

**Modulation des *Quorum sensing*
in *Pseudomonas aeruginosa*
durch den RND Efflux Transporter MexN**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom Biologin Susanne von Pall de Tolna

geboren am 21.07.19974, in Windhuk (Namibia)

2006

Referent: Prof. Dr. Dr. Tümmler

Korreferent: Prof. Dr. Alves

Tag der Promotion: 13.03.2006

Kurzfassung

Primäres Ziel dieser Arbeit war, Gene, die einen Einfluss auf das *Quorum sensing* ausüben, näher zu charakterisieren. Eine Kombination von funktioneller Genomanalyse (Affymetrix GeneChips), *in silico* Analysen sowie verschiedene Bioassays wurden dafür verwendet. Mit Hilfe der Komplementation sollte zudem bestätigt werden, dass sich der beobachtete Phänotyp kausal dem ausgeschalteten Gen zuordnen ließ.

Für zwei Gene (*fliK* und *rrR*) ließ sich mit der pLAFR3-Bank die Komplementation durchführen. Allerdings war aufgrund der geringen Expressionsrate von pLAFR3 keine Möglichkeit zur Untersuchung in weiteren Bioassays gegeben. Somit lässt sich sagen, dass pLAFR3 sich zur phänotypischen Analyse von einzelnen Zellen, aber nicht für die quantitative Analyse an einer Bakterienpopulation eignet. Zur Lösung dieser Problematik wurde pLAFR3 sequenziert und anhand dieser Ergebnisse sind 22 ORFs identifiziert worden, die für Gene kodieren, die das Verweilen und Einbringen von pLAFR3 in Rezipientenzellen ermöglichen.

Eine Alternative war die Komplementation mit polycistronische Genkassetten. Diese wurde verwendet, um polare Effekte, die durch Einzelgenuntersuchungen entstehen könnten, zu minimieren. In dieser Arbeit ist für das *mexN* Gen gezeigt worden, dass es zu einer Expression von auf pUCP20 klonierten Genen in *P. aeruginosa* kommt. Das Ausschalten dieses Gens hat einen erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel von *P. aeruginosa* sowie auf das *Quorum sensing*. Die Bildung von Virulenzfaktoren, wie Proteasen, Elastasen sowie Hämolyse war gestört. Regulatoren des Las und Rhl Systems waren zudem im Mutanten herab reguliert.

Anhand des Vergleichs von Transportern verschiedener Taxa ist gezeigt worden, dass MexN aus *P. aeruginosa* eine größere Homologie zu den Orthologen aus *P. fluorescens* und *P. syringae* aufweist als zu dem Ortholog aus *P. putida* und dem Paralog aus *P. aeruginosa* selbst.

Die anderen Mutanten mit ausgeschalteten Genen wiesen ebenso veränderte phänotypische Eigenschaften auf, aber durch Komplementation konnte bewiesen werden, dass diese Gene nicht für den beobachteten Phänotyp kausal verantwortlich waren. Diese Phänotypen müssen daher auf Sekundärmutationen an anderen Positionen im Genom zurück zu führen sein.

Schlüsselwörter: *Pseudomonas aeruginosa*, *Quorum sensing*, Komplementation

Summary

The main objective of this work was to characterize genes that may play a role in Quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. A combination of functional genomics, *in silico* analysis and different bioassays were used to examine the virulence. Using complementation *in trans* should reveal that the inactivated gene was responsible for the observed phenotype.

Complementation with a pLAFR3 library was successful in two cases, but the observed expression level was too low for further investigations in subsequent bioassays. So it could be said that pLAFR3 is applicable for phenotypic analysis in single cells but not for quantitative examinations of a bacterial population. To gain insights into the major problem of insufficient expression of heterologous insertions, pLAFR3 was sent for sequencing and 22 ORFs were identified. They are coding for genes that are involved in maintenance and transfer of pLAFR3 in target cells.

A possible alternative was the complementation with operons cloned into pUCP20. Due to the lack of knowledge in the literature, the capability of expressing genes from larger inserts cloned into this vector had to be explored before using it as a standard cloning vehicle for complementation.

Inactivation of *mexN* led to a formidable decrease in metabolic activity but also abolished Quorum sensing. The production of virulence factors like proteases, elastases and hemolysins was defective. Furthermore regulators of the Las and Rhl Systems were down regulated. Also the mutant was not able to utilize citrate properly, suggesting that the transporter MexN may play a role in the transport of organic acids like it is known for its homologs in plant associated Pseudomonads.

All tested (nine) mutants, except *mexN*-, *rrR*-, *fliK*- and *lemA*- did not revert the phenotype to Quorum sensing positive. The complementation *in trans* showed that the mutation in the examined genes were not accountable for the observed phenotype. These changes are caused by secondary mutational events in the genome.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum sensing, Complementation

1	Einleitung	1
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2	Genomorganisation von <i>P. aeruginosa</i>	2
1.3	<i>P. aeruginosa</i> und cystische Fibrose (CF)	3
1.4	Die Virulenz und Cytotoxizität von <i>P. aeruginosa</i>	4
1.5	Entdeckung des <i>Quorum sensing</i> in <i>Vibrio fischeri</i>	6
1.6	<i>Quorum sensing</i> in <i>P. aeruginosa</i>	7
1.6.1	<i>Quorum sensing</i> Systeme in <i>P. aeruginosa</i>	8
1.6.2	Andere Regulatoren beteiligt am <i>Quorum sensing</i>	9
1.7	Cosmid pLAFR3	12
1.8	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Verbrauchsmaterial	15
2.1.3	Chemikalien und Enzyme	15
2.1.4	Lösungen und Puffer	16
2.1.5	Bakterienstämme	20
2.1.6	Vektoren	21
2.2	Mikrobiologische Methoden	22
2.2.1	Anzucht von Bakterien	22
2.2.2	Zelldichtebestimmungen	22
2.2.3	Glyzerinkulturen	22
2.3	Molekularbiologische Methoden	23
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.3.2	Präparation genomischer DNA	23
2.3.3	Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA	24
2.3.4	Quantifizierung von DNA	24
2.3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.3.6	Oligonukleotid Konstruktion	27
2.3.7	Restriktionspaltung von DNA	27
2.3.8	Dephosphorylierung des Vektors	28
2.3.9	Ligation	28
2.4	Southern Blot	29
2.4.1	Dotblot	29
2.4.2	Herstellung der DIG markierten Sonden	30
2.4.3	Hybridisierung der Sonden an die DNA-Blots	30
2.4.4	Immunologische Detektion der Digoxigenin markierten DNA	31
2.4.5	Waschen hybridisierter Nylonmembranen	31
2.5	Komplementation	32
2.5.1	Triparentale Konjugation	32
2.5.2	Kompetente Zellen und Transformation	33
2.5.3	Elektroporation von <i>P. aeruginosa</i> TB	34
2.6	RNA Arbeitstechniken	35
2.6.1	Anzucht von Bakterien für RNA Isolierungen aus LB Medium	35
2.6.2	Anzucht von Bakterien für RNA Isolierungen aus ABC Minimal Medium	36
2.6.3	Quantifizierung der RNA	36
2.6.4	Lösungen für RNA Arbeiten	36
2.6.5	Lösungen für die Northern Hybridisierung	37
2.6.6	RNA Isolierung	38
2.6.7	Formaldehyd Agarosegel Elektrophorese	38
2.6.8	Northern Blotting	39
2.6.9	RNA-DNA Hybridisierung	40
2.6.10	Immunologische Detektion der Digoxigenin markierten DNA	40
2.7	Phänotypische Untersuchungen	41
2.7.1	Messung der Proteaseaktivität auf Caseinagar	41
2.7.2	Sekretion von Elastase	41
2.7.3	Stapholytische Aktivität	42
2.7.4	Sekretion von Hämolysinen	42
2.7.5	Kongorot Agar	42

2.7.6	Messung der Siderophorenproduktion	43
2.7.7	Sekretion von Pyocyanin	44
2.7.8	Sekretion von Pyoverdin.....	44
2.8	<i>P. aeruginosa</i> Microarrays (Affymetrix).....	45
2.8.1	<i>P. aeruginosa</i> GeneChip	45
2.8.2	Herstellung und Fragmentation von cDNA.....	47
2.8.3	RT-PCR.....	48
2.8.4	Markieren von fragmentierter cDNA mit Biotin	49
2.8.5	GeneChip Analysen.....	49
2.9	Annotation von pLAFR3.....	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Komplementation <i>Quorum sensing</i> defizienter <i>knock out</i> Mutanten.....	54
3.1.1	Auflistung der zu untersuchenden Gene	55
3.2	Triparentale Konjugation.....	61
3.2.1	Antibiotika Test.....	61
3.2.2	PCR für die Herstellung der Sonden	62
3.2.3	Durchsuchen der pLAFR3-Bank mit spezifischen Sonden	62
3.2.4	Überprüfen der komplementierten Mutanten nach der triparentalen Konjugation	64
3.3	Annotation pLAFR3.....	70
3.4	Komplementation mit pUCP20.....	73
3.5	Phänotypische Komplementation	78
3.5.1	Proteasenachweis auf Caseinagar.....	78
3.5.2	Besonderer Phänotyp auf LB-Agar.....	79
3.5.3	Hämolyse (Rhamnolipidproduktion)	80
3.5.4	LasA Proteaseaktivität in der Stapholyse-Untersuchung	81
3.5.5	Nachweis der LasB Elastase.....	82
3.5.6	Pyoverdinsekretion in King B Medium.....	82
3.5.7	Pyocyaninsekretion in King A Medium	84
3.5.8	Siderophorenproduktion	85
3.5.9	Homoserinlacton (HSL) Produktionstests	86
3.5.10	DC-Test für die Bildung von PQS	87
3.6	RNA Analysen.....	89
3.7	Auswertung GeneChip PA1436	92
3.8	Auswertung GeneChip PA5349	99
4	Diskussion.....	105
4.1	Komplementation mit der pLAFR3-Bank	105
4.1.1	Annotation pLAFR3	106
4.2	Komplementation <i>in trans</i> mit pUCP20-Konstrukten.....	108
4.2.1	MDR (<i>multidrug resistance transporter</i>) Transporter.....	109
4.2.2	Struktur eines RND Efflux Transporters	110
4.2.3	RND Efflux Transporter in <i>P. aeruginosa</i>	111
4.3	Untersuchungen des <i>mexN</i> - Mutanten	113
4.3.1	Phänotypische Untersuchungen des <i>mexN</i> - Mutanten	113
4.3.2	Transkriptomanalyse	113
4.4	Transkriptomanalyse der <i>rrR</i> - Mutante (ORF=PA5349)	114
4.5	<i>In silico</i> Analysen	115
4.6	Ausblick.....	121
4.7	Zusammenfassung	121
5	Literaturverzeichnis.....	125
6	Anhang	134
7	Abkürzungsverzeichnis.....	137
	Curriculum vitae	139

1 Einleitung

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, ein gram-negativ, polar begeißeltes stäbchenförmiges Bakterium ist ein sehr bekanntes Mitglied aus der Gattung der Pseudomonaden [Stanier *et al.*, 1966]. Sie werden anhand der 16S-rRNA Sequenzen taxonomisch der Gruppe der γ -Proteobakterien zugeordnet [Woese und Fox, 1977]. Die am intensivsten untersuchten Mitglieder der Gattung *Pseudomonas* sind sowohl *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. syringae* als auch *P. aeruginosa* [Olsen *et al.*, 1994]. Letztgenannter, mit einer Länge von 1,5-3 μm , sowie einem Durchmesser von 0,5-0,8 μm wurde erstmals aus einer nässenden Brandwunde, welche leicht grünlich verfärbt war, isoliert. Diese Fähigkeit des fakultativ anaeroben Bakteriums zur Produktion verschiedener Farbstoffe, wie zum Beispiel Pyocyanin (blaugrün) [Al-Ani *et al.*, 1986], Pyoverdin (fluoreszierendes grün), Pyorubin (rot) und Pyomelanin (braun) führten zu seiner Namensgebung (aerugo=grünspan). Seine außerordentliche Fähigkeit, sich verschiedenster ökologischer Nischen anzupassen, macht dieses Bakterium so erfolgreich, denn es ist in Wasser, Erde, Pflanzen und tierischem Gewebe auffindbar [Hardalo und Edberg, 1997]. Möglich wird dies durch die metabolische Umsetzung eines breiten Spektrums an organischen Komponenten, wie aliphatischen Kohlenwasserstoffe, halogenierten und nicht halogenierten Aromaten, die als Nährstoffgrundlage dienen. Ebenso toleriert es Temperaturen von 4°C bis 43°C, überlebt in destilliertem Wasser und kann auch aus Desinfektionsmitteln isoliert werden [Bean und Farrell, 1967]. Die Rolle von *P. aeruginosa* als eines der wichtigsten humanpathogenen Bakterien des letzten Jahrhunderts ist auf seine Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika und Desinfektionsmitteln zurückzuführen. Gesunde Personen sind normalerweise selten von einer Infektion mit der Spezies *P. aeruginosa* betroffen, da diese eine intakte Immunabwehr nicht überwinden kann [Botzenhardt und Döring, 1993]. Auf Intensivstationen (ICU=*Intensive Care Units*), konnte in 50% der Sputumproben, in 32,7% der Blutproben, sowie in 23,1% der Urinproben von Patienten, Bakterien nachgewiesen werden, und in 41,3% der Fälle handelte es sich um *P. aeruginosa* [Tennant *et al.*, 2005]. Ebenso sind Menschen mit schweren Brandwunden von Infektionen mit *P. aeruginosa* betroffen, denn laut einer Studie von 2005, handelte es sich bei 40,4% der bakteriellen Isolate um *P. aeruginosa* [Yildirim *et al.*, 2005]. Eine weitere große Patientengruppe sind Menschen mit COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*). In einer Studie aus Spanien wurden 211 Fälle von *P. aeruginosa* Infektionen untersucht, und 17,5% der insgesamt untersuchten Patienten litten unter COPD und 13,2% unter Diabetes [Gomez *et al.*, 2005]. Gefährlich wird *P. aeruginosa* zudem für Menschen, die mit Immunsuppressiva behandelt werden, und für Patienten mit Malignomen und HIV-Infektionen. Ebenso können Menschen, die an Mukoviszidose (CF=Cystische Fibrose) leiden und ein normal funktionierendes Immunsystem besitzen, von *P. aeruginosa* befallen werden.

Erkrankungen des Urogenitaltraktes [Horan, 1986], sowie nosokomiale Infektionen [Quinn, 1998] lassen sich ebenfalls auf *P. aeruginosa* zurückführen. Bei CF-Patienten führt die chronische Besiedlung der unteren Atemwege zur Entzündung und Destruktion des befallenen Lungengewebes [Govan und Deretic, 1986].

Des Weiteren kommt es auch zu akuten Infektionen im Auge und am Ohr. In einer belgischen Studie wurde anhand der durch Kontaktlinsentragen ausgelöste Minimaltraumen an der Cornea nachgewiesen, dass diese mit am häufigsten zur Besiedlung mit *P. aeruginosa* führen [Verhelst *et al.*, 2005]. Bei der akuten Otitis Externa, Endzündung des äußeren Ohrs, wurde in 38% der Fälle eine Infektion mit *P. aeruginosa* diagnostiziert [Roland *et al.*, 2002].

1.2 Genomorganisation von *P. aeruginosa*

Die Fähigkeit von *P. aeruginosa*, in vielfältigen ökologischen Nischen zu überleben, deckt sich mit seinem umfangreichen genetischen Repertoire. Der komplett sequenzierte Stamm PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>) weist eine Größe von 6,264 Mb auf [Stover *et al.*, 2000] und kodiert für 5570 potentielle Gene beziehungsweise offene Leserahmen (*open reading frames*=ORFs). Damit gehört er zu den bisher größten sequenzierten Bakteriengenomen, und seine Anzahl an ORFs ist fast so groß wie die des Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae*, auf dessen Chromosomen circa 6200 ORFs lokalisiert sind [Ball *et al.*, 2000]. Ein bemerkenswert hoher Anteil der ORFs (7,2%) wurde als potentielle Transkriptionsregulatoren oder als Bestandteile der Zwei-Komponenten-Regulatorsysteme (2,1%) beschrieben. Diese hohe Anzahl an Regulatorgenen wurde auch in anderen Spezies gefunden, welche verschiedene Lebensräume kolonisieren (5,3% *Bacillus subtilis*). Pathogene aus definierten Lebensräumen haben einen deutlich geringeren Anteil an Regulatoren (3% *Mycobacterium tuberculosis*, 1% bei *Helicobacter pylori*).

Durch Insertionen und Deletionen verschiedener DNA-Blöcke kommt es zu einer hohen Genomdiversität der einzelnen Stämme der Spezies *P. aeruginosa*. Dabei variiert die Genomgröße zwischen 5,2 und 7 Mb [Schmidt *et al.*, 1996], und der Anteil nicht konservierter DNA zwischen zwei Stämmen kann bis zu über 20% der jeweiligen Genome ausmachen. Selbst der Vergleich klonaler Varianten zeigt einen Anteil von über 10% an variablen DNA-Abschnitten [Römling *et al.*, 1997].

1.3 *P. aeruginosa* und cystische Fibrose (CF)

Cystische Fibrose bedeutet für den Patienten, dass er unter einer generalisierten Störung des sekretorischen Epithels aller exokrinen Drüsen leidet [Davies *et al.*, 1996; Tümmler *et al.*, 1999; Welsh *et al.*, 1995]. Diese genetische Erkrankung europäischer Populationen mit autosomal rezessivem Erbgang wird durch Mutationen im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Gen [Riordan *et al.*, 1989] verursacht. Die häufigste Mutation $\Delta F508$ kommt auf 70% aller CF-Chromosomen vor. Das klinische Krankheitsbild, das von Sekundärveränderungen an Pankreas, Darm, Leber, Gallenwegen, Reproduktions- und Respirationstrakts geprägt ist, wird durch den Basisdefekt des gestörten Wasser- und Salztransports ausgelöst. Chronische Infektionen von bakteriellen Erregern führen zu Defektheilungen und Umbau des Lungengewebes, was somit letztendlich in einer respiratorischen Insuffizienz mündet. Moderne Therapieprogramme sorgten im Jahr 2004 für eine durchschnittliche Überlebenszeit der Patienten von circa 34 Jahren [mündliche Mitteilung Tümmler].

Als Pathogene treten in Altersabhängigkeit verschiedene Bakterien auf. Im Säuglings- und Kleinkindalter dominieren Atemwegsinfektionen mit *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*. Bei Schulkindern kommt es zu chronischer Besiedlung der Atemwege mit *P. aeruginosa* [Döring, 1997; Gilligan, 1991; Govan *et al.*, 1992 und 1996]. Den Staphylokokken und den Pseudomonaden ist eine große morphologische und physiologische Vielfalt gemein, die zur Bildung von *small colony variants* führen kann [Häussler *et al.*, 1999]. Zuerst setzt sich *P. aeruginosa* in Form von Mikrokolonien im Bronchiallumen von CF-Patienten fest, da diese ein dehydriertes zähes luminales Sekret besitzen. Allerdings wird die endotheliale Barriere dabei nicht durchbrochen [Baltimore *et al.*, 1989]. Durch die ständige Präsenz der Bakterien und ihrer bakteriellen Antigene kommt es zu einer chronischen Stimulation des Abwehrsystems [Buret *et al.*, 1993; Döring *et al.*, 1995]. Diese lokale Abwehr erfolgt durch Alveolarmakrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Die durch die Granulozyten freigesetzten lysosomalen Enzyme sorgen für eine lokale Zerstörung des Lungengewebes. Der initial erworbene *P. aeruginosa*-Klon verweilt in der Lunge und ändert während der chronischen Infektion seinen Phänotyp. Die Keime ändern ihre äußere Zellhülle, werden LPS-defizient, synthetisieren vermehrt Alginate und setzen ein verändertes Spektrum an Exoprodukten frei [Baltimore *et al.*, 1989; Boucher *et al.*, 1997; Govan *et al.*, 1996; Römling *et al.*, 1994].

1.4 Die Virulenz und Cytotoxizität von *P. aeruginosa*

Die Pathogenität von *P. aeruginosa* ist nicht auf einen einzelnen Virulenzfaktor zurückzuführen, sondern auf eine komplizierte Interaktion verschiedener Faktoren. Sie beginnt mit der Kolonisierung und Biofilmbildung, anschließender Bildung von Gewebnekrosen, der Invasion und Verteilung durch das vaskuläre System, sowie der Aktivierung von lokalen und systemischen Immunantworten [Van Delden, 2004].

Um eine Adhärenz an die Wirtszellen zu vermitteln, benutzt *P. aeruginosa* Typ IV Pili, die an das Glycosphingolipid asialo-GM1 (aGM1) der epithelialen Zellmembran binden [Comolli *et al.*, 1999]. Für die weitere Kolonisierung der epithelialen Oberflächen des Wirts fungieren das Flagellen Cap Protein [Arora *et al.*, 1998] und Flagellin [Feldman *et al.*, 1998; Lillehoj *et al.*, 2002]. Flagellen spielen am Anfang der Infektion eine Rolle [O'Toole und Kolter, 1998], im späteren Verlauf überwiegen andere Faktoren [Mahenthiralingam *et al.*, 1994]. Fimbrien [Vallet *et al.*, 2001], das äußere Membranporin OprF [Azghani *et al.*, 2002], Lipopolysaccharide (LPS) und Alginat [Gilboa-Garber *et al.*, 1996, D'Argenio, 2004] spielen ebenso eine wichtige Rolle. Die Fähigkeit von *P. aeruginosa* an abiotische Oberflächen und Gewebe zu binden, sowie die Differenzierung der Mikroorganismen zu Biofilmen stellt eine weitere Besonderheit dieser Bakterien dar [Watnik und Kolter, 2000].

Nach Kolonisierung der Gewebe beginnt *P. aeruginosa* mit der Produktion extrazellulärer Virulenzfaktoren, die das Einwandern von Bakterien in den Blutkreislauf und die dortige Verteilung bewirken. *In vivo* Studien von *P. aeruginosa* Mutanten, die Defekte in der Produktion diverser Virulenzfaktoren aufwiesen, zeigten eine verminderte Pathogenität [Nikas und Iglewski, 1985], die aber in Abhängigkeit des Infektionstyps variieren kann.

Für die Sekretion von Virulenzfaktoren spielt das Typ-III Sekretionssystem (TTSS) eine wichtige Rolle. Das TTSS benötigt einen engen Kontakt mit den Wirtszellen, um die Effektorproteine mittels einer nadelartigen Struktur in das Zytoplasma der eukaryontischen Zellen einzubringen [Cornelis *et al.*, 2000]. Vier dieser Exotoxine sind bisher identifiziert, das Exoenzym S, -T, -Y und U.

Exo S, ein bifunktionales Cytotoxin, unterbricht mit seinem Aminoterminus die Actinfilamente in eukaryontischen Zellen, wo hingegen das Carboxylende eine ADP-ribosyltransferase Domäne beinhaltet [Coburn *et al.*, 1989]. In verschiedenen klinischen Isolaten von *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass Exo S eine wichtige Rolle bei dem Zelltod von Makrophagen während der Phagozytose spielt [Dacheux *et al.*, 2000]. 40% der klinischen Isolate produzieren Exo S [Sokurenko *et al.*, 2001]. Stämme, die kein Exo S als Effektorprotein besitzen, verwenden stattdessen Exo U, das somit an der Virulenz dieser Bakterien beteiligt ist [Fleiszig *et al.*, 1997; Finck-Barbancon *et al.*, 1997]. Exo T und S zusammen sind an der Ribosylierung von ADP beteiligt [Nicas und Iglewski, 1984; Barbieri, 2000]. Somit verhindern sie die Wundheilung, als auch die Exozytose und verursachen das Anhalten des Zellzyklus [Krall *et al.*, 2000]. Die Sekretion von Exo U ist zytotoxisch für Säugerzellen, und neuere Untersuchungen zeigen, dass es auch eine

Phospholipaseaktivität besitzt [Rabin und Hauser, 2003], die zum Abbau der Zellmembranen und letztendlich zum Zelltod führt [Sato *et al.*, 2003].

Exotoxin A ist eine ADP-Ribosyltransferase und inaktiviert den eukaryontischen Elongationsfaktor 2 eEF2, was zur Inhibierung der Proteinbiosynthese und dem Zelltod führt [Wick *et al.*, 1990]. Reinigt man Exotoxin A auf, wirkt es tödlich in Tierversuchen, somit spielt es eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor für *P. aeruginosa* [Woods und Iglewski, 1983].

Bei Infektionen der Cornea spielt die alkalische Protease als Virulenzfaktor eine wichtige Rolle [Howe und Iglewski, 1984], sowie beim Abbau der Komponenten des Komplementsystems [Hong und Ghebrehiwet, 1992] und der Hydrolyse von Fibrin und Fibrinogen [Shibuya *et al.*, 1991].

LasA und LasB Elastase sind verantwortlich für den Abbau des Proteins Elastin in menschlichem Lungengewebe und den Blutgefäßen [Galloway, 1991]. Beide Elastasen sind in Sputumproben von CF-Patienten nachgewiesen worden [Storey *et al.*, 1992; Jaffar-Bandjee *et al.*, 1995]. Wobei die LasB Elastase auch mit der Immunabwehr des Wirtes interagiert [Van Delden, 2004].

Phospholipase C, eines von zwei Hämolytinen in *P. aeruginosa* induziert eine vaskuläre Permeabilität, Organschäden und Tod im Tiermodell, als auch eine Ausschüttung von Endzündungsmediatoren [Berk *et al.*, 1987, König *et al.*, 1996]. Rhamnolipid, das zweite Hämolytin, ist ein Glykolipid bestehend aus Rhamnose mit detergentenähnlichen Strukturen, die die Phospholipide der Lungenoberfläche auflösen und sie somit der Spaltung durch die Phospholipase C zugänglich machen [Liu, 1974]. Damit liegt die Vermutung nahe, dass beide Hämolytine, Rhamnolipid und Phospholipase C, synergistisch zusammenarbeiten, um Lipide und Lecithin aufzubrechen und das Eindringen in das Wirtsgewebe voranzutreiben [Van Delden, 2004].

Protease IV, eine Serinprotease, ist am Abbau des Komplementsystems, Fibrinogen, Plasmin und Plasminogen beteiligt [Engel *et al.*, 1998a] und spielt außerdem eine wichtige Rolle bei Corneainfektionen [Engel *et al.*, 1997 und 1998b].

Pyocyanin, ein blaues redoxaktives Phenazinpigment, das Lungengewebe aufgrund seiner Bildung von oxidativen Produkten zerstört [Ran *et al.*, 2003], induziert Apoptose und behindert sowohl die Bildung von Superoxiden in neutrophilen Zellen, als auch die Heranreifung von Lymphozyten [Usher *et al.*, 2002].

Pyoverdin und Pyochelin, zwei Siderophore aus *P. aeruginosa*, spielen eine Rolle bei der Eisenaufnahme und sind an der Regulation der Virulenzfaktoren beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass sie für die Entfaltung der Virulenz von *P. aeruginosa* im Tiermodell verantwortlich sind [Takase *et al.*, 2000; Lamont *et al.*, 2002].

Die Expression dieser Virulenzfaktoren wird zum großen Teil von dem Zelldichte abhängigen System *Quorum sensing* reguliert [Van Delden und Iglewski, 1998].

1.5 Entdeckung des *Quorum sensing* in *Vibrio fischeri*

Lange Zeit wurde angenommen, dass Bakterien als individuelle Organismen existieren, wachsen, sich vermehren und keinerlei Kommunikation untereinander betreiben, um sich wechselnden Umweltbedingungen anzupassen, wie dies bei höheren Eukaryonten zu beobachten ist. Zu einer Änderung dieser Ansicht kam es, nachdem bei *Vibrio fischeri*, ein marines Bakterium, das die Lichtorgane diverser Fische kolonisiert, entdeckt worden war, dass es die Lichtproduktion abhängig von der Bakteriendichte reguliert [Nealson *et al.*, 1970]. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Luziferaseaktivität nur bei hohen Zelldichten tätig ist. Außerdem wurde ein kleines Molekül, 3-oxo-C₆ Homoserinlacton (C₆-HSL) entdeckt, dessen Konzentration die Expression der Luziferase reguliert. Damit die Luziferase exprimiert wird, muss ein gewisser Schwellenwert überwunden werden. Liegt die Konzentration von C₆-HSL unterhalb des Schwellenwerts, kommt es zu keiner Luziferaseexpression. Somit wurden diese kleinen Moleküle als *Autoinducer* bezeichnet. Die Regulation dieser *Autoinducer* ist abhängig von LuxR und LuxI [Sitnikov *et al.*, 1995]. LuxR ist der Aktivator des Biolumineszenz Operons und LuxI ist die *Autoinducer* Synthase, die die Synthese der 3-oxo-C₆ Homoserinlactone steuert. Bindet C₆-HSL an LuxR, wird dieser aktiviert und kann das *lux* Operon transkribieren. Dabei wird gleichzeitig auch *luxI* abgelesen und somit eine positive Rückkopplung etabliert. Kurz nach Entdeckung wurden ähnliche Systeme in anderen Spezies gefunden. Dieser von der Zelldichte abhängige Mechanismus wurde fortan als *Quorum sensing* bezeichnet und stellt einen ersten Schritt Richtung Organisation einer Bakteriengesellschaft dar. Abbildung 1.1 zeigt das *Quorum sensing* in *V. fischeri* in Anlehnung an Pappas *et al.*, 2004.

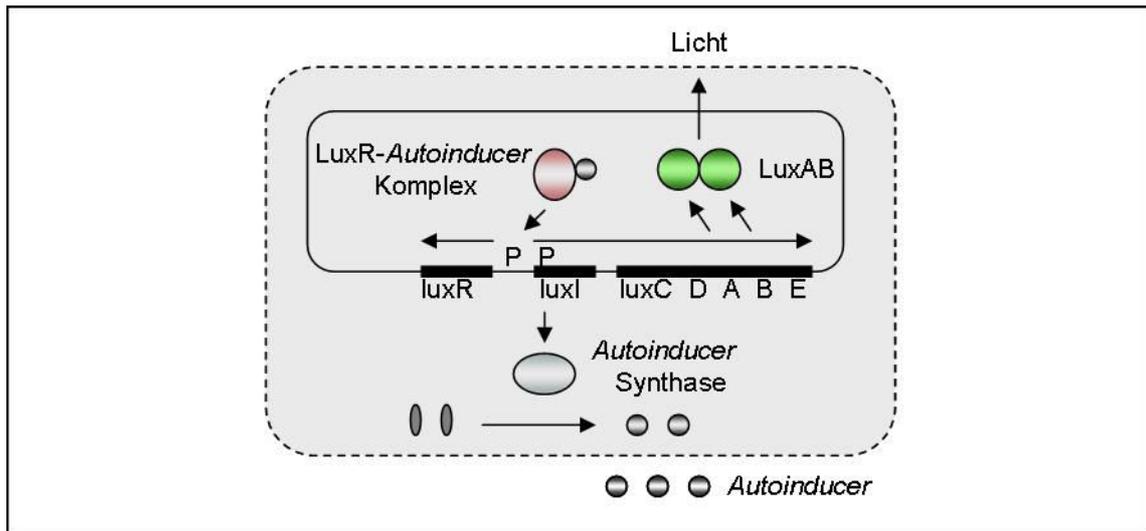


Abb.1.1: LuxR-LuxI *Quorum sensing* System in *V. fischeri*. Die Autoinducer Synthese, LuxI, synthetisiert 3-oxo-C₆ Homoserinlacton, das durch die Zellmembran diffundiert und sich innerhalb der Zelle nur akkumulieren kann, wenn eine hohe Bakteriendichte vorhanden ist. Nachdem ein gewisser Schwellenwert des *Autoinducers* erreicht worden ist, bindet dieser an das LuxR Protein. Der LuxR-Autoinducer Komplex aktiviert die Transkription des *luxICDABE* Operons was zu der Biolumineszenz führt [Pappas *et al.*, 2004].

1.6 *Quorum sensing* in *P. aeruginosa*

Das *Quorum sensing* System von *P. aeruginosa* ist mit am intensivsten untersucht worden. Untersuchungen der vergangenen Jahre zeigen, dass das *Quorum sensing* Netzwerk in *P. aeruginosa* die Expression von Virulenzfaktoren und der Biofilmbildung kontrolliert. Ist eine ausreichende Anzahl von Bakterien vorhanden, werden diese Virulenzgene aktiviert und verhindern die Vernichtung der Bakterien durch das Immunsystem des Menschen. Tabelle 1.1 zeigt eine Auflistung der vom *Quorum sensing* betroffenen Gene in *P. aeruginosa* [Quelle: <http://textbookofbacteriology.net>].

Tab.1.1: Vom *Quorum sensing* kontrollierte Funktionen in *P. aeruginosa*.Durch *Quorum sensing* in *P. aeruginosa* beeinflusste Funktionen

Acylhomoserinlacton Synthese
Adhesin (Lektin) Biosynthese
Biofilmbildung
Exotoxin A Biosynthese
Hydrogen Cyanid Synthese
Neuraminidase
Katalase- und Superoxiddismutasebildung (oxidative Stress)
Protease Biosynthese
Proteine des Typ III Sekretionssystems
Pyocyaninsynthese
PQS Synthese
Rhamnolipidsynthese
Swarming motility

1.6.1 *Quorum sensing* Systeme in *P. aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt drei bisher identifizierte *Quorum sensing* Systeme, das Las, Rhl und das *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) System. Jedes dieser *Quorum sensing* Systeme arbeitet mit seinen eigenen *Autoinducer* Molekülen [Pearson *et al.*, 1997]. Das Las System besteht aus einem Transkriptionsregulator LasR und der Homoserinlacton Synthase LasI, die N-3-oxo-Dodecanoyl-Homoserinlacton = 3-oxo-C₁₂-HSL (C₁₂-HSL) synthetisiert. Das Rhl System besteht aus RhlR als Transkriptionsregulator und der Homoserinlacton Synthase RhlI, die die Synthese von N-Butanoyl-Homoserinlacton = C₄-HSL steuert. Das C₄-HSL ist frei membrangängig, und für die Sekretion des C₁₂-HSL ist ein MexAB-OprM *Multidrug* Efflux Transporter notwendig [Pearson *et al.*, 1999]. Das Las System ist sowohl an der Regulation einer großen Anzahl von Virulenzfaktoren beteiligt, als auch von *lasI* selbst. Somit kommt es zu einer positiven Rückkopplung. Genau wie das Las System, hat das Rhl System Einfluss auf die Expression eines breiten Genspektrums. Einige der *Quorum sensing* regulierten Gene sind unter der Kontrolle von beiden Systemen, hingegen werden andere entweder vom Las oder vom Rhl System reguliert. Beide Systeme können allerdings nicht unabhängig voneinander arbeiten, denn das Las System reguliert im positiven Sinn das Rhl System [Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997], indem C₁₂-HSL mit C₄-HSL um die Bindung an RhlR konkurriert. Somit kann C₁₂-HSL als Antagonist des Rhl Systems wirken und das Las System ist dem Rhl System übergeordnet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RhlR eine Doppelfunktion besitzt, nämlich einerseits als Aktivator und andererseits als Repressor wirkt. Gezeigt wurde dies anhand des *rhlAB* Operons (polycistronische Genkassette), welches für die Rhamnosyltransferase kodiert. RhlR kann spezifisch an Sequenzen oberhalb des *rhlAB* Operons binden sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von C₄-HSL. In einem Fall wird die Transkription aktiviert und im anderen unterdrückt [Medina *et al.*, 2003].

Über das PQS System ist noch nicht so viel bekannt, nur dass das 2-Heptyl-3-Hydroxy-4-Quinolon als Signalmolekül agiert und sich strukturell von den bisher gefundenen *Autoinducer* Molekülen unterscheidet [Pesci *et al.*, 1999]. PQS wird allerdings erst spät in der stationären Wachstumsphase der Bakterien produziert, wobei zuerst ein PQS-Vorläufer 4-Hydroxy-2-Heptylquinolon (HHQ) gebildet wird. Dieser wird von den Zellen freigelassen und wieder aufgenommen, um anschließend durch PqsH, dessen Expression durch das Las System kontrolliert wird [Gallagher *et al.*, 2002; Deziel *et al.*, 2004], in PQS umgewandelt zu werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass PQS vom Zelldichte abhängigen *Quorum sensing* unabhängig agieren und sogar in der Abwesenheit von LasR gebildet werden kann [Diggle *et al.*, 2003]. Die Gene für die PQS Synthese werden positiv vom Las System und negativ vom Rhl System kontrolliert. Als Konsequenz ergibt sich daraus, dass die PQS Synthese vom Verhältnis von C₁₂-HSL zu C₄-HSL abhängig ist und eine Balance zwischen diesen beiden Systemen existiert [McGrath *et al.*, 2004].

Alle drei QS Systeme zeigen sich verantwortlich für die Produktion der Virulenzfaktoren, und der Las *Autoinducer* 3-oxo-C₁₂-HSL wird für die Biofilmbildung benötigt und besitzt zudem noch immunmodulierende Aktivität [De Kievit *et al.*, 2000].

1.6.2 Andere Regulatoren beteiligt am *Quorum sensing*

Außer den drei *Quorum sensing* Systemen gibt es weitere Faktoren, die an der Regulation des *Quorum sensing* beteiligt sind. Abbildung 1.2 zeigt eine Übersicht des *Quorum sensing* Netzwerks. Einer dieser Regulatoren ist GacA, ein Zwei-Komponenten-Regulator, der in fluoreszenten Pseudomonaden die Bildung von Virulenzfaktoren und die Antibiotikaproduktion kontrolliert. In *P. aeruginosa* ist er an der Regulation der C₄-HSL Produktion beteiligt. Ein Modell wurde entwickelt, das GacA oberhalb von LasR und RhlR ansiedelt [Reimann *et al.*, 1997]. Des Weiteren wurde ein ursprünglich an der Alginateproduktion beteiligter Transkriptionsregulator AlgR2 gefunden, der spezifisch an die *LasR* und *RhlR* Promotorregion bindet, um die *Quorum sensing* Kaskade negativ zu regulieren [Ledgham *et al.*, 2003a]. Ein weiterer Regulator ist der Repressor RsaL, der mit dem LasR-C₁₂-HSL Komplex um die Bindung an den *lasI* Promotor konkurriert. RsaL reguliert somit die *lasI* Transkription negativ [De Kievit *et al.*, 1999, Fagerlind *et al.*, 2003]. Die Polyphosphatkinase Ppk hat einen positiven Einfluss auf die C₁₂-HSL und C₄-HSL Synthese und somit auf die Virulenz von *P. aeruginosa* [Rashid *et al.*, 2000]. Für die zeitgerechte Expression des *Quorum sensing* Regulons zeigt sich MvaT verantwortlich, denn mit einem mutierten *mvaT* Gen kommt es zu einer verstärkten und vorzeitigen Expression *Quorum sensing* regulierter Gene [Diggle *et al.*, 2002]. Außerdem wird das *Quorum sensing* auch auf posttranskriptionaler Ebene kontrolliert, zum einen durch das RsmA/RsmZ System [Pessi *et al.*, 2001; Heurlier *et al.*, 2004] und zum anderen durch *dksA* [Jude *et al.*, 2003]. Des Weiteren ist das *Quorum sensing* Netzwerk mit dem cAMP Netzwerk verbunden [Wolfgang *et al.*, 2003]. Als Bindeglied fungiert Vfr, ein Transkriptionsregulator [Albus *et al.*, 1997], der Mitglied der cAMP Rezeptor Protein

Familie ist. Vfr hat somit eine wichtige Funktion in der Regulation von Exotoxin A und von Proteasen, zusätzlich besitzt er einen positiven Einfluss auf die Expression von über hundert Genen [Wolfgang *et al.*, 2003], inklusive denen des Typ III Sekretionssystems, welches toxische Effektorproteine direkt in die Wirtszelle sezerniert. Ein negativer Effekt auf das *Quorum sensing* wurde bei dem alternativen Sigmafaktor RpoN beobachtet [Heurlier *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2003]. Ein weiterer Sigmafaktor RpoS, der in der stationären Wachstumsphase aktiv ist, hat einen großen Einfluss auf die Regulation der *Quorum sensing* Gene, dem Typ III Sekretionssystems und den Anti-Wirt Effektorproteinen [Hogardt *et al.*, 2004; Schuster *et al.*, 2004]. Bioinformatische Analysen zeigten zudem, dass *P. aeruginosa* zwei weitere LuxR Homologe besitzt, nämlich QscR und VqsR. Das erste Homolog, QscR, dessen Synthese von GacA reguliert wird, moduliert den Zeitpunkt der *Quorum sensing* Genexpression, indem es die Transkription von *lasI* inhibiert [Chugani *et al.*, 2001]. Das zweite Homolog, VqsR, zeigt in *vqsR* defekten Mutanten, dass *Quorum sensing* positiv regulierte Gene, eine deutlich geringere Expression aufwiesen, und Gene, die durch *Quorum sensing* negativ reguliert werden, aktiviert wurden [Juhas *et al.*, 2004]. Des Weiteren wurde ein Virulenz Modulator gefunden, *vqsM* [Dong *et al.*; 2005], der durch die Regulation von *vqsR* das *Quorum sensing* von *P. aeruginosa* kontrolliert.

All diese Regulatorsysteme sorgen somit für eine weitere Komplexität des *Quorum sensing* Netzwerks (Abbildung 1.2). Das *Quorum sensing* reguliert die Expression vieler extrazelluläre Proteine, von Sekundärmetaboliten, von regulatorischen Proteinen und von hypothetischen Proteinen mit bis dato unbekannter Funktion [Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003].

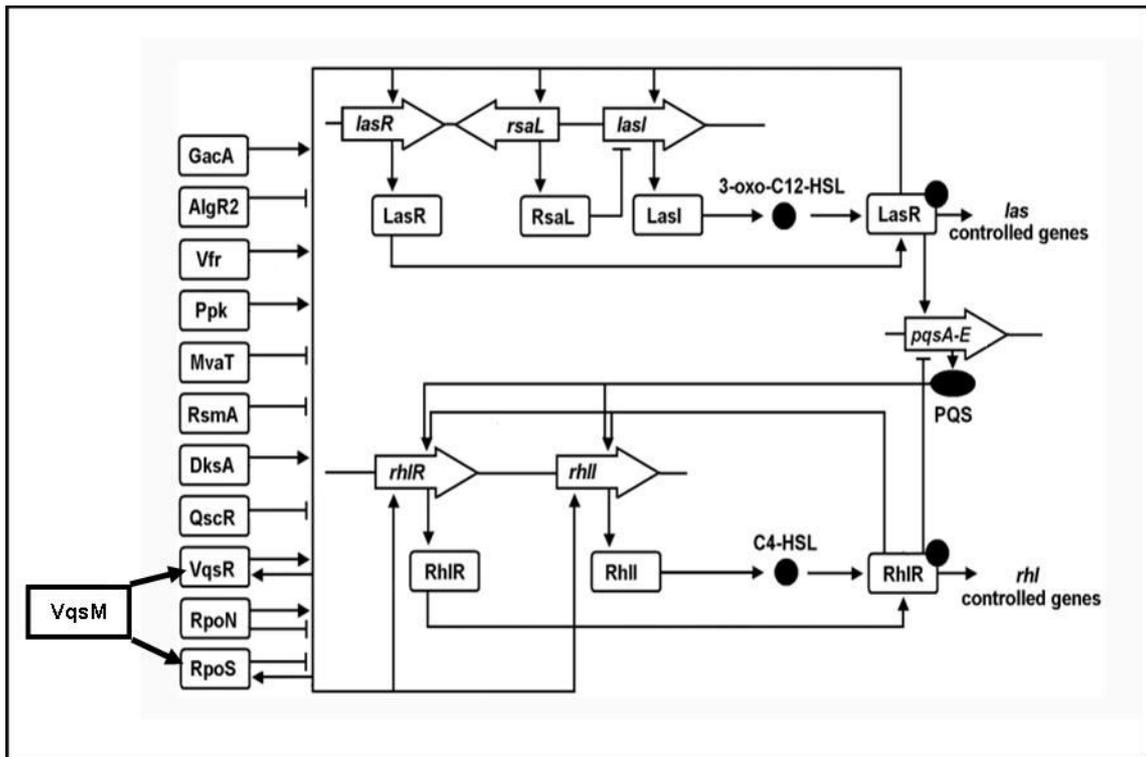


Abb.1.2: Quorum Sensing Netzwerk in *P. aeruginosa* [Juhas et al.; 2005 modifiziert]. Die zwei hierarchisch angeordneten Las und Rhl Systeme unterliegen einer Modulation durch eine große Anzahl von Regulatoren, die ein *Finetuning* des Quorum sensing bewirken. (→: Aktivierung; ---|: Inhibition).

1.7 Cosmid pLAFR3

Bei dem Cosmid pLAFR3 handelt es sich um ein *Broad Host Range* Plasmid mit einem breiten Wirtsspektrum. Es kann neben *Escherichia coli* in verschiedenen Bakterien-spezies, wie auch *P. aeruginosa* verwendet werden. Allerdings ist dieser mobilisierbare gramnegative Vektor nur mit einer geringen Kopienzahl in den Bakterien vorhanden. Das Cosmid pLAFR3 wurde aus dem Vorläufer pLAFR1 generiert. Dafür wurde in den mit *EcoRI* behandelten Vektor pLAFR1 das 454 bp große *HaeIII* Fragment aus pUC8 eingefügt [Staskawicz *et al.*, 1987]. Bekannt ist von pLAFR3 somit nur, dass es ungefähr 22 kb groß ist, eine *cos*-Sequenz trägt und ein Tetrazykligen als Resistenzmarker enthält. Das 454 bp große *HaeIII* Fragment aus dem Plasmidvektor pUC8, enthält eine Multiklonierungsstelle (*mcs*) und das *lacZ* Gen. Die *mcs* hat folgende Schnittstellen: *HindIII-PstI-SalI-BamHI-SmaI-EcoRI*. Für *PstI*, *SalI* und *SmaI* existieren zudem noch weitere Schnittstellen in pLAFR3 selbst.

Die Vektoren pLAFR1 sowie pLAFR3 gehören zu der α -Gruppe der P-1 Inkompatibilitäts Plasmide (IncP α). IncP α Plasmide sind stabil und autonom replizierende Elemente, die in einer Vielzahl gramnegativer Bakterien anzufinden sind [Thomas *et al.*, 1989] und den konjugativen Transfer in die verschiedenen Organismen selbst steuern können. Sie können somit in gramnegative und grampositive Bakterien als auch in einige Hefen transferiert werden [Heinemann *et al.*, 1989]. Ein Vertreter dieser IncP α Gruppe ist RK2, ein 60099 bp großes Plasmid, das erstmals aus dem kultivierten antibiotikaresistenten *Klebsiella aerogenes* Stamm, der aus einer Brandwunde isoliert wurde, gefunden worden ist [Ingram *et al.*, 1973; Pansegrau *et al.*, 1994]. Weitere Vertreter dieser IncP α Gruppe sind RP1, RP4 und R68.

Von dem RK2 Plasmid ausgehend wurden kleinere Vektoren konstruiert, wie pRK290, pLAFR und pFAJ1700. pRK290 mit einer Größe von 20 kb besitzt das RK2 Replicon und kann mit Hilfe eines Helferplasmids mobilisiert werden [Ditta *et al.*, 1980]. Generiert wurde pRK290 durch den partiellen Verdau von RK2 und dessen anschließender Religation. Das Entfernen nicht benötigter Sequenzen führte zu einer drastischen Reduktion der Plasmidgröße. Das Einbringen einer Lambda *cos site* in pRK290 führte zu dem Vektor pLAFR1 [Friedman *et al.*, 1982]. Dieser wurde in jüngster Vergangenheit annotiert, besitzt eine Größe von 20352 bp [Vanbleu *et al.*, 2004] und enthält die für die Replikation wichtigen Regionen *oriV* und *trfA*. Außerdem besitzt pLAFR1 Gene für das *Partitioning*, das für das gleichmäßige Verteilen der Plasmide auf die Tochterzellen verantwortlich ist und gleichzeitig den Vektor in den Wirtszellen stabilisiert. Durch die geringe Größe dieser Cosmide können lange DNA Fragmente in die Vektoren kloniert werden und dadurch eignen sie sich hervorragend für den Aufbau von Cosmidbanken [Dissertation Larbig, 2001].

1.8 Ziel der Arbeit

Innerhalb der letzten Jahre kam es zu einer Explosion von Informationen über die Genomorganisation vieler bakterieller Genome. Darunter befand sich auch das Humanpathogen *P. aeruginosa* [Stover *et al.*, 2000]. Um die Gesamtheit der komplexen regulatorischen Netzwerke und metabolischen Kreisläufe von *P. aeruginosa* zu verstehen, müssen die Funktion der einzelnen ORFs, die durch das Genomsequenzierungsprojekt entdeckt worden sind, aufgeklärt werden.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen *knock out* Mutanten einer *signature tagged mutagenesis* (STM) Bank des *P. aeruginosa* Stamms TB [Dissertation Wiehlmann, 2001] komplementiert und daran anschließend weiter charakterisiert werden. Beim Durchsuchen dieser Minitransposon *Tn5* Bank fielen einige Mutanten auf, die einen Defekt im *Quorum sensing* aufwiesen, der dadurch gekennzeichnet war, dass die Mutanten nicht mehr in der Lage waren, Proteasen und andere Virulenzfaktoren zu bilden. Diese Gene sollten zuerst komplementiert werden, um zu zeigen, dass sie kausal für den beobachteten Phänotyp verantwortlich waren, und es sollte zudem ihre Funktion näher charakterisiert werden. Damit dieses Ziel erreicht werden kann, wird folgende Vorgehensweise in Betracht gezogen.

Zuerst werden *in silico* Analysen von den zu untersuchenden ORFs durchgeführt, um Hinweise über deren Funktion zu bekommen. Des Weiteren müssen die Gene, die untersucht werden sollen, *in trans* in die Mutanten eingebracht werden. Da die Gene in *P. aeruginosa* als polycistronische Genkassetten angeordnet sind, muss für die Komplementierung die gesamte Genkassette kloniert werden, um oftmals vorhandene polare Effekte, die für die Änderung des Phänotyps verantwortlich sein könnten, zu minimieren. Zur Anwendung soll dabei sowohl die Cosmid-Bank pLAFR3 [Dissertation Larbig, 2001], als auch der *shuttle vector* pUCP20 kommen. Mittels triparentaler Konjugation bzw. Elektroporation werden die Vektoren in die *knock out* Mutanten gebracht, um den Phänotyp des Wildtyps zu generieren. Diese Komplementation *in trans* soll dafür sorgen, dass der beobachtete Phänotyp des Mutanten auch wirklich durch den Defekt des untersuchten Gens und nicht durch sekundäre Mutationen hervorgerufen wird.

Die Mutanten werden bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bildung von *Quorum sensing* Molekülen, sowie auf die Bildung bzw. Sekretion von diversen Virulenzfaktoren hin untersucht. Anschließend sollen einzelne Mutanten einer Transkriptomanalyse mit *P. aeruginosa* PAO1 GeneChips von Affymetrix unterzogen werden, um Hinweise auf die Funktion des Genprodukts zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus
Laborfuge I	Heraeus
Dri-Block DB3	Techne
Eppendorf-Centrifuge 5415C	Eppendorf
Eppendorf-Centrifuge 5417R	Eppendorf
Eppendorf-Thermostat 5320	Eppendorf
Hybridisierungssofen 400 HY	Bachofer
UV-Transilluminator	Bachofer
Minifold I Vakuum-Blotter	Schleicher und Schuell
Schüttelwasserbad Modell G76	New Brunswick Scientific
Schwenktisch HS250	Janke & Kukul Ika Labortechnik
Sorvall-Zentrifuge RC5B Plus	DuPont
Rotoren	GS3 (SLA3000)
	GSA3 (SLA1500)
	SS34
Spannungsquelle Power pac 300B	BioRad
pH-Meßgerät 761 Calimatic	Knick
Spektralphotometer U3000	Hitachi
Thermocycler	Landgraf
Tischzentrifuge Hettich universal	Hettich
Waagen	BP3100S Sartorius
	BP210S Sartorius

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Filterpapier GB003	Schleicher und Schuell
Pasteurpipetten	Sarstedt
Petrischalen 9 cm Ø	Sarstedt
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 10 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäß (50 ml, 15 ml)	Greiner
Reaktionsgefäß (0,5 ml bis 2 ml)	Sarstedt
Röntgenfilm X-Omat AR	Kodak

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

AB- Serum	Blutbank MHH
Anti-Digoxigenin AP	Boehringer
CDP-Star	Tropix
FailSafe™ PCR System	Epicentre®
Fast-Link™ DNA Ligation Kit	Epicentre®
Nylonmembran Hybond N+	Amersham
Oligonukleotide	MWG Biotech
Restriktionsendonukleasen	NEB
Größenstandards	100 bp Ladder NEB
	1 kb Ladder NEB
	2-Log Ladder NEB
Taq-Polymerase	InViTek

Alle anderen Laborchemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „pro analysis“ von den Firmen Invitrogen, Merck; Sigma und Riedel de Haen bezogen.

2.1.4 Lösungen und Puffer

Prozentangaben sind bei der Einwaage von Feststoffen in Masse/Volumen (w/v) angegeben, hingegen bei Zugabe flüssiger Substanzen in Volumen/Volumen (v/v).

LB-Medium

15 g	Caseinhydrolysat
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	NaCl
	Ad 1l H ₂ O, pH7.0

M9-Medium (10x)

68,14 g	Na ₂ HPO ₄ (0,48M)
30 g	KH ₂ PO ₄ (0,22M)
5 g	NaCl (85mM)
10 g	NH ₄ Cl (0,18M)

Vor Gebrauch Zugabe von einer Kohlenstoffquelle

0,8%	Casein (w/v)
15 mM	Na-Benzoesäure
	Ad 1l H ₂ O

ABC-Medium

A-10

20 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ (final 0,15M)
60 g	Na ₂ HPO ₄ (final 0,33M)
30 g	KH ₂ PO ₄ (final 0,22M)
30 g	NaCl (final 0,5M)
	Ad 1l ddH ₂ O

B1	20,33 g/100 ml	MgCl ₂ *6H ₂ O (final 2mM)
B2	7,35 g/100 ml	CaCl ₂ *2H ₂ O (final 0,1mM)
B3	0,27 g/100 ml	FeCl ₃ *6H ₂ O (final 0,003mM)

Stammlösungen wurden steril filtriert

C	1M	Citrat (final 10mM)
Zusammensetzung :	100 ml	A-10
	10 ml	C
	2,0 ml	Stammlösung B1
	0,2 ml	Stammlösung B2
	0,3 ml	Stammlösung B3
		Ad 1l ddH ₂ O
King A	20 g	Bacto-Pepton 140
	20 g	KOH
	5,5 ml	H ₂ SO ₄
	3,3 g	MgCl ₂ *6H ₂ O
	10 g	Glyzerin
		Ad 1l ddH ₂ O, pH7.2
King B	20 g	Bacto-Pepton 140
	1,6 g	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O
	3,0 g	MgSO ₄ *7H ₂ O
	10 g	Glyzerin
		Ad 1l ddH ₂ O, pH7.2
SOC		Firma Invitrogen

Zur Herstellung von festen Nährböden wurden 15g/l Agar zugesetzt. Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, 30 min bei 121°C autoklaviert.

TBE (10X)	0,9M	Tris
	0,9M	Borsäure
	0,02M	EDTA
		pH8.3-8.5
Agaroseauftragspuffer (6X)	0,5M	EDTA
	0,25%	Bromphenolblau
	0,25%	Xylencyanol
	15% (v/v)	Ficoll 400 pH8.5
Sephadex G50 Farbstoffmix	0,8%	Dextranblau
	0,5%	Phenolrot
<u>Puffer für Southern Blotting</u>		
Transferpuffer	0,4M	NaOH
	1,5M	NaCl
Blot-Waschpuffer	50mM	NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O
		Mit NaOH pH6.5 einstellen
Prähybridisierungspuffer	7%	SDS
	0,5M	NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O
	1mM	EDTA
	0,5%	Blockingreagenz (Boehringer)
		Zur besseren Löslichkeit auf 50-70°C erwärmen pH7.2
Hybridisierungswaschpuffer	1%	SDS
	40mM	NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O
	1mM	EDTA
		pH7.2

Puffer I	100mM	Tris
	150mM	NaCl
		pH7.5
Puffer II	Puffer I + 5%	Blockingreagenz (Boehringer)
Puffer III	100mM	Tris
	100mM	NaCl
	50mM	MgCl ₂
		pH9.5
Antikörperlösung		1:5000 Verdünnung
Antidigoxigenin AP <i>Fab</i> alkalische Phosphatase-Konjugat (Boehringer) in Puffer II		
Waschlösung	0,2M	NaOH
	0,1%	SDS

2.1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α

F⁻, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, (Str^R), *endA1*, *nupG*

Bei diesem Stamm handelt es sich um chemisch hoch kompetente Zellen (Firma Invitrogen) mit einer Transformationseffizienz von 1×10^9 cfu/ μ g DNA.

E. coli HB101

F⁻, *leuB6*, *proA2*, *recA13*, *thi-1*, *ara-14*, *lacY1*, *galK2*, *xyl-5*, *mtl-1*, *rpsL20*, *supE44*, *hdsS20*, (*r_B*⁻, *m_B*⁻)

Dieser Stamm trägt das Plasmid pRK2013, welches als Helferplasmid bei der triparentalen Konjugation eingesetzt wird.

Pseudomonas aeruginosa TB

Serotyp: 4, Pyocintyp: 1h, Phagenlyso-typie: F8, M4, PS2, PS24, PS31, 352, 46b/2, 1214, Col21, F7, F10, PS21, PS73

Ein Plasmid konnte nicht nachgewiesen werden.

P. aeruginosa PAO1

Er gilt als genetischer Referenzstamm und die überwiegend veröffentlichte Literatur bezieht sich auf ihn und seine klonalen Varianten.

2.1.6 Vektoren

pRK2013

Dieses Plasmid gehört zu den ColE Typen der RK2 Familie, welches die RK2 *tra* (Transfer) Funktion enthält. Diese Gene unterstützen die Konjugation eines mobilisierbaren Plasmids beziehungsweise Cosmids. Vektoren die den Transfer *origin* (RP4-*ori-T*) enthalten, können mit Hilfe dieses Plasmids mobilisiert werden, auch wenn der Donorstamm nicht selbst zur Konjugation fähig ist. Außerdem trägt pRK2013 eine Kanamycinresistenz. (Kan^R, Mob⁺, Tra⁺, ColE).

pLAFR3

Dieses Cosmid ist ein Abkömmling der RK2 Plasmid-Familie. Es ermöglicht die Aufnahme großer DNA-Fragmente und dient somit dem Aufbau von Cosmid-Banken. Eine Tetrazyklin-Resistenz dient als Selektionsmarker.

pUCP20

pUCP20 ist ein verbesserter Klonierungsvektor, der sowohl in *Escherichia coli* als auch in *P. aeruginosa* eingesetzt werden kann. Als Abkömmling von pUC18/19 enthält er das 1,9 kb *PstI* Fragment von pRO1614, welches dem Plasmid ein stabiles Verweilen in *Pseudomonas* ermöglicht. Abbildung 2.1 zeigt pUCP20, das eine Länge von 3893 bp (Basenpaaren) hat und eine Beta-lactamase besitzt. Diese vermittelt ihm eine Resistenz sowohl gegenüber Ampicillin als auch Carbenicillin.

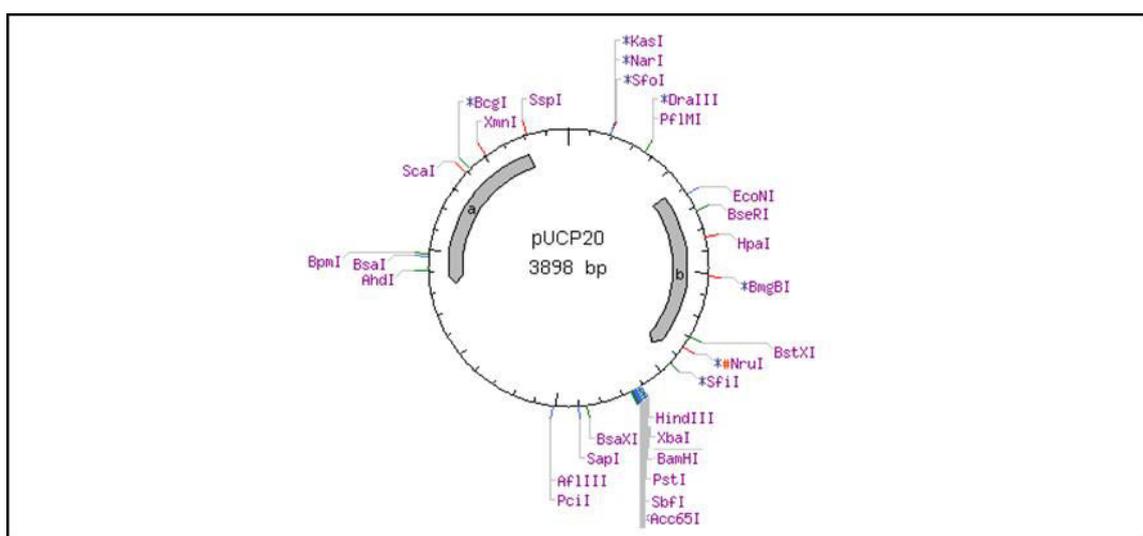


Abb.2.1: Restriktionskarte von pUCP20. Generiert mit dem Programm NEBcutter, das auf der Internetseite <http://tools.neb.com/NEBcutter2> frei zugänglich ist.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterien

Alle Bakterien wurden in Vollmedien nach Luria-Bertani (LB-Medium) herangezogen, Ausnahmen sind speziell gekennzeichnet. *P. aeruginosa* Stämme die das Plasmid pUCP20 tragen, wurden mit 200 µg/ml Carbenicillin, die pLAFR3 tragen, mit 200 µg/ml Tetrazyklin angezogen. Tragen *E. coli* Stämme pUCP20, wird dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte auf jeden Fall nach dem Autoklavieren, da die Hitze diese sonst zerstören würde.

2.2.2 Zelldichtebestimmungen

Mittels eines Photometers wurden die Zelldichten bei einer Wellenlänge von 578nm gemessen, der Zusammenhang von optischer Dichte und Zelldichte ist wie folgt:

<i>P. aeruginosa.</i>	0,6OD	≈ 1x10 ⁹ Zellen/ml
<i>E. coli</i>	1,0OD	≈ 0,8x10 ⁹ Zellen/ml

2.2.3 Glyzerinkulturen

Kulturen in Flüssigmedien und auf Agar sind nur begrenzt haltbar. Erstere mussten schon nach einer Wachstumszeit von 24 bis 48 Stunden in eine neue Kultur überimpft werden, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Kolonien auf Agarplatten waren versiegelt je nach Stamm bei 4°C für drei bis vier Wochen haltbar.

Glyzerinkulturen sind auch nach jahrelanger Lagerung bei -70°C noch zum Animpfen von Flüssigkulturen oder agarhaltigen Nährböden geeignet.

Eine 5 ml LB-Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von $OD_{578nm} = 0,5-0,8$ herangezogen. 1,2 ml der Bakteriensuspension wurden zu 600 µl sterilem (autoklavierten) 45%igen Glyzerin gegeben. Die Zellen wurden bei -70°C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden Produkte der Firma Qiagen verwendet. Mit dem *QIAprep Spin Miniprep* System wurden bis zu 10 µg DNA erhalten (aus 3 ml LB-Kulturen). Eine größere Ausbeute an DNA ließ sich mit *QIAGEN-tip 100* (100 ml Kulturvolumen) erzielen. Die Ausbeute an DNA betrug dann bis zu 100 µg.

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, wurde das *Qiaquick Gel Extraction Kit* verwendet und zur Aufreinigung von PCR-Produkten das *Qiaquick PCR Purification Kit*.

Die Durchführungen richteten sich nach den Protokollen des Herstellers.

Um Plasmid-DNA aus *P. aeruginosa* zu gewinnen, wurde eine Präparation ohne Verwendung der Qiagen Säulen vorgenommen.

Eine 4 ml über Nacht-Kultur wurde 2 min bei 13000xg zentrifugiert, das Pellet in 500 µl Puffer 1 (Qiagen) resuspendiert, mit 500 µl Puffer 2 (Qiagen) versetzt, leicht geschwenkt und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss kamen 700 µl Puffer 3 (Qiagen) zum Neutralisieren der Suspension dazu und diese wurde für 10 min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,7 Volumenanteil Isopropanol versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, daran anschließend 30 min bei 13000xg zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen, kurz getrocknet und in 15 µl EB-Puffer (Qiagen) aufgenommen.

2.3.2 Präparation genomischer DNA

Für die Herstellung von Southern Blots oder als Matrize in der PCR wurde genomische DNA benötigt.

Lysispuffer	40mM	Tris-Acetat
	20mM	Natriumacetat
	1mM	EDTA
	1%	SDS
		pH7.8

5 ml einer dicht gewachsenen Bakterienkultur (LB-Medium) wurden für 2 min bei 13000xg zentrifugiert, das Pellet in 900 µl Lysispuffer resuspendiert und mit 100 µl

5M NaCl vermischt. Durch Zentrifugation (60 min, 13000xg, 4°C) wurden Zelltrümmer und Proteine abgetrennt.

Der Überstand wurde mit 5 µl DNase freier RNase (10 mg/ml) zum Verdau der RNA versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA-Lösung wurde diese nacheinander mit jeweils gleichen Volumina von Phenol, Phenol/Chloroform (1:1), und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) kräftig gemischt und eine Phasentrennung durch Zentrifugation (15min, 13000xg) erlangt. Durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol wurde die DNA ausgefällt und zentrifugiert (20 min, 13000xg, Raumtemperatur). Das Pellet wurde mit eiskaltem 70%igen EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl EB-Puffer (Qiagen) aufgenommen.

2.3.3 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA

Mittels Elektrophorese wurden Moleküle unterschiedlicher Größe im elektrischen Feld getrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist dem Logarithmus ihres Molekulargewichts umgekehrt proportional. Je kleiner ein Molekül, desto weiter lief es im Gel. Die verwendete Konzentration (1-2%) eines Agarosegels war abhängig von der Länge der DNA-Fragmente. Je kleiner das Fragment, desto höher die Gelkonzentration. Als Pufferlösung wurde 1xTBE verwendet und die angelegte Feldstärke betrug 7-8,5 V/cm. Vor Beladung des Gels wurden die Proben mit 1/6 Volumen Auftragspuffer versetzt. Zur anschließenden Dokumentation wurde das Gel 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt, in Wasser entfärbt und auf einem UV-Transiluminator bei einer Wellenlänge von 312nm fotografiert. Zur Größenbestimmung wurden eine 100 bp Leiter, eine 1 kb Leiter der Firma NEB beziehungsweise ein λ-BstE Standard verwendet. Von den Standards von NEB wurden jeweils 0,5 µg verwendet und für den λ-BstE Standard 0,25 µg.

2.3.4 Quantifizierung von DNA

Um die Menge und Reinheit der DNA zu überprüfen, wurde Ihre Fähigkeit zur Absorption von UV-Licht gemessen. Die photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 260nm wurde in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm vorgenommen. Zweifach destilliertes Wasser wurde als Kontrolle verwendet. Bei einer Wellenlänge 280nm absorbieren Proteine das UV-Licht. Bei 320nm wurde der Nullwert gemessen. Das Verhältnis von OD_{260nm}/OD_{280nm} gab die Reinheit der DNA wider. Reine DNA hatte einen Wert von 1,8. Die optische Dichte von 1,0 bei 260nm Wellenlänge entsprach folgenden Mengen:

50 µg/ml dsDNA

33 µg/ml ssDNA

2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*) beruht auf der zyklischen Amplifikation von DNA-Sequenzen durch eine thermostabile Polymerase. Somit kommt es zu einer Anreicherung spezifischer DNA-Sequenzen aus geringen Mengen heterogenen Ausgangsmaterials.

Zur Herstellung von Sonden für die Southern-Hybridisierungen wurden spezifische Sequenzen aus *P. aeruginosa* mittels PCR amplifiziert. Ebenso kam die PCR zur Anwendung für die Generierung diverser polycistronischer Genkassetten (Operons), die für die spätere Klonierung benötigt wurden. Außerdem konnte mit Hilfe der PCR die pLAFR3 Komplementation überprüft werden.

PCR zur Generierung der Sonden/Überprüfung der pLAFR3 Revertanten

PCR Ansatz für die Sondenherstellung:

5 µl	10X Puffer (InViTek, Eurogentec)
5 µl	8mM dNTP (2mM je Nukleotid)
5 µl	5µM Oligonukleotid 1
5 µl	5µM Oligonukleotid 2
2,5 µl	DMSO
1,5 µl	50mM MgCl ₂
0,2 µl	Taq-DNA Polymerase (5 U/µl)
100-200 ng	Template DNA/Bakterienkolonie
	Ad 50 µl ddH ₂ O,
	Ansatz mit Mineralöl überschichten

Durch die Zugabe eines chaotropen Reagenz, wie zum Beispiel DMSO, wurde die Ausbildung von Fehlpaarungen, Merkmal eines hohen GC-Gehalts von *P. aeruginosa*, minimiert und die Hybridisierungstemperatur herabgesenkt. Die PCR Parameter für die Sondenherstellung sind in Tabelle 2.1 gezeigt.

Tab.2.1: PCR Parameter für die Sondenherstellung.

	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung	300 s	96°C	1
Hybridisierung	45 s	58°C	30
Verlängerung	45 s	72°C	
Denaturierung	60 s	94°C	
Hybridisierung	45 s	58°C	1
Verlängerung	90 s	72°C	
	∞	10°C	1

Die Produktgröße der Sonden lag zwischen 450 und 500 bp. Dieselbe Größenordnung wurde auch für die Produkte zur Überprüfung der pLAFR3 Revertanten erreicht.

Herstellung polycistronischer Genkassetten mit FailSafe™ PCR System (Epicentre®)

Das FailSafe™ PCR System eignete sich besonders gut zur Amplifizierung langer DNA-Sequenzen. Die Länge der polycistronischen Genkassetten variierte von 5800 bp bis 8900 bp.

PCR-Ansatz für die Amplifizierung von polycistronischen Genkassetten:

- 2,5 µl 5µM Oligonukleotid 1
- 2,5 µl 5µM Oligonukleotid 2
- 100-250 ng Genomische DNA
- 0,5 µl FailSafe PCR Enzyme Mix (1,25 U)
- Ad 12,5 µl ddH₂O
- 12,5 µl FailSafe PCR 2X PreMix
- Ansatz mit Mineralöl überschichten

Der PCR-Ansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert. Tabelle 2.2 zeigt die PCR Bedingungen für die Herstellung der polycistronischen Genkassetten.

Tab.2.2: PCR Parameter für die polycistronischen Genkassetten.

	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung	180 s	96°C	1
Hybridisierung	45 s	60°C	30
Verlängerung	390-600 s	72°C	
Denaturierung	60 s	94°C	
Hybridisierung	45 s	60°C	1
Verlängerung	450-650 s	72°C	1
	∞	10°C	

2.3.6 Oligonukleotid Konstruktion

Die Oligonukleotide mussten spezifisch an die Zielsequenzen in *P. aeruginosa* binden und sollten nicht selbstkomplementär sein, um die Bildung von *Hairpin* Strukturen zu vermeiden. Die Oligonukleotide endeten mit G-C Basen, welche eine stabile Hybridisierung unterstützten, und für die Konstruktion wurde die frei zugängliche Software *Primer 3* [http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi] aus dem Internet verwendet.

Für die Oligonukleotide der polycistronischen Genkassetten wurden unterschiedliche Restriktionsschnittstellen je Oligonukleotid eingebaut, damit die PCR-Produkte anschließend für die Klonierung verwendet werden konnten. Die Sequenzen der Oligonukleotide befinden sich im Anhang.

2.3.7 Restriktionspaltung von DNA

Zur Überprüfung der DNA (analytische Spaltung) oder zur Gewinnung der DNA für die Klonierung (präparative Spaltung) wurden Restriktionsspaltungen der DNA durchgeführt. Die Trennung von Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese, wobei auch gleichzeitig eine Längenabschätzung der Fragmente anhand eines Standards vorgenommen wurde.

Analytische Spaltung

1-2 µg DNA wurden mit 2 µl 10fach-Puffer und 10 U des Enzyms vermischt. Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und für eine Stunde bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl AAP wurde die Reaktion abgestoppt.

Präparative Spaltung

8-10 µg DNA wurden mit 10 bis 20 U der Restriktionsendonuklease für mehrere Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Je nach Enzym konnte eine Deaktivierung durch Hitze erfolgen, war dies nicht möglich, musste der Ansatz aufgereinigt werden.

2.3.8 Dephosphorylierung des Vektors

Behandelte man DNA mit Restriktionsendonukleasen, entstanden dabei zum einen 3'-Enden oder 5'-Enden als kompatible Überhänge. Bei 5'-Enden wurden die terminalen Phosphatgruppen durch Dephosphorylierung entfernt, damit eine Rezirkularisierung des Vektors unterbunden wurde. 1 Unit der *Antartic phosphatase* (NEB) setzte 1 µg DNA in 30 min bei 37°C um.

10 µg verdaute Vektor DNA wurde mit 1/10 Volumen 10X *Antartic phosphatase buffer*, 10 U *Antartic phosphatase* versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65°C für 5 min.

2.3.9 Ligation

Für Ligationen wurde das Fast-Link™ DNA Ligation Kit von der Firma Epicentre verwendet und die Durchführung richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers.

Ligationsansatz

1,5 µl	10X Fast-Link Ligation Buffer
1,5 µl	10mM ATP
150 ng	Vektor DNA (pUCP20)
300 ng	Insert DNA (polycistronische Genkassette)
1 µl	Fast-Link DNA Ligase
	Ad 15 µl ddH ₂ O

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert, und die Zugabe der Ligase erfolgte bei Raumtemperatur. Er verblieb dann 10 min bei Raumtemperatur, und das Enzym wurde 15 min bei 70°C inaktiviert.

Der Ligationsansatz konnte nun direkt für die Transformation in *E. coli* Zellen eingesetzt werden.

2.4 Southern Blot

Mit Hilfe des Southern Blots ließ sich gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran transferieren und dort mittels UV-Licht dauerhaft fixieren.

Nachdem die DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt worden war, wurde dieses in 0,4M NaOH gewässert, um die DNA alkalisch zu denaturieren. Das Gel wurde umgekehrt auf Filterpapier (Whatman) gelegt, dessen Enden in den Transferpuffer der Blotapparatur reichten. Die Nylonmembran wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit einigen Lagen Filterpapier bedeckt. Darüber wurden einige Lagen saugfähiges Papier gestapelt und mit einem leichten Gewicht, circa 400g, beschwert. Bei dem Kapillartransfer wurden die DNA Fragmente aus dem Gel auf die Membran gesogen. Der Transfer sollte für mindestens 16 h stattfinden. Die Membran wurde dann zweimal für 5 min in Neutralisationspuffer gewaschen, luftgetrocknet und jede Membranseite für 1 min mit UV-Licht behandelt, um die DNA kovalent an die Nylonmembran zu binden.

2.4.1 Dotblot

Für die triparentale Konjugation wurden die pLAFR3 Konstrukte benötigt, die die entsprechenden *ORFs* der zu komplementierenden Gene trugen. Diese mussten in der pLAFR3 Bank gesucht werden. Dafür wurden Dotblots hergestellt, auf die die hergestellte Sonden-DNA hybridisiert wurde.

Zur Herstellung wurden acht 96-Well Platten, die die sortierte pLAFR3 Bank als Glycerinkultur enthielten, verwendet. Von diesen acht Platten wurden mit Hilfe eines sogenannten Igels die Kulturen in frische 96-Well (96-Loch) Platten überimpft. Pro Loch wurden 100 µl LB Kulturvolumen benötigt, welches mit 40 µg/ml Tetrazyklin versetzt worden war. Die Platten wurden mit einem Deckel abgedeckt und über Nacht bei 37°C angezogen. Die Bakterien wurden denaturiert und direkt auf die Nylonmembran übertragen. Dazu wurden zu 100 µl über Nacht-Kultur 33 µl 1,2M NaOH gegeben und für 2 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten auf einem Eisbad abgekühlt und sofort mit 67 µl 3M NH₄Acetat neutralisiert. Die zuvor mit 1M NH₄Acetat angefeuchtete Nylonmembran wurde in eine Minifold-Dot-Vakuum-Blotapparatur (Schleicher & Schuell) eingespannt. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette konnte die DNA-haltige Lösung in die Apparatur gegeben werden, 200 µl pro Bohrung, und durch Anlegen eines leichten Vakuums auf die Nylonmembran gesaugt werden. Nach dem Trocknen wurde die Nylonmembran beidseitig für 1 min mit UV-Licht bestrahlt. Sie konnte nun für Hybridisierungen verwendet werden.

2.4.2 Herstellung der DIG markierten Sonden

DNA Fragmente, die auf eine Nylonmembran fixiert worden waren, konnten mit Hilfe von Radioaktivität oder eines chemolumineszenten Markers detektiert werden. Die *Random primed Labeling* Methode [Feinberg und Vogelstein, 1983] kam dabei zum Einsatz. Nach Denaturierung der DNA konnte die Klenow-Polymerase ausgehend von den Hexanukleotiden komplementäre DNA-Stränge synthetisieren. Die Hexanukleotide wurden aus DNase verdauter Kalbsthymus-DNA gewonnen und banden circa alle 100 b an die Matrizen DNA. Um die neusynthetisierte DNA zu markieren, wurde der Ansatz mit einer dNTP Mischung verdünnt, bei der 1/3 des dTTP durch ein DIG-dUTP ersetzt worden war. Somit erfolgte ungefähr alle 20 bis 25 Basen der Einbau eines markierten Nukleotids in den neu synthetisierten Strang.

Die DNA Fragmente aus der Sonden PCR wurden mittels *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt, dann für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Raumtemperatur abgekühlt.

Ansatz für *Random-Primed Labeling*

15 µl	Template DNA
2 µl	Hexanukleotid Mix 10X
2 µl	DIG-labeling Mix 10X
1 µl	5 U Klenow-Polymerase

Dieser Ansatz wurde mindestens 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit einer Säule aufgereinigt. Dabei handelte es sich um eine mit TE Puffer äquilibrierte Sephadex G-50 Säule, bei der die nicht inkorporierten DIG-dUTPs und Hexanukleotide abgetrennt wurden. Die Säule wurde trocken zentrifugiert (1000xg/45 s), der mit 20 µl Farbstoffmischung und 160 µl TE Puffer auf 200 µl aufgefüllte Markierungsansatz aufgetragen und für 45 s bei 1000xg zentrifugiert. Die so aufgereinigten Sonden konnten bei -20°C gelagert werden.

2.4.3 Hybridisierung der Sonden an die DNA-Blots

Durch Wahl der geeigneten Ionenstärke und Temperatur war es möglich, kurze markierte Einzelstränge unter Bildung von Doppelsträngen an die DNA Fragmente auf dem Blot zu binden.

Die Nylonmembran wurde zuerst für 2 bis 4 h mit Prähybridisierungspuffer bei 68°C in einem Rotationsofen inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Daran anschließend kam die Membran mit der Sondenlösung für 16 h in den 68°C heißen Rotationsofen. Für 100 cm² Membran wurden etwa 10 ml Lösung benötigt. Die Sondenlösung konnte aufgefangen, bei -20°C gelagert und wieder verwendet werden. Nach zweimaligem Waschen der Blots mit Hybridisierungswaschpuffer für

jeweils 20min bei 68°C im Rotationsofen waren sie bereit für die immunologische Detektion.

2.4.4 Immunologische Detektion der Digoxigenin markierten DNA

Mit Hilfe eines Anti-Digoxigenin-(F_{ab}-Fragment)-Alkalische Phosphatase-Konjugats erfolgte die Detektion der Blots. Dabei katalysierte die Alkalische Phosphatase eine Chemolumineszenzreaktion von CDP-Star™ (Tropix), die für mehrere Stunden anhielt und auf einem fotografischen Film nachgewiesen werden konnte.

Die vorbehandelte Membran äquilibrierte für 5 min in Puffer I, danach wurden unspezifische Bindungsstellen durch 30 min Inkubation in Puffer II abgesättigt. Danach erfolgte eine 30 bis 45 min Behandlung mit der Antikörperlösung (5 ml/100cm² Membran) und anschließend drei Waschgänge für jeweils 15 min mit Puffer I, bevor die Membran in frisch gefiltertem Puffer III äquilibriert werden konnte. CDP-Star wurde in Puffer III verdünnt (1:500) und die Membran für 5 bis 10 min in der Lösung inkubiert, ehe die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und ein fotografischer Film (Kodak X-OMAT AR) aufgelegt werden konnte. Nach 15 bis 30 min erreichte die Chemolumineszenz ihren Höhepunkt und gab für viele Stunden ein Signal konstanter Stärke.

2.4.5 Waschen hybridisierter Nylonmembranen

Um die Membranen mehrmals verwenden zu können, musste das DIG-dUTP in einem alkalischen Milieu zerstört werden, dabei kam es zur Freisetzung des Digoxigenins. Die an die Membran gebundene Sonde gab somit bei späteren Hybridisierungen kein Signal mehr.

Zwei 30 min Waschschrte in der Waschlösung mit kräftigem Schütteln sorgten dafür, dass das Digoxigenin von der Sonde abgespalten wurde. Für die Neutralisation wurden die Membranen mehrfach in frischem Wasser gelagert, kurz mit Blotwaschpuffer inkubiert, in Plastikfolie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.5 Komplementation

Eine Bank aus Oligonukleotid markierten mini-*Tn5* Transposon Mutanten des *P. aeruginosa* TB Stamms wurde nach einem modifizierten Protokoll generiert [Wiehlmann, 2001] und nach Mutanten hin untersucht, die einen Verlust des *Quorum sensing* aufwiesen. Einige dieser Mutanten mit einer abgeschwächten Virulenz wurden für weitergehende Experimente herangezogen. Diese ausgewählten Mutanten wurden *in trans* komplementiert, um den beobachteten Phänotyp der Transposon Insertionen, diesem Effekt zuordnen zu können. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass eventuelle sekundäre Ereignisse diese Veränderungen bewirkt haben könnten.

Es standen zwei Möglichkeiten der Komplementierung zur Auswahl. Zum einen die Verwendung einer bereits vorhandenen Cosmid-Bank [Doktorarbeit Larbig, 2001], die für die triparentale Konjugation verwendet werden konnte und zum anderen die Herstellung eines Konstrukts, welches in *P. aeruginosa* mit Hilfe der Elektroporation eingebracht werden sollte.

2.5.1 Triparentale Konjugation

Bei der triparentalen Konjugation, auch *Mating* genannt, wurde ein mobilisierbares Cosmid mit Hilfe eines Helferstammes, der die zur Konjugation benötigten Gene besaß, in einen Akzeptorstamm übertragen. Der Donorstamm selbst war nicht zur Konjugation fähig, und es war darauf zu achten, dass der Akzeptor über kein funktionierendes Restriktionssystem verfügt.

Donor-Stamm	DH5 α + pLAFR3 (pLAFR3-Bank)
Helfer-Stamm	HB101 + pRK2013
Akzeptor-Stamm	<i>P. aeruginosa</i> TB <i>knock out</i> -Stämme

P. aeruginosa TB wurde für 5 Tage bei 42°C auf 5% Blutagar (Columbia) angezogen und dabei täglich auf eine frische Platte überimpft. Durch diese Vorgehensweise wurde das Restriktionssystem von *P. aeruginosa* ausgeschaltet. Der Donor- als auch der Helfer-Stamm wurden einen Tag vor der Konjugation auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C angezogen. Tabelle 2.3 gibt die verwendeten Antibiotikakonzentrationen wider.

Tab.2.3: Antibiotikakonzentrationen der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Antibiotika Konzentration
HB101 + pRK2013	50 µg/ml Kanamycin
DH5α + pLAFR3	50 µl/ml Tetrazyklin

Die Bakterien wurden in 5 ml eiskaltem 10mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD_{578nm}: 1.0 OD eingestellt. Anschließend wurden die Suspensionen von Akzeptor, Donor und Helfer im Verhältnis 1:10:10 gemischt und je 400 µl auf LB-Agar-Platten ausplattiert.

Nach mindestens 24 h bei 37°C wurde die Hälfte des Bakterierasens in 5 ml eiskaltem 10mM MgSO₄ resuspendiert und 100 µl dieser Suspension auf M9-Minimalagar mit 200 µg/ml Tetrazyklinzusatz ausplattiert. Nach 36-48 h bei 37°C waren einzelne Kolonien sichtbar, diese wurden dann auf frische Platten überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nun konnten die Mutanten für weiterführende Experimente verwendet werden.

2.5.2 Kompetente Zellen und Transformation

Damit Bakterien DNA aus dem umgebenden Milieu aufnehmen, musste die Zellmembran kurzfristig an einigen Stellen instabil werden. Dies konnte durch eine chemische Kompetenz erreicht werden oder aber durch eine Elektrokompetenz.

Transformation von *E. coli* DH5α Zellen

Für die Transformation wurden One Shot ®TOP10 von der Firma Invitrogen benutzt.

20 µl der kompetenten Zellen wurden zur Transformation in einem Eisbad aufgetaut und mit etwa 2 µl Ligationsansatz versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 250 µl SOC-Medium verdünnt und für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Von dieser Bakterienlösung wurden 100 µl auf festem Selektivmedium ausplattiert. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.5.3 Elektroporation von *P. aeruginosa* TB

Durch Anlegen eines starken elektrischen Feldes entstanden kurzfristig Löcher in der Zellmembran der Bakterien, durch die dann die Plasmid-DNA eindringen konnte. Die Transformationseffizienz war bei diesem Verfahren höher als bei der chemischen Kompetenz.

Eine 5 ml über Nacht-Kultur wurde 2 min bei 13000xg zentrifugiert, das LB-Medium komplett entfernt und die Zellen in 1 ml ddH₂O resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 13000xg zentrifugiert, das Pellet erneut in 1 ml ddH₂O aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt sechs Mal durchgeführt, dabei war darauf zu achten, dass die Exopolysaccharidschicht, welche *P. aeruginosa* TB umgab, entfernt wurde. Die Zellen wurden zum Schluss in 500 µl ddH₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

100 µl Bakterienlösung wurden mit 1 µl Plasmid-DNA (200 ng) versetzt, in eine Elektroporationsküvette mit einem Plattenabstand von 1 mm (BIORAD) gegeben und bei einer Spannung von 1,25 KV, einem Widerstand von 400 Ω und einer Kapazität von 25 µF elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl SOC (Invitrogen) oder LB versetzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 3 h bei 37°C im Schüttelinkubator angezogen. Von dieser Lösung wurden 100 µl auf selektivem Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Inkubator herangezogen.

2.6 RNA Arbeitstechniken

Um die Degradation der RNA durch RNasen zu unterbinden, müssen spezielle Vorkehrungen getroffen werden. Wasser, das für RNA-Arbeiten verwendet wurde, musste zweifach destilliert und mit 0,05% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt werden. Die DEPC-Behandlung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur und anschließend wurde es für 30 min bei 121°C Wasserdampf und 1 bar Druck neutralisiert.

Ein Großteil der verwendeten Materialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße usw.) wurden in 0,05% (v/v) DEPC Wasser über Nacht inkubiert und anschließend für 30 min bei 121°C Wasserdampf und 1 bar Druck autoklaviert. Glaswaren und Metallständer konnten im 250°C Ofen für 5 h gebacken werden.

Gel-Kammern wurden zweimalig mit 3% (v/v) H₂O₂ für jeweils 5 min gewaschen und anschließend mit 70% EtOH gespült.

Die Arbeitsflächen wurden regelmäßig mit zweifach destilliertem Wasser und anschließend mit 70% EtOH abgewischt. Ein Wechsel der Arbeitsschutzhandschuhe sollte regelmäßig erfolgen.

RNA konnte in RNase freiem Wasser gelöst für bis zu 3 Monate bei -80°C gelagert werden. Während der Arbeiten verblieb die RNA ständig auf Eis, falls nötig, wurden die RNA Proben mit RNase-Inhibitoren versetzt.

Frische Plastikwaren (originalverpackt) konnten direkt für die RNA Arbeiten verwendet werden.

2.6.1 Anzucht von Bakterien für RNA Isolierungen aus LB Medium

Für RNA Präparationen wurden die Bakterien in 125 ml Capsenberg Kolben angezogen, um alle Bakterien gut belüften zu können.

30 ml Bakterienkultur wurde in 125 ml Capsenberg Kolben mit 300 rpm bei 37°C im Schüttelinkubator angezogen bis zu einer optischen Dichte von 4,5-5OD_{578nm}. Die Bakterien wurden sofort 3 min bei 5000xg und 4°C zentrifugiert, das Pellet in einem Eisbad für die daran anschließende RNA Isolierung bereit gehalten.

2.6.2 Anzucht von Bakterien für RNA Isolierungen aus ABC Minimal Medium

30 ml Bakterienkultur wurde in 125 ml Capsenberg Kolben mit 300 rpm bei 30°C im Schüttelinkubator angezogen bis zu einer optische Dichte von 1,0 OD_{578nm} . Anschließend wurden die Bakterien bei 5000xg für 3 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet für die RNA Isolierung auf einem Eisbad bereit gehalten.

2.6.3 Quantifizierung der RNA

Um die Menge und Reinheit der RNA zu überprüfen, wurde Ihre Fähigkeit zur Absorption von UV-Licht gemessen. Die photometrische Bestimmung der RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt. Das Verhältnis von OD_{260nm}/OD_{280nm} gab die Reinheit der RNA wider. Hochreine RNA, frei von Proteinen, hatte den Wert 2,0. Die optische Dichte bei 1,0 entsprach 40 µg/ml RNA.

2.6.4 Lösungen für RNA Arbeiten

RNA Lysispuffer	2%	SDS (w/v)
	3mM	Natrium-Acetat
	0,1%	EDTA (w/v)
		pH5.5
DNase Puffer 10X	0,5M	Natrium-Acetat
	0,1M	MgCl ₂ *6H ₂ O
	20mM	CaCl ₂ *2H ₂ O
		pH6.5
MOPS 10X	0,2M	MOPS
	0,1M	Natrium-Acetat
	10mM	EDTA
		pH7.0

RNA Ladepuffer	50% (v/v)	Glyzerin
	1mM	EDTA
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau pH6.0

SSC 20X	3M	NaCl
	0,3M	Natrium-Citrat pH7.0

2.6.5 Lösungen für die Northern Hybridisierung

Prähybridisierungspuffer	5X	SSC
	5X	Denhardt Lösung
	50% (v/v)	Formamid
	1% (w/v)	SDS
	100 µg/ ml	Heringssperma DNA

Bevor die Heringssperma DNA zur Lösung gegeben wurde, musste sie für 10 min bei 95°C denaturiert werden.

Denhardt Lösung	2% (v/v)	Ficoll 400
	2% (v/v)	Polyvinylpyrrolidin PVP-40
	2% (v/v)	BSA (Bovine serum albumin)

Lösung I	3M	NaCl
	0,1M	Tris
	0,3% (v/v)	Tween 20 pH8.0

Lösung II	0,5% (w/v)	Blocking Reagenz in Lösung I
-----------	------------	------------------------------

Lösung III	100mM	Tris
	100mM	NaCl
	50mM	MgCl ₂ pH9.5

2.6.6 RNA Isolierung

Das Protokoll zur Isolierung von Gesamt RNA basierte auf der Heißen-Phenol Methode [Oelmüller *et al.*, 1990; Tao *et al.*, 1999]. Alle Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt.

Das Bakterien Pellet aus 15 ml Kulturvolumen wurde sofort in 500 µl zweifach destilliertem Wasser resuspendiert und schnell in 7,5 ml 65°C heißen Lysispuffer (5 ml Phenol pH4.5/ 2,5 ml RNA Lysispuffer) lysiert und kräftig für 8 min geschüttelt. Anschließend verblieb der Ansatz für 5 min auf Eis. Das Zell-Lysat wurde 20 min bei 4°C mit 3500xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde ein zweites Mal mit Phenol ausgeschüttelt und für 15 min bei 4°C mit 3500xg zentrifugiert. Die RNA-haltige Phase wurde zweimal mit 3 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) aufgereinigt. Zum Schluss wurden die Nucleinsäuren über Nacht bei -20°C durch die Zugabe von 0,1 Volumenanteil 3M Natrium-Acetat und 2,5 Volumenanteile EtOH präzipitiert. Daran anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4°C von 30 min bei 3500xg. Das Pellet wurde in 70% EtOH gewaschen und in 175 µl DEPC behandeltem Wasser resuspendiert. Die darin noch enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 40 U DNase I und 20 U RNaseIn in DNase I Puffer in einem Volumen von 200 µl für 30 min bei 37°C denaturiert. Die RNA wurde mit *RNeasy* Säulen der Firma Qiagen laut Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Eine Quantifizierung der RNA erfolgte mittels UV Absorption bei 260nm. Der Zustand der RNA wurde in einem Formaldehyd Agarosegel überprüft.

2.6.7 Formaldehyd Agarosegel Elektrophorese

Um RNA in einem Agarosegel entsprechend ihrer Länge nach aufzutrennen, musste sie zuvor denaturiert und während der Elektrophorese in diesem Zustand gehalten werden. Dafür wurde sowohl das Agarosegel als auch der Laufpuffer mit Formaldehyd versetzt. Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurden kleine Gele verwendet mit einer Größe von 5x7 cm und 40 ml Volumen. Wie zuvor unter RNA Arbeitstechniken beschrieben, wurden die Arbeitsgeräte vorbereitet.

Es wurde ein 1,5% Agarosegel verwendet, in dem Agarose in 1X MOPS Puffer gelöst, auf 50°C abgekühlt und mit 2,4 ml Formaldehyd versetzt (0,7M Endkonzentration) worden ist.

Die RNA Proben wurden wie folgt zusammen pipettiert:

2 μ l	RNA
2 μ l	Formaldehyd 37% (w/v)
5 μ l	Formamid
2 μ l	RNA Ladepuffer
1 μ l	10X MOPS
0,5 μ l	Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Nun wurden die Proben 10 min bei 65°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel geladen. Als Marker wurden 0,5 μ g von dem 0,16-1,7kb RNA Standard der Firma Invitrogen verwendet. Eine Feldstärke von 5 V/cm Gel wurde für 1,5 h angelegt. Anschließend wurden die Gele unter dem UV-Transiluminator fotografiert.

2.6.8 Northern Blotting

RNA-DNA Hybridisierungen konnten verwendet werden, um die Intensität der Genexpression zu bestimmen. Dafür wurde Gesamt-RNA komplett denaturiert und in einem Agarosegel aufgetrennt auf eine Nylonmembran transferiert [Ausubel *et al.*, 1988]. Dafür kam wie beim Southern Blot die Kapillarblot Methode zur Anwendung.

Das Agarosegel wurde für 20 min in Wasser gewässert und anschließend für 20 min in 20X SSC äquilibriert. Dann wurde es auf Whatman Papier gelegt, welches in das Pufferreservoir hineinreichte, die Nylonmembran luftblasenfrei aufgelegt und mit einer weiteren Lage Whatman Papier abgedeckt. Darauf wurden noch einige Lagen saugfähiges Papier gelegt und dieser Aufbau mit einem Gewicht von ungefähr 400g beschwert. Der Kapillarblot erfolgte für 20 h bei Raumtemperatur. Als Transferpuffer wurde 20X SSC verwendet. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran für 1 min in 2X SSC gewaschen, um restliche Gelreste zu entfernen. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet und für 20 min bei 65°C gebacken und beidseitig für 1 min mit UV-Licht bestrahlt, damit die RNA irreversibel an die Membran gebunden wurde. Nun konnte sie für die Hybridisierung mit DNA Sonden verwendet werden.

2.6.9 RNA-DNA Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde eine digoxigeninmarkierte DNA Sonde verwendet, deren Herstellung in Kapitel 2.4.2 beschrieben worden ist.

Die Membran wurde so in ein 50 ml Reaktionsgefäß platziert, das die RNA gebundene Seite nach oben zeigte. 10 ml Prähybridisierungspuffer wurden in das Röhrchen gegeben und für 2 h bei 42°C im Rotationsofen inkubiert. Die DIG-markierte DNA Sonde wurde für 10 min bei 95°C in 10 ml Prähybridisierungspuffer denaturiert und anschließend auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens 16 h bei 42°C.

2.6.10 Immunologische Detektion der Digoxigenin markierten DNA

Mit Hilfe eines Anti-Digoxigenin-(F_{ab}-Fragment)-Alkalische Phosphatase-Konjugats erfolgte die Detektion der Blots. Dabei katalysiert die Alkalische Phosphatase eine Chemolumineszenzreaktion von CDP-Star™ (Tropix), die für mehrere Stunden anhält und auf einem fotografischen Film nachgewiesen werden konnte.

Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran 5 min mit 6X SSC + 3% (w/v) SDS bei Raumtemperatur, 20 min mit 2X SSC + 3% (w/v) SDS bei 42°C und für weitere 20 min mit 0,2X SSC + 3% (w/v) SDS bei 42°C gewaschen. Danach wurde die Membran in eine Glasschale überführt und 5 min mit Puffer I äquilibriert. Durch Inkubation mit 170 ml Puffer II für 30 min wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Danach erfolgte eine 30 bis 45 min Behandlung mit der Antikörperlösung (1:10000 Verdünnung) und anschließend drei Waschgänge für 15 min mit Puffer I, bevor die Membran in frisch gefilterten Puffer III äquilibriert werden konnte. Puffer III wurde mit CDP-Star versetzt (1:500) und die Membran für 5 bis 10 min darin inkubiert, ehe die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und ein fotografischer Film (Kodak X-OMAT AR) aufgelegt werden konnte. Nach 15 bis 30 min erreichte die Chemolumineszenz ihren Höhepunkt und gab für viele Stunden ein Signal konstanter Stärke.

2.7 Phänotypische Untersuchungen

Zur Untersuchung von Wildtyp, *knock out* Mutanten sowie komplementierte Mutanten standen eine Vielzahl an Bioassays zur Verfügung, die die Unterschiede im Phänotyp bezüglich des *Quorum sensing* aufzeigen konnten.

2.7.1 Messung der Proteaseaktivität auf Caseinagar

Hier konnte die Fähigkeit der Bakterien überprüft werden, ob sie in der Lage sind, Casein als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Hauptsächlich wird Casein durch LasB Protease, alkalische Protease und Protease IV degradiert [Cowell *et al.*, 2003]. Sie können Casein somit abbauen und dem Kohlenstoffwechsel des Bakteriums zugänglich machen. Sichtbar wird dies durch die Bildung eines weißen Rings um den Bakterienhof.

Die Bakterien wurden über Nacht in LB Flüssigmedium angezogen, bis sie die stationäre Phase erreicht hatten. Zur Anzucht des komplementierten Mutanten wurde dem Medium 200 µg/ml Tetrazyklin beziehungsweise Carbenicillin zugegeben. Aus dieser Kultur wurden 5 µl auf eine M9-Agarplatte mit 0,8% Casein aufgetropft. Die Platten wurden bei 37°C für mindestens 16 h inkubiert, bis die Bildung eines weißen Rings um die aufgetropften Bakterien sichtbar wurde. Als Positivkontrolle wurde auf jede Platte der Wildtyp mit aufgetropft.

2.7.2 Sekretion von Elastase

In diesem Experiment wurde die Elastaseaktivität der Bakterienüberstände in einem modifizierten Elastin Kongorot Assay gemessen [Rust *et al.*, 1994]. Sezernierte Elastase spaltete Kongorot vom kovalent gebundenen Elastin und setzte den Kongorot Farbstoff frei. Somit kam es zu einer Rotfärbung des Mediums, welche sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 495nm messen ließ.

Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C in 5 ml LB Medium angezogen, die optische Dichte bei 578nm bestimmt, 2 min mit 13000xg zentrifugiert und 100 bis 200 µl der Bakterienüberstände zu der Elastin Kongorot Lösung gegeben. Diese bestand aus 70 mg Elastin-Kongorot Konjugat, frisch in 7 ml 30mM Tris pH7.2 eingewogen. Im Schüttelinkubator wurden die Ansätze für 2 bis 6 h bei 37°C inkubiert.

Ungespaltene Elastin-Kongorot Konjugat wurde für 2 min bei Zentrifugation bei 13000xg abgetrennt (2 ml Reaktionsgefäß) und die Absorption des Überstandes bei 495nm gemessen.

2.7.3 Stapholytische Aktivität

Eine Möglichkeit, die LasA Proteaseaktivität von *P. aeruginosa* zu bestimmen, bestand darin, die Fähigkeit zur Lyse von *Staphylococcus aureus* zu messen [Kessler *et al.*, 1993].

Eine 30 ml über Nacht-Kultur von *S. aureus* SA113 (ATCC 35556) wurde 10 min aufgeköcht, 15 min bei 4000xg zentrifugiert, das Pellet in 10 mM NaH₂PO₄ (pH7.5) resuspendiert und auf eine OD_{600nm}: 0,8 eingestellt. 100 µl Überstand von einer *P. aeruginosa* über Nacht Kultur wurde zu 900 µl *S. aureus* Suspension gegeben. Nach bestimmten Zeitwerten erfolgte eine Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm. Messungen erfolgten nach 2, 6, 12, 14, 18, 22, 26, 30, 45, 60 min.

2.7.4 Sekretion von Hämolytinen

Die hämolytische Aktivität von *P. aeruginosa* unterliegt dem *Quorum sensing* und es werden zwei verschiedene Hämolytine sezerniert. Zum einen Phospholipase C und zum anderen Rhamnolipid. Diese dienen dazu Lipide und Lecithin abzubauen, damit *P. aeruginosa* das Wirtsgewebe befallen kann [Van Delden, 2004]. Mit Hilfe von Columbia Blutagarplatten ließ sich die hämolytische Aktivität der zu untersuchenden Bakterien einfach testen.

Zuerst wurden die Bakterien über Nacht in 5 ml LB bei 37°C angezogen und 5 µl dieser Kulturen auf die Blutplatten getropft. Diese wurden mindestens für 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Größe der transparenten Zone um den Bakterienhof dokumentiert. Sie gab die hämolytische Aktivität der Bakterien wider.

2.7.5 Kongorot Agar

Mit Hilfe des Kongorot Farbstoffs im Agar ließ sich ein unterschiedlicher Membranaufbau der Bakterien phänotypisch zeigen.

LB Agar wurde mit 40 µg/ml Kongorot versetzt und 5 µl einer über Nacht LB-Kultur aufgetropft. Die Platten werden bei 37°C für 24 h inkubiert und anschließend mit einer Digitalkamera dokumentiert.

2.7.6 Messung der Siderophorenproduktion

Viele Mikroorganismen produzieren und sezernieren Siderophore, deren Funktion darin liegt, hochaffin Fe^{3+} und Fe^{2+} zu komplexieren. *P. aeruginosa* bildet verschiedene Siderophore. Zwei davon sind Pyochelin und Pyoverdin, die eine Eigenfluoreszenz besitzen. Für die Untersuchung wurde ein Medium verwendet, welches Fe(III) als dreifachen Komplex mit einem Farbstoff Chrom Azurol S (CAS) und dem Detergenz Hexadecyl-Trimethylammonium Bromid (HDTMA) enthielt. Konnte ein starker Chelator das Eisen aus dem Komplex entfernen, veränderte sich dessen Farbe von blaugrün zu orange. Durch die Ausbildung eines orangefarbenen Bereichs um den Bakterienhof äußerte sich die Fähigkeit zur Siderophorenproduktion. Dieses Experiment war allerdings nicht in der Lage, zwischen Pyochelin und Pyoverdin zu diskriminieren.

CAS-Agar wurde laut Protokoll von Schwyn und Neilands mit ein paar Modifikationen hergestellt.

Für einen Liter CAS-Agar, löste man 60,5 mg CAS in 50 ml Wasser und mischte dieses mit 10 ml einer Lösung die 1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 10mM HCl enthielt. Die daraus resultierende blaue Farbstofflösung wurde autoklaviert, anschließend 72,9 mg HDTMA in 40 ml Wasser gelöst, steril filtriert und zu der noch warmen CAS-Lösung gegeben. Ein abgewandeltes M9-Medium (MM9) kam zur Verwendung, da der normale Phosphatpuffer eine starke Eisenbindung besaß und dieses somit dem Bakterium nicht mehr zur Verfügung stünde. 1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES) wurde stattdessen dem Medium zugesetzt. 100 ml MM9-Medium wurden mit 750 ml Wasser und 15 g Agar autoklaviert, 30,24 g PIPES und 12 g einer 50% (w/v) NaOH-Lösung zu dieser noch warmen Lösung hinzu gegeben, und anschließend mit der CAS-Lösung vermischt und in Petrischalen gegossen.

Von einer über Nacht-Kultur wurden 5µl auf den CAS-Agar aufgetropft und für 24 h bei 37°C inkubiert. Ein Nachweis der Siderophorenproduktion erfolgte visuell durch Fotografie der Platten mit einer Digitalkamera (Olympus).

2.7.7 Sekretion von Pyocyanin

Für den Nachweis der Pyocyanin-Produktion wurde ein spezielles Medium, King A Medium genannt [King *et al.*, 1954], verwendet. Dieses Medium unterstützte die Pyocyanin-Produktion und unterband gleichzeitig die Sekretion von Pyoverdin.

Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C in 5 ml LB Medium angezogen, die optische Dichte bei 578nm gemessen. Nun wurden alle zu untersuchenden Bakterien mit einer Start-OD_{578nm}: 0.05 in 30 ml King A Medium bei 37°C im Rotationsinkubator angezogen. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 1,5 ml Aliquots den Kulturen entnommen, die aktuelle Zelldichte bestimmt, für 2 min bei 13000xg zentrifugiert und die Absorption der Überstände bei 695nm gemessen.

Alternativ dazu wurden King A Agarplatten gegossen, von den LB über Nacht-Kulturen 5 µl aufgetropft und bei 37°C für 20 h inkubiert. Die Platten wurden auf dem UV-Transiluminator gestellt und mit einer Digitalkamera fotografiert, denn unter UV-Licht weisen Pyocyanine eine Eigenfluoreszenz auf.

2.7.8 Sekretion von Pyoverdin

Der Nachweis der Pyoverdin-Produktion erfolgte mit King B Medium, welches die Sekretion von Pyoverdin unterstützt und gleichzeitig die Sekretion von Pyocyanin hemmte.

Die Vorgehensweise war dieselbe wie bei dem Pyocyanin-Assay. Die Absorption der Überstände wurde ebenfalls bei 695nm gemessen.

Ebenso konnten Festmedien aus King B hergestellt werden. Die Bakterien wurden wie bei dem Pyocyanin-Assay auf die Platten getropft, über Nacht inkubiert und unter UV-Licht die Eigenfluoreszenz des Pyoverdins gemessen.

2.8 *P. aeruginosa* Microarrays (Affymetrix)

2.8.1 *P. aeruginosa* GeneChip



Abb.2.2: Affimetrix GeneChip [www.affymetrix.com].

Der GeneChip von Affymetrix (Abbildung 2.2) wurde von der *Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Inc.* (CFFTI, USA) entwickelt. Die Konstruktion dieses Chips basierte auf den Erkenntnissen des *P. aeruginosa* Genom Sequenzierungs Projekt [Stover *et al.*, 2000] finanziert von der CFFTI. Es waren Sonden für 5549 offene Leseraster (*open reading frame*: ORF) auf den GeneChip aufgetragen, sowie weitere Sonden für ein repräsentatives ribosomales Gen-Cluster (23S, 16S, 5S rRNA). Des Weiteren 18 tRNA Gene und eine Auswahl von 199 intergenischen Regionen, die eine Größe von 600 bp oder größer erreichten, basierend auf dem komplett sequenzierten und annotiertem Genom von *P. aeruginosa* PAO1. Ebenso waren 117 weitere Sonden von ORFs anderer *P. aeruginosa* Stämme auf dem GeneChip präsent. Insgesamt konnten somit 5986 verschiedene *P. aeruginosa* Sequenzen mit dem GeneChip analysiert werden. Als Kontrolle waren 14 Gene von *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* aufgebracht. Diese Sonden wurden nach den Sequenzen der GENE BANK Datenbank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] generiert. Detaillierte Informationen bezüglich der Konstruktion des GeneChip konnten von der NETAFFX Datenbank [<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>] erhalten werden.

Die Sequenzen auf dem GeneChip von Affymetrix wurden durch eine variierende Anzahl von 25-mer Oligonukleotide repräsentiert [Lipshutz *et al.*, 1999]. Jedes proteinkodierende Gen wurde durch 8 bis 13 solcher Oligonukleotide dargestellt, hingegen wurden die tRNA Gene mit 8 bis 16, und die intergenischen Regionen mit 13 bis 122 solcher Oligonukleotide abgedeckt.

Die Verwendung von spezieller fotolithografischer Technologie in Kombination mit Fest-Phasen kombinatorischer Chemie ermöglichte das Auftragen eines jeden Oligonukleotids als Sondenzelle *in situ* auf eine Glasoberfläche von 20x20µm [Fodor *et al.*, 1991]. Die Sondenzelle, die komplementär zu den zu analysierten Sequenzen (*perfect match oligo*) war, wurde direkt neben ein Oligonukleotid, welches eine nicht komplementäre Base an Position 13 besitzt (*mismatch oligo*) aufgebracht. Dieses *perfect match* und *mismatch oligo* fungierten als ein Sondenpaar (Abbildung 2.3). Die Signalintensität des *mismatch oligos* repräsentierte das Hintergrundsignal der spezifischen Hybridisierung. Hierfür wurde die Signalstärke des *mismatch oligos* von der des *perfect match oligos* in der anschließenden *in silico* Auswertung subtrahiert. Alle Sondenpaare auf dem GeneChip, die eine spezifische Sequenz repräsentierten, wurden als Sondenatz bezeichnet. Die Sondenpaare desselben Sondenatzes waren zufällig auf der 1,28x1,28cm großen Oberfläche des GeneChips verteilt, um die negativen Auswirkungen von nicht gleichförmigen Hybridisierungen und Färbungen oder mechanische Schäden wie Kratzer, die durch die Hybridisierung entstehen konnten, auszugleichen.

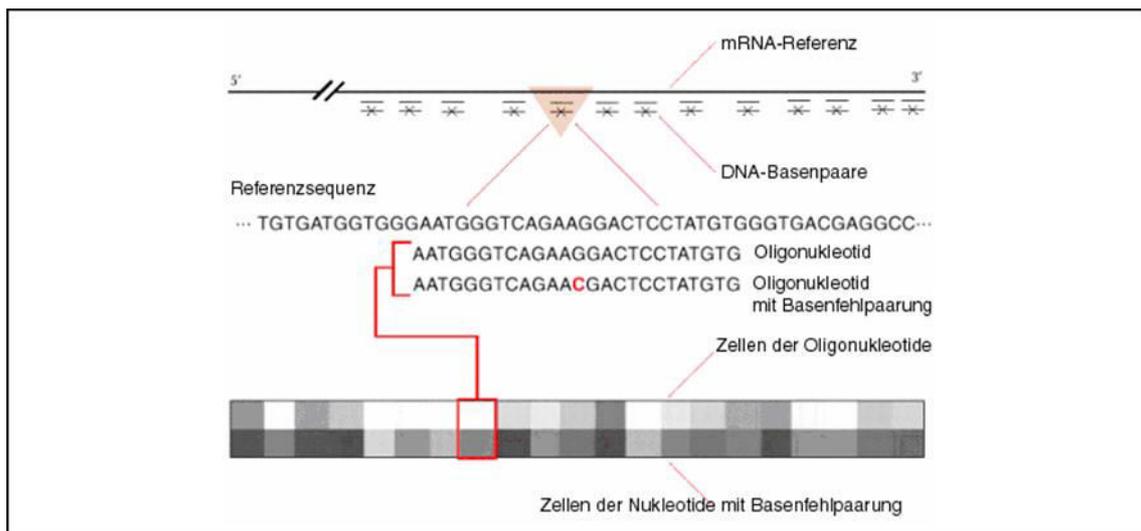


Abb.2.3: *Perfect match* und *mismatch* Oligonukleotide [www.affymetrix.com].

Ein einzelnes Gen auf dem GeneChip wird repräsentiert durch ein Sondenpaar von 25-mer Oligonukleotiden. Jedes Sondenpaar beinhaltet ein *perfect match oligo*, welches komplementär zu den analysierenden Sequenzen ist und ein *mismatch oligo*, welches an Position 13 einen Basenaustausch besitzt [Lipshutz *et al.*, 1999].

2.8.2 Herstellung und Fragmentation von cDNA

Für die Hybridisierung des GeneChips musste zuerst die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA Synthese, Fragmentierung und anschließende Markierung mit Biotin-ddUTP wurde laut Beschreibung des Herstellers Affymetrix hergestellt.

Reaktionsansatz für die RT-PCR:

10 µg RNA
750 ng *Random* Oligonukleotide (Invitrogen)
Ad 30 µl ddH₂O

Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 70°C, für weitere 10 min bei 25°C inkubiert und danach sofort auf 4°C heruntergekühlt. Nun erfolgte die Zugabe von 22,5 µl Reaktionsmix.

12 µl 5x 1st Buffer (Invitrogen)
6 µl 100mM DTT (Invitrogen)
3 µl 10mM dNTPs (Invitrogen)
1,5 µl SuperRasIn (Ambion)
22,5 µl Reaktionsmix

Zum Schluss wurde noch 7,5 µl SuperScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) dazu gegeben, und der Ansatz für 10 min bei 25°C inkubiert. Daran folgte eine weitere Inkubation für 60 min bei 37°C, 60 min bei 42°C, und anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 70°C inaktiviert.

Durch Zugabe von 20 µl 1M NaOH wurde die RNA für 30 min bei 65°C hydrolysiert, und zum Schluss wurde die Lösung mit der Zugabe von 20 µl 1M HCl neutralisiert.

Die cDNA wurde mit *Qiaquick Purification Kit* von Qiagen aufgereinigt und die cDNA Menge photometrisch bestimmt.

3 bis 5 µg cDNA wurden mit 0,5 U DNase/µg cDNA in 50 µl Volumen One Phor-All Puffer (OFA, Amersham Biotech) für 10 min bei 37°C inkubiert, und anschließend das Enzym bei 98°C für 10 min denaturiert. 5 µl des Ansatzes wurden auf einem 2%igen Agarosegel überprüft, um sicher zu gehen, dass ein Großteil der cDNA Fragmente in einem Bereich von 50 bis 200 bp lag.

2.8.3 RT-PCR

Um zu überprüfen, ob konstitutiv exprimierte Gene, wie z.B. *rpIU* oder *lecB* in ausreichender Kopienzahl vorlagen, wurde eine lineare RT-PCR durchgeführt. Die PCR wurde zum einen mit den Hexanukleotiden (*Random* Oligonukleotide) durchgeführt und zum anderen mit dem ersten spezifischen Oligonukleotid für *lecB*. Der Ansatz erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend erfolgte eine zweite PCR auf der zuvor erstellten cDNA. Dafür musste für den ersten Ansatz das spezifische Oligonukleotidpaar für *lecB* verwendet werden und für den zweiten Ansatz das zweite spezifische Oligonukleotid von *lecB*. Der Ansatz wurde wie folgt zusammen pipettiert.

5 µl	10X Puffer (InViTek, Eurogentec)
5 µl	8mM dNTP (2mM je Nukleotid)
5 µl	5µM <i>lecB</i> 1 oder Wasser
5 µl	5µM <i>lecB</i> 2
2,5 µl	DMSO
1,5 µl	50mM MgCl ₂
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA Polymerase (5 U/µl)
2 µl	cDNA
	Ad 50 µl ddH ₂ O,
	Ansatz mit Mineralöl überschichten

Tab.2.4: PCR-Parameter für die Amplifizierung der konstitutiv exprimierte Gene.

	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Denaturierung	300 s	96°C	1
Hybridisierung	45 s	62°C	30
Verlängerung	30 s	72°C	
Denaturierung	20 s	92°C	
Hybridisierung	45 s	62°C	1
Verlängerung	60 s	72°C	
	∞	10°C	1

Nach unterschiedlicher Zyklenanzahl wurden 8 µl aus dem PCR-Ansatz entnommen und mit 3 µl Auftragspuffer versetzt.

2.8.4 Markieren von fragmentierter cDNA mit Biotin

Von der Firma Enzo wurde das BioArray™ *Terminal Labelling Kit* mit Biotin-ddUTP verwendet, um die generierten cDNA Fragmente endständig zu markieren.

Dafür wurden 3 bis 5 µg fragmentierter cDNA mit 5x Reaktionspuffer, 10x CoCl₂ Lösung, 1 µl Biotin-ddUTP und 2 µl Terminale Deoxynukleotid Transferase in einem 60 µl Volumen angesetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5M EDTA gestoppt. Die so markierte cDNA war nun fertig für die Hybridisierung auf GeneChips von Affymetrix, konnte aber auch bei -20°C einige Zeit gelagert werden.

Die Hybridisierung erfolgte an der GBF in Braunschweig durch das Affymetrix Service Center.

2.8.5 GeneChip Analysen

Die GeneChips wurden mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software (MAS 5.0) in den HP Affymetrix GeneChip Scanner eingelesen. Alle notwendigen Informationen bezüglich des Experiments wurden in der .exp Datei abgespeichert. Der Scanner basierte auf einem konfokalen Mikroskop, welches einen Argon-Ionen Laser benutzte, um die Fluoreszenz von Phycoerythrin bei einer Wellenlänge von 570nm mit einer Auflösung von 3µm darzustellen. 64 Pixel wurden für jede einzelne Sondenzelle in einer .dat Datei abgelegt. Die korrespondierenden Gensequenzen für jede Sondenzelle wurden ihren entsprechenden Koordinaten und den Signalintensitäten auf dem GeneChip zugeordnet. Das MAS 5.0 Programm analysierte die .dat Dateien und berechnete einen *single intensity value* für jede einzelne Sondenzelle. Diese Daten wurden automatisch in einer .cel Datei abgelegt. Abbildung 2.4 zeigt die Chipanalyse.

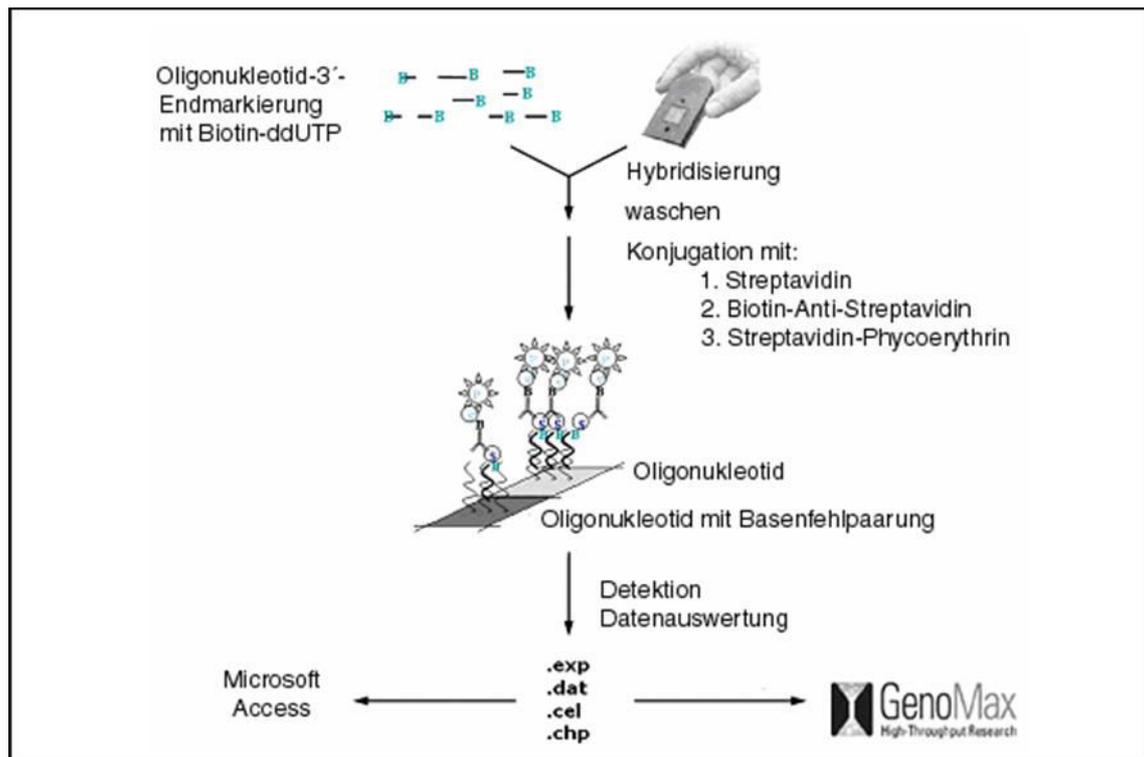


Abb.2.4: Prinzip der Hybridisierung und der Detektion des GeneChips [www.affymetrix.com]. Fragmentierte cDNA (50 bis 200 bp) wird endständig mit Biotin-ddUTP markiert und auf den GeneChip hybridisiert. Danach anschließend erfolgt die Detektion und Datenauswertung.

Für weitere Analysen musste eine Normalisierung und Hintergrundkorrektur vorgenommen werden, da es zu unspezifischen Bindungen des Streptavidin-Phycoerythrins auf dem GeneChip kommen konnte. Dafür wird das Spotmuster aller Sondensätze mit den Fluoreszenzbildern verknüpft und der Chip in unterschiedliche Abschnitte unterteilt. Jedes Hybridisierungssignal konnte somit dem spezifischen Feld und damit der aufgetragenen DNA zugeordnet werden. Die Spoterkennung erfolgte durch die Software automatisch, und die gemessenen Signale mussten vom Hintergrund bereinigt werden. Dafür wurde das Signal zu Hintergrundverhältnis so gewählt, dass der Hintergrund einen möglichst geringen Wert annahm. Lage und Größe der Spots der Sondenzellen waren festgelegt und somit unterscheidbar. Bei schwachen Signalen wurde eine Hintergrundkorrektur durchgeführt, das heißt von jedem Spot wurde der Hintergrund subtrahiert. Von den gemessenen Signalintensitäten der einzelnen Spots wurde von dem *perfect match* und dem *mismatch oligo* der Medianwert berechnet. Das abschließende Signal wurde erhalten, indem die Signaldifferenz beider Oligos verwendet wurde.

Um Unterschiede zwischen den einzelnen GeneChips auszugleichen, wurden die Ergebnisse einer linearisierten Normalisierung unterzogen. Diese mathematische Methode ermöglichte somit einen Vergleich verschiedener Experimente. Dafür wurden alle Signalintensitäten eines Chips miteinander multipliziert und ein *Scaling Factor* von 150 festgelegt.

Zudem zeigte ein Vierfach-Vergleich die Gene, die in allen vier Experimenten wirklich unterschiedlich exprimiert worden waren. Dafür wurde RNA von zwei unterschiedlichen Präparationen zusammengeführt und auf einen Chip hybridisiert. Somit kam es zu einer Verminderung von Fehlern, die sich auf eine unterschiedliche Durchführung der RNA Präparation zurückführen ließe. Die Experimente wurden doppelt ausgeführt, so dass für den Mutanten zwei GeneChips und für den Wildtyp ebenfalls zwei Chips verwendet wurden [Chen *et al.*, 2000; Bakay *et al.*, 2002]. Abbildung 2.5 zeigt das Prinzip des Vierfach-Vergleichs.

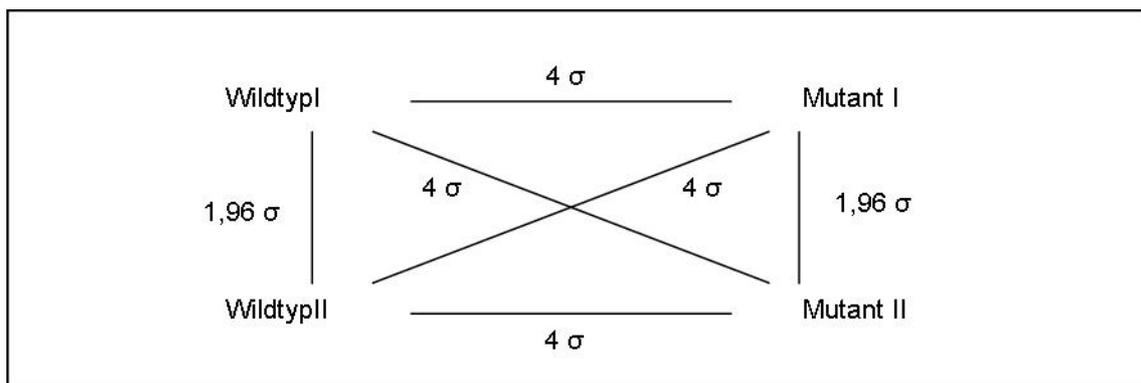


Abb.2.5: Prinzip des Vierfach-Vergleichs zur Ermittlung von unterschiedlich exprimierten Genen.

Zuerst wurden die Signalverhältnisse der einzelnen Gene der Wildtypen, sowie der Mutanten untereinander bestimmt. Dabei war zu prüfen, ob die Verteilung der Werte für die Signalverhältnisse einer Normalverteilung folgte, und innerhalb des 95% igen Konfidenzintervalls tatsächlich 95% der Werte lagen. Im Falle des PAO1 GeneChips von Affymetrix mit 5900 Einzelvergleichen ergab die Bonferroni-Korrektur, dass alle Werte, die außerhalb des 4σ Intervalls lagen, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% von der Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant differentiell exprimiert worden waren.

Damit die Ergebnisse ausgewertet werden konnten, wurden die Daten aller vier GeneChip Experimente in eine Excel Tabelle übertragen, und die Quotienten der Signalintensitäten von $\left(\frac{\text{Mutant I}}{\text{Mutant II}}\right)$ sowie von $\left(\frac{\text{Wildtyp I}}{\text{Wildtyp II}}\right)$ untereinander bestimmt. Ebenso wurden die Quotienten der Signalintensitäten von $\left(\frac{\text{Mutant I}}{\text{Wildtyp I}}\right)$, $\left(\frac{\text{Mutant I}}{\text{Wildtyp II}}\right)$, $\left(\frac{\text{Mutant II}}{\text{Wildtyp I}}\right)$ und $\left(\frac{\text{Mutant II}}{\text{Wildtyp II}}\right)$ ermittelt. Um feststellen zu können, ob das Hybridisierungssignal der Mutanten oder des Wildtyps untereinander stark streute, wurde ein Test auf eine randomisierte Normalverteilung durchgeführt. Die Lage und Form einer Normalverteilung wird durch zwei Kenngrößen (oder Parameter) bestimmt. Zum einen durch den Mittelwert (oder Erwartungswert) μ und die Standardabweichung σ . Die geometrische Bedeutung von μ und σ ist folgende: μ ist die Abszisse des Gipfelpunktes der Dichtefunktion. Die beiden symmetrisch zu μ gelegenen Wendepunkte der Dichtefunktion haben die Abszissen $\mu - \sigma$ und $\mu + \sigma$. Dabei beträgt der Flächenanteil an der Grundfläche zwischen

den beiden Wendepunkten 68,3%. Zum Beispiel liegen zwischen $x_1 = \mu - 2\sigma$ und $x_2 = \mu + 2\sigma$ 95,4% der Gesamtfläche.

Wurden die Quotienten der Hybridisierungssignale aufsteigend in einer Excel Tabelle geordnet, konnten sie gegen die Anzahl der auswertbaren Gene logarithmisch in einem Diagramm dargestellt werden. Abbildung 2.6 zeigt beispielhaft einen solchen Kurvenverlauf.

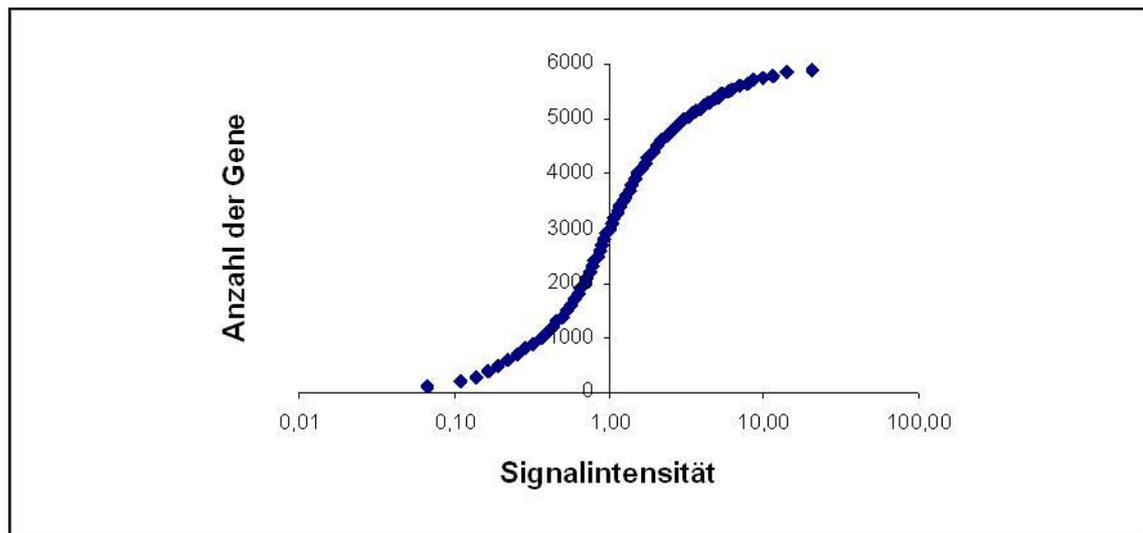


Abb.2.6: Hybridisierungsvergleich zweier Experimente.

Die Quotienten der Signalintensitäten wurden in einer Excel Tabelle aufsteigend sortiert, und diese logarithmisch zur Anzahl der Gene in einem Diagramm dargestellt.

Danach wurde getestet, ob es sich bei den Proben um vergleichbare Stichproben handelte, indem experimentell das Zufallsrauschen bestimmt worden war. Daran anschließend wurde für die 5900 Einzeluntersuchungen ein 99%iges Konfidenzintervall festgelegt. Zudem wurden die Ergebnisse der unterschiedlich exprimierten Gene mit einem Faktor von 4σ (für 5900 Gene in *P. aeruginosa*), mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur, auf die Zahl der zu testenden Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% korrigiert.

Mit der Bonferroni-Korrektur wurde folgendes bestimmt: um signifikant differentiell exprimierte Gene erkennen zu können ($P < 0,01$), musste ein Korrekturfaktor mit der

Formel: $P_{\text{Korrektur}} = \frac{P'}{\sqrt{N}}$ berechnen werden, wobei $P' = 0,01$ bedeutete und N für die Anzahl

der auswertbaren Gene des entsprechenden Stamms stand.

Durch die Anwendung dieser stringenten Korrektur, verblieben nur die Gene für die Auswertung, die in den Mutanten signifikant unterschiedlich exprimiert worden waren. Dabei stellten Werte $< 0,2$ beziehungsweise > 5 die unterschiedlich exprimierten Gene dar.

2.9 Annotation von pLAFR3

Für die Annotation von pLAFR3 wurde eine Maxiprep nach Kapitel 2.3.1 durchgeführt und 50 µg der DNA zum Sequenzieren an die Firma MWG Biotech geschickt. Für Sequenzvergleiche wurden öffentlich zugängliche Datenbanken mittels BLAST und BLAST-2-*Sequences* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] verwendet und eine Restriktionskarte wurde mit dem NEBcutter [<http://tools.neb.com/NEBcutter2>] erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Komplementation *Quorum sensing* defizienter *knock out* Mutanten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten *knock out* Mutanten einer *signature tagged mutagenesis* (STM) Bank des *Pseudomonas aeruginosa* Stamms TB komplementiert und daran anschließend weiter charakterisiert werden. Zur Auswahl kamen dabei Mutanten, die einen phänotypischen Defekt im *Quorum sensing* aufwiesen, zumindest was die Bildung von Proteasen auf einem speziellen Festmedium (Caseinagar) anbelangte. Um diesen Defekt einem speziellen Gen zuordnen zu können, wurden die Mutanten sequenziert und über Annotation mit dem Referenzstamm PAO1 der *Pseudomonas* Datenbank (<http://www.pseudomonas.com>) bestimmt. Durch Überprüfen ihrer möglichen Funktion *in silico*, zeigte sich, dass Gene durch die *Tn5* Transposon Insertion betroffen waren, deren Funktion bezüglich des *Quorum sensing* unklar war. Um zu zeigen, dass das ausgeschaltete Gen diesen Effekt bezüglich des *Quorum sensing* hervorrief, sollten Plasmide, welche die polycistronischen Genkassetten trugen, in die Mutanten eingebracht werden. Diese Komplementation *in trans* wurde gewählt, um eventuell vorhandene polare Effekte, die sich für die Änderung des Phänotyps der Mutanten verantwortlich zeigen konnten, zu minimieren. Auf eine Positivkontrolle konnte verzichtet werden, da in dieser Arbeitsgruppe für *rhIR* Mutanten gezeigt worden war, dass sie einen phänotypischen Defekt in Bezug des *Quorum sensing* auf dem speziellen Festmedium (Caseinagar) aufwiesen.

Für die Komplementation wurde sowohl die Cosmid-Bank pLAFR3, die zufällig verdaute DNA von *P. aeruginosa* SG17M enthielt (Dissertation Larbig, 2001], als auch der *shuttle vector* pUCP20, in den polycistronische Genkassetten aus *P. aeruginosa* TB kloniert worden waren, verwendet.

Des Weiteren sollte ein Mutant komplementiert werden, der eine verminderte Virulenz in PMN (Polymorphkernige neutrophile Granulozyten) aufwies. Die *in silico* Analyse zeigte hierbei, dass es sich um ein Gen in der Nähe des Flagellen-Clusters handelte und die phänotypische Analyse zeigte, dass die Flagellenbildung beeinträchtigt war. Ein Defekt dieses Mutanten bezüglich des *Quorum sensing* konnte nicht nachgewiesen werden.

3.1.1 Auflistung der zu untersuchenden Gene

Im Folgenden werden die einzelnen Gene beziehungsweise ORFs (*open reading frames*) des Referenzstamms PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>) beschrieben, basierend auf den Informationen der PAO1 Datenbank, wie sie zum Zeitpunkt der Arbeit annotiert waren. Daraus lies sich ihre Organisation, ob sie in polycistronischen Genkassetten oder als einzelnes Gen angeordnet waren, ablesen.

Legende

Sie gibt die verwendeten Farbkodierungen für die Funktion einzelner Gene wider. Abbildung 3.1 zeigt die Legende (Quelle: <http://www.pseudomonas.com>).

■ Adaptation, protection	■ Membrane proteins
■ Amino acid biosynthesis and metabolism	■ Motility & attachment
■ Antibiotic resistance and susceptibility	■ Nucleotide biosynthesis and metabolism
■ Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	■ Protein secretion/export apparatus
■ Carbon compound catabolism	■ Putative enzymes
■ Cell division	■ Related to phage, transposon, or plasmid
■ Cell wall / LPS / capsule	■ Secreted factors (toxins, enzymes, alginate)
■ Central intermediary metabolism	■ Transcription, RNA processing and degradation
■ Chaperones & heat shock proteins	■ Transcriptional regulators
■ Chemotaxis	■ Translation, post-translational modification, degradation
■ DNA replication, recombination, modification and repair	■ Transport of small molecules
■ Energy metabolism	■ Two-component regulatory systems
■ Fatty acid and phospholipid metabolism	
■ Hypothetical, unclassified, unknown	

Abb.3.1: Karte der Farblegende für die Funktionszuweisung der einzelnen Gene. Quelle siehe Text.

PA0447/0448

Die Sequenz von *gcdH* (1182 bp = 394 Aminosäuren (AS)) kodiert für eine Glutaryl-CoA Dehydrogenase, die in der Aminosäurebiosynthese, im Kohlenstoffkatabolismus, Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus tätig ist. PA0448 kodiert wahrscheinlich für einen Transkriptionsregulator (909 bp = 303AS). Abbildung 3.2 gibt die Organisation des Gens wider.

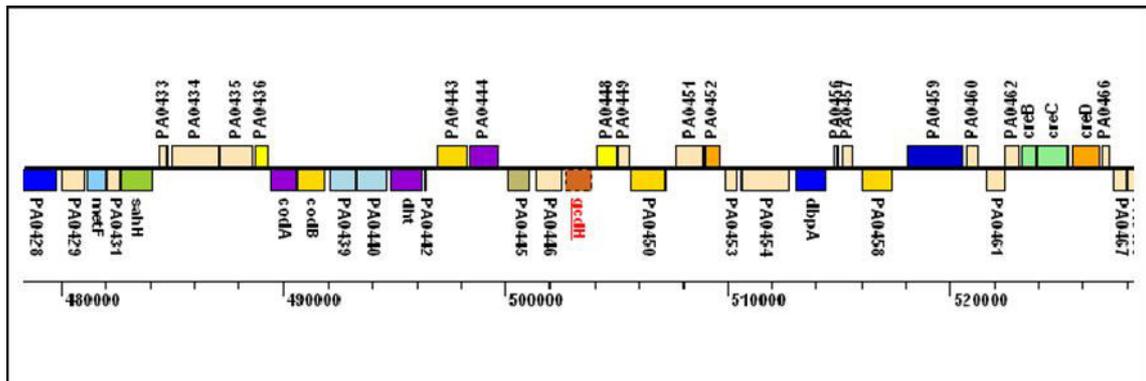


Abb.3.2: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomenregion (http://www.pseudomonas.com) für das Gen *gcdH*.

PA0928

Das Gen *lemA* hat eine Länge von 2778 bp = 926 AS und gehört zum Zwei-Komponenten-Regulatorsystem. Abbildung 3.3 zeigt seine Organisation auf dem Chromosom.

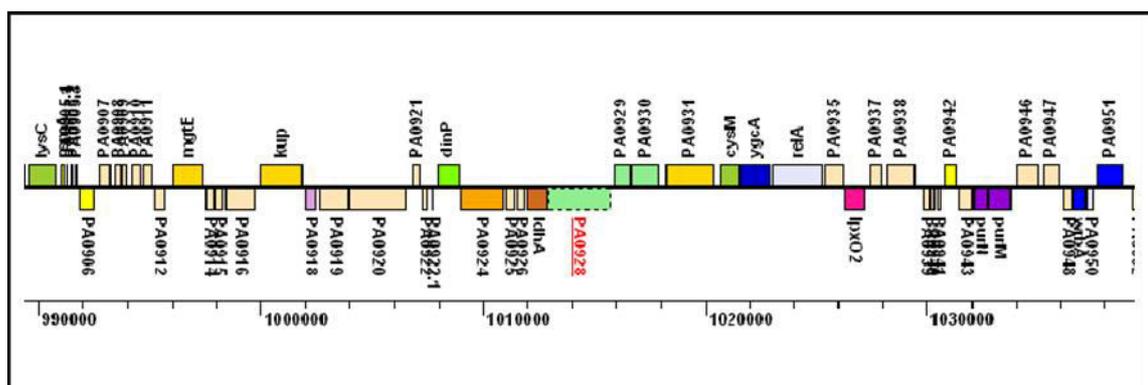


Abb.3.3: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomenregion (http://www.pseudomonas.com) für das Gen *lemA*.

PA1288

Hierbei handelt es sich vermutlich um ein Membranprotein, welches in der äußeren Membran verankert ist. Es hat eine Länge von 1275 bp = 425 AS und ist am Transport kleiner Moleküle beteiligt. Abbildung 3.4 zeigt die Organisation dieses Gens.

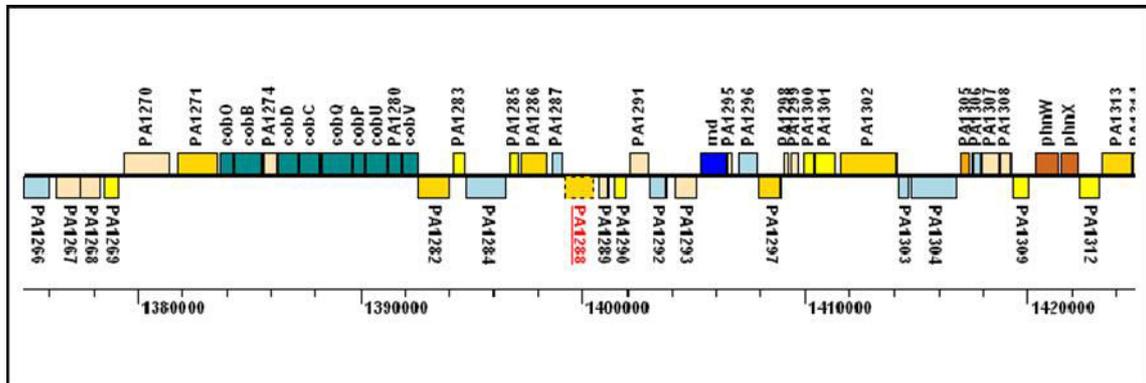


Abb.3.4: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomengegend (<http://www.pseudomonas.com>) für den ORF PA1288.

PA1436

Dieses Gen kodiert für einen möglichen RND Efflux-Transporter und ist in der inneren Membran verankert und für den Transport kleiner Moleküle verantwortlich. Seine Länge beträgt 3111 bp = 1037 AS. Wie aus Abbildung 3.5 zu sehen, ist es als Cluster mit PA1435 angeordnet.

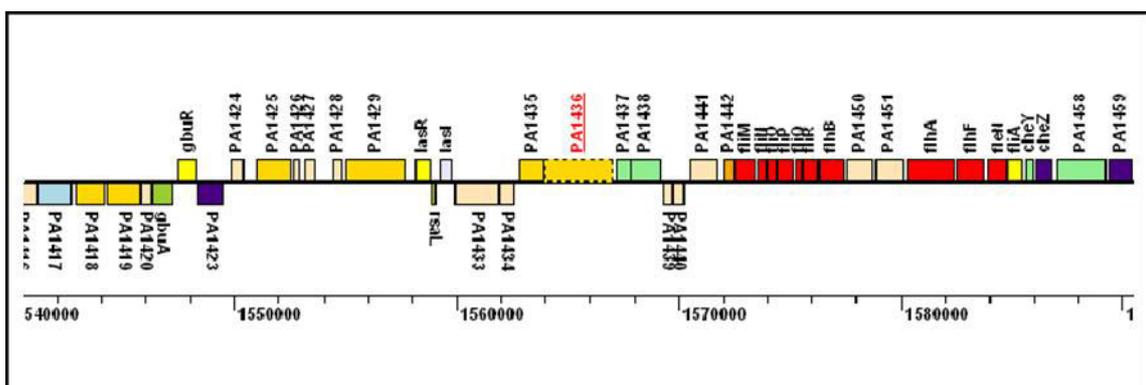


Abb.3.5: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomengegend (<http://www.pseudomonas.com>) für den ORF PA1436.

PA1441

Der ORF 1441 hat eine Länge von 1284 bp = 428 AS und besitzt eine 47%ige Homologie zum *fliK* Gen aus *Salmonella typhimurium*. Wie aus Abbildung 3.6 zu ersehen ist, liegt das Gen in der Nähe des Flagellen-Clusters.

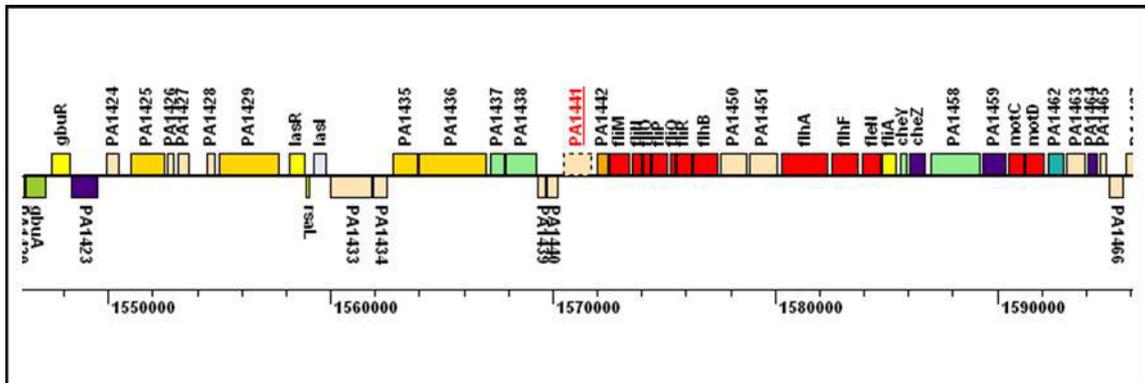


Abb.3.6: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomengegend (<http://www.pseudomonas.com>) für das Gen *fliK*.

PA2751/2752

Bei diesen zwei ORFs handelt es sich um konservierte hypothetische Proteine, die in der Membran verankert sind. PA2751 ist 900 bp = 300 AS lang und PA2752 ist 444 bp = 148AS lang. In Abbildung 3.7 ist ihre Organisation auf dem Chromosom dargestellt.

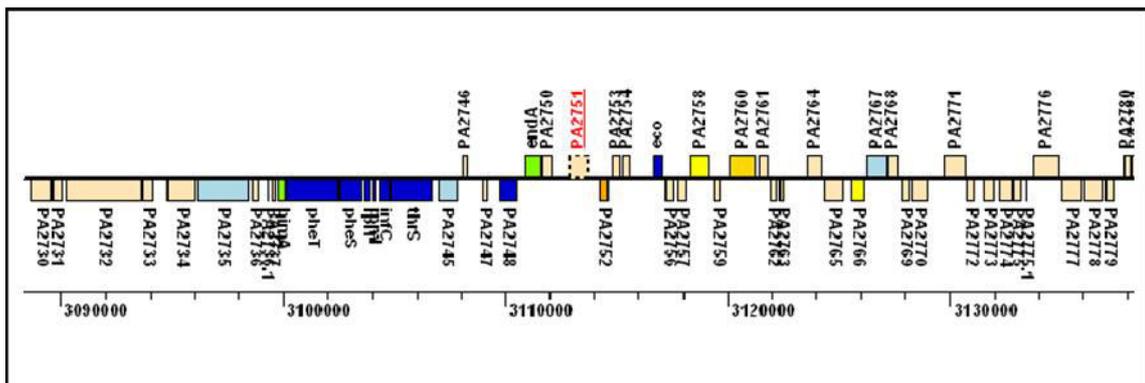


Abb.3.7: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomengegend (<http://www.pseudomonas.com>) für die ORFs PA2751 und PA2752.

PA4621

Dieses Gen kodiert vermutlich für eine Oxidoreduktase und hat eine Länge von 2832 bp = 944 AS. Seine Organisation ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

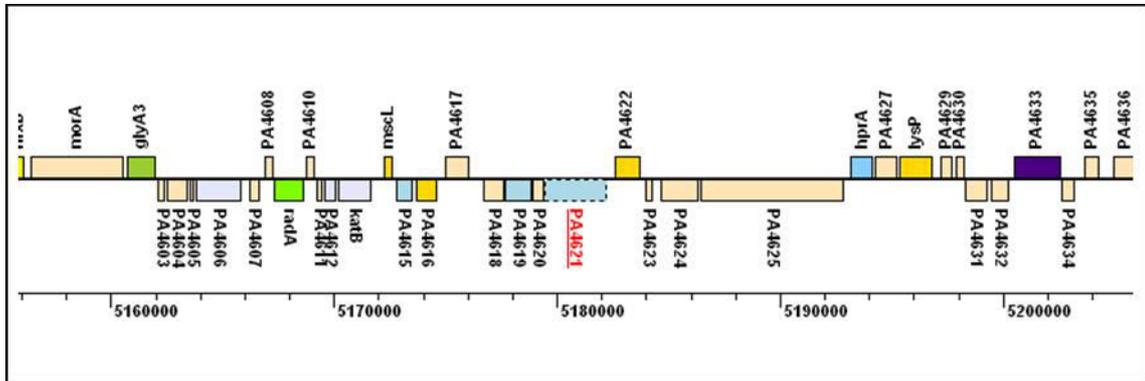


Abb.3.8: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomenregion (<http://www.pseudomonas.com>) für den ORF PA4621.

PA4785

Die Sequenz von diesem ORF (1278 bp = 426 AS) kodiert wahrscheinlich für eine Acyl-CoA Thiolase und seine Organisation ist in Abbildung 3.9 gezeigt.

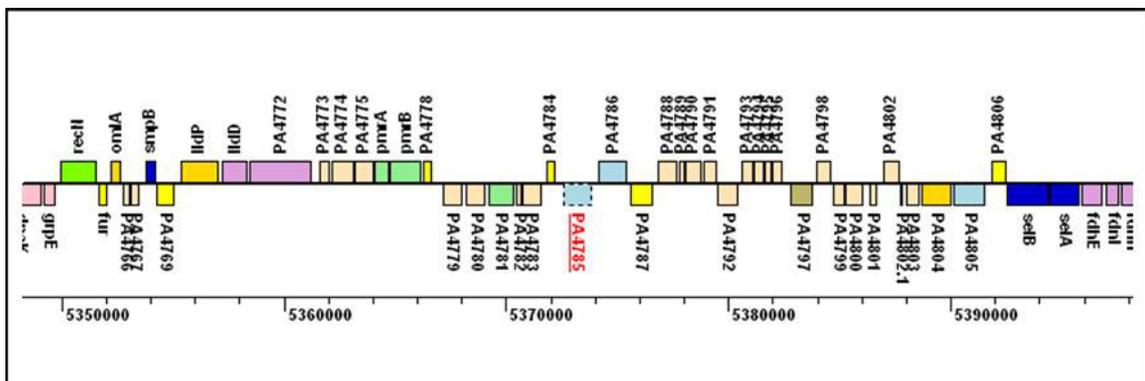


Abb.3.9: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomenregion (<http://www.pseudomonas.com>) für den ORF PA4785.

PA5349

Dieser ORF kodiert für eine mögliche Rubredoxin Reduktase, die am Kohlenstoffkatabolismus beteiligt ist. Mit einer Länge von 1155 bp = 385 AS liegt er in direkter Nähe zu den Rubredoxin ORFs. Seine Organisation auf dem *P. aeruginosa* Chromosom ist in Abbildung 3.10 gezeigt.

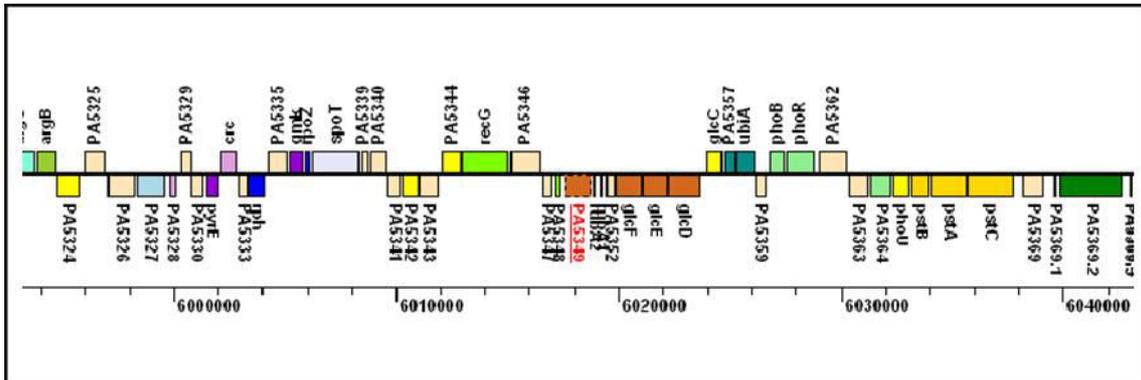


Abb.3.10: Karte der *P. aeruginosa* Chromosomengend (<http://www.pseudomonas.com>) für den ORF PA5349.

3.2 Triparentale Konjugation

Für die Komplementation der Gene *in trans* wurden Plasmide mit den spezifischen Sequenzen in die Mutanten gebracht (Kapitel 2.5.1). Zurückgegriffen wurde dafür auf eine bestehende Cosmid-Bank [Doktorarbeit Larbig; 2001], die aus dem Vektor pLAFR3 generiert worden war. Zufällig restriktionsverdaut DNA Fragmente von *P. aeruginosa* SG17M waren in den Vektor kloniert worden. Für die Komplementation musste zuerst die Cosmid-Bank nach den richtigen Klonen mit Sonden (Kapitel 2.4.1 und Folgende) durchsucht werden. Die gefundenen pLAFR3 Klone konnten für das Mating verwendet werden. *P. aeruginosa* besitzt eine große Anzahl an Resistenzen, und um sicherzustellen, dass die Selektion der komplementierten Mutanten auf tetrazyklinhaltigen Medium erfolgreich war, mussten alle eingesetzten Bakterienstämme auf Tetrazyklinresistenzen untersucht werden.

3.2.1 Antibiotika Test

Bevor die Komplementation durchgeführt werden konnte, wurden die verwendeten Bakterienstämme auf ihre Resistenzen bezüglich Tetrazyklin hin untersucht. Da die spätere Selektion auf M9-Minimalagar durchgeführt wurde, wurden *P. aeruginosa* und *E. coli* auf diesem Agar zuvor getestet. Wie die Ergebnisse in Tabelle 3.1 zeigen, tolerierte der Wildtyp (wt) eine Konzentration von bis zu 125 µg/ml Tetrazyklin. Um ein Überleben der Mutanten ohne Cosmid zu unterbinden, wurde für die spätere Selektion der komplementierten Mutanten 200 µg/ml Tetrazyklin in M9-Minimalagar eingesetzt. Außerdem konnte, wie in der Tabelle 3.1 zu sehen ist, das Cosmid den Bakterien (*E. coli*) eine Resistenz gegenüber Tetrazyklin von bis zu 360 µg/ml vermitteln.

Tab.3.1: Konzentrationsbestimmung von Tetrazyklin für die triparentale Konjugation.

Konzentration = µg/ml	500	360	250	180	125	90	62	45	31
<i>P. aeruginosa</i> TB (wt)	kein Wachstum				Wachstum				
<i>E. coli</i> DH5α	kein Wachstum								
<i>E. coli</i> 1047 + pLAFR3 Leervektor	kein Wachstum	Wachstum							

3.2.2 PCR für die Herstellung der Sonden

Da für das Durchsuchen der Cosmid-Bank Sonden benötigt wurden, mussten mittels einer PCR DNA-Fragmente von einer Länge bis zu 500 Basenpaaren (bp) generiert werden. Diese PCR-Produkte wurden in einem 1,2%igem Agarosegel analysiert (Abbildung 3.11).

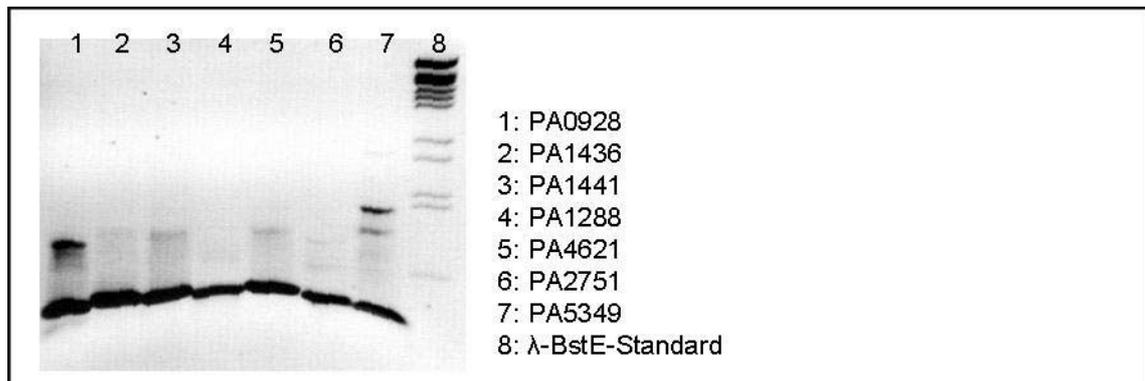


Abb.3.11: Produkte der PCR für die Generierung der Sonden zum Durchsuchen der pLAFR3-Bank.

Wie in der Abbildung 3.11 zu sehen ist, lagen die PCR-Produkte in der erwarteten Größe vor (Spur 1 bis 7). Als Vergleich wurde in Spur 8 ein λ -BstE Standard verwendet, dessen kleinste sichtbare Bande ungefähr 700 bp groß war. Für alle Gene, bis auf PA1288, gab es Nebenprodukte, was allerdings kein Problem darstellte, da die Hauptprodukte der PCR aus dem Gel isoliert und aufgereinigt worden waren. Anschließend wurden sie mit Digoxigenin markiert und für die Hybridisierung der Dotblots verwendet.

3.2.3 Durchsuchen der pLAFR3-Bank mit spezifischen Sonden

Nachdem die Sonden generiert worden waren, konnten sie für die Durchsuchung der pLAFR3-Bank verwendet werden. Die Signale der Sonden, welche auf dem Dotblot an ihre komplementären Sequenzen gebunden hatten, wurden auf einem Röntgenfilm abgelichtet. Abbildung 3.12 zeigt beispielhaft einen solchen Film für die Sonde des Gens PA4785. Gezeigt sind positive Klone, die auf dem Dotblot Nummer 5 von insgesamt 8 Stück gefunden worden waren. Und zwar die Klone an Position: 5A10, 5D4, 5E7 und 5F4.

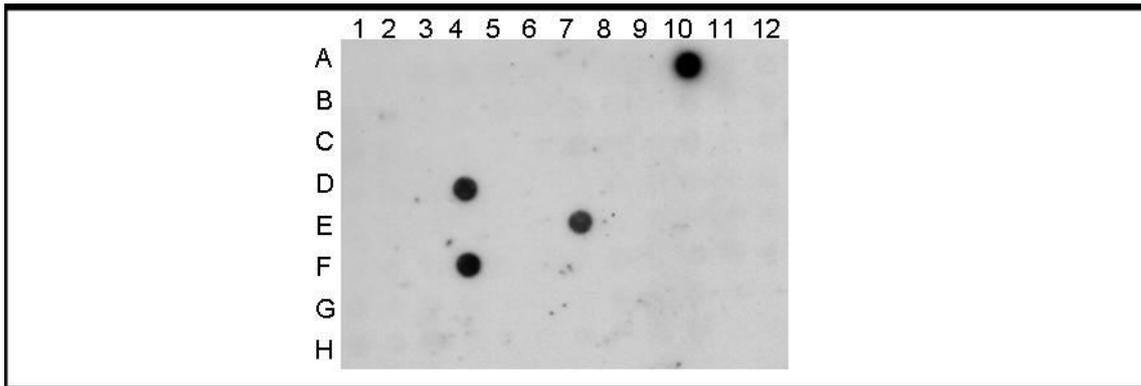


Abb.3.12: Exemplarische Darstellung eines Röntgenfilms nach Durchsuchen der pLAFR3-Bank zur Ermittlung positiver Klone, die das Gen PA4785 enthalten.

Da das Durchsuchen der Bank für alle zu untersuchenden Gene auf jeweils allen 8 Dotblots durchgeführt werden musste, sind die Ergebnisse zur Vereinfachung in einer Tabelle dargestellt. Die Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse für das Durchsuchen der pLAFR3 Bank. War mehr als ein positiver Klon pro Gen gefunden worden, wurde für die anschließende triparentale Konjugation eine zufällige Auswahl von maximal drei Klonen verwendet.

Tab.3.2: Übersicht der positiven Klone nach Durchsuchen der pLAFR3-Bank.

Gen	Positive Signale (Klone)
PA0447	2A10, 3F6, 5A10
PA0928	1H5, 4H5
PA1288	1B1, 6A8, 8A2
PA1436	1B9, 8C7
PA1441	3C6, 3D6, 4H5, 5A4
PA2751/2752	4B5
PA4621	5B10, 3E11, 4C6
PA4785	1F10, 5A10, 5D4, 5E7, 5F4, 6C1, 6A8,
PA5349	1C8, 1F7, 2D8, 4A9, 6H11, 7E8, 8H5

3.2.4 Überprüfen der komplementierten Mutanten nach der triparentalen Konjugation

Nachdem die positiven Klone in der pLAFR3-Bank gefunden worden waren, konnten sie für die triparentale Konjugation, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, verwendet werden. Die daraus resultierenden komplementierten Mutanten mussten auf ihre phänotypische Komplementation hin überprüft werden, und wurden dafür auf einem speziellen Festmedium (Caseinagar) untersucht. Dies war eine schnelle und einfache phänotypische Nachweismethode, die der Überprüfung der Fähigkeit zur Produktion von Proteasen diente. Leider zeigte kein einziger Klon, auch nach mehrmaligem Wiederholen der triparentalen Konjugation eine Reversion des Phänotyps.

Um nicht so viel Zeit zu verlieren, wurde überprüft, ob das Cosmid pLAFR3 von den Mutanten überhaupt aufgenommen worden war, und *E. coli* aus den Mischkulturen verschwunden war. Dafür wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Als Template für diese PCR wurde direkt eine kleine Bakterienmenge aus einer Kolonie genommen, ohne vorher die DNA aufgereinigt zu haben. Verwendet wurden Oligonukleotide für das Tetrazyklinresistenz-Gen Tet^R (pLAFR3), die ein PCR-Produkt gaben, sobald sich pLAFR3 in den Bakterien befand. Außerdem wurden Oligonukleotide für das *Tn5* Transposon (Mutant) eingesetzt, die ein PCR-Produkt für den Nachweis eines *knock out* Mutanten gaben. Des Weiteren kamen Oligonukleotide für den *OriV* aus *E. coli* zur Anwendung, die dem Nachweis von *E. coli* Verunreinigungen dienen sollte. Abbildungen 3.13 und 3.14 zeigen die analysierten PCR-Produkte auf 1%igen Agarosegelen.

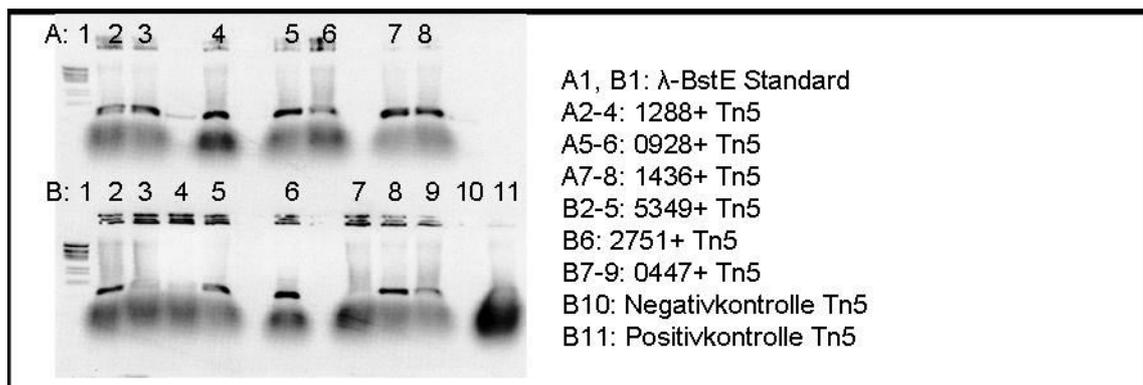


Abb.3.13: Produkte der Kolonie-PCR zur Überprüfung der komplementierten Mutanten. Dabei sollte mit einem Produkt für die *Tn5* Insertion nachgewiesen werden, dass es sich bei der Komplementation nach wie vor um die ursprünglichen *knock out* Mutanten handelte. Als Positivkontrolle wurde ein *knock out* Mutant verwendet und die Negativkontrolle beinhaltete kein *Template*.

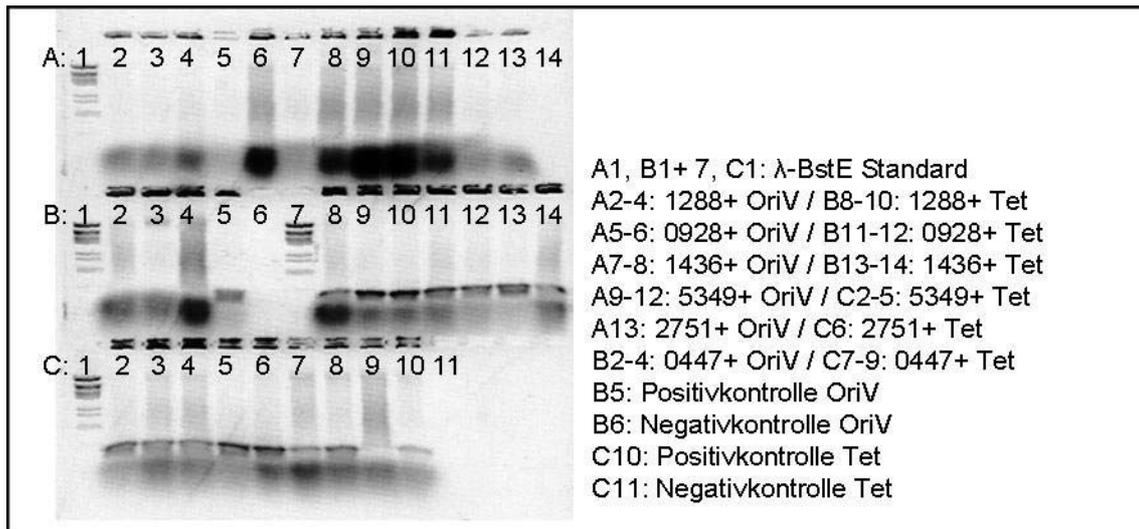


Abb.3.14: Produkte der Kolonie-PCR zur Überprüfung von *E. coli* Kontaminationen aus den Donorstämmen, und der Anwesenheit von pLAFR3-Konstrukten in den komplementierten Mutanten. Dafür wurden zum einen Oligonukleotide für die Region um den *OriV* aus *E. coli* verwendet, und zum anderen Oligonukleotide für die Tetrazyklinkassette aus pLAFR3. Als Positivkontrollen kamen für den *OriV* eine Mischkultur aus Helfer- und Donorstamm zur Einsatz, und für die Tetrazyklinkontrolle (Tet) der Donorstamm, welcher die pLAFR3-Konstrukte beinhaltet. Für die Negativkontrollen wurde kein *Template* eingesetzt.

Wie auf den Gelen zu sehen ist, gab es keine Produkte für den *OriV* (Spuren A2 bis A13, B2 bis B4 aus Abb.3.14) und dies bedeutete, dass sich keinerlei Kontaminationen mit *E. coli* in allen untersuchten komplementierten Mutanten befanden. Ebenso zeigte die Negativkontrolle (Spur B6 aus Abb.3.14), kein *Template* (Bakterium) zugegeben, dass die PCR-Ansätze frei von Verunreinigungen waren, die falschpositive Signale hätten hervorrufen können. Für die Positivkontrolle (Spur B5 aus Abb.3.14) wurde eine Mischung aus Helfer (*E. coli* HB101 + pRK2013) und Donor (*E. coli* DH5 α + pLAFR3) verwendet. Sie gab ein positives Signal, das hieß, dass die PCR unter den gewählten Bedingungen ein Produkt ergeben konnte. Die Produkte für die Tetrazyklin Kasette zeigten für alle komplementierten Mutanten (Spuren B8 bis B14, C2 bis C8 aus Abb.3.14), bis auf einen Klon von 0447+ (Spur C9 aus Abb.3.14), die Anwesenheit des Cosmids pLAFR3. Als Positivkontrolle (Spur C10 aus Abb.3.14) wurde der Helferstamm verwendet. Die Negativkontrolle (Spur C11 aus Abb.3.14) beinhaltet kein *Template*, somit kam es auch in diesem Fall zu keinen falschpositiven Ergebnissen.

Ebenso gab es Produkte für das *Tn5* Transposon (Spuren A2 bis A8, B2 bis B9 aus Abb.3.13), und somit konnte gezeigt werden, dass es sich um Mutanten handelte, die das Cosmid pLAFR3 trugen. Als Positivkontrolle (Spur B11 aus Abb.3.13) wurde ein *knock out* Mutant verwendet, und für die Negativkontrolle (Spur B10 aus Abb.3.13) kam kein *Template* zum Einsatz. Die Positivkontrolle bestätigte in diesem Fall, ebenso wie in den vorherigen PCRs auch, dass die PCR unter den gewählten Bedingungen ein Produkt ergeben konnte. Des Weiteren bewies die Negativkontrolle, dass es sich bei den Produkten um keine falschpositiven Ergebnisse handeln konnte.

Als Standard wurde in allen Analysen der λ -BstE Marker verwendet (Spuren A1 und B1 aus Abb. 3.13, Spuren A1, B1 und B7, sowie C1 aus Abb.3.14), dessen kleinste sichtbare Bande eine Größe von ~700 bp aufwies.

Da eine Komplementation auf phänotypischer Ebene nach wie vor Schwierigkeiten bereitete, sollten andere Antibiotika für eine stringenter Auswahl möglicher komplementierter Mutanten gefunden werden. Tetrazyklin war ein nicht besonders stabiles Antibiotikum, weshalb nach geraumer Zeit, seine Konzentration in den Medien zu gering werden konnte, und die komplementierten Mutanten somit das Cosmid unter dem fehlenden Selektionsdruck verloren. Somit wurde die gleichzeitige Gabe von Cefotaxim oder des Schwermetalls Tellurit in Erwägung gezogen. Beide waren wesentlich stabiler in den Medien in ihrer jeweiligen Konzentration über einen längeren Zeitraum zu halten. Allerdings musste die Gabe von Tetrazyklin beibehalten werden, um überhaupt die Cosmid-Konstrukte in die Zellen zu bekommen.

Für das Austesten, sollte nun eine gleichzeitige Gabe von zwei verschiedenen Antibiotika beziehungsweise (bzw.) Antibiotika und Schwermetall erfolgen. Dafür wurde sowohl LB-Agar als auch M9-Minimalagar mit 100 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin und Cefotaxim (0, 20, 40, 50, 75 $\mu\text{g/ml}$) oder Tellurit (0, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$) versetzt. In Vortests wurde ein Fenster für Cefotaxim und Tellurit von 10 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Als Positivkontrolle wurden alle Bakterien auf LB-Agar ausgestrichen. Getestet wurden folgende Bakterienmischungen:

Wildtyp (wt) / wt + Donor / wt + Helfer / wt + Donor + Helfer = wt Trimix

Mutant (M) / M + Donor / M + Helfer / M + Donor + Helfer = M Trimix

Donor = D

Helfer = H

Donor + Helfer

Komplementierte Mutante (PA1288+)

Die Platten wurden nach 3 Tagen ausgewertet, hierbei zeigte sich, dass der komplementierte Mutant auf allen LB Platten mit Tetrazyklin allein, als auch in Kombination mit Cefotaxim oder Tellurit wachsen konnte. Der M9-Minimalagar mit Zugabe von zwei Antibiotika verhinderte ein Wachstum aller verwendeten Bakterien (nicht in Tabelle 3.3 gezeigt). Der wt Trimix und der M Trimix wuchsen sowohl auf LB-Agar als auch auf M9-Minimalagar, beide mit jeweils 200 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin versetzt. Donor allein und Donor + Helfer wuchsen jeweils nur auf LB-Agar mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin. Auf allen anderen Platten konnte kein Wachstum festgestellt werden. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse für den LB-Agar mit den kombinierten Antibiotika bzw. Schwermetalls Tellurit.

Tab.3.3: Ergebnisse der kombinierten Antibiotikagabe in Vollmedium

Stämme	LB 200 µg/ml Tet	M9 200 µg/ml Tet	LB 100 µg/ml Tet 0 bis 75 µg/ml Cefotaxim	LB 200 µg/ml Tet 0 bis 75 µg/ml Cefotaxim	LB 100 µg/ml Tet 0 bis 75 µg/ml Tellurit	LB 100 µg/ml Tet 0 bis 75 µg/ml Tellurit
wt	kein Wachstum					
wt + D						
wt + H						
wt Trimix	Wachstum		kein Wachstum			
M	kein Wachstum					
M + D						
M + H						
M Trimix	Wachstum		kein Wachstum			
Donor D	Wachstum	kein Wachstum				
Helfer H	kein Wachstum					
D + H	Wachstum	kein Wachstum				
1288+	Wachstum					

Es konnte gezeigt werden, dass auf Vollmedium zwei Antibiotika von den Bakterien durchaus toleriert werden konnten (Tabelle 3.3), hingegen der M9-Minimalagar (Ergebnisse nicht gezeigt) das Überleben der Bakterien verhinderte. Da kein einziges Bakterium unter diesen stringenten Bedingungen auf M9-Agar überleben konnte, eigneten sie sich auch nicht für eine Selektion komplementierter Mutanten. Die Selektion musste auf M9-Minimalagar durchgeführt werden, um *E. coli* aus den Mischkulturen entfernen zu können, damit es nicht zu falschpositiven Ergebnissen kommen konnte. Dabei wurde die Eigenschaft von *E. coli* genutzt, Natrium-Benzoesäure als alleinige Kohlenstoffquelle in dem M9-Agar nicht nutzen zu können.

Nach diesen Antibiotika Tests zeigte sich, dass an der bisher verwendeten Selektionsmethode nichts verändert werden sollte. Dieses wurde zudem durch die Ergebnisse der PCR unterstützt. Diese zeigten nämlich, dass die *Tn5* Mutanten das Cosmid pLAFR3 aufgenommen hatten und frei von Verunreinigungen durch den Donor oder Helfer waren.

Somit stellte sich die Frage, ob die komplementierten Mutanten überhaupt die Gene auf den pLAFR3-Konstrukten in ausreichender Menge exprimieren konnten.

Um überhaupt abschätzen zu können, wie viele Mutanten die klonierten Sequenzen auf pLAFR3 exprimierten, bot sich für den PA5349 Mutanten ein Test unter oxidativem Stress an. Dafür wurde dem Medium Wasserstoffperoxid zugegeben. Dieser Ansatz wurde gewählt, da der Mutant PA5349- unter diesen Bedingungen ein vermindertes Überleben im Gegensatz zum Wildtyp [Dissertation Wiehlmann, 2001] zeigte. Hierfür wurden jeweils 10^8 Bakterien in 100 µl Volumen von dem Mutant (5349-), komplementiertem Mutant (5349+) und Wildtyp sowohl auf LB-Agar, LB-Agar mit 200 µg/ml Tetracyclin versetzt, und

als auch auf LB-Agar mit 100 µg/ml Tetrazyklin und zusätzlich 5mM H₂O₂ ausplattiert. Tabelle 3.4 zeigt die Ergebnisse.

Tab.3.4: Ergebnisse der Untersuchung der Bakterien unter oxidativem Stress.

	5349-	5349+	wt
LB	Wachstum		
LB 200 µg/ml Tet	kein Wachstum	Wachstum	kein Wachstum
LB 100 µg/ml Tet 5mM H ₂ O ₂	kein Wachstum	5 bis 10 Klone	kein Wachstum

Wie zu erwarten war, wuchsen alle drei Stämme auf LB-Agar und der komplementierte Mutant wuchs zudem auf LB mit 200 µg/ml Tetrazyklin. Auf den H₂O₂ Platten waren 5 bis 10 Kolonien des komplementierten Mutanten sichtbar. Dies bedeutete, dass nur ein Klon von 10⁸ Bakterien das Rubredoxin Reduktase Gen auf dem Cosmid pLAFR3 exprimierte.

Ein weiterer Test bot sich für den Mutanten PA1441- an. Dieser Mutant war dadurch gekennzeichnet, dass er einen Defekt in der Ausbildung von Flagellen besaß und diese somit ein stummelartiges Erscheinungsbild hatten. Die phänotypische Überprüfung der Komplementation mit pLAFR3 ließ sich visuell einfach im Elektronenmikroskop (EM) nachweisen. Dafür wurden die Bakterien auf verdünnten LB-Agar (0,3% Agar) aufgetropft. Die frischen Proben konnten somit am nächsten morgen direkt für die EM-Untersuchung verwendet werden. Abbildung 3.15 zeigt die EM-Aufnahmen der untersuchten Stämme.

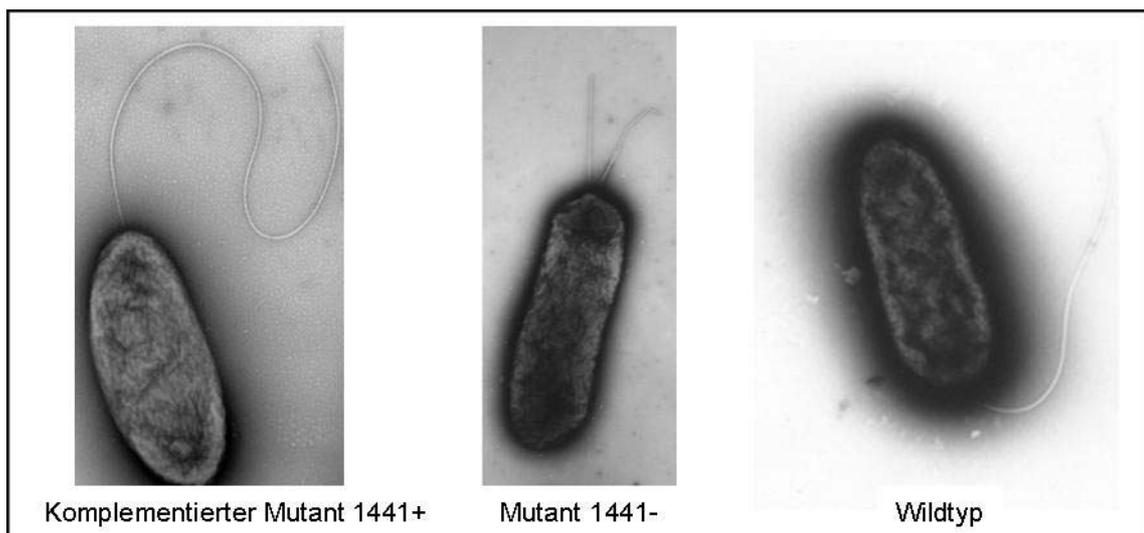


Abb.3.15: EM Aufnahmen der untersuchten Bakterien [Gudrun Brandes, EM-Abteilung der MHH].

Zu sehen sind der Wildtyp mit seinem normal ausgebildeten Flagellum, sowie der fliK- Mutant mit den stummelartig ausgebildeten Flagellen, als auch der komplementierte Mutant fliK+ mit normalem Flagellentypus.

Wie auf den EM-Bildern in Abbildung 3.15 zu sehen ist, war die Komplementation mit dem pLAFR3-Konstrukt in einzelnen Bakterien erfolgreich. Die komplementierte Mutante und der Wildtyp besaßen beide ein normal ausgebildetes langes Flagellum. Bei dem flik-Mutanten waren eindeutig die stummelartig ausgebildeten Flagellen zu sehen.

Insgesamt gesehen, musste allerdings angenommen werden, dass für eine erfolgreiche Komplementation, diese Expressionsraten von pLAFR3 zu gering waren, um weitere phänotypische Untersuchungen durchführen zu können. Damit eine stabile Komplementation des Phänotyps erzeugt werden konnte, sollte somit auf einen anderen Vektor für die Komplementation *in trans* zurückgegriffen werden.

Da allerdings ein Großteil dieser Arbeit bis dato mit der Cosmid-Bank pLAFR3 erfolgte, sollte dieses Cosmid an sich, weiter untersucht werden. Dafür wurde zuerst die Sequenz bestimmt, bevor es zu einer weiteren Charakterisierung von pLAFR3 kam. Anschließend erfolgte eine Restriktionskartierung von pLAFR3, und außerdem wurde die komplette Sequenzierung von pLAFR3 in Auftrag gegeben. Diese wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Die Annotation des Cosmids erfolgte mit den öffentlich zugänglichen BLAST Programmen [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

3.3 Annotation pLAFR3

Die Sequenzierdaten von pLAFR3 wurden von der Firma MWG Biotech auf einer CD-ROM zugeschickt. Die Sequenz wurde in einer Datei .seq abgelegt und ließ sich mit dem Microsoft Editor öffnen und in eine Worddatei .doc umschreiben. Dabei stellte sich heraus, dass pLAFR3 eine Länge von 20722 bp hatte. Nach Einlesen der Sequenz in das freizugängliche NEBcutter Programm (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>), konnten die Restriktionsschnittstellen sowie der GC-Gehalt des Cosmids ermittelt werden. Somit besaß pLAFR3 einen GC-Gehalt von 61%. Des Weiteren wurde die Sequenz mit den BLAST Programmen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) analysiert, um Homologien zu anderen Plasmiden zu finden und einzelnen ORFs eine Funktion zuweisen zu können. In der Abbildung 3.16 werden sowohl die Restriktionsschnittstellen für *single cutter* gezeigt, als auch die einzelnen ORFs von pLAFR3, denen sich Funktionen zuweisen ließen.

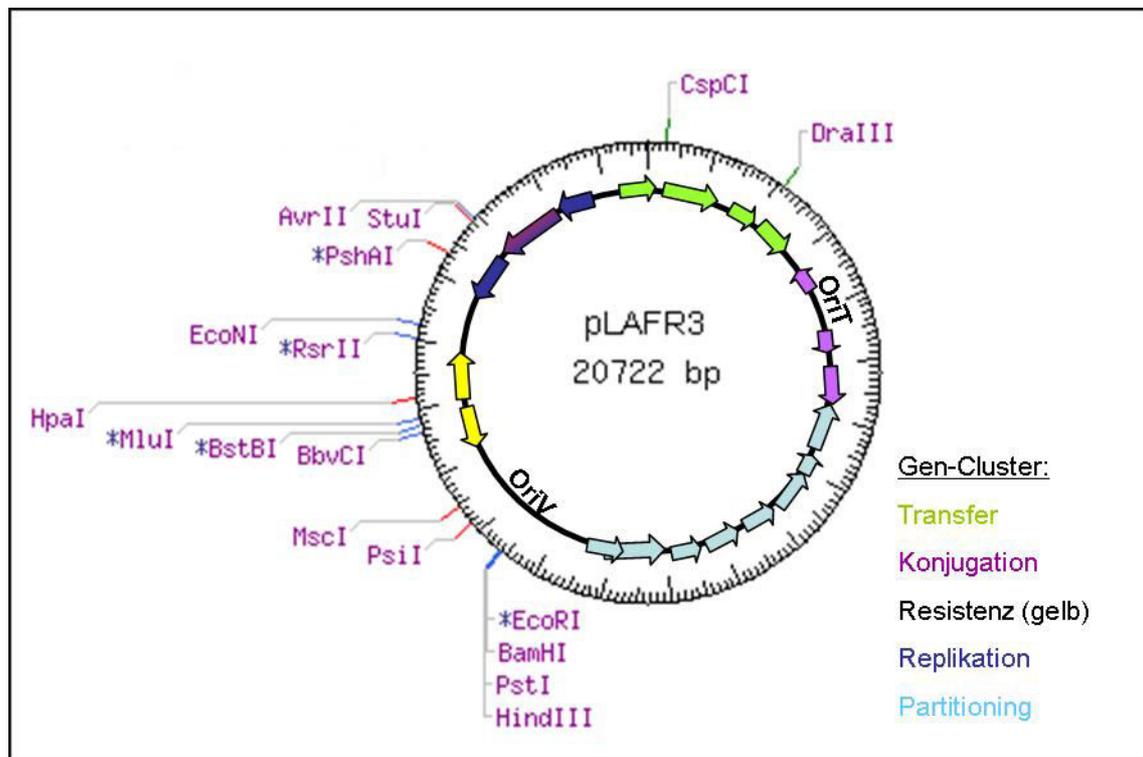


Abb.3.16: Schematische Grafik von pLAFR3 mit den Restriktionsschnittstellen für *single cutter*, sowie ORFs mit zugewiesener Funktion laut Annotation von BLAST-2-Sequences. Die Farben der einzelnen ORFs spiegeln sich in den Gen-Clustern wider.

Da aus der Literatur bekannt war, dass pLAFR3 aus pLAFR1 und pUC8 generiert worden war, wurden die jeweiligen Sequenzen verglichen. Dabei kam das frei verfügbare Programm BLAST-2-Sequences zum Einsatz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq>). Die einzelnen Sequenzabschnitte, die Homologien zueinander aufwiesen, sind skizzenhaft in Abbildung 3.17 wider gegeben.

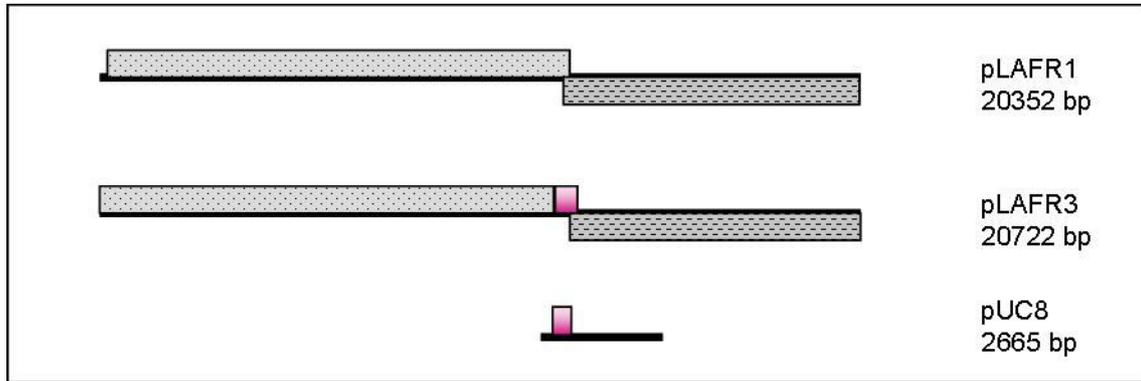


Abb.3.17: Skizzenhafter Sequenzvergleich von pLAFR3 mit pLAFR1 und pUC8. Gleiche Sequenzabschnitte sind durch dieselbe Musterwahl gekennzeichnet.

Wie aus dem Sequenzvergleich zu sehen war und in Abbildung 3.17 verdeutlicht wurde, war pLAFR3 aus pLAFR1 generiert, und eine *mcs* (*multiple cloning site*) von pUC8 eingefügt worden. Die Sequenz von pUC8 war auf folgender Internetseite abgelegt und frei zugänglich: <http://seq.yeastgenome.org/vector>. pUC8 besaß einen GC-Gehalt von 51% und hatte eine Größe von 2665 bp.

Des Weiteren wurde für ein weiteres Plasmid, pRK310 (AF327712), eine hohe Homologie zu pLAFR3 gefunden. Beide Plasmide wurden somit einem Sequenzvergleich mit dem Ursprungsplasmid RK2 unterzogen. Abbildung 3.18 zeigt den skizzenhaften Vergleich der Sequenzabschnitte von RK2, pLAFR3 und pRK310.

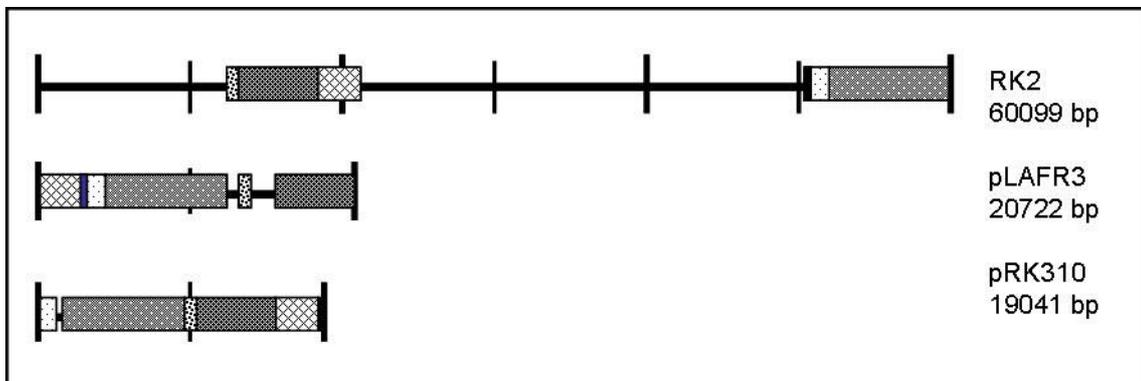


Abb.3.18: Skizzenhafter Vergleich von pLAFR3, pRK310 und dem Ursprungsplasmid RK2. Gleiche Sequenzabschnitte sind durch dieselbe Musterwahl gekennzeichnet.

Wie aus der Abbildung 3.18 zu entnehmen ist, konnte eine nahe Verwandtschaft der Plasmide pRK310 und pLAFR3 untereinander, sowie dem Ursurungsplasmid RK2 gegenüber nachgewiesen werden. In der Abbildung 3.18 wurden nur die größeren Fragmente dargestellt, da Sequenzabschnitte von 1 kb und kleiner aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen worden waren. pRK310 hatte eine Größe von 19041 bp und besaß einen GC-Gehalt von 62%. RK2 (L27758) mit einer Länge von 60099 bp hatte einen GC-Gehalt von 62%.

Aufbauend auf diesen Sequenzvergleichen wurde die Bestimmung der ORFs von pLAFR3 durchgeführt. In der Tabelle 3.5 sind die annotierten ORFs gezeigt, deren Grundlage die Sequenz von dem Plasmid pRK310 (AF327712) bildete. Dessen ORFs waren in Genbank annotiert und wiesen eine 99-100%ige Homologie zu pLAFR3 auf.

Tab.3.5: Annotation der ORFs von pLAFR3 mit einer 99-100%igen Homologie zu pRK310.

Gen	Funktion	Nukleotide	Start Base	Ende Base
TrbA	Transfer	312	163	471
TrbB		957	744	1699
TrbC		438	1715	2150
TrbD		312	2156	2464
TraJ	Konjugation	372	3369	3001
TraK		405	3737	4138
TraM		438	4863	5297
Upf54.4	Partitioning	1347	6700	5356
Upf54.8		348	7076	6731
KfrA		927	8159	7236
KorG		528	8872	8348
KorF		522	9358	8868
KorB		1077	10531	9459
IncC		1095	11623	10532
KorA		306	11610	11308
TetR		Resistenz	651	16585
TetA	1200		16691	17887
Upf16.5	Replikation	669	19188	18524
TrfA		1149	20311	19166
Ssb		351	20710	20363
mcs	Klonierungsstelle	384	12363	12746
oriT	Start Transfer	360	3377	3736
oriV	Replikationsstart	720	13009	13728

3.4 Komplementation mit pUCP20

Da sich die phänotypische Analyse von den mit pLAFR3 komplementierten Mutanten als schwierig erwies, musste auf eine Alternative zurückgegriffen werden. Aufgrund der Aufgabenstellung, musste ein kleiner Vektor gefunden werden, der zum einen in der Lage war, sehr große DNA Fragmente aufzunehmen zu können, und zum anderen in *E. coli* und gleichzeitig in *P. aeruginosa* eingesetzt werden konnte. Anschließend sollten diese aufgereinigten Konstrukte mittels Elektroporation in *P. aeruginosa* Mutanten eingebracht werden, obwohl bekannt war, dass ab Größen von mehr als 10 kb, die Elektroporationseffizienz erheblich nachließ.

Für diesen Ansatz wurde das Plasmid pUCP20 ausgesucht, da es aufgrund seiner relativ kleinen Größe von 3898 bp, sehr große DNA Fragmente aufnehmen vermochte, und diese klonierten Konstrukte anschließend leichter per Elektroporation in die Mutanten eingebracht werden konnten. Da mit polycistronischen Genkassetten komplementiert werden sollte, um polare Effekte auszuschließen, mussten große Fragmente von circa 5500 bis 9000 bp kloniert werden. pUCP20 hatte den Vorteil, als *shuttle* Vektor zwischen *E. coli* und *P. aeruginosa* eingesetzt werden zu können. Somit konnten die klonierten Konstrukte in *E. coli* überprüft und aufgereinigt werden, bevor sie mittels Elektroporation in *P. aeruginosa* transformiert wurden. Zu Beginn der Arbeiten, war allerdings über die Expression von homolog in pUCP20 komplementierter DNA nichts in der Literatur bekannt.

Für die Klonierung wurden zuerst die polycistronischen Genkassetten per PCR generiert, in einem Agarosegel analysiert, aufgereinigt und mit Restriktionsendonukleasen behandelt, bevor sie in den Vektor kloniert worden waren. Daran anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* DH5 α (Invitrogen), Überprüfung der Klonierung mittels einer analytischen Restriktionsendonukleasebehandlung und zum Schluss das Einbringen der Konstrukte in *P. aeruginosa* Mutanten mittels Elektroporation.

Die Länge der polycistronischen Genkassetten, die kloniert werden mussten, ist in Tabelle 3.6 abgebildet. Außerdem kann der Tabelle 3.6 Funktion und Grenzen der klonierten Gen-Cluster entnommen werden.

Tab.3.6: Eigenschaften der polycistronischen Genkassetten, die kloniert wurden.

Polycistronische Genkassette	Länge in bp	Grenzen der Gen-Cluster PA-Nummern	Name/Homologie/Funktion
0447	6819	0446 bis 0450	gcdH
0928	8910	0927 bis 0931	lemA
1288/1288*	5421/7426	1285 bis 1290/1292	fadL
1436	7955	1434 bis 1438	RND Efflux Transporter
2751	5806	2749 bis 2754	Hypothetisches Gen
4621	7234	4618 bis 4623	Oxidoreduktase
4785	5541	4783 bis 4788	Acyl-CoA thiolase
5349	7408	5347 bis 5355	Rubredoxinreduktase

Eine Auswahl der analysierten polycistronischen Genkassetten, welche mit dem FailSafe™ PCR-System von Epicentre (Kapitel 2.3.5) hergestellt worden waren, ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

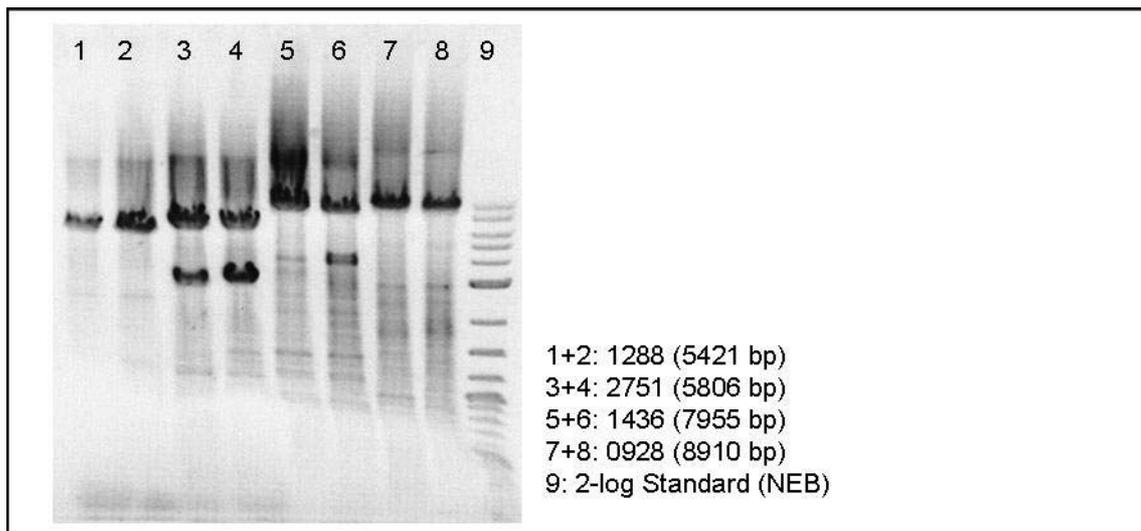


Abb.3.19: PCR Produkte der polycistronischen Genkassetten. Als Standard wurde der 2-log Marker von NEB verwendet.

Alle Produkte lagen in den erwarteten Größen von 5421 bp bis 8910 bp vor (Spur 1 bis 8 aus Abb.3.19). Für 2751 (Spur 3 und 4 aus Abb.3.19), Hauptprodukt 5806 bp, erschien ein ebenso starkes Nebenprodukt mit einer Größe von circa 4000 bp. Das stellte allerdings kein Problem dar, da alle Produkte aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt wurden, bevor sie für die Klonierung verwendet worden waren. Der Standard (Spur 9 aus Abb.3.19) zeigte Fragmente in den Größen von 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1,5; 1,2 und 1 kb deutlich, wobei die Banden für 3 kb und 1 kb hervorgehoben waren. Die Fragmentgrößen kleiner als 1 kb waren in dem 0,8%igen Agarosegel nicht gut darstellbar. Für die nicht gezeigten Gen-Cluster (4785, 5349, 4621, 1288*, 0447) lagen ebenso PCR

Produkte in den erwarteten Größen vor, diese wurden aber zur Vereinfachung nicht in einer Abbildung dargestellt.

Die weitere Vorgehensweise beinhaltete die Klonierung der Gen-Cluster in den *shuttle vector* pUCP20 und die Strategie dafür ist in Abbildung 3.20 skizzenhaft für das Gen-Cluster 1436 dargestellt.

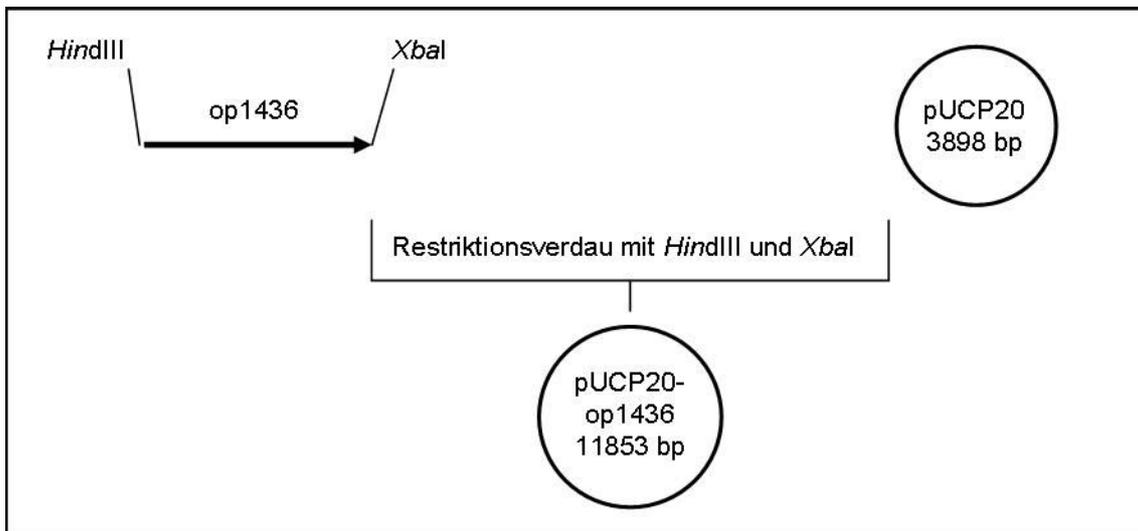


Abb.3.20: Klonierungsstrategie für das Gen-Cluster 1436 (op1436=Operon 1436). PCR Produkt 1436, sowie der Vektor pUCP20 wurden mit *HindIII* und *XbaI* behandelt und anschließend zusammengelegt.

Die Konstrukte, deren Herstellung in Abbildung 3.20 gezeigt ist, wurden zuerst in *E. coli* OneShot@TOP10 chemisch kompetente Zellen (Invitrogen) transformiert und anschließend mittels Elektroporation in die Mutanten überführt (Kapitel 2.5.2 und 2.5.3). Die Kontrolle, der mit Restriktionsendonukleasen behandelten rekombinanten Plasmide, bestätigte die genetische Komplementation der Mutanten bis auf den Klon 4785.

Abbildungen 3.21 und 3.22 zeigen eine Auswahl der überprüften rekombinanten Plasmide aus *E. coli* DH5 α Zellen bzw. aus den komplementierten *P. aeruginosa* Mutanten.

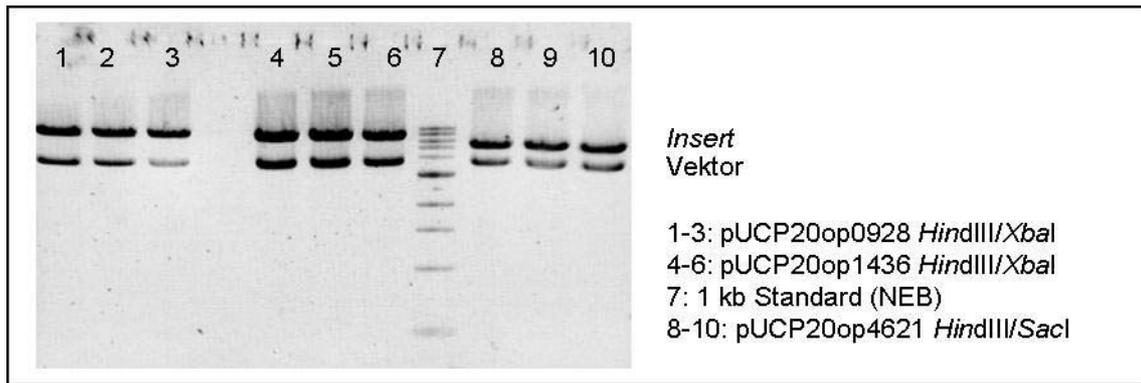


Abb.3.21: Kontrolle der rekombinanten Plasmide aus *E. coli* DH5 α mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen. Für alle untersuchten Plasmide konnten die *Inserts* der erwarteten Größen gefunden werden.

Wie für einige Klone aus *E. coli* DH5 α Zellen in Abbildung 3.21 gezeigt, lagen die rekombinanten Plasmide in allen untersuchten Klonen vor. Dabei zeigte sich für das Gen 0928 (Spur 1 bis 3 aus Abb.3.21) ein *Insert* von 8910 bp und der Vektor mit einer Länge von 3898 bp. Für das Gen 1436 (Spur 4 bis 6 aus Abb.3.21) war das *Insert* mit einer Länge von 7955 bp auszumachen, während für das Gen 4621 (Spur 8 bis 10) ein *Insert* von 7234 bp zu sehen war. Als Standard wurde die 1 kb Leiter von NEB verwendet, mit Fragmentgrößen von: 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1,5; 1 und 0,5 kb, wobei die Bande für 3 kb hervorgehoben war.

Die überprüften rekombinanten Plasmide aus *E. coli* DH5 α Zellen wurden dann mittels Elektroporation in die *P. aeruginosa* Mutanten eingebracht, in denen sie ebenfalls mit Restriktionsendonukleasen untersucht wurden. In Abbildung 3.22 ist für eine Auswahl von Klonen aus *P. aeruginosa* Mutanten die Analyse auf einem 1%igen Agarosegel gezeigt.

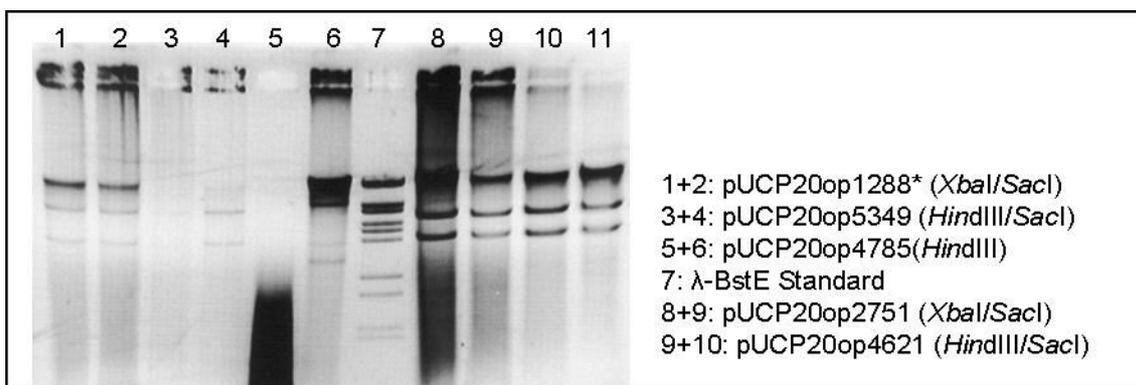


Abb.3.22: Kontrolle der rekombinanten Plasmide aus *P. aeruginosa* Mutanten mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen. Für alle untersuchten Plasmide, bis auf Klon 4785 (Spur 5 und 6) konnten die *Inserts* in den erwarteten Größen gefunden werden. Die oberste Bande (von 3 Banden) in allen Spuren der untersuchten Plasmide, zeigt das native Plasmid.

Wie aus Abbildung 3.22 zu entnehmen, lagen rekombinante Plasmide für das Gen-Cluster 1288* (Spur 1 und 2), 5349 (Spur 3 und 4), 2751 (Spur 8 und 9), sowie 4621 (Spur 10 und 11) vor. Für das Gen-Cluster 4785 konnte kein rekombinantes Plasmid nachgewiesen werden. Als Standard wurde der λ -BstE Marker eingesetzt, der Fragmente in den Größen von: ~14; 6,3; 5,6; 4,8; 4,3; 3,6; 2,3; 1,9; 1,3; 1,2 kb sowie 702 bp zeigte. Die Bande von ~700 bp war in dem 0,8%igem Agarosegel nicht auszumachen. In allen Spuren, bis auf Spur 7 mit dem Standard, ließ sich eine zusätzliche Bande erkennen, bei der es sich um das native Plasmid handelte. Für die Analyse wurde einfach präzipitierte DNA genommen, die nicht weiter über Säulen (Qiagen) aufgereinigt worden war. Die Plasmidisolierung über Säulen funktionierte nicht, da die DNA nicht mehr von diesen eluiert werden konnte. Daher waren auch noch Verunreinigungen von Proteinen in den Proben anzufinden, welche dafür sorgten, dass sich die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen als schwierig erwies.

Durch diese Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass auf genetischer Ebene für $\frac{3}{4}$ der ausgewählten Mutanten eine stabile Komplementation gelungen war: 0928, 1288*, 1436, 2751, 4621 und 5349. Diese Klone konnten nun phänotypischen Untersuchungen unterzogen werden.

3.5 Phänotypische Komplementation

Die zuvor genetisch komplementierten Mutanten wurden anschließend auf ihre phänotypische Komplementation hin überprüft. Dafür stand eine Vielzahl von Untersuchungen zur Verfügung. Da alle *knock out* Mutanten auf einem speziellen Festmedium gefunden worden waren (Proteasedefizienz), wurden sie zuerst auf diesem Medium untersucht, um ihre Fähigkeit bezüglich der Proteasenbildung zu testen.

3.5.1 Proteasenachweis auf Caseinagar

Wie bei den pLAFR3 komplementierten Mutanten zuvor, wurden ebenso die mit pUCP20 komplementierten Mutanten als erstes dem Proteasenachweis auf Caseinagar unterzogen. Dabei sollte überprüft werden, ob neben der genetischen Komplementation auch eine phänotypische Komplementation des *Quorum sensing* vorhanden war. Eine phänotypische Komplementation konnte nur für das Gen 0928 (0928+) und 1436 (1436+) nachgewiesen werden. Die Mutanten wurden mit 0928- bzw. 1436- bezeichnet. Abbildung 3.23 zeigt für 1436+ den Nachweis für die Produktion von Proteasen.

Wegen der mangelnden Reversion im Phänotyp ist für die in den PAO1 Genen PA1288, PA2751, PA4621 bekannte Mutation davon auszugehen, dass vermutlich eine Sekundärmutation für die Proteasedefizienz verantwortlich ist. Dieses Ergebnis bestätigt zu dem die Notwendigkeit, nach der Durchführung einer Mutation über Komplementation nachzuweisen, dass diese Mutation für den Phänotyp kausal verantwortlich ist.

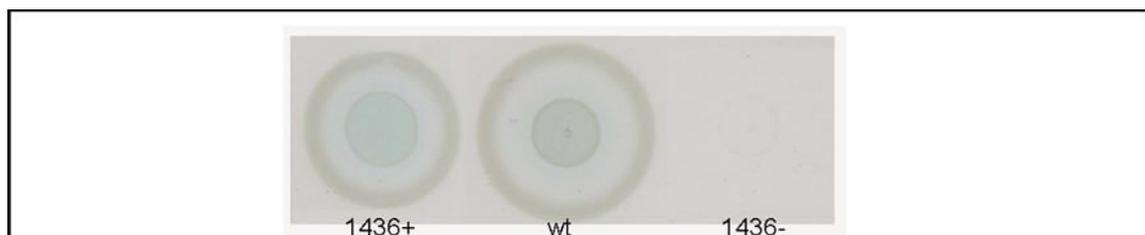


Abb.3.23: Proteasenachweis auf Caseinagar. Der Wildtyp sowie die komplementierte Mutante zeigten Proteaseproduktion, gekennzeichnet durch den weißlichen Ring um den Bakterienhof.

Wie der Proteasenachweis in Abb.3.23 zeigt, war der komplementierte Mutant 1436+ durchaus in der Lage, Casein zu degradieren und es dem Kohlenstoffwechsel des Bakteriums zugänglich zu machen. Des Weiteren war ebenso der komplementierte Mutant 0928+ in der Lage, auf diesem speziellen Festmedium zu überleben. Allerdings wurde er zu weiteren Untersuchungen nicht herangezogen, da in der Arbeitsgruppe um Brinkmann und Tan [Brinkmann *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 1999]] seine Funktion bezüglich der Virulenz von *P. aeruginosa* untersucht worden war. Er fungiert als Sensor LemA

(GacS), der zusammen mit dem Regulator GacR das LasR System reguliert und somit das *Quorum sensing* steuert.

Alle anderen untersuchten genetisch komplementierten Mutanten zeigten keine phänotypische Komplementation auf Caseinagar, somit wurden sie nicht für weitere Untersuchungen herangezogen.

3.5.2 Besonderer Phänotyp auf LB-Agar

Da für die weiteren Untersuchungen nur der komplementierte Mutant 1436+ in Frage kam, wurde er als einziger für weitere Experimente herangezogen. Beim Auftropfen von 1436+, wt und 1436- auf normalem LB-Agar, zeigte sich ein besonderer Phänotyp für den Mutanten 1436-. Abbildung 3.24 zeigt die Bakterien nach 24 h Inkubation auf LB-Agar.

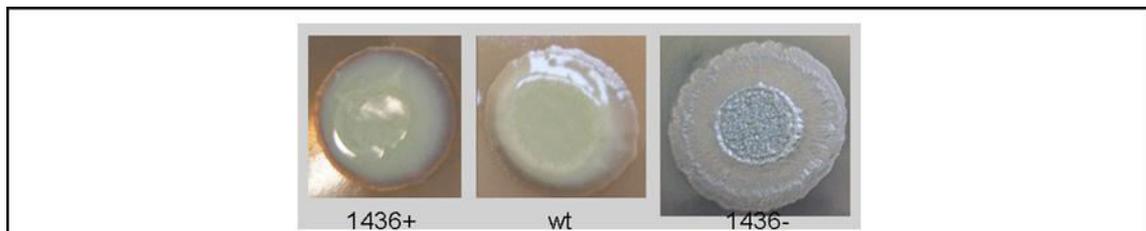


Abb.3.24: Besonderer Phänotyp auf LB-Agar.

Wie auf der Abb.3.24 zu sehen ist, zeigte der 1436- eine matte knötchenartige Oberfläche, hingegen der wt und 1436+ eine typisch glänzende Oberfläche aufwiesen, die charakteristisch für *P. aeruginosa* TB ist. Somit schien der 1436- einen etwas veränderten Membranaufbau zu besitzen. Dies wurde zudem durch den Kongorot-Agar bestätigt, der je nach Membranbeschaffenheit der Bakterien eine unterschiedliche Einlagerung des Farbstoffs in die Bakterienzellwand bewirkte, siehe Abbildung 3.25.

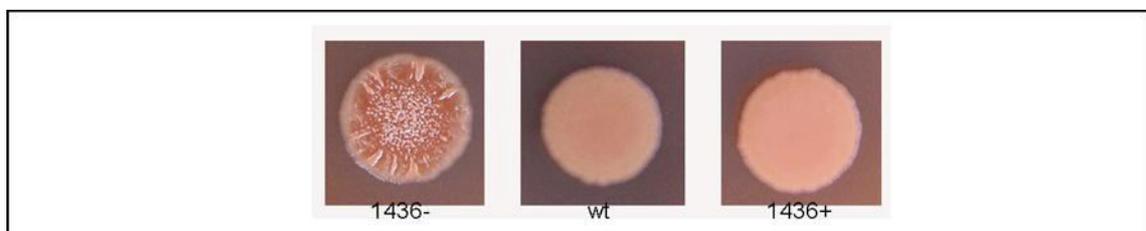


Abb.3.25: Besonderer Phänotyp auf Kongorot-Agar.

3.5.3 Hämolyse (Rhamnolipidproduktion)

Die Produktion von Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel Rhamnolipid, eines der Hämolytine, konnte auf Columbia-Agar (Schafsblutagar) nachgewiesen werden. Abbildung 3.26 zeigt die Ergebnisse nach Inkubation der Bakterien für drei Tage bei 37°C und der weiteren Inkubation für zwei Tage bei Raumtemperatur.

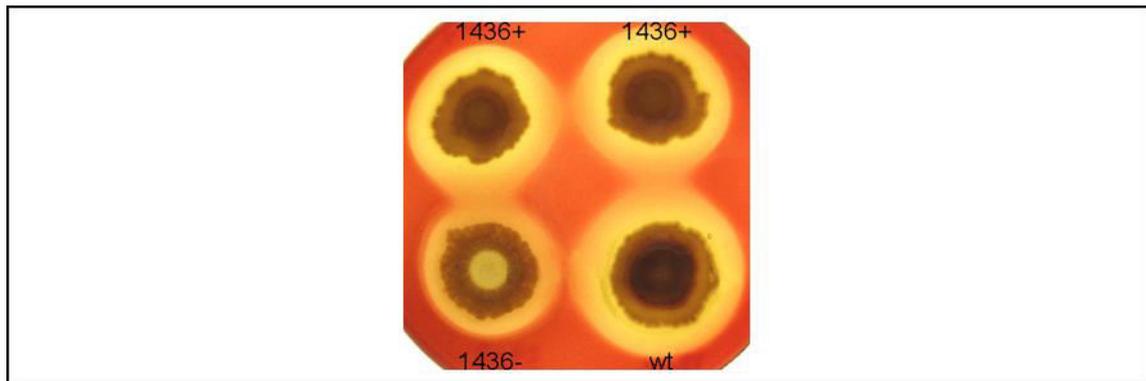


Abb.3.26: Hämolyse auf Columbia-Agar. In der oberen Reihe ist der komplementierte Mutant zweimal aufgetropft, und in der unteren Reihe ist links der Mutant und rechts der Wildtyp zu sehen.

In Abb.3.26 ist zu sehen, dass alle untersuchten Bakterien Hämolyse betreiben konnten. Die eigentliche Bildung eines Hämolysehofs konnte allerdings bereits nach 48 h bei 37°C beobachtet werden. In dem Fall hatten nur wt und 1436+ Hämolyse betrieben (Abbildung nicht gezeigt). Nach weiterer Inkubation (4 Tage) fing auch der 1436- an, Hämolyse zu betreiben. Allerdings war die Hämolyse von 1436+ und wt weiter fortgeschritten als die des Mutanten. Eine weitere Auffälligkeit des Mutanten war das fortschreitende Absterben der Bakterien im Zentrum.

3.5.4 LasA Proteaseaktivität in der Stapholyse-Untersuchung

Die stapholytische Aktivität der LasA Protease in 1436+, 1436- und wt ließ sich in der Staphylokokken-Lyse (Kapitel 2.7.3) untersuchen. Die Abb.3.27 gibt den Verlauf des 60 minütigen Experiments wider.

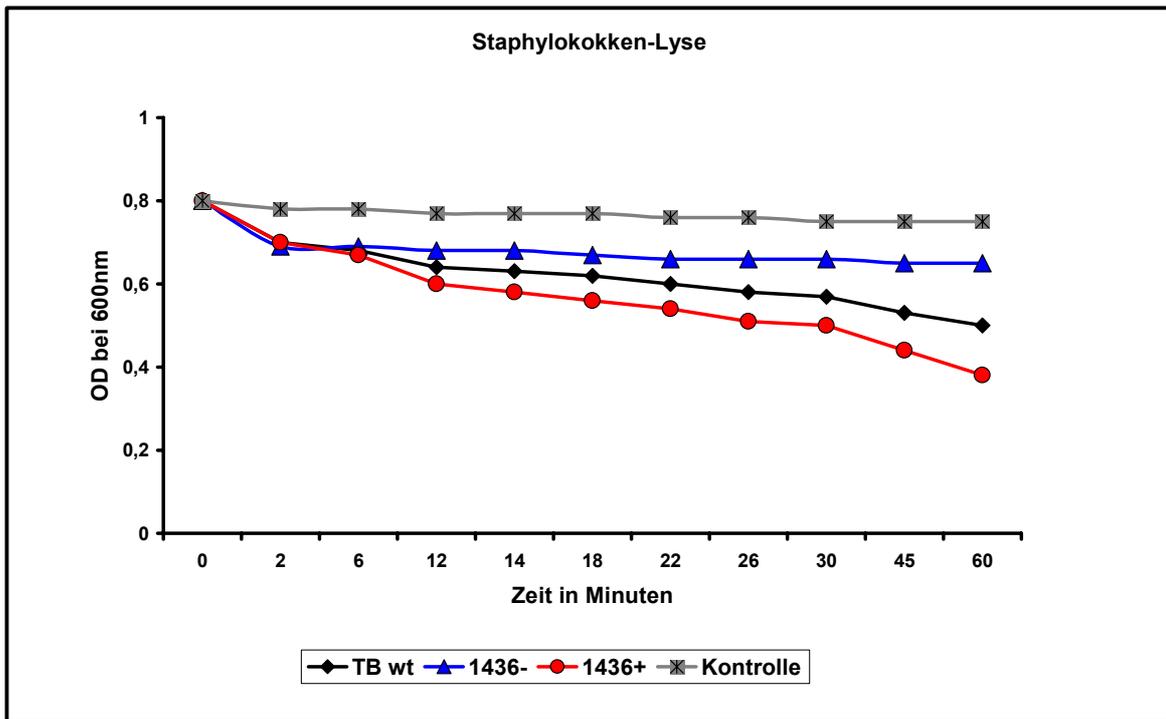


Abb.3.27: Grafische Darstellung der Zeitwerte der Staphylokokken-Lyse.

Wie aus dem Diagramm 3.27 zu ersehen, besaßen wt und 1436+ eine höhere LasA Aktivität als der Mutant. *S. aureus* Zellen ohne Zugabe von *P. aeruginosa* Überstand war die Negativkontrolle. Wurde die Untersuchung über einen längeren Zeitraum fortgesetzt, trat der Unterschied zwischen wt, komplementierte Mutante 1436+ und Mutant noch deutlicher zu Tage. 1436+ und wt lysierten die *S. aureus* Zellen soweit, dass die Bakterienlösung fast durchsichtig wurde bis zu einer OD_{600nm} : 0,10.

3.5.5 Nachweis der LasB Elastase

Die Elastaseaktivität wurde mit dem Kongorot Assay gemessen (Kapitel 2.7.2). In Abb.3.28 ist die Kinetik der Elastaseaktivität dargestellt.

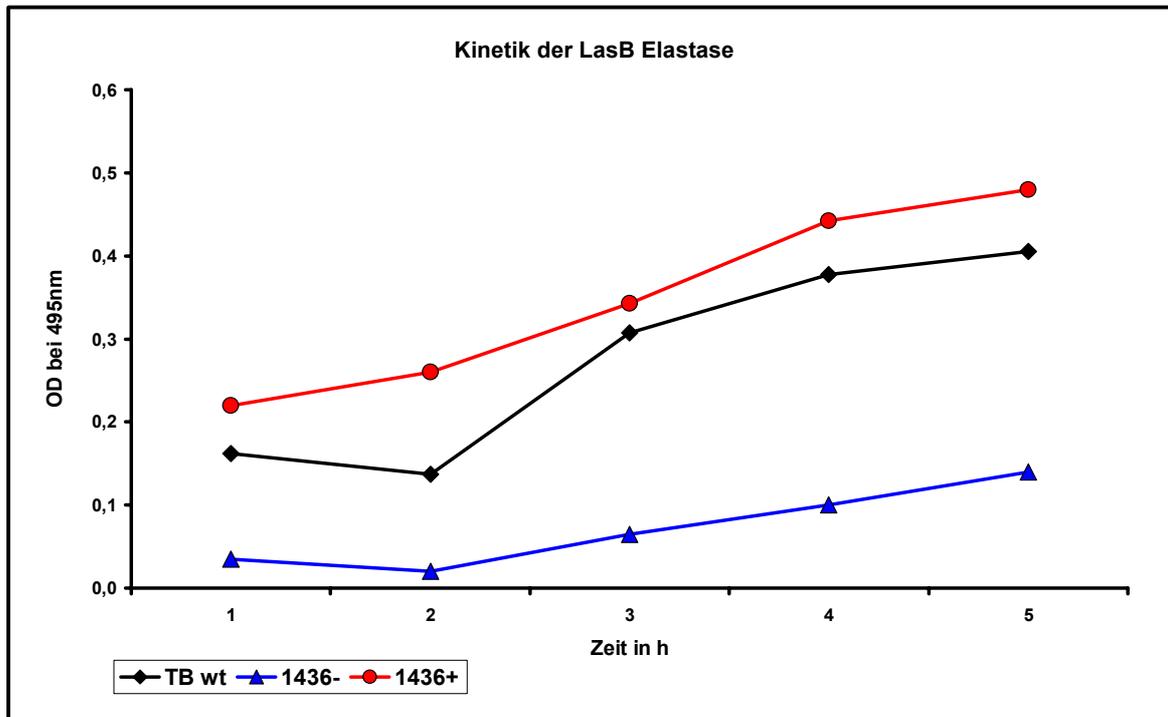


Abb.3.28: Grafische Darstellung der Elastasekinetik.

Aus der Abb.3.28 geht eindeutig hervor, dass der wt und 1436+ ähnlich viel Elastase sezernieren und diese in der Lage war, kovalent gebundenes Elastin vom Farbstoff Kongorot abzuspalten. Der Mutant hingegen wies auch nach 5 h immer noch eine deutlich geringere Elastaseproduktion auf.

3.5.6 Pyoverdininsekretion in King B Medium

Zur weiteren phänotypischen Analyse, erfolgte wie in Kapitel 2.7.8 beschrieben, die Untersuchung der Bakterien in King B Medium. Die Resultate des Experiments sind in Abb. 3.29 dargestellt.

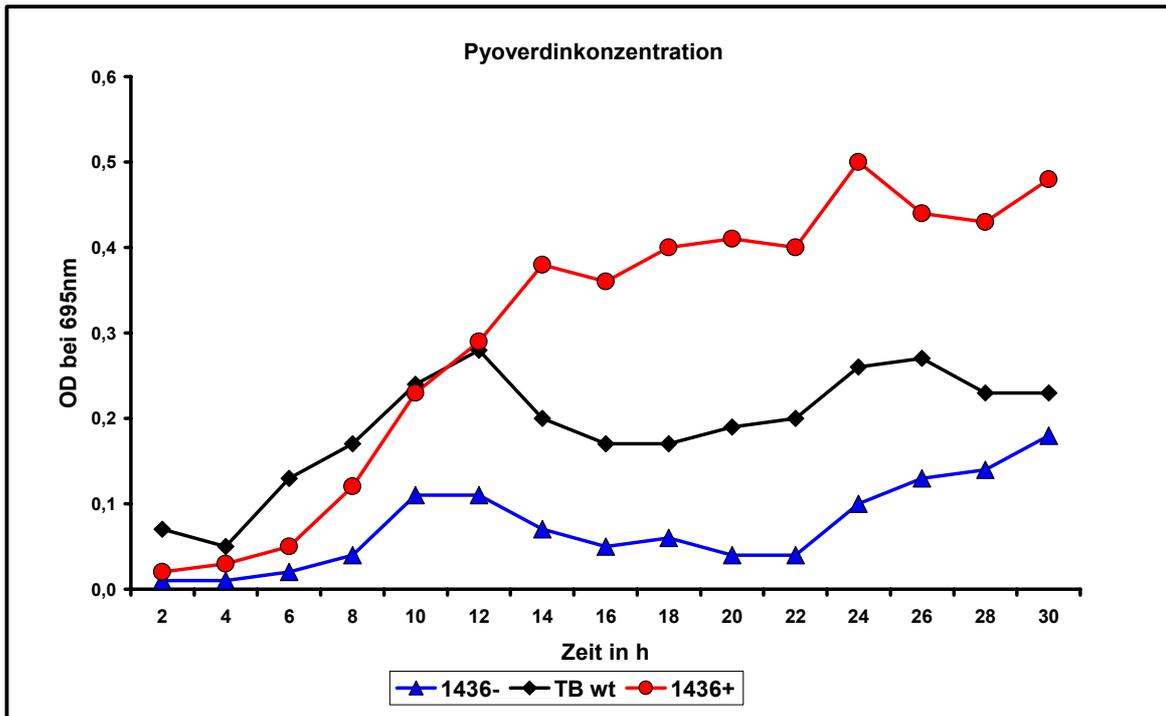


Abb.3.29: Grafische Darstellung der Pyoverdinssekretion in King B Medium.

Die komplementierte Mutante hatte im Gegensatz zum wt eine erheblich höhere Pyoverdinssekretion. Der Mutant hingegen zeigte die geringste Pyoverdinssekretion. Allerdings war bei ihm nach 30 h eine Annäherung der Pyoverdinssekretion an den wt zu beobachten. Dies könnte allerdings darin begründet liegen, dass die Bakterien aus Nährstoffmangel nach 30 h abstarben, die Zellen somit lysierten und Pyoverdin ins Medium abgeben konnten. Bestätigt wurde dies durch die Beobachtung, dass sich in den Kulturen nach 26 h Flocken aus Bakterien gebildet hatten.

Eine weitere Untersuchung bezüglich der Pyoverdinsproduktion erfolgte auf King B-Agar. Dafür wurden die Agarplatten zur Auswertung mit UV-Licht bestrahlt, denn unter diesen Bedingungen wies Pyoverdin eine Eigenfluoreszenz auf. Abbildung 3.30 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

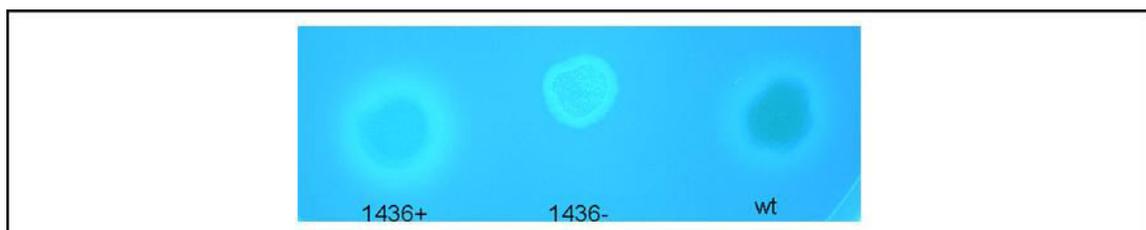


Abb.3.30: King B-Agar zum Nachweis von Pyoverdin.

Wie der Abb.3.30 zu entnehmen ist, produzierte der komplementierte Mutant erheblich mehr Pyoverdin als der Wildtyp. Sichtbar wurde dies an dem kräftigeren fluoreszierenden Ring, der das Bakterium umgab. Die Mutante sezernierte kein Pyoverdin, allerdings wies sie eine erhöhte Eigenfluoreszenz auf, was darauf schließen ließ, dass sich Pyoverdin in den Zellen ansammelte und nicht sezerniert werden konnte.

3.5.7 Pyocyaninsekretion in King A Medium

Die Untersuchung der Bakterien zur Sekretion von Pyocyanin (Kapitel 2.7.7) wurde in King A Medium vorgenommen. Abbildung 3.31 zeigt das Ergebnis dieser phänotypischen Analyse.

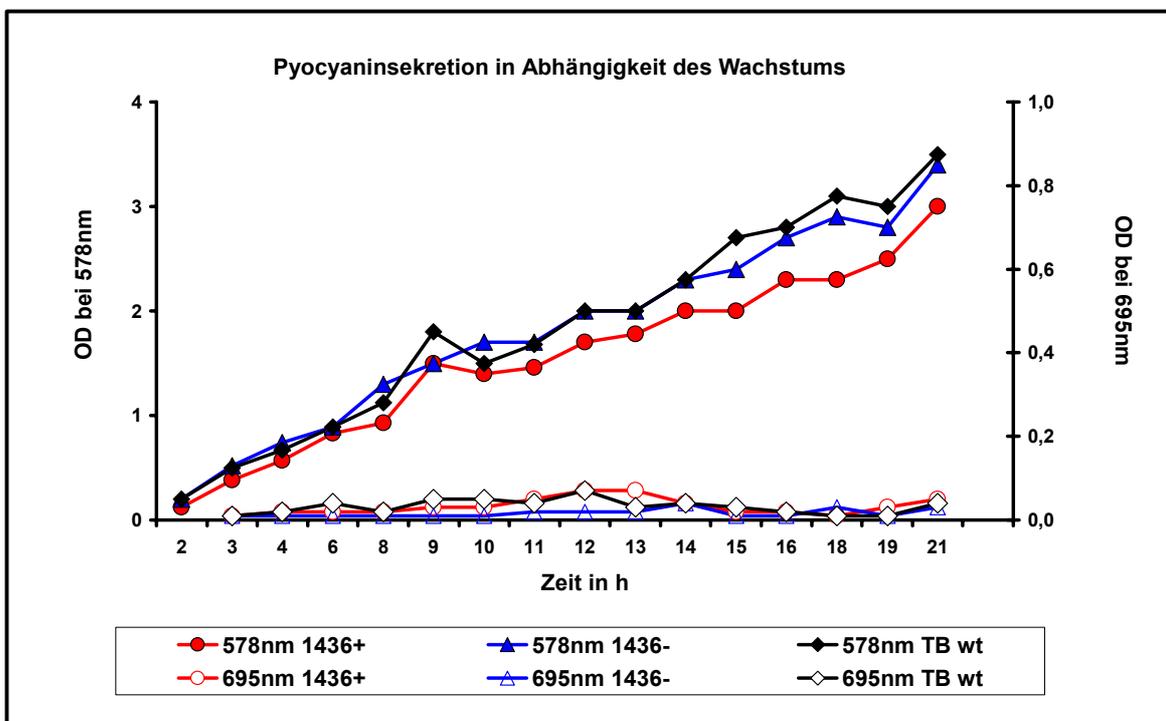


Abb.3.31: Grafische Darstellung der Pyocyaninsekretion in Abhängigkeit des Wachstums.

Wie aus Abb.3.31 zu entnehmen, verhielten sich, was die Pyocyaninsekretion anbelangte, 1436+, wt und 1436- relativ ähnlich. In diesem Versuch war somit kein Unterschied der Bakterien untereinander in Bezug auf die Sekretion nachzuweisen. Falls sie Pyocyanin produzierten, dann in äußerst geringen Mengen, die noch nicht ausreichten, damit es ins umgebende Medium sezerniert werden konnte. Die volle Pyocyaninproduktion erfolgte wahrscheinlich erst zu einem späteren Zeitpunkt, als nach 21 h. Das Wachstum der Bakterien in dem Medium war normal, nach 21 h erreichten sie eine optische Dichte von ungefähr 4.0 OD bei 578nm, und alle drei Stämme verhielten sich somit ähnlich.

3.5.8 Siderophorenproduktion

Um zu überprüfen, ob der Mutant in der Produktion von Siderophoren beeinträchtigt war, das heißt in seiner Eisenaufnahme behindert, wurde für diesen Nachweis der CAS-Agar verwendet. Das Experiment wurde wie in Kapitel 2.7.6 beschrieben worden war, durchgeführt. Abbildung 3.32 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

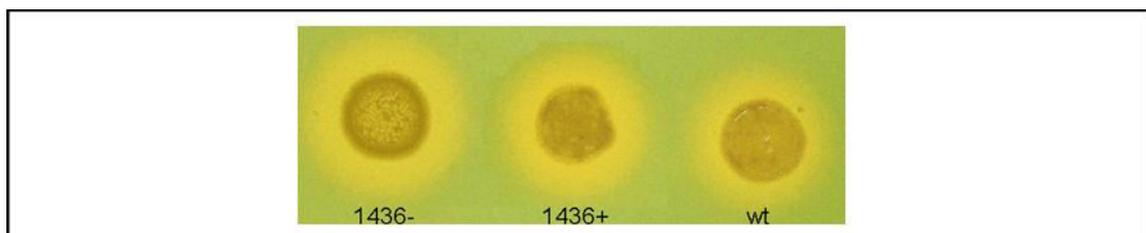


Abb.3.32: Nachweis der Siderophorenproduktion zur Eisenaufnahme auf CAS-Agar.

Hinsichtlich der Siderophorenproduktion verhielten sich alle drei Stämme gleich, wie in Abb.3.32 zu sehen ist. Somit war keinerlei Beeinträchtigung des Mutanten bezüglich der Eisenaufnahme zu beobachten. Allerdings konnte auf diesem Agar nicht zwischen Pyoverdin und Pyochelin unterschieden werden. Außerdem ließ sich auf dem CAS-Agar, wie zuvor auf den Columbia-Agar auch, die Autolyse im Zentrum des Mutanten beobachten.

3.5.9 Homoserinlacton (HSL) Produktionstests

Dies sind Untersuchungen zur Überprüfung der Produktion von Homoserinlactonen. Dafür standen zwei Experimente zur Auswahl. Das erste diente dem Nachweis von C₄-HSL und das zweite dem Nachweis von C₁₂-HSL. Beide Experimente wurden von Kathrin Riedel am Institut für Mikro- und Pflanzenbiologie in der Schweiz (Zürich) durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie (DC) mit dem Detektorstamm *Chromobacterium violaceum* CV026

In Gegenwart aliphatischer HSL produzierte der Detektorstamm *C. violaceum* CV026 Violacein, ein lilafarbenes Pigment, welches sich gut in einer DC visuell darstellen ließ. Abbildung 3.33 zeigt eine solche DC.

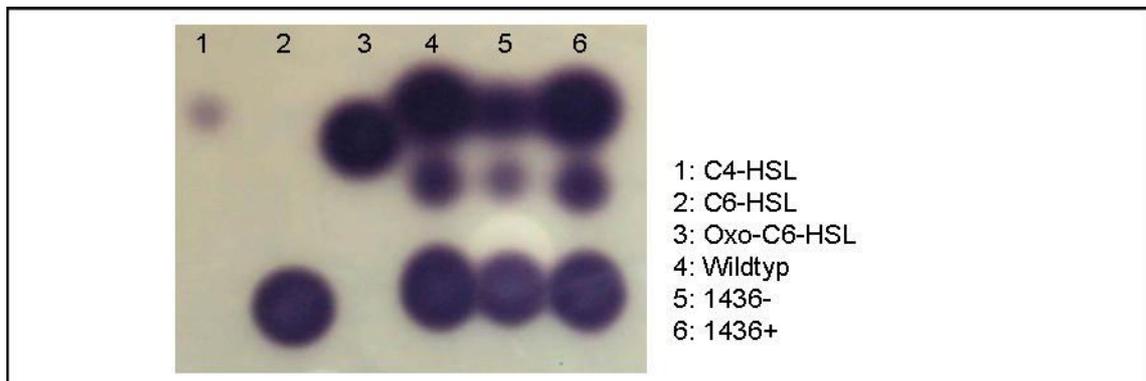


Abb.3.33: DC zum Nachweis von C₄-HSL mit *C. violaceum* CV026 (Experiment von K. Riedel am Institut für Mikro- und Pflanzenbiologie Zürich).

In der DC-Analyse (Abb.3.33) konnte sowohl beim Wildtyp als auch bei dem komplementierten Mutant 1436+ die Produktion von C₄-HSL detektiert werden (oberste Signale). Hingegen war die C₄-HSL-Konzentration der Mutante um das 3-5 fache reduziert.

Die produzierte C₆-HSL Konzentration (unterste Signale) schien sich in allen drei Stämmen zu ähneln. Bei den mittleren Signalen handelte es sich wahrscheinlich um C₅-HSL Moleküle.

Sensor *P. putida* F117 (pKR-C12)

Der Sensorstamm *P. putida* F117 (pKR-C12) produzierte in Gegenwart von C₁₂-HSL GFP (*Green fluorescent protein*). Die Bakterien wurden dafür, wie auf der Abbildung 3.34 zu sehen, auf eine Agarplatte ausgestrichen. Links sind das Auftragschema und rechts das Resultat des Experiments zu sehen.

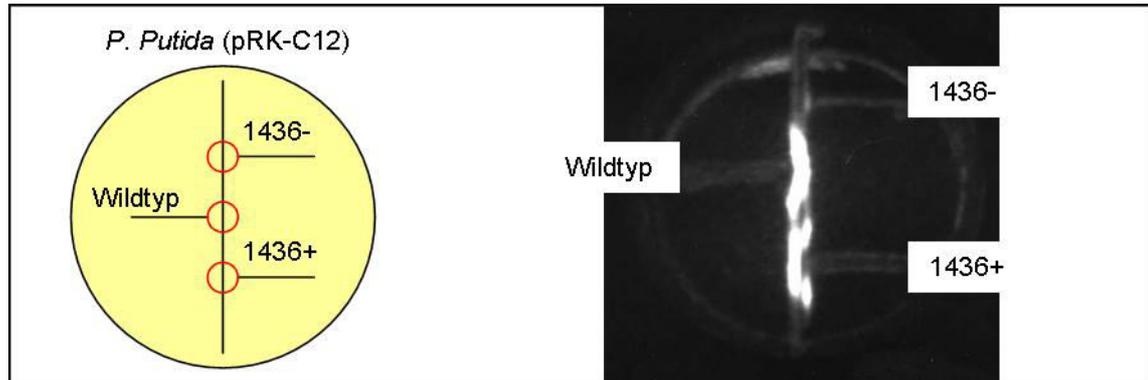


Abb.3.34: Nachweis von C₁₂-HSL mit dem Sensorstamm *P. putida* F117 (pKR-C12). Experiment von K. Riedel am Institut für Mikro- und Pflanzenbiologie Zürich.

Aus der Abb.3.34 geht hervor, dass der Wildtyp und der Revertant 1436+ C₁₂-HSL sezernierten, jedoch der Mutant 1436- stark eingeschränkt war. Dies konnte auch in einem quantitativen Assay gemessen werden, von dem leider war keine DC möglich war.

3.5.10 DC-Test für die Bildung von PQS

Die Bildung von PQS kann erst in der spätstationären Phase untersucht werden Dieser Versuch wurde von Susanne Häussler an der GBF in Braunschweig durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden nur der Wildtyp und die Mutante verwendet. Abbildung 3.35 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments.

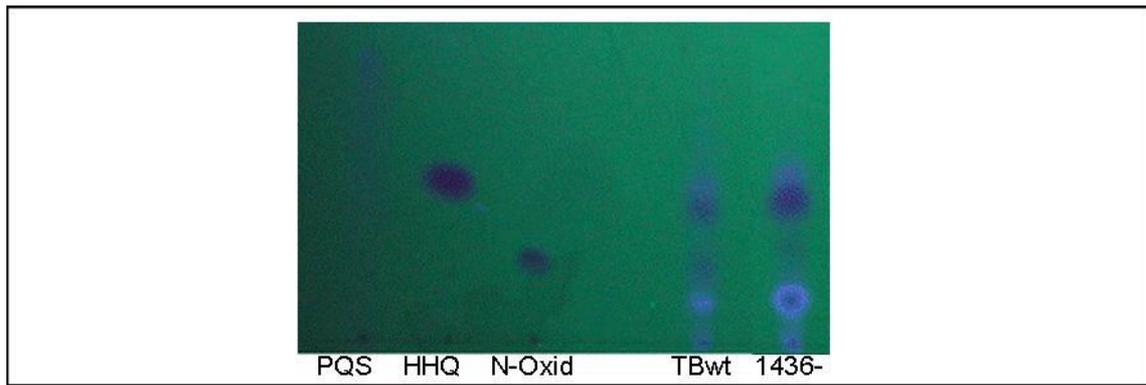


Abb.3.35: DC-Analyse der PQS Produktion im Mutanten und Wildtyp. Experiment von S. Häussler an der GBF in Braunschweig.

Wie auf dem Bild 3.35 zu sehen ist, produzierte die Mutante 1436- erheblich mehr PQS als der Wildtyp (stärkere Signale). Die komplementierte Mutante 1436+ war nicht untersucht worden.

Abschließend lässt sich zu den phänotypischen Untersuchungen bemerken, dass sich die komplementierte Mutante 1436+ in den Experimenten wie der Wildtyp selbst verhielt, also die Funktion des defekten Gens erfolgreich wiederhergestellt worden war. Um die Funktion von 1436 näher bestimmen zu können, sollte eine Transkriptomanalyse vom Mutanten 1436- und dem Wildtyp durchgeführt werden.

3.6 RNA Analysen

Anhand vorhandener Datensätze aus Transkriptomanalysen verschiedener Stämme, die unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen getestet worden waren, konnte gezeigt werden, dass die Expression von PA1436 sehr gering (20fach reduziert) im Gegensatz zu MexA, einem bekannten RND Efflux Transporter war. Einzig im ABC Medium ließ sich eine geringfügig erhöhte Expression nachweisen, weshalb dieses Medium für die Transkriptomanalyse mit dem GeneChip von Affymetrix ausgewählt worden war.

RNA wurde aus dem Wildtyp, der Mutante 1436-, sowie dem komplementierten Mutant 1436+ isoliert und anschließend in einer Northern Hybridisierung analysiert. Die Menge an mRNA von PA1436 war allerdings zu gering, um sie nachzuweisen. Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Menge der mRNA Transkripte überprüft. Dafür wurde eine lineare RT-PCR bezüglich des konstitutiv exprimierten Gens *lecB* durchgeführt. War genügend Produkt gebildet worden, erfolgte anschließend die Fragmentierung der cDNA zu 50 bis 200 bp großen Fragmenten. Zum Schluss wurden die cDNA-Fragmente markiert und die Hybridisierung auf den Affymetrix GeneChip konnte an dem Affymetrix Service Center an der GBF in Braunschweig erfolgen.

Zuerst erfolgte die Präparation der RNA, wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben. Abbildung 3.36 zeigt die Analyse der RNA auf einem formaldehydhaltigen 1,5%igen Agarosegel.

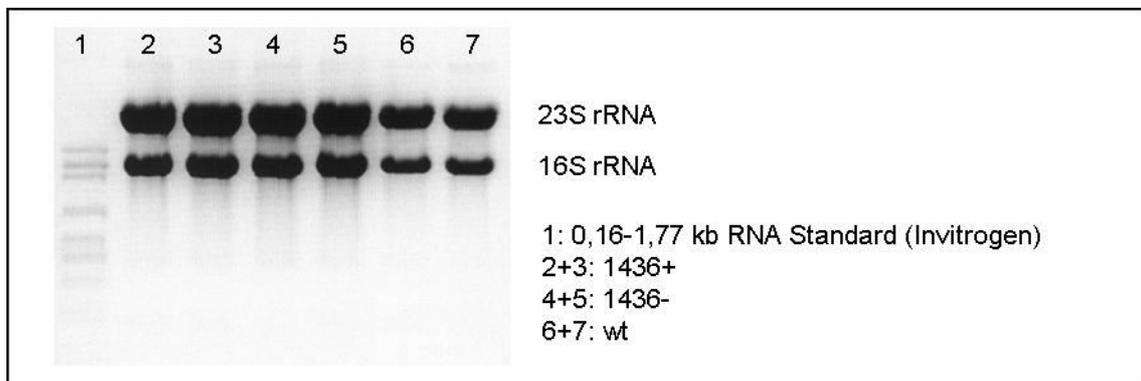


Abb.3.36: Analyse der RNA-Präparation auf einem formaldehydhaltigen 1,5%igen Agarosegel. Zu sehen sind die 16S und 23S rRNA.

Die Reinheit und Menge der RNA (es wurden jeweils 2µl RNA aufgetragen, Spur 2 bis 7) war ausreichend, um sie für die Umschreibung in cDNA zu verwenden. Dabei war die RNA-Präparation, wie auf der Abb.3.36 zu sehen ist, frei von genomischer DNA, welche die spätere Expressionsanalyse durch falschpositive Signale beeinträchtigen könnte. Zu sehen sind die 16S und die 23S rRNA. Der Standard in Spur 1 zeigt Fragmente in der Größe von 1,77; 1,52; 1,28; 0,78; 0,53; 0,40; 0,28 und 0,155 kb.

Bevor cDNA fragmentiert werden konnte, musste überprüft werden, ob konstitutiv exprimierte Gene, wie z.B. *rplU* oder *lecB* in ausreichender Kopienzahl vorlagen. Dafür wurde eine lineare RT-PCR durchgeführt. Abbildung 3.37 zeigt die Analyse der linearen RT-PCR für das *lecB* Gen auf einem 2%igen Agarosegel.

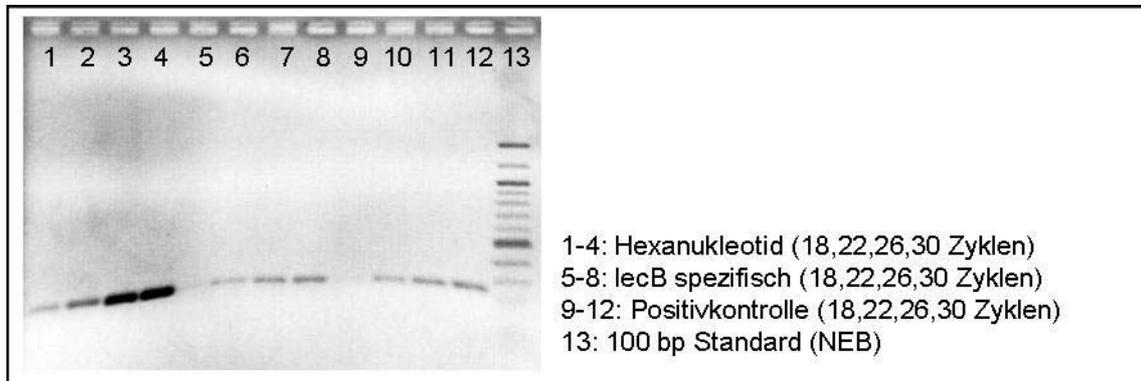


Abb.3.37: RT-PCR Analyse des konstitutiv exprimierten Gens *lecB*. Dafür wurde nach unterschiedlicher Zyklenzahl eine Probe aus der PCR entnommen. Auf dem Gel aufgetragen sind die Proben, die nach 18 Zyklen, 22 Zyklen, 26 Zyklen und 30 Zyklen aus den jeweiligen Ansätzen entnommen worden waren. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um *lecB* cDNA.

Wie in Abb.3.37 zu sehen ist, reichte die Menge von *lecB*-mRNA aus, um in ausreichender Menge in cDNA umgeschrieben werden zu können. Bereits nach 18 Zyklen (Spuren 1, 5, 9) konnte für alle Ansätze eine schwache Bande ausgemacht werden. Dabei beinhalteten die Spuren 1 bis 4 die Produkte bei Verwendung der Hexanukleotide nach 18, 22, 26 und 30 Zyklen. Durch Verwendung der Hexanukleotide wurde die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben und erst in der zweiten PCR wurden die *lecB* spezifischen Oligonukleotide eingesetzt. Durch den größeren Hintergrund an cDNA war nach 26 Zyklen ein deutlich höherer Anteil an spezifischem Produkt gebildet worden, als dies bei der Verwendung von den spezifischen Oligonukleotiden allein erreicht werden konnte. Zu sehen in den Spuren 7 und 11. Beim Einsatz der spezifischen Oligonukleotide wurden nur die *lecB* Transkripte in cDNA umgeschrieben und in der zweiten PCR wurden diese dann amplifiziert. Als Positivkontrolle diente eine spezifische cDNA (*lecB*), für die eine ausreichende Kopienzahl in der zweiten PCR nach 18 Zyklen erwartet werden konnte. Als Standard wurde ein 100 bp Marker (NEB) verwendet, dessen Fragmente eine Größe von 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp aufwiesen. Die Banden für 1500, 1000 und 500 bp sind in dem Gel hervorgehoben.

Nach dieser Analyse konnte die cDNA somit fragmentiert (Kapitel 2.8.2) und markiert (Kapitel 2.8.4) werden. Abbildung 3.38 zeigt die Fragmentation der cDNA auf einem 2%igen Agarosegel. Die Fragmente lagen alle in der erwarteten Größenordnung von 50 bis 200 bp vor. Als Marker zur Größenidentifizierung wurde der 100 bp Standard der Firma NEB verwendet.

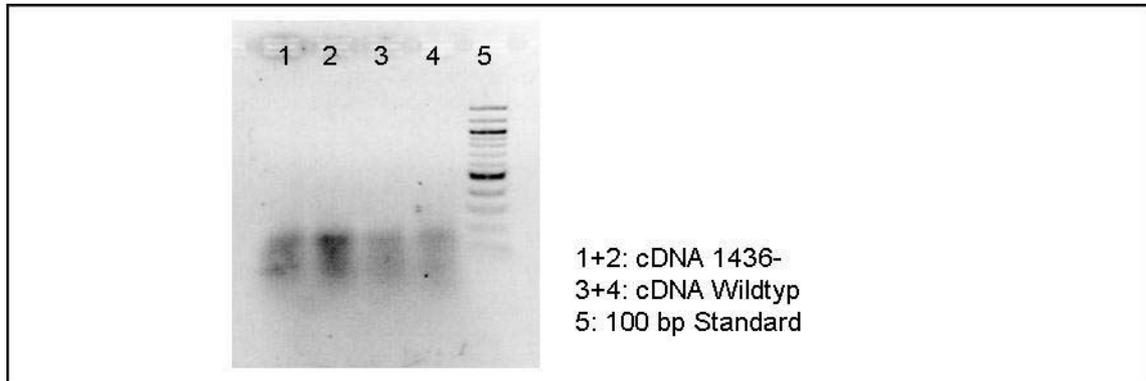


Abb.3.38: Kontrolle der fragmentierten cDNA auf einem 2%igen Agarosegel. Die Produkte lagen in der erwarteten Größe von 50 bis 200 bp vor.

Somit konnte die fragmentierte cDNA markiert werden und zur weiteren Verwendung an das Service Center von Affymetrix in Braunschweig gegeben werden. Die Ergebnisse der Hybridisierung der GeneChips wurden auf CD-ROM zugeschickt und konnten dann analysiert werden.

3.7 Auswertung GeneChip PA1436

Um die Rohdaten der GeneChips auswerten zu können, wurde der jeweilige Quotient aus den Signalintensitäten beider Mutanten und beider Wildtypen berechnet. Anschließend wurden die Quotienten der Vierfachvergleiche bestimmt. Mutant I zu Wildtyp I, Mutant I zu Wildtyp II und ebenso für Mutant II. Die berechneten Signalintensitätsquotienten wurden aufsteigend sortiert und das Signalverhältnis gegen die Anzahl der Gene logarithmisch dargestellt. Bei idealer Hybridisierung befand sich der Wendepunkt des Graphen bei eins. Abbildung 3.39 zeigt die Graphen für Mutant und Wildtyp.

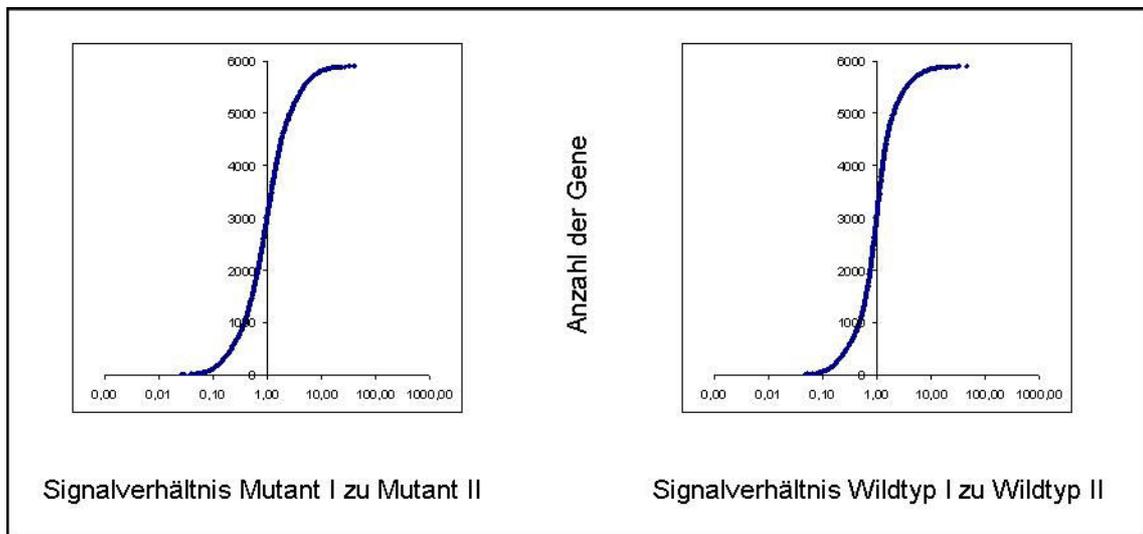


Abb.3.39: Vergleich der Graphen, die die Verteilung der Signalverhältnisse im Mutant und Wildtyp im Verhältnis zur Anzahl der Gene zeigt.

Wie der Abb.3.39 zu entnehmen ist, kann man sehen, dass die biologischen und technischen Replika einer Normalverteilung folgten und der Ansatz somit gerechtfertigt war. Über Bestimmung der statistischen Varianz wurde der Grenzwert bestimmt, bei dem nach Bonferroni-Korrektur das Signalverhältnis eines Gens von Wildtyp und Mutant als signifikant differentiell exprimiert angesehen werden konnte. Nach dieser Auswertung wurden die Gene, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%, die mehr als 5-fach differentiell exprimiert wurden, als signifikant reguliert betrachtet. Das Ergebnis für den GeneChip von PA1436 lautete deshalb:

- 1633 Gene nicht auswertbar, streuten zu sehr
- 462 Gene mindestens einmal auffällig verändert
- 3805 Gene nicht reguliert

Ebenso ließen sich die Signalintensitätsunterschiede aller ORFs im Vergleich in einem Plot-Diagramm darstellen. Abbildung 3.40 zeigt die veränderte Expression vom Mutanten 1436- im Vergleich zum Wildtyp.

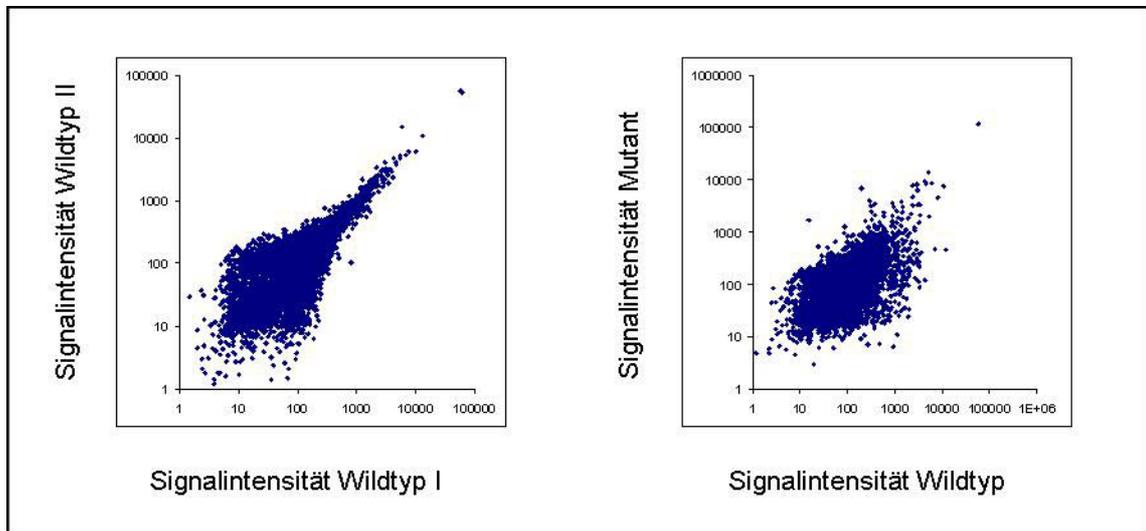


Abb.3.40: Plot-Diagramm der Signalintensitätsunterschiede aller ORFs. Zum einen ist der Vergleich des Wildtyps untereinander gezeigt, und zum anderen der Vergleich von Wildtyp zu Mutant.

Aus der Abb.3.40 ist gut zu erkennen, dass der Mutant im Gegensatz zum Wildtyp ein unterschiedliches Expressionsmuster besaß.

Die Gene, die im Mutanten unterschiedlich exprimiert worden waren, sind in den folgenden Tabellen 3.7 und 3.8 gezeigt. 39 Gene waren in der Mutante 1436- hoch reguliert und 100 Gene herab reguliert. Die Daten wurden nur tabellarisch zusammengefasst, da eine ausführlichere Beschreibung dieser Daten in der Diskussion erfolgt. Außerdem erfolgt die Beschreibung der Gene international, da auf eine Übersetzung verzichtet wurde.

Tab.3.7: ORFs die im Mutanten hoch reguliert waren.

ORF	Gen	Veränderung	Beschreibung
<u>Aminosäurebiosynthese und Metabolismus</u>			
PA0132		7,8	beta-alanine--pyruvate transaminase
<u>Sezernierte Faktoren (Toxine, Enzyme, Alginate)</u>			
PA2862	lipA	13,4	lactonizing lipase precursor
PA0843	plcR	7,4	phospholipase accessory protein PlcR precursor
<u>Zentraler Kohlenstoffmetabolismus</u>			
PA1502	gcl	8,6	glyoxylate carboligase
PA1779		11,6	assimilatory nitrate reductase
PA3582	glpK	8,8	glycerol kinase
PA3584	glpD	17,2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
<u>Zellwand/LPS/Kapsel</u>			
PA3148	wbpl	6,1	probable UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase Wbpl
PA3154	wzy	8,9	B-band O-antigen polymerase
<u>Adaptation und Schutz</u>			
PA2570	pa1L	9,2	PA-I galactophilic lectin
PA2920		9,8	probable chemotaxis transducer
<u>Proteinsekretion</u>			
PA1691	pscT	6,7	translocation protein in type III secretion
<u>Translation, Modifikation, Degradation</u>			
PA3049	rmf	9,7	ribosome modulation factor
<u>Putative Enzyme</u>			
PA0219		6,8	probable aldehyde dehydrogenase
PA1500		14,6	probable oxidoreductase
PA1737		8,2	probable 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
PA5384		7,1	probable lipolytic enzyme
PA0842		13,6	probable glycosyl transferase
<u>Mögliche transkriptionale Regulatoren</u>			
PA1136		7,0	probable transcriptional regulator
PA1264		18,7	probable transcriptional regulator
PA2121		6,2	probable transcriptional regulator
PA2447		17,3	probable transcriptional regulator
PA2551		8,1	probable transcriptional regulator
PA2766		8,5	probable transcriptional regulator
PA3565		6,7	probable transcriptional regulator
PA3973		12,1	probable transcriptional regulator
PA5525		7,1	probable transcriptional regulator
<u>Membranprotein/Transport kleiner Moleküle</u>			
PA0452		7,4	probable stomatin-like protein

PA0602		7,8	probable binding protein component of ABC transporter
PA0786		8,3	probable transporter
PA1144		7,9	probable MFS transporter
PA1302		9,5	probable heme utilization protein precursor
PA1626		9,9	probable MFS transporter
PA1632	kdpF	11,9	KdpF protein
PA1819		6,8	probable amino acid permease
PA3188		9,1	probable permease of ABC sugar transporter
PA3252		13,1	probable permease of ABC transporter
PA3264		7,8	probable transporter
PA3581	glpF	13,5	glycerol uptake facilitator protein

Aus der Auflistung ist zu sehen, dass im Mutanten wichtige Gene, wie die des Glyoxylatstoffwechsels und verschiedener Transporter hoch reguliert waren. Als weiteres wichtiges Gen war der Rmf (*ribosome modulating factor*) hoch reguliert.

Im Folgenden ist die Auflistung der herab regulierten Gene gezeigt.

Tab.3.8: ORFs die im Mutanten herab reguliert waren.

ORF Gen Veränderung Beschreibung

Las und RHL System

PA1431	rsaL	-33,0	regulatory protein RsaL
PA3476	rhII	-5,7	autoinducer synthesis protein RhII

Aminosäurebiosynthese und Metabolismus

PA0009	glyQ	-8,2	glycyl-tRNA synthetase alpha chain
PA3525	argG	-10,4	argininosuccinate synthase
PA3736	hom	-5,5	homoserine dehydrogenase
PA3814	iscS	-3,7	L-cysteine desulfurase (pyridoxal phosphate-dependent)
PA3834	valS	-15,6	valyl-tRNA synthetase
PA4443	cysD	-7,6	ATP sulfurylase small subunit
PA4449	hisG	-7,4	ATP-phosphoribosyltransferase
PA4560	ileS	-7,9	isoleucyl-tRNA synthetase
PA4694	ilvC	-8,4	ketol-acid reductoisomerase
PA4696	ilvI	-29,2	acetolactate synthase large subunit
PA4846	aroQ1	-8,6	3-dehydroquinate dehydratase
PA5170	arcD	-7,2	arginine/ornithine antiporter
PA5322	algC	-10,3	phosphomannomutase AlgC

Kohlenhydratstoffwechsel

PA0555	fda	-6,0	fructose-1,6-bisphosphate aldolase
PA0552	pgk	-6,3	phosphoglycerate kinase

PA2300	chiC	-8,2	chitinase
PA5161	rmlB	-6,2	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase
PA5351		-8,5	rubredoxin

Nukleinsäurebiosynthese und Metabolismus

PA1013	purC	-10,3	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
PA3770	guaB	-17,4	inosine-5 -monophosphate dehydrogenase
PA4756	carB	-9,8	carbamoylphosphate synthetase large subunit
PA4758	carA	-9,0	carbamoyl-phosphate synthase small chain

Zentraler Kohlenstoffmetabolismus

PA2193	hcnA	-63,4	hydrogen cyanide synthase HcnA
PA2194	hcnB	-8,9	hydrogen cyanide synthase HcnB
PA2195	hcnC	-13,5	hydrogen cyanide synthase HcnC
PA5549	glmS	-6,1	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase

Energiemetabolismus

PA1554		-12,7	probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)
PA1556		-86,1	probable cytochrome c oxidase subunit
PA1557		-8,0	probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)
PA1581	sdhC	-16,4	succinate dehydrogenase (C subunit)
PA1583	sdhA	-13,3	succinate dehydrogenase (A subunit)
PA1588	sucC	-6,3	succinyl-CoA synthetase beta chain
PA2637	nuoA	-10,3	NADH dehydrogenase I chain A
PA2639	nuoD	-7,3	NADH dehydrogenase I chain C,D
PA2647	nuoL	-10,3	NADH dehydrogenase I chain L
PA2648	nuoM	-4,2	NADH dehydrogenase I chain M
PA2951	etfA	-4,8	electron transfer flavoprotein alpha-subunit
PA2952	etfB	-9,2	electron transfer flavoprotein beta-subunit
PA2999	nqrA	-9,4	Na ⁺ -translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit Nrq1
PA3621	fdxA	-11,2	ferredoxin I
PA3635	eno	-5,5	enolase
PA4430		-24,9	probable cytochrome b
PA5553	atpC	-9,1	ATP synthase epsilon chain
PA5556	atpA	-28,3	ATP synthase alpha chain
PA5557	atpH	-11,4	ATP synthase delta chain
PA5558	atpF	-27,5	ATP synthase B chain

Sezernierte Faktoren (Toxine, Enzyme, Alginate)

PA0263	hcpC	-14,3	secreted protein Hcp
PA1901		-10,0	phenazine biosynthesis protein PhzC
PA1902		-29,3	phenazine biosynthesis protein PhzD
PA1903		-11,2	phenazine biosynthesis protein PhzE

PA1905	-20,5	probable pyridoxamine 5 -phosphate oxidase
PA4210	-14,1	probable phenazine biosynthesis protein
PA3724 lasB	-6,7	elastase LasB
<u>Zellwand/LPS/Kapsel</u>		
PA3337 rfaD	-32,2	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase
PA4479 mreD	-7,0	rod shape-determining protein MreD
<u>Transkriptionsregulatoren</u>		
PA0527 dnr	-7,3	transcriptional regulator Dnr
PA5274 mk	-4,5	nucleoside diphosphate kinase regulator
<u>Putative Enzyme</u>		
PA0658	-7,1	probable short-chain dehydrogenase
PA0996	-21,8	probable coenzyme A ligase
PA0998	-7,8	hypothetical protein
PA3330	-17,5	probable short chain dehydrogenase
PA1169	-37,4	probable lipoxygenase
PA2119	-18,6	alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)
PA2939	-11,0	probable aminopeptidase
PA3001	-6,7	probable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PA4131	-10,9	probable iron-sulfur protein
PA4175	-14,0	probable endoproteinase Arg-C precursor
PA4209	-8,6	probable O-methyltransferase
PA4434	-7,1	probable oxidoreductase
<u>Adaptation und Schutz</u>		
PA0594 surA	-10,9	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SurA
PA0595 ostA	-6,9	organic solvent tolerance protein OstA precursor
PA1008 bcp	-10,5	bacterioferritin comigratory protein
PA4235 bfrA	-19,2	bacterioferritin
<u>Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen</u>		
PA1546 hemN	-18,2	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
PA3397 fpr	-15,0	ferredoxin--NADP+ reductase
PA3653 fr	-15,2	ribosome recycling factor
<u>Fettsäuremetabolismus</u>		
PA0286	-3,4	probable fatty acid desaturase
PA1869	-20,7	probable acyl carrier protein
PA2967 fabG	-18,6	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase
PA2968 fabd	-5,6	malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase
PA3334	-11,7	probable acyl carrier protein
<u>Membranprotein/Transport kleiner Moleküle</u>		
PA2331	-10,8	hypothetical protein/Membrane proteins
PA2501	-48,1	hypothetical protein/Membrane proteins

PA2946	-8,4	hypothetical protein/Membrane proteins
PA2204	-35,5	probable binding protein component of ABC transporter
PA3313	-6,7	hypothetical protein/Transport of small molecules
PA3890	-3,3	probable permease of ABC transporter
PA4064	-6,1	probable ATP-binding component of ABC transporter
PA4765 omlA	-8,8	outer membrane lipoprotein OmlA
PA4770 lldP	-12,5	L-lactate permease
PA5468	-26,5	probable citrate transporter
<u>Proteinsekretion</u>		
PA3105 xcpQ	-9,9	general secretion pathway protein D
PA4142	-6,6	probable secretion protein
PA5128 secB	-8,9	secretion protein SecB
<u>Zellteilung</u>		
PA3244 minD	-10,5	cell division inhibitor MinD
PA5564 gidB	-7,3	glucose inhibited division protein B
<u>Andere</u>		
Pae_L37109	-5,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> type IV pilin (pilA) gene, complete cds.
PA0001 dnaA	-5,4	chromosomal replication initiator protein DnaA

Wichtige Gene, die im Mutanten herab reguliert waren, sind Gene der Aminosäurebiosynthese, des Kohlenhydratstoffwechsels, der Nukleinsäurebiosynthese, des Fettsäuremetabolismus, sowie Gene der oxidativen Phosphorylierung. Die Produktion von *Quorum sensing* Effektorproteinen war nicht beeinträchtigt. Nur die Gene für Sekretion, Phenazinbiosynthese und die *Quorum sensing* Regulatoren waren herab reguliert.

3.8 Auswertung GeneChip PA5349

Weiterhin wurde auch der Rubredoxin Reduktase Mutant einer Transkriptomanalyse unterzogen, weil es in der mit dem pLAFR3-Konstrukt komplementierten Mutante in einzelnen Fällen zu einer Reversion des Phänotyps kam. Die Auswertung wurde genau wie für die Analse des PA1436 GeneChips durchgeführt. Als Ergebnis kam folgendes dabei heraus:

1409 Gene	nicht auswertbar, streuten zu sehr
387 Gene	mindestens einmal auffällig verändert
4104 Gene	nicht reguliert

Auch in diesem Fall sind die Daten wurden nur tabellarisch zusammengefasst, da eine Interpretation der Daten in der Diskussion erfolgt. Außerdem erfolgt die Beschreibung der Gene international, da auf eine Übersetzung verzichtet wurde.

Tabelle 3.9 und 3.19 zeigen die Gene, die im Mutaten hoch (43) beziehungsweise herab (103) reguliert waren.

Tab.3.9: ORFs die im Mutanten hoch reguliert waren.

<u>ORF</u>	<u>Gen</u>	<u>Veränderung</u>	<u>Beschreibung</u>
<u>Aminosäurebiosynthese</u>			
PA0865	hpd	28,5	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
PA0132		8,0	beta-alanine--pyruvate transaminase
<u>Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus</u>			
PA4813	lipC	12,6	lipase LipC
<u>Kohlenhydratstoffwechsel</u>			
PA2862	lipA	14,1	lactonizing lipase precursor
PA3181		19,5	2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase
<u>Zentraler Kohlenstoffmetabolismus</u>			
PA3582	glpK	9,1	glycerol kinase
PA3584	glpD	16,2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
<u>Transport kleiner Moleküle, Membranproteine</u>			
PA0323		14,2	probable binding protein component of ABC transporter
PA0476		13,7	probable permease
PA1302		16,3	probable heme utilization protein precursor
PA1626		10,1	probable MFS transporter
PA2219	opdE	12,9	opdE /DEF=membrane protein OpdE
PA3252		11,7	probable permease of ABC transporter
PA3581	glpF	10,1	glycerol uptake facilitator protein

PA5287	amtB	8,1	ammonium transporter AmtB
PA4023		29,8	probable transport protein
<u>Zellwand/LPS/Kapsel</u>			
PA1077	flgB	11,1	flagellar basal-body rod protein FlgB
PA3145	wbpL	25,8	glycosyltransferase WbpL
PA3541		9,6	alginate biosynthesis protein Alg8
<u>Putative Enzyme</u>			
PA0657		8,1	probable ATPase
PA0842		11,0	probable glycosyl transferase
PA1014		9,4	probable glycosyl transferase
PA1225		11,2	probable NAD(P)H dehydrogenase
PA1500		17,4	probable oxidoreductase
PA1537		8,1	probable short-chain dehydrogenase
PA1984		10,9	probable aldehyde dehydrogenase
PA2188		10,7	probable alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)
PA3217		11,9	probable adenylate cyclase
PA3427		8,7	probable short-chain dehydrogenases
PA3509		10,1	probable hydrolase
<u>Transkriptionsregulatoren</u>			
PA1136		11,4	probable transcriptional regulator
PA1264		14,8	probable transcriptional regulator
PA2100		17,2	probable transcriptional regulator
PA3133		9,1	probable transcriptional regulator
PA3973		9,7	probable transcriptional regulator
PA4147	acoR	6,5	transcriptional regulator AcoR
PA5380		9,1	probable transcriptional
<u>Energiemetabolismus</u>			
PA2716		9,5	probable FMN oxidoreductase
PA3416		40,8	probable pyruvate dehydrogenase E1 component, beta chain
<u>Andere</u>			
PA2944	cobN	8,3	cobalamin biosynthetic protein CobN
PA0441		18,6	dihydropyrimidinase
PA4553	pilX	7,6	type 4 fimbrial biogenesis protein PilX
PA2920		14,5	probable chemotaxis transducer

Wichtige Gene, die im Mutanten 5349- hoch reguliert waren, betrafen Gene der Glycerinverarbeitung und des Stoffwechsels.

Im Folgenden werden die Gene gezeigt, die im Mutanten herab reguliert waren.

Tab.3.10: ORFs die im Mutanten herab reguliert waren.

<u>ORF</u>	<u>Gen</u>	<u>Veränderung</u>	<u>Beschreibung</u>
<u>Las Rhl System</u>			
PA1431	rsaL	-62,5	regulatory protein RsaL
PA1432	lasI	-10,2	autoinducer synthesis protein LasI
PA3477	rhIR	-5,9	transcriptional regulator RhIR
<u>Adaptation und Schutz</u>			
PA0595	ostA	-14,3	organic solvent tolerance protein OstA precursor
PA1002	phnB	-17,8	anthranilate synthase component II
PA3331		-9,6	cytochrome P450
PA3625	surE	-10,8	survival protein SurE
PA4235	bfrA	-23,1	bacterioferritin /FUNCTION=Adaptation, protection; Transport of small molecules
<u>Aminosäurebiosynthese und Metabolismus</u>			
PA0399		-7,2	cystathionine beta-synthase
PA0649	trpG	-8,9	anthranilate synthase component II
PA1757	thrH	-10,6	homoserine kinase
PA1812	mltD	-19,0	membrane-bound lytic murein transglycosylase D precursor
PA3014	faoA	-6,0	fatty-acid oxidation complex alpha-subunit
PA3139		-5,8	probable amino acid aminotransferase
PA3166	pheA	-7,9	chorismate mutase
PA3834	valS	-23,1	valyl-tRNA synthetase
PA3525	argG	-17,1	argininosuccinate synthase
PA4694	ilvC	-40,5	ketol-acid reductoisomerase
PA4696	ilvI	-17,4	acetolactate synthase large subunit
PA5263	argH	-4,3	argininosuccinate lyase
PA5322	algC	-10,5	phosphomannomutase AlgC
<u>Zentraler Kohlenstoffmetabolismus</u>			
PA2195	hcnC	-4,6	hydrogen cyanide synthase HcnC
PA4031	ppa	-8,1	inorganic pyrophosphatase
PA5570	rpmH	-137,3	50S ribosomal protein L34
<u>Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus</u>			
PA2967	fabG	-9,2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase
PA2968	fabD	-12,4	malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase
PA1869		-11,8	probable acyl carrier protein
PA4847	accB	-5,5	biotin carboxyl carrier protein (BCCP)
<u>Nukleinsäurebiosynthese und Metabolismus</u>			
PA3770	guaB	-8,1	inosine-5 -monophosphate dehydrogenase

PA3807	ndk	-11,2	nucleoside diphosphate kinase
<u>Energiemetabolismus</u>			
PA0195	pntA	-8,9	still frameshift pyridine nucleotide transhydrogenase alpha subunit
PA0548	tktA	-13,9	transketolase
PA1552		-25,8	probable cytochrome c
PA1581	sdhC	-13,0	succinate dehydrogenase (C subunit)
PA1582	sdhD	-9,8	succinate dehydrogenase (D subunit)
PA1583	sdhA	-26,0	succinate dehydrogenase (A subunit)
PA1588	sucC	-10,6	succinyl-CoA synthetase beta chain
PA2999	nqrA	-10,4	Na ⁺ -translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit Nrq1
PA3621	fdxA	-20,3	ferredoxin I
PA4133		-12,0	cytochrome c oxidase subunit (cbb3-type)
PA4429		-18,4	probable cytochrome c1 precursor
PA3635	eno	-10,7	enolase
PA5553	atpC	-10,9	ATP synthase epsilon chain
PA5555	atpG	-10,8	ATP synthase gamma chain
PA5557	atpH	-54,2	ATP synthase delta chain
PA5558	atpF	-13,7	ATP synthase B chain
PA5559	atpE	-9,1	atp synthase C chain
PA5560	atpB	-3,6	ATP synthase A chain
<u>Sezernierte Faktoren (Toxine, Enzyme, Alginate)</u>			
PA0263	hcpC	-24,9	secreted protein Hcp
PA1901	PhzC	-47,0	phenazine biosynthesis protein PhzC
PA1902	PhzD	-18,8	phenazine biosynthesis protein PhzD
PA1903	PhzE	-35,0	phenazine biosynthesis protein PhzE
PA1904		-8,2	probable phenazine biosynthesis protein
PA1905		-47,6	probable pyridoxamine 5 -phosphate oxidase
<u>Proteinsekretion</u>			
PA4403	secA	-6,7	secretion protein SecA
PA5128	secB	-12,2	secretion protein SecB
<u>Zellwand/LPS/Kapsel</u>			
PA1084	flgI	-5,4	flagellar P-ring protein precursor FlgI
PA3337	rfaD	-25,9	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase
PA3644	lpxA	-7,0	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase
PA5161	rmlB	-9,8	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase
<u>Chaperone und Hitzeschockproteine</u>			
PA0837	slyD	-11,9	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD
PA1800	tig	-28,9	trigger factor
PA4572	fkIB	-19,7	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkIB

Transport kleiner Moleküle und Membranproteine

PA0157		-6,9	probable RND efflux membrane fusion protein precursor
PA0283	sbp	-7,9	sulfate-binding protein precursor
PA0973	oprL	-7,4	outer membrane protein OprL precursor
PA2204		-76,2	probable binding protein component of ABC transporter
PA3441		-10,2	probable molybdopterin-binding protein
PA4064		-10,5	probable ATP-binding component of ABC transporter
PA4243	secY	-5,8	secretion protein SecY
PA4770	lldP	-10,2	L-lactate permease
PA5468		-12,9	probable citrate transporter

Putative Enzyme

PA0293		-7,9	probable hydratase
PA0372		-5,3	probable zinc protease
PA0658		-7,3	probable short-chain dehydrogenase
PA0996		-14,7	probable coenzyme A ligase
PA1169		-40,4	probable lipoxygenase
PA2067		-14,9	probable hydrolase
PA2069		-10,8	probable carbamoyl transferase
PA2119		-18,0	alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)
PA3001		-28,3	probable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PA2634		-23,8	probable isocitrate lyase
PA3330		-26,0	probable short chain dehydrogenase
PA4131		-36,6	probable iron-sulfur protein
PA4190		-4,5	probable FAD-dependent monooxygenase
PA4209		-6,4	probable O-methyltransferase
PA4715		-9,9	probable aminotransferase

Zwei Komponenten Sensor

PA0757		-6,7	probable two-component sensor
--------	--	------	-------------------------------

Transkriptionsregulatoren

PA0547		-12,2	probable transcriptional regulator
PA1663		-5,4	probable transcriptional regulator
PA2469		-4,0	probable transcriptional regulator
PA3204		-11,4	probable two-component response regulator
PA3898		-5,9	probable transcriptional regulator
PA5274	rnk	-11,5	nucleoside diphosphate kinase regulator
PA5438		-6,5	probable transcriptional regulator

Chemotaxis

PA0409	pilH	-6,0	twitching motility protein PilH
--------	------	------	---------------------------------

Biosynthese von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen

PA1278	cobP	-9,2	cobinamide kinase
--------	------	------	-------------------

PA1546	hemN	-49,2	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
PA3397	fpr	-37,3	ferredoxin--NADP+ reductase
PA3653	frr	-7,4	ribosome recycling factor
PA4569	ispB	-11,9	octaprenyl-diphosphate synthase
PA4893	ureG	-5,3	urease accessory protein UreG
<u>Andere</u>			
PA0852	cpbD	-21,0	chitin-binding protein CbpD precursor

Wichtige Gene, die im Mutanten 5349- herab reguliert waren, betrafen Gene der Aminosäurebiosynthese, der Nukleinsäurebiosynthese, des Fettsäuremetabolismus, sowie Gene des Energiemetabolismus. Des Weiteren waren Gene der Phenazinsynthese, der Sekretion und die Gene der *Quorum sensing* Regulatoren beeinträchtigt. Ein weiteres wichtiges Gen, die *fpr* (*ferredoxin-NADP+ reductase*) war zudem herab reguliert.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, *P. aeruginosa* TB *Tn5 knock out* Mutanten einer STM-Bank [Doktorarbeit Wiehlmann, 2001] *in trans* zu komplementieren und anschließend die Funktion dieser Gene zu bestimmen. Zur Anwendung kam dabei eine pLAFR3 Cosmid-Bank, die zufällig fragmentierte *P. aeruginosa* SG17M DNA enthält [Dissertation Larbig, 2001] und der *shuttle vector* pUCP20, in den die polycistronischen Genkassetten kloniert worden sind. Anschließend erfolgte in beiden Fällen die genetische sowie phänotypische Überprüfung der Komplementation. Außerdem wurde von einigen Mutanten eine Transkriptomanalyse mittels *P. aeruginosa* PAO GeneChips von Affymetrix durchgeführt. Des Weiteren wurde der Vektor pLAFR3 sequenziert und annotiert.

4.1 Komplementation mit der pLAFR3-Bank

Für den Nachweis der Komplementation des *Quorum sensing* eignet sich der allgemeine Proteasenachweis, ein schneller und einfacher Nachweis für die Produktion von Proteasen auf Caseinagar. Die wichtigsten Proteasen, die in der Lage sind, Casein zu degradieren, sind die LasB Protease, die alkalische Protease und Protease IV. Alle Proteasen spielen eine wichtige Rolle während der akuten Infektion mit *P. aeruginosa*, die LasB Protease ist dabei einer der wichtigsten Virulenzfaktoren, die dabei gebildet werden und das Protein Elastin zerstören [van Delden, 2004]. Protease IV ist im Abbau der Komponenten des Komplementsystems (Cq1 und C3), Fibrinogen, Immunoglobulin G, Plasmin und Plasminogen involviert [Engel *et al.*, 1998]. Die alkalische Protease ist ebenso daran beteiligt, Teile des Komplementsystems sowie Fibrin und Fibrinogen abzubauen [Shibuya *et al.*, 1991], wobei die LasB Protease diejenige mit der höchsten proteolytischen Aktivität ist [Galloway, 1991]. Die Expression der LasB und der alkalischen Protease wird in *P. aeruginosa* *Quorum sensing* abhängig reguliert [Latifi *et al.*, 1995].

Für die Komplementation mit der pLAFR3-Bank konnte auch nach mehrmaligem Wiederholen der triparentalen Konjugation kein einziger Klon gefunden werden, der eine stabile phänotypische Komplementation aufwies. Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnte bewiesen werden, dass die Komplementation auf genetischer Ebene funktionierte. Durch nachfolgende Experimente ist allerdings gezeigt worden, dass die Expressionsrate der auf den pLAFR3-Konstrukten kodierten Gene zu gering war, als dass sie eine Veränderung des Phänotyps hätten bewirken können. Nur einer von 10^8 Klonen exprimierte die Gene unter oxidativem Stress, wie für den komplementierten Mutanten 5349+ gezeigt worden war. Ebenso wurde durch die EM-Aufnahmen für den komplementierten Mutanten 1441+ gezeigt, dass einzelne Bakterien durchaus das auf dem pLAFR3-Konstrukt kodierte Gen *fliK* exprimierten und somit einen wildtypähnlichen Phänotyp hervorriefen.

Die Komplementation mit der pLAFR3-Bank konnte zeigen, dass das mutierte Gen kausal für den beobachteten Phänotyp verantwortlich war. Allerdings waren weiterführende Untersuchungen dieser komplementierten Mutanten aufgrund der zu geringen Expressionsrate der pLAFR3-Konstrukte nicht möglich. Deswegen musste für die Charakterisierung der Gene ein alternativer Ansatz der Komplementation gefunden werden. Zur Analyse dieser Problematik sollte pLAFR3 sequenziert werden, ob sich vielleicht Gründe für das Scheitern der stabilen Expression von Genen auf pLAFR3 aus der Sequenz ableiten lassen.

4.1.1 Annotation pLAFR3

Zur weiteren Untersuchung war pLAFR3 sequenziert und annotiert worden. Wie aus den Sequenzvergleichen entnommen werden konnte, stammt pLAFR3 direkt von pLAFR1 [Vanbleu *et al.*, 2004] ab und beide haben ihren Ursprung in dem Plasmid RK2 [Pansegrau *et al.*, 1994], ein Mitglied der IncP α Plasmidfamilie. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind der Klonierungsvektor pRK310 mit einer Länge von 19041 bp [Marx und Lidstrom, 2001], dessen ORFs eine 99 bis 100%ige Ähnlichkeit zu pLAFR3 aufwiesen und der *Binary vector* pCLD04541 mit einer Länge von 27608 bp (AF184978). Ein Teil seiner Sequenzabschnitte besitzt ebenfalls eine 99 bis 100%ige Homologie zu pLAFR3. 22 ORFs konnten für pLAFR3 bestimmt werden. Die Gene sind in sogenannten Clustern angeordnet, nämlich den Clustern für Transfer, Konjugation, Partitioning, Replikation und Resistenz.

Vier für den Transfer wichtige ORFs, nämlich *trbABCD* sind identifiziert worden. Für das IncI1 Plasmid R64 wurde gezeigt, dass *trbA* und *trbC* für den Transport unerlässlich sind und *trbB* für die Effizienz des Transfers benötigt wird [Furuya und Komano, 1996].

Das Cluster für die Konjugation ist nicht vollständig, deswegen wurde für die Übertragung von pLAFR3 in die Rezipientenzellen ein Helferplasmid benötigt, welches die zusätzlichen Gene trägt (triparentale Konjugation). Für die Konjugation werden normalerweise fünf Gruppen an Genen benötigt. Die Erste zeigt sich verantwortlich für den DNA Transport, die Zweite für die F-Pilusbildung und -Bewegung, die Dritte für die Mating-Paar-Stabilisierung, die Vierte für die *surface and entry exclusion* und des weiteren die fünfte Gruppe an Genen, die die Regulation der Transferegene steuert. Die Gene *traJ* (OriT *recognizing protein*), *-K*, *-M* sind auf pLAFR3 identifiziert worden, sie stellen aber nur einen Teil des Konjugations-Clusters dar.

Das *broad host range* IncP α Plasmid RK2 besitzt zwei Möglichkeiten der Vermehrung, zum einen die vegetative Replikation, die zu einer Duplikation der Plasmide während der Zellteilung führt [Thomas *et al.*, 1989] und zum anderen die Replikation während des Transfers in eine Rezipientenzelle unabhängig von der Zellteilung der Donorzelle [Guiney *et al.*, 1989]. Damit bei der Replikation die Mutter-, sowie die Tochterzelle dieselbe Anzahl an Plasmiden erhalten, muss diese Verteilung reguliert werden. Dieser Prozess wird durch das Partitioning gesteuert. Die Regulationsfunktionen des Partitioning

sind in einer so genannten *central control region (ctl)* kodiert. Die *ctl* koordiniert die Expression der Replikations- und Transfergene sowie die gleichmäßige Verteilung der Plasmidkopien auf die neu gebildeten Zellen während der Zellteilung. In der *ctl* von RK2 sind drei polycistronische Genkassetten zusammengefasst. Zum einen das Kor-Operon, *korA*, *incC*, *korB*, *-F*, *-G*, wobei KorA und KorB mit Hilfe eines weiteren globalen Regulators TrbA die Replikation und den Transfer der IncPα Plasmide koordinieren [Pansegrau *et al.*, 1994; Zatyka *et al.*, 1994]. Zum anderen sind in der *ctl* das Gen *kfrA* und die bicistronische Genkassette mit den Genen *upf54.8* und *upf54.4* vorhanden [Pansegrau *et al.*, 1994]. pLAFR3 enthält somit die komplette *ctl*.

Das Cluster für die Replikation umfasst die beiden Gene *trfA* (*trans acting replication*) und *ssb* (*single strand binding protein*). TrfA ist essentiell für die Replikation von RK2 in gram-negativen Wirten [Ayres *et al.*, 1993] und initiiert die Replikation am OriV. Außerdem wird vermutet, dass eine TrfA abhängige RK2 Plasmidsynthese an der inneren Membran von diversen gram-negativen (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *S. typhimurium* und *Rhodobacter sphaeroides*) stattfindet [Banack *et al.*, 2000].

Damit RK2 den Wechsel zwischen Replikation und Transfer durchführen kann, dominiert der *trfA* Promotor (Replikation) über den *trbA* Promotor (konjugativer Transfer) und KorA ist wichtig für die Balance der Genexpression, die diese alternativen Wege der Plasmidvermehrung steuern kann [Jagura-Burdzy und Thomas, 1997].

Neben dem OriT für *origin of transfer* und dem OriV *origin of replication*, existieren noch die Gene *tetR* und *tetA* für die Tetrazyklinresistenz, wobei TetR als Repressor fungiert.

Anhand der Sequenziererergebnisse lässt sich abschliessend sagen, dass pLAFR3 alle nötigen Gene, bis auf die des Konjugations-Clusters besitzt, die ihm ein Verweilen und einen effizienten Transfer in die Rezipientenzelle ermöglichen. Allerdings ist die Expressionsrate von Genen auf pLAFR3 als sehr gering einzuschätzen, denn nur 1 von 10^8 Klonen zeigte einen Phänotyp, der dem des Wildtyps ähnelte. Somit scheint es sich dabei um ein *P. aeruginosa* abhängiges Problem zu handeln, wenn die Gene nicht in ausreichender Menge exprimiert werden. Damit lässt sich sagen, dass sich pLAFR3 für die Komplementation von *P. aeruginosa* Mutanten nicht eignet, um phänotypische Analysen durchführen zu können.

4.2 Komplementation *in trans* mit pUCP20-Konstrukten

Als alternative Komplementation wurde auf den *shuttle vector* pUCP20 zurückgegriffen, in den die jeweiligen polycistronischen Genkassetten kloniert worden waren. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil vermutet wurde, dass die Gene in polycistronischen Genkassetten angeordnet sind. Um Schwierigkeiten, die bei Einzelgenklonierungen auftauchen könnten, wie polare Effekte, zu minimieren, wurde auf den wesentlich schwierigeren Ansatz der polycistronischen Genkassettenklonierung zurückgegriffen.

Auf genetischer Ebene ließ sich wie bei pLAFR3 die Komplementation nachweisen. Allerdings konnte nur für zwei Konstrukte eine Komplementation des Phänotyps auf Caseinagar (allgemeiner Proteasenachweis) nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich zum einen um das Gen *lemA* (ORF PA0928) und zum anderen um einen RND Efflux Transporter (ORF PA1436=MexN). Für die anderen untersuchten Gene, wie PA0447, PA1288, PA4621, PA2751 muss somit angenommen werden, dass die beobachtete Veränderung bezüglich des *Quorum sensing* auf Sekundärmutationen beruht. Der ORF PA0928 wurde nicht weiter untersucht, da das Gen *lemA*, schon durch andere Arbeitsgruppen phänotypisch charakterisiert worden war [Brinkmann *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 1999]. Daher wurden die weiteren phänotypischen Untersuchungen nur mit der komplementierten Mutante MexN+ fortgeführt. Zuerst soll dabei auf die Funktion des Gens PA1436 eingegangen werden, die ihm in der PAO1 Datenbank zugewiesen wurde, nämlich als RND Efflux Transporter.

In silico Analysen zeigten für den ORF PA1436 eine große Homologie zu dem ORF PA2527, der wiederum eine große Ähnlichkeit zu YegN aus *E. coli* aufwies. Das Gen PA2527 liegt in dem Gen-Cluster PA2526-PA2527-PA2528. Zudem erschien 2005 eine Publikation, die das Gen-Cluster PA1435-PA1436 in Verbindung mit OprM als MexMN-OprM Multidrug Efflux Pumpe vom Typ RND (*Resistance, Nodulation, Division*) beschrieb [Mima *et al.*, 2005]. Somit handelt es sich bei dem ORF PA1436 um MexN. Als nächstes soll zuerst auf die Funktion von MDR Pumpen allgemein eingegangen werden, bevor die Funktion von MexN näher betrachtet wird.

4.2.1 MDR (*multidrug resistance transporter*) Transporter

Es gibt fünf charakterisierte Superfamilien von MDR Transportern. Die MFS (*major facilitator superfamily*), ABC (*ATP-binding cassette superfamily*), SMR/DMT (*small multidrug resistance/Drug metabolite transporter*), MATE (*multi antimicrobial extrusion*) und RND (*Resistance, Nodulation, Division*) Transporter. Eine Übersicht einiger Transporter ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

Die Transporter der ABC Familie nutzen die ATP Hydrolyse, um Substrate aus dem Zellinneren auszuschleusen, während die Mitglieder der MFS, RND, MATE und DMT Familien den Antiport Mechanismus (Substrat: $H^+ Na^+$) verwenden, um die Substrate und andere Stoffe auszuschleusen [Saier und Paulsen, 2001].

Die Multidrug Transporter sowie substratspezifische Effluxsysteme führen zu einer klinisch signifikanten Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Agenzien in pathogenen Bakterien, Pilze, Parasiten und humanen Krebszellen [Paulsen *et al.*, 1996; Nikaido, 1994; Van Bambeke *et al.*, 2000]. Die bisher untersuchten Mitglieder der RND Transporter katalysieren den Substrat Efflux via Protonen Antiport Mechanismus. Diese Proteine sind in Bakterien, Archaeen und Eukaryonten gefunden worden. Der RND Efflux Transporter agiert mit einem *membrane fusion protein* (MFP) und einem *outer membrane factor* (OMF) zusammen, um die Substrate direkt aus dem Zellinneren über beide Membranen hinweg nach außen zu transportieren [Zgurskaya und Nikaido, 2000]. Diese Pumpen besitzen ein breites Spektrum an Substraten. Dazu gehören Medikamente, organische Komponenten (Toluene, Alkane), Isoflavonoide, Fettsäuren, Gallsalze, Steroide, antibakterielle Peptide und Homoserinlactone [Saier und Paulsen, 2001].

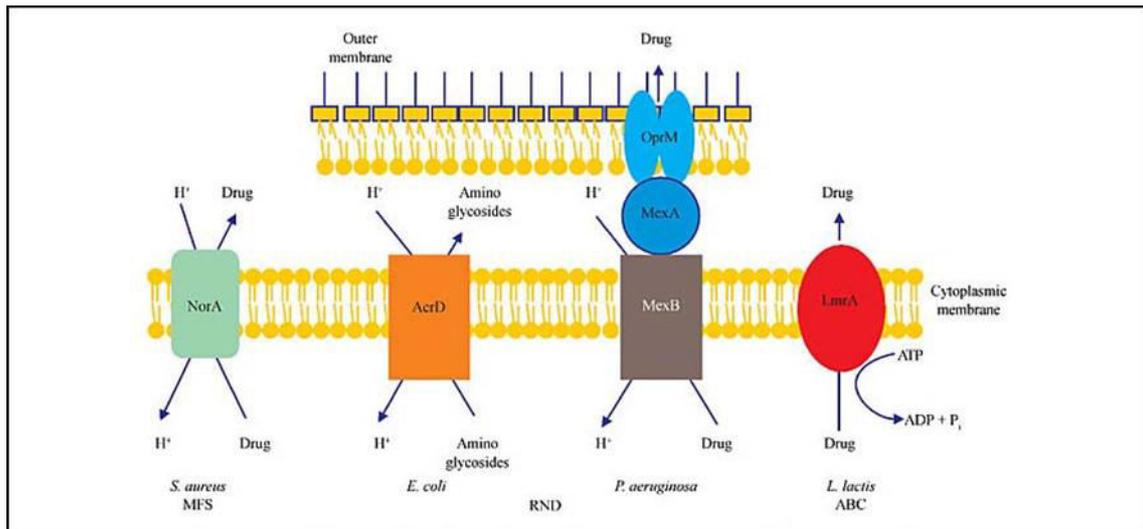


Abb.4.1: Übersicht über die Haupttypen bakterieller MDR Efflux Pumpen in *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *Lactobacillus lactis*. Dargestellt ist NorA, ein Mitglied der MFS Familie; AcrD und MexAB-OprM, zwei Mitglieder der RND Familie und LmrA, ein Mitglied der ABC Familie. Alle Systeme schleusen die Metabolite über einen energieabhängigen Mechanismus nach außen. Die anderen Systeme wie MATE und DMT sind strukturell der MFS Familie sehr ähnlich, aber aufgrund ihrer phylogenetischen Diversität anderen Familien zugeordnet worden. [Quelle: Schweizer, 2003].

4.2.2 Struktur eines RND Efflux Transporters

Für den RND Efflux Transporter AcrAB-TolC aus *E. coli* konnte die Struktur aufgeklärt werden [Koronakis *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2002; Akama *et al.*, 2004; Higgins *et al.*, 2004]. AcrB und TolC sind Homotrimeren, die eine lange periplasmatische Domäne beinhalten. Es scheint, als würde sich die tunnelartige Öffnung des AcrB Kopfstücks perfekt in das proximale röhrenförmige Ende von TolC einfügen. Higgins *et al.* haben zudem postuliert, dass ein Ring von neun AcrA Monomeren eine Hülle um die periplasmatische α -Barrel Domäne von TolC und der distalen Domäne von AcrB bilden. Nach dieser Ansicht verbindet die AcrA Untereinheit AcrB und TolC, um einen Transmembrankomplex von 270 Å Länge zu bilden, der groß genug ist, beide Membranen und den periplasmatischen Raum zu durchspannen.

Anhand der 3D Struktur des AcrB Trimers (Abbildung 4.2) wurden drei große Vorhöfe entdeckt, die zu einer zentralen Höhle innerhalb der Pumpe führen, was eventuell Substraten aus dem periplasmatischen Raum Zugang zu der Pumpe verschafft und als Bindungsstelle dienen könnte. Durch Ko-Kristallisationsstudien konnte eine Bindung für nicht verwandte Substrate in der zentralen Höhle nachgewiesen werden [Yu *et al.*, 2003]. Die Spezifität der MDR Transporter, kann durch das Vorhandensein einer hydrophoben, flexiblen zentralen Höhle erklärt werden, die unterschiedliche Strukturen mit multiplen hydrophoben Enden, durch Interaktion von Liganden über Wasserstoffbrückenbindung und geladenen Gruppen für elektrostatische Interaktionen mit anionischen und

kationischen Substraten, erkennt. Geladene und aromatische Enden sind wichtig für die Ligandenspezifität verschiedener MDR Transporter [Langton *et al.*, 2005].

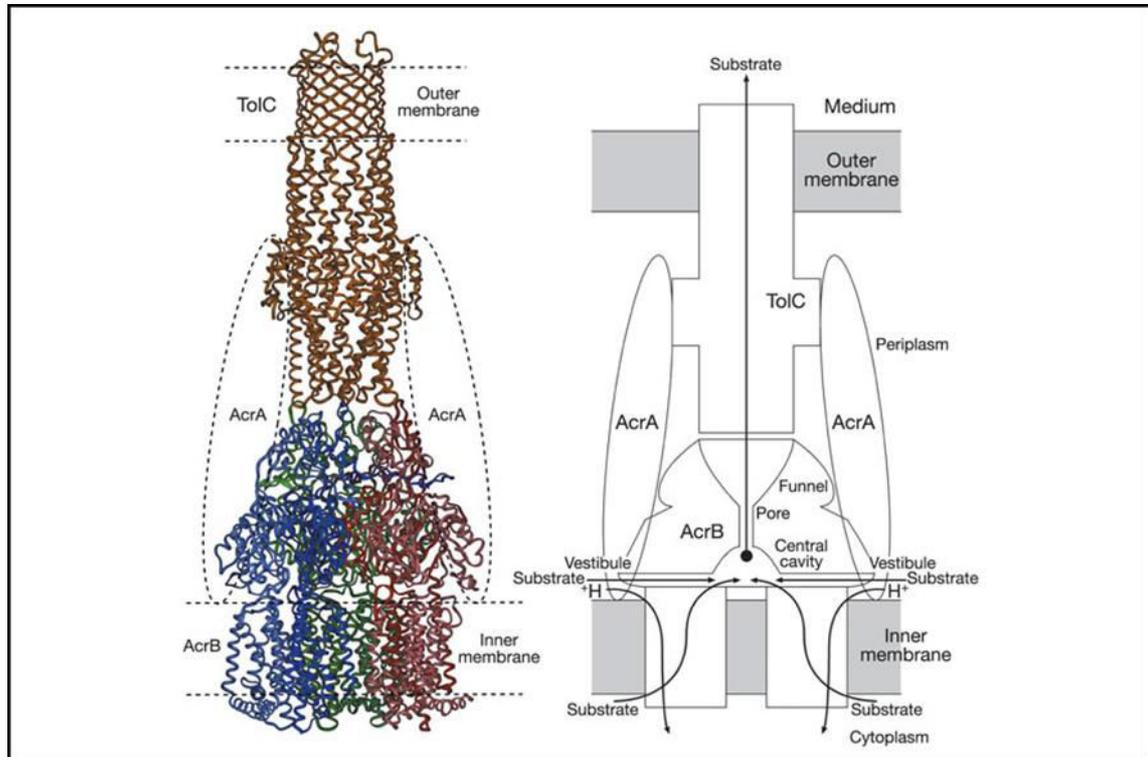


Abb.4.2: Modell des AcrAB-TolC Komplex aus *E. coli* und der schematische Mechanismus des Substrat Exports durch das AcrAB-TolC System [Murakami *et al.*, 2002].

4.2.3 RND Efflux Transporter in *P. aeruginosa*

In *P. aeruginosa* sind laut Genomanalysen 12 potentielle RND Efflux Transporter vorhanden [Stover *et al.*, 2000]. Bei 7 von diesen Transportern ist diese Funktion bisher experimentell bestätigt worden. MexAB-OprM [Poole *et al.*, 1993], MexCD-OprJ [Poole *et al.*, 1996], MexVW-OprM [Li *et al.*, 2003], MexEF-OprN [Köhler *et al.*, 1997], MexGHI-OpmD [Aendekerk *et al.*, 2002], MexJK [Chuanchuen *et al.*, 2002] und MexXY [Mine *et al.*, 1999; Westbrook-Wadman *et al.*, 1999]. Die einzelnen Gene dieser Efflux Pumpen sind als polycistronische Genkassetten angeordnet. Das erste Gen kodiert dabei für das Membranfusionsprotein MFP (MexA, -C, -V, -E, -H, -J und -X), welches mit der cytoplasmatischen Membran verankert ist. Das zweite Gen kodiert den Transporter (MexB, -D, -W, -F, -I und -Y), der das Substrat über die innere Membran exportiert. Das dritte Protein (OprM, -J und -N, sowie OpmD) übernimmt die Passage des Substrats über die äußere Membran hinweg und fungiert als *outer membrane factor* OMF. Zusammen bilden diese drei Proteine einen Tunnel, der von der inneren bis zur äußeren Membran reicht und somit den Export der Stoffe vom Cytoplasma direkt in das extrazelluläre Milieu ermöglicht [Zgurskaya *et al.*, 2003].

Zwei weitere RND Efflux Transporter sind in diesem Jahr als MDR Multidrug Efflux Pumpen beschrieben worden. Und zwar MexPQ-OpmE und MexMN-OprM, wobei PA1436 als MexN bezeichnet wurde [Mima *et al.*, 2005]. Das Membranfusionsprotein MexM (ORF=PA1435) und der Transporter MexN arbeiten zusammen mit OprM als RND Efflux Transporter. Für den MexMN-OprM Efflux Transporter wurde in der Arbeit gezeigt, dass nach Einbringen des Transporters in hypersensitive Zellen diese eine leicht erhöhte Resistenz gegenüber Chloramphenicol und Thiamphenicol aufwiesen. Zugleich konnte auch bestätigt werden, dass OprM als OMF (*outer membrane factor*) fungiert.

Von dem MexAB-OprM Transporter aus *P. aeruginosa* ist bisher bekannt, dass er die Resistenz der Bakterien gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln erhöht. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der MexAB-OprM Transporter am aktiven Transport des 3-Oxo-C₁₂-Homoserinlactons (C₁₂-HSL) beteiligt ist [Pearson *et al.*, 1999]. Des Weiteren wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass das Ausschalten des MexAB-OprM Transporter eine verminderte Virulenz nach sich zieht, und somit wird vermutet, dass dieser Transporter eventuell am Transport von Virulenzfaktoren beteiligt sein könnte [Hirakata *et al.*, 2002].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des RND Efflux Transporters MexN in *P. aeruginosa* TB zu einem Defekt im *Quorum sensing* führt. Somit lag die Vermutung nahe, dass dieser Transporter, wie der MexAB-OprM auch, am Transport von Homoserinlactonen oder anderer wichtiger Faktoren, die das *Quorum sensing* beeinflussen, beteiligt sein könnte. Da das *Quorum sensing* die Expression von extrazellulären Virulenzfaktoren und die Biofilmbildung kontrolliert, hätte das Ausschalten eines C₁₂-HSL Transporters einen großen Einfluss auf die Virulenz von *P. aeruginosa*. Um diese These zu stützen, wurden Untersuchungen bezüglich der Fähigkeit der Bildung von Virulenzfaktoren in dem Mutanten *mexN*-, dem komplementierten Mutanten *mexN*+ und dem Wildtyp vorgenommen.

4.3 Untersuchungen des *mexN*- Mutanten

4.3.1 Phänotypische Untersuchungen des *mexN*- Mutanten

Für *mexN*⁺ konnte eine Reversion des Phänotyps bezüglich des *Quorum sensing* und der Bildung von Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. *mexN*⁺ war in der Lage, Proteasen und Elastasen sowie Hämolytine zu bilden und zu sezernieren. Des Weiteren konnte für die Siderophorenproduktion, im Fall des Pyoverdins, welche nicht *Quorum sensing* abhängig reguliert wird, eine Reversion des Phänotyps nachgewiesen werden.

Eine wichtige Beobachtung war allerdings, dass ein Absterben der Zellen im Zentrum der Kolonien vom *mexN*- zu beobachten war. Dies deutet auf Autolyse hin, die schon in einer Transposon *knock out* Bank von *P. aeruginosa* PAO1 beobachtet werden konnte, in der Mutanten, die PQS überproduzierten, die stärkste Lyse aufwiesen [D'Argenio *et al.*, 2002]. Da bei den Untersuchungen bezüglich der Fähigkeit zur Produktion von PQS der *mexN*- Mutant auffällig viel PQS sezernierte, konnte daraus geschlossen werden, dass es sich dabei tatsächlich um Autolyse handelte.

4.3.2 Transkriptomanalyse

Anhand der Chipdaten der *mexN*- Mutante konnte gezeigt werden, dass die Expression von Virulenzfaktoren durch das Ausschalten von *mexN* nicht betroffen war. Der Defekt im *Quorum sensing* muss daher durch andere Faktoren ausgelöst worden sein. Ein Hinweis war, dass *mexN*- seinen Stoffwechsel in ABC Medium komplett umgestellt hatte. Der *rmf* (*ribosome modulation factor*), der für eine Dimerisierung der 70S Ribosomen zu einem 100S Ribosom, der inaktiven Form, sorgt [Wada *et al.*, 1995], war hoch reguliert. Daraus resultiert, dass die Bildung von Proteinen im Mutanten deutlich reduziert wird. Des Weiteren war *kdpF* hoch reguliert. KdpF stabilisiert in *E. coli* den Kdp Komplex, der für die Aufnahme von K⁺-Ionen verantwortlich ist [Gaßel *et al.*, 1999]. Er soll die K⁺-Ionenaufnahme unter Mangelbedingungen gewährleisten. Außerdem waren Enzyme des Glyoxylatzyklus hoch reguliert, wodurch *P. aeruginosa* den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung umgehen kann. Die Enzyme der Proteinbiosynthese, des Kohlenhydratstoffwechsels und des Fettsäuremetabolismus waren herab reguliert, wodurch der *mexN*- Mutant einen veränderten Stoffwechsel hatte. Er war aber durchaus in der Lage, wie der Wildtyp zu wachsen. MexN muss eine Rolle für die Verwertung typischer Kohlenstoffquellen übernehmen, ob als Importer oder als Exporter, ist bisher noch nicht geklärt und muss in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Die *Quorum sensing* Defizienz beruht wahrscheinlich darauf, dass in der *mexN*- Mutante die Proteinbiosynthese und die Energiebereitstellung herab geregelt sind und somit werden kaum *Quorum sensing* abhängig regulierte Virulenzfaktoren gebildet.

Ausserdem wurde gezeigt, dass das Rhl System herab reguliert war. Die beobachtete Autolyse resultierte wahrscheinlich aus der Überproduktion von PQS in der spätstationären Phase. Da die Transkriptomanalyse in der frühstationären Phase erfolgte, konnte dort keine Veränderung der PQS Synthese ausgemacht werden. Für die Analyse von PQS auf DC-Platten wurden allerdings Bakterien die sich in der spätstationären Wachstumsphase befanden, gewählt. Die beobachtete Autolyse im Zentrum der Kolonie, beruht darauf, dass die Bakterien sich dort schon in der spätstationären Phase befanden, während die Bakterien am Rand der Kolonie sich in der exponentiellen bis frühstationären Wachstumsphase befanden. Laut Transkriptomanalyse kam es zu keiner Überproduktion von PQS. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass andere Mechanismen, wie die der Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten in der Zelle zu einer Autolyse führen könnten.

4.4 Transkriptomanalyse der *rrR*- Mutante (ORF=PA5349)

Da die *rrR*- (Rubredoxin Reduktase) Mutante einen Defekt im *Quorum sensing* aufwies und sie sich phänotypisch der *MexN*- Mutante ähnelte, wurde die *rrR*- Mutante ebenfalls einer Transkriptomanalyse unterzogen. Die Ergebnisse zeigen, dass die *rrR*- Mutante ein ähnliches Stoffwechselverhalten wie das der *MexN*- Mutanten besitzt. Auch die *rrR*- Mutante besaß einen veränderten Stoffwechsel. Die Rubredoxin Reduktase war bisher mit der Oxidation von n-Alkanen in Verbindung gebracht worden [van Beilen *et al.* 2001]. In *P. aeruginosa* PAO1 sind zwei Alkanhydroxylasen (AlkB1 und AlkB2), welche membrangebunden vorliegen, bekannt, sowie zwei Rubredoxine (AlkG1 und AlkG2) und eine Rubredoxin Reduktase AlkT. Welche Rolle RrR für den Stoffwechselhaushalt und dem *Quorum sensing* von *P. aeruginosa* spielt, muss in weiterführenden Experimenten noch genauer untersucht werden.

4.5 In silico Analysen

Ein Vergleich der Proteinsequenzen von Efflux Transportern verschiedener Spezies zeigt eine hohe Verwandtschaft. Für MexN konnte bei den BLAST Analysen für zwei Mitglieder von *P. fluorescens* und für drei Mitglieder von *P. syringae* eine große Homologie nachgewiesen werden, wobei beide Taxa epiphytisch Pflanzen besiedeln. Des Weiteren wurde für einen noch nicht charakterisierten ORF PA2527 aus *P. aeruginosa* eine hohe Ähnlichkeit zu MexN nachgewiesen. Für ein multiples Alignment (Programm *Vector NTI Advance 9*), wurden einzelne Transporter dieser verschiedenen Spezies verwendet, um Strukturähnlichkeiten anhand konservierter oder identischer Aminosäuren auszu-machen.

Verglichen wurden MexN, sowie der zu MexN ähnliche ORF PA2527 aus *P. aeruginosa* und TtgB aus *P. putida* DOT-T1E, der *P. putida* eine Toluoltoleranz vermittelt [Ramos *et al.*, 1998]. Ebenso wurden der ORF PFL5049 aus *P. fluorescens* Pf-5, sowie der ORF PSPPH1196 aus *P. syringae* *pv. phaseolicola* in die Untersuchungen mit einbezogen. Des Weiteren wurde MexN mit AcrB aus *E. coli* K12 verglichen, da von diesem die Struktur aufgeklärt worden war.

Die hellgrau hinterlegten Felder kennzeichnen konservierte Aminosäuren, während die dunkelgrau hinterlegten Felder identische Aminosäuren markieren.

		1		50
MexN	(1)	MTPRAGISGWCVRHPIATALLTLASLLGLLAFRLGVAPLPEADFPTIQ		
PA2527	(1)	----MNPSRPFILRPVATLLMVAILLSGLIAYRFLPISALPEVDYPTIQ		
TtgB	(1)	-----MSKFFIDRFIFAWVIALVIMLVGALSILKLPINQYPSIAPPATA		
PSPPH1196	(1)	MSGRGSVSAWCIDHPVATLLLTFAVLVLLGVIAFPRLPIAPLPEAEFPTIQ		
PFL5049	(1)	MKGHGSVSAWCVDHPVATVLLTFALVLLGAIAPRLPVAPLPEAEFPTIQ		
Consensus	(1)	M S WCIDHPVAT LLT A LLG IAF RLPIAPLPEA FPTIQ		
		51		100
MexN	(51)	INALLPGGSPETMASSVATPLEVQFSAIPGITEMTSSS-ALGTTTTLTQF		
PA2527	(47)	VVTLYPGASPEIMTSSITAPLENQLGQIPGLNEMSSSS-SGGASVITLQF		
TtgB	(45)	IAVTYPGASAQTVQDTRVQVIEQQNLGIDNLRVSSSENSDGSMTITATF		
PSPPH1196	(51)	VTAQLPGASPETMASSVATPLEVQFSAIPGMTQMTSSS-ALGSTNLTQF		
PFL5049	(51)	VSAALPGASPDMASSVATPLEVQFSAIPGMTQMTSSS-ALGSSLLTLQF		
Consensus	(51)	V A LPGASPETMASSVATPLEVQFSAIPG T MTSSS ALGS LTLQF		
		101		150
MexN	(100)	SLDKSIDVAAQEVQAAINAAAGRLPVDMPNL-PTWRKVN PADSPIMILRV		
PA2527	(96)	SLQSNLDVAEQEVQAAINAAQSLLPNDLPNQ-PVFSKVN PADAPILTAV		
TtgB	(95)	EQGTNPDTAQVQVQNKLNLATPLLPQEVQQGIRVTKAVKNFLLVIGLVS		
PSPPH1196	(100)	TLNKSIDTAAQEVQAAINTAAGRLPADMPSL-PTWRKVN PADSPVLILSV		
PFL5049	(100)	TLNKSIDTAAQEVQAAINTAAGKLPKDMPTL-PTWKKVN PADSPVLILSI		
Consensus	(101)	L KSIDTAAQEVQAAIN AAG LP DMP L PTW KVN PADSPVLIL V		
		151		200
MexN	(149)	NSEMPLELSDYAETILARQLSQVNGVGVQIFVVGQQRPAIRIQAQPEKL		
PA2527	(145)	MSDGMPLPQIQDLVDTRLAQKISQISGVGLVVISGGQRPAVRVRANPTAL		
TtgB	(145)	EDGSMTKDDLANYIVSNMQDPISRTAGVGVDFQVFG-AQYAMRIWLDPAKL		
PSPPH1196	(149)	SSSLMPGTELSDVTEITILARQLSQIEGVGVQVFITGQQRPAIRVQAAPKEL		
PFL5049	(149)	SSTQMPGTELSDYAETLLARQISQIDGVGVQINITGQQRPAIRVQASADKL		
Consensus	(151)	S MP ELSDY ET LARQISQI GVGQ I GQQRPAIRVQA P KL		

		201		250
MexN	(199)	AAAYQLTLADLRQSLQASVNLAKG-----ALYGEGRVSTLAANDQLFNA		
PA2527	(195)	AAAGLSLEDLRSTVTSNNLNGPKG-----SFDGPTRASTLDANDQLRSA		
TtgB	(194)	NKFQLTPVDVKTAFAAAQNVQVSSGQLGGLPALPGTQLNATIIGKTRLQTA		
PSPPH1196	(199)	AALGLTLADIRLAVQQTSLNLAKG-----ALYGKDSISTLSSNDQLFKP		
PFL5049	(199)	AAIGLTLADIRLAIQQTSLNLAKG-----ALYGESSISTLSTNDQLFHP		
Consensus	(201)	AA GLTLAD R AVQ SLNLAKG ALYG STL NDQLF A		
		251		300
MexN	(243)	SDYDDLVAAYR-QGAPVFLKDVARIVSAPEDDYVQAWPNVPGVALVILR		
PA2527	(239)	DAYRDLIIAYK-NGSPLRIRDVASVEDDAENVRLAAWANNLPVAVLNIQR		
TtgB	(244)	EQFESILLKVNKDGSQLVRLGDVAQVGLGGENYAVSAQFNKGPASGLAVKL		
PSPPH1196	(243)	QDYAQLIVSYK-NGAPVQLKDVAVVAGSENAAYVKAWSGDQQGVNIAIFR		
PFL5049	(243)	EEYGQLIVSYK-DGAPVHLQDVARVNGSEDAYVQAWSGDQPGVNLVISR		
Consensus	(251)	Y LIV YK GAPV L DVARV V G EN YV AW N PGV L I R		
		301		350
MexN	(292)	QPGANIVDTADAIQAALPRLREMLPATIEVDVLNDRTRTIRSSLHEVELT		
PA2527	(288)	QPGANVIEVVDRIKALLPQLQSTLPGNLDVQVLTDRTTTTIRASVKDVQFE		
TtgB	(294)	ATGANALDTAKALRETIKGLEPFFPGVKAVFPYDTTPVVTESISGVIHT		
PSPPH1196	(292)	QPGANIVDTVDRIQRELPRLEMLPATVEVSVLNDRTTRTIRASLHEVELT		
PFL5049	(292)	QPGANIVETVDRIQAALPGLIEMLPASVQKVLVDRTQTIRASLHEVEIT		
Consensus	(301)	QPGANIVDTVDRIQA LP L MLPA V V VL DRT TIRASLHEVE T		
		351		400
MexN	(342)	LLLTIGLVVLMGLFIRQLSATLIVATVLAVSLASFAAMYVLGFTLNNL		
PA2527	(338)	LALAVLVVMVTFLELRNVYATLIPSAVPLSLIGTFGVMYLSGFSINNL		
TtgB	(344)	LIEAVLVFLVMYLFIQNFRATIIITMTVPVLLGTFGILAAAGFSINTL		
PSPPH1196	(342)	LMIAVLVVAVMALFIRQLSATLIVSAVLGVSLIASFAMMYLFGFSLNNL		
PFL5049	(342)	LIIAVLVVAVMALFIRQWSATLIVSAVLGVSLTASFALMYVLGFSINNL		
Consensus	(351)	L AV LVV VM LFLRQ SATLIVS VL VSL ASFA MY GFSLNNL		
		401		450
MexN	(392)	TLVALIIAVGFI VDDAIVVVENIHRHLEA-GASKVEAALKGAAEIGFTVI		
PA2527	(388)	TLMALTIATGFVDDAIVVVENIARYLEQ-GDSPLEAALKGSKQIGFTII		
TtgB	(394)	TMFAMVLAIGLLVDDAIVVVENVERVMSEEGLPPKEATKRSMEQIQGALV		
PSPPH1196	(392)	TLVAIVVAVGFI VDDAIVVVENIHRHLEA-GQGTREAAIKGAGEIGFTVV		
PFL5049	(392)	TLVAIVVAVGFI VDDAIVVVENIHRHLEA-GDGMREAAIKGAGEIGFTVV		
Consensus	(401)	TLVA V AVGFI VDDAIVVVENIHRHLEA G EAA KGA EIGFTVV		
		451		500
MexN	(441)	SISFSLIAAFIPLLFMGGIVGRLFREFAVSVTVAILISVVASLTLAPMLA		
PA2527	(437)	SLTFSLIAVLIPLLFMGDVAGRLFREFAITLAVAILISGFVSLTLTPMLS		
TtgB	(444)	GIALVLSAVLLPMAFFGGSTGVIYRQFSITIVSAMGLSVLVALIFTPALC		
PSPPH1196	(441)	SISFSLIAAFIPLLFMGGVVGRLFKFALTATATILISVIVSLTLAPTIA		
PFL5049	(441)	SISFSLIAAFIPLLFMGGVVGRLFKFALTATSTIMISVVVSLTLAPTIA		
Consensus	(451)	SISFSL AAFIPLLFMGGVVGRLFREFA T T AILISV VSLTLAP LA		
		501		550
MexN	(491)	SRFMPALRHAEAP-----RKGFAEWLTGGYERGLRWALGHQRLMLV		
PA2527	(487)	AKLLRHIDEDQQRGFAR-----AAGRVIDGLIAQYAKALRVVLRHQPLTLL		
TtgB	(494)	ATMLKPLKKGEGHTAKGGFFGWFNRNFDRSVNGYERSVGTILRNKVPFLL		
PSPPH1196	(491)	ALFMRAPTHNPHQ-----KPGFGERLLASYERGLRKALAHQRLMLG		
PFL5049	(491)	ALFMRAPVHPAHA-----KPGFGERLLAVYERGLRKALAHQKRLMLG		
Consensus	(501)	A FMRA H H GF ERL A YERGLR AL HQ LML		
		551		600
MexN	(532)	GFAFTVLVAVAGYVGI PKGFFPLQDTAFVIGTSQAAEDISYDDMVAKHRQ		
PA2527	(533)	VAIATLALTALLYLAMPKGFFPVQDTGVIQGVAEAPQSISFQAMSERQRA		
TtgB	(544)	AYALIVVGMIVLFAFIPTAFLPEEDQGVLFQVQTPAGSSAERTQVVVDQ		
PSPPH1196	(532)	VFGLTLALAVVGYILIPKGFFPVQDTAFALGTTEAAADISYDPDMVEKHLQ		
PFL5049	(532)	IFGLTLSMAIAGYILIPKGFFPVQDTGFVLGTTEAAADISYDPDMVKKHQ		
Consensus	(551)	F LTL A GY IPKGFFPVQDTGF GT EAAADISY DMV KH Q		

		601		650
MexN	(582)	LAEIIASDPAVQSYNHAVGVTGGSQS--LANGRFWIVLKDRGER---DVS		
PA2527	(583)	LAEVVLKDPAVASLSSYIGVDGSNPT--LNTGRLLINLKPHSER---DVT		
TtgB	(594)	MREYLLKDEADTVSSVFTVNGFNFAGRGQSSGMAFIMLKPWDERSKENS		
PSPPH1196	(582)	LAKIVGADPAVLAFSHSVGVSGSNQT--IANGRFWISLKPRSER---DVS		
PFL5049	(582)	LAEIVATDPAVQAFSHSVGVSGSNQT--IANGRFWISLKNRGDR---DVS		
Consensus	(601)	LAEIV DPAV SH VGV GSNQT ANGRFWI LKPR ER DVS		
		651		700
MexN	(627)	VGEFIDRLRPQLAKVPGIMLYLRAAQDINLSSGSPSRTOYQYALRSSDSTQ		
PA2527	(628)	ASEVIQRLQPELDHLPGLIKLYMQPVQDLTIEDRVARTQYQFTLQDADPDV		
TtgB	(644)	FALAQRAQQHFFTFRDAMVFAFAPPVLELGNATGFDVFLQDRGGVGHAK		
PSPPH1196	(627)	VSEFIDRLRPKLAKVPGIVLYLRAAQDINLSSGSPSRQYQYVLLKSNDGEL		
PFL5049	(627)	ASAFIDRIRPQLMKVPGIVLYLRAAQDINLSSGSPSRAQYQYVLLKSNDGPT		
Consensus	(651)	SEFIDRLRP L KVPGIVLYLRA QDINLSSGSPSR QYQY L S D		
		701		750
MexN	(677)	LALWAQRLTERLKQVPLMDVSNDLQV GASVTALD IDRVAARFGLSAED		
PA2527	(678)	LAEWVPKLVARLQELPOLADVADWQDKGLQAYLNIDRDTASRLGVKLS		
TtgB	(694)	LMEARNQFLAKAAQSKILSAVRPNGLNDEPQYQLTIDDERASALGVTIAD		
PSPPH1196	(677)	LNTWTQRLTEKLRSNPAFRDMSNDLQGGSVTHIDIDRSAAARFGLTTAD		
PFL5049	(677)	LSTWTQRLTEKLRSNPAFRDISNDLQGGSIITHIQIDRTAAARFGLTASD		
Consensus	(701)	L W QRLTEKL P L DVSNDLQ GGS T L IDR AAARFGLT D		
		751		800
MexN	(727)	VSQTLYDAFGQRQVGEYQTEVNQYKVVLELDARQRGAESLDWFYLRSP		
PA2527	(728)	IDSVLYNAFGQRLISTIFTQATQYRVVLEVAPQFQLGPQALEQLYVPS-S		
TtgB	(744)	INNTLSIALGASYVNDFIDRGRVKKVYIQGEP SARMSPELQKMYVRN-G		
PSPPH1196	(727)	VDQALYDAFGQRQISEYQTEVNQYKVVILELDAQQRGKAESLAYFYLRSP		
PFL5049	(727)	VDEALYDAFGQRQINEFQTEINQYKVVILELDTQQRGKAESLNYFYLRSP		
Consensus	(751)	VD LYDAFGQRQI E QTE NQYKV LELED QQRG AESL FYLRSP		
		801		850
MexN	(777)	SGEMVPLSAIAKVAAPRSGPLQINHNMGFPAVNLSFNLAAGVSLGEAVQA		
PA2527	(777)	DGTQVRLSSSLAKVEER-HTLLAINHIAQFPSATLSFNLAAGVSLGEAVEA		
TtgB	(793)	AGEMVPLSFAKGEWT-YGSPKLSRYNGVEAMEILGAPAPGYSTGEAMAE		
PSPPH1196	(777)	TNEMVPLSALAKVSAPRMGPLSISHDGMFPAANLSFNLAGVALGDAVSM		
PFL5049	(777)	TGEMVPLSALARFDAPTIGPLSIAHDGMFPAANLSFNLAGVALGDAVIL		
Consensus	(801)	GEMVPLSALAKV AP GPL I H GMFPAANLSFNLA GVSLGEAV		
		851		900
MexN	(827)	VQRAQEEIGMPSTIIGVFQAAQAFQSSLASQPLLILAAALVAVYIILGVL		
PA2527	(826)	IRGVEASLELPLSMQGSFRGAALAFEASLSNTLLLILASVVTMYIVLGIL		
TtgB	(842)	VERIAG--ELPSGIGFSWTGMSYEEKLSGSQMPALFALSVLVFLCLAAL		
PSPPH1196	(827)	LDQAKKEIGMPASIIIGSFQAAQAFQSSLANQPWLILAAALVAVYIILGVL		
PFL5049	(827)	LNQAKSEIGMPTAISGNFQAAQAFQSSLASQPYLILAAALVAVYIILGVL		
Consensus	(851)	A EIGMP I GSFQAAQAFQSSLA QP LILAAALVAVYIILGVL		
		901		950
MexN	(877)	YESFVHPLTILSTLPSAGIGAVFLLWAWGQDFSIMALIGIVLLIGIVKKN		
PA2527	(876)	YESFIHPVTILSTLPSAGVGALLMLLAGQEIGIVAIIGIILLIGIVKKN		
TtgB	(890)	YESWSIPIAVVLVPLGIIGALIATSLRGLSNDVYFLVGLLTTIGLAAKN		
PSPPH1196	(877)	YESFVHPLTIISTLPSAGIGALLLWMMGQDFSIMALIGIVLLIGIVKKN		
PFL5049	(877)	YESFVHPLTIISTLPSAGL GALLMLWLCGQDFSIMALIGLVLLIGIVKKN		
Consensus	(901)	YESFVHPLTI STLPSAGIGALL LWL GQDFSIMALIGIVLLIGIVKKN		
		951		1000
MexN	(927)	GILMVDFAIVAQREQGM SAEQAIYQACLTRFRPIIMTTLAALLGALPLMI		
PA2527	(926)	AIMMIDFALDAERNEGKPPHEAIYQACLLRFRPIIMTTMAALLGALPLML		
TtgB	(940)	AILLIVEFAKELHE-QGRSLYDAIEACRMRLRPIIMTSLAFILGVVPLTI		
PSPPH1196	(927)	GILLVDFALQAQREQGLSSQEAIYEACITRFRPIIMTTLAALLGALPLML		
PFL5049	(927)	GILMIDFALEAQRHGGLPPEFAIYQACITRFRPIIMTTLAALLGALPLML		
Consensus	(951)	GILMVDFA L AQR QG S EAIYQAC TRFRPIIMTTLAALLGALPLML		

		1001		1050
MexN	(977)	GFGTGS	ELRQPLGI	AVVGGLLVSQVLT
PA2527	(976)	ACGAGAE	LRQPLGIT	MVGGLLLSQVLT
TtgB	(989)	ASGAGAG	SQHAI	GTGVI
PSPPH1196	(977)	GFCVGA	ELRQPLGI	AVVGGLLVSQVLT
PFL5049	(977)	GYGAGAE	LRQPLGI	AVVGGLLVSQVLT
Consensus	(1001)	G	GAGAE	LRQPLGI
		1051		1068
MexN	(1027)	DGGTAGATAT	-----	
PA2527	(1026)	QRGLDLNTEAGFDGDAGR		
TtgB	(1039)	VTPENPRYEAGQ	-----	
PSPPH1196	(1027)	APALALHK	-----	
PFL5049	(1027)	PATTT	-----	
Consensus	(1051)			

Wie der Vergleich zeigt, sind die Orthologe bis auf den Bereich des N- und C-Terminus konserviert oder sogar identisch. Die größten Abweichungen von der Consensus-Sequenz besitzt TtgB aus *P. putida*. Die Analyse zeigt, dass 43% bis 61% der Aminosäuren identisch und 59 bis 72% konserviert sind. Auf Nukleinsäureebene war diese Übereinstimmung nicht ganz so deutlich zu sehen, da es nur vereinzelte DNA-Abschnitte gab, die identisch waren. Anhand der Proteinsequenz sind diese Unterschiede allerdings nicht sichtbar, da es während der Evolution zu synonymen Basenaustauschen kam, damit optimierte lebenswichtige Funktionen nicht zerstört wurden.

Die Transporter der pflanzenassoziierten Bakterien dienen dazu, den Osmosestress, der bei Pflanzen auftritt, zu bekämpfen. Als Hauptenergiequelle dieser Organismen dienen organische Säuren, wie Zitronensäure, Malat, Lactat, Succinat und Oxalsäure, die von den Pflanzen in großen Mengen abgegeben werden [Curl und Truelove, 1986]. Der *mexN*- Mutant zeigt ein verändertes Stoffwechselverhalten in Gegenwart organischer Säuren wie Citrat, die in dem ABC Medium vorhanden sind. Somit kann auch auf diesem Wege bestätigt werden, dass MexN eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von *P. aeruginosa* besitzt, beispielsweise könnte er toxische Intermediärmetabolite (Glyoxylat) exportieren.

Ebenso wurde ein Vergleich von AcrB aus *E. coli* K12 mit MexN durchgeführt, da von AcrB die Struktur aufgeklärt worden ist und diese könnte somit einen Hinweis zu der Struktur von MexN selbst geben. Die grau hinterlegten Felder stellen identische Aminosäuren dar.

		1		50
MexN	(1)	MTPRAGIS	GWCVRH	PI
AcrB	(1)	-----	MPNFFIDR	PI
		51		100
MexN	(51)	INALLP	GGSPET	MASSVAT
AcrB	(45)	ISASYP	GADAKT	VQD
		101		150
MexN	(100)	SLDKSID	VAAQEV	QAAINAA
AcrB	(95)	ESGTDAD	IAQVQV	QNKQLQ
		151		200
MexN	(149)	NSEMPL	IELSDY	AETILAR
AcrB	(145)	TDGTM	TQEDI	SDYVAAN

		201		250
MexN	(199)	AAAYQLTLA	DLRQSLQASVNLAKGALYGEG-----RVSTLA	AANDQLFN
AcrB	(194)	NKFQLT	PVDVITAIKAQNAQVAAGQLGGTTPVKGQQLNASIIAQ	TRLTST
		251		300
MexN	(242)	ASDYDD	LVVAYRQ	GAPVFLKDVARTVSAPEDDYVQAWP
AcrB	(244)	EEFGKI	LKVNQD	SRVLLRDVAKTELGGENYDIIAEFNGQPASGLGI
		301		350
MexN	(292)	QPGANIV	DTADAIQAALPRLREMLPATIEVDV	LNDRTRTIRS
AcrB	(294)	ATGANAL	DTAAAIRAELAKMEPFFPSGLKIVYPYDTT	PFVKIS
		351		400
MexN	(342)	ILLTI	GLVVLVMGLFLRQLSATLIVATVLA	VSLSASFAAMYVLGFTLNNL
AcrB	(344)	LVEAL	ILVFLVMYFLQNFRA	TLIPTIAVPVLLGTF
		401		450
MexN	(392)	TLVALI	IAVGFIVDDAIVVVENIHRHLEAGAS	-KVEAALKGAAEIGFTVI
AcrB	(394)	TMFGM	VLAIGLLVDDAIVVVENVERVMAEEGLPPKE	ATRKSMGQIQGALV
		451		500
MexN	(441)	SISFSL	IAAFIPLLFMGGIVGR	LFREFAVSVTVAILISVVASLTLAPMLA
AcrB	(444)	GIAMV	LSAVFVPMAFFGGSTGAIYRQFSITIVS	SAMALSVLVALIILTPALC
		501		550
MexN	(491)	SREFPAL	RHAEAPR-----KGFAEWL	TGGYERGLRWALGHQRLMLV
AcrB	(494)	ATMLK	PIAKGDHGEGKKGFFGWFNRMFEKSTH	HYTDSVGGILRSTGRYL
		551		600
MexN	(532)	GFAFT	VLVAVAGYVGI	PKGFFP
AcrB	(544)	LYLI	IVGMAYL	FVRLPSSFLPDE
		601		650
MexN	(582)	LAEII	ASDP--AVQSYNHAVGV	TGGSQSLANGRFWIVL
AcrB	(594)	VTHY	LTKEKNNVESVFAVNGFGF	AGRGQNTGIAFVSLKDWADRP
		651		700
MexN	(624)	DVSVGE	FIDRLRPLAKVPGIMLYL	RAAQDINLSSGPSRTQYQYALRSSD
AcrB	(644)	VEAIT	MRATRAFSQIKDAMVFAFN	LPAIVELGTATG-FDFELIDQAGLGH
		701		750
MexN	(674)	STQ	LALWAQRITERL	KQVPLMDVSNLQV GASVTALDIDRVA
AcrB	(693)	EKLT	QARNQLLAFAAKHPDML	TSVPRNGLEDTPQFKIDIDQEK
		751		800
MexN	(724)	AE	VSQTL	YDAFGQ
AcrB	(743)	IND	INTL	GAAWGGSYV
		801		850
MexN	(774)	SPLS	GEMVPLSAIAKVAAPRSGPLQ	INHNGMFP
AcrB	(793)	-AAD	QMVPEFSAFSSSRWEYGS-PR	LERYNGLPSMEILGQAAPGKST
		851		900
MexN	(824)	VQAV	QRAQEEIGMPSTI	IGVFQ
AcrB	(841)	MELME	QLASKL--PTGVGYDWT	GMSYQERLSGNQAPSLY
		901		950
MexN	(874)	GV	LYESFVHPLTIL	STLPSAGIGAV
AcrB	(889)	AAL	YESWSIPFSV	MLVPLGVIGALLAATFRGLT
		951		1000
MexN	(924)	KKNG	IIMVDF	IVAQREQMSAEQAIYQ
AcrB	(939)	AKNA	ILIVEFAKDLMDKE	GKGLIEATLDAVRMLRPIL
		1001		1050
MexN	(974)	IM	IGFTGSEL	RQPLGIAV
AcrB	(989)	LV	ISTGAGS	GAQNAVGTGMG
		1051	1063	
MexN	(1024)	TTSDGG	LAGATAT	
AcrB	(1039)	DIEHSH	VDHH-	

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von AcrB zu MexN zeigt, dass 23% der Aminosäuren identisch sowie 43% konserviert sind. Um ein genaueres Bild über die Verwandtschaft zu erhalten, wurde ein Stammbaum basierend auf den Aminosäuresequenzen entwickelt. Dieser enthält Orthologe aus *P. putida* (TtgB) und *P. syringae* (PSPTO1308, Psyr1128 und PSPPH1196), *P. fluorescens* (PFL5049), sowie dem Paralog PA2527 aus *P. aeruginosa* selbst. Abbildung 4.3 zeigt die phylogenetische Verwandtschaft.

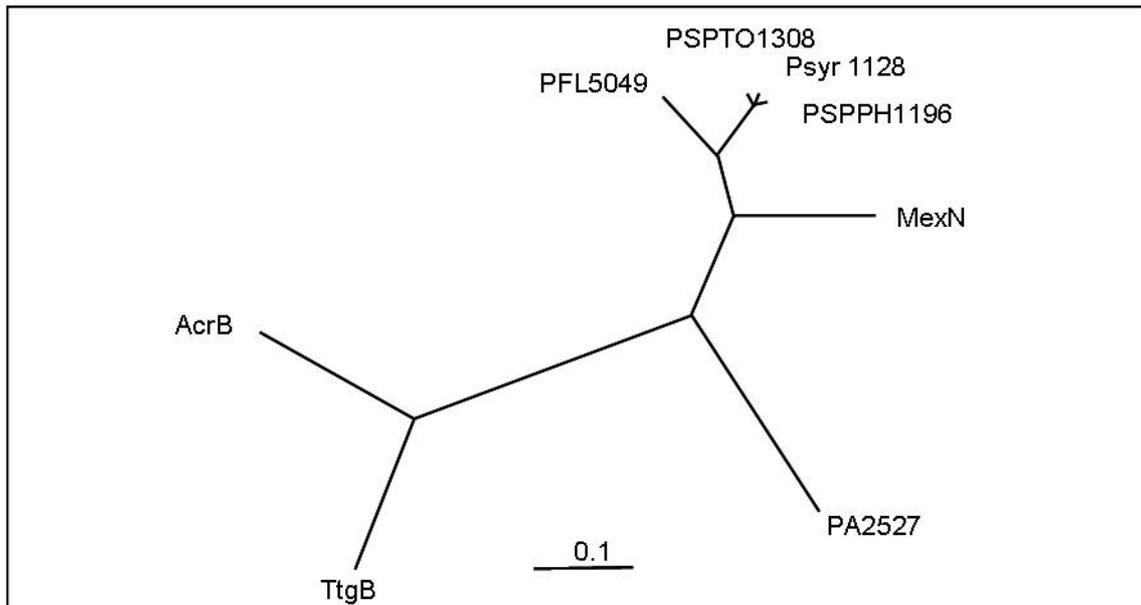


Abb.4.3: Phylogentische Verwandtschaft von RND Efflux Transportern. Die Länge der Verbindungen bzw. deren Abstände geben die Nähe der Verwandtschaft wider. MexN besitzt demnach eine erheblich nähere Verwandtschaft zu den Transportern der pflanzenassoziierten Bakterien als zu dem Homolog aus *P. aeruginosa* selbst oder zu dem Toluoltransporter aus *P. putida*.

Aus dem Stammbaum in Abb.4.3 läßt sich die nahe Verwandtschaft von MexN zu den Transportern der pflanzenassoziierten Bakterien nachweisen. Die Verwandtschaft zum Paralog aus *P. aeruginosa* selbst (PA2527) und dem Toluoltransporter aus *P. putida* ist dabei als wesentlich geringer einzustufen. Dies unterstützt die These, dass MexN in *P. aeruginosa* nicht nur Antibiotikaresistenzen vermittelt, sondern auch den Stoffwechsel von *P. aeruginosa* selbst beeinflusst. Ausserdem besitzt MexN einen indirekten Einfluss auf das *Quorum sensing*.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte der veränderte Phänotyp der MexN *knock out* Mutante direkt dem mutierten Gen zugeordnet werden. Des Weiteren wurde bestätigt, dass MexN einen Einfluss auf das *Quorum sensing* ausübt, denn in dem Mutanten war das Rhl System herab reguliert. Des Weiteren war er in der Bildung von Virulenzfaktoren wie Proteasen gestört. Ebenso kam es im Mutanten zu einer massiven Umstellung des Stoffwechsels. Als Alternative verwendete *P. aeruginosa* den Glyoxylatstoffwechsel, um den Citratzyklus zu umgehen. Zu dem ist anhand von Proteinsequenzanalysen gezeigt worden, dass MexN eine größere Verwandtschaft zu pflanzenassoziierten Transportern als zu dem Paralog aus *P. aeruginosa* selbst oder dem Ortholog aus *P. putida* besitzt. Ausserdem hat der als MexN annotierte ORF PA1436 nicht nur die Rolle Antibiotika zu transportieren, wie von Mima *et al.* postuliert worden ist. Sondern er besitzt auch einen erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel von *P. aeruginosa* sowie einen sekundären Einfluss auf das *Quorum sensing*.

In weiterführenden Experimenten muss im Mutanten die PQS Synthese ausgeschaltet werden, damit man einen Hinweis auf den Auslöser der Autolyse bekommt. Des Weiteren müssen die Substrate, die von MexN transportiert werden in weiteren Untersuchungen gefunden werden.

4.7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, *P. aeruginosa* TB *Tn5 knock out* Mutanten einer STM Bank *in trans* zu komplementieren und anschließend die Funktion dieser Gene zu bestimmen. Das Ausschalten dieser Gene hatte zur Folge, dass die Mutanten einen Defekt in der Bildung von Proteasen aufwiesen, die in *P. aeruginosa* *Quorum sensing* abhängig reguliert werden. Die Komplementation sollte mit einer pLAFR3-Cosmid Bank erfolgen, welche zufällig fragmentierte DNA aus *P. aeruginosa* SG17M enthält.

Nach Durchsuchen dieser Bank mit geeigneten Sonden wurden positive Klone für die triparentale Konjugation verwendet. Für zwei Gene (*fliK* und *rrR*) kam es zu einer Reversion des Phänotyps, allerdings nur in einzelnen Zellen. 1 von 10^8 Klonen des komplementierten *rrR*+ Mutanten exprimierte die Gene unter Peroxidstress. Der *fliK*- Mutant, der eine Störung der Flagellenbildung hat, besaß mit Hilfe des pLAFR3-Konstrukts ein normal ausgebildetes Flagellum. Dies konnte in den EM-Aufnahmen gezeigt werden. Allerdings war die Expressionsrate von pLAFR3 zu gering, um quantitative Analysen von Bakterienpopulationen durchführen zu können. Damit diese Problematik geklärt werden konnte, sollte pLAFR3 sequenziert werden. Anhand dieser Ergebnisse sind 22 ORFs identifiziert worden, die für Gene kodieren, die ein Verweilen und die Weitergabe von pLAFR3 in Rezipientenzellen ermöglichen. Das Gen-Cluster für die Konjugation ist nicht

vollständig, deshalb wird für die Komplementation die Anwesenheit eines Helferplasmids benötigt, damit dieses die fehlenden Gene beisteuern kann.

pLAFR3 eignet sich somit nur eingeschränkt zur phänotypischen Charakterisierung genetisch *in trans* komplementierter Transposonmutanten in *P. aeruginosa*.

Die Klonierung polycistronischer Genkassetten in pUCP20 und die Elektroporation dieser Konstrukte in die Mutanten stellte eine Alternative dar. Allerdings war zu Beginn der Arbeiten über die Expression von homolog in pUCP20 klonierter DNA in *P. aeruginosa* nichts aus der Literatur bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass pUCP20 zur Expression von polycistronischen Genkassetten in *P. aeruginosa* geeignet ist.

Das Ausschalten des Gens PA1436 (möglicher RND Efflux Transporter) führte zu einer Verminderung von *Quorum sensing* abhängig regulierten Virulenzfaktoren. Von dem bisher weitgehend charakterisierten RND Efflux Transporter MexA ist bekannt, dass er als MexAB-OprM Transporter wichtig für die Virulenz von *P. aeruginosa* ist. Zudem ist auch gezeigt worden, dass er am Transport von Homoserinlactonen beteiligt ist [Hirakata *et al.*, 2002, Pearson *et al.*, 1999]. Zeitgleich zu dieser Arbeit an PA1436 zeigte eine japanische Gruppe, das ORF PA1436=MexN als Multidrug Transporter MexMN-OprM hypersensitiven Zellen eine leicht erhöhte Resistenz gegenüber Chloramphenicol sowie Thiamphenicol vermittelt [Mima *et al.*, 2005].

Durch die Komplementation mit dem pUCP20-Konstrukt konnte für den *mexN*- Mutanten mit diesem Ansatz gezeigt werden, dass das mutierte Gen für den beobachteten Defekt in der Bildung von Proteasen kausal verantwortlich ist. Verschiedene Bioassays, die die Fähigkeit zur Bildung von Virulenzfaktoren testen, wurden verwendet, um genauere Information über die Wirkung des Ausschaltens von *mexN* zu bekommen.

Zuerst wurde mit dem Elastin Kongorot Assay die Elastaseproduktion gemessen, die vom Las-System (C_{12} -HSL) *Quorum sensing* abhängig reguliert wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass *mexN*- in der Produktion von Elastase behindert ist, hingegen die komplementierte Mutante *mexN*+ diese bilden kann. Der Stapholyse Assay zeigte, dass *mexN*- nicht in der Lage war LasA Protease zu sezernieren. Ebenso wie die Proteaseproduktion wird die Elastaseproduktion vom C_{12} -HSL abhängigen Las *Quorum sensing* System reguliert [Winzer und Williams, 2001; Camara *et al.*, 2002].

Ein anderer Test diente der Überprüfung zur Bildung von Hämolytinen. *P. aeruginosa* produziert zwei Hämolytine, die Phospholipase C und das Rhamnolipid. Rhamnolipid wirkt als biologisches Detergenz, welches zusammen mit der Phospholipase C Lipide (Phospholipide der Lungenepithelien) und Lecithin auflösen kann [van Delden, 2004]. Außerdem spielen die Rhamnolipide eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Biofilmen [Konig *et al.*, 1996; Davey *et al.*, 2003]. Die Phospholipase C sorgt für den Ausstoß von Entzündungsmediatoren durch menschliche Effektorzellen, wie Granulozyten, Monozyten und Blutplättchen. Die Expression beider Hämolytine unterliegt dem *Quorum sensing* von *P. aeruginosa* [Passador *et al.*, 1993; Hentzer *et al.*, 2003].

Während *mexN*⁺ und der Wildtyp die gleiche hämolytische Aktivität besaßen, war diese im *mexN*⁻ deutlich reduziert. Außerdem war ein Absterben der Zellen im Zentrum der Kolonien bei *mexN*⁻ zu beobachten, was auf eine Autolyse hindeutete. Diese konnte schon in einer Transposon *knock out* Bank von *P. aeruginosa* PAO1 beobachtet werden, wobei Mutanten, die PQS überproduzierten, die stärkste Lyse aufwiesen [D'Argenio *et al.*, 2002]. Da bei Untersuchungen bezüglich der Fähigkeit zur Produktion von PQS *mexN*⁻ auffällig viel PQS sezernierte, lag die Vermutung nahe, dass es sich tatsächlich um Autolyse handeln könnte.

Für die Bildung von Pyocyanin, ein Derivat des PQS, konnte kein Unterschied in allen drei untersuchten Stämmen nachgewiesen werden, daher ist davon auszugehen, dass die Pyocyaninproduktion im Mutanten nicht beeinträchtigt war.

Ein Test zur Überprüfung der Siderophorenproduktion zeigte keinerlei Beeinträchtigung dieser im Mutanten. Die Bildung von Pyoverdin wird allerdings nicht *Quorum sensing* abhängig reguliert. Außerdem kann mit diesem Test nicht zwischen den einzelnen Siderophoren, wie Pyoverdin oder Pyochelin diskriminiert werden. Für den Nachweis von Pyoverdin eignete sich King B Medium. Die Untersuchung der Stämme erfolgte sowohl in Flüssig- als auch auf Festmedium. In beiden Fällen konnte für den Mutanten eine Beeinträchtigung der Bildung von Pyoverdin beobachtet werden.

Um nähere Erkenntnisse über die Funktion von MexN zu gewinnen, wurde eine Expressionsanalyse der Stämme in ABC Medium durchgeführt. Dies geschah, weil nach Analyse vorhandener Transkriptomdaten gezeigt werden konnte, dass das Gen *mexN* in allen untersuchten Stämmen unter den getesteten Bedingungen circa 20fach geringer als *mexA* exprimiert wurde. Lediglich in ABC Medium konnte eine geringfügig höhere Expression von *mexN* gefunden werden.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigten, dass *mexN*⁻ seinen Stoffwechsel in ABC Medium komplett umgestellt hatte. Zum einen war *rmf* (*ribosome modulating factor*) hoch reguliert, was bedeutet, dass die Proteinbiosynthese deutlich reduziert wird. Enzyme des Glyoxylatstoffwechsels waren ebenfalls hoch reguliert, wodurch *P. aeruginosa* den Citratzyklus sowie die oxidative Phosphorylierung umgehen kann. Durch den Vergleich der Proteinsäuresequenzen von MexN mit Transportern aus *P. fluorescens*, *P. syringae* und *P. putida* konnte gezeigt werden, dass diese bis auf die N- und C-terminalen Enden in allen untersuchten Stämmen konserviert sind. In pflanzenassoziierten Bakterien dienen die Transporter dazu, die von den Pflanzen in die Rhizosphäre sezernierten organischen Säuren, wie Zitronensäure, Malat, Lactat und Oxalsäure zu verwerten.

Des Weiteren waren im Mutanten die Regulatoren des Las und des Rhl Systems herab reguliert. Vermutlich wird durch die geringe Stoffwechselrate das *Quorum sensing* reduziert und die Folge davon ist die verminderte Bildung von Virulenzfaktoren.

Um einen genaueren Einblick über die möglichen Substrate von MexN zu gewinnen, müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden. Ebenso muss durch Ausschalten von PQS Synthesegenen gezeigt werden, ob die Überproduktion von PQS in dem Mutanten tatsächlich für die Autolyse verantwortlich ist.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass MexN für die Aufrechterhaltung eines normalen Stoffwechsel zwingend notwendig ist. Er fungiert eventuell als Transporter von organischen Säuren. Diese Vermutung wird zudem dadurch untermauert, dass MexN sehr große Homologien zu Transportern von pflanzenassoziierten Bakterien besitzt. Diese Bakterien benötigen die Transporter, um die von der Pflanze abgegebenen organischen Säuren verwerten zu können.

5 Literaturverzeichnis

- Aendekerck, S., B. Ghysels, et al. (2002). "Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium." Microbiology **148**(Pt 8): 2371-81.
- Akama, H., T. Matsuura, et al. (2004). "Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*." J Biol Chem **279**(25): 25939-42.
- Al-Ani, F. Y., A. S. Al-Shibib, et al. (1986). "Pyocyanin preparation from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from heterogeneous clinical materials." Folia Microbiol (Praha) **31**(3): 215-9.
- Albus, A. M., E. C. Pesci, et al. (1997). "Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **179**(12): 3928-35.
- Arora, S. K., B. W. Ritchings, et al. (1998). "The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion." Infect Immun **66**(3): 1000-7.
- Ayres, E. K., V. J. Thomson, et al. (1993). "Precise deletions in large bacterial genomes by vector-mediated excision (VEX). The *trfA* gene of promiscuous plasmid RK2 is essential for replication in several gram-negative hosts." J Mol Biol **230**(1): 174-85.
- Azghani, A. O., S. Idell, et al. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture." Microb Pathog **33**(3): 109-14.
- Bakay, M., Y. W. Chen, et al. (2002). "Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation." BMC Bioinformatics **3**: 4.
- Ball, C. A., K. Dolinski, et al. (2000). "Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database." Nucleic Acids Res **28**(1): 77-80.
- Baltimore, R. S., C. D. Christie, et al. (1989). "Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration." Am Rev Respir Dis **140**(6): 1650-61.
- Baltimore, R. S., R. L. Duncan, et al. (1989). "Epidemiology of pharyngeal colonization of infants with aerobic gram-negative rod bacteria." J Clin Microbiol **27**(1): 91-5.
- Banack, T., P. D. Kim, et al. (2000). "TrfA-dependent inner membrane-associated plasmid RK2 DNA synthesis and association of TrfA with membranes of different gram-negative hosts." J Bacteriol **182**(16): 4380-3.
- Barbieri, J. T. (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin." Int J Med Microbiol **290**(4-5): 381-7.
- Bean, H. S., Farell R. C. (1997). "The persistence of *P. aeruginosa* in aqueous solutions of phenols." J. Pharm. Pharmacol. **19**: 183-88
- Berk, R. S., D. Brown, et al. (1987). "In vivo studies with two phospholipase C fractions from *Pseudomonas aeruginosa*." Infect Immun **55**(7): 1728-30.
- Botzenhardt, K., Döring, G. (1993) "Etiology and epidemiology of *P. aeruginosa* in: Cama, A., Bendinelli, M., Friedmann, M.(ed). "*P. aeruginosa* as an opportunistic pathogen." Plenum Press N.Y. USA.
- Boucher, J. C., M. J. Schurr, et al. (1997). "*Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: role of mucC in the regulation of alginate production and stress sensitivity." Microbiology **143** (Pt **11**): 3473-80.
- Brinkman *et al.* (2001) „Evolutionary relationships among virulence-associated Histidine kinases.“ Infection and Immunity **69** (8): 5207-11.
- Buret, A. and A. W. Cripps (1993). "The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis." Am Rev Respir Dis **148**(3): 793-805.
- Camara, M., Williams, P., Hardman, A. (2002). "Controlling infection by timing and turning down the volume of bacterial small talk." Lancet Infect Dis **2**: 667-76.
- Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, et al. (2002). "The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan." J Bacteriol **184**(18): 5036-44.
- Chugani, S. A., M. Whiteley, et al. (2001). "QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2752-7.
- Coburn, J., S. T. Dillon, et al. (1989). "Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* ADP-ribosylates the intermediate filament protein vimentin." Infect Immun **57**(3): 996-8.
- Comolli *et al.*, (1999). "Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *P. aeruginosa*." Infection and Immunity **67** (7): 3207-3214.

- Cornelis, G. R. (2000). "Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1397): 681-93.
- Cowell, B. A., S. S. Twining, et al. (2003). "Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells." *Microbiology* **149**(Pt 8): 2291-9.
- Curl, EA., Truelove, B. (1986). "The Rhizosphere." Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Dacheux, D., B. Toussaint, et al. (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils." *Infect Immun* **68**(5): 2916-24.
- D'Argenio, D. A., M. W. Calfee, et al. (2002). "Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants." *J Bacteriol* **184**(23): 6481-9.
- D'Argenio, D. A. and S. I. Miller (2004). "Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger." *Microbiology* **150**(Pt 8): 2497-502.
- Davis, PB., Drumm, M., Konstan, MW. (1996) „Cystic fibrosis.“ *Am Rev Respir Dis* (154): 1129-56.
- de Bentzmann, S., P. Roger, et al. (1996). "Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells." *Infect Immun* **64**(5): 1582-8.
- de Kievit, T., P. C. Seed, et al. (1999). "RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **181**(7): 2175-84.
- de Kievit, T. R. and B. H. Iglewski (1999). "Quorum sensing, gene expression, and *Pseudomonas* biofilms." *Methods Enzymol* **310**: 117-28.
- de Kievit, T. R. and B. H. Iglewski (2000). "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships." *Infect Immun* **68**(9): 4839-49.
- Denervaud, V., P. TuQuoc, et al. (2004). "Characterization of cell-to-cell signaling-deficient *Pseudomonas aeruginosa* strains colonizing intubated patients." *J Clin Microbiol* **42**(2): 554-62.
- Deziel, E., F. Lepine, et al. (2004). "Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1339-44.
- Diggle, S. P., K. Winzer, et al. (2003). "The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR." *Mol Microbiol* **50**(1): 29-43.
- Diggle, S. P., K. Winzer, et al. (2002). "Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression." *J Bacteriol* **184**(10): 2576-86.
- Ditta, G., S. Stanfield, et al. (1980). "Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12): 7347-51.
- Döring (1997). "*Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis: implications for prognosis and treatment." *Pediatr Pulmol Suppl* (16): 235-36.
- Döring, G., Bellon, G., Knight, R. (1995). "Immunology of cystic fibrosis in: Hodson *et al.*: cystic fibrosis." Chapman & Hall London pp: 99-129.
- Dong *et al.* (2005). "*vqsM* a novel AraC-type global regulator of quorum sensing signalling and virulence in *P. aeruginosa*." *Mol Micro* (58): 552-64.
- Engel, L. S., J. M. Hill, et al. (1998). "Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **273**(27): 16792-7.
- Engel, L. S., J. M. Hill, et al. (1998). "*Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(3): 662-5.
- Engel, L. S., J. A. Hobden, et al. (1997). "*Pseudomonas* deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(8): 1535-42.
- Fagerlind, M. G., P. Nilsson, et al. (2005). "Modeling the effect of acylated homoserine lactone antagonists in *Pseudomonas aeruginosa*." *Biosystems* **80**(2): 201-13.
- Fagerlind, M. G., S. A. Rice, et al. (2003). "The role of regulators in the expression of quorum-sensing signals in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**(2): 88-100.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* **132**(1): 6-13.
- Feldman, M., R. Bryan, et al. (1998). "Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection." *Infect Immun* **66**(1): 43-51.
- Feldmann, D., A. Sardet, et al. (1998). "Identification of three novel mutations in the CFTR gene, R117P, deltaD192, and 3121-1G-->A in four French patients." *Hum Mutat Suppl* **1**: S78-80.

- Finck-Barbancon, V., J. Goranson, et al. (1997). "ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury." *Mol Microbiol* **25**(3): 547-57.
- Fleiszig, S. M., J. P. Wiener-Kronish, et al. (1997). "*Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S." *Infect Immun* **65**(2): 579-86.
- Fodor, S. P., J. L. Read, et al. (1991). "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." *Science* **251**(4995): 767-73.
- Friedman, A. M., S. R. Long, et al. (1982). "Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants." *Gene* **18**(3): 289-96.
- Furuya, N. and T. Komano (1996). "Nucleotide sequence and characterization of the *trbABC* region of the IncI1 Plasmid R64: existence of the *pnd* gene for plasmid maintenance within the transfer region." *J Bacteriol* **178**(6): 1491-7.
- Gallagher, L. A., S. L. McKnight, et al. (2002). "Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **184**(23): 6472-80.
- Galloway, D. R. (1991). "*Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments." *Mol Microbiol* **5**(10): 2315-21.
- Gassel, M., T. Mollenkamp, et al. (1999). "The KdpF subunit is part of the K(+)-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex in vitro." *J Biol Chem* **274**(53): 37901-7.
- Gilboa-Garber, N. (1996). "Towards anti-*Pseudomonas aeruginosa* adhesion therapy." *Adv Exp Med Biol* **408**: 39-50.
- Gilligan, P. H. (1991). "Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis." *Clin Microbiol Rev* **4**(1): 35-51.
- Gomez et al. (2005). "*P. aeruginosa* bacterimia: Clinical and epidemiological patterns and treatment a 7 Year prospective study." *Rev Esp Quimioterap* **15** (4):360-65.
- Govan, J. R. and V. Deretic (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*." *Microbiol Rev* **60**(3): 539-74.
- Govan, J. R. and G. S. Harris (1986). "*Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis." *Microbiol Sci* **3**(10): 302-8.
- Govan, J. R., D. W. Martin, et al. (1992). "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: the role of mutations in muc loci." *FEMS Microbiol Lett* **79**(1-3): 323-9.
- Govan, J. R. and J. W. Nelson (1992). "Microbiology of lung infection in cystic fibrosis." *Br Med Bull* **48**(4): 912-30.
- Guiney, D. G., C. Deiss, et al. (1989). "Mutagenesis of the *Tra1* core region of RK2 by using Tn5: identification of plasmid-specific transfer genes." *J Bacteriol* **171**(7): 4100-3.
- Hahn, H. P. (1997). "The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review." *Gene* **192**(1): 99-108.
- Hardalo, C. and S. C. Edberg (1997). "*Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water." *Crit Rev Microbiol* **23**(1): 47-75.
- Hausler, S., B. Tummler, et al. (1999). "Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis." *Clin Infect Dis* **29**(3): 621-5.
- Heinemann, J. A. and G. F. Sprague, Jr. (1989). "Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast." *Nature* **340**(6230): 205-9.
- Hentzer, M., H. Wu, et al. (2003). "Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors." *Embo J* **22**(15): 3803-15.
- Heurlier, K., V. Denervaud, et al. (2003). "Negative control of quorum sensing by RpoN (σ 54) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J Bacteriol* **185**(7): 2227-35.
- Heurlier, K., F. Williams, et al. (2004). "Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J Bacteriol* **186**(10): 2936-45.
- Higgins, M. K., E. Bokma, et al. (2004). "Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 9994-9.
- Hirakata et al. (2002). "Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *P. aeruginosa*." *J Exp Med* **196**(1): 109-118.
- Hogardt, M., M. Roeder, et al. (2004). "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS." *Microbiology* **150**(Pt 4): 843-51.
- Hong, Y. Q. and B. Ghebrehiwet (1992). "Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3." *Clin Immunol Immunopathol* **62**(2): 133-8.

- Horan, T. C., J. W. White, et al. (1986). "Nosocomial infection surveillance, 1984." MMWR CDC Surveill Summ **35**(1): 17SS-29SS.
- Howe, T. R. and B. H. Iglewski (1984). "Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model." Infect Immun **43**(3): 1058-63.
- Ingram, J. M., K. J. Cheng, et al. (1973). "Alkaline phosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*: the mechanism of secretion and release of the enzyme from whole cells." Can J Microbiol **19**(11): 1407-15.
- Ingram, L. O. (1973). "Occurrence of cell lytic enzymes in blue-green bacteria." J Bacteriol **116**(2): 832-5.
- Ingram, L. O., Richmond, M.H., Sykes, R.B. (1973). "Molecular characterization of the R factors implicated in the carbenicillin resistance of a sequence of *P. aeruginosa* strains isolated from burns." Antimicrob Agents Chemother (3): 279-288.
- Jaffar-Bandjee, M. C., A. Lazdunski, et al. (1995). "Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*." J Clin Microbiol **33**(4): 924-9.
- Jagura-Burdzy, G., J. P. Ibbotson, et al. (1991). "The korF region of broad-host-range plasmid RK2 encodes two polypeptides with transcriptional repressor activity." J Bacteriol **173**(2): 826-33.
- Jagura-Burdzy, G., K. Kostelidou, et al. (1999). "IncC of broad-host-range plasmid RK2 modulates KorB transcriptional repressor activity In vivo and operator binding in vitro." J Bacteriol **181**(9): 2807-15.
- Jagura-Burdzy, G., D. P. Macartney, et al. (1999). "Repression at a distance by the global regulator KorB of promiscuous IncP plasmids." Mol Microbiol **32**(3): 519-32.
- Jagura-Burdzy, G. and C. M. Thomas (1992). "kfrA gene of broad host range plasmid RK2 encodes a novel DNA-binding protein." J Mol Biol **225**(3): 651-60.
- Jagura-Burdzy, G. and C. M. Thomas (1997). "Dissection of the switch between genes for replication and transfer of promiscuous plasmid RK2: basis of the dominance of trfAp over trbAp and specificity for KorA in controlling the switch." J Mol Biol **265**(5): 507-18.
- Jude, F., T. Kohler, et al. (2003). "Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **185**(12): 3558-66.
- Juhas et al. (2004). "Global regulation of quorum sensing and virulence by *vqsR* in *P. aeruginosa*." Microbiology (150): 831-841.
- Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B. (2005) „Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*." Environmental Microbiology **7**(4): 459-471.
- Kessler, E., M. Safrin, et al. (1993). "Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease." J Biol Chem **268**(10): 7503-8.
- King, E. O., M. K. Ward, et al. (1954). "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin." J Lab Clin Med **44**(2): 301-7.
- Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, et al. (1997). "Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **23**(2): 345-54.
- Konig, B., K. E. Jaeger, et al. (1996). "Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes)." Infect Immun **64**(8): 3252-8.
- Koronakis, V., A. Sharff, et al. (2000). "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export." Nature **405**(6789): 914-9.
- Krall, R., G. Schmidt, et al. (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein." Infect Immun **68**(10): 6066-8.
- Lamont, I. L., P. A. Beare, et al. (2002). "Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7072-7.
- Langton, K. P., P. J. Henderson, et al. (2005). "Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism?" Nat Prod Rep **22**(4): 439-51.
- Larbig (2001). "Intraklonale Genomdiversität in *P. aeruginosa*". Dissertation 2001
- Latifi, A., M. Foglino, et al. (1996). "A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS." Mol Microbiol **21**(6): 1137-46.
- Latifi, A., M. K. Winson, et al. (1995). "Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Mol Microbiol **17**(2): 333-43.

- Ledgham, F., C. Soscia, et al. (2003). "Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR2 (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing." Res Microbiol **154**(3): 207-13.
- Ledgham, F., I. Ventre, et al. (2003). "Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR." Mol Microbiol **48**(1): 199-210.
- Li, X. Z., N. Barre, et al. (2000). "Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*." J Antimicrob Chemother **46**(6): 885-93.
- Lillehoj, E. P., B. T. Kim, et al. (2002). "Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(4): L751-6.
- Lipshutz, R. J., S. P. Fodor, et al. (1999). "High density synthetic oligonucleotide arrays." Nat Genet **21**(1 Suppl): 20-4.
- Liu, P. V. (1974). "Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*." J Infect Dis **130** Suppl(0): S94-9.
- Mahenthalingam, E., M. E. Campbell, et al. (1994). "Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis." Infect Immun **62**(2): 596-605.
- Marx, C. J. and M. E. Lidstrom (2001). "Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria." Microbiology **147**(Pt 8): 2065-75.
- McGrath, S., D. S. Wade, et al. (2004). "Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS)." FEMS Microbiol Lett **230**(1): 27-34.
- Medina, G., K. Juarez, et al. (2003). "The *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer N-butyl-L-homoserine lactone." J Bacteriol **185**(1): 377-80.
- Medina, G., K. Juarez, et al. (2003). "Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter." J Bacteriol **185**(20): 5976-83.
- Mima, T., H. Sekiya, et al. (2005). "Gene Cloning and Properties of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiol Immunol **49**(11): 999-1002.
- Mine, T., Y. Morita, et al. (1999). "Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **43**(2): 415-7.
- Murakami, S., R. Nakashima, et al. (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." Nature **419**(6907): 587-93.
- Nealson, K. H., T. Platt, et al. (1970). "Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system." J Bacteriol **104**(1): 313-22.
- Nicas, T. I. and B. H. Iglewski (1984). "Isolation and characterization of transposon-induced mutants of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in production of exoenzyme S." Infect Immun **45**(2): 470-4.
- Nicas, T. I. and B. H. Iglewski (1985). "The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." Can J Microbiol **31**(4): 387-92.
- Nikaido, H. (1994). "Maltose transport system of *Escherichia coli*: an ABC-type transporter." FEBS Lett **346**(1): 55-8.
- Nikaido, H. (1994). "Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux." Science **264**(5157): 382-8.
- Oelmüller, U., H. G. Schlegel, et al. (1990). "Differential stability of mRNA species of *Alcaligenes eutrophus* soluble and particulate hydrogenases." J Bacteriol **172**(12): 7057-64.
- Olsen, G. J., C. R. Woese, et al. (1994). "The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology." J Bacteriol **176**(1): 1-6.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." Mol Microbiol **30**(2): 295-304.
- Pansegrau, W., E. Lanka, et al. (1994). "Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis." J Mol Biol **239**(5): 623-63.
- Pappas, K. M., C. L. Weingart, et al. (2004). "Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling." Mol Microbiol **53**(3): 755-69.
- Passador et al, Iglewski, BH. (1993). "Expression of *P. aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication." Science (260): 1127-1130.

- Paulsen, I. T. (1996). "Carbon metabolism and its regulation in *Streptomyces* and other high GC gram-positive bacteria." *Res Microbiol* **147**(6-7): 535-41.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, et al. (1996). "Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3630-5.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, et al. (1996). "Proton-dependent multidrug efflux systems." *Microbiol Rev* **60**(4): 575-608.
- Paulsen, I. T., R. A. Skurray, et al. (1996). "The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs." *Mol Microbiol* **19**(6): 1167-75.
- Pearson, J. P., E. C. Pesci, et al. (1997). "Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes." *J Bacteriol* **179**(18): 5756-67.
- Pearson, J. P., C. Van Delden, et al. (1999). "Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals." *J Bacteriol* **181**(4): 1203-10.
- Pesci, E. C. and B. H. Iglewski (1997). "The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing." *Trends Microbiol* **5**(4): 132-4; discussion 134-5.
- Pesci, E. C., J. B. Milbank, et al. (1999). "Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11229-34.
- Pesci, E. C., J. P. Pearson, et al. (1997). "Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **179**(10): 3127-32.
- Pessi, G., F. Williams, et al. (2001). "The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **183**(22): 6676-83.
- Poole, K. (2001). "Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms." *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(2): 255-64.
- Poole, K., N. Gotoh, et al. (1996). "Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol Microbiol* **21**(4): 713-24.
- Poole, K., K. Krebs, et al. (1993). "Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon." *J Bacteriol* **175**(22): 7363-72.
- Quinn, J. P. (1998). "Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens." *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**: S117-24.
- Rabin, S. D. and A. R. Hauser (2003). "*Pseudomonas aeruginosa* ExoU, a toxin transported by the type III secretion system, kills *Saccharomyces cerevisiae*." *Infect Immun* **71**(7): 4144-50.
- Ramos, J. L., E. Duque, et al. (1998). "Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E." *J Bacteriol* **180**(13): 3323-9.
- Ramphal, R., J. C. Sadoff, et al. (1984). "Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium." *Infect Immun* **44**(1): 38-40.
- Ran, H., D. J. Hassett, et al. (2003). "Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14315-20.
- Rashid, M. H., K. Rumbaugh, et al. (2000). "Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9636-41.
- Reimann, C., M. Beyeler, et al. (1997). "The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase." *Mol Microbiol* **24**(2): 309-19.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." *Science* **245**(4922): 1066-73.
- Roland P.S und Stroma D.W. (2002 "Microbiology of acute otitis externa." *Laryngoscope* (112): 1166-77.
- Römling, U., B. Fiedler, et al. (1994). "Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis." *J Infect Dis* **170**(6): 1616-21.
- Römling, U., K. D. Schmidt, et al. (1997). "Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats." *J Mol Biol* **271**(3): 386-404.
- Römling, U., K. D. Schmidt, et al. (1997). "Large chromosomal inversions occur in *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains isolated from cystic fibrosis patients." *FEMS Microbiol Lett* **150**(1): 149-56.
- Rust, L., C. R. Messing, et al. (1994). "Elastase assays." *Methods Enzymol* **235**: 554-62.
- Saier, M. H., Jr. and I. T. Paulsen (2001). "Phylogeny of multidrug transporters." *Semin Cell Dev Biol* **12**(3): 205-13.

- Saier, M. H., Jr., I. T. Paulsen, et al. (1997). "A bacterial model system for understanding multi-drug resistance." *Microb Drug Resist* **3**(4): 289-95.
- Sato *et al.* (2003). "The mechanism of action of the *P. aeruginosa* encoded type III secretion cytotoxin ExoU." *EMBO* (22): 2959-69.
- Schmidt, K. D., B. Tümmler, et al. (1996). "Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats." *J Bacteriol* **178**(1): 85-93.
- Schweizer, HP. (2003). "Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *P. aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions." *Genet Mol Res* **2**(1): 48-62.
- Schuster, M., A. C. Hawkins, et al. (2004). "The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing." *Mol Microbiol* **51**(4): 973-85.
- Schuster, M., C. P. Lostroh, et al. (2003). "Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis." *J Bacteriol* **185**(7): 2066-79.
- Shibuya, Y., H. Tanaka, et al. (1991). "Activation of human plasma prekallikrein by *Pseudomonas aeruginosa* elastase in vitro." *Biochim Biophys Acta* **1097**(1): 23-7.
- Shibuya, Y., T. Yamamoto, et al. (1991). "*Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin." *Biochim Biophys Acta* **1077**(3): 316-24.
- Sitnikov, D. M., J. B. Schineller, et al. (1995). "Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*." *Mol Microbiol* **17**(5): 801-12.
- Sokurenko, E. V., V. Tchesnokova, et al. (2001). "Detection of simple mutations and polymorphisms in large genomic regions." *Nucleic Acids Res* **29**(22): E111.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, et al. (1966). "The aerobic pseudomonads: a taxonomic study." *J Gen Microbiol* **43**(2): 159-271.
- Staskawicz, B., D. Dahlbeck, et al. (1987). "Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*." *J Bacteriol* **169**(12): 5789-94.
- Storey, D. G., E. E. Ujack, et al. (1992). "Population transcript accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase in sputa from patients with cystic fibrosis." *Infect Immun* **60**(11): 4687-94.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, et al. (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen." *Nature* **406**(6799): 959-64.
- Takase, H., H. Nitani, et al. (2000). "Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice." *Infect Immun* **68**(4): 1834-9.
- Tan, M. W., L. G. Rahme, et al. (1999). "*Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2408-13.
- Tao *et al.*, Conway, T. (1999). "Functional genomics expression analysis of *E. coli* growing on minimal and rich media." *J Bacteriol* (181): 6425-6440.
- Tennant *et al.* (2005). "Microbial isolates from patients in an intensive care unit and associated risk factors." *West Indian Med J* **54** (4): 225-31.
- Thomas, C. M. (1986). "Evidence for the involvement of the *incC* locus of broad host range plasmid RK2 in plasmid maintenance." *Plasmid* **16**(1): 15-29.
- Thomas, CM., Helsinki, DR. (1989) "Vegetative replication and stable inheritance of *Inc* plasmids pp: 1-25 in M. Thomas (ed): *promiscuous plasmids of gram negative bacteria*." *Academic Press Ltd: San Diego Calif.*
- Thompson, L. S., J. S. Webb, et al. (2003). "The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhII* in *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiol Lett* **220**(2): 187-95.
- Tümmler, B. and C. Kiewitz (1999). "Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections." *Mol Med Today* **5**(8): 351-8.
- Tümmler, B., Steinkamp, G., Götz, M. Staab, D. (1999) „Mukoviszidose in: Rieger *et al.*: *Pneumologie des Kindes- und Jugendalters*." *Springer Verlag Heidelberg.*
- Usher, L. R., R. A. Lawson, et al. (2002). "Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection." *J Immunol* **168**(4): 1861-8.
- Vallet, I., J. W. Olson, et al. (2001). "The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6911-6.

- Van Bambeke, F., E. Balzi, et al. (2000). "Antibiotic efflux pumps." *Biochem Pharmacol* **60**(4): 457-70.
- van Beilen, J. B., S. Panke, et al. (2001). "Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes." *Microbiology* **147**(Pt 6): 1621-30.
- Van Delden (2004). "Virulence factors in *P. aeruginosa*." Volume 2 (ed) Ramos JL *Kluwer Academic Plenum Publishers N.Y.*
- Van Delden, C. and B. H. Iglewski (1998). "Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Emerg Infect Dis* **4**(4): 551-60.
- Van Delden, C., E. C. Pesci, et al. (1998). "Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant." *Infect Immun* **66**(9): 4499-502.
- Vanbleu, E., K. Marchal, et al. (2004). "Genetic and physical map of the pLAFR1 vector." *DNA Seq* **15**(3): 225-7.
- Verhelst et al. (2005) "Clinical epidemiological and cost aspects of contact lens related infectious keratitis in Belgium: results of a 7 year retrospective study." *Bull Soc Belge Ophtalmol* **297**: 7-15.
- Wada, A., K. Igarashi, et al. (1995). "Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*." *Biochem Biophys Res Commun* **214**(2): 410-7.
- Wagner, V. E., D. Bushnell, et al. (2003). "Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment." *J Bacteriol* **185**(7): 2080-95.
- Wagner, V. E., R. J. Gillis, et al. (2004). "Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*." *Vaccine* **22 Suppl 1**: S15-20.
- Watnick, P. and R. Kolter (2000). "Biofilm, city of microbes." *J Bacteriol* **182**(10): 2675-9.
- Weber, M. L. and R. Cleroux (1986). "Comparison of immediate retention obtained by the use of a tape slide programme and by a formal lecture." *Med Teach* **8**(4): 393-5.
- Welsh, M. J. and A. E. Smith (1995). "Cystic fibrosis." *Sci Am* **273**(6): 52-9.
- Westbrock-Wadman, S., D. R. Sherman, et al. (1999). "Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(12): 2975-83.
- Wiehlmann (2001). "Sequenzspezifizierte Transposonmutagenese (STM) in *P.aeruginosa*". *Dissertation 2001*
- Wick, M. J., D. W. Frank, et al. (1990). "Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A." *Annu Rev Microbiol* **44**: 335-63.
- Wick, M. J., A. N. Hamood, et al. (1990). "Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A." *Mol Microbiol* **4**(4): 527-35.
- Williams, D. R., D. P. Macartney, et al. (1998). "The partitioning activity of the RK2 central control region requires only incC, korB and KorB-binding site O(B)3 but other KorB-binding sites form destabilizing complexes in the absence of O(B)3." *Microbiology* **144 (Pt 12)**: 3369-78.
- Woese, C. R. and G. E. Fox (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(11): 5088-90.
- Wolfgang, M. C., V. T. Lee, et al. (2003). "Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway." *Dev Cell* **4**(2): 253-63.
- Woods, D. E. and B. H. Iglewski (1983). "Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives." *Rev Infect Dis* **5 Suppl 4**: S715-22.
- Yildirim et al. (2005). "Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care units and the hospital services unit of a single center." *J. Burn. Care Rehabil* **26** (6): 488-92
- Yu, E. W., J. R. Aires, et al. (2003). "AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity." *J Bacteriol* **185**(19): 5657-64.
- Yu, E. W., G. McDermott, et al. (2003). "Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump." *Science* **300**(5621): 976-80.
- Zatyka, M., G. Jagura-Burdzy, et al. (1994). "Regulation of transfer genes of promiscuous IncP alpha plasmid RK2: repression of Tra1 region transcription both by relaxosome proteins and by the Tra2 regulator TrbA." *Microbiology* **140 (Pt 11)**: 2981-90.

-
- Zatyka, M., G. Jagura-Burdzy, et al. (1997). "Transcriptional and translational control of the genes for the mating pair formation apparatus of promiscuous IncP plasmids." J Bacteriol **179**(23): 7201-9.
- Zgurskaya, H. I., G. Krishnamoorthy, et al. (2003). "Mechanism of antibiotic efflux in Gram-negative bacteria." Front Biosci **8**: s862-73.
- Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido (2000). "Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes." Mol Microbiol **37**(2): 219-25.

6 Anhang

Anhang I

Oligonukleotide für die Sondenherstellung

Oligonukleotid	Sequenz
5349 hin	CTGGCCAGCCTGAAGAAG
5349 rück	CCAGAGCCTTCCACTAGCC
4785 hin	CTATGAGGAGGGCTGGCA
4785 rück	GTCTTGCACTACTCGGGGTC
4621 hin	GAGGACGACGAGTTCTCCAG
4621 rück	CTCTGGAAGTCTCGTAGCG
2751/2752 hin	TGTTGACTGACTGGGCCG
2751/2752 rück	GAGGTAGCGGAGCGTCTTG
1436 hin	GACTGGTTCTACCTGCGCTC
1436 rück	GTCGACCATGAGGATGCC
1288 hin	GCCTGACCTACCACTCCAAG
1288 rück	GACGGTCAGGTCCTGGTTC
0928 hin	GGACGACTACCTGACCAAGC
0928 rück	GTGGAGGACAGGTGGGTG
0447 hin	GGCGAGATCGTGATGGAC
0447 rück	GGTGCCCTCGTAGGTGTTC

Oligonukleotide für die Überprüfung der Komplementation mit den pLAFR3 Konstrukten.

Oligonukleotid	Sequenz
Tetrazyklin hin	CGATATCACTGATGGCGATG
Tetrazyklin rück	ATCATTCCGAGCATGAGTGC
<i>E. coli</i> oriV hin	GTCGATGCTGGAAGACATTC
<i>E. coli</i> oriV rück	CGTGGTCAGTAAGAAGTGCC
Tn5 hin	ACTTCGTTCTGCGTTTCGACC
Tn5 rück	TGTACCTGGCGCTCATGAAGC

Oligonukleotide der polycistronischen Genkassetten. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Schnittstelle	Sequenz
0447 hin	<i>HindIII</i>	GCGCA <u>AAGCTT</u> CTGTGCCCGCTTGATGAGTTG
0447 rück	<i>XbaI</i>	GCGC <u>TCTAGAT</u> CCAGTCCAGCACCACC
0928 hin	<i>HindIII</i>	GCGCA <u>AAGCTT</u> CCAGGTATGGATCGCCAG
0928 rück	<i>XbaI</i>	GCGC <u>TCTAGAGAT</u> GCGATGACCAGAGGC
1288 hin	<i>HindIII</i>	GCGCA <u>AAGCTT</u> TAGCTACCGTCGGGGTTG
1288 rück	<i>XbaI</i>	GCGC <u>TCTAGAC</u> GCGACTTCCTCTACAGCC
1288* hin	<i>XbaI</i>	GCGC <u>TCTAGAG</u> CCAGGTAGGTCTGCTTCTG
1288* rück	<i>SacI</i>	GCGC <u>GAGCTC</u> AGGTGGTGCTCTACGACGAC
1436 hin	<i>HindIII</i>	GCGCA <u>AAGCTT</u> ATGGCTGACCACCTCGAC
1436 rück	<i>XbaI</i>	GCGC <u>TCTAGACA</u> AGGTCTACGCCATCGG
2751/2752 hin	<i>XbaI</i>	GCGC <u>TCTAGAG</u> CAGTATTTCGCGGACCAC
2751/2752 rück	<i>SacI</i>	GCGC <u>GAGCTC</u> CTGGCCTGTTGGATCCT
4621 hin	<i>HindIII</i>	GCGCA <u>AAGCTT</u> CGGACCACCTGTAGATCGAG
4621 rück	<i>SacI</i>	GCGC <u>GAGCTC</u> CCAGGCTAGGGAACAGCTTC
4785 hin	<i>BglII</i>	GTCCG <u>GAGATCT</u> GATCGCCAGGTAAGTGGAGC
4785 rück	<i>HindIII</i>	GTCGGA <u>AAGCTT</u> GGTGACGATGCTGAAGGTGG
5349 hin	<i>HindIII</i>	GCGCA <u>AAGCTT</u> GGTAGTCCGCTGCGAAAC
5349 rück	<i>SacI</i>	GCGC <u>GAGCTC</u> ACCGCTCGATACGCTCTG

Oligonukleotide der RT-PCR zur Überprüfung der konstitutiv exprimierten Gene.

Oligonukleotid	Sequenz
LecB 1	ATGGCAACACAAGGAGTGTTCC
LecB 2	CTAGCCGAGCGGCCAGTTG
rplU 1	TGTACGCAGTGATTGTTACCG
rplU 2	ATGTGGTGCTTACGACGGCG

Anhang II

Molekulargewichtsstandards die für die DNA sowie RNA Agarosegelelektrophorese benutzt worden sind. Die Fragmentgrößen sind in Basenpaaren angegeben.

<u>λBstEII</u>	<u>100 bp Standard</u>	<u>1 kb Standard</u>	<u>2-log Standard</u>	<u>0,16-1,77kb Standard</u>
8454	1517	10000	10000	1770
7242	1200	8000	8000	1520
6369	1000	6000	6000	1280
5686	900	5000	5000	780
4822	800	4000	4000	530
4324	700	3000	3000	400
3675	600	2000	2000	280
2323	517/500	1500	1500	155
1929	400	1200	1200	
1371	300	1000	1000	
1264	200		900	
702	100		800	
224			700	
117			600	
			517/500	
			400	
			300	
			200	
			100	

7 Abkürzungsverzeichnis

AAP	Agarose-Auftragspuffer
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celcius
C-	Carboxyl-
Carb	Carbenicillin
cDNA	komplementäre DNA
CF	Cystische Fibrose
dd	didesoxy
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
ϵ_{xxxnm}	Extinktionskoeffizient bei xxx nm
<i>et al</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HSL	Homoserinlacton
k	kilo
kb	1000 Basenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
m	milli oder Meter
Mb	Megabasen
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
μ	mikro
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
n	nano
N-	Amino-
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
Ω	Ohm, Einheit des elektrischen Widerstands
OD _{xxxnm}	optische Dichte bei xxxnm
Oligonukleotid	oligomeres Desoxyribonukleotid
ORF	<i>Open reading frame</i> (offenes Leseraster)
p	pico oder Plasmid
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
P _i	anorganisches Phosphat
r	ribo

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylphosphat
s	Sekunde(n)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet	Tetrazyklin
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
wt	Wildtyp
xg	Zentrifugalbeschleunigung

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Susanne von Pall de Tolna
Lindemannstr.1, 30952 Ronnenberg
Geburtstag: 21.07.1974
Geburtsort: Windhuk (Namibia)
Familienstand: ledig

Schulbildung

1992-1995 Allgemeine Hochschulreife an der Handelslehranstalt
HamelN-Pyrmont

Ausbildung

1995-1996 Lehre zur Groß- und Außenhandelskauffrau
Firma: Wieland Antriebstechnik GmbH, Springe
Abschluß Januar 1997

Hochschulstudium

1996-2001 Universität Hannover, Fachbereich Biologie
Abschluß als Diplom Biologin (mit Auszeichnung) 28. März 2001

Sep.2000-März 2001 Diplomarbeit: Mutagenesestudien zur Löslichkeitsverbesserung
eines fusionierten Dimers der Restriktionsendonuklease *EcoRI*

2001-August 2002 Wissenschaftliche Angestellte an der Medizinischen Hochschule
Hannover

Aug. 2002-Feb.2006 Doktorarbeit, Universität Hannover
Modulation des *Quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*
durch den RND Efflux Transporter MexN
Klinische Forschergruppe, Medizinische Hochschule Hannover,
betreut von Prof. Dr. Dr. Tümmler