).

Bakterien benötigen für optimales Wachstum im allgemeinen Eisenkonzentrationen von etwa 0,3 bis 1,8 μM . Im Erdreich liegen zum Vergleich in der Regel lediglich Eisenkonzentrationen unterhalb von 0,1 μM vor und in den Geweben, Körperflüssigkeiten und Sekreten von Säugetieren und Menschen, wie sie im Infektionsverlauf von pathogenen Bakterien besiedelt werden, liegen die Konzentrationen frei verfügbaren Eisens sogar nur in der Größenordnung von 10^{-9} μM (Vasil und Ochsner, 1999). Hinzu kommt die Tatsache, dass Eisen im aeroben Milieu fast ausschließlich in der oxidierten Form Fe(III) vorliegt, dieses aber extrem unlöslich ist. Die Löslichkeit von Fe(III) in Wasser liegt bei einem pH-Wert von 7 in der Größenordnung von 10^{-18} μM (Braun und Killmann, 1999).

Die geringe Konzentration frei verfügbaren Eisens im Milieu einer infizierten Lunge eines CF-Patienten liegt größtenteils an der Tatsache, dass der überwiegende Teil des Eisens in Proteinen wie Transferrin, Laktoferrin und Ferritin gebunden ist oder aber komplexiert als Häm in Hämoglobin oder verschiedenen Enzymen vorliegt.

Um unter solchen eisenlimitierten Bedingungen existieren zu können haben Bakterien eine Reihe von Mechanismen zur effektiven Eisenversorgung entwickelt (Wooldridge und Williams, 1993). *Pseudomonas aeruginosa* beispielsweise ist in der Lage, Eisen durch sekretorische Siderophore zu komplexieren und auch Häm als Eisenquelle zu erschließen (Poole et al., 1996).

Bei den vergleichenden 2D-Analysen der untersuchten *P. aeruginosa* Morphotypen wurden eine ganze Reihe von Proteinen bei den SCV's als überexprimiert beobachtet, die funktionell in diesen Zusammenhang der effektiven Eisenversorgung des Erregers einzuordnen sind. Diese überexprimierten Proteine sind aufgrund ihrer Lokalisation in zwei Gruppen einzuordnen, Membranproteine und sekretorische Proteine.

Überexpression von Membranproteinen zur Eisenversorgung bei den 'Small Colony Variants'

Bei den SCV's wurden insgesamt sechs vermutlich im Rahmen der Eisenversorgung wichtige Membranproteine als überexprimiert beobachtet, zum einen die beiden bekannten Rezeptoren für die Siderophoren Pyoverdin und Pyochelin FpvA und FptA und zum anderen vier noch nicht funktionell untersuchte Genprodukte der Gene mit den Annotierungsnummern PA0781, PA4625, PA4675 und PA5217. Bei diesen vier Proteinen wurden Funktionen der Eisenversorgung aufgrund von Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen oder aber aufgrund von konservierten Aminosäuremotiven postuliert.

Bei den Siderophoren Pyoverdin und Pyochelin handelt es sich um niedermolekulare Chelatbildner, die extrazellulär Eisen mit hoher Affinität binden können und anschließend den Transport des Eisens in die bakterielle Zelle über die Bindung an spezielle Rezeptoren auf der äußeren bakteriellen Membran vermitteln (Cox und Graham, 1979; Cox und Adams, 1985). Sowohl die Bildung der Siderophore als auch die Expression der entsprechenden Rezeptoren ist bekanntermaßen eisenreguliert (Ankenbauer und Quan, 1994). Im Falle der Siderophore Pyoverdin wurde in einer jüngeren Untersuchung sogar eine Regulation der Biosynthese dieses Chelatbildners durch den N-terminalen Bereich des Rezeptors FpvA selbst nachgewiesen (Shen et al., 2002).

Sowohl der 'outer membrane' Rezeptor FpvA, welcher für die Bindung der eisenbeladenen Siderophore Pyoverdin zuständig ist, als auch der Rezeptor FptA, welcher die Siderophore Pyochelin bindet, waren bei den SCV's überexprimiert. Weiterhin wurde bei den Flüssigkulturen der SCV's in den späteren Wachstumsphasen eine deutlich verstärkte Einfärbung des Mediums mit einer gelb-grünen Farbe festgestellt, was auf eine verstärkte Sekretion des Pyoverdins schließen lässt.

Die Rezeptoren FptA und FpvA sind mit allerhöchster Wahrscheinlichkeit funktionell vom Membranprotein TonB (PA5531) abhängig (Takase et al., 2000; Folschweiller et al., 2000). Bei TonB handelt es sich um ein in der inneren Membran verankertes Protein, welches sich weit ins Periplasma erstreckt und welches bei vielen Bakterien homolog vorliegt und eine entscheidende Komponente aller Vorgänge der Eisen-Siderophor-Aufnahme darstellt. TonB stellt bei diesen Prozessen eine funktionelle Verbindung zwischen zytosolischer und äußerer Membran her, indem es das elektrochemische Potential der inneren Membran auf die abhängigen Rezeptoren der äußeren Membran überträgt und so den spezifischen Transport der Eisen-Siderophore-Komplexe über die äußere Membran aktiviert (Postle, 1993).

Bei zwei der oben genannten noch nicht funktionell untersuchten Proteine, welche bei den SCV's überexprimiert wurden, nämlich dem Protein PA0781 und dem Protein PA4675, liegt eine Sequenzhomologie zu den konservierten Bereichen TonB-abhängiger 'outer membrane' Rezeptoren vor. Zudem weist das Protein PA0781 insgesamt eine 37%ige Ähnlichkeit zum 'outer membrane' Heminrezeptor PhuR auf. Diese Beobachtung ist ein deutlicher Hinweis auf eine sehr wahrscheinliche Beteiligung dieser beiden Proteine an Prozessen der Eisenaufnahme über die äußere Membran, welche in *Pseudomonas aeruginosa* noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Das ebenfalls überexprimierte Protein PA5217 hingegen weist eine Sequenzhomologie zu Bindungskomponenten von ABC-Eisentransportern anderer Organismen auf und könnte daher auch hier eine Funktion bei diesem Vorgang der Aufnahme frei verfügbaren Eisens aus der Umgebung wahrnehmen.

Weiterhin wurde bei den überexprimierten Proteinen das Produkt des Gens PA4625 beobachtet. Dieses Gen zeigt eine sehr schwache Homologie zum Gen *huxA* aus *Haemophilus influenzae*. Das auf dem PA01-Chromosom benachbart liegende Gen PA4624 allerdings weist bereits 42% Übereinstimmung mit dem Gen *huxB* aus *H. influenzae* auf, und auch in *H. influenzae* liegen die Gene *huxA* und *huxB* auf dem Chromosom benachbart vor. Es dürfte sich also hier bei *P. aeruginosa* um zu den *Haemophilus*-Genen *huxA* und *huxB* homologe Gene handeln.

Bei den Proteinen HuxA/B aus *H. influenzae* handelt es sich um die 'hemopexin utilization' Proteine A und B. Auch diese Proteine bilden ein System zur zellulären Aufnahme komplexierten Eisens (Cope et al., 1998).

Es konnte in den Untersuchungen also bei den SCV's die Überexpression von sechs Genprodukten beobachtet werden, die aller Wahrscheinlichkeit nach allesamt Funktionen bei der Eisenaufnahme über die äußere Membran innehaben. Darüber hinaus wurde noch die Überexpression einiger weiterer putativer 'outer membrane' Proteine festgestellt, welche aufgrund mangelnder Homologie zu bekannten Proteinen aber nicht funktionell eingeordnet werden konnten. Eine Beteiligung dieser Proteine an ähnlichen Prozessen ist aber durchaus möglich.

Überexpression von sekretorischen Proteinen zur Eisenversorgung bei den 'Small Colony Variants'

Die frühzeitig induzierte Bildung und Sekretion der Proteine AprA, AprX und HasAp wurde bereits in Abschnitt 5.1.2. behandelt. Zumindest bei zweien dieser Proteine, AprA und HasAp, ist eine Regulation durch Eisen nachgewiesen worden (Ochsner et al., 2000; Shigematsu et al., 2001). Funktionell wird auch der Protease AprA eine wichtige Rolle bei der Eisenakquirierung zugeschrieben, indem sie durch den Abbau eukaryontischer Proteine, die zum Teil Eisen enthalten, die Aufnahme dieses Elementes durch das Bakterium sozusagen vorbereitet. Die Tatsache der Eisenregulation des *aprA*-Gens unterstützt diese Hypothese (Shigematsu et al., 2001). Über das Protein AprX ist funktionell noch nichts weiteres bekannt, doch die hohe Homologie zum Protein AprA lässt eine eventuelle ähnliche Funktion vermuten. Immerhin wurde auch das Protein AprX in bemerkenswert großen Mengen in den Kulturüberständen der untersuchten Stämme vorgefunden.

Neben den erwähnten drei sekretorischen Proteinen wurde bei den SCV's noch eine größere Anzahl weiterer, bisher nicht untersuchter Proteine mit vorliegenden Signalpeptidsequenzen als überexprimiert beobachtet, die aber aufgrund mangelnder Homologie zu bekannten Proteinen nicht funktionell zugeordnet werden konnten. Aufgrund der vorliegenden Signalpeptide könnte es sich hierbei zumindest teilweise ebenfalls um noch nicht bekannte Exoproteine handeln. Weiterhin gab die grünlich-gelbe Färbung der Kulturen wie bereits oben erwähnt einen Hinweis auf die vermehrte Sekretion von Siderophoren bei den 'Small Colony Variants'.

Insgesamt ergibt das Muster der Überexpression von Membranrezeptoren und sekretorischen Proteinen, die funktionell allesamt der Aufnahme von Eisen zuzuordnen sind ein Bild der Anpassung der SCV's an Eisenmangelbedingungen. Eine solche Adaption könnte im Rahmen einer chronischen Infektion der CF-Lunge angesichts der wachstumslimitierenden mangelhaften Verfügbarkeit von Eisen ein entscheidender Selektionsvorteil sein.

5.1.5. Die SCV's zeigen eine verstärkte Biofilmbildung.

Wie bereits im Abschnitt 2.3. beschrieben, konnte bei der Kultivierung der unterschiedlichen Morphotypen in der späteren Wachstumsphase der Flüssigkulturen bei den SCV's eine verstärkte Bildung von Zellklumpen im Medium und Biofilmen auf den Oberflächen der Kulturgefäße beobachtet werden.

Diese Beobachtung deckt sich mit der von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe elektronenmikroskopisch bei mehreren Stämmen im Falle der SCV's beobachteten erhöhten Anzahl von Fimbrien auf der bakteriellen Oberfläche und der im Northern-Blot nachgewiesenen erhöhten Transkription des *pilA*-Gens, denn Pili werden bei nicht mukoiden *P. aeruginosa* Stämmen als entscheidende Komponente des Aufbaus von Biofilmen bei einer Infektion gesehen (Vallet et al., 2001).

Das Genprodukt des *pilA*-Gens, das Strukturprotein der Typ IV Pili, gehörte jedoch nicht zu den in der 2D-Analyse aufgrund differentieller Expression identifizierten Proteinen. Eventuell ist auch dieses Protein der Analyse aufgrund seines geringen Molekulargewichtes entgangen. Der 'Precursor' des PilA Proteins hat nämlich nur eine Masse von 15,5 kDa und bei der Prozessierung desselben wird noch der Bereich des Signalpeptides abgetrennt. Da sich auf den untersuchten 2D-Gelen in diesem niedermolekularen Bereich in der Nähe der elektrophoretischen Lauffront bei der Analyse von Kulturüberstandsextrakten stets sehr viele Abbauprodukte anderer größerer Proteine fanden, ist es gut möglich, dass dieses Protein durch Überlagerung mit anderen Spots keine Beachtung fand.

Bemerkenswert ist hingegen im Zusammenhang der biofilmbildenden Potenz der untersuchten Morphotypen die Tatsache, dass Strukturgene des Flagellins bei den SCV's im Vergleich zu den großwachsenden Morphotypen schwächer exprimiert vorlagen. Sowohl das Protein FlgK ('flagellar hook associated protein 1), als auch das Protein fliD ('flagellar capping protein'), sowie das flagelläre Filamentprotein FliC selbst wurden in den 2D-Gelanalysen als bei den SCV's unterexprimiert beobachtet und daher identifiziert. Beim Protein FliC, welches man aufgrund seiner stammspezifischen Variabilität in verschiedene Typen unterteilt (Spangenberg et al., 1996), handelte es sich übrigens sowohl bei Stamm 61, als auch bei Stamm 20265 um Typ B Flagellin. Der sequenzierte Referenzstamm PA01 zum Vergleich weist hingegen TypA Flagellin auf.

Sowohl Flagellen, als auch Pili werden essentielle Funktionen beim Aufbau von Biofilmen zugeschrieben. Jedoch geht man davon aus, dass Flagellen die entscheidende Rolle beim

ersten Schritt der Adhäsion übernehmen (Arora et al., 1998), die Pili aber umso wichtiger beim weiteren Aufbau des entstehenden Biofilms sind.

Da die SCV's nun in vermindertem Umfang Flagellen zu bilden scheinen, dafür aber umso mehr Pili exponieren, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die SCV's an die Situation der bereits erfolgten Adhärenz an das pulmonale Epithel adaptiert sind und im Rahmen dieser Adaption durch Verstärkung der Bildung von Pili über verbesserte Fähigkeiten zum Aufbau von Biofilmen verfügen. Es kann vermutet werden, dass die Flagellen in solch einem reifenden Biofilm keinen Vorteil mehr bieten und daher bei den SCV's nur noch reduziert vorliegen.

5.1.6. Bewertung weiterer differentiell exprimierter Proteine

Unter den bei SCV's und großwachsenden Morphotypen unterschiedlich exprimierten Proteinen befand sich neben den erwähnten funktionell interessanten Proteinen auch eine Anzahl von insgesamt 11 Proteinen über die keinerlei funktionelle Aussagen getroffen werden konnten. Aufgrund mangelnder Homologie zu bekannten Proteinen und fehlender konservierter Sequenzbereiche war es bei diesen Proteinen im Gegensatz zu den bereits erwähnten putativen Membran- und Exoproteinen auch nicht möglich, Rückschlüsse auf deren zelluläre Lokalisation zu ziehen.

Weiterhin wurde unterschiedliche Expression auch bei einer Reihe von Enzymen des zellulären Metabolismus beobachtet, über deren Rolle bei der Adaption des Erregers bisher nur spekuliert werden kann.

Einige weitere, abweichend exprimierte Proteine mit bekannter oder aber zumindest postulierter Funktion konnten nicht in die oben aufgeführten funktionellen Gruppen wie verstärkte Sekretion oder Adaption an Eisenmangel eingeordnet werden. Da die Expression dieser Proteine im Rahmen der Adaption des Bakteriums aber durchaus von Interesse sein könnte, werden im Folgenden einige dieser Proteine kurz erörtert.

Besonders bei der Analyse der Proteinextrakte späterer Wachstumsphasen fiel bei den Kulturen der Wildtypformen eine im Vergleich zu den SCV's deutlich stärkere Expression des Zytotoxins (auch Leukocidin genannt) auf. Bei den Kulturen der Revertanten war diese

Expression zwar vermindert, doch auch hier immer noch deutlich stärker als bei den 'Small Colony Variants'.

Beim Zytotoxin handelt es sich um ein periplasmatisch vorliegendes Protein, welches offensichtlich erst im Falle der bakteriellen Lyse in die Umgebung freigesetzt wird (Kluffinger et al., 1989; Lutz et al., 1992). Im Anschluss an die Freisetzung erfolgt die Aktivierung des zuvor nicht zytotoxischen Proteins durch die enzymatische proteolytische Abtrennung eines ca. 20 Aminosäuren umfassenden Peptides am C-Terminus mit Hilfe von Wirtszellproteasen (Hayashi et al., 1989; Orlik-Eisel et al., 1990). Derartig aktiviert ist das Protein dann in der Lage, eukaryontische Zelltypen zu schädigen. Das Zytotoxin bildet in diesen Zellen transmembrane hydrophile Poren, welche zum Zusammenbruch der dort vorliegenden Ionengradienten führen (Xiong et al., 1994). Die Rolle des Zytotoxins bei der Pathogenese konnte im Mausmodell durch erhöhte Mortalität der Tiere nachgewiesen werden (Baltch et al., 1994). Mit dem Zytotoxin konnte also ein Virulenzfaktor identifiziert werden, welcher von den 'Small Colony Variants' in geringerem Maße als vom Wildtyp gebildet wird.

Ebenfalls gegenüber dem Wildtyp reduziert war die Expression des chitinbindenden Proteins CbpD. Bei diesem sekretorischen Protein konnte eine abgestufte Expression beobachtet werden: die stärkste Expression zeigte der Wildtyp und die geringste die Revertanten. Zudem lag beim Stamm 61 eine deutlich stärkere Expression als beim Stamm 20265 vor. Eine funktionelle Rolle kann diesem Protein im Rahmen der Lungeninfektion nach bisherigem Erkenntnisstand nicht zugewiesen werden. Allerdings wurde für eines der proteolytischen Spaltprodukte dieses Proteins eine staphylolytische Proteaseaktivität postuliert und dieses aus diesem Grund mit der Bezeichnung LasD versehen (Park und Galloway, 1995). Das Fragment LasD soll zudem die Aktivierung der Elastase LasA bewirken (Park und Galloway, 1998). Auch in den untersuchten 2D-Gelen konnten mehrere Fragmente des Proteins CbpD nachgewiesen werden. Dem unprozessierten Protein mit der Eigenschaft, Chitin zu binden, kann in der Lunge aber keine Funktion zugewiesen werden, da dieses Biopolymer nur bei Arthropoden und Pilzen, sowie bei einigen Algen und Nematoden vorkommt. Die gleiche Aussage lässt sich über die Chitinase ChiC treffen, deren Expression ebenso abgestuft in analoger Weise zum Protein CbpD beobachtet werden konnte.

Mit dem putativen DNA-bindenden Streßprotein PA0962 konnte die morphotypisch spezifisch differentielle Expression eines weiteren putativ eisenregulierten Proteins beobachtet werden. Im Unterschied zu den oben genannten Proteinen mit Funktionen im

Zusammenhang der bakteriellen Akquirierung von Eisen lag dieses Protein aber bei SCV's und Revertanten im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert vor. Die Eisenregulation und Induktion der Expression wurde in diesem Fall für homologe Proteine in anderen Bakterien wie z. B. *Bacillus subtilis* nachgewiesen (Chen et al., 1993). Die Tatsache, dass dieses Protein in der späten Wachstumsphase beim Wildtyp deutlich stärker exprimiert wurde als bei den SCV's lässt auf einen intrazellulären Eisenmangel schließen und könnte somit die Hypothese der verbesserten Eisenaufnahme der SCV's und der damit verbundenen Adaptation an derartige Mangelzustände stärken.

Über die beobachteten differentiell exprimierten Proteine hinaus überraschte bei der Analyse der Kulturüberstände aller Morphotypen die teilweise beträchtliche Anzahl zytosolischer Proteine in diesen Extrakten. Da die Anzahl dieser Proteinspots mit zunehmender Kultivierungsdauer anstieg, muss hier eine Kontamination der Extrakte mit zellulären Bestandteilen lysierter Bakterien vermutet werden. Es ist jedoch festzustellen, dass für diese Beobachtung, die in dieser Form auch von anderen Proteomanalysen bekannt ist, mindestens zwei ergänzende Möglichkeiten diskutiert werden, die das Vorliegen zytosolischer Proteine in den Kulturüberständen erklären. Zum einen existieren in bakteriellen Membranen sogenannte mechanosensitive Kanäle, welche als Schutz vor osmotischer Überanspruchung bei extremer Membranspannung zahlreiche Substanzen, darunter auch niedermolekulare Proteine in die Umgebung freisetzen können. Ein solcher Kanal wurde beispielsweise bei *E. coli* vergleichsweise gut untersucht (Ajouz et al., 1998) und ist auch bei *P. aeruginosa* in homologer Form vorhanden (MscL, PA4614). Es ist denkbar, dass ein Teil der in den Kulturüberständen vorliegenden Proteine während der unumgänglichen Zentrifugationsschritte auf diese Weise die Zellen verlässt, doch auch eine möglichst schonende Zentrifugation vermochte die vorliegende Proteinzusammensetzung nicht zu verändern. Zweitens wurden für eine zunehmende Anzahl an Proteinen inzwischen mehrere vollkommen unterschiedliche Funktionen beschrieben. Diese Proteine werden auch als 'Moonlighting-Proteins' bezeichnet und es sind inzwischen einige solcher Proteine bekannt, die neben einer bekannten Funktion im Zytosol auch noch eine ganz andere Funktion als Bestandteil des Sekretoms innehaben, wie beispielsweise die einer Substratbindung (Jeffery, 1999). Da die Anzahl bekannter derartiger Proteine insgesamt noch recht gering ist kann eine Doppelfunktion im Einzelfall für in den Kulturüberständen vorliegende Proteine meist auch nicht ausgeschlossen werden.

5.2. Identifizierung von Protein-Antigenen

In der Vergangenheit gab es verschiedene Ansätze zur Etablierung von Vakzinierungsstrategien mit dem Ziel der Verhinderung oder zumindest der Abmilderung des Verlaufes von Infektionen mit *P. aeruginosa* (Pennington, 1990; Stanislavsky und Lam, 1997).

Im Blickpunkt dieser Strategien waren hierbei stets jene Proteine und Polysaccharide, deren antigene Eigenschaften im Infektionsverlauf bereits bekannt waren. Zu nennen sind hier vor allem die Proteine von Oberflächenstrukturen wie Pili und Flagellen (Pitt, 1981; Drake und Montie, 1987), eine Anzahl von 'outer membrane' Proteinen (Kubesch et al., 1988; Stanislavsky et al., 1989), vor allem OmpF (Gilleland et al., 1988), sowie das Lipopolysaccharid (LPS) (Stanislavsky et al., 1992) und das Exopolysaccharid Alginat (Woods und Bryans, 1985), aber auch Exoenzyme wie beispielsweise das Exotoxin A (Cryz et al., 1987). Auch mit kombinierten Protein-DNA Vakzinen wurden bereits derartige Untersuchungen durchgeführt (Price et al., 2002).

Durch 2D-Gelanalysen in Verbindung mit einer Identifizierung immunogener Proteine durch 'Western-Blot' kann die Anzahl solcher "Kandidatenproteine" für Vakzinierungsstrategien beträchtlich erhöht werden. Beispiele hierfür sind derartige durchgeführte Untersuchungen bei anderen pathogenen Mikroorganismen wie *Helicobacter pylori* (McAtee et al., 1998), *Candida albicans* (Pitarch et al., 1999) oder Gruppe A - Streptokokken (Lei et al., 2000).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gelang ebenfalls die Identifizierung einer Reihe immunogener Proteine, über welche bisher keinerlei Informationen über antigene Eigenschaften vorhanden waren. Es erscheint sinnvoll, die Kenntnisse über diese neu identifizierten Protein-Antigene durch weitere serologische Untersuchungen zu vertiefen, um anhand der gewonnenen Informationen das "Kandidatenspektrum" der für Vakzinierungsstrategien in Betracht gezogenen Proteine erweitern zu können.

5.3. Abschließende Bewertung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die von CF-Patienten isolierten *Pseudomonas aeruginosa* - 'Small Colony Variants' einer eingehenden vergleichenden Proteomanalyse mit den entsprechenden Revertanten und Wildtypformen unterzogen. Es konnten hierbei

zahlreiche Unterschiede der Proteinexpressionsprofile nachgewiesen werden, die Rückschlüsse auf die Art der Adaptationsstrategie des Erregers an die Situation der chronischen Lungeninfektion zulassen.

Es konnte auch belegt werden, dass die bei den SCV's auftretenden Revertanten keinesfalls der ursprünglichen Wildtypform gleichzusetzen sind. Vielmehr stellt auch dieser Morphotyp eine besondere Variante dar, welche bezüglich der Proteinexpression zahlreiche Unterschiede sowohl im Vergleich zum Wildtyp, als auch im Vergleich zu den SCV's aufweist.

Die aus dieser Arbeit resultierenden deutlichen Hinweise auf die mit der Adaptation des Erregers an den Infektionsverlauf einhergehenden Veränderungen können durch weitere Experimente hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz überprüft werden. Anpassungsvorgänge etwa wie die postulierte Adaptation an Eisenmangelbedingungen oder aber auch die Strategie der Antiphagozytose könnten in geeigneten Experimenten wie Kultivierungsversuchen unter bestimmten Bedingungen oder aber der Austestung der cytotoxischen Aktivität der Erreger bzw. der Phagozytoseleistung phagozytischer Zellen bei den unterschiedlichen Morphotypen näher untersucht werden.

In weitergehenden Untersuchungen wäre es darüberhinaus von hohem Interesse, die große Anzahl bisher unbekannter und in dieser Arbeit erstmals nachgewiesener Proteine im Einzelnen funktionell zu untersuchen. Erkenntnisse über die Funktion dieser bisher nicht einzuordnenden Proteine könnten sowohl für die Fragestellung nach der Art der Adaptation des Bakteriums bei der chronischen Infektion als auch bei der Aufklärung genereller pathogener Mechanismen des Erregers äußerst aufschlussreich sein. Der Nachweis dieser Proteine in dieser Arbeit und die dabei gewonnenen Erkenntnisse über Lokalisation und zeitlichen Verlauf der Expression stellen Informationen dar, die die Auswahl der entsprechenden Gene für eingehende Untersuchungen gegenüber anderen Genen, deren Produkte bis dato noch niemals direkt nachgewiesen wurden, nahelegen.

7. Literaturverzeichnis

- Abele-Horn, M., Schupfner, B., Emmerling, P., Waldner, H. und Goring, H. (2000). Persistent wound infection after herniotomy associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Infection* 28, 53-54
- Adessi, C., Mieke, C., Albrieux, C. und Rabilloud, T. (1997). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 127-135
- Ajouz, B., Berrier, C., Garrigues, A., Besnard, M. und Ghazi, A. (1998). Release of Thioredoxin via the Mechanosensitive Channel MscL during Osmotic Downshock of *Escherichia coli* Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 26670-26674
- Anderson, D.H. (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *American Journal of Diseases of Children* 56: 341-350
- Anderson, D.M. und Schneewind, O. (1999). Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. *Current Opinions in Microbiology* 2, 18-24
- Anderson, L. (1991). *Two-Dimensional Electrophoresis - Operation of the ISO-DALT System*. Large Scale Biology Press, Rockville, USA
- Ankenbauer, R.G. und Quan, H.N. (1994). FptA, the Fe(III)-Pyochelin Receptor of *Pseudomonas aeruginosa*: a Phenolate Siderophore Receptor Homologous to Hydroxamate Siderophore Receptors. *Journal Of Bacteriology* 176, 307-319
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S. und Ramphal, R. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* Flagellar Cap Protein, FliD, is Responsible for Mucin Adhesion. *Infection And Immunity* 66, 1000-1007
- Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (Eds.) (1996). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. und Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 43, 475-485
- Baltch, A.L., Smith, R.P., Franke, M., Michelsen, P., Bopp, L. und Lutz, F. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin as a pathogenicity factor in a systemic infection of leukopenic mice. *Toxicon* 32, 27-34
- Barbieri, J.T. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type III secreted cytotoxin. *International Journal Of Medical Microbiology* 290, 381-387
- Beardsley, R.L. und Reilly, J.P. (2002). Optimization of Guadinidation Procedures for MALDI Mass Mapping. *Analytical Chemistry* 74, 1884-1890

- Bellido, F., Martin, N.L., Siehnel, R.J. und Hancock, R.E.W. (1992). Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. *Journal Of Bacteriology* 1992, 5196-5203
- Binet, R., L  toff  , S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P. und Wandersman, C. (1996). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters - a review. *Gene* 192, 7-11
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., G  rg, A., Westermeier, R. und Postel, W. (1982). Isoelectric focusing in immobilised pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal Of Biochemical And Biophysical Methods* 6, 317-339
- Blomberg, A., Blomberg, L., Fey, S.J., Mose Larsen, P., Roepstorff, P., Degand, P., Boutry, M., Posch, A. und G  rg, A. (1995). Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16, 1935-1945
- Bloomfield, V.A. (1997). DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* 44, 269-282
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99
- Boat, T.F., Welsh, M.J. und Beaudet, A.L. (1989). in: *The Metabolic Basis of inherited Disease*, Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. und Valle, D. (Eds.). McGraw-Hill Inc., New York, 2649-2680
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- Brancia, F.L., Butt, A., Beynon, R.J., Hubbard, S.J., Gaskell, S.J. und Oliver, S.G. (2001). A combination of chemical derivatisation and improved bioinformatic tools optimises protein identification for proteomics. *Electrophoresis* 22, 552-559
- Braun, V. und Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 104-109
- Brown, R.S. und Lennon, J.J. (1995). Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry* 67, 1998-2003
- Brumlik, M.J. und Storey, D.G. (1992). Zinc and iron regulate translation of the gene encoding *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Molecular Microbiology* 6, 337-344
- Bullen, J.J. (1981). The significance of iron in infection. *Reviews of Infectious Diseases* 3, 1127-1138

- Chee, M., Yang, R., Hubbel, E., Berno, A., Huang, X.C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D.J., Morris, M.S. und Fodor, S.P. (1996). Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274, 610-614
- Chen, L., James, L.P. und Helmann, J.D. (1993). Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. *Journal Of Bacteriology* 175, 5428-5437
- Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquié, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J. und Rabilloud, T. (1998). New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 1901-1909
- Choe, L.H. und Lee, K.H. (2000). A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: the multiphor, the IPGphor and the protean IEF cell. *Electrophoresis* 21, 993-1000
- Coburn, J. (1992). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 175, 133-143
- Cope, L.D., Thomas, S.E., Hrkal, Z. und Hansen, E.J. (1998). Binding of Heme-Hemopexin Complexes by Soluble HxuA Protein Allows Utilization of This Complexed Heme by *Haemophilus influenzae*. *Infection And Immunity* 66, 4511-4516
- Cox, C.D. (1994). Deferration of laboratory media and assay for ferric and ferrous ions. Chapter 24. in: *Methods in Enzymology*, Clark, V.L. und Bavoil, P.M. (Eds.), Academic Press, San Diego, USA
- Cox, C.D. und Adams, P. (1985). Siderophore activity of pyoverdin for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection And Immunity* 48, 130-138
- Cox, C.D. und Graham, R. (1979). Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology* 137, 357-364
- Cryz, S.J., Furer, E., Sadoff, J.C., Germanier, R., Pastan, I., Willingham, M.C. und FitzGerald, D.J. (1987). Use of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A in the construction of conjugate vaccines and immunotoxins. *Rev. Infect. Dis.* 9 (Suppl.) S644-S649
- Croft, L., Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Huang, B., Blakeley, L. und Mattik, S. (2000). An interactive web-based *Pseudomonas aeruginosa* genome database: discovery of new genes, pathways and structures. *Microbiology* 146, 2351-2364
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M. und Geesey, G.G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology* 59, 1181-1186

- Di Sant' Agnese, P.A. und Anderson, D.L. (1946). Celiac Syndrome: chemotherapy of infections of the respiratory tract associated with cystic fibrosis of the pancreas; observations with penicillin and drugs of the sulphonamide groups, with special reference to penicillin aerosol. *American Journal of Diseases of Children* 72, 17-61
- Déziel, E., Comeau, Y. und Villemur, R. (2001). Initiation of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP Correlates with Emergence of Hyperpiliated and Highly Adherent Phenotypic Variants Deficient in Swimming, Swarming, and Twitching Motilities. *Journal Of Bacteriology* 183, 1195-1204
- Drake, D. und Montie, T.C. (1987). Protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection by passive transfer of anti-flagella serum. *Canadian Journal of Microbiology* 33, 755-763
- Duong, F., Bonnet, E., Geli, V., Lazdunski, A., Murgier, M. und Filloux, A. (2001). The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* 262, 147-153
- Duong, F., Lazdunski, A. und Murgier, M. (1996). Protein secretion by heterologous bacterial ABC-transporters: the C-terminus secretion signal of the secreted protein confers high recognition specificity. *Molecular Microbiology* 21, 459-470
- Duong, F., Lazdunski, A., Cami, B. und Murgier, M. (1992). Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationships to other secretory pathways. *Gene* 121, 47-54
- Edman, P. und Begg, G (1967). A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry* 1, 80-91
- Edman, P. (1950). Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica* 4, 283-290
- Figeys, D. und Aebersold, R. (1997). High sensitivity identification of proteins by electrospray ionization tandem mass spectrometry: Initial comparison between an ion trap mass spectrometer and a triple quadrupole mass spectrometer. *Electrophoresis* 18, 360-368
- Filloux, A., Michel, G. und Bally, M. (1998). GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 177-198
- Finck-Barbançon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., Fleiszig, S.M., Wu, C., Mende-Mueller, L. und Frank, D.W. (1997). ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Molecular Microbiology* 29, 547-557

- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Merrik, J.M., McKenney, K., Sutton, G., Fitz-Hugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L., Glodex, A., Kelley, J.M., Weidmen, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fritchmann, J.L., Fuhrmann, J., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. und Venter, J.C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496-512
- Folschweiller, N., Schalk, I.J., Celia, H., Kieffer, B., Abdallah, M.A. und Pattus, F. (2000). The pyoverdinin receptor FpvA, a TonB-dependent receptor involved in iron uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Membrane Biology* 17, 123-133
- Frithz-Lindsten, E., Holmstrom, A., Jacobsson, L., Soltani, M., Olsson, J., Rosqvist, R. und Forsberg, A. (1998). Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Molecular Microbiology* 29, 1155-1165
- Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R. und Forsberg, A. (1997). Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Molecular Microbiology* 25, 1152-1139
- Fujiwara, S. und Chakrabarty, A.M. (1994). Post-translational regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* algC gene. *Gene* 19, 1-5
- Galloway, D.R. (1993) Role of exotoxins in the pathogenesis of *P. aeruginosa* infections. in: *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Campa, M., Bendinelli, M. und Friedmann, H. (Eds.), Plenum Press, New York, 107-127
- Gilleland, H.E., Gilleland, L.B. und Matthews-Greer, J.M. (1988). Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotypestrains in a rat model. *Infection And Immunity* 5, 1017-1022
- Gooley, A. und Packer, H. (1997). The importance of Protein Co- and Post-Translational Modifications in Proteome Projects. in: *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D. und Hochstrasser, D.F. (Eds.), Springer, Heidelberg, 65-92
- Görg, A., Obermeier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. und Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilised pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053

- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G. und Weiss, W. (1999). Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20, 712-717
- Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C. und Weiss, W. (1998). Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis* 19, 1516-1519
- Görg, A. (1991). Two-dimensional electrophoresis. *Nature* 349, 545-546
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, S.R., Hanash, S.M. und Somerlot, L. (1987). Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 8, 122-124
- Görg, A., Postel, W., Günther, S. und Weser, J. (1985). Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 6, 599-604
- Govan, J.R.W. und Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews* 60, 539-574
- Guzzo, J., Pages, J.M., Duong, F., Lazdunski, A. und Murgier, M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *Journal Of Bacteriology* 173, 5290-5297
- Hahn, H.P. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Gene* 192, 99-108
- Häußler, S., Ziegler, I., Löttel, A., von Götz, F., Rohde, M., Wehmhöner, D., Saravanamuthu, S., Tümmler, B. und Steinmetz, I. (2002). Highly adherent small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Manuskript eingereicht.
- Häußler, S., Tümmler, B., Weißbrodt, H., Rohde, M. und Steinmetz, I. (1999 a). Small-Colony Variants of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Clinical Infectious Diseases* 29, 621-625
- Häußler S., Rohde, M. und Steinmetz, I. (1999 b). Highly resistant *Burkholderia pseudomallei* small colony variants isolated in vitro and in experimental melioidosis. *Medical Microbiology and Immunology* 188, 91-97
- Hale, J.E., Butler, J.P., Knierman, M.D. und Becker, G.W. (2000). Increased sensitivity of tryptic peptide detection by MALDI-TOF mass spectrometry is achieved by conversion of lysine to homoarginine. *Analytical Biochemistry* 287, 110-117

- Hancock, R.E.W. (1998). Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 1998 (Suppl 1), S93-99
- Hauser, A.R., Fleiszig, S., Kang, P.J., Mostov, K. und Engel, J.N. (1998). Defects in type III secretion correlate with internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells. *Infection And Immunity* 29, 1413-1420
- Hayashi, T., Kamino, Y., Hishinuma, F., Usami, Y., Titani, K. und Terawaki, Y. (1989). *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin: the nukleotide sequence of the gene and the mechanism of activation of the protoxin. *Molecular Microbiology* 3, 861-868
- Haynes, P.A. und Yates, J.R. (2000). Proteome profiling - pitfalls and progress. *Yeast* 17, 81-87
- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. und Parsek, M.R. (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *Journal Of Bacteriology* 183, 5395-5401
- Herbert, B.R., Molloy, M.P., Gooley, A.A., Walsh, B.J., Bryson, W.G. und Williams, K.L. (1998). Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributylphosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 19, 845-51
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C. und Chait, B.T. (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry* 63, 1193A-1203A
- Holloway, B. (1955). Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology* 13, 572-581
- Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 379-433
- Jeffery, C.J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 8-11
- Kahl, B., Herrmann, M., Schulze Everding, A., Koch, H.G., Becker, K., Harms, E., Proctor, R.A. und Peters, G. (1997). Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Infectious Diseases* 177, 1023-1029
- Karas, M., Glückmann, M. und Schäfer, J. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 1-12
- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60, 2299-2301
- Kimmel, J.R. (1967). Guanidination of proteins. *Methods in Enzymology* 11, 584-589

- Klufftger, J.L., Lutz, F. und Hancock, R.E. (1989). *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin: periplasmic localization and inhibition of macrophages. *Infection And Immunity* 57, 882-886
- Krause, E., Wenschuh, H. und Jungblut, P.R. (1999). The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Analytical Chemistry* 71, 4160-4165
- Kubesch, P., Dörk, T., Wuhlbrand, U., Kälin, N., Neumann, T., Wulf, B., Geerlings, H., Weißbrodt, H., von der Hardt, H. und Tümmler, B. (1993). Genetic determinants of airways' colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Lancet* 341, 189-193
- Kubesch, P., von Specht, B.-U. und Tümmler, B. (1988). Immune Response in Cystic Fibrosis to Outer Membrane Proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zentralblatt für Bakteriologie* 269, 395-410
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lam, J., Chan, R., Lam, K. und Costerton, J.W. (1980). Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infection And Immunity* 28, 546-556
- Langen, H., Gray, C., Röder, D., Juranville, J.F., Takacs, B. und Fountoulakis, M. (1997). From genome to proteome: Protein map of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis* 18, 1184-1192
- Lauber, W.M., Carroll, J.A., Dufield, D.R., Kiesel, J.R., Radabaugh, M.R. und Malone, J.P. (2001). Mass spectrometry compatibility of two-dimensional gel protein stains. *Electrophoresis* 22, 906-918
- Lei, B., Mackie, S., Lukomski, S. und Musser, J.M. (2000). Identification and Immunogenicity of Group A *Streptococcus* Culture Supernatant Proteins. *Infection And Immunity* 68, 6807-6818
- Létoffé, S., Redeker, V. und 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. *Molecular Microbiology* 28, 1223-1234
- Liu, S., Yahr, T.L., Frank, D.W. und Barbieri, J.T. (1997). Genetic relationships between the 53-kilodalton (Exo53) and 49-kilodalton (ExoS) forms of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology* 179, 1609-1613

- Lopez, M.F., Berggreen, K., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Robinson, M. und Patton, W.F. (2000). A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* 21, 3673-3683
- Lutz, F., Elsabagh, H., Hartmann, J., Hitz, M., Jungblut, R., Kräuter, J., Leidolf, R., Lindemann, H., Seeger, W., Seifert, S. und Xiong, G. (1992). Pore-forming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin as a pathogenic factor. in: Cystic fibrosis, basic and clinical research. Høiby, N. und Pedersen, S.S. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, 121-131
- Macdonald, P. (2001). Diversity in translational regulation. *Current Opinions in Cellular Biology* 13, 326-331
- MacNab, R.M. (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *Journal Of Bacteriology* 181, 7149-7153
- Martin, D.W., Holloway, B.W. und Deretic, V. (1993). Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus sigma* factor. *Journal Of Bacteriology* 175, 1153-1164
- McAtee, C.P., Fry, K.E. und Berg, D.E. (1998). Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by "proteome" technologies. *Helicobacter* 3, 163-169
- McNamara, P., Lew, W. und Han, L. (2001). Fluorescent imaging and analysis with Typhoon 8600. *Electrophoresis* 22, 837-842
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Williams, K.L. und Gooley, A.A. (1999). Extraction of *Escherichia coli* proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20, 701-704
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Walsh, B.J., Tyler, M.I., Traini, M., Sanchez, J.S., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. und Gooley, A.G. (1998). Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 837-844
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L. und Smith, D.F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria. *Journal Of Bacteriology* 119, 736-747
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262
- Niven, D.F., Ekins, A. und al-Samaurai, A.A. (1999). Effects of iron and manganese availability on growth and production of superoxide dismutase by *Streptococcus suis*. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 1027-1032

- Nogueira, T. und Springer, M. (2000). Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. *Current Opinions in Microbiology* 3, 154-158
- O' Toole, G.A. und Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30, 295-304
- O' Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250, 4007-4021
- Ochsner, U.A., Johnson, Z. und Vasil, L. (2000). Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146, 185-198
- Ochsner, U.A., Vasil, A.I. und Vasil, M.L. (1995). Role of the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. *Journal Of Bacteriology*. 177, 7194-7201
- Oliver, A.R., Canton, P., Campo, P., Baquero, F. und Blazquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251-1254
- Orlik-Eisel, G., Lutz, F., Henschen, A., Eisel, U., Struckmeier, M., Kräuter, J. und Niemann, H. (1990). The cytotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*: cytotoxicity requires proteolytic activation. *Archiv für Mikrobiologie* 153, 561-568
- Park, S. und Galloway, D.R. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* LasD processes the inactive LasA precursor to the active protease form. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357, 8-12
- Park, S. und Galloway, D.R. (1995). Purification and characterization of LasD: a second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 16, 263-270
- Pennington, J.E. (1990). *Pseudomonas aeruginosa* - Vaccines and Immunotherapy. *Infectious Disease Clinics of North America* 4, 259-270
- Pier, G.B. (1998). *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. *ASM News* 64, 339-347
- Pier, G.B., Small, G.J. und Warren, H.B. (1990). Protection against mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in rodent models of endobronchial infections. *Science* 249, 537-540
- Pitarch, A., Pardo, M., Jiménez, A., Pla, J., Gil, C., Sánchez, M. und Nombela, C. (1999). Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *Electrophoresis* 20, 1001-1010
- Pitt, T.L. (1981). The antibody response to the flagella of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 14, 261-270

- Pollack, M. (2000). *Pseudomonas aeruginosa*. in: Principles and Practice of Infectious Diseases, G.L. Mandell, J.E. Bennett und R. Dolin (eds), Churchill Livingstone, Philadelphia, 2310-2335
- Poole, K. und Strikumar, R. (2001). Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. Current Topics in Medicinal Chemistry 1, 59-71.
- Poole, K., Dean, C., Heinrichs, S., Neshat, S., Krebs, K., Young, L. und Kilburn, L. (1996). Siderophore-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. in: Molecular biology of *Pseudomonas*. Nakazawa, T. (Ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., 371-383
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C. und Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. Journal Of Bacteriology 175, 7363-7372.
- Postle, K. (1993). TonB protein and energy transduction between membranes. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 25, 591-601
- Price, B.M., Barten Legutki, J., Galloway, D.R., von Specht, B.U., Gilleland, L.B., Gilleland, H.F. und Starzek, J. (2002). Enhancement of the protective efficacy of an oprF DNA vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 33, 89-99
- Pridmore, A.M., Devine, D.A., Bonass, W.A. und Silley, P. (1999). Influence of sample preparation technique on two-dimensional gel electrophoresis of proteins from *Porphyromonas gingivalis*. Letters in Applied Microbiology 28, 245-249
- Prince, R.W., Cox, C.D. und Vasil, M.L. (1993). Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. Journal Of Bacteriology. 175, 2589-2598
- Proctor, R.A., Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P.E., Lew, D.P. und Peters, G. (1998). Staphylococcal Small Colony Variants Have Novel Mechanisms for Antibiotic Resistance. Clinical Infectious Diseases 27 (Suppl 1), S68-74
- Proctor, R.A., Langevelde, P.v., Kristjansson, M., Maslow, J.N. und Arbeit, R.D. (1995). Persistent and Relapsing Infections Associated with Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. Clinical Infectious Diseases 20, 95-102
- Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretion pathway in Gram-negative bacteria. Microbiological Reviews 57, 50-108
- Qi, S.Y., Moir, A. und O'Connor, C.D. (1996). Proteome of *Salmonella typhimurium* SL1344: Identification of Novel Abundant Cell Envelope Proteins And Assignment to a Two-Dimensional Reference Map. Journal Of Bacteriology 178, 5032-5038

- Rabilloud, T. (1999). Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods in Molecular Biology* 112, 9-19
- Rabilloud, T. (1998). Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 758-760
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. und Lunardi, J. (1997). Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 307-316
- Rabilloud, T. (1996). Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 17, 813-829
- Rabilloud, T., Valette, C. und Lawrence, J.J. (1994). Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 15, 1552-1558
- Ramphal, R. und Pier, G.B. (1985). Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infection And Immunity* 47, 1-4
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073
- Righetti, P.G. (1990). Immobilized pH gradients. Theory and methodology. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford
- Roggenkamp, A., Sing, A., Hornef, M., Brunner, U., Autenrieth, I.B. und Heesemann, J. (1998). Chronic Prosthetic Hip Infection Caused by a Small-Colony Variant of *Escherichia Coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2530-2534
- Russel, M. (1998). Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* 279, 485-499
- Sambrook, J. und Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual (Vol.3)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanchez, J.C., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M.R. und Hochstrasser, D.F. (1997). Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 324-327
- Santoni, V., Rabilloud, T., Doumas, P., Rouquié, D., Mansion, M., Kieffer, S., Garin, J. und Rossignol, M. (1999). Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* 20, 705-711
- Shen, J., Meldrum, A. und Poole, K. (2002). FpvA Receptor Involvement in Pyoverdine Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology* 184, 3268-3275

- Shevchenko, A., Loboda, A., Ens, W., Schraven, B., Standing, K.G. und Shevchenko, A. (2001). Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry. *Electrophoresis* 22, 1194-1203
- Shigematsu, T., Fukushima, J., Oyama, M., Tsuda, M., Kawamoto, S. und Okuda, K. (2001). Iron-Mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Immunology* 45, 579-590
- Spangenberg, C., Heuer, T., Bürger, C. und Tümmler, B. (1996). Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters* 396, 213-217
- Stanislavsky, E.S. und Lam, J.S. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. *FEMS Microbiology Reviews* 21, 243-277
- Stanislavsky, E.S., Makarenko, T.A. und Kozenova, T.E. (1992). Specific and non-specific mouse protection induced by different chemotypes of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides. *FEMS Microbiology Immunology* 105, 181-190
- Stanislavsky, E.S., Edvabnaya, L.S., Bandman, O.A., Boolk, V.F., Zhvanetskaya, M.I. und Vargina, A.K. (1989). Experimental studies on the protective efficacy of a *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *Vaccine* 7, 562-566
- Steinberg, T.H., Chernokalskaya, E., Berggren, K., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P. und Patton, W.F. (2000). Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium metal chelate stain. *Electrophoresis* 21, 486-496
- 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., 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. und Olson, M.V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964
- Takase, H., Nitani, H., Hoshino, K. und Otani, T. (2000). Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB Gene for High-Affinity Iron Acquisition and Infection. *Infection And Immunity* 68, 4498-4504
- Tomassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. und Lazdunski, A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*. 9, 73-90
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 76, 4350-4354

- Vallet, I., Olson, W., Lory, S., Lazdunski, A. und Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene cluster (cup) and their involvement in biofilm formation. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 98, 6911-6916
- Vallis, A.J., Yahr, T.L., Barbieri, J.T. und Frank, D.W. (1999). Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. Infection And Immunity 67, 914-920
- Vasil, M.L. und Ochsner, U.A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. Molecular Microbiology 34, 399-413
- Vogel, H.J. und Bonner, D.M. (1956). Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. The Journal of Biological Chemistry 218, 97-106
- Westermeier, R. (2001). Electrophoresis in Practice (3rd Edition). Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Wickner, W. und Leonard, M.R. (1996). Escherichia coli preprotein translocase. The Journal of Biological Chemistry 271, 29514-29516
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Sanchez, J.-C., Bairoch, A und Hochstrasser, D.F. (1998). Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: The effects of protein hydrophobicity and copy number. Electrophoresis 19, 1501-1505
- Wise, R.I. (1956). Small colonies (G variants) of staphylococci: isolation from cultures and infections. Annals of the New York Academy of Sciences 65, 169-174
- Woods, D.E. und Vasil, M.L. (1994). Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. in: *Pseudomonas aeruginosa* Infections and Treatment. Baltch, A.L. und Smith, R.P. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 21-50
- Woods, D.E. und Bryans, L.E. (1985). Studies on the ability of alginate to act as protective immunogen against infection with *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of Infectious Diseases 151, 581-588
- Woods, D.E., Straus, D.C., Johansen, W.G., Berry, V.K. und Bass, J.A. (1980). Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. Infection And Immunity 29, 1146-1151
- Wooldridge, K.G. und Williams, P.H. (1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. FEMS Microbiological Reviews 12, 325-348
- Xiong, G., Struckmeier, M. und Lutz, F. (1994). Pore-forming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin. Toxicology 87, 69-83

- Yahr, T.L., Mende-Mueller, L.M., Friese, M.B. und Frank, D.W. (1997). Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. Journal Of Bacteriology 179, 7165-7168
- Yates, J.R. (1998). Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. Journal Of Mass Spectrometry 33, 1-19
- Young, G.M., Schmiel, D.H. und Miller, V.L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: The flagellar export apparatus functions as a secretion system. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 96, 6456-6461
- Zierdt, C.H. und Schmidt, P.J. (1964). Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Of Bacteriology 87, 1003-1010

7. Eidesstattliche Versicherung

Dipl. Biol. Dirk Wehmhöner
Celler Straße 114
38114 Braunschweig

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass

1. ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Proteomanalyse unterschiedlicher Morphotypen von *Pseudomonas aeruginosa*, isoliert von Patienten mit zystischer Fibrose" selbständig verfasst und die verwendeten Hilfsmittel vollständig angegeben habe,
2. die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist,
3. ich zu keinem früheren Zeitpunkt ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule oder einem anderen Fachbereich beantragt habe.

Braunschweig, 16.06.2002

Dirk Wehmhöner

8. Lebenslauf

Name:	Dirk Wehmhöner
Geburtsdatum:	1.9.1970
Geburtsort:	Soltau, Niedersachsen
Eltern:	Ernst Wehmhöner und Marianne Wehmhöner (geb. Blumberg)
Familienstand:	ledig
1977 - 1981	Süllberg - Grundschule Munster
1981 - 1983	Orientierungsstufe Munster
1983 - 1990	Gymnasium Munster
1990	Abiturprüfung am Gymnasium Munster
1990 - 1992	Wehrdienst mit Reserveoffiziersausbildung bei Panzeraufklärungslehrbataillon L11 und Kampftruppenschule 2 in Munster
1992 - 1998	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
1997 - 1998	Diplomarbeit in der Abteilung Molekulargenetik (Prof. Dr. A. Klein) im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
1998	Diplomabschlußprüfung als Diplombiologe an der Philipps-Universität Marburg (Hauptfach: Genetik)
1998 - 2002	Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter, Promotion im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. Bitter-Suermann), Durchführung der praktischen Tätigkeiten in der Abteilung Zellbiologie der Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig.
Seit 2003	Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Zellbiologie der Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig.

9. Danksagung

Ohne die Unterstützung meiner Projekt- und Arbeitsgruppenleiter sowie zahlreicher Kollegen wäre mir die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund möchte ich mich bei allen direkt und indirekt am Zustandekommen dieser Arbeit Beteiligten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen, der diesem Projekt in zahlreichen Diskussionen stets neue Impulse verliehen hat und der das Referat dieser Dissertation übernommen hat. Ebenso danke ich Dr. Susanne Häussler, deren entscheidende Vorarbeiten diese Arbeit erst ermöglicht haben und die mir bei meinen anfänglichen Versuchen eine große Hilfe war, sowie Dr. Ivo Steinmetz, meinem Arbeitsgruppenleiter, der dieses Projekt stets hilfreich, kompetent und kritisch betreut hat.

Darüberhinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Wehland, der mich für die Dauer der Durchführung dieser Arbeit dauerhaft als Gast in seiner Abteilung aufgenommen hat, wodurch mir die praktische Durchführung meiner Experimente erst ermöglicht wurde. Ebenso danke ich Dr. Uwe Kärst, der für mich bei allen technischen Fragen in den Laboren der GBF stets ein hilfsbereiter Ansprechpartner war.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Hannover und im Bereich Zell- und Immunbiologie an der GBF in Braunschweig bedanken, die mir in Seminaren oftmals neue Anregungen lieferten und durch kritische Diskussionen den Verlauf dieser Arbeit befruchteten. Erwähnen möchte ich insbesondere Jessica Schaumburg, die während der Anfertigung ihrer Diplomarbeit ebenfalls im Rahmen des SCV-Projektes tätig war und mit der ich mich gemeinsam methodisch einarbeiten konnte, sowie Senthil Selvan, der vor kurzem ebenfalls mit Proteomanalysen von *P. aeruginosa* begonnen hat und dem ich eine Reihe konstruktiver Gespräche verdanke.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Brakhage für die Übernahme des Koreferates dieser Dissertation.

