

**Mobile Geninseln in**  
***Pseudomonas aeruginosa***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz  
Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation  
von

**DIPL.-BIOLOGE DIECO WÜRDEMANN**  
geboren am 20.01.1976 in Oldenburg (Oldb.)

Hannover 2007

**Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Burkhard Tümmler im Zeitraum vom 15.11.2003 – 15.10.2006 in der klinischen Forschergruppe „Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“ im Zentrum Biochemie und Zentrum Kinderheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt**

**Referent: Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler**

**Koreferent: Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand**

**Tag der Promotion: 19.01.2007**

## Kurzfassung

Geninseln (genomische Inseln) sind größere, ins Chromosom inserierte DNA - Abschnitte, die nicht zum Kerngenom gehören und meist durch speziesunspezifischen horizontalen Gentransfer von einem auf den anderen Bakterienstamm übertragen werden. Die chromosomale Integration von Geninseln stellt neben der Aufnahme von Phagen und Plasmiden eine der Hauptursachen für die Genomdiversität von *Pseudomonas aeruginosa* dar.

Die mobile Geninsel pKLC102 wurde zuerst in *P. aeruginosa* Klon C – Stämmen detektiert. In diesen lag sie als episomales Plasmid und als in das Genom integrierte Insel vor. pKLC102 inserierte in ein tRNA<sup>Lys</sup> – Gen, war 104 kb groß und wies 105 mögliche Gene (ORFs) auf.

*in silico* – Analysen der sequenzierten *P. aeruginosa* – Stämme PACS2, C3719, 2192 und PA7 zeigten die Präsenz einer ähnlichen Insel im Genom dieser Stämme. Diese pKLC102 – verwandten Elemente wiesen ebenfalls eine mosaikartige Struktur auf. Hierbei traten ähnliche ORFs blockartig auf und wurden als Bausteine des konservierten Grundgerüsts definiert, zwischen denen es zur Insertion von stammspezifischer DNA kommen kann.

Durch Hybridisierungsexperimente wurde außerdem die Verbreitung pKLC102 – verwandter Elemente innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* analysiert. Hierfür wurde ein pKLC102 repräsentierender Makroarray generiert, mit dessen Hilfe die Genome verschiedener *P. aeruginosa* Stämme auf die Anwesenheit pKLC102 – verwandter Geninseln untersucht wurden. Analysiert wurden die Genome 50 verschiedener *P. aeruginosa* – Stämme unterschiedlicher Herkunft und Habitate. In allen untersuchten Isolaten wurden partiell bzw. vollständig konservierte Geninseln detektiert. Anhand der konservierten pKLC102 - ORFs erfolgte eine Zuordnung zu verschiedenen Typen dieser Familie. Insgesamt wurden fünf verschiedene Inseltypen definiert, die wiederum in insgesamt 15 verschiedenen Subtypen unterteilt wurden. Geninseln vom Typ pKLC102 scheinen innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* weit verbreitet zu sein. Die unterschiedlichen Inseltypen wiesen alle einen mosaikartigen Aufbau auf. Das blockweise konservierte Grundgerüst scheint charakteristisch für diese Art von Geninseln zu sein und weist auf einen gemeinsamen Vorläufer hin.

Weiterhin wurde gezeigt, dass pKLC102 und verwandte Geninseln vollständig aus dem Genom der jeweiligen *P. aeruginosa* Stämme ausgeschnitten werden und die Bakterien auch ohne diese Geninseln existieren können. Die Gene, die auf der Geninsel pKLC102 lokalisiert sind, scheinen nicht für das Überleben der Bakterien essentiell zu sein..

Die Exzisionsraten, mit der pKLC102 aus dem Genom ausgeschnitten wird, wurden während unterschiedlichen/r Wachstumsphasen analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Anzahl an episomalem Plasmid von der frühlogarithmischen bis zur spätstationären Phase stark verringerte. Parallel dazu sank die Zahl an integrierten Geninseln im Genom. pKLC102 scheint für Bakterien in der spätstationären Phase eine geringere Rolle zu spielen, als für solche, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden.

Die bei diesen Analysen detektierte Menge an episomalem Plasmid war höher als die Zahl der im Genom integrierten Form der Insel. pKLC102 kann sich demnach als eigenständiges Element replizieren.

Ebenfalls durchgeführte Analysen der Geninsel PAPI-1 des Stammes PA14 zeigten, dass diese in nur ca 2% der Bakterien als zirkuläres Plasmid vorlag. PAPI – 1 ist demnach nicht in der Lage, sich als eigenständiges episomales Element in den Bakterien zu replizieren. Ein möglicher Grund könnten nachgewiesene Unterschiede in der oriV – Struktur sein.

Im Gegensatz zu PAPI – 1 besitzt pKLC102 anscheinend ein funktionelles Plasmidmodul und kann sich aus diesem Grund als eigenständiges Element replizieren. pKLC102 weist somit die höchste bisher bekannte Mobilität einer Geninsel auf.

**Schlüsselwörter:** *Pseudomonas aeruginosa*, mobile Geninseln, pKLC102, PAPI - 1

## Abstract

Gene islands (genomic islands) are large blocks of chromosomally integrated DNA which are not part of the core genome and are transferred inbetween bacteria by horizontal gene transfer. Chromosomal integration of gene islands, phages and plasmids is one major reason for genome diversity in *Pseudomonas aeruginosa*.

The mobile genome island pKLC102 was first detected in *P. aeruginosa* clone C strains where it coexists as plasmid as well as gene island. pKLC102 is inserted into a tRNA<sup>Lys</sup> – gene, is 104 kb in size and includes 105 hypothetical genes (ORFs).

*In silico* analysis of the sequenced *P. aeruginosa* strains PACS2, C3719, 2192 and PA7 revealed the presence of homologous gene islands in their genomes. These pKLC102 – like genomic islands also shared a similar mosaic-like structure. Some ORFs in the respective gene islands were similar to those in pKLC102 and were defined as the conserved core genome, in which insertions of strain – specific DNA can be found.

The abundance and diversity of pKLC102 – like genomic islands in *P. aeruginosa* were investigated applying hybridization analysis. A macroarray representing pKLC102 ORFs was generated for this purpose. The genomes of 50 different *P. aeruginosa* strains from diverse habitats and origins were analysed for the presence of pKLC102 – like gene islands. In all analysed isolates, partial or complete conserved gene islands were detected. On the basis of the conserved pKLC102 ORFs, a classification of different island types was carried out. In summary, it could be differentiated between five different types of islands which were split into 15 different subtypes. These findings revealed pKLC102 – like gene islands in *P. aeruginosa* are widespread.

The differentiated subtypes revealed a mosaic-like structure. The backbone structure is conserved in specific blocks, which seems to be characteristic for this family of gene islands and constitutes evidence that they evolved from a common ancestor.

It was also shown that pKLC102 and related islands can be completely excised from the core genome of *P. aeruginosa* strains. Analysis revealed that the bacteria can survive without the genome island. This leads to the assumption that pKLC102 does not code for essential bacterial functions.

The spontaneous excision rates of pKLC102 during different growth rates were estimated. The results revealed that during growth, the percentage of episomal plasmid decreases. In parallel, the percentage of chromosomally integrated genomic islands also decreases.

It seems that pKLC102 is more important for bacteria in the exponential growth phase than in the late stationary phase.

The detected amount of episomal plasmid was higher than the amount of integrated gene islands. pKLC102 can thus replicate in its host cell as an independent element.

The same analyses have been performed for the gene island PAPI – 1 in strain PA14. PAPI – 1 was only found as a circular plasmid in 2% of bacteria. That means that PAPI – 1 cannot replicate as a selfish element in the bacteria. One possible reason could be due to differences in the oriV – structure. In contrast to PAPI – 1, pKLC102 includes a functional plasmid – module and can replicate itself as a selfish element. Therefore pKLC102 is the most mobile genome island reported to date.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, mobile gene islands, pKLC102, PAPI – 1



## Danksagungen

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. B. Tümmler für die Bereitstellung dieses höchst interessanten Themas, sein stetes Interesse und seine engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Burkhard Tümmler und Frau Helga Riehn-Kopp danke ich für die gelungene Organisation des Europäischen Graduiertenkollegs“*Pseudomonas: Pathogenicity and Biotechnology*“, sowie allen Mitgliedern für die unvergessliche Zeit.

Weiterhin danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Klinischen Forschergruppe für die produktive Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und vielen schönen Stunden während und nach der Arbeit..

Jens Klockgether, Lutz Wiehlmann und Frauke Stanke für die hervorragende Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft bei sämtlichen auftretenden Problemen.

Vinod Kumar möchte ich ganz herzlich für die produktiven Wochen, in denen wir zusammen unsere Doktorarbeit geschrieben haben, danken.

Gerwin, Wigand, André, Britta, Jörg, Bea, Sabrina, Dieter und Anna gilt mein großer Dank für ihre Freundschaft und Unterstützung in den letzten Monaten.

Und mehr als nur Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für all ihre Unterstützung in den letzten Jahren.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	8
1.1	Bakterielle Geninseln	8
1.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.3	Genomische Organisation von <i>P. aeruginosa</i>	12
1.4	Geninseln in <i>P. aeruginosa</i>	15
1.4.1	PAGI – 1 – verwandte Geninseln	15
1.4.2	PAGI – 2 – verwandte Geninseln	16
1.4.3	pKLC102 – verwandte Geninseln	16
1.4.4	Weitere Geninseln	18
1.5	Ziele der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Verbrauchsmaterial	26
2.1.3	Chemikalien und Enzyme	26
2.1.4	Verwendete Medien	27
2.1.5	Bakterienstämme	27
2.2.	Mikrobiologische Methoden	28
2.2.1	Anzucht von Bakterien	28
2.2.2	Bestimmung der Bakterienzellzahl	28
2.2.3	Lagerung von Bakterien	29
2.2.4	Präparation von DNA	30
2.2.4.1	Präparation von genomischer DNA	30
2.2.4.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	31
2.2.4.3	Präparation von Cosmiden aus <i>E. coli</i> Zellen	31
2.2.4.4	Isolierung von DNA - Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.2.5	Methoden zur DNA – Analyse	33
2.2.5.1	Konzentrationsmessung	33
2.2.5.2	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.5.3	Standard PCR-Ansatz	34
2.2.5.4	PCR – Ansatz mit Betain	36
2.2.5.5	Kinetik – PCR zur Quantifizierung	37
2.2.5.6	Agarosegelelektrophorese	38
2.3	DNA-DNA-Hybridisierungen	40
2.3.1	DNA-Fixierung auf Membranen	40
2.3.2	Digoxigenin-Markierung von DNA	41
2.3.3	Aufreinigung Digoxigenin-markierter DNA	42
2.3.4	Hybridisierung von DIG-markierter DNA mit membranfixierter DNA	42
2.3.5	Detektion Digoxigenin-markierter DNA	43
2.3.6	Regeneration von hybridisierten DNA-Membranen	44
2.4	Phänotypische Untersuchungen	44
2.4.1	Caseinplatten	44
2.4.2	Peroxid-Agarplatten	45
2.4.3	Kongorot-Agarplatten	46
2.4.4	Chrom Azurol S-Platten	46
2.4.5	<i>Twitching</i> -Agar	47
2.5	„Fast – killing“ – Versuche mit <i>Caenorhabditis elegans</i>	47
2.6	Sequenzanalyse in silico	49
2.7	Stammbaumerstellung	50

3.	Ergebnisse und Diskussion	51
3.1	Die mobile Geninsel pKLC102	51
3.1.1	Etablierung einer PCR zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninseln pKLC102 und PAPI-1	51
3.1.2	Quantifizierung des Vorkommens der verschiedenen Formen von pKLC102 und PAPI-1	54
3.2	pKLC102 - verwandte Geninseln in sequenzierten <i>P. aeruginosa</i> Stämmen	60
3.2.1	Neue sequenzierte <i>P. aeruginosa</i> Isolate	60
3.2.2	Vergleich pKLC102 – ähnlicher Geninseln in den sequenzierten <i>P. aeruginosa</i> Stämmen	60
3.2.3	Konservierung der TAGI – Sequenzen in pKLC102 ähnlichen Geninseln	63
3.2.4	Konservierung von CP1 (soj) und CP103a (xerC integrase) in pKLC102 – ähnlichen Geninseln	67
3.2.5	Vergleich der oriV - Region zwischen pKLC102 und pKLC102 – artigen Inseln	68
3.3	Epidemiologie von pKLC102	73
3.3.1	Generierung eines repräsentativen pKLC102 Makroarrays	75
3.3.2	Ergebnisse der Makroarray – Hybridisierungen	79
3.3.3	Klassifizierung von Inseltypen anhand der Makroarray-Ergebnisse	83
3.4	Verlust pKLC102 – verwandter Geninseln in <i>P. aeruginosa</i> Stämmen	89
3.4.1	Analysierte Bakterienstämme	89
3.4.2	Vergleich verschiedener <i>P. aeruginosa</i> Stämme mit Hilfe der kombinatorischen PCR	90
3.4.3	Dot blots verschiedener <i>P. aeruginosa</i> Stämme	92
3.5	Phänotypische Analysen verschiedener <i>P. aeruginosa</i> Isolate	95
3.5.1	Virulenz im <i>Caenorhabditis elegans</i> – Infektionsmodell	95
3.5.2	Analysen verschiedener <i>P. aeruginosa</i> Stämme auf die Fähigkeit zur „Twitching Motility“	97
3.5.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen isoklonaler <i>P. aeruginosa</i> Stämme	98
3.5.4	Analyse der Siderophorenproduktion isoklonaler Varianten	99
3.5.5	Untersuchung der Proteaseaktivität isoklonaler <i>P. aeruginosa</i> Varianten	101
3.5.6	Wachstumsvergleich isoklonaler Varianten auf LB – Agar	102
3.5.7	Vergleich der Koloniemorphologie isoklonaler Varianten auf Kongorot – Agar	103
3.5.8	Vergleich verschiedener Klon C – Stämme auf Resistenz gegen oxidativen Stress	104
3.5.9	Analyse der Hämolyseaktivität unterschiedlicher Klon C – Stämme	105
4.	Diversität pKLC102 – verwandter Geninseln in <i>P. aeruginosa</i>	107
4.1	Vergleich der Geninseln pKLC102 und PAPI - 1	107
4.2	Vergleich pKLC102- und PAPI-2 – verwandter Geninseln	111
5.	Verbreitung von pKLC102-artigen Geninseln in anderen Bakterienstämmen	114
6.	Zusammenfassung: Mobile Geninseln in <i>P. aeruginosa</i>	121
7.	Abkürzungsverzeichnis	126
8.	Literaturverzeichnis	127
9.	Anhang	138
9.1	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	138
9.2	Lebenslauf	139
9.3	Sequenzen der verwendeten Primer	140

# **1. Einleitung**

## **1.1 Bakterielle Geninseln**

Bakteriengenome bestehen aus einem sogenannten „Kerngenom“, das konserviert in den Stämmen einer Spezies zu finden ist, und variablen DNA – Bereichen, die in den Subgruppen und Stämmen einer Spezies variieren können. Durch den Verlust und die Aufnahme von DNA unterliegen die variablen Bereiche ständigen Veränderungen. Dieser Vorgang spielt eine bedeutende Rolle in der Bakterienevolution (Dobrindt et al., 2004).

Während im Kerngenom meist die genetischen Informationen für essentielle zelluläre Funktionen lokalisiert sind, codiert der variable Teil häufig für zusätzliche Funktionen, die den einzelnen Stämmen in ihrem spezifischen Habitat bestimmte Vorteile verleihen können (z.B. Antibiotikaresistenzen). Diese flexiblen DNA – Bereiche bestehen aus Bakteriophagen, Insertionssequenz – Elementen (IS – Elemente), Plasmiden, Integrons, Transposons oder Geninseln.

Geninseln (genomische Inseln) sind ins Bakteriengenom inserierte DNA - Elemente, die nicht zum Kerngenom gehören (Dobrindt et al., 2004). Sie codieren meist Gene, die für ihre Mobilität eine bedeutende Rolle spielen. Zu diesen Proteinen gehören z. B. Integrasen und Transposasen. Die Mehrzahl der genomischen Inseln inserieren in tRNA – Gene. Typischerweise sind diese von IS – Elementen oder *direct repeats* flankiert. In den meisten Fällen lassen sie sich anhand ihres unterschiedlichen GC – Gehalts und der atypischen Oligonukleotidzusammensetzung vom Kerngenom unterscheiden (Dobrindt et al., 2004; Reva et al., 2005).

Die ersten Geninseln wurden in den Genomen uropathogener *Escherischia coli* Stämme entdeckt. Die Inseln codierten u.a. Proteine, die an Virulenzmechanismen beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden sie als „Pathogenitätsinseln“ bezeichnet (Hacker et al., 2002). Mittlerweile sind vergleichbare Strukturen auch im Genom vieler nichtpathogener Bakterien entdeckt worden. Hier werden sie als Genominseln bezeichnet, die für verschiedene Funktionen wie z. B. metabolische Leistungen, Sekretionssysteme, Symbiosefaktoren oder Resistenzen codieren können. Je nach ihrer Funktion werden sie dementsprechend als Metabolismusinseln, Resistenzinseln oder Pathogenitätsinseln bezeichnet (Dobrindt et al., 2004).

Vergleicht man genomische Inseln mit anderen mobilen Elementen wie z. B. Transposons oder IS - Elementen, werden durch Geninseln eine größere Anzahl an Genen übertragen. Die Aufnahme von Geninseln kann zu auffälligen Veränderungen der charakteristischen Eigenschaften des Empfängers führen. Dem Bakterium könnte dadurch eine erfolgreichere Anpassung und erhöhte Fitness in spezifischen Habitaten ermöglicht werden. Ein Beispiel hierfür ist die Geninsel ICEHin1056 der Spezies *Haemophilus influenzae*. Die Insel wurde zuerst 1970 in ampicillinresistenten Stämmen detektiert. Zwei Jahre später wurden in der gleichen Geninsel zusätzliche Resistenzgene gegen Tetrazyklin und Chloramphenikol gefunden. Diese transposoncodierten Resistenzen wurden mit der Geninsel zusammen auf andere Stämme übertragen. Mit der Übertragung der Geninsel entstanden multiresistente Stämme (Mohd – Zain et al., 2004).

Über den Ursprung genomischer Inseln ist wenig bekannt. Es wird angenommen, dass sie sich aus ehemaligen Plasmid – und Bakteriophagensequenzen zusammensetzen, wie sie auch schon in vielen Geninseln entdeckt wurden. Nach ihrer Integration ins Genom der Bakterien kann es durch Punktmutationen und Umlagerung zu einer Veränderung der Struktur kommen. Sind hiervon Gene betroffen, die für die Mobilität dieser Elemente eine bedeutende Rolle spielen, führt das zu einer relativ stabilen chromosomalen Insertion dieses Elementes.

Ein Beispiel für die Evolution eines mobilen genetischen Elements zu einer stabil ins Genom inserierten Geninsel ist pKLC102. Diese wurde in *P. aeruginosa* Klon C Stämmen als reversibel ins Genom inserierte Geninsel sowie als episomales Element detektiert (Römling et al., 1997). In der Subgruppe C der Klon C – Stämme wurde innerhalb der chromosomal integrierten pKLC102 – DNA ein 23 kb großes Integron gefunden, das in der episomalen Variante fehlte. Mit der Insertion dieses Elementes scheint eine irreversible Fixierung der Geninsel im Genom einherzugehen, da pKLC102 in diesen Stämmen nicht mehr episomal detektiert werden konnte (Klockgether et al., 2004).

Eine reversible Integration, bei der die Geninsel wieder aus dem Chromosom ausgeschnitten werden und eine zirkuläre Form annehmen kann, wurde bisher nur in wenigen Fällen beschrieben. Einige Beispiele hierfür sind pKLC102 der *P. aeruginosa* Klon C – Stämme (Römling et al., 1997), das *clc* Element des Stammes *Pseudomonas putida* RR21 (Gaillard et al., 2006), Pathogenitätinseln aus *Vibrio cholerae* (Rajanna et al., 2003), *Shigella flexneri* (Sakellaris et al., 2004) und *Yersinia pseudotuberculosis* (Rakin et al., 2001; Lesic und Carniel, 2005).

Mobile Geninseln können nicht nur zwischen den Bakterien einer Spezies, sondern auch taxonunabhängig weitergegeben werden. Ein Beispiel hierfür ist das Element HPI (high pathogenicity island). Dieses wurde zuerst für virulente *Yersinia* spp beschrieben. Es codiert u.a. für ein Yersiniabaktin - Siderophorensystem. Eine homologe Insel wurde auch in nichtpathogenen *E. coli* Isolaten entdeckt (Lesic und Carniel, 2005).

Ein weiteres Beispiel für das taxonunabhängige Vorkommen von Geninseln ist das *clc* – Element des Stammes *Pseudomonas* sp. strain B13. Nahezu identische Elemente wurden z. B. in den Stämmen *Ralstonia* sp. strain JS705 (Müller et al., 2003), *Burkholderia xenovorans* LB400 gefunden. Im *P. aeruginosa* Stamm C wurde eine ähnliche Struktur detektiert (Gaillard et al., 2006). Analysen der Mobilität dieser Geninseln zeigten, dass das *clc* – Element mit einer Rate von ca.  $10^{-8}$  auf andere  $\beta$ - und  $\gamma$  – Proteobakterien übertragen werden kann (Ravatn et al., 1998).

Geninseln weisen meist eine mosaikartige Struktur auf, da sie häufig durch Insertion weiterer genetischer Elemente (z.B Transposons, IS - Elemente) verändert werden (Lawrence und Roth, 1996). Trotzdem sind aber noch homologe Abschnitte in den einzelnen Inseln zu finden, die auf eine gemeinsame Herkunft schließen lassen. Sequenzvergleiche 16 unterschiedlicher Geninseln aus 11 verschiedenen Spezies ergaben, dass die analysierten Inseln aus einer 33 Gene umfassenden Kernregion und stammspezifischen Abschnitten bestehen (Mohd – Zain et al., 2004). Die Kernregion weist eine hohe Homologie zwischen den Inseln aus. 15 Gene wurden in allen Inseln konserviert gefunden. Hierbei handelt es sich anscheinend um Gene, die charakteristisch für diese Art von Inseln sind. Rund ein Drittel der dort gefundenen Gene weisen eine Homologie zu bekannten auf. Sie spielen anscheinend eine Rolle für die Replikation, Integration und Exzision dieser Inseln aus dem Genom. Den restlichen homologen Genen konnte keine Funktion zugewiesen werden. Allen Geninseln war gemein, dass sie in tRNA – Gene inserieren, verglichen mit dem umliegenden Genom einen unterschiedlichen GC – Gehalt aufwiesen und die Anordnung der Gene (Syntenie) zum größten Teil identisch war. Analysen der Aminosäureähnlichkeit der Proteine homologer ORFs lag bei allen untersuchten Geninseln zwischen 25 – 30%. Dies deutet auf eine vielfältige evolutionäre Entwicklung der einzelnen Geninseln hin. Diese Analysen zeigen, dass es anscheinend unter der großen Anzahl an Geninseln verschiedene Arten von Familien geben könnte.

## 1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Bei den am intensivsten untersuchten Spezies der Gattung *Pseudomonas* handelt es sich *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* und *P. aeruginosa* (Olsen et al., 1994). Diese gehören, basierend auf den Sequenzen der 16S – rRNA, zur Gruppe der  $\gamma$  – Proteobakterien (Olsen et al., 1994). *P. aeruginosa* ist ein fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges, polar begeißeltes, gram – negatives Bakterium.

Es weist eine Länge von ca. 1,5 – 3  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser zwischen 0,5 – 0,8  $\mu\text{m}$  auf. *P. aeruginosa* wurde erstmals aus einer leicht grünlich verfärbten, nässenden Brandwunde isoliert. Die Fähigkeit der Bildung verschiedener Farbstoffe, z.B. Pyocyanin (blau – grün) (Al Ani et al., 1986) und Pyoverdin (Fluoreszierendes grün) verliehen ihm seinen Namen (lat. aerugo = grünspan). *P. aeruginosa* stellt nur sehr geringe Anforderungen an seinen Lebensraum (Botzenhardt und Döring, 1993) und ist in der Lage, sich unterschiedlichen Habitaten anzupassen. Verschiedene Isolate wurden in unterschiedlichen aquatischen Habitaten wie Flüssen, Abwässern (Rhame, 1980) und Trinkwasserleitungen (Hardalo u. Edberg, 1997) gefunden. Weiterhin wurde es in der Rhizosphäre (Botzenhardt und Döring, 1993), auf der Oberfläche von Pflanzen (Cho et al., 1975) und in verschiedenen kontaminierten Böden detektiert (Ridgway et al., 1990). *P. aeruginosa* ist in der Lage, tierisches Gewebe zu kolonisieren (Hardalo und Edberg, 1997), wobei habitatunabhängig das gleiche Repertoire an Virulenzfaktoren genutzt wird (Rhame et al., 1995). Die Anpassung an unterschiedliche Lebensräume wird *P. aeruginosa* durch die Umsetzung eines breiten Spektrums an organischen Komponenten wie verschiedenen Kohlenwasserstoffen, halogenierten und nichthalogenierten Aromaten (Hickey und Focht, 1990; Palleroni, 1986) ermöglicht, die als Kohlenstoffquelle genutzt werden können. Die Bakterien sind in der Lage, Temperaturen zwischen 4°C und 43°C zu tolerieren und in destilliertem Wasser zu leben (Favero et al., 1971). Desweiteren wurde *P. aeruginosa* auch in verschiedenen Desinfektionsmitteln nachgewiesen (Adair et al., 1969).

*P. aeruginosa* weist Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika und Desinfektionsmitteln auf. Eine Kolonisation beim Menschen verläuft meist harmlos, da eine Infektion nur dann eintritt, wenn die Abwehr des Wirtsorganismus reduziert oder zerstört ist (Tennant et al., 2005). So befällt dieser opportunistische Keim vorwiegend Menschen mit lokal oder systemisch geschwächtem Immunsystem. Neben großflächigen Hautdefekten (z.B. Verbrennungswunden) gelten Mukoviszidose (zystische Fibrose, CF), eine Infektion mit HIV,

Therapien mit Immunsuppressiva und Malignome als typische, für eine *P. aeruginosa* Infektion prädisponierende Faktoren (Schaal, 1994).

Eine bedeutende Rolle spielt der chronische *P. aeruginosa* – Befall bei Mukoviszidose (CF) – Patienten. Er ist hier zwar auf die Lunge beschränkt, ist aber entscheidend für den Krankheitsverlauf (Pier, 1985; Hoiby et al., 1989). Bei CF - Patienten stellt die infolge der chronischen Besiedlung der unteren Atemwege mit alginatproduzierenden *P. aeruginosa* Stämmen auftretende entzündliche Destruktion des Gewebes die Hauptursache für die reduzierte Lebenserwartung dar (Govan und Deretic, 1996).

Bei der Besiedlung von Gewebe werden von *P. aeruginosa* unterschiedliche Virulenzfaktoren in die betroffenen Zellen sezerniert (Nicas und Iglewski, 1986; Döring et al., 1987). Ein Beispiel hierfür ist das Exotoxin A, das zu einer Inhibierung der Proteinbiosynthese und anschließendem Zelltod führt (Wick et al., 1990). Die Expression der einzelnen Virulenzfaktoren wird zum großen Teil in Abhängigkeit der Zelldichte über das sog. „quorum-sensing“ - System reguliert (van Delden und Iglewski, 1998).

### **1.3 Genomische Organisation von *P. aeruginosa***

Seine Anpassungsfähigkeit und metabolische Vielseitigkeit verdankt *P. aeruginosa* seiner ungewöhnlich umfangreichen genetischen Ausstattung. Das 6,264 Mb große, vollständig sequenzierte Genom des Referenzstammes PAO1 gehört zu den größten bisher sequenzierten Genomen (Stover et al., 2000). Es ist damit um 35% größer als das Genom des *Escherichia coli* Stammes K12 (4,64 MB) (Blattner et al., 1997). Das PAO1 – Genom codiert für 5570 potentielle Gene bzw. offene Leserahmen (*open reading frames*). Vergleicht man dies mit der Anzahl an ORFs des Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* (6200 ORFs) (Ball et al., 2000), ist die Zahl im PAO1 – Genom nur geringfügig kleiner.

Auffällig hohe Anteile der codierten Proteine (7,2%) wurden als potentielle Transkriptionsregulatoren oder als Bestandteile von Zwei – Komponenten – Regulatorsystemen (2,1%) beschrieben. Eine ähnlich hohe Zahl an Regulatorgenen wurde schon für andere Spezies, die verschiedene Lebensräume kolonisieren können, beschrieben (z.B. *Bacillus subtilis*, 5,3%). Pathogene aus definierten Lebensräumen weisen hingegen eine geringere Anzahl an Regulatorgenen auf. Beispiele hierfür sind *Mycobacterium tuberculosis* (3%) und *Helicobacter pylori* (1%).



Das PAO1 - Genom weist einen mosaikartigen Aufbau aus einem konservierten Kerngenom und variablen Abschnitten auf (Kiewitz et al., 2000; Römling et al., 1995; Spencer et al., 2003).

Der variable Teil des Genoms besteht u.a. aus klon- bzw. stammspezifischen Geninseln (Larbig et al., 2002). Dieser Aufbau führt zu unterschiedlichen Genomgrößen bei verschiedenen *P. aeruginosa* - Stämmen, die zwischen 5,2 und 7 Mbp variieren können (Schmidt et al., 1996).

Um die Konservierung von PAO1 – ORFs in anderen Stämmen zu bestimmen, verglichen Wolfgang et al. (2003) die Genome 18 verschiedener Klinik- und Umweltisolate mit Hilfe eines PAO1 – Mikroarrays. Hierbei wurden 24 DNA - Segmente als variable Bereiche des PAO1 - Genoms identifiziert, wobei größere PAO1 – spezifische Bereiche durch die Integration von drei Phagen verursacht wurden.

Insgesamt waren 5183 PAO1 - ORFs (93,4 %) in allen Stämmen konserviert und wurden als Kerngenom der Spezies definiert. Die Informationen über diese Sequenzabschnitte können auf entsprechende Regionen in anderen Stämmen übertragen werden, da für *P. aeruginosa* Stämme in 97,5 % der konservierte Bereichen eine Sequenzdiversität von durchschnittlich 0,5 % ermittelt worden war (Kiewitz und Tümmler, 2000; Spencer et al., 2003).

Zu den Bereichen mit hoher Sequenzdiversität innerhalb des Kerngenoms zählen die Pyoverdin kodierenden Gene, das Flagellar – Regulon, sowie die *pilA* und O – Antigen – Synthese Gene. Jede dieser Regionen ist zwar im Genom aller *P. aeruginosa* Stämme zu finden, aber die jeweiligen Gene können eine sehr hohe Divergenz zueinander aufweisen.

Evolutionsbedingte Strukturänderungen werden anscheinend hauptsächlich durch die Aufnahme und den Verlust einzelner Gene oder von Geninseln bedingt. Punktmutationen scheinen eine nicht so bedeutende Rolle zu spielen. Die Größe der *P. aeruginosa* Genome kann sich in verschiedenen Isolaten um bis zu 30% unterscheiden (Morales et al., 2004). Untersuchungen zur intraklonalen Genomdiversität wurden an 21 verschiedenen *P. aeruginosa* Klon C durchgeführt. Klon C tritt dominierend in Europa auf (Römling et al., 1994), ist aber auch weltweit zu finden (Römling et al., 2005). Vertreter dieser Gruppe wurden in unterschiedlichen Habitaten wie Flusswasser oder der Klinikumgebung gefunden (Römling et al., 1994). Vergleiche der Makrorestriktionskarten 21 verschiedener Stämme zeigten, dass in 20 der analysierten Stämme die Geninsel pKLC102 ins Genom integriert war (Römling et al. (1997). Die Genomgrößen der einzelnen Stämme war um 450 – 700 kb größer als das des *P. aeruginosa* Stammes PAO1. Gegenüber dem Genom des Typenstammes C wiesen die

Genome anderer Klon C Isolate Insertionen oder Deletionen von 1 – 214 kb großen DNA-Blöcken sowie in Einzelfällen chromosomale Inversionen auf.

Ein detaillierter Genomvergleich der beiden sequenzierten Stämme PAO1 und PA14 wurde von Lee et al. (2006) durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass 91,7 % des PA14 Genoms in PAO1 und 95,8 % des PAO1 Genoms im Genom des Stammes PA14 präsent sind. Beide Genome waren weitgehend kollinear, mit Ausnahme einer chromosomalen Inversion im Genom des Stammes PAO1.

45 PAO1 – Abschnitte, die mindestens einen ORF umfassen, fehlen im Genom des Stammes PA14 (Lee et al., 2006). Umgekehrt lassen sich 58 PA14 – Abschnitte keiner PAO1 - Region zuordnen. Diese stammspezifischen Abschnitte zeichnen sich durch einen niedrigeren GC – Gehalt im Vergleich zum Kerngenom und die Präsenz von *direct repeats* und IS – Elementen aus. Dies läßt vermuten, dass es sich hierbei um Elemente handelt, die durch horizontalen Gentransfer erworben wurden. Bei den meisten Genen, die in diesen Abschnitten gefunden wurden, handelt es sich um Gene mit unbekannter Funktion. Aus diesem Grund kann nur selten eine Aussage über durch sie kodierte metabolischen Fähigkeiten oder mögliche Virulenzassoziation getroffen werden.

Außerdem wurden von Lee et al. (2006) die Genome 20 verschiedener *P. aeruginosa* – Stämme unterschiedlicher Herkunft auf die Präsenz PAO1- und PA14 – spezifischer Gene untersucht. Diese Analysen zeigten, dass jeder Stamm ein spezielles Repertoire an Geninseln und Gen – „islets“ besaß. Die Verteilung der PAO1- und PA14 – spezifischen Bereiche innerhalb des Genoms der analysierten Stämme zeigte keine Korrelation von DNA - Elementen. Es war nicht möglich, anhand der gefundenen Elemente Rückschlüsse auf die Herkunft oder die Virulenz im *C. elegans* Infektionsmodell, zu ziehen.

Des Weiteren wurden PA14 – spezifische Gene genauer analysiert, deren codierte Proteine eine verstärkte Virulenz in Infektionsmodellen zeigten (Lee et al., 2006). Diese Untersuchungen ergaben, dass kein Zusammenhang zwischen der Präsenz dieser PA14 – Gene in anderen Stämmen und erhöhter Virulenz bestand. Die Anwesenheit dieser in PA14 mit Virulenz assoziierten Gene in anderen *P. aeruginosa* – Stämmen muss also nicht zwangsläufig mit erhöhter Virulenz einhergehen. Die Pathogenität von *P. aeruginosa* ist von vielen Faktoren abhängig und kann aus diesem Grund auch nicht ohne weiteres durch Genomanalysen vorausgesagt werden (Lee et al., 2006).

Diese Ergebnisse stimmen überein mit der heterogenen Zusammensetzung der Stamm - und Klon – spezifischen Regionen. Viele der in diesen Abschnitten gefundenen Gen – „islets“ sind aus einem bis vier Genen zusammengesetzt. Diese Regionen unterscheiden sich in ihrer Nukleotidzusammensetzung bzw. ihrer Integration oder ihrem Verlust aus dem Genom.

Variable Elemente sind über das gesamte Genom zerstreut zu finden. Ein Drittel dieser Elemente ist in direkter Nähe von tRNA oder tmRNA – Genen im Genom zu finden.

### **1.4 Geninseln in *P. aeruginosa***

Im *P. aeruginosa* Chromosom existieren drei hypervariable Regionen (Bereiche mit großer genomischer Variabilität). Diese befinden sich in der Umgebung der *pilA*, *phnAB* und *lipH* Gene (Römling et al., 1995). In allen drei hypervariablen Regionen können große DNA - Blöcke gefunden werden, die im Genom des Referenzstammes fehlen. Die gefundenen DNA– Blöcke stellen meist Geninselsequenzen dar.

#### **1.4.1 PAGI – 1 – verwandte Geninseln**

PAGI – 1 (*Pseudomonas aeruginosa* gene island – 1) ist die einzige, bisher im *P. aeruginosa* Genom detektierte Geninsel, die nicht in ein tRNA – Gen inseriert (Liang et al., 2001). PAGI – 1 ist 49 kb groß und besteht aus zwei separaten DNA – Blöcken mit unterschiedlichem GC – Gehalt. Diese Zusammensetzung läßt auf eine Herkunft aus zwei unterschiedlichen Vorfahren schließen. In den Stämmen PA14, 2192 und PACS2 wurde eine verkürzte Variante der Geninsel gefunden. PAGI – 1 wurde in 85% der getesteten nordamerikanischen Klinikisolate detektiert (Liang et al., 2001). Bakterien, in deren Genom PAGI – 1 inseriert wurde, weisen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress auf.

### **1.4.2 PAGI – 2 – verwandte Geninseln**

Die weiteren bisher bekannten großen Geninseln inserieren alle in tRNA – Gene. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Inseltypen gefunden, PAGI – 2 – verwandte Geninseln und pKLC102 – verwandte Geninseln.

PAGI - 2 und PAGI – 3 stellen die Prototypen der PAGI – 2 verwandten Geninseln dar (inserieren in der *lipH* – Umgebung). Sie wurden in den Klon C – Stämmen C (Isolat aus CF-Lunge) bzw. SG17M (Umweltisolat) detektiert (Larbig et al., 2002). Ihre Größe beträgt 105 kb (PAGI – 2) bzw. 103 kb (PAGI – 3). Der erste Teil der Inseln, nahe des tRNA<sup>Gly</sup> – Gens, besteht aus inselspezifischer DNA („cargo“). Im zweiten Teil befinden sich überwiegend ORFs, die in beiden Inseln konserviert sind. Zwischen diesen sind aber auch mosaikartig weitere Abschnitte inselspezifischer DNA zu finden. 47 konservierte ORFs sind in beiden Inseln gleich angeordnet und die codierten Proteine weisen Aminosäureidentitäten von 35 – 88% auf.

### **1.4.3 pKLC102 – verwandte Geninseln**

Einen der drei hypervariablen Bereiche im *P. aeruginosa* Genom stellen die PAGI – 2 verwandten Geninseln dar. Die beiden anderen Regionen werden durch die Integration und Exzision von Geninseln in zwei tRNA<sup>Lys</sup> – Genen repräsentiert.

Die Prototypen für pKLC102 – verwandte Geninseln stellen pKLC102 und PAPI – 1 dar, die in ein tRNA<sup>Lys</sup> – Gen (entspricht PA4541.1 im PAO1 – Genom; *pilA* - Umgebung) inseriert sind.

Die 104 kb große mobile Geninsel pKLC102 wurde in *P. aeruginosa* Klon C Stämmen als chromosomal integrierte Geninsel sowie als episomales Element detektiert (Römling et al., 1997).

Die Integration von pKLC102 ins Genom erfolgte nach einem phagenartigen Mechanismus in das tRNA<sup>Lys</sup> – Gen des PAO1 homologen PA4541.1 (Klockgether et al., 2004).

An den Übergängen zwischen chromosomaler und Plasmid - DNA wurde auf der einen Seite ein komplettes tRNA<sup>Lys</sup>-Gen (*attB* – Sequenz), auf der anderen Seite eine Kopie von dessen 3' - Ende (45 bp) detektiert. Das 5' – Ende von pKLC102 (*attP* – Sequenz) weist demnach

eine 45 bp lange Teilsequenz des tRNA<sup>Lys</sup> – Gens auf. Nach Insertion der Plasmid – DNA in die *attB* – Sequenz liegt wieder ein vollständig rekonstruiertes tRNA<sup>Lys</sup> – Gen vor.

Die Integration und Exzision der Geninsel wird wahrscheinlich durch eine XerC - Integrase nach einem phagenartigen Mechanismus katalysiert (wie z. B. schon für das *clc* – Element und den  $\lambda$  – Phagen beschrieben (Ravatn et al., 1998)).

Die Annotation der Geninsel ergab 105 mögliche ORFs (Klockgether et al., 2004). 60 der postulierten Proteine wurden als hypothetisch oder konserviert hypothetisch klassifiziert. In Tabelle 1.1 am Ende dieses Abschnitts ist eine Übersicht der Annotationsergebnisse für die einzelnen pKLC102 - ORFs angefügt.

Die pKLC102 – Sequenz codiert für mindestens 20 potentielle Proteine, die bei Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA eine Rolle spielen könnten. Hierunter befinden sich u.a. Gene für die Ausbildung von Sex – Pili (CP33 – CP42), zwei *tra* - Gene (*tragG* – CP67 und *traI* – CP102), ein *soj* – Gen zur Chromosomenaufteilung (CP1) und ein *xerC*-Integrase-Gen (CP103).

Mindestens drei weitere pKLC102 - ORFs codieren für putative Virulenzfaktoren. Der ORF CP94 codiert für ein potentielles ChvB - Protein, eine cyclo- $\beta$ -(1,2)-Glucan-Synthetase. Solche Proteine sind essentiell für die Interaktion zwischen bakteriellen Spezies und eukaryontischen Wirten (De Iannino et al., 1998). Aus diesem Grund wurde das *chvB*-Gen als wichtige Komponente für die Besiedlung von Wirtsgeweben und möglicher Virulenzfaktor charakterisiert. Des Weiteren wurden auf pKLC102 mit CP57 (putatives Polyketid-Synthase-Gen) und CP26 (das codierte Protein besitzt eine *VagC*-Domäne, die nicht weiter klassifizierten putativen Virulenz-assoziierten Proteinen zugeschrieben wird) zwei weitere mögliche Virulenzgene detektiert (Klockgether et al., 2004). Alle drei befinden sich in Abschnitten von pKLC102, die in verwandten Geninseln nicht konserviert sind.

Der einzige Abschnitt der pKLC102 – Sequenz, der eine hohe Ähnlichkeit zu PAO1 aufwies, umfasste das Chemotaxisoperon CP84 – CP86. Dieses befand sich ebenfalls in einem spezifischen Abschnitt von pKLC102.

Da die Geninselszusammensetzung Merkmale von Phagen und Plasmiden aufweist, stellt pKLC102 vermutlich eine Übergangsstufe eines Phagen und eines Plasmids dar.

Die Pathogenitätsinsel PAPI – 1 (***P. aeruginosa* pathogenicity island – 1**) wurde zuerst in Wund- und CF – Isolaten des Stamms PA14 gefunden (He et al., 2004), inzwischen aber ebenfalls in Klinik- und Schmutzwasserisolaten detektiert. PAPI – 1 weist eine hohe

Ähnlichkeit zu pKLC102 auf. Beide Geninseln besitzen eine ähnliche Größe (PAPI – 1: 108 kb; pKLC102: 104 kb) und einen vergleichbaren GC – Gehalt (PAPI – 1: 59,7%; pKLC102: 60,9%). An den Übergängen zum Kerngenom befinden sich jeweils ein tRNA<sup>Lys</sup> – Gen angrenzend an ein Ende der Insel und ein *direct repeat* des 3' Endes der tRNA<sup>Lys</sup> am anderen Ende.

76 der 115 postulierten PAPI – 1 ORFs weisen starke Homologien und gleiche Syntenie zu pKLC102 auf. 20 dieser homologen ORFs codieren vermutlich für Proteine, die bei Konjugation, Rekombination und dem Transfer von DNA beteiligt sind. Dazu gehören der jeweils erste sowie der letzte annotierte ORF der Geninseln, die jeweils für eine Integrase bzw. für ein Protein zur Chromosomenaufteilung (Soj) codieren. In beiden Geninseln wurden Typ IV Pilus - Synthese Gene identifiziert. In PAPI – 1 codieren diese für Typ IV Gruppe B - Pili und in pKLC102 für Typ IV Sex - Pili.

Mutationsanalysen verschiedener Gene der Pathogenitätsinsel PAPI-1 haben ergeben, dass sie für mindestens 19 ORFs codiert, die für die Virulenz im Maus- und Pflanzenmodell eine Rolle spielen (He et al., 2004). Zu den so identifizierten Virulenzfaktoren zählten u.a. eine Protein – Disulfid – Isomerase und fünf Proteine mit gänzlich unbekannter Funktion.

#### **1.4.4 Weitere Geninseln**

In das tRNA<sup>Lys</sup> – Gen (entspricht PA0976.1 im PAO1 – Genom; *phnAB* - Umgebung) können Geninseln verschiedener Größe inserieren (4 – 106kb). Diese genomische Region erweist sich als heterogen, da dort in nur vier von elf an dieser Position sequenzierten Stämmen keine DNA – Insertion gefunden wurde.

Vier der bisher bekannten Geninseln, die in diese tRNA<sup>Lys</sup> – inserieren, codieren u.a. für den Virulenzfaktor ExoU. Hierbei handelt es sich um die ExoU – Insel A (81 kb), ExoU – Insel B (30 kb), ExoU - Insel C (4 kb) und PAPI – 2 (11 kb) (Kulasekara et al., 2006).

Im Stamm K1 (CF – Isolat) inseriert in dieser Position die pKLC102 – verwandte Geninsel pKLC106 (Kiewitz et al., 2000). Von dieser wurde eine zirkuläre Variante entdeckt, was darauf schließen lässt, dass diese Geninsel wie pKLC102 mobilisierbar ist. Analysen von Klockgether et al. (2004) zeigten, dass mehr als 97% der pKLC102 Sequenz eine hohe Homologie zu pKLC106 aufweist.

Im Stamm PAO1 ist an dieser Position eine 8,9 kb große Geninsel inseriert, die an beiden Seiten von IS – Elementen flankiert ist (Kiewitz et al., 2000). Im Stamm C wurde an dieser

Position die 23 kb große Geninsel PAGI – 4 gefunden (Klockgether et al., 2004). Die Geninseln PAGI – 4, PAPI – 2 und die ExoU – Inseln A und B setzen sich aus pKLC102 homologen Abschnitten, PAO1 – ähnlichen und inselspezifischen Abschnitten zusammen. Sequenzanalysen der vier ExoU - Inseln zeigten, dass sie sich möglicherweise aus einem pKLC102 – ähnlichen Vorläufer entwickelt haben, wobei sich ihre Struktur durch Integration von IS – Elementen, Deletionen und DNA - Umlagerungen im Laufe der Zeit immer weiter verändert hat (Kulasekara et al., 2006).

**Tabelle 1.1: Annotationsübersicht für pKLC102 (aus J. Klockgether, Dissertation, 2004)**

ORF	Koordinaten		Orientierung	Länge [aa]	GC-Gehalt [%]	Name des Gens	Funktionsvorhersage bzw. ähnliches Genprodukt	Bestes BLAST-Ergebnis	
	links	rechts						GenBank-Nr	E-Wert
CP1	113	997	→	294	60.23%	<i>soj</i>	Protein zur Chromosomenaufteilung XF1785	NP_299073	6E-67
CP2	999	1724	→	241	59.78%		Konserviertes hypothetisches Protein ( <i>Pseudomonas resinovorans</i> )	NP_758706	2E-25
CP3	1721	2218	→	165	62.25%		Konserviertes hypothetisches Protein PA2226 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	NP_250916	5E-27
CP4	2224	2970	→	248	61.85%		Konserviertes hypothetisches Protein, codiert von Gen Z2097 im Prophagen CP-933O ( <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933)	NP_287555	6E-10
CP5	2967	3653	→	228	64.05%		Konserviertes hypothetisches Protein Magn3145 ( <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> )	ZP_00050489	1E-10
CP6	3653	4354	→	233	64.53%		Konserviertes hypothetisches Protein ( <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi)	NP_456007	1E-09
CP7	4351	5058	→	235	58.62%		Konserviertes hypothetisches Protein EsV-1-119 ORF119 ( <i>Ectocarpus siliculosus</i> virus)	NP_077604	0,039
CP8	5042	5260	→	72	57.08%		Hypothetisches Protein	-	-
CP9	5323	6600	→	425	61.11%	<i>dnaB</i>	Replikative DNA Helicase PA4931 ( <i>dnaB</i> ) ( <i>P. aeruginosa</i> )	NP_253618	1E-122
CP10	7039	7395	←	118	55.74%		Hypothetisches Protein	-	-
CP11	7838	8365	→	175	61.74%		Hypothetisches Protein	-	-
CP12	8362	8619	→	85	60.08%		Hypothetisches Protein	-	-
CP13	8612	9109	→	165	62.85%		Hypothetisches Protein	-	-
CP14	9102	9335	→	77	66.24%		Konserviertes hypothetisches Protein Bcep0486 ( <i>Burkholderia fungorum</i> )	ZP_00027718	1E-06
CP15	9335	10351	→	338	64.01%		Konserviertes hypothetisches Protein PA3849 ( <i>P. aeruginosa</i> )	NP_252538	1E-175
CP16	10348	10602	→	84	58.43%		Putatives DNA-Bindungsprotein PA3385 ( <i>AlgZ</i> ) ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAD55364	0,028
CP17	10599	12332	→	577	58.36%		Konserviertes hypothetisches Protein SG102 ( <i>P. aeruginosa</i> ), mit <i>ParB</i> -ähnlicher Nuclease-Domäne	AAN62323	1E-104
CP18	12360	13115	→	251	59.13%		Konserviertes hypothetisches Protein Bcep0488 ( <i>B. fungorum</i> )	ZP_00027720	1E-30
CP19	16188	16197	→	242	63.24%		Konserviertes hypothetisches Protein C104 ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAN62197	4E-64
CP20	16500	17048	→	182	60.84%		Konserviertes hypothetisches Protein C103 ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAN62196	1E-24
CP21	17095	17934	→	279	60.83%		Putativer Antirepressor sb41 ( <i>Salmonella typhimurium</i> Phage ST64B)	NP_700414	6E-23
CP22	17964	18452	→	162	62.17%	<i>ssb</i>	Putatives DNA-Einzelstrang-bindendes Protein <i>ssb</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAN62318	5E-30
CP23	18871	19152	←	93	53.90%		Hypothetisches Protein	-	-
CP24	19289	19549	←	86	52.87%		Hypothetisches Protein	-	-
CP25	19571	19981	←	136	60.83%		Putatives Nukleinsäure-bindendes Protein mit PIN-konservierter Domäne ( <i>S. typhimurium</i> LT2)	NP_461950	2E-51
CP26	19981	20211	←	76	57.57%		Putatives Virulenz-assoziiertes Protein im Zytoplasma ( <i>S. typhimurium</i> LT2), <i>VagC</i> Domäne	NP_490591	2E-20
CP27	20467	22386	→	639	62.19%	<i>topA</i>	Topoisomerase I XFa0003 ( <i>X. fastidiosa</i> )	NP_061659	1E-148
CP28	22694	22903	→	69	51.90%	<i>cspA</i>	Kälteadaptationsprotein / Kälteschockprotein PA3266 ( <i>CspA</i> ) ( <i>P. aeruginosa</i> )	NP_251956	2E-18
CP29	23124	25013	→	629	60.37%		Hypothetisches Protein	-	-



ORF	Koordinaten		Orien- tierung	Länge [aa]	GC- Gehalt [%]	Name des Gens	Funktionsvorhersage bzw. ähnliches Genprodukt	Bestes BLAST- Ergebnis	
	links	rechts						GenBank-Nr	E-Wert
CP30	25010	26983	→	657	64.18%		Putative Helicase Psyr4003 ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ); Protein aus Familie DEAD-artiger Helicasen mit entsprechenden N- und C-terminalen Domänen	ZP_00127683	0
CP31	27105	27887	→	260	46.23%		Putativer ABC-Transporter mlr7981 ( <i>Mesorhizobium loti</i> ), ATP-bindendes Protein	BAB53638	9E-85
CP32	27920	29173	→	417	41.55%		Konserviertes hypothetisches Protein SMa2241 ( <i>Sinorhizobium meliloti</i> Plasmid pSymA)	NP_436454	1E-126
CP33	29347	30471	→	374	65.16%	<i>pilL</i>	<i>PilL</i> ( <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> )	AAL05416	3E-36
CP34	30471	32180	→	569	63.86%	<i>pilN</i>	<i>PilN</i> ( <i>E. coli</i> )	AAL05518	8E-56
CP35	32298	33509	→	403	64.03%	<i>pilO</i>	<i>PilO</i> ( <i>Salmonella typhi</i> )	AAF14815	5E-13
CP36	33499	34032	→	177	70.97%	<i>pilP</i>	<i>PilP</i> ( <i>S. typhimurium</i> plasmid R64)	BAA77976	2E-04
CP37	34041	35621	→	526	63.25%	<i>pilQ</i>	<i>PilQ</i> ( <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin)	AAF81213	7E-74
CP38	35621	36700	→	359	63.80%	<i>pilR</i>	<i>PilR</i> ( <i>S. typhi</i> )	AAC98886	2E-40
CP39	36779	37252	→	157	60.13%	<i>pilS</i>	<i>PilS</i> ; Präpilin ähnlich einem hypothetischen protein ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a) und einem Typ IV Präpilin ( <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> )	ZP_00127690	3E-18
CP40	37249	38190	→	313	66.03%	<i>pilU</i>	<i>PilU</i> , „twitching motility“ Protein ( <i>P. aeruginosa</i> )	S54702	1E-15
CP41	38195	39523	→	442	63.81%	<i>pilV</i>	<i>PilV</i> ( <i>E. coli</i> )	CAA44099	6E-48
CP42	39552	39989	→	145	68.26%	<i>pilM</i>	<i>PilM</i> ( <i>S. typhimurium</i> plasmid R64)	BAA77973	1,1
CP43	40911	41300	→	129	60.00%		Hypothetisches Protein	-	-
CP44	41373	41552	→	59	53.33%		Hypothetisches Protein	-	-
CP45	41554	41688	→	44	58.52%		Hypothetisches Protein	-	-
CP46	42012	42491	→	159	57.29%		Konserviertes hypothetisches Protein ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	ZP_00087894	4E-46
CP47	42861	43058	→	65	53.54%		Konserviertes hypothetisches Protein ( <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi)	NP_458626	1E-10
CP48	43163	43441	→	92	50.18%		Hypothetisches Protein	-	-
CP49	43544	44251	→	235	52.68%		Konserviertes hypothetisches Protein Pflu5179 ( <i>P. fluorescens</i> )	ZP_00087892	1E-41
CP50	44487	44837	→	116	63.25%		Hypothetisches Protein	-	-
CP51	44894	45685	→	263	61.62%		Konserviertes hypothetisches Protein XF1760 ( <i>X. fastidiosa</i> )	NP_299049	2E-42
CP52	45788	46150	→	120	58.13%		Konserviertes hypothetisches Protein ORF C77 ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAN62171	9E-21
CP53	46218	46472	→	84	61.18%		Konserviertes hypothetisches Protein XAC2240 ( <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> )	NP_642557	2E-08
CP54	46564	47169	→	201	64.03%		Konserviertes hypothetisches Protein XAC2241 ( <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306)	NP_642558	1E-50
CP55	47199	48644	→	481	63.69%		Konserviertes hypothetisches Protein Bcep3609 ( <i>B. fungorum</i> ),	ZP_00030785	1E-133
CP56	48743	50998	→	751	63.25%		Putative Helicase Psyr4040 ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ), Protein aus Familie DEAD-artiger Helicasen mit entsprechenden N- und C-terminalen Domänen	ZP_00127717	0
CP57	51579	52364	←	261	55.47%		Putative Polyketid-Synthase XF2135 ( <i>X. fastidiosa</i> ), HCCA-Isomerase-Domäne	NP_299414	8E-23
CP58	52303	52644	←	113	58.48%		Konserviertes hypothetisches Protein Bcep7601 ( <i>B. fungorum</i> ); Carboxymuconolacton-Decarboxylase-Domäne	ZP_00034706	2E-15

ORF	Koordinaten		Orientierung	Länge [aa]	GC-Gehalt [%]	Name des Gens	Funktionsvorhersage bzw. ähnliches Genprodukt	Bestes BLAST-Ergebnis	
	links	rechts						GenBank-Nr	E-Wert
CP59	52739	53299	←	186	54.55%		Putativer Transkriptionsregulator ORF43 ( <i>P. putida</i> plasmid pWWO), TetR-Familie	NP_542832	3E-17
CP60	53362	54147	←	261	58.78%		Putatives Reduktase-Pprotein ORF44 ( <i>P. putida</i> plasmid pWWO), „short chain“-Dehydrogenase-Domäne	NP_542833	3E-76
CP61	54303	54716	←	137	59.66%		Putativer Transkriptionsregulator MA2493 ( <i>Methanosarcina acetivorans</i> ); TetR-Familie	NP_617399	0,12
CP62a	54709	55560	←	283	57.51%		Putative Phage-Integrase; ähnlich hypothetischem Protein Reut5633 ( <i>Ralstonia metallidurans</i> )	ZP_00026607	1E-23
CP62b	54904	55407	→	167	59,52%		Hypothetisches Protein, „inner ORF“ der putativen Phage-Integrase CP62a	-	-
CP63	56331	57023	→	230	63.78%		Konserviertes hypothetisches Protein Psyr4041 ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> )	ZP_00127718	2E-26
CP64	57034	57789	→	251	65.21%		Konserviertes hypothetisches Protein Psyr4042 ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> )	ZP_00127719	5E-53
CP65	57774	58355	→	193	65.64%		Konserviertes hypothetisches Protein ORF SG70 ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAN62161	5E-35
CP66	58352	58852	→	166	66.27%		Konserviertes hypothetisches Protein ORF SG69 ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAN62291	7E-31
CP67	59134	61365	→	743	65.10%		Putatives Konjugationsprotein <i>TraG</i> ; ähnlich zu hypothetischem Protein Psyr4044 ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ); <i>TraG/TraD</i> -Domäne	ZP_00127721	0
CP68	61365	62111	→	248	61.18%		Konserviertes hypothetisches Protein ORF SG67 ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAN62289	5E-52
CP69	62122	63603	→	493	59.85%		Putative Helicase; ähnlich einem hypothetischen Protein Psyr4046 ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ), <i>UvrD</i> -Helicase-Domäne	ZP_00127723	0
CP70	63735	64844	→	369	46.58%		Konserviertes hypothetisches Protein; ähnlich putativem RND Efflux-Transporter-Protein ml1426 ( <i>M. loti</i> )	NP_103018	4,4
CP71	64889	65200	←	103	49.68%		Konserviertes hypothetisches Protein PA0713 ( <i>P. aeruginosa</i> )	NP_249404	5E-16
CP72	65373	65672	→	99	57.00%		Hypothetisches Protein	-	-
CP73	65883	66104	→	73	67.57%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1322 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089650	3E-24
CP74	66107	66340	→	77	64.53%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1321 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089649	2E-08
CP75	66358	66714	→	118	57.98%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1320 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089648	3E-15
CP76	66725	67111	→	128	66.93%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1319 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089647	1E-32
CP77	67108	67767	→	219	61.06%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1318 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089646	4E-78
CP78	67764	68648	→	294	66.33%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1317 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089645	5E-88
CP79	68710	70137	→	475	64.15%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1316 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089644	1E-149
CP80	70211	70558	→	115	64.94%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1315 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089643	1E-47
CP81	70558	73500	→	980	63.00%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1314 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089642	0
CP82	73497	73781	→	94	58.25%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1313 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089641	2E-19
CP83	73778	74434	→	218	62.25%		Konserviertes hypothetisches Protein PA0982 ( <i>P. aeruginosa</i> ); putatives <i>outer membrane</i> Protein	NP_249673	3E-87

ORF	Koordinaten		Orientierung	Länge [aa]	GC-Gehalt [%]	Name des Gens	Funktionsvorhersage bzw. ähnliches Genprodukt	Bestes BLAST-Ergebnis	
	links	rechts						GenBank-Nr	E-Wert
CP84	75208	76395	→	395	62.88%		Putative Flavoprotein-Reduktase; ähnlich hypothetischem Protein PA2566 ( <i>P. aeruginosa</i> )	NP_251256	0
CP85	76418	76840	→	140	66.43%		Konserviertes hypothetisches Protein PA2565 ( <i>P. aeruginosa</i> )	NP_251255	5E-25
CP86	76830	77696	→	288	63.78%	<i>cheR</i>	<i>CheR</i> , trans-Aconitat 2-Methyltransferase PA2564 ( <i>P. aeruginosa</i> )	NP_251254	1E-126
CP87	77834	78265	→	143	61.81%		Putatives Membranprotein Avin1308 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089637	6E-20
CP88	78265	79203	→	312	64.86%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1307 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089636	1E-123
CP89	79038	80603	→	521	64.56%		Putatives Membranprotein C42 ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAN62272	1E-122
CP90	80603	80950	→	115	62.64%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1305 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089634	0,001
CP91	80947	82482	→	511	58.72%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin1304 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089633	0
CP92	82924	83256	→	110	60.61%		Konserviertes hypothetisches Protein ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> ), <i>NikR</i> -Transkriptionsregulator-Domäne	ZP_00086716	8E-16
CP93	83260	83610	→	116	62.68%		Konserviertes hypothetisches Protein AGR_C_2415 ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain C58, Cereon); ParE-Domäne von Proteinen aus Plasmid-Stabilisationssystemen	G97518	5E-15
CP94	83988	92501	←	2837	65.32%	<i>chvB</i>	Beta-(1→2)-Glucan-Biosynthese-Protein <i>ChvB</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )	NP_533395	0
CP95	93343	93567	→	74	61.33%		Konserviertes hypothetisches Protein Pflu4565 ( <i>P. fluorescens</i> )	ZP_00087289	0,13
CP96	93782	94501	→	239	61.25%		Transkriptionsregulator-verwandtes Protein SO2551 ( <i>Shewanella oneidensis</i> ); <i>helix-turn-helix</i> - und cAMP-Regulatorprotein-Domänen	NP_718137	5E-78
CP97	94572	94934	→	120	60.33%		Hypothetisches Protein	-	-
CP98	94852	95532	→	226	64.02%		Konserviertes hypothetisches Protein XF0240 ( <i>X. fastidiosa</i> )	NP_297533	7,1
CP99	95641	97659	→	672	62.51%		Fusionsprotein, putative <i>fatty acid</i> -Synthase ähnlich <i>cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid</i> -Synthase ml14091 ( <i>M. loti</i> )	BAB50831	3E-67
CP100	97815	99008	←	397	61.81%		Putative Fettsäure-Desaturase PA0286 ( <i>P. aeruginosa</i> )	AAG03675	1E-124
CP101	99396	99752	→	118	45.94%		Konserviertes hypothetisches Protein Avin0596 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00088936	3E-21
CP102	99964	101883	→	639	58.70%		Konserviertes hypothetisches Protein; putative konjugative Relaxase <i>Tral</i> , ähnlich hypothetischem Protein Avin0927 ( <i>A. vinelandii</i> )	ZP_00089260	0
CP103a	101880	103163	→	427	60.00%	<i>xerC</i>	Phagen-ähnliche Integrase <i>XerC</i> ( <i>P. syringae</i> )	AAM77365	1E-101
CP103b	101970	102476	←	168	60.36%		Hypothetisches Protein, „ <i>inner ORF</i> “ der putativen Integrase CP103a		

### **1.5 Ziele der Arbeit**

Ziel der Arbeit ist es, die Verbreitung und Mobilität der Geninsel pKLC102 in der Spezies *P. aeruginosa* zu untersuchen.

In 20 analysierten *P. aeruginosa* Klon C - Stämmen wurde die mobile Geninsel pKLC102 in episomaler Form sowie als ins Genom integrierte Geninsel detektiert. Hochhomologe Geninseln wurden ebenfalls im Genom der Stämme Klon K und Klon PA14 gefunden. Dies läßt auf eine weite Verbreitung innerhalb der Gattung *P. aeruginosa* schließen.

Zur Analyse der Verbreitung pKLC102 – verwandter Geninseln in der Spezies *P. aeruginosa* soll ein Makroarray für Hybridisierungsexperimente generiert werden. Dieser repräsentiert die potentiellen Gene der Geninsel pKLC102. Mit diesem Makroarray soll eine Auswahl von 71 *P. aeruginosa* – Stämmen, die die weltweit vorkommenden Klone / Subgruppen dieser Spezies repräsentieren, analysiert werden. Das Ziel ist es, durch Detektion pKLC102 - homologer Abschnitte in anderen Stämmen verwandte Geninseln nachzuweisen. Die dabei detektierten pKLC102 – verwandten Elemente sollen verschiedenen Subtypen innerhalb dieser Familie zugeordnet werden.

Desweiteren sollen veröffentlichte Genomsequenzen weiterer *P. aeruginosa* – Stämme auf die Präsenz von pKLC102 – verwandten Geninseln analysiert werden. Per Sequenzvergleich werden die gefundenen Sequenzen auf ihre Ähnlichkeit zur Geninsel pKLC102 untersucht und ihre chromosomalen Integrationspunkte detektiert.

Das Plasmid pKLC102 liegt in Klon C Stämmen als episomales Plasmid und ins Genom integrierte Insel vor. Untersucht werden soll nun, ob pKLC102 - positive Stämme diese Geninsel verlieren können. Darüber hinaus wird der Anteil an episomalen Plasmid sowie geninselfreier tRNA<sup>Lys</sup> quantifiziert. Parallel dazu werden dieselben Untersuchungen mit dem sequenzierten Stamm PA14 und der pKLC102 – verwandten Geninsel PAPI – 1 durchgeführt. Die Annotation der Geninsel pKLC102 ergab 105 mögliche ORFs, von denen 60 als hypothetisch oder konserviert hypothetisch klassifiziert wurden. Für eine nähere Charakterisierung der Geninsel und ihrer Bedeutung für den Organismus sind experimentelle Daten zu den Funktionen der kodierten Proteine erforderlich. Daher sollen phänotypische Untersuchungen für mögliche Funktionshinweise mit isoklonalen Isolaten, die sich nur in An- bzw. Abwesenheit der Geninsel unterscheiden, durchgeführt werden.

## **2. Material und Methoden**

Die für die hier beschriebenen Versuche verwendeten Lösungen wurden alle entweder mit bidestilliertem Wasser oder hochreinem Wasser („epure“-Wasser) aus einer entsprechenden Aufbereitungsanlage angesetzt. Alle Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc.) sowie selbst angesetzte Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, vor Gebrauch mind. 30 min unter 1,2 bar Wasserdampfdruck bei 121°C im Autoklaven erhitzt. Prozentangaben für die Zusammensetzung von Lösungen geben bei Einwaage von Feststoffen das Verhältnis Masse / Volumen an (M / V), bei Zugabe flüssiger Substanzen das Verhältnis Volumen / Volumen (V / V).

### **2.1. Material**

#### **2.1.1 Geräte**

Brutschrank	Heraeus
Digitalkamera	Olympus
Labofuge I	Heraeus
Dri- Block DB-3	Techne
eppendorf- Centrifuge 5415C	Eppendorf
eppendorf- Centrifuge 5417R	Eppendorf
eppendorf- Thermostat 5320	Eppendorf
Hybridisierungsofen 400 HY	Bachofer
UV- Transilluminator	Bachofer
Minifold I Vakuum- Blotter	Schleicher und Schuell
Schüttelwasserbad Modell G76	New Brunswick Scientific
Schwenktisch HS250	Janke & Kukel Ika Labortechnik
Sorvall- Zentrifuge RC5B Plus	DuPont
dazu Rotoren	GS-3 (SLA3000)
	GSA (SLA1500)
	SS34
Spannungsquelle Power pac 300	Bio-Rad
pH- Meßgerät 761 Calimatic	Knick

Spektralphotometer U3000	Hitachi
Thermocycler	Landgraf
Tischzentrifuge Hettich universal	Hettich
Waagen BP3100S	Sartorius
BP210 S	Sartorius

### **2.1.2 Verbrauchsmaterial**

96-well-Microtiterplatte	Greiner
Filterpapier GB003	Schleicher u. Schuell
Hybond N <sup>+</sup> -Membran	Amersham Pharmacia
Pasteurpipette	Sarstedt
Petrischalen 9 cm Ø	Sarstedt
Pipettenspitzen (1ml, 200µl, 10µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäß (50 ml, 15 ml )	Greiner
Reaktionsgefäß (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt
Röntgenfilm X-Omat AR	Kodak

### **2.1.3 Chemikalien und Enzyme**

Anti-Digoxigenin AP	Boehringer
Betain	Sigma
CDP- Star	Tropix
Ethidiumbromid	Sigma
FailSafe <sup>TM</sup> PCR System	Epicentre <sup>®</sup>
Formaldehyd 35%	Merck
Gentamycin	Serva
Goldstar- Polymerase + Puffersysteme	Eurogentec
Hybond N+ Membran	Amersham
Klenow- Polymerase	Boehringer
Oligonukleotide	MWG Biotech, Pharmacia
Proteinase K	Sigma
RNase A	Qiagen

Taq- Polymerase + Puffersysteme

InViTek

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

#### **2.1.4 Verwendete Medien**

**Luria-Bertani-(LB)-Medium:** 10 g/l selecto-Pepton 140, 5 g/l Hefeextrakt , 5 g/l NaCl, pH 7,0

**LB-Amp-Medium:** LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

**Vogel-Bonner-(VB)-Medium:** 2,1 g/l Na-Citrat · H<sub>2</sub>O, 5,86 g/l NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 8,44 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, 0,8 g/l MgSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 50 g/l Kalium-(D)-gluconat, pH 7,2; Zuerst wird eine Lösung ohne Kaliumgluconat angesetzt und im Autoklaven sterilisiert. Das Kaliumgluconat wird dann aus einer getrennt angesetzten und sterilfiltrierten Lösung hinzugegeben.

#### **2.1.5 Bakterienstämme**

Die folgenden Bakterienstämme wurden für diese Arbeit verwendet:

##### ***Pseudomonas aeruginosa***

Alle verwendeten Stämme wurden in LB Medium bei 37°C angezüchtet. Stamm PAO DSM1707 (Holloway, 1955) wurde als *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Referenzstamm verwendet. Unterschiede zum sequenzierten Stamm PAO1 (www.pseudomonas.com; Stover et al., 2000) sind eine große chromosomale Inversion sowie eine 20 kb große Insertion. Die verwendeten Klon C Stämme (C2, C5, C20, C21) sind Lungenisolate von CF - Patienten (Römling et al., 1997). Beim ebenfalls verwendeten Klon C Stamm SG17M handelt es sich um ein Umweltisolat, welches aus Flusswasser isoliert wurde (K. D. Larbig, Dissertation 2001).

Beim Stamm PA14 handelt es sich um ein Klinikisolat aus den USA (Rahme, 1995).

Weitere Beschreibungen der verwendeten Stämme sind in Kapitel 3.4 zu finden.

### **Escherichia coli Stämme; Genombibliothek von P. aeruginosa Stamm C**

Alle verwendeten Cosmid - tragenden *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme entstammten einer Genombibliothek, die von Dr. K. Larbig im Laufe ihrer Promotion angelegt wurde (K. D. Larbig, Dissertation 2001).

Mit Hilfe der Stämme DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983), XL1-Blue MR (Stratagene) und Sure (Greener, 1990) wurde eine Cosmidbibliothek angelegt. Als Vektor diente hierbei SuperCos 1 (Evans et al., 1989). Dieser wurde als Rahmen für ca. 30 – 45 kb große Fragmente genomischer DNA von *P. aeruginosa* C verwendet. Zur Cosmidpräparation wurden die Bakterien in Standard LB Medium, welchem 100  $\mu$ g/ml Ampicillin hinzugefügt wurden, bei 37°C angezüchtet. Das entsprechende Resistenzgen befand sich in diesem Fall auf dem SuperCos 1 Rahmen.

Der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurde ebenfalls als apathogener Referenzkeim in den *C. elegans* - Assays verwendet.

## **2.2. Mikrobiologische Methoden**

### **2.2.1 Anzucht von Bakterien**

Alle Bakterien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in Standard LB – Medium im Schüttelinkubator bei 37°C mit 200 – 250 rpm angezogen. Für die Anzucht von Bakterien in Brutschränken auf festen Nährböden wurde den jeweiligen Medien 20 g/l Select-Agar zugegeben.

### **2.2.2 Bestimmung der Bakterienzellzahl**

Die Bestimmungen der Bakterienzellzahl wurde mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt. Der Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zelldichte ist hierbei wie folgt:

für *P. aeruginosa*: 0,6 OD<sub>578 nm</sub> entspricht ca.  $1 \cdot 10^9$  Zellen/ml

für *E. coli* : 1,0 OD<sub>578 nm</sub> entspricht ca.  $0,8 \cdot 10^9$  Zellen/ml



### **2.2.3 Lagerung von Bakterien**

#### **Glyzerinkulturen**

Bakterien können für längere Zeit bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, wenn dem Medium 15% Glycerin beigemischt werden, welches die Bakterienmembran beim Einfrierprozeß schützt. Hierfür werden Bakterien einer Übernachtskultur für fünf Minuten mit  $6000 \times g$  und bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Danach wird das Pellet in  $1/5$  Volumen LB Medium, das 15% Glycerin enthält, resuspendiert. Da es leicht vorkommen kann, dass Bakterien ihren Phänotyp durch Subkultivierung ändern, muss darauf geachtet werden, dass Glyzerinkulturen nicht ständig auf- und abgetaut werden.

#### **Cryobeads**

Um Bakterien bei  $-80^{\circ}\text{C}$  ohne Gefahr einer Phänotypänderung zu lagern, können sog. Cryobeads (Technical service Consultants Ltd., Lancashire, UK) verwendet werden. Diese Kügelchen (Beads) sind speziell beschichtet, um eine Anlagerung der Bakterien und den Schutz während des Einfrierens zu gewährleisten. Des Weiteren fehlt ihnen eine Kohlenstoffquelle für Stoffwechselaktivitäten, wodurch ein Phänotypwechsel nahezu unmöglich wird. Dies ist vor allem für Stämme mit einem instabilen Genom (z.B. Hypermutatorstämme) sehr hilfreich, wenn diese öfter subkultiviert und dadurch vermehrten Auf- und Abtauzyklen ausgesetzt werden (A.S. Limpert, persönliche Mitteilung).

Hierfür wurde eine Übernachtskultur bei  $6000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Danach wird das Pellet mit der Konservierungsflüssigkeit der Cryobeads resuspendiert. Diese Suspension wird auf die Cryobeads pipettiert, gemixt und für einige Minuten stehen gelassen.

Danach wird der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Gefäß mit den Cryobeads bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## **2.2.4 Präparation von DNA**

### **2.2.4.1 Präparation von genomischer DNA**

#### **Verwendete Lösungen:**

**Lysis-Puffer** 40 mM Tris-Acetat, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 1% SDS, pH 7,8

**5 M NaCl**

**RNase A (Qiagen)**

**Phenol**

**Chloroform**

**Isopropanol**

**Ethanol (EtOH)**

**TE-Puffer** 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

**H<sub>2</sub>O (bidest)**

Zur Präparation genomischer DNA aus *P. aeruginosa* Stämmen wurden 5 ml LB Medium mit den entsprechenden Stämmen inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 12000 x g und 4°C pelletiert.

Das Pellet wurde dann in 900 µl Lysis-Puffer resuspendiert und für 10 – 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Probe mit 300 µl 5M NaCl versetzt. Um die Zellfragmente abzutrennen, wurde die Probe für 45 – 90 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 µl RNase A (10 mg / ml) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA im Überstand wurde eine Phenol – Chloroform – Extraktion durchgeführt (siehe 2.2.4.2. Phenol-Chloroform-Extraktion). Sollte die wässrige Phase nach einmaliger Extraktion immer noch eine Trübung aufweisen, wurde dieser Schritt wiederholt. Um die DNA aus der wässrigen Phase auszufällen, wurde das gleiche Volumen Isopropanol hinzugefügt. Die ausgefallene DNA wurde nun 15 Minuten bei 14000 x g und 20°C zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend bei 37°C für 30 Minuten im Heizblock getrocknet. Um die DNA vollständig zu lösen, wurde sie mit 50 µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O versetzt und für mindestens 12 Stunden bei 4°C gelagert.

### **2.2.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion**

#### **Verwendete Lösungen:**

<b>Phenol</b>	in TE-Puffer äquilibriert, pH 7,5 – 8,0
<b>Chloroform</b>	Chloroform + Isoamylalkohol (Verhältnis 24 : 1)

Die Phenol-Chloroform-Extraktionen wurden bei diversen Präparationsverfahren zur Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen verwendet. Hierfür wurden die DNA-Lösungen (z. B. Überstände von Zellysaten) mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die sich bildenden Phasen wurden durch 15 minütige Zentrifugation bei 14000 x g und 4°C getrennt. Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen und auf die gleiche Weise noch einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 :1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) behandelt. Bei Bedarf erfolgten auch mehrere Aufreinigungsschritte mit Phenol/Chloroform.

### **2.2.4.3 Präparation von Cosmiden aus *E. coli* Zellen**

#### **Verwendete Lösungen:**

<b>Puffer 1</b>	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
<b>Puffer 2</b>	200 mM NaOH, 1 % SDS
<b>Puffer 3</b>	3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure, pH 5,5
<b>Isopropanol</b>	
<b>Ethanol</b>	
<b>Phenol</b>	
<b>Chloroform</b>	
<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
<b>EB-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl, pH 8,5

Zur Cosmid – Präparation aus Bakterien wurden die unterschiedlichen Eigenschaften von Cosmid bzw. genomischer DNA ausgenutzt. Bei der Präparation von genomischer DNA wird immer die DNA einer Zelle extrahiert, wohingegen bei der Cosmid - Präparation nur Cosmid DNA, welche frei von genomischer DNA ist, präpariert werden sollte. Der entscheidende Schritt bei dieser Prozedur ist die Zellyse. Die genomische DNA ist durch Ankerproteine mit der Zellwand verbunden, wohingegen sich die Cosmid – DNA im Cytoplasma befindet. Durch eine fünfminütige Bakterienlyse mit Hilfe eines alkalischen SDS – Puffers kann diese extrahiert werden. Die Bakterienmembran wird lysiert und die Cosmid – DNA freigesetzt. Die genomische DNA hingegen bleibt weiterhin über die Ankerproteine mit der Zellwand verbunden. Durch Abzentrifugieren kann nun die Cosmid – DNA von der genomischen DNA

getrennt werden. Die Cosmid – DNA ist im Überstand zu finden, wohingegen sich die genomische DNA mit den anderen Zelltrümmern im Sediment befindet.

#### Präparativer Maßstab:

Die Präparation erfolgte nach der alkalischen Lysis-Methode (Birnboim u. Doly, 1979). Zuerst wurde eine 250 ml Übernachtkultur der entsprechenden Bakterien angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 6000 x g und 4°C 15 Minuten lang abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 20 ml Puffer 1 resuspendiert. Zur Bakterienlyse wurden 20 ml Puffer 2 hinzugefügt und die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch die Zugabe von 20 ml Puffer 3 wurde das Gemisch neutralisiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 20000 x g, 30 Minuten und 4°C abgetrennt.

Die DNA wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 500 µl H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen.

#### **2.2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

##### **Verwendete Lösungen:**

<b>EB-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl, pH 8,5
<b>Na-acetat</b>	3 M Natriumacetat, pH 5,2
<b>Ethanol</b>	
<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Dieses Verfahren wurde verwendet, um PCR - Produkte nach der elektrophoretischen Auftrennung in Agarosegelen (s. Kapitel 2.2.5.6) aus der Gelmatrix zu isolieren. Hierfür wurde das DNA-Fragment im Agarosegel lokalisiert und das entsprechende Gelstück aus dem Gel ausgeschnitten.

Die DNA - Isolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

## **2.2.5 Methoden zur DNA - Analyse**

### **2.2.5.1 Konzentrationsmessungen**

Die DNA – Konzentration in Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption (A) bei 260 nm (und 280 nm) Wellenlänge bestimmt. Dabei gilt:

$$A_{260\text{nm}} = 1 \Rightarrow c_{(\text{DNA})} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Die Reinheit der DNA ergibt sich aus dem Quotienten  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$  zwischen 1,6 und 2, wobei hochreine DNA einen Wert von 1,8 aufweist.

### **2.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion**

Seit ihrer Entdeckung 1983 ist die Polymerase – Kettenreaktion (PCR) zu einem der wichtigsten Standardverfahren in der Molekularbiologie entwickelt worden (Saiki et al., 1988). Sie ist eine sehr wirkungsvolle Methode zur Anreicherung definierter DNA – Abschnitte. Hierfür reichen schon geringe Mengen einer DNA – Matrize aus. Dazu werden bei bekannter Zielsequenz zwei passende Oligonukleotide (Primer), eine thermostabile DNA – Polymerase, Puffer, die zu amplifizierende DNA und Nukleotide benötigt.

Das typische PCR – Programm besteht aus drei Schritten:

- einem Denaturierungsschritt, durch den bei 94°C die beiden DNA – Stränge voneinander getrennt werden
- einem Annealingschritt bei ca. 55 – 65°C, währenddessen es zu einer Hybridisierung der Primer mit der einzelsträngigen DNA kommt
- einem Elongationsschritt bei 72°C (Temperaturoptimum der *Taq* – Polymerase), bei dem die Primer so lange verlängert werden, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für folgende Zwecke verwendet:

- Amplifikation bekannter Sequenzen zur Herstellung von DNA-Sonden oder zur Bindung an Nylonmembranen für Hybridisierungsexperimente
- Bestimmung des Integrationspunktes von Plasmiden im *P. aeruginosa* Genom
- Nachweis von Plasmiden in *P. aeruginosa* Bakterien
- Quantifizierung von Plasmid – bzw. chromosomal integrierter DNA

Ein kritischer Faktor der PCR ist das Primerdesign. Bei der Auswahl der jeweiligen Sequenzen wurden folgende Punkte berücksichtigt:

- der GC – Gehalt der Primer sollte ungefähr dem der DNA – Matrize entsprechen; aufgrund des hohen GC-Gehalts im *P. aeruginosa* Genom von 65% in diesem Fall mind. 60 %
- die Schmelztemperatur der Primer sollte möglichst oberhalb von 60°C liegen; dies kann mit der Formel  $T_m = \Sigma(\text{GC}) \cdot 4^\circ\text{C} + \Sigma(\text{AT}) \cdot 2^\circ\text{C}$  abgeschätzt werden (Wu et al., 2005)
- die Primer sollten keine komplementäre Strukturen aufweisen
- die Primer eines Paares sollten möglichst den gleichen Schmelzpunkt aufweisen
- die Länge sollte ca. 20 – 25 bp betragen
- die Primer sollten nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden
- das 3' der Primer sollte möglichst mit zwei Cytidinen oder Guaninen enden, wodurch es zu einer stabilen Hybridisierung dieses Bereiches mit der DNA – Matrize kommt
- es sollten möglichst keine weiteren gleichen oder ähnlichen Sequenzen in der Matrizen – DNA vorkommen

Die bei den Versuchen verwendeten Primer werden in den jeweiligen Abschnitten „Ergebnisse und Diskussion“ beschrieben. Die jeweiligen Sequenzen sind im Anhang beigefügt.

### **2.2.5.3 Standard PCR – Ansatz**

#### **Verwendete Lösungen:**

<b>PCR-Kit</b>	10x Reaktionspuffer, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , Taq-Polymerase (InViTek)
<b>dNTP-Lösung</b>	8 mM (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
<b>DMSO</b>	
<b>5 µM Primer A</b>	
<b>5 µM Primer B</b>	
<b>Paraffin</b>	

Für die Standard PCR Ansätze wurde *Taq*-DNA-Polymerase (InViTek) verwendet. Reaktionen mit 30  $\mu$ l Gesamtvolumen wurden nach folgenden Schema angesetzt und danach mit Paraffin überschichtet:

3,0 $\mu$ l	10x Reaktionspuffer (InViTek)
1,8 $\mu$ l	8 mM dNTPs
3,0 $\mu$ l	5 $\mu$ M <i>Primer A</i>
3,0 $\mu$ l	5 $\mu$ M <i>Primer B</i>
1,0 $\mu$ l	DMSO
2,0 $\mu$ l	50 mM MgCl <sub>2</sub> (1 mM Endkonzentration)
50 – 200 ng	DNA-Matrize (abhängig vom Experiment)
1 U	<i>Taq</i> -Polymerase in 5 $\mu$ l 1x Reaktionspuffer
ad 30,0 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Wurde ein anderes Gesamtvolumen verwendet, wurden die einzelnen Volumina dementsprechend angepaßt.

Für die jeweiligen Ansätze wurde folgendes Programm verwendet ( $T_{Ann}$  = Hybridisierungstemperatur der Primer;  $t_{Elong}$  = gewählte Elongationszeit):

$$\begin{aligned}
 &1 \times (300s - 96^{\circ}C) \\
 &35 \times (T_{Ann} / 60 s - 72^{\circ}C / t_{Elong} - 92^{\circ}C/120s) \\
 &1 \times (T_{Ann} / 60 s - 72^{\circ}C / 2 * t_{Elong})
 \end{aligned}$$

Da mit Hilfe der PCR unterschiedlich lange PCR – Produkte ( ca. 100 – 700 bp) erzeugt wurden, ist die Elongationszeit  $t_{Elong}$  im PCR-Program den jeweiligen Produktlängen angepasst worden. Im Anschluss an die PCR wurden den Aliquots des Produktes ca. 5 $\mu$ l entnommen und per Agarosegelelektrophorese auf Größe, Qualität und Ausbeute überprüft. War eine Optimierung des PCR – Ansatzes notwendig, wurden verschiedene MgCl<sub>2</sub>-Konzentration (Einfluss auf die Fehlerrate und Prozessivität der Polymerase) und unterschiedliche  $T_{Ann}$  (Einfluss auf die Primerbindung an die DNA – Matrize) getestet. Ebenso können die Menge der Template – DNA sowie  $t_{Elong}$  variiert werden.

Die genomische DNA von *P. aeruginosa* neigt wegen ihres hohen GC – Gehaltes verstärkt zur Bildung von Sekundärstrukturen. Dies könnte die Amplifikation der DNA – Abschnitte behindern. Aus diesem Grund wurde DMSO hinzugefügt, welches als chaotropes Reagenz wirkt und das Aufschmelzen der DNA für die PCR erleichtern soll. Allerdings muss hierbei auch beachtet werden, dass eine zu hohe DMSO – Konzentration (über 10%) die Aktivität der *Taq* – Polymerase um bis zu 50% reduzieren kann (Gelfand, 1989).

Eine weitere Möglichkeit war die Zugabe von Betain (siehe Abschnitt 2.2.5.4).

Führten alle Optimierungsversuche nicht zum gewünschten Erfolg, wurde das ‚FailSafe™ PCR-System‘ (Epicentre), verwendet. Dieses System besteht aus 12 unterschiedlichen Reaktionspuffern sowie einem speziellen Gemisch verschiedener DNA – Polymerasen.

Die Elongationszeit  $t_{\text{Elong}}$  im PCR-Programm wurde den Längen des jeweils erwarteten PCR-Produkts angepasst. Gewählt wurden ca. 60 s pro 800 bp Produktlänge. Im Anschluss an die PCR wurde ein Aliquot des Produkts per Agarosegelelektrophorese auf Größe, Qualität und Ausbeute überprüft.

#### **2.2.5.4 PCR – Ansatz mit Betain**

Ein weiterer verwendeter PCR – Zusatz war Betain. Dieses Reagenz ist ebenfalls in den unterschiedlichen Puffern diverser PCR Amplifikationssysteme wie „GC – RICH solution enhancer“ von Roche, „FailSafe Enhancer“ von Epicentre, und „TaqMaster Enhancer“ von Eppendorf enthalten.

Durch diesen Zusatz kann es in vielen Fällen zu einer verbesserten Amplifikation kommen. Dies ist vor allem hilfreich, wenn PCR – Produkte auf GC – reicher Matrizen - DNA generiert werden sollen, da es die Bildung von Sekundärstrukturen verhindert (Henke, 1997).

Betain wird in einer Endkonzentration von 1,0 – 1,7 M eingesetzt. Die Effektivität der Betainzugabe wird in Abbildung 2.1 veranschaulicht. Durch die Zugabe von Betain wurde in zwei Fällen (1b, 2b) ein PCR – Produkt generiert, das ohne Betainzugabe nicht amplifiziert werden konnte (1a, 2a). In zwei weiteren Fällen (2a – b, 4a – b) wurde die Ausbeute des PCR – Produktes deutlich, in einem Fall (5a – b) gering erhöht.

**Abb. 2.1: Einfluss von Betain auf PCR – Ausbeute**



Aufgetragen wurden fünf verschieden PCR – Produkte, die jeweils in zwei parallelen Ansätzen a und b generiert wurden. Ansatz b unterschied sich von Ansatz a jeweils nur durch die Zugabe von 1,5 M Betain.



Ein Standard 30 µl PCR - Ansatz mit Betain wurde nach folgenden Schema angesetzt:

3,0 µl	10x Reaktionspuffer (InViTek)
1,8 µl	8 mM dNTPs
3,0 µl	5 µM <i>Primer A</i>
3,0 µl	5 µM <i>Primer B</i>
1,0 µl	DMSO
2,0 µl	50 mM MgCl <sub>2</sub> (1 mM Endkonzentration)
50 – 200 ng	DNA-Matritze (abhängig vom Experiment)
11,25 µl	Betain (4M)
1 U	<i>Taq</i> -Polymerase
ad 30,0 µl	H <sub>2</sub> O

### 2.2.5.5 Kinetik - PCR zur Quantifizierung

Mit Hilfe der Kinetik – PCR wurde der Anteil an freiem Plasmid und geninselfreiem Genom detektiert und in den jeweiligen *P. aeruginosa* Stämmen analysiert.

Hierfür wurden 100 ml LB – Medium mit Hilfe einer Übernachtskultur der jeweiligen Bakterienstämme auf OD<sub>578nm</sub> 0,2 gebracht. Zu definierten OD<sub>578nm</sub> wurden Bakterien der Kultur entnommen und die DNA, wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, isoliert.

Mit dieser DNA wurden 50 µl PCR - Ansätze nach folgenden Schema angesetzt:

5,0 µl	10x Reaktionspuffer (Eurogentec)
3,0 µl	8 mM dNTPs
5,0 µl	5 µM <i>Primer A</i>
5,0 µl	5 µM <i>Primer B</i>
1,0 µl	DMSO
3,3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Eurogentec)
50 ng	DNA-Matritze
11,25 µl	Betain (4M)
1 µl	Goldstar <sup>TM</sup> -DNA-Polymerase
ad 50,0 µl	H <sub>2</sub> O

Zu definierten Zyklen wurde dem PCR – Ansatz jeweils 5µl entnommen. Die Auftrennung der DNA - Ansätze erfolgte per Gelelektrophorese und die entsprechenden Gele mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die relativen Mengen  $N_i$  und  $N_j$  der Template DNA  $i$  und  $j$  im Reaktionsansatz wurden durch Titration auf den ersten PCR Zyklus, bei dem ein PCR - Produkt auf dem Gel sichtbar wurde, mit Hilfe der Gleichung  $N_i / N_j = (1+R)^{n(j)} - n(r)$  bestimmt.  $R$  bezeichnet in diesem Fall die Effizienz des Thermocyclers während der PCR – Reaktion. Sie lautet in diesem Fall:  $R = 0,78 \pm 0,02$  für PCR einer Länge zwischen 100 bp und 800 bp und einem Intervall der Reaktionszyklen von  $10 < n < 35$  (Hoof et al., 1991; Bremer et al., 1992).

### 2.2.5.6 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren per Agarosegelelektrophorese wurde zur Separierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdauen und zur Überprüfung der Qualität, Größe und auch Quantität von PCR-Produkten, präparierten Cosmiden und genomischer DNA eingesetzt.

#### **Benötigte Reagenzien:**

<b>Agarose ultrapure</b>	Agarose <i>electrophoresis grade</i> (Gibco BRL), für analytische Agarosegele
<b>NuSieve-GTG-Agarose</b>	Agarose <i>genetic technology grade</i> (FMC), für präparative Agarosegele
<b>TBE-Puffer</b>	0,09 M Tris, 0,09 M Borsäure, 0,002 M EDTA, pH 8,3 – 8,5
<b>6x AP-Puffer</b>	0,5 M EDTA, 15 % Ficoll Typ 400 (Amersham Pharmacia), 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanol, pH 8,0
<b>EtBr-Lösung</b>	1 µg/ml Ethidiumbromid

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 0,6 – 2,2 % Agarose verwendet, die Größen betragen 5 x 7 cm, 10 x 14 cm oder 20 x 20 cm. Als Puffer für Herstellung der Gele und die Elektrophorese wurde TBE-Puffer verwendet (bei 20 x 20 cm großen Gelen 0,5x TBE). Vor dem Auftragen auf ein Gel wurden die Proben mit 0,2 Vol. 6x AP-Puffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer angelegten Feldstärke von 5 – 8 V/cm oder bei langsamer Auftrennung (über Nacht) bei 4°C und einer Feldstärke von 1,5 – 2 V/cm.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele in EtBr-Lösung gefärbt (20 – 30 min Färben, 2 x 20 min Entfärben in Wasser) und die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) auf einem Transilluminator sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele mit der fluoreszierenden DNA fotografiert.

Mit den Proben wurden im Gel DNA-Größenstandards aufgetrennt. Anhand der Positionen nach der Elektrophorese konnten die Längen der untersuchten DNA-Fragmente bestimmt werden. Verwendet wurden drei verschiedene Standards mit folgenden Fragmentgrößen [bp]:

<b>GeneRuler (Fermentas)</b>	<b>2 – Log DNA Ladder (NEB)</b>	<b>pBluescript II KS- (Stratagene) <i>MspA1I</i>- verdaut</b>
700	10002	941
600	8001	809
500	6001	518
400	5001	314
300	4001	245
200	3001	134
150	2017	
100	1517	
75	1200	
50	1000	
25	900	
	800	
	700	
	600	
	500	
	400	
	300	
	200	
	100	

## 2.3 DNA-DNA-Hybridisierungen

### 2.3.1 DNA-Fixierung auf Membranen

#### „Dot blotting“ von DNA-Lösungen

##### **Benötigte Lösungen:**

**3 M NaOH**

**TE-Puffer**

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

**1 M Ammoniumacetat**

**3 M Ammoniumacetat + Farbstoff**

3 M Ammoniumacetat, 0,01 % Xylencyanol

Um PCR-Produkte als Sonden direkt auf Nylonmembranen zu übertragen, wurde eine „Minifold-Dot-Vakuum-Blot-Apparatur“ verwendet. Mit Hilfe dieser Apparatur lassen sich die DNA-haltigen Lösungen in 96 Bohrungen (angeordnet wie bei einer 96-well-Platte (Greiner)) auf eine eingespannte Membran auftragen.

In 96-well-Platten wurden 50 µl PCR-Produkt mit 85 µl TE-Puffer und 15 µl 3M NaOH pro „well“ versetzt, 30 min bei 65°C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. In die *Dot-Blot*-Apparatur wurde eine mit 1 M Ammoniumacetat angefeuchtete Membran (Hybond N<sup>+</sup>) eingespannt. Die denaturierten DNA-Lösungen wurden mit 100 µl 3 M Ammoniumacetat + Farbstoff versetzt und 2 min bei RT inkubiert. In die Bohrungen der Apparatur wurden mit einer Mehrkanalpipette 100 µl Aliquots dieser Ansätze gegeben (entspricht 20 µl des eingesetzten PCR-Produkts). Die Bindung der DNA an die Membran erfolgte durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuum an die Apparatur, so dass die Flüssigkeit durch die Membran gesaugt wird und die denaturierte DNA an der Membran haften bleibt. Durch die Bohrungen der Apparatur wurde gewährleistet, dass die 96 DNA-Proben in Form von Punkten („dots“) separat lokalisiert waren (Überprüfung mit Hilfe des beigefügten Farbstoffs). Nach kurzem Trocknen der Membran wurde die DNA durch 1 min Bestrahlung mit UV-Licht irreversibel auf der Membran fixiert.

#### „Dot blotting“ von DNA aus Bakterienzellen

##### **Benötigte Lösungen:**

**LB - Medium**

**2,5 M NaOH**

**1 M Ammoniumacetat**

**3 M Ammoniumacetat + Farbstoff**

3 M Ammoniumacetat, 0,01 % Xylencyanol

Aus Dauerkulturen wurden diese Stämme in 96-well-Platten in LB-Amp-Medium über Nacht bei 37 °C angezchtet. Zur Lyse der Bakterienzellen und zum Denaturieren der DNA wurden jeweils 150 µl Kultur mit 37,5 µl 2,5 M NaOH versetzt und mind. 60 min bei 65°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 112,5 µl 3 M NH<sub>4</sub>-acetat + Farbstoff zugegeben. Die Auftragung der DNA auf die Membranen mit Hilfe der *Dot-Blot*-Apparatur und die weitere Behandlung der Membranen erfolgte wie im oberen Abschnitt „*Dot blotting* von DNA-Lösungen“ beschrieben. Aufgetragen wurden pro Bohrung 100 µl der DNA-Lösung (entspricht 50 µl eingesetzter Bakterienkultur).

### **2.3.2 Digoxigenin-Markierung von DNA**

#### Generierung DIG-markierter DNA mit der „*random primed labeling*“-Methode

Um DNA-DNA-Hybridisierungen auf Nylonmembranen detektieren zu können, wurden einzelsträngige DNA-Fragmente erzeugt und mit Digoxigenin (DIG) markiert. Diese Fragmente wurden standardmäßig mit der „*random primed labeling*“-Methode generiert (Feinberg & Vogelstein, 1983). Dabei dienen Hexanukleotide aus Kalbsthymus als *Primer*, die statistisch verteilt an die Matrize binden und von einer Polymerase verlängert werden. Eingebaut werden dabei dNTPs aus einem Gemisch, bei dem 1/3 des dTTP durch DIG-dUTP ersetzt ist.

#### **Benötigte Reagenzien:**

**10x Hexanucleotid-Mix (Roche)**

**10x DIG-dUTP-Labeling Mix (Roche)**

**2 U/µl Klenow-Polymerase (Roche)**

Als Matrize wurden genomische DNA oder PCR-Produkte verwendet. Die DNA-Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt, 4 min bei 94°C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Nach Zugabe von 2 µl Hexanukleotid-Gemisch, 2 µl DIG-dUTP-labeling Mix und 1 µl Klenow-Polymerase wurden die Ansätze über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.3.3 Aufreinigung Digoxigenin-markierter DNA

DIG-markierte DNA wurden nach der Generierung generell über Sephadex G-50 Säulen aufgereinigt, um nicht inkorporierte dNTPs, Hexanukleotide usw. zu entfernen.

#### **Benötigte Reagenzien:**

<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl, pH 8,0
<b>Sephadex G-50</b>	in TE-Puffer äquilibriert
<b>Farbstoffgemisch</b>	0,8 % Dextranblau (Serva, $2 \cdot 10^6$ g/mol), 0,5 % Phenolrot (376 g/mol), gelöst in TE-Puffer

Sephadex G-50 Säulen (Durchmesser 0,5 cm, Länge 6 cm) wurden mit TE-Puffer äquilibriert und trocken zentrifugiert (45 s, 1000 g). Die Ansätze aus der Markierungsreaktion wurden mit 8 µl Farbstoffgemisch versetzt, mit TE-Puffer auf ein Volumen von 250 µl aufgefüllt und auf die Säulen aufgetragen. Durch Zentrifugation (30 s, 1000 g) wurden die DIG-markierten DNA-Fragmente zusammen mit dem Dextranblau eluiert, die dNTPs, Hexanukleotide usw. wurden zusammen mit dem Phenolrot auf der Säule zurückgehalten. Die aufgereinigten Produkte wurden bis zum Gebrauch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.4 Hybridisierung von DIG-markierter DNA mit membranfixierter DNA

Durch Hybridisierungsreaktionen wurden spezifische Fragmente membrangebundener DNA mit DIG-DNA-Fragmenten markiert. Die DNA-tragende Membran wurde bei einer ausgewählten Hybridisierungstemperatur inkubiert, um die markierten Fragmente an die fixierten DNA-Stränge zu binden. Unspezifisch gebundene DIG-DNA wurde durch anschließende Waschschrte entfernt.

#### **Benötigte Lösungen:**

<b>Prähybridisierungspuffer</b>	0,5 Na-phosphat, 7 % SDS, 1 mM EDTA, 0,5 % <i>Blocking-Reagenz</i> (Roche), pH 7,2
<b>Waschlösung</b>	40 mM Na-phosphat, 1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,2

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die DNA-beladenen Membranen 2 – 16 h bei  $68^{\circ}\text{C}$  in Prähybridisierungspuffer unter Rotation in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Die markierte DNA wurde in 10 ml Prähybridisierungspuffer aufgenommen und mit der Membran weitere 24 – 48 h bei  $68^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Entfernung der Lösung mit der markierten DNA wurden die Membranen mind. zweimal 30 – 45 min bei  $68^{\circ}\text{C}$  mit

Waschlösung inkubiert. Auf den gewaschenen Membranen erfolgte dann die Detektion der hybridisierten DIG-DNA (siehe folgender Abschnitt). Die benutzte Lösung mit der markierten DNA konnte für eventuelle weitere Anwendungen bei -20°C gelagert werden.

### **2.3.5 Detektion Digoxigenin-markierter DNA**

#### **Benötigte Lösungen:**

<b>Puffer I</b>	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
<b>Puffer II</b>	Puffer I + 0,5 % <i>Blocking</i> -Reagenz (Roche)
<b>Puffer III</b>	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,5
<b>Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat</b>	Anti-Digoxigenin-Antikörper (Fab-Fragmente), an Alkalische Phosphatase gekoppelt (Roche), Stammlösung 1 : 5000 in Puffer II verdünnt
<b>CDP-Star<sup>TM</sup></b>	Stammlösung (12,5 mM, Tropix), 1 : 500 in Puffer III verdünnt

Die Detektion der DIG-markierten Fragmente auf den DNA-Membranen nach der Hybridisierungsreaktion erfolgte in Anlehnung an ein publiziertes Protokoll (Guiliano et al., 1999). Dabei wurden an die DIG-Markierung Anti-Digoxigenin-Antikörper gebunden, an die Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Durch die Alkalische Phosphatase (AP) erfolgte die Spaltung eines Chemolumineszenz-Substrats (CDP-Star<sup>TM</sup>). Diese Chemolumineszenzsignale wurden mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die gewaschene Membran wurde dazu 5 min in Puffer I äquilibriert, durch 30 - 60 min Inkubation in Puffer II wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat erfolgte für 30 – 60 min unter ständigem Schütteln (mind. 4 ml Antikörperlösung pro 100 cm<sup>2</sup> Membran). Nach dreimaligem Waschen in Puffer I (je 15 min) wurde die Membran 5 min in Puffer III für die anschließende Enzymreaktion der Alkalischen Phosphatase äquilibriert. Die Inkubation mit der verdünnten CDP-Star<sup>TM</sup>-Lösung erfolgte für 5 – 10 min, die Membran wurde dann in Plastikfolie eingeschweißt. Die Detektion der Chemolumineszenz-Signale erfolgte durch Exposition von Röntgenfilmen (Typen „X-OMAT<sup>TM</sup> AR“ oder „Bio-MAX MR“ (Kodak)).

### **2.3.6 Regeneration von hybridisierten DNA-Membranen**

#### **Benötigte Lösungen:**

**Stripping-Puffer** 0,2 M NaOH, 0,1 % SDS

**Blot-Waschpuffer** 50 mM Na-phosphat, pH 6,5

Mit DIG-markierter DNA hybridisierte Membranen konnten für weitere Experimente regeneriert werden, indem sie zweimal 30 min in *Stripping*-Puffer gewaschen wurden. Die alkali-labile Bindung des Digoxigenins an dUTP zerfällt in diesem Puffer, so dass das Digoxigenin (und gebundener Antikörper) freigesetzt wurden.

Die Membranen wurden nach dieser Behandlung gründlich mit H<sub>2</sub>O gewaschen, um das SDS zu entfernen, 5 min in Blot-Waschpuffer neutralisiert, in Plastikfolie eingeschlagen und bei -20°C gelagert. Waren besonders starke Signale detektiert worden, wurde die Anzahl der Waschschrte mit *Stripping*-Puffer erhöht.

Da durch diese Behandlung zwar die DIG-Markierungen, nicht aber die hybridisierte DNA selbst von der auf der Membran fixierten DNA gelöst werden, nimmt die Zahl der Bindungsplätze für neue Fragmente bei mehrmaliger Wiederverwendung stetig ab. Die Membranen können daher nicht beliebig oft regeneriert werden.

### **2.4 Phänotypische Untersuchungen**

Phänotypische Untersuchungen wurden mit verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen durchgeführt.

#### **2.4.1 Caseinplatten**

##### **Benötigte Reagenzien:**

**10x M9** 0,48 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,22 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 85 mM NaCl, 0,18M NH<sub>4</sub>Cl, 1,5 M Na-benzoat

##### **Casein**

Mit Hilfe der Caseinplatten wurde untersucht, ob die Bakterien in der Lage sind, Casein als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Sind die Bakterien in der Lage, Casein abzubauen und es ihrem Kohlenstoffwechsel zugänglich zu machen, kann dies durch die Bildung eines weißen Rings um den Bakterienhof detektiert werden.



Hierfür wurde eine Übernachtkultur der Bakterien angesetzt und auf eine  $OD_{578nm}$  0,5 verdünnt. Von dieser wurden 3  $\mu$ l auf eine M9 – Agarplatte mit 0,8% Casein aufgetropft und für mindestens 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der Stamm PA14 verwendet.

### **2.4.2 Peroxid - Agarplatten**

#### **Benötigte Reagenzien:**

**LB – Agar**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stammlösung (35%)**

Phagozytierende Bakterien gehören u. a. zu den Zellen der primären Immunantwort beim Menschen. Makrophagen sind hierbei die Haupteffektorzellen der primären Immunantwort und eliminieren eingedrungene Erreger vor allem durch die Phagozytose. Weitere zur Phagozytose befähigte Zellen sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Sie sind kurzlebig und wandern nur bei Entzündung ins Gewebe ein. Bei der Phagozytose von Pathogenen entstehen Phagosomen, in welchen nach Verschmelzung mit Lysosomen die Krankheitserreger abgetötet werden. Außerdem erzeugen Phagozyten eine Reihe von für Bakterien toxische Metabolite, z.B. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Superoxidanion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Stickstoffoxid (NO) (Roitt et al., 1995).

Verschiedene *P. aeruginosa* Stämme wurden bezüglich ihrer Sensitivität für unterschiedliche Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – Konzentrationen und dem damit verbundenden Stress getestet. Durch die Sezernierung spez. Enzyme, wie Superoxiddismutasen, kann *P. aeruginosa* oxidative Schäden vermeiden.

Die jeweils verwendeten Platten wurden bei 4°C gegossen. Hierzu wurden 50 - ml Röhren mit flüssigem LB – Agar gefüllt und die jeweilig verwendete Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus einer 35%igen Konzentratlösung hinzugegeben. Die Ausgangskonzentrationen betragen 300 mM und 400 mM. Mit diesen wurde Verdünnungsreihen durchgeführt. Nach dem Gießen wurden sofort 3  $\mu$ l einer auf  $OD_{578nm}$  0,5 verdünnten Bakterienübernachtkultur getropft. Die Platten wurden danach für ca. 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **2.4.3 Kongorot - Agarplatten**

**Benötigte Reagenzien:****LB – Agar****Kongorot – Farbstoff**      25µg/ml

Kongorot bindet unspezifisch an verschiedene Typen von Exopolysacchariden sowie an einige Proteine auf der Zelloberfläche von Bakterien (Römling, 1998). Daher lassen sich, nach einer Kongorot - Färbung, unter dem Mikroskop betrachtet, Aussagen über die Morphologie der verschiedenen *P. aeruginosa* Kulturen treffen.

Die Platten wurden gegossen, indem 25 ml LB – Agar mit 25µg/ml versetzt wurden. Auf diese wurden dann 3 µl einer Bakterienkultur mit OD<sub>578nm</sub> 0,5 getropft und anschließend bei 37°C inkubiert.

### **2.4.4 Chrom Azurol S - Platten**

**Benötigte Reagenzien:****mod. CAS – Agar****MM9 – Medium****Chrom Azurol S****Hexadecyl – Trimethylammonium - Bromid**

Viele Mikroorganismen produzieren und sezernieren Siderophore. Ihre Funktion besteht darin, hochaffin Fe<sup>2+</sup> - und Fe<sup>3+</sup> - Ionen zu komplexieren, die so in die Zelle aufgenommen werden können. *P. aeruginosa* ist in der Lage, die Siderophore Pyochelin und Pyoverdin zu bilden, die beide eine Eigenfluoreszenz besitzen. Für diese Untersuchungen 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. Bei Entfernung der Fe – Ionen aus diesem Komplex veränderte sich seine Farbe von blaugrün zu orange. Die Siderophorenproduktion der untersuchten Bakterien läßt sich durch einen orangefarbenen Bereich um den Bakterienhof erkennen. Die Größe des entstehenden Hofes ist abhängig von der Siderophorenproduktion. Bei dieser Untersuchung kann allerdings nicht zwischen Pyochelinen und Pyoverdinen diskriminiert werden.

Der CAS – Agar wurde in einer leicht modifizierten Variante nach Schwyn und Neilands (1987) hergestellt. Für einen Liter CAS – Agar wurden 60,5 mg CAS in 50 ml Wasser gelöst und mit 10 ml einer Lösung gemischt, welche 1 mM FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O und 10 mM HCl enthielt.

Die daraus resultierende blaue Lösung 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) wurde verwendet, da der normale Phosphatpuffer eine starke Eisenbindung besaß und dieses somit den Bakterien nicht mehr zur Verfügung gestanden hätte. Stattdessen wurde dem Medium 1,4 – Piperazindiethansulfonsäure (PIPES) 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 gegeben, und anschließend mit der CAS – Lösung vermischt und in Petrischalen gegossen. Auf diese wurden dann 3 µl einer Bakterienkultur mit  $OD_{578nm}$  0,5 aufgetropft und anschließend für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

#### **2.4.5 Twitching Agar**

##### **Benötigte Reagenzien:**

##### **LB – Agar**

Unter *Twitching* versteht man die Fähigkeit von Bakterien, sich an Oberflächen mit Hilfe von Pili zu bewegen.

Das Twitching-Vermögen unterschiedlicher *P. aeruginosa* Stämme wurde auf LB – Agarplatten getestet. Hierfür wurde eine Übernachtskultur der Bakterien angesetzt. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurden die Bakterien durch den Agar auf die Platte inokuliert. Die Platte wurde anschließend bei 37°C inkubiert. Waren die Bakterien durch „Twitching“ beweglich, konnte dies als kreisförmige Ausdehnung der Bakterienkultur zwischen Agar und Boden der Petrischale festgestellt werden. Diese Ausdehnung wurde durch Messung des Durchmessers nach 48 Stunden quantifiziert.

#### **2.5 „Fast – killing“ – Versuche mit *Caenorhabditis elegans***

##### **Benötigte Reagenzien:**

**PGS-Agar** (Pepton Glucose Sorbitol: 1% Bactopecton, 1% NaCl, 1% Glukose, 0,15 M Sorbitol, 1,7% Bactoagar)

Bei den in diesem Modell verwendeten *C. elegans* handelt es sich um den N2 Bristol Wildtyp-Stamm, DR Subklon von CB Original (Tc1 pattern I). Dieser wurde auf mit *E. coli*

bewachsenen NGM (Nematode Growth Medium)-Agarplatten bei 20 °C im Nematodenschrank (Chromatographieschrank 2023, Mini Cold Lab, Fa. Pharmacia) kultiviert. Etwa alle fünf Tagen mussten die Würmer auf neue Platten umgesetzt werden. Hierzu wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpell ein kleines, gut mit *C. elegans* besiedeltes Agarstück aus der alten Platte herausgeschnitten und auf die neue Platte übersetzt. Die Umsetzfrequenz der Würmer, die zur Eipräparation dienen sollten, wurde auf ein bis zwei Tage reduziert.

Die Eipräparation wurde durchgeführt, um die Population in ihrer Entwicklung zu synchronisieren, da für die Versuche *C. elegans* eines Entwicklungsstadiums verwendet wurden. Zur Präparation waren NGM - Platten mit einer möglichst großen Zahl von Eiern und graviden Hermaphroditen nötig. Dieses Ziel wurde zuverlässig erreicht, wenn *C. elegans* vier Tage sowie am Tag vor der Eipräparation auf neue Futterplatten umgesetzt wurde. Diese Platten wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O gespült, indem das Wasser mehrmals über die Platten pipettiert wurde. Die Flüssigkeit mit den heruntergespülten Eiern und Würmern wurde in einem 15 ml Falcontube gesammelt, wobei das Volumen mindestens 3,5 ml betragen musste. Falls nötig, wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Ein Gemisch aus 600 µl sterilem H<sub>2</sub>O, 500 µl Natriumhypochlorit (12%) und 400 µl 5 M NaOH wurde hinzugefügt und gut vermischt. Die Würmer wurden über einen Zeitraum von 10 min vollständig aufgelöst, wobei etwa alle 2 min gut geschüttelt wurde. Die in der Flüssigkeit zurückgebliebenen Eier wurden gewaschen, indem sie für 30 s bei 1100 g zentrifugiert wurden. Die überstehende Flüssigkeit wurde bis auf etwa 100 µl verworfen, bevor wieder mit sterilem H<sub>2</sub>O auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt wurde. Nach Wiederholung des Waschvorgangs wurden die abzentrifugierten Eier in etwa 30 ml M9-Puffer in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt. Dazu kam eine Spatelspitze konzentrierte *E. coli* als Nahrungsquelle für die schlüpfenden *C. elegans* -Larven. Die Eipräparation wurde im Nematodenschrank bei 20 °C auf einem Schüttler bei 80 rpm gehalten. Nach etwa 3 Tagen hatten sich die Larven bis zum L4 - Larvenstadium entwickelt, die dann für die Versuche eingesetzt wurden.

Die in diesem Modell zu untersuchenden Bakterienstämme wurden zunächst auf Columbia-Blutagar mit 5% Schafblut bei 37 °C angezchtet. Anschließend wurden Vorkulturen hergestellt, in dem Koloniematerial mit einem sterilen Zahnstocher in 5 ml LB-Medium gegeben wurde. Die Inkubation erfolgte im Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 rpm über Nacht. Dann wurde die OD<sub>578nm</sub> bestimmt und die Bakterienzeldichte anhand einer Eichgerade errechnet. Die Suspension wurde soweit mit LB-Medium verdünnt, dass eine

Bakterienkonzentration von etwa  $1,5 \times 10^4$  Bakterien/ml erreicht wurde. Mit jeweils 100  $\mu$ l dieser Suspension wurden die *Fastkilling* – Platten (PGS – Agar) beimpft und mittels Drigalskispatel ausgestrichen. Bei jedem Ansatz wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  als Negativkontrolle eingesetzt. Da dieser Stamm auch als Futtermaterial verwendet wurde, sollte sich seine Anwesenheit nicht negativ auf die Bakterien auswirken. Die Platten wurden 16h bei 37 °C bebrütet. Vor Versuchsbeginn wurden die Platten für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie mit *C. elegans*, die sich im L4 – Larvenstadium befanden, inokuliert wurden. Pro Platte wurde ein Aliquot, das etwa 50 bis 60 *C. elegans* enthielt, verwendet. Durch den hohen Salzgehalt im Medium werden die *P. aeruginosa* Stämme zur vermehrten Toxinproduktion angeregt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde deshalb die Anzahl der toten Würmer im Verhältnis zum Inokulum bestimmt. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.6 Sequenzanalyse *in silico*

Die zu analysierenden DNA – Sequenzen, sofern nicht durch vorherige Arbeiten bekannt, wurden aus der an das NCBI (National Center for Biotechnological Information) angeschlossenen Sequenzdatenbank „GenBank®“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bezogen. Ebenfalls verwendet wurde die Internetseite des Genomsequenzierungsprojektes von *P. aeruginosa* PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>).

Die unterschiedlichen Genomsequenzen wurden auf verschiedene Charakteristika hin analysiert. Gesucht wurde dabei nach genetischen Elementen wie *tRNA*-Genen und besonderen DNA-Strukturen (Sequenzwiederholungen, „*repeats*“) und Proteinhomologien. Hierfür wurden verschiedene „Blast“ (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) Programme (Altschul et al., 1990) zur Analyse von DNA- oder Protein - Sequenzen verwendet, die ebenfalls alle auf der Homepage des NCBI unter der Internetadresse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) zu finden waren.

Im folgenden sind die durchgeführten *in silico* Analysen und die dafür verwendeten Programme aufgeführt sowie dazugehörige Referenzen und/oder Internetadressen angegeben.

### **Vergleiche mit anderen Proteinsequenzen in Datenbanken**

Um homologe Proteinsequenzen für pKLC102 annotierte Proteine zu detektieren, wurde das Programm „PHI- and PSI-BLAST“ verwendet. Dieses Programm verglich die jeweils eingegebene pKLC102 – Protein - Sequenz mit den Ergebnissen der abgeschlossenen bzw. fast abgeschlossenen Sequenzierprojekte prokaryotischer Genome. Hierfür wurden die vorgegebenen Standardeinstellungen des Programmes verwendet.

Die Aussagekraft der durch die BLAST – Suche gefundenen Übereinstimmungen wurde anhand der parallel zu den Ergebnissen ausgegebenen Wahrscheinlichkeitswerte individuell bewertet. Gab das Programm einen Wert an, der zufällige Ähnlichkeiten beider Sequenzen erwarten ließ („Sequences with E – value worse than threshold“), wurden die beiden Proteinsequenzen als nicht ähnlich angesehen.

### **Vergleich zweier Sequenzen**

Um den Grad der Ähnlichkeit zweier Sequenzen zu bestimmen und übereinstimmende Abschnitte in beiden darzustellen, wurde das Programm „BLAST 2 Sequences“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) verwendet.

Das Programm „BLAST 2 Sequences“ gibt beim Vergleich zweier Nukleotidsequenzen den Grad der Sequenzähnlichkeit an. Lag der Ähnlichkeitswert, für die über die volle Länge verglichenen Sequenzen, bei über 70% wurden diese als homolog angesehen.

## **2.7 Stammbaumerstellung**

Der Stammbaum wurde mit Hilfe des PHYLIP-Programms (Phylogeny Inference Package, Version 3.6, Juli 2004, von Joseph Felsenstein) entwickelt.

PHYLIP ist ein Paket von Programmen zur Entwicklung verschiedenartiger Stammbäume, wie z.B. mit Hilfe von Distanz-Matrices. Mit Hilfe dieser Programme ist es möglich, Veränderungen in der Genzusammensetzung verschiedener Spezies in Distanzen umzurechnen und diese innerhalb eines Stammbaumes darzustellen. Die Grundlage hierfür bildeten die Ergebnisse der Makroarrayauswertungen.

## **3. Ergebnisse und Diskussion**

### **3.1. Die mobile Geninsel pKLC102**

Das Plasmid pKLC102 aus *P. aeruginosa* liegt in Klon C Stämmen als episomales Plasmid und ins Genom integrierte Insel vor. Wie die Arbeiten von K.D. Larbig (Dissertation, 2001) und J. Klockgether (Dissertation, 2003) gezeigt haben, kann es reversibel in das tRNA<sup>Lys</sup> – Gen ( entspricht PA4541.1 in PAO1) inserieren.

Untersucht werden sollte nun, ob pKLC102 - positive Stämme die Geninsel verlieren können, d.h. ob das tRNA<sup>Lys</sup> – Gen PA4541.1 in diesen Stämmen auch ohne integrierte Geninsel vorliegt. Darüber hinaus sollte der Anteil an episomalen Plasmid sowie geninselfreier tRNA<sup>Lys</sup> quantifiziert werden.

#### **3.1.1 Etablierung einer PCR zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninseln pKLC102 und PAPI-1**

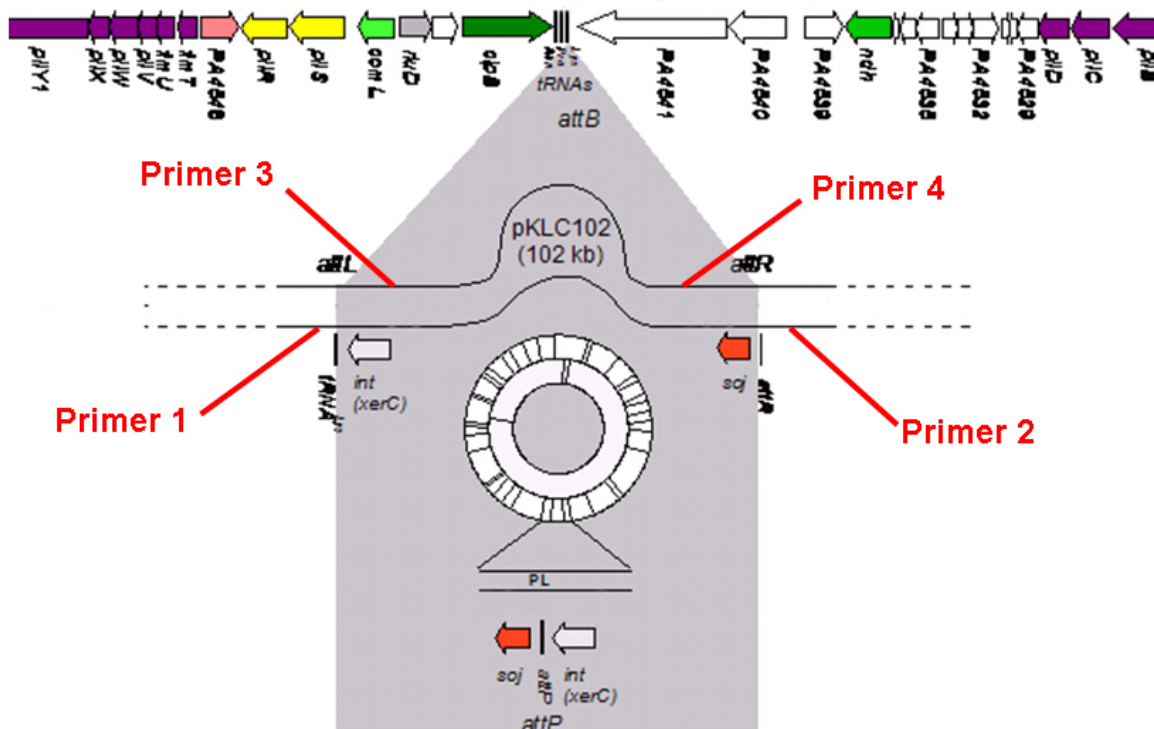
Für diese Untersuchungen wurde der Stamm SG17M gewählt. Bei diesem zum Klon C gehörenden Stamm handelt es sich um ein Flusswasserisolat aus Mülheim a. d. Ruhr, für das nachgewiesen wurde, dass es eine episomale und chromosomal integrierte Form von pKLC102 besitzt (Römling et al., 1994). Parallel dazu sollten die selben Untersuchungen mit dem sequenzierten Stamm PA14 und der Insel PAPI – 1 durchgeführt werden. Untersucht werden sollte, ob auch von PAPI – 1 episomale Varianten existieren.

Für diese Analysen innerhalb der Stämme wurden „Primer“ konstruiert, die die chromosomalen Insertionspunkte im Genom überspannten. Die Primer wurden so gewählt, dass, je nach Kombination, die linke bzw. rechte Insertionsstelle im Genom bei integrierter Insel, die episomale Form oder die tRNA<sup>Lys</sup> ohne integrierte Geninsel detektiert werden konnte (siehe Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1).

Als Negativkontrollen dienten die Stämme PAO1 und der Klon C Stamm C5. Da laut Genomsequenz (Stover et al., 2000) ausgeschlossen werden konnte, dass in PAO1 eine pKLC102 - verwandte Geninsel vorliegt. Dies wurde durch weitere Untersuchungen L. Wiehlmann (unveröffentlichte Daten) und Dot blot Hybridisierungen (s. Kapitel 3.3) bestätigt. Im Stamm C5 (Klon C) ist ebenfalls keine pKLC102 – verwandte Geninsel integriert. Dies

ergaben Voruntersuchungen von K.D. Larbig (Dissertation, 2001) und L. Wiehlmann (unveröffentlichte Daten) und wurde durch Dot blot Hybridisierung ebenfalls verifiziert.

**Abbildung 3.1: Bindungsstellen der bruchpunktumspannenden Primer im Genom**



Integration des Plasmides pKLC102 in die tRNA<sup>Lys</sup> im Bakteriengenom. Rot gekennzeichnet sind die Bereiche, in denen die Bindungsstellen für die Primer zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninseln pKLC102 und PAPI-1 liegen (modifiziert nach KD Larbig Dissertation, 2001).

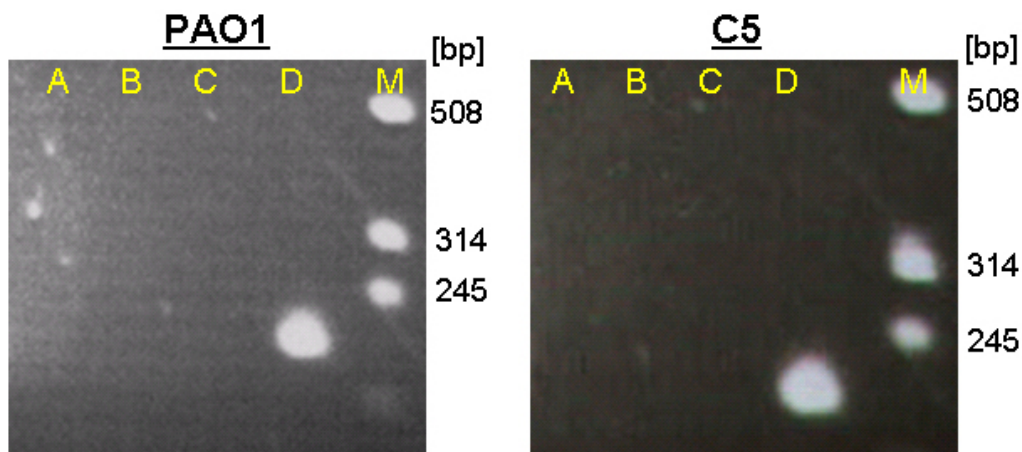
**Tabelle 3.1: Übersicht der Primer zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninseln pKLC102 und PAPI-1**

Position der Primer	Primerkombination	Größe des PCR - Produktes
A: linke Integrationsstelle	1 und 3	291 bp
B: rechte Integrationsstelle	2 und 4	370 bp
C: freies Plasmid	3 und 4	547 bp
D: tRNA ohne int. Geninsel	1 und 2	192 bp



Die Ergebnisse der Analysen sind in den Abbildungen 3.2 und 3.3 dargestellt. Die PCR mit DNA der beiden Negativkontrollen (s. Abbildung 3.2) ergab nur ein Produkt in der erwarteten Größe für das  $tRNA^{Lys}$  - Gen ohne integrierte Geninsel (Reihe D). Die drei anderen PCR Reaktionen blieben ohne Produkt (Reihe A – C). Dies zeigt, dass die „Primer“ spezifisch für die Region um das  $tRNA^{Lys}$  – Gen PA4541.1 sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass es zu keinen unspezifischen Bindungen kam bzw. es an anderen Positionen im Genom der Bakterien noch weitere Bindungsstellen für die entsprechenden Primerkombinationen gab.

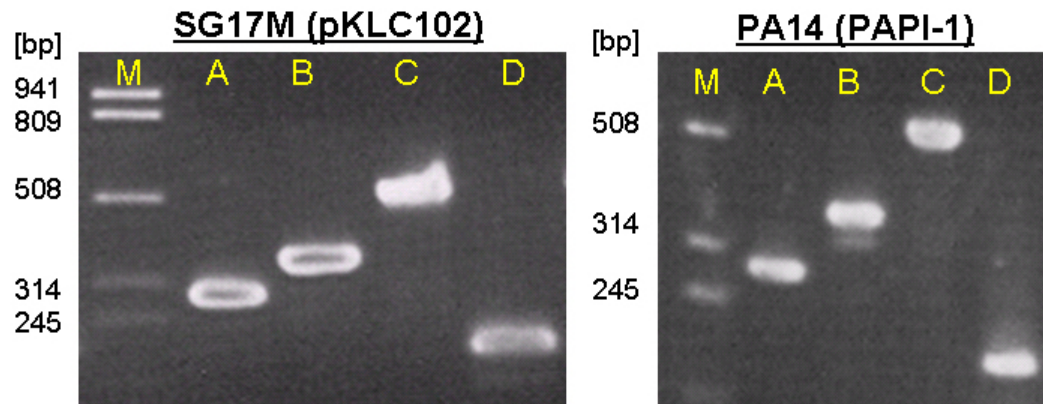
**Abbildung 3.2: Gelfoto der Negativkontrollen PAO1 und C5 der PCR zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninseln pKLC102 und PAPI-1**



Die Spuren A – D bezeichnen die jeweils erwarteten PCR – Produkte für  
**A: linke Integrationsseite; B: rechte Integrationsseite; C: freies Plasmid; D:  $tRNA^{Lys}$  ohne integrierte Geninsel; M: Größenstandard**

In Abbildung 3.3 ist das Ergebniss der Analysen für pKLC102 (Stamm SG17M) und PAPI – 1 (Stamm PA14) dargestellt. In beiden Stämmen wurde ein PCR - Produkt für die linke und rechte Integrationsstelle von pKLC102 / PAPI – 1 im Genom detektiert. Ebenso wiesen beide Stämme eine episomale Variante der Geninsel auf und es konnte, wie bei DNA der beiden Negativkontrollen PAO1 und C5,  $tRNA^{Lys}$  ohne integrierte Geninsel detektiert werden. Dies zeigt, dass pKLC102 sowie PAPI – 1 reversibel als Genominsel in das Genom der Bakterien integrieren, und auch als freies Plasmid in den jeweiligen Stämmen existieren. Das Produkt D zeigt für beide Stämme, dass die Geninseln in der Lage sind, sich wieder aus dem Genom auszuschneiden.

**Abbildung 3.3: Gelfoto der Produkte der PCR zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninseln pKLC102 und PAPI-1 für die Stämme SG17M und PA14**



Die Spuren bezeichnen die jeweils erwarteten PCR – Produkte für A: linke Integrationsseite; B: rechte Integrationsseite; C: freies Plasmid; D: tRNA<sup>Lys</sup> ohne integrierte Geninsel; M: Größenstandard

### 3.1.2 Quantifizierung des Vorkommens der verschiedenen Formen von pKLC102 und PAPI-1

pKLC102 und PAPI – 1 kommen in den jeweiligen Bakterienstämmen als reversibel integrierte Geninsel und als Plasmid vor. Um eine Aussage über die relativen Mengen an episomalem Plasmid und insel-freiem Genom treffen zu können, wurden diese durch PCR – Reaktionen quantifiziert.

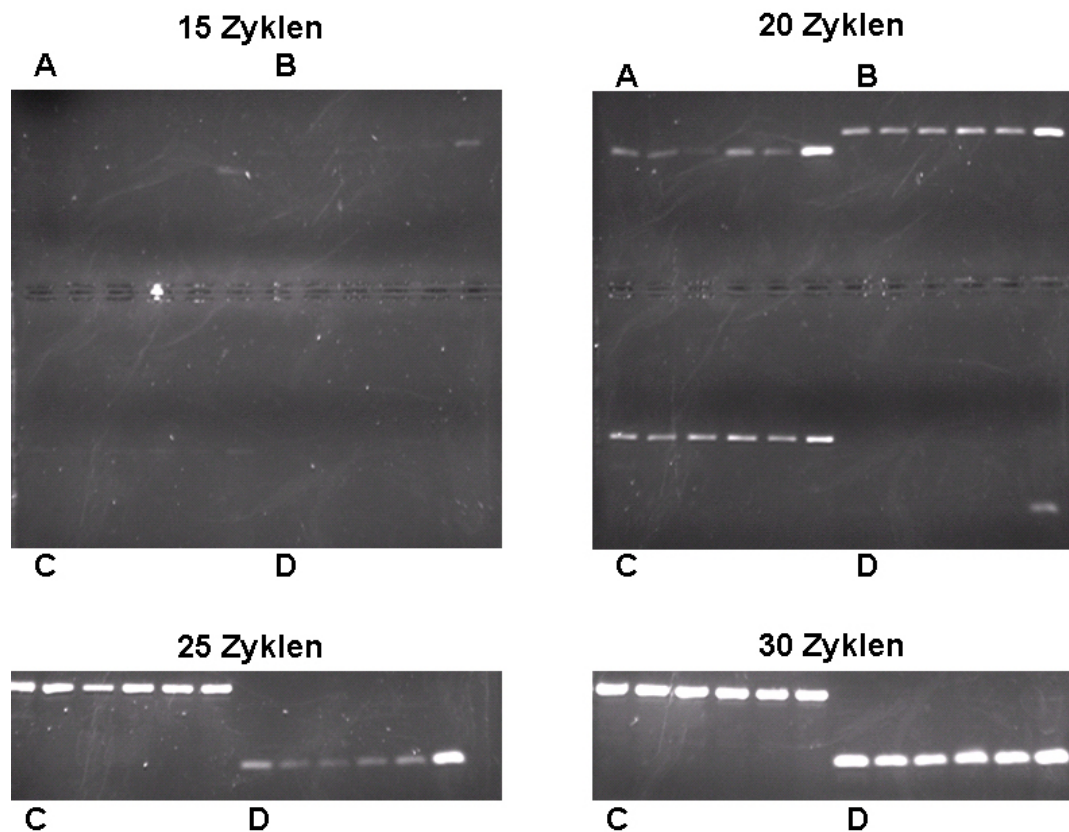
LB – Medium wurde mit Aliquots von Übernachtskulturen der Stämme SG17M und PA14 inokuliert. Zu bestimmten Zeitpunkten zwischen früher exponentieller ( $OD_{578nm} = 0,9$ ) und spätstationärer Wachstumsphase (nach einem Tag Wachstum) wurden Proben entnommen. Aus diesen Proben wurde bakterielle DNA isoliert und eine PCR mit den in Kapitel 3.1 beschriebenen Primern durchgeführt. Zu bestimmten Zyklenzahlen (siehe Abbildungen 3.4 – 3.6) wurde dem PCR – Ansatz nun ein 5µl Aliquot entnommen, per Gelelektrophorese aufgetrennt und das entsprechende Gel mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die relativen Mengen an episomaler DNA und geninselfreiem Genom wurden bestimmt, indem die Reaktionszyklen miteinander verglichen wurden, in denen die jeweiligen Banden zuerst sichtbar wurden. Als Grundlage hierfür dienten die Bandenintensitäten der PCR - Produkte der linken und rechten Bruchpunkte der ins Genom inserierten Insel. Die relativen

Mengen der Template – DNA  $N_i$  und  $N_j$  konnten nun mit Hilfe der Gleichung  $N_i / N_j = (1+R)^{n(j)-n(i)}$  bestimmt werden. R steht in dieser Gleichung für die Effizienz der Thermocycler während der exponentiellen Phase. Sie liegt für das verwendete Gerät bei  $R = 0.78 \pm 0.2$  für PCR – Produkte zwischen 100 bp und 800 bp und während eines Intervalls zwischen den Reaktionszyklen 10 und 35 (Hoof et al., 1991; Bremer et al., 1992).

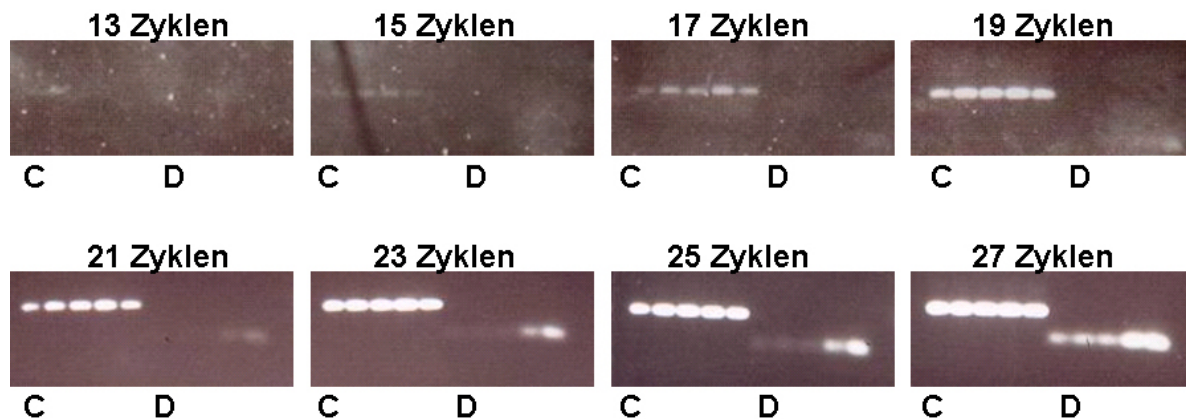
Für den Stamm SG17M wurden während des fünfzehnten, zwanzigsten, fünfundzwanzigsten und dreißigsten Reaktionszyklus Aliquots entnommen (siehe Abbildung 3.4). Anhand dieser Zyklenabstände war für diesen Stamm aber keine exakte Quantifizierung möglich. Aus diesem Grund wurde die PCR mit der Entnahme von Aliquots in geringeren Zyklusabständen (siehe Abbildung 3.5) wiederholt.

**Abbildung 3.4: PCR zur Quantifizierung der Menge an episomalen Plasmid sowie geninselfreier tRNA<sup>Lys</sup> im Stamm SG17M**



**Kombinatorische PCR der integrierten und episomalen Variante der Geninsel pKLC102 im Stamm SG17M. Während der Wachstumsphasen wurden Proben bei einer  $OD_{578nm}$  von (von links nach rechts) 0,9; 1,3; 2,0; 2,9; 4,0 und nach 24 Stunden entnommen. Ins Chromosom integrierte Geninseln wurden durch Produkte detektiert, welche die 5' tRNA (A) oder die 3' tRNA - Integrationspunkte umspannten. Die episomalen Varianten (C) wurden anhand von PCR Produkten identifiziert, welche die Plasmidbruchpunkte umfassten, geninselfreies Genom (D) durch Primer, die die tRNA<sup>Lys</sup> Region umspannten.**

**Abbildung 3.5: PCR zur Quantifizierung der Menge an episomalen Plasmid sowie geninselfreier tRNA<sup>Lys</sup> im Stamm SG17M**



Kombinatorische PCR der integrierten und episomalen Variante der Geninsel pKLC102 im Stamm SG17M. Während der Wachstumsphasen wurden Proben bei einer OD<sub>578nm</sub> von (von links nach rechts) 0,9; 1,3; 2,0; 4,0 und nach 24 Stunden entnommen. Die episomalen Varianten (C) wurden anhand von PCR Produkten identifiziert, welche die Plasmidbruchpunkte umfassten, geninselfreies Genom (D) durch Primer, die die tRNA<sup>Lys</sup> Region umspannten.

**Tabelle 3.2: Quantifizierung der Mengen an freiem Plasmid und Genom ohne integrierte Geninsel für den Stamm SG17M**

Zeitpunkt der Entnahme der Bakterienkultur	$\Delta n^a$	Plasmide pro Zelle (C) <sup>c</sup>	$\Delta n^b$	inselfreies Chromosom (D) <sup>d</sup>
OD <sub>578nm</sub> 0,9	6	30	6-7	2-3%
OD <sub>578nm</sub> 1,3	6	30	6-7	2-3%
OD <sub>578nm</sub> 2,0	6	30	6-7	2-3%
OD <sub>578nm</sub> 4,0	6	30	6	3%
24 h <sup>e</sup>	2	3	4	10%

<sup>a</sup>Zyklusdifferenz zwischen den Referenzintensitäten und den Bandenintensitäten für die Zahl an freiem Plasmid pro Zelle

<sup>b</sup>Zyklusdifferenz zwischen den Referenzintensitäten und den Bandenintensitäten für den prozentualen Anteil an inselfreiem Genom

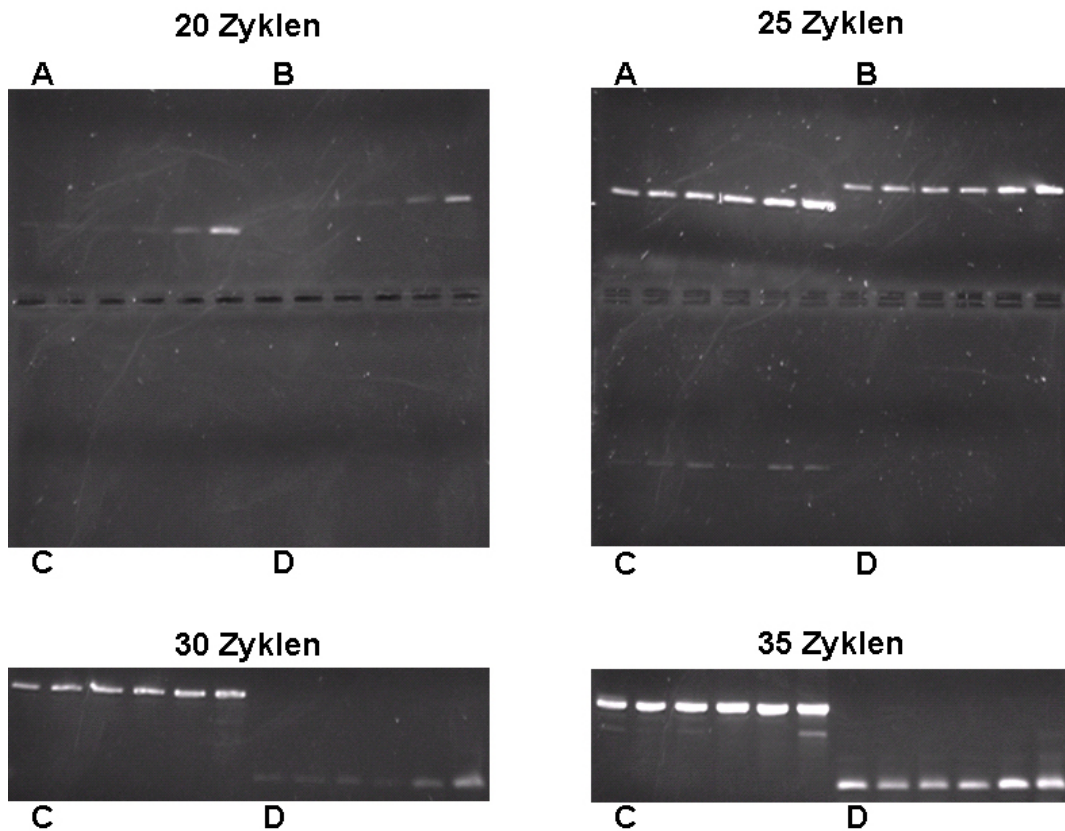
<sup>c, d</sup> gewählte PCR für diesen Nachweis

<sup>e</sup> nach 24 Stunden Wachstum (Zelldichte nicht gemessen)

Die Kopienzahl an freiem Plasmid pKLC102 im Stamm SG17M lag bei 30 Plasmiden pro Zelle und nahm in der spätexponentiellen auf drei ab (s. Abbildung 3.4 und 3.5 sowie Tabelle 3.2). Parallel hierzu fand ein Verlust der Geninsel während der Wachstumsphasen statt. In der frühlogarithmischen Phase wiesen nur 2-3% der Bakterien ein geninselfreies Chromosom auf, wohingegen sich dieser Anteil in der spätexponentiellen Phase auf 10% erhöhte. Die Exzisionsrate für den spontanen Verlust der Geninsel beträgt also mindestens  $1 \times 10^{-1}$ .



**Abbildung 3.6: PCR zur Quantifizierung der Menge an episomalen Plasmid sowie geninselfreier tRNA<sup>Lys</sup> im Stamm PA14**



Kombinatorische PCR der integrierten und episomalen Variante der Geninsel PAPI - 1 im Stamm PA14. Während der Wachstumsphasen wurden Proben bei einer OD<sub>578nm</sub> von (von links nach rechts) 0,9; 1,3; 2,0; 2,9; 4,0 und nach 24 Stunden entnommen. Ins Chromosom integrierte Geninseln wurden durch Produkte detektiert, welche die 5' tRNA (A) oder die 3' tRNA – Integrationspunkte (B) umspannten. Die episomalen Varianten (C) wurden anhand von PCR Produkten identifiziert, welche die Plasmidbruchpunkte umfassten, geninselfreies Genom (D) durch Primer, die die tRNA<sup>Lys</sup> Region umspannten.

**Tabelle 3.3: Quantifizierung der Mengen an freiem Plasmid und Genom ohne integrierte Geninsel für den Stamm PA14**

Zeitpunkt der Entnahme der Bakterienkultur	$\Delta n^a$	Plasmid pro Zelle (C) <sup>c</sup>	$\Delta n^b$	inselfreies Chromosom (D) <sup>d</sup>
OD <sub>578nm</sub> 0,9	7	2%	8 – 10	0,3% - 1%
OD <sub>578nm</sub> 1,3	7	2%	8 – 10	0,3% - 1%
OD <sub>578nm</sub> 2,0	7	2%	8 – 10	0,3% - 1%
OD <sub>578nm</sub> 2,9	7	2%	8 – 10	0,3% - 1%
OD <sub>578nm</sub> 4,0	7	2%	8 - 10	0,3% - 1%
24 h <sup>e</sup>	7	2%	8 - 10	0,3% - 1%

<sup>a</sup>Zyklusdifferenz zwischen den Referenzintensitäten und den Bandenintensitäten für die Zahl an freiem Plasmid pro Zelle

<sup>b</sup> Zyklusdifferenz zwischen den Referenzintensitäten und den Bandenintensitäten für den prozentualen Anteil an inselfreiem Genom  
<sup>c, d</sup> gewählte Primerkombinationen für diesen Nachweis  
<sup>e</sup> nach 24 Stunden Wachstum (Zelldichte nicht gemessen)

Die Geninsel PAPI-1 lag im Stamm PA14 in allen untersuchten Wachstumsphasen in nur ca. 2% der Bakterien als zirkuläres Plasmid vor. Geninselfreies Chromosom wurde in nur ca. 0,3% bis 1% der untersuchten Stämme detektiert. Die Exzisionsrate lag für die Geninsel PAPI – 1 bei mindestens  $0,3 \times 10^{-3}$  (s. Abbildung 3.6 und Tabelle 3.3).

Die Exzisionswerte für Pathogenitätsinseln diesbezüglich analysierter Enterobakterien liegen zwischen Werten von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  (Rajanna et al., 2003; Sakellaris et al., 2004; Lesic et al., 2004). pKLC102 und PAPI-1 weisen damit eine 1000 und 10 - fach höhere Exzisionsrate auf als bisher für Geninseln bekannt ist.

pKLC102 und PAPI-1 codieren für verschiedene Gene, die bei der Mobilität dieser Inseln eine Rolle spielen könnten. So sind in beiden ein *xerC* - Integrasegen, ein Pilin – Operon, welches für Sex-Pili codiert, und verschiedene plasmidspezifische Gene konserviert. Sie könnten die Ursache für die Mobilität dieser Inseln darstellen und nach dem Ausschneiden aus dem Chromosom die Bildung einer stabilen zirkulären Form ermöglichen. Die Zahl an episomalen Elementen für PAPI-1 und pKLC102 ist jedoch stark unterschiedlich. Demnach ist anzunehmen, dass nur ein geringer Teil der PA14 Bakterien ein PAPI-1 Plasmid besitzt und dieser den Phänotyp der PA14 Population nur in geringem Maße beeinflusst. Im Gegensatz dazu liegt pKLC102 in SG17M in einer deutlich höheren Kopienzahl vor. Diese ist sogar höher als die Zahl der im Genom integrierten Form der Insel. Dies ist ein Beweis dafür, dass pKLC102 in den Bakterien als Plasmid repliziert wird.

Die vorhandenen Plasmidgene sind anscheinend dafür verantwortlich, dass pKLC102 die höchste bisher bekannte Mobilität einer Geninsel aufweist.

Während der Wachstumsphasen nahm die Zahl an geninselfreiem Chromosom immer stärker zu. Da parallel dazu auch die Zahl der detektierten freien Plasmide abnahm, scheint pKLC102 für Bakterien in der spätstationären Phase eine geringere Rolle zu spielen, als für solche, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden.

Im Gegensatz dazu bleibt die Zahl der integrierten Geninseln im Stamm PA14 über sämtliche untersuchte Wachstumsphasen konstant. Eine Erklärung hierfür ist bisher noch nicht bekannt. Eine mögliche Ursache könnten die stammspezifischen „Cargo“ – Regionen dieser beiden Geninseln sein. PAPI – 1 codiert u.a. für sieben weitere Virulenzfaktoren, zu denen keine

homologen Sequenzen in pKLC102 detektiert wurden. Diese könnten möglicherweise den Verbleib von PAPI – 1 im Bakteriengenom begünstigen.

PAPI-1 und speziell pKLC102 weisen somit kombinierte Eigenschaften eines mobilen genetischen Elements und einer Geninsel auf, die auf eine schon postulierte Herkunft aus Phagen und Plasmiden schließen läßt (Klockgether et al., 2006a).

### **3.2 pKLC102 - verwandte Geninseln in sequenzierten *P. aeruginosa* Stämmen**

Die mobile Geninsel pKLC102 und pKLC102 verwandte – Elemente wurden in verschiedenen *P. aeruginosa* Isolaten detektiert (Kiewitz et al., 2000; He et al., 2004; Klockgether et al., 2004). In Klon C Stämmen wurde pKLC102 als zirkuläres Element sowie als ins Genom integrierte Geninsel detektiert. Dies traf ebenfalls für die hochverwandte Pathogenitätsinsel PAPI - 1 des Stammes PA14 zu (siehe Kapitel 3.1 und Einleitung). Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere pKLC102 – verwandte Geninseln in vielen weiteren untersuchten Isolaten detektiert (siehe Kapitel 3.3).

#### **3.2.1 Neue sequenzierte *P. aeruginosa* Isolate**

Im Jahr 2006 wurden die Genomsequenzen vier weiterer *P. aeruginosa* Stämme veröffentlicht. Anhand der im Internet zugänglichen Genomsequenzen wurden diese Stämme auf die Präsenz von pKLC102 – verwandten Geninseln in ihrem Genom analysiert.

Als Integrationspunkt für pKLC102 im Genom diente das tRNA<sup>Lys</sup> – Gen (PA4541.1) in der Nähe des *pilA* – Gens (Klockgether et al., 2004). Untersuchungen von Kiewitz et al. (2000) ergaben, dass das Plasmid pKLC106, welches eine enge Verwandtschaft zu pKLC102 aufweist, auch im zweiten vorkommenden tRNA<sup>Lys</sup> - Gen (PA0976.1) in der Nähe der *oprL-phnAB* Region reversibel ins Genom integrieren kann. Aus diesem Grund wurden beide Regionen auf pKLC102 – verwandte Elemente untersucht.

An diesen Positionen detektierte Geninseln wurden durch Sequenzvergleich auf die Präsenz der einzelnen für pKLC102 annotierten ORFs analysiert.

#### **3.2.2 Vergleich pKLC102 – ähnlicher Geninseln in den sequenzierten *P. aeruginosa* Stämmen**

In allen analysierten Gensequenzen wurde eine pKLC102 – verwandte Geninsel entdeckt (siehe Tabelle 3.4). Der Insertionspunkt im Genom war in drei Stämmen (C3719, PACS2, 2192) , wie für pKLC102 und PAPI-1, das tRNA<sup>Lys</sup> - Gen PA4541.1. Die lokalisierten Geninseln hatten dabei eine Größe von 81,121 bis 106,457 kb. Die im Stamm PA7 inserierte Geninsel inserierte, wie das in Klon K gefundene Plasmid pKLC106 (Kiewitz et al., 2000), in das tRNA<sup>Lys</sup> – Gen PA0976.1.



Alle vier detektierten Geninseln besaßen eine zu pKLC102 identische *attP* – Sequenz mit einem *soj* Gen (codiert für ein Protein zur Chromosomaufteilung) an einem Ende der Insel sowie einem *xerC* – Integrase Gen (codiert für eine phagenähnliche Integrase) am anderen Ende. Ebenfalls auffällig war, dass die Abfolge der konservierten ORFs im Gencontig in allen gefundenen Inseln identisch war.

Sequenzvergleiche mit den für pKLC102 annotierten ORFs ergaben Sequenzvariationen von 75% (in Stamm C3719) bis 98% in Stamm PACS2. Ein DNA – Abschnitt der analysierten Sequenz wurde dabei als Homolog bezeichnet, wenn der Sequenzvergleich mit dem jeweiligen pKLC102 ORF eine Ähnlichkeit von über 70% aufwies.

Aufgrund der ebenfalls detektierten Insertionen und Deletionen (siehe Abbildung 3.7) differierten die entdeckten Geninseln in ihrer Größe im Vergleich zu pKLC102. Die Geninsel mit der stärksten Ähnlichkeit zu pKLC102 wurde im Stamm PACS2 entdeckt. Hier wiesen 68 der 98 pKLC102 homologen ORFs eine Sequenzidentität von 100% auf. Die Geninsel im Stamm PA7 wies hingegen oft Insertionen und Deletionen in den einzelnen ORFs auf.

In den jeweiligen Geninseln sind, wie in Abbildung 3.7 dargestellt, spezifische DNA – Blöcke vorhanden, die in pKLC102 fehlen.

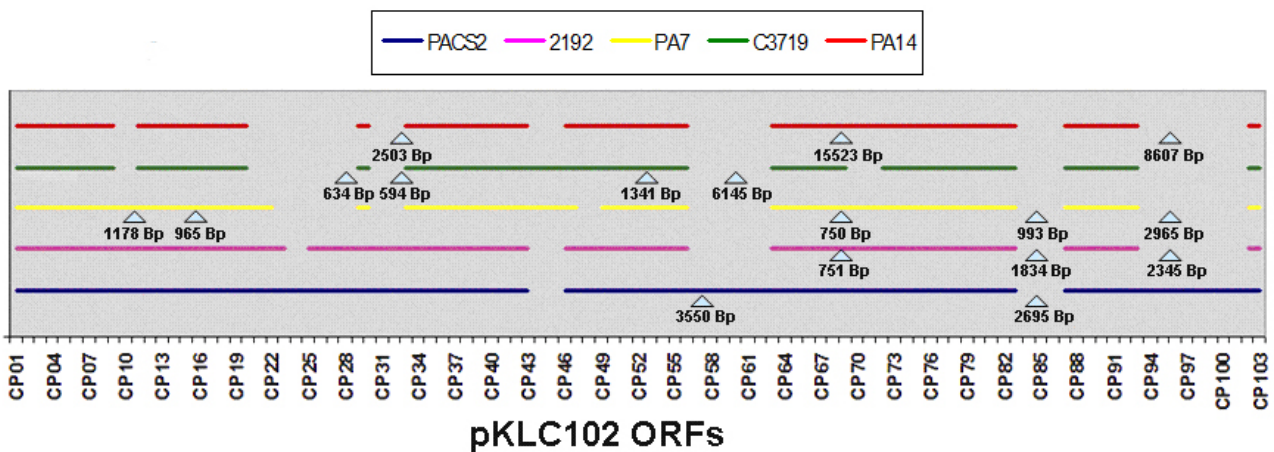
Auffällig hierbei ist, dass die deletierten bzw. nicht vorhandenen DNA – Abschnitte immer zwischen bestimmten ORFs zu finden sind. So scheint es sich bei den Regionen zwischen den ORFs CP22 – CP27, CP30 – CP33, CP43 – CP46, CP56 – CP63, CP83 – CP87, sowie CP93 – CP102 um variable Regionen zu handeln, in denen stammspezifische variable – Sequenzen, sog. „Cargo“, zu finden sind. Es gibt in vergleichbarer Anordnung eine konservierte Gerüststruktur, die an bestimmten Stellen von variablen Regionen unterbrochen ist, in denen es sehr häufig zu Deletionen oder Insertionen von DNA – Abschnitten kommen kann.

pKLC102 und die in diesem Kapitel analysierten Elemente weisen hiermit im Gegensatz zu den anderen beiden in *P.aeruginosa* vorkommenden mit tRNA<sup>Gly</sup> – assoziierten Geninseln PAGI – 2 und PAGI – 3 eine verstärkte mosaikartige Struktur auf (siehe auch Einleitung und Kapitel 4.2).

**Tabelle 3.4: Allgemeine Charakteristika der vier neu sequenzierten *P. aeruginosa* Stämme und der pKLC102 – verwandten Geninseln**

Name	C3719	PACS2	2192	PA7	PA7
Herkunft	Isolat, Manchester	Klinikisolat, Washington	CF – Isolat, Boston	Klinikisolat, Buenos Aires	
Genomgröße [Mb]	6,147	6,492	6,823	6,663	
GC – Gehalt des Genoms	66,5%	66,3%	66,2%	66,4%	
Protein– kodierende Sequenzen	5650	5676	6157	5815	
Größe der pKLC102 verwandt. Inseln [bp]	81.121	106.457	85.108	85.554	
pKLC102 homologe ORFs	75 /103	98 / 103	83 / 103	78 / 103	
Sequenzähnlichkeit der pKLC102 homologen ORFs	90% - 100%	92% - 100%	92% - 100%	80% - 99%	
Genbank Nummer	AAKV00000000	AAQW00000000	AAKW00000000	AAQE00000000	

**Abbildung 3.7: Vergleich der Geninseln der Stämme PACS2, 2192, PA7, C3719 und PA14 mit pKLC102**



Die X – Achse repräsentiert die 103 pKLC102 ORFs, die Homologen in den detektierten Geninseln werden durch farbige Linien dargestellt (s. Legende). Lücken in den jeweiligen Linien symbolisieren Deletionen; Insertionen werden durch Dreiecke dargestellt.

### Gene für Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA

Mindestens 20 der 103 pKLC102 ORFs codieren vermutlich für Proteine, die bei Konjugation, Rekombination und dem Transfer von DNA beteiligt sind. Als Beispiele hierfür gibt es ein *Soj* – Protein zur Chromosomenaufteilung (CP1), vier putative Helikasen (CP9, CP30, CP56, CP69), ein DNA – Einzelstrang – bindendes Protein *Ssb* (CP22), eine Topoisomerase *TopA* (CP27), einen Block von Pilin – Genen (*pill* – *pilM*, CP33 – CP42) und zwei Phagen - ähnliche Integrasen (CP62a, CP103a) (Klockgether et al., 2004). In Abbildung 3.8 ist ein Vergleich der Geninselsequenzen aller untersuchten pKLC102 homologen ORFs dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass alle oben erwähnten ORFs auch in den Geninseln der neu sequenzierten Isolate sowie in PAPI-1 konserviert sind. Die Sequenzidentität der konservierten ORFs liegt hierbei zwischen 81% und 100%. Die ORFs, die eine Rolle bei der Konjugation, Rekombination und dem Transfer der Geninseln spielen könnten, sind orangefarben dargestellt.

### Potentielle Virulenzfaktoren

Mutationsanalysen verschiedener Gene der Pathogenitätsinsel PAPI-1 des Stammes PA14 haben ergeben, dass in PAPI-1 mindestens 19 ORFs existieren, die für die Virulenz im Maus- und Pflanzenmodell eine Rolle spielen (He et al., 2004). 12 dieser potentiellen Virulenz – ORFs sind mit hoher Homologie auch in pKLC102 zu finden. In Abbildung 3.9 ist die Konservierung dieser ORFs in den neu entdeckten Geninseln dargestellt. Aus ihr geht hervor, dass alle potentiellen Virulenz – ORFs in den dargestellten Geninseln konserviert sind. Die einzige Ausnahme bildet das nicht vorhandene CP70 Homolog im Stamm C3719. Die Sequenzhomologie der konservierten ORFs reicht von 86% bis 100%.

### **3.2.3 Konservierung der TAGI – Sequenzen in pKLC102 ähnlichen Geninseln**

TAGI wird als Abkürzung für  $tRNA^{Lys}$  – associated genomic island repeat (abgekürzte Buchstaben sind unterstrichen) verwendet (Kulasekara et al., 2006). Diese wurden zuerst als 20 bp lange flankierende Elemente der ExoU – Inseln verschiedener *P. aeruginosa* Stämme entdeckt. Verschiedene Varianten sind im  $tRNA^{Lys}$  – Gen des PAO1 homologen ORFs PA0976.1 inseriert. Es wird spekuliert, ob diese Sequenzen ein zusätzliches Element darstellen, welches eine Rolle bei der Integration bzw. dem Entfernen der Geninseln aus dem Chromosom spielt (Kulasekara et al., 2006).

Name des Gens	pKLC102	PACS2	2192	PA7	C3719	PAPI-1								
<i>int xerC</i>	CP103	*	*	*	*	*								
	CP102	*	*	*	*	*								
	CP101	*												
	CP100	*												
	CP99	*												
	CP98	*												
	CP97	*												
<i>chsE</i>	CP96	*												
	CP95	*												
	CP94	*												
	CP93	*	*	*	*	*								
	CP92	*	*	*	*	*								
	CP91	*	*	*	*	*								
	CP90	*	*	*	*	*								
<i>cheF</i>	CP89	*	*	*	*	*								
	CP88	*	*	*	*	*								
	CP87	*	*	*	*	*								
	CP86	*												
	CP85	*												
	CP84	*												
	CP83	*	*	*	*	*								
CP82	*	*	*	*	*									
CP81	*	*	*	*	*									
CP80	*	*	*	*	*									
CP79	*	*	*	*	*									
CP78	*	*	*	*	*									
CP77	*	*	*	*	*									
CP76	*	*	*	*	*									
CP75	*	*	*	*	*									
CP74	*	*	*	*	*									
CP73	*	*	*	*	*									
CP72	*	*	*	*	*									
CP71	*	*	*	*	*									
CP70	*	*	*	*	*									
CP69	*	*	*	*	*									
CP68	*	*	*	*	*									
CP67	*	*	*	*	*									
CP66	*	*	*	*	*									
CP65	*	*	*	*	*									
CP64	*	*	*	*	*									
CP63	*	*	*	*	*									
CP62	*													
CP61	*													
CP60	*													
CP59	*													
CP58	*													
CP57	*													
CP56	*	*	*	*	*									
CP55	*	*	*	*	*									
CP54	*	*	*	*	*									
CP53	*	*	*	*	*									
CP52	*	*	*	*	*									
CP51	*	*	*	*	*									
CP50	*	*	*	*	*									
CP49	*	*	*	*	*									
CP48	*	*	*	*	*									
CP47	*	*	*	*	*									
CP46	*	*	*	*	*									
CP45	*	*	*	*	*									
CP44	*	*	*	*	*									
CP43	*	*	*	*	*									
<i>pilM</i>	CP42	*	*	*	*	*								
	<i>pilY</i>	CP41	*	*	*	*	*							
		<i>pilI</i>	CP40	*	*	*	*	*						
			<i>pilS</i>	CP39	*	*	*	*	*					
				<i>pilF</i>	CP38	*	*	*	*	*				
					<i>pilQ</i>	CP37	*	*	*	*	*			
						<i>pilP</i>	CP36	*	*	*	*	*		
							<i>pilG</i>	CP35	*	*	*	*	*	
								<i>pilN</i>	CP34	*	*	*	*	*
									<i>pilL</i>	CP33	*	*	*	*
CP32										*	*			
CP31	*									*				
CP30	*	*								*	*	*		
<i>cspA</i>	CP29	*	*							*	*	*		
	<i>topA</i>	CP28	*	*						*	*	*		
		CP27	*	*	*					*	*			
		CP26	*	*										
		CP25	*	*										
CP24		*	*											
<i>ssb</i>	CP23	*	*											
	CP22	*	*	*	*	*								
	CP21	*	*	*	*	*								
	CP20	*	*	*	*	*								
	CP19	*	*	*	*	*								
	CP18	*	*	*	*	*								
	CP17	*	*	*	*	*								
	CP16	*	*	*	*	*								
	CP15	*	*	*	*	*								
	CP14	*	*	*	*	*								
CP13	*	*	*	*	*									
CP12	*	*	*	*	*									
CP11	*	*	*	*	*									
CP10	*	*	*	*	*									
<i>dnaE</i>	CP9	*	*	*	*	*								
	CP8	*	*	*	*	*								
	CP7	*	*	*	*	*								
	CP6	*	*	*	*	*								
	CP5	*	*	*	*	*								
	CP4	*	*	*	*	*								
CP3	*	*	*	*	*									
CP2	*	*	*	*	*									
<i>soj</i>	CP1	*	*	*	*	*								

Abb. 3.8: pKLC102 ORFs und deren Homologe in anderen konservierten Geninseln

Durch einen Stern gekennzeichnet sind homologe ORFs der beschriebenen Geninselsequenzen. Orange unterlegte Bereiche bezeichnen potentielle pKLC102 ORFs, die für Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA eine Rolle spielen könnten.

Name des Gens	pKLC102	PACS2	2192	PA7	C3719	PAPI-1
<i>int verC</i>	CP103	*	*	*	*	*
	CP102	*	*	*	*	*
	CP101	*				
	CP100	*				
	CP99	*				
	CP98	*				
<i>chsE</i>	CP97	*				
	CP96	*				
	CP95	*				
	CP94	*				
	CP93	*	*	*	*	*
	CP92	*	*	*	*	*
<i>cheF</i>	CP91	*	*	*	*	*
	CP90	*	*	*	*	*
	CP89	*	*	*	*	*
	CP88	*	*	*	*	*
	CP87	*	*	*	*	*
	CP86	*				
<i>cheR</i>	CP85	*				
	CP84	*				
	CP83	*	*	*	*	*
	CP82	*	*	*	*	*
	CP81	*	*	*	*	*
	CP80	*	*	*	*	*
	CP79	*	*	*	*	*
	CP78	*	*	*	*	*
	CP77	*	*	*	*	*
	CP76	*	*	*	*	*
	CP75	*	*	*	*	*
	CP74	*	*	*	*	*
	CP73	*	*	*	*	*
	CP72	*	*	*	*	*
	CP71	*	*	*	*	*
	CP70	*	*	*	*	*
	CP69	*	*	*	*	*
	CP68	*	*	*	*	*
	CP67	*	*	*	*	*
	CP66	*	*	*	*	*
CP65	*	*	*	*	*	
CP64	*	*	*	*	*	
CP63	*	*	*	*	*	
CP62	*					
CP61	*					
CP60	*					
CP59	*					
CP58	*					
CP57	*					
CP56	*	*	*	*	*	
CP55	*	*	*	*	*	
CP54	*	*	*	*	*	
CP53	*	*	*	*	*	
CP52	*	*	*	*	*	
CP51	*	*	*	*	*	
CP50	*	*	*	*	*	
CP49	*	*	*	*	*	
CP48	*	*	*	*	*	
CP47	*	*	*	*	*	
CP46	*	*	*	*	*	
CP45	*	*	*	*	*	
CP44	*	*	*	*	*	
CP43	*	*	*	*	*	
<i>pilM</i>	CP42	*	*	*	*	*
<i>pilY</i>	CP41	*	*	*	*	*
<i>pilI</i>	CP40	*	*	*	*	*
<i>pilS</i>	CP39	*	*	*	*	*
<i>pilF</i>	CP38	*	*	*	*	*
<i>pilQ</i>	CP37	*	*	*	*	*
<i>pilP</i>	CP36	*	*	*	*	*
<i>pilO</i>	CP35	*	*	*	*	*
<i>pilN</i>	CP34	*	*	*	*	*
<i>pilL</i>	CP33	*	*	*	*	*
CP32	*	*	*	*	*	*
CP31	*	*	*	*	*	*
CP30	*	*	*	*	*	*
CP29	*	*	*	*	*	*
<i>cspA</i>	CP28	*	*	*	*	*
<i>topA</i>	CP27	*	*	*	*	*
CP26	*	*	*	*	*	*
CP25	*	*	*	*	*	*
CP24	*	*	*	*	*	*
CP23	*	*	*	*	*	*
<i>ssb</i>	CP22	*	*	*	*	*
CP21	*	*	*	*	*	*
CP20	*	*	*	*	*	*
CP19	*	*	*	*	*	*
CP18	*	*	*	*	*	*
CP17	*	*	*	*	*	*
CP16	*	*	*	*	*	*
CP15	*	*	*	*	*	*
CP14	*	*	*	*	*	*
CP13	*	*	*	*	*	*
CP12	*	*	*	*	*	*
CP11	*	*	*	*	*	*
CP10	*	*	*	*	*	*
<i>dnaE</i>	CP9	*	*	*	*	*
CP8	*	*	*	*	*	*
CP7	*	*	*	*	*	*
CP6	*	*	*	*	*	*
CP5	*	*	*	*	*	*
CP4	*	*	*	*	*	*
CP3	*	*	*	*	*	*
CP2	*	*	*	*	*	*
<i>soj</i>	CP1	*	*	*	*	*

Abb. 3.9: pKLC102 ORFs und deren Homologe in anderen konservierten Geninseln

Durch einen Stern gekennzeichnet sind homologe ORFs der beschriebenen Geninselsequenzen. Gelb unterlegte Bereiche bezeichnen pKLC102 ORFs, die laut He et al. (2004) potentielle Virulenzfaktoren darstellen könnten.

Nahezu identische Sequenzen wurden bei den Geninseln pKLC102 und PAPI-1 entdeckt, welche aber nicht für ExoU, einen starken Virulenzfaktor, kodieren. Ein Vergleich der TAGI – Sequenzen (siehe Abbildung 3.10) von ExoU – Inseln mit denen von pKLC102 – verwandten Inseln zeigt, dass die Sequenzen nicht vollständig konserviert sind. Im rechten TAGI repeat kommt es bei den pKLC102 – verwandten Inseln zu einem Basenpaaraustausch von CT nach TC.

In pKLC102 und PAPI-1 befinden sich diese repetitiven Sequenzen (repeats) 125 bp abwärts des tRNA<sup>Lys</sup> Gens neben dem zu PAO1 homologen ORF PA4542 und am anderen Ende der Insel 28 bp abwärts des verkürzten tRNA<sup>Lys</sup> Gens in der Nähe des zu PAO1 homologen ORFs PA4541.

Diese TAGI – Sequenzen wurden bei allen untersuchten Stämmen mit 100% Sequenzidentität entdeckt. Eine Ausnahme stellte der Stamm PA7 dar, in dem lediglich eine TAGI – Sequenz 125 bp abwärts des tRNA<sup>Lys</sup> Gens des PAO1 homologen ORFs PA0976.1 gefunden wurde. Die zweite repetitive Sequenz fehlte. Dies könnte bedeuten, dass die Funktionalität der TAGI – Sequenzen, sofern es eine gibt, in diesem Fall nicht mehr gewährleistet ist.

Die Präsenz dieser *repeats* ist ein weiterer Beweis für die Entwicklung dieser Geninseln aus einem gemeinsamen Vorläufer (Kulasekara et al., 2006). Die Bedeutung des Basenpaaraustauschs bleibt allerdings unklar.

**Abbildung 3.10: Vergleich der TAGI – Elemente sechs verschiedener pKLC102 – ähnlicher Geninseln**

AGGTGGGCTTTTCTGTTTCT	<b>PAPI-1 linker repeat</b>
AGGTGGGCTTTTCTGTTTCT	<b>pKLC102 linker repeat</b>
AGGTGGGCTTTTCTGTTTCT	<b>PA2192 linker repeat</b>
AGGTGGGCTTTTCTGTTTCT	<b>C3719 linker repeat</b>
AGGTGGGCTTTTCTGTTTCT	<b>PACS2 linker repeat</b>
AGGTGGGCTTTTCTGTTTCT	<b>PA7 linker repeat</b>
AGGTGGGCTTTTTCGTTTCT	<b>PAPI-1 rechter repeat</b>
AGGTGGGCTTTTTCGTTTCT	<b>pKLC102 rechter repeat</b>
AGGTGGGCTTTTTCGTTTCT	<b>PA2192 rechter repeat</b>
AGGTGGGCTTTTTCGTTTCT	<b>C3719 rechter repeat</b>
AGGTGGGCTTTTTCGTTTCT	<b>PACS2 rechter repeat</b>

Unterschiede in den Sequenzen der dargestellten *repeats* sind grau unterlegt

### **3.2.4 Konservierung von CP1 (*soj*) und CP103a (*xerC integrase*) in pKLC102 – ähnlichen Geninseln**

Das erste neben der *attP* - Sequenz in pKLC102 codierte putative Protein ist das *Soj* – Protein (CP1). Es gehört zu einer konservierten Familie von Proteinen, die für eine effiziente Plasmid- und Chromosomenaufteilung in vielen verschiedenen Bakterienspezies benötigt werden (Lee und Grossman, 2006). Es wird postuliert, dass es eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung der Eigenschaften von selbstständig replizierenden DNA - Elementen spielen könnte (Kulasekara et al., 2006).

Das durch den ORF neben der *attB* / tRNA<sup>Lys</sup> Integrationsstelle codierte Protein wurde als *XerC* – Integrase (CP103a) annotiert. Sie scheint die chromosomale Integration von pKLC102 nach einem Phagen – artigen Mechanismus zu katalysieren (Klockgether et al., 2004) und könnte auch für die Mobilisierung und Exzision des Elements eine bedeutende Rolle einnehmen.

Homologe zu CP1 und CP103 wurden in allen pKLC102 – verwandten Geninseln gefunden. Diese homologen ORFs wiesen 73% - 100% Sequenzidentität zu den pKLC102 – ORFs auf (siehe Tabelle 3.5). CP1 weist hierbei einen gering höheren Grad an Konservierung auf, als CP103.

Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei den untersuchten Elementen um hochhomologe pKLC102 – ähnliche Elemente handelt.

**Tabelle 3.5: Vergleich der CP1 (*soj*) und CP103 (*xerC integrase*) Sequenzen von pKLC102 mit den in den gefundenen pKLC102 homologen Geninseln**

Stamm	CP1 ( <i>soj</i> , 885 bp)			CP103 ( <i>xerC</i> , 1284 bp)		
	Identische bp	Lücken	E-Wert	Identische bp	Lücken	E-Wert
PACS2	885/885 (100%)	0/885 (0%)	0.0	1284/1284 (100%)	0/1284 (0%)	0.0
C3719	848/859 (98%)	0/859 (0%)	0.0	1177/1252 (94%)	0/1252 (0%)	0.0
2192	847/859 (92%)	0/859 (0%)	0.0	1202/1284 (93%)	3/1284 (0%)	0.0
PA14	834/898 (92%)	17/898 (1%)	0.0	1204/1284 (93)	0/1284 (0%)	0.0
PA7	803/861 (93%)	0/861 (0%)	0.0	706/956 (73%)	90/956 (9%)	1,00E-98

Die Spalte „Identische bp“ zeigt, wie viele Basenpaare des homologen ORFs dem ursprünglichen pKLC102 – ORF entsprechen. Die Spalte „Lücken“ zeigt, wie viele Basenpaare im jeweiligen Stamm fehlen. Der Ähnlichkeitswert „E“ in der dritten Spalte stellt den Erwartungsfaktor der Ähnlichkeit nach BlastN dar. Je niedriger dieser Wert ist, desto höher ist der Grad der Homologie, wobei 0 den höchsten Grad an Homologie darstellt.

### **3.2.5 Vergleich der *oriV* - Region zwischen pKLC102 und pKLC102 – artigen Inseln**

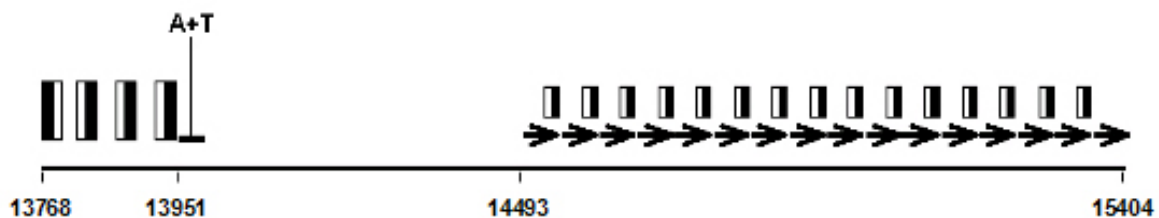
Der Bereich zwischen CP18 und CP19 wurde als möglicher Replikationsursprung *oriV* des Plasmids annotiert. In dieser Umgebung wurden ebenfalls Gene entdeckt, die typischerweise in der Nähe von Replikationsursprüngen in Plasmiden zu finden sind, z.B. *dnaB* (CP9), *ssb* (CP22) und *topA* (CP27) (Klockgether et al., 2004).

Die *oriV* - Region besteht im linken Teil aus vier Palindromen unterschiedlicher Länge, denen ein AT – reicher Abschnitt folgt. Die 15 bp lange Palindromsequenz, die in allen vier „loops“ eine Art Grundgerüst darstellt, ist **GTTCGGCATCCGAAC** (die komplementäre Sequenzen wurden jeweils unterstrichen). Die Länge der vier verschiedenen „loops“ variiert von 15 bis 27 bp.

Der rechte Teil des Replikationsursprungs besteht aus 16 hochkonservierten, sich wiederholenden Basenabfolgen (*direct repeats*) mit einer Länge von 57 bp. Alle *direct repeats* beginnen bzw. enden mit dem 19 bp Palindrom

5' - **GTGGTGCCAGTGGCACCAC** – 3' (die komplementären Basen wurden jeweils unterstrichen). (siehe Abbildung 3.11).

**Abbildung 3.11: Aufbau des Replikationsursprungs *oriV* in pKLC102**



Schwarz-weiße Kästen stellen Palindrome dar; die Pfeile repräsentieren 16 *direct repeats*. Die A + T-reiche Region ist durch einen schwarzen Balken angezeigt. Die Positionen innerhalb der pKLC102-Sequenz sind angegeben. (Abbildung aus Klockgether et al., 2004)

Abbildung 3.12 zeigt einen Vergleich des linken Teils des *oriV* mit den jeweils gefundenen Regionen in den pKLC102–verwandten Geninseln. Der *ori* des Genoms von PACS2 wies hierbei eine Sequenzidentität von 100% auf. Die Sequenzen der weiteren untersuchten Stämme zeigten in diesem Bereich ebenfalls eine sehr starke Ähnlichkeit zur *oriV* – Region von pKLC102 auf. Eine Abweichung, die in allen untersuchten Stämmen (außer PACS2) gefunden wurde, war ein Basenaustausch in der A + T-reichen Region. An Position 12 wird



ein Thymin durch Adenin ersetzt. Die restlichen 41 Basenpaare sind identisch. Hier sind die vier Palindromsequenzen der „loops“ ebenfalls hochkonserviert. Eine Auffälligkeit wies der Stamm PA2192 auf, in dessen *ori* – ähnlicher Region „loop“ Nummer zwei deletiert war.

**Abbildung 3.12: Vergleich des linken Bereichs der *oriV* Region zwischen pKLC102 und homologen Geninseln**

<b>pKLC102 / PACS2</b>	
A+T reiche Region (gelb): 42 bp TTTTACATACTGAATCTTGTGGTATGTATACGTACTATAT	
Loop 4:	BTTCGGCATCCGAAC
Loop 3:	CTGGGTTCGGCATCCGAACTCAG
Loop 2:	GAGTTCGGCATCCGAACTC
Loop 1:	GGCAGAGTTCGGATGCCGAACTCTGCC

<p><b>PA14</b> A+T reiche Region (gelb): 42 bp (Austausch der 12. Base T-&gt;A) TTTTACATACTGAATCTTGTGGTATGTATACGTACTATAT</p> <p>Loop 4: BTTCGGCATCCGAAC</p> <p>Loop 3: CTGGGTTCGGTATCCGAACTCAG</p> <p>Loop 2: GAGTTCGGCATCCGAACTC</p> <p>Loop 1: GACAGAGTTCGGATGCCGAACTCTGCC Zwei Basenpaaraustausche bei Loop 3 und einer bei Loop 1</p>	<p><b>C3719</b> A+T reiche Region (gelb): 42 bp (Austausch der 12. Base T-&gt;A) TTTTACATACTGAATCTTGTGGTATGTATACGTACTATAT</p> <p>Loop 4: BTTCGGCATCCGAAC</p> <p>Loop 3: CTGGGTTCGGCATCCGAACTCAG</p> <p>Loop 2: GAGTTCGGCATCCGAACTA</p> <p>Loop 1: GGCAGAGTTCGGATGCCGAACTCTGCC Jeweils ein Basenpaaraustausch bei Loop 2 und 1</p>
<p><b>PA7</b> A+T reiche Region (gelb): 42 bp (Austausch der 12. Base T-&gt;A) TTTTACATACTGAATCTTGTGGTATGTATACGTACTATAT</p> <p>Loop 4: BTTCGGCATCCGAAC</p> <p>Loop 3: CTGGGTTCGGCATCCGAACTCAG</p> <p>Loop 2: GAGTTCGGCATCCGAACTC</p> <p>Loop 1: GGCAGAGTTCGGATGCCGAACTCTGCC</p>	<p><b>2192</b> A+T reiche Region (gelb): 42 bp (Austausch der 12. Base T-&gt;A) TTTTACATACTGAATCTTGTGGTATGTATACGTACTATAT</p> <p>Loop 4: BTTCGGCATCCGAAC</p> <p>Loop 3: CTGGGTTCGGCATCCGAACTCGG</p> <p>Loop 2:</p> <p>Loop 1: GGCAGAGTTCGGATGCCGAACTCTGCC Ein Basenpaaraustausch bei Loop 3, Loop 2 deletiert</p>

Die A + T - reiche Region ist gelb, die komplementären Palindromsequenzen der einzelnen „loops“ sind entsprechend grün und rot unterlegt. Basenaustausche in den jeweiligen Sequenzen sind grau unterlegt.

Der rechte Teil der *oriV* Region wird in Abbildung 3.13 verglichen. Sie besteht in pKLC102 aus 16 57 bp langen *direct repeats*, wobei jeder ein Grundgerüst (grau unterlegt) aufweist, das sich in allen Sequenzen an der gleichen Position wiederholt und nahezu identisch ist. Der Rest der einzelnen *direct repeats* scheint aus sich wiederholenden Modulen zu bestehen. Als ein Modul wird in diesem Fall eine Basenabfolge von zwei bis sieben Basen bezeichnet, die an der gleichen Position auch in den anderen *direct repeats* auftaucht. Hierbei weisen Module an den gleichen Positionen eine starke Sequenzähnlichkeit zueinander auf. Eine erhöhte Präferenz bestimmter Module konnte nur bei pKLC102 festgestellt werden. Hier kommt es an

den jeweiligen Enden zu einer Häufung identischer Module. Dies führt dazu, dass die bereits oben erwähnte Palindromsequenz hochkonserviert zu finden ist.

Innerhalb der *direct repeat* - Region kommt es an zwei Positionen zum Austausch lediglich eines Basenpaares. Diese beiden Regionen sind ebenfalls in allen Sequenzen konserviert.

Des Weiteren wurde im konservierten Grundgerüst eine weitere 8 bp lange Palindromsequenz entdeckt, 5' – **CGGC GCCG** – 3' (die komplementären Basen wurden jeweils grün und rot unterlegt). Diese ist in allen untersuchten *direct repeats* hochkonserviert.

Für die Geninsel pKLC102 wurde in Kapitel 3.1 gezeigt, dass sie ein mobiles Element darstellt. In episomaler Form wurde es ca. 100 mal häufiger in den Bakterienzellen detektiert, als das ähnliche verwandte Element PAPI – 1. Da die Gene, die eine Rolle bei der Mobilisierung dieser beiden Geninseln spielen könnten (soweit sie bekannt sind), in der Kernstruktur konserviert sind, könnte der unterschiedliche Aufbau des Replikationsursprung hierbei eine entscheidende Rolle einnehmen. Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, besteht der rechte Teil der *oriV* Region in PAPI – 1 aus lediglich drei konservierten *direct repeats*, wohingegen die gleiche Region in pKLC102 aus 16 besteht. Laut Klockgether et al. (2004) könnten die nicht – palindromischen Bereiche dieser Sequenzen Bindungsstellen für Replikationsproteine darstellen. Von dieser Annahme ausgehend könnte die niedrigere Anzahl von *direct repeats* ein Grund für die geringere Menge an freien Plasmiden im Stamm PA14 sein.

Da die Gene für Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA in den anderen untersuchten Geninseln ebenfalls hochkonserviert vorliegen und die *oriV* Struktur ebenfalls eine starke Ähnlichkeit zu pKLC102 aufweist, legt dies den Verdacht nahe, dass es sich bei ihnen ebenfalls um mobile Elemente handeln könnte.

Hierbei könnte der Stamm PACS2 durch seine Sequenzidentität von 100% in der *ori* – Region eine ebenso mobile und sich selbstständig replizierende Geninsel wie pKLC102 besitzen. Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, scheint sich die Geninsel PAPI-1 nicht selbstständig in den Bakterienzellen replizieren zu können. Sollte die verkürzte *ori* – Region hierbei eine bedeutende Rolle spielen, könnten dies für die Stämme mit teilweise deletierten bzw. mit Insertion versehenen *ori* - Regionen ebenfalls der Fall sein. Genauere Aussagen können aber nur nach entsprechenden Experimenten, wie in Kapitel 3.1 durchgeführt, getroffen werden.



**Das konservierte Grundgerüst dieser Abschnitte ist grau unterlegt. Der variable Teil setzt sich aus verschiedenen Modulen (2 bp – 7 bp) zusammen, die für identische Sequenzen an den gleichen Positionen mit jeweils derselben Farbe gekennzeichnet sind (Ausnahme: rosa eingefärbte Blöcke). Module in rosa bezeichnen Varianten, die nur ein einziges Mal vorkommen. Einzeln vorkommene Basenunterschiede, sind gelb (für Cytosin), grün (für Guanin), hellblau (für Adenin) und rot (für Thymin) unterlegt. Deletionen bzw. Insertionen sind weiß dargestellt.**

Wie an den in Abbildung 3.8 – 3.9 aufgeführten Homologen für die pKLC102 - ORFs zu erkennen ist, setzten sich die analysierten Geninseln mosaikartig aus DNA-Abschnitten mit Ähnlichkeiten zu pKLC102 – ORFs und inselspezifischer – DNA zusammen. Die Zahl der detektierten homologen ORFs der pKLC102 – ähnlichen Bereiche variierte dabei zwischen 75 und 98. Die Abfolge dieser ORFs in den analysierten Geninseln gegenüber der in pKLC102 war identisch. Somit könnte pKLC102 mit diesen Geninseln gemeinsame Vorfahren haben und in die gleiche „Familie“ partiell konservierter DNA-Elemente gehören.

### **3.3 Epidemiologie von pKLC102**

Die mobile Geninsel pKLC102 wurde zuerst im Stamm Klon C, einem dominant in Europa vorkommendem *P. aeruginosa* Klon, entdeckt. Untersuchungen von 21 verschiedenen Klon C Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten ergaben, dass pKLC102 in 20 dieser Isolate ins Genom integriert war (Römling et al., 1997). Spätere Untersuchungen zeigten, dass eine hochähnliche Variante ebenfalls in verschiedenen Klon K Stämmen (sequentielle Isolate eines CF – Patienten) vorkamen (Kiewitz et al., 2000).

Das weit verbreitete Vorkommen innerhalb dieser Stämme ließ vermuten, dass pKLC102 bzw. dazu verwandte Geninseln in weiteren *P. aeruginosa* Isolaten gefunden werden könnten.

Um die generelle Verbreitung von pKLC102-verwandten Geninseln in *P. aeruginosa* zu charakterisieren, wurde eine Auswahl von 71 Stämmen analysiert. Diese bestand aus Stämmen mit nicht verwandten SpeI Restriktionsmustern (Pulsfeldgelelektrophorese) und wurde aus einer Sammlung von über 3000 *P. aeruginosa* Isolaten (Stammsammlung der Medizinischen Hochschule Hannover) ausgewählt.

Die Auswahl enthielt sowohl Umwelt- als auch Klinik- und Patientenisolat aus unterschiedlichen Ländern und Regionen (siehe Tabelle 3.6). Sie repräsentierte somit verschiedene weltweit vorkommende Klone / Subgruppen dieser Spezies.

Zur Identifizierung von partiell konservierten Geninseln in den unterschiedlichen Stämmen dieser Kollektion wurden Hybridisierungsexperimente, in denen das Vorkommen von DNA-Abschnitten mit Homologien zur Referenzinsel pKLC102 detektiert werden sollte, durchgeführt.

**Tabelle 3.6: Auswahl von 71 *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen**

Stamm-Nr	Stamm-bezeichnung	Beschreibung und Angaben zur Herkunft
1	ATCC 10145	Neotyp, Typenstamm; Prag, Tschechische Republik (<1960)
2	ATCC 14886	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula, Bodenisolat, Osaka, Japan (<1958)
3	ATCC 15522	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula, Bodenisolat, USA (<1967)
4	ATCC 15691	Wundisolat; Melbourne, Australien (1952) ATCC15691 = PAT
5	ATCC 21472	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula, Bodenisolat von einem Ölfeld, Japan, (<1973)

6	ATCC 21176	Bodenisolat, Japan (<1974)
7	ATCC 33348	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula, Serotyp 1, Bonn, Deutschland (<1957)
8	ATCC 33356	Internationaler Serotyp 9, Stuhlprobe; Heidelberg, Deutschland (<1955)
9	ATCC 33364	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula, Serotyp 17 (<1978)
10	ATCC 33818	Isolat vom Pilz <i>Agaricus bisporus</i>
11	ATCC 33988	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula, Isolat aus einem Benzintank; Ponca City, Oklahoma, USA
12	63741	Wundisolat; Hannover, Deutschland (1992)
13	A 5670	Wundisolat; Heidelberg, Deutschland (1992)
14	A 5803	Lufttröhrenisolat; Heidelberg, Deutschland (1992)
15	AL 5846	Wundisolat; Heidelberg, Deutschland (1992)
16	2733/92	CF-Patient, Sputum-Probe; Kopenhagen, Dänemark (1992)
17	2813 A/92	CF-Patient, Sputum-Probe; Kopenhagen, Dänemark (1992)
18	BST 1	CF-Patient, Rachenabstrich; Hannover, Deutschland (1985)
19	KB 1	CF-Patient, Rachenabstrich; Sarstedt, Deutschland (1985)
20	SS 1	CF-Patient, Rachenabstrich; Lüneburg, Deutschland (1985)
21	MF 6	CF-Patient, Rachenabstrich; Bremen, Deutschland (1987)
22	PD 1	CF-Patient, Rachenabstrich; Hannover, Deutschland (1985)
23	RN 4	CF-Patient, Rachenabstrich; Oldenburg, Deutschland (1986)
24	RP 1	CF-Patient, Rachenabstrich; Hannover, Deutschland (1985)
25	Va 24437	CF-Patient, Sputum-Probe; Halle, Deutschland (1992)
26	Va 26232	CF-Patient, Sputum-Probe; Halle, Deutschland (1992)
27	Va 27081	CF-Patient, Sputum-Probe; Halle, Deutschland (1992)
28	Va 27260	CF-Patient, Sputum-Probe; Halle, Deutschland (1992)
29	DM	CF-Patient, Sputum-Probe; Hamburg, Deutschland (1984)
30	ZW 30	CF-Patient, Rachenabstrich; Innsbruck, Österreich (1997)
31	ZW 31	CF-Patient, Rachenabstrich; Innsbruck, Österreich (1997)
32	ZW 41	CF-Patient, Rachenabstrich; Verona, Italien (1997)
33	ZW 43	CF-Patient, Rachenabstrich; Genua, Italien (1997)
34	ZW 49	CF-Patient, Rachenabstrich; Verona, Italien (1997)
35	ZW 54	CF-Patient, Rachenabstrich; Mailand, Italien (1997)
36	ZW 64	CF-Patient, Rachenabstrich; Lund, Schweden (1997)
37	ZW 77	CF-Patient, Rachenabstrich; London, Großbritannien (1997)
38	ZW 79	CF-Patient, Rachenabstrich; Galway, Irland (1997)
39	ZW 81	CF-Patient, Rachenabstrich; London, Großbritannien (1997)
40	ZW 83	CF-Patient, Rachenabstrich; London, Großbritannien (1997)
41	ZW 85	CF-Patient, Rachenabstrich; Aberdeen, Großbritannien (1997)
42	ZW 88	CF-Patient, Rachenabstrich; London, Großbritannien (1997)
43	ZW 92	CF-Patient, Rachenabstrich; Marseille, Frankreich (1997)
44	ZW 98	CF-Patient, Rachenabstrich; Den Haag, Niederlande (1997)
45	ZW 102	CF-Patient, Rachenabstrich; Leuven, Belgien (1997)
46	ZW 113	CF-Patient, Rachenabstrich; Rotterdam, Niederlande (1997)
47	ZW 117	CF-Patient, Rachenabstrich; Wien, Österreich (1997)
48	ZW 119	CF-Patient, Rachenabstrich; Posen, Polen (1997)
49	SG1 (= C)	CF-Patient, Rachenabstrich; Bückeburg, Deutschland (1986); (Klon C Typenstamm)
50	SG31	Flusswasser-Isolat; Mülheim, Deutschland (1993); SG31 = SG17M
51	PT 2	Wasser-Isolat, Mülheim, Deutschland (1992)
52	PT 6	Wasser-Isolat, Mülheim, Deutschland (1992)

53	PT 12	Wasser-Isolat, Mülheim, Deutschland (1992)
54	PT 20	Wasser-Isolat, Mülheim, Deutschland (1992)
55	PT 22	Wasser-Isolat, Mülheim, Deutschland (1992)
56	PT 36	Wasser-Isolat, Mülheim, Deutschland (1992)
57	641 HD 11/ml	Wasser-Isolat, Mülheim, Deutschland (1992)
58	Gr 2052	Klinikisolat; Athen, Griechenland (1995)
59	Gr 2057	Klinikisolat; Athen, Griechenland (1995)
60	Gr 2248	Klinikisolat; Athen, Griechenland (1995)
61	PAO	Referenzstamm DSM 1707; Brandwundenisolat; Melbourne, Australien (<1955)
62	892	CF-Patient, Sputum-Probe; Hannover, Deutschland (1983)
63	PAK	Laborstamm; Japan (<1960)
64	HJ2	Sputum-Probe; Köln, Deutschland (1990)
65	G7	CF-Patient, Sputum-Probe; Stade, Deutschland (1986)
66	H2	Klinikisolat aus einen Katheter
67	K9	CF-Patient, Sputum-Probe; Husum, Deutschland (1985)
68	DSM 288	Isolat aus einem Hygieneinstitut; Göttingen, Deutschland (1990)
69	DSM 939	Wasser-Isolat; USA (1980)
70	DSM 1128	Patientenisolat, Ohrinfektion; USA (1980)
71	DSM 1253	Brandwundenisolat; Stanford, USA (<1949)

### **3.3.1 Generierung eines repräsentativen pKLC102 Makroarrays**

Um nun die Stämme zu finden, die in ihrem Genom homologe DNA zu spezifischen Bereichen der pKLC102 Geninsel aufwiesen, wurden Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurde ein sog. „Makroarray“ generiert, der die meisten ORFs von pKLC102 repräsentierte. Dazu wurden 96 PCR – Produkte generiert, die mit Hilfe einer Dot – Blot – Apparatur (siehe Kapitel 2.3.1) auf eine Nylonmembran übertragen und dort fixiert wurden. Diese Membran wurde in späteren Versuchen mit DIG – markierter genomischer DNA der zu analysierenden Stämme hybridisiert.

Von den 96 möglichen Positionen auf dem Makroarray waren neun für Positiv- und Negativkontrollen reserviert. Die restlichen 87 Positionen wurden mit PCR – Produkten belegt, die potentielle Gene und den putativen Replikationsursprung *oriV* von pKLC102 repräsentierten (siehe Abbildung 3.14). Für kleinere ORFs wurden vereinzelt PCR – Produkte generiert, die zwei benachbarte ORFs überspannten (CP47/CP48; CP52/CP53; CP73/CP74). Weiterhin wurden zwei Produkte für CP103 generiert. CP103b repräsentiert in diesem Fall einen sogenannten *inner* ORF von CP103 (Klockgether et al., 2004), CP103a den Bereich, der nicht zu diesem *inner* ORF zählt. CP94 wurde durch drei PCR – Produkte dargestellt (CP94-1,

CP94-2, CP94-3), da er aufgrund seiner Länge von 8511 bp den größten ORF in pKLC102 repräsentierte.

Durch die aufgetragenen 87 PCR-Produkte waren so 88 verschiedene ORFs auf dem Makroarray repräsentiert. Die Generierung der PCR-Produkte erfolgte mit ORF-spezifischen *Primern*: PCR-Produkt CP01: *Primer* CP01l und CP01r; PCR-Produkt CP2: *Primer* CP02l und CP02r; usw. Die jeweiligen Primersequenzen sind im Anhang aufgelistet.

Ausnahmen:	PCR-Produkt CP47/CP48:	<i>Primer</i> CP47/CP48l – CP47/CP48r
	PCR-Produkt CP52/CP53:	<i>Primer</i> CP52/CP52l – CP52/CP53r
	PCR-Produkt CP73/CP74:	<i>Primer</i> CP73/CP74l – CP73/CP74r
	PCR-Produkt CP94a:	<i>Primer</i> CP94-1l – CP94-1r
	PCR-Produkt CP94b:	<i>Primer</i> CP94-2l – CP94-2r
	PCR-Produkt CP94c:	<i>Primer</i> CP94-3l – CP94-3r
	PCR-Produkt ori1:	<i>Primer</i> ori1l – ori1r
	PCR-Produkt ori2:	<i>Primer</i> ori2l – ori2r

Die genaue Belegung des Arrays mit den PCR – Produkten der jeweiligen ORFs ist zusammen mit der variierenden Länge der einzelnen PCR – Produkte in Abbildung 3.14 A und B dargestellt. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen (P1, P2a, P2b, N1, N2) sind folgende PCR – Produkte aufgetragen:

P1: „cit2/3“; 650 bp aus Gen *gltA* (Citrat-Synthase), amplifiziert auf genomischer DNA von *P. aeruginosa* C (*Primer* cit2 und cit3).

P2a: „fliCa“; 530 bp aus Gen *fliCa* (Flagellin-Filament-Protein Typ a), amplifiziert auf DNA von *P. aeruginosa* C (*Primer* fla3a und fla4a)

P2b: „fliCb“; 800 bp aus Gen *fliCb* (Flagellin-Filament-Protein Typ b), amplifiziert auf DNA von *P. aeruginosa* TB (*Primer* fla3b und fla4b)

N1: „PP5“; 1289 bp aus dem Genom von *P. putida* KT2440, aus intergenischer Region zwischen ORFs PP5238 und PP5239 (Genom-Position 5974091 – 5975379) (*Primer* PP5a und PP5b)

N2: „hobI“; 300 bp Abschnitt des humanen Gens *hob* (*human obese gene*), generiert mit *Primern* hob1 und hob2 auf humaner DNA (Präparation erhalten von Dr. Frauke Stanke)



Bei der Amplifikation der Negativkontrolle N1 scheint ein anderes, unspezifisches Produkt amplifiziert worden zu sein. Eigentlich sollte in der entsprechenden Position bei keiner der Hybridisierungen ein Signal auftreten. Stattdessen wurde dort bei jeder Hybridisierung ein positives Signal detektiert. Aus diesem Grund wurde die Negativkontrolle N1 außer Acht gelassen.

Die PCR – Produkte PA0977, PA0981, TB-Cargo und D8A6 repräsentierten Abschnitte weiterer Geninseln aus anderen Stämmen. Für die Epidemiologie – Analysen wurden Signale in den dazugehörigen Positionen nicht weiter betrachtet.

**Abbildung 3.14: Schematische Darstellung des pKLC102 - Makroarrays**

**A**

CP103a	CP102	CP93	CP92	CP91	CP90	CP89	CP88	CP87	CP83	CP81	CP79
CP78	CP77	CP76	CP73 -74	CP68	CP67	CP66	CP65	CP64	CP56	CP55	CP54
CP52 -53	CP51	CP49	CP47 -48	CP46	CP27	CP22	CP20	CP19	CP18	CP17	CP1
P1	ori1	ori2	CP94a	CP33	CP34	CP37	CP39	CP40	CP41	CP42	CP62
P2a	PA0977	CP84	CP85	CP86	CP94b	CP94c	CP99	CP100	CP21	CP25	CP103b
P2b	PA0981	CP28	CP44	CP32	CP43	CP57	CP58	CP59	CP60	CP63	CP69
N1	TB - Cargo	CP70	CP96	CP97	CP98	CP12	CP11	CP10	CP80	CP75	CP101
N2	D8A6	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP30	CP50

**B**

534	536	344	244	405	297	354	570	326	451	525	510
581	283	267	321	320	555	312	551	319	416	504	532
585	265	523	535	397	370	304	350	356	556	483	497
	324	274	605	475	502	467	338	587	565	361	481
		518	326	572	500	540	565	535	375	346	296
		271	272	429	375	575	255	435	337	303	512
		587	510	337	475	279	510	255	327	329	301
		602	465	531	423	611	608	286	569	450	316

**A: Belegung des Makroarrays mit pKLC102 - repräsentierenden PCR - Produkten. Die Positionen der Positiv- und Negativkontrollen sind grau markiert.**

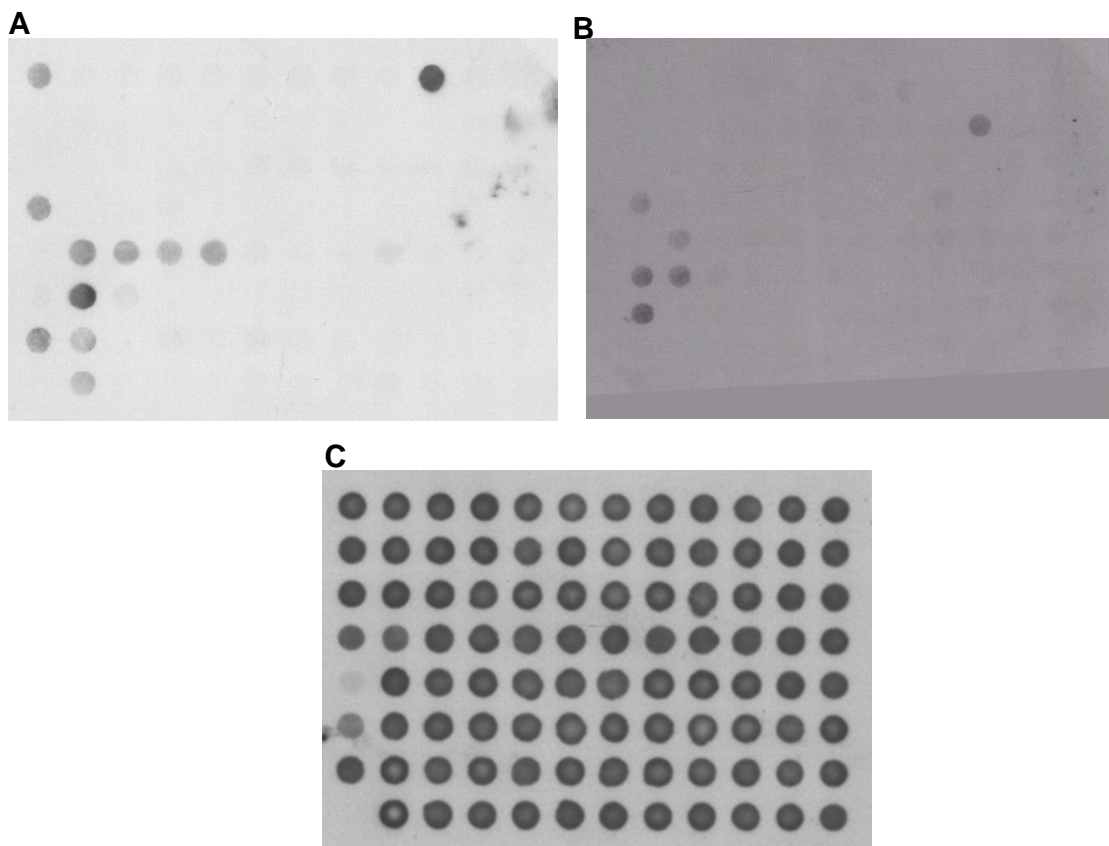
**B: Länge der in den einzelnen Positionen aufgetragenen PCR-Produkte.**

Mehrere Makroarrays wurden parallel aus Aliquots der gleichen vereinigten PCR - Ansätze hergestellt. Dabei wurde auf jeden Makroarray die gleiche Menge an PCR – Produkt aufgetragen.

Bei der Erstellung der zweiten Generation von Makroarrays trat allerdings ein Problem auf. Das PCR – Produkt „ori-1“ ließ sich nicht mehr generieren. Stattdessen wurde ein CP35 repräsentierendes Produkt amplifiziert und aufgetragen. Da die Konservierung dieser beiden repräsentierten pKLC102 - Abschnitte nicht für alle Stämme untersucht werden konnte, wurden sie bei der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigt.

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden die Makroarrays mit markierter genomischer DNA der *P. aeruginosa* Stämme PAO1, der laut Annotation keine pKLC102 – ähnliche Geninsel enthält, C5, für den Mikroarrayanalysen zeigten, dass er keine pKLC102 Geninsel besitzt (unveröffentlichte Daten L. Wiehlmann) und SG17M, welcher pKLC102 aufweist, hybridisiert. Die Hybridisierungsergebnisse sind in Abbildung 3.15 A, B und C dargestellt.

**Abbildung 3.15: Positiv- und Negativkontrollen der pKLC102 – Makroarrays**



**A:** Hybridisierung mit genomischer DNA von *P. aeruginosa* PAO (Negativkontrolle)

**B:** Hybridisierung mit genomischer DNA des *P. aeruginosa* Stammes C5 (Negativkontrolle)

**C:** Hybridisierung mit genomischer DNA des *P. aeruginosa* Stammes SG17M (Positivkontrolle)

Die Hybridisierung der Makroarrays mit genomischer DNA der Negativkontrolle PAO1 zeigte positive Signale für die ORFs CP83, CP84 – CP86 sowie CP103. Die Annotationsergebnisse der ORFs CP83, CP84 – CP86 hatten gezeigt, dass sie eine starke Homologie zu den PAO1 Genen PA0982 (CP83) sowie PA2564 – PA2566 (CP86 – CP84) aufweisen. CP84 – CP86 sind von zwei 239 bp langen *direct repeats* flankiert und weisen charakteristische Signalmerkmale einer mobilen Genkassette auf. ORF CP103 codiert eine *XerC* – Integrase. Das positive Signal für PAO1 könnte möglicherweise durch andere ähnliche Integrase-Gene im PAO-Genom verursacht worden sein.

Die Hybridisierung der Makroarrays mit genomischer DNA der Negativkontrolle C5 zeigt nur ein positives Signal für den ORF CP56. Hierbei handelt es sich um ein putatives Helikasegen. Das positive Signal für diesen ORF wird wahrscheinlich durch ein ähnliches Gen im C5 Genom verursacht.

Die Hybridisierungsergebnisse mit genomischer DNA der Positivkontrolle SG17M ergaben positive Signale für alle pKLC102 repräsentierenden Punkte. Wie erwartet wurde tatsächlich pKLC102 – DNA gespottet.

### **3.3.2 Ergebnisse der Makroarray – Hybridisierungen**

Anhand von in unserem Labor zuvor durchgeführten Mikroarray - Untersuchungen wurde eine Vorauswahl der 71 zu analysierenden *P. aeruginosa* Stämme getroffen (unveröffentlichte Daten L. Wiehlmann). Auf dem Mikroarray befanden sich vier zwischen 20 und 25 bp lange DNA – Sonden, durch welche pKLC102 auf diesem DNA – Chip repräsentiert wurde. Sie stellten spezifische Abschnitte des konservierten Teils der Geninsel dar. Aus diesen Untersuchungen ließen sich Rückschlüsse ziehen, ob in dem jeweils zu untersuchendem Stamm eine pKLC102 ähnliche Geninsel vorlag. Für 50 der 71 zu analysierenden Stämme wurde die Vorhersage getroffen, dass sie pKLC102 - ähnliche Geninseln aufwiesen.

Die Hybridisierungsergebnisse dieser 50 ausgewählten Stämme ergaben positive Signalmuster für alle Stämme. Dies zeigte, dass alle untersuchten Stämme eine vergleichbar (partiell) konservierte pKLC102 – verwandte Geninsel aufwiesen. Eine Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

Viele der untersuchten Stämme zeigten positive Hybridisierungssignale in nahezu allen DNA – Punkten der Membran. Viele der fehlenden Signale wurden in benachbarten Stellen in der Geninselsequenz detektiert und fehlten dementsprechend blockweise.

In sechs der 50 untersuchten Stämme (5, 20, 49, 50, 65, 68) wurden für alle pKLC102 vertretenden ORFs Signale detektiert. Dementsprechend schien wahrscheinlich eine Kopie von pKLC102 in diesen Stämmen vorzuliegen.

Diese Isolate stammten aus verschiedenen Habitaten unterschiedlicher Länder wie der Lunge von CF - Patienten und Flusswasser aus Deutschland oder von einem Ölfeldboden aus Japan. Die Verbreitung vollständig konservierter Varianten von pKLC102 scheint demnach habitunabhängig zu sein.

Die wenigsten Signale wurden für den Stamm 58, einem Klinikisolat aus Griechenland, detektiert. In diesem Fall wiesen nur 28 der 87 Punkte ein positives Signal auf. Es scheint so, als ob in diesem Stamm nur wenige pKLC102 – homologe Abschnitte vorliegen oder die vorhandene DNA – Sequenz eine so geringe Ähnlichkeit zur pKLC102 - Sequenz aufweist, dass sie mit dem angewandten Hybridisierungsverfahren nur teilweise detektiert werden kann. Vergleiche der unterschiedlichen Konservierungsmuster der analysierten Stämme zeigten größere pKLC102 - Abschnitte, die anscheinend in vielen detektierten Inseln fehlen. Analog zu den *in-silico* Untersuchungen in Kapitel 3.2 wiesen z.B. die Bereiche zwischen den ORFs CP52 und CP62, CP84 und CP86 sowie CP94 und 101, eine große Varianz auf. Für den Bereich zwischen CP57 und CP62 wurden 17 Stämme detektiert, deren DNA keine oder nur geringe Hybridisierungssignale ergaben. Für den Bereich zwischen CP94 und CP101 wurden in nur 19 der untersuchten 50 Stämme positive Signale vorgefunden. Den geringsten Konservierungsgrad innerhalb der untersuchten Stämme wies der ORF CP32 auf. Homologe Sequenzen wurden in nur 9 untersuchten Stämme gefunden. Auffällig war, dass es sich dabei um den ORF mit dem niedrigsten GC – Gehalt innerhalb der pKLC102 Sequenz handelt.

Diese Ergebnisse bestätigen das Bild von pKLC102 – verwandten Geninseln, das sich schon nach den Vergleichen der neusequenzierten *P. aeruginosa* Stämme angedeutet hatte (siehe Kapitel 3.2). Anscheinend gehören die gefundenen Geninseln zu einer weitverzweigten „Familie“ von ähnlichen Elementen, die alle einen ähnlichen Aufbau zeigen. So gibt es anscheinend ein Grundgerüst, welches allen Mitgliedern dieser Familie gemein ist, und das mehr oder weniger komplett in allen Geninseln konserviert vorliegt. Zwischen diesen Bereichen gibt es Regionen, in denen anscheinend inselspezifisches „Cargo“ integriert werden kann.

Dieses Grundgerüst könnte auf einen möglichen gemeinsamen Vorläufer hindeuten, aus dem dann nachfolgende Varianten entstanden sind.

Dass in mindestens 70% der in Abbildung 3.16 dargestellten *P. aeruginosa* Stämme eine pKLC102 – verwandte Insel vorliegt, lässt auf eine sehr weite Verbreitung dieser Familie innerhalb der Spezies schließen.



Farbcode der eingefärbten Kästchen: grau: ORFs sind in diesem Stamm konserviert; weiss: ORFs sind nicht konserviert; hellblau: Konservierung fraglich, nur eins von zwei möglichen Signalen wurde für den ORF detektiert

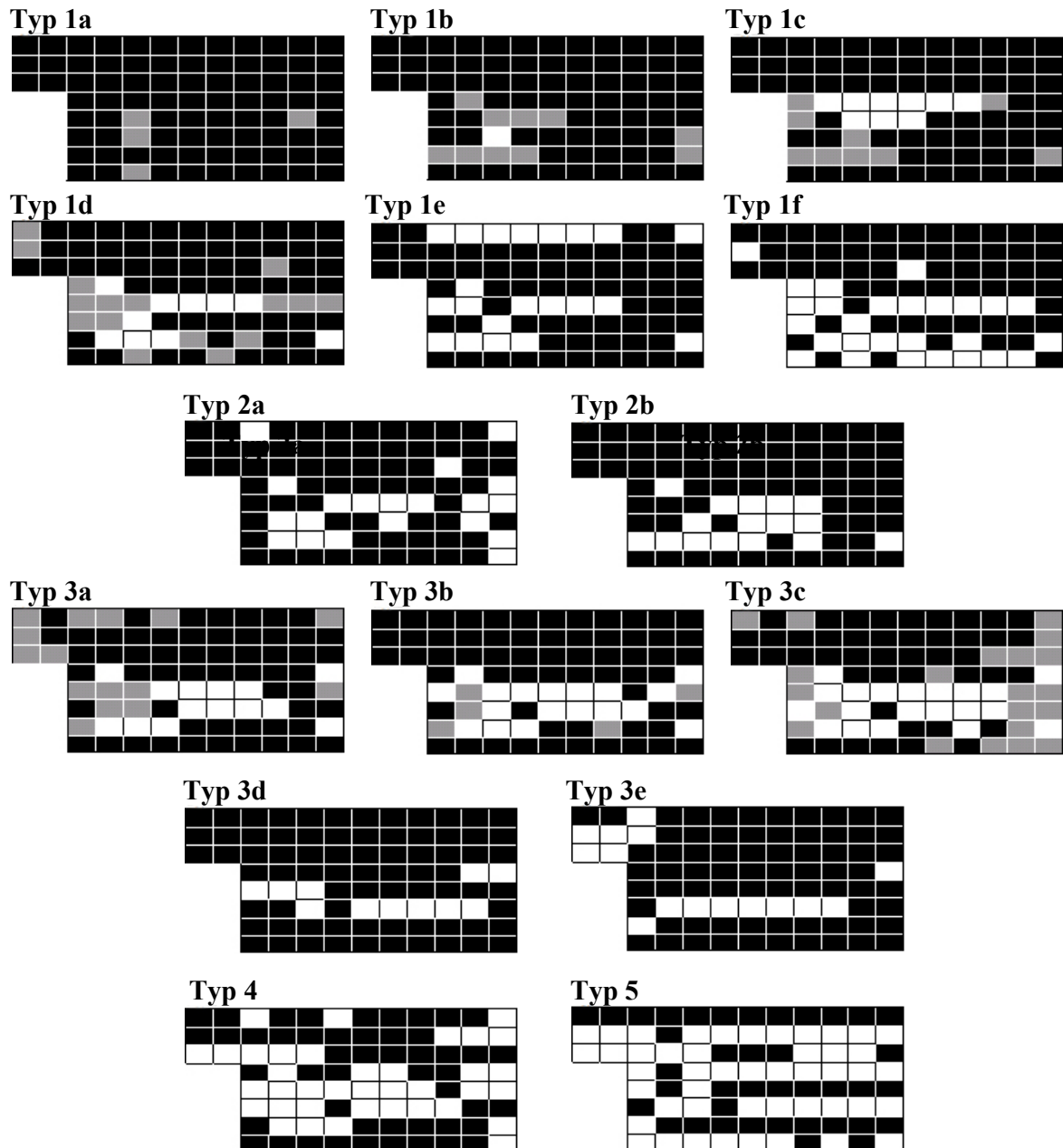
Zwei ORFs, die von einem Punkt repräsentiert wurden, wurden als konserviert angesehen, wenn ein Signal auftrat. Gab es mehrere PCR-Produkte für einen ORF, wurde er als konserviert bewertet, wenn alle ihn vertretenden Punkte ein Signal aufwiesen. Die ORFs CP35 und ori1 sind in der Analyse ausgespart, da sie nicht auf allen Makroarrays vertreten waren.

### **3.3.3 Klassifizierung von Inseltypen anhand der Makroarray-Ergebnisse**

Die Ergebnisse der in Abbildung 3.16 dargestellten Makroarray – Analyse wurden genauer untersucht. Das Ziel war hierbei, die Muster der Hybridisierungssignale nach verschiedenen Typen zu ordnen.

Für die in 50 Stämmen vorliegenden Geninseln wurden anhand der Daten fünf verschiedene Inseltypen definiert, die wiederum in insgesamt 15 verschiedenen Subtypen unterteilt wurden. Für die Stämme 53 und 58 wurde jeweils ein eigener Inseltyp definiert, da ihre Hybridisierungsmuster keine Ähnlichkeit zu den anderen aufwiesen. Das Ergebniss dieser Einteilung ist in Abbildung 3.17 dargestellt.

Abbildung 3.17: Konservierungsmuster der definierten Inseltypen im Vergleich zu pKLC102



Schwarz: Homologe DNA in allen Stämmen dieser Subgruppe detektiert

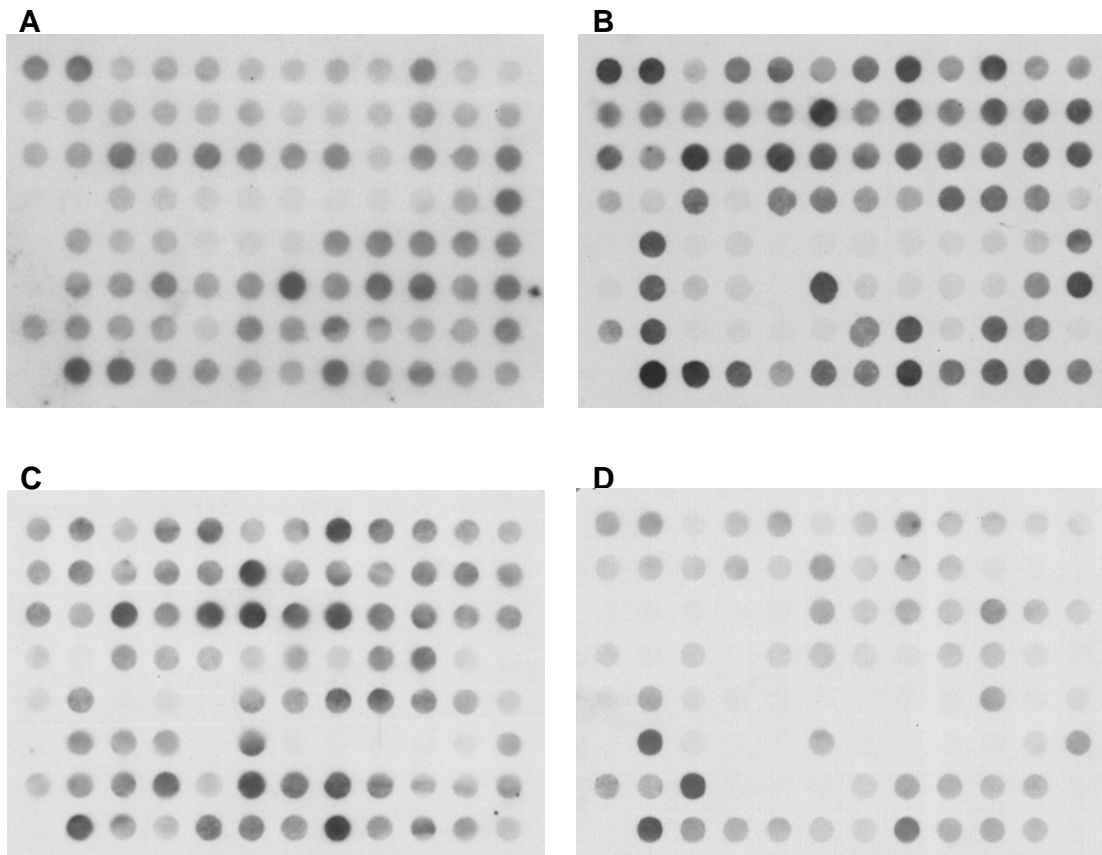
Grau: schwächere Homologie, der jeweilige ORF ist nicht in allen Stämmen dieses Subtyps detektiert worden.

Weiß: keine Homologie detektiert



In Abbildung 3.18 A-D sind als Beispiel vier Signalmuster dargestellt, die verschiedene Subtypen der gefundenen Geninsel darstellen. Tabelle 3.7 zeigt die genaue Verteilung der einzelnen untersuchten *P. aeruginosa* Stämme auf die ihnen zugewiesenen Typengruppen anhand der Hybridisierungsergebnisse.

**Abbildung 3.18: Makroarrays hybridisiert mit genomischer DNA von *P. aeruginosa* - Stämmen**



Dargestellt sind die Signalmuster für vier Stämme aus der *P. aeruginosa* Auswahl.  
A: Stamm 6 (Inselsubtyp 1c);  
B: Stamm 10 (Inselsubtyp 3c);  
C: Stamm 36 (Inselsubtyp 3d);  
D: Stamm 53 (Inseltyp 4)

**Tabelle 3.7: Definierte Typen pKLC102-artiger Geninseln in *P. aeruginosa* Stämmen**

Typ / Subtyp	1a	1b	1c	1d	1e	1f	2a	2b
Stammnummer	5; 9; 19; 20; 41; 49; 50; 65; 68	4; 21; 29; 51; 71	6; 33	13; 14; 15; 22; 23; 24; 25; 39; 52; 55; 60; 62; 69; 70	54	45	46	2
Typ / Subtyp	3a	3b	3c	3d	3e	4	5	
Stammnummer	16; 28; 31	3; 7; 44	7; 10; 12; 35; 56; 66	36	59	53	58	

32 der untersuchten Stämme lassen sich der Typengruppe 1 zuordnen. In Subgruppe 1a befindet sich Stamm 49, ein Klon C – Stamm, der nachweislich eine vollständig konservierte Geninsel besitzt. Diese Subgruppe repräsentiert aber nicht die Mehrheit der gefundenen Inseltypen. 14 der analysierten Konservierungsmuster lassen sich der Subgruppe 1d zuordnen, dem die größte Zahl an Stämmen / Signalmustern zugeordnet wurde. Den detektierten Inseln fehlten jeweils acht pKLC102 – ORFs, einschließlich dem als Virulenzfaktor angesehenen *chvB* – Gen. In dieser Gruppe befindet sich der Stamm Nr.62, in dem per PCR eine episodale Variante einer pKLC102 – verwandten Geninsel detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Dies legt den Verdacht nahe, dass dies für die anderen Stämme dieser Subgruppe ebenfalls zutreffen könnte und sich der am häufigsten auftretende Subtyp ebenfalls intrazellulär replizieren kann.

Bei zehn der untersuchten Subgruppen wiesen die Signalmuster ein starkes Signal in der Position *ori2* auf. Dies deutet auf ähnliche *oriV* – Strukturen in diesen Stämmen hin, so dass auch diese pKLC102 – verwandten Geninseln mobil sein könnten und eventuell als zirkuläre Elemente vorliegen, wie für pKLC102 im Stamm SG17M gezeigt wurde.

Abbildung 3.19 zeigt eine Zusammenfassung des Konservierungsgrades der einzelnen pKLC102 – ORFs in den verschiedenen Inseln. 37 der analysierten pKLC102 ORFs zeigten einen Konservierungsgrad von über 95% und liegen hochkonserviert in den verschiedenen Inseln vor und scheinen demnach essentiell für pKLC102 - verwandte Geninseln zu sein.

Insgesamt zeigten mehr als 50% der analysierten ORFs einen sehr hohen Konservierungsgrad auf und wurden in fast allen analysierten Inseln gefunden.

**Abbildung 3.19: Zusammenfassung der Konservierungsmuster der Makroarrays**

CP103a	CP102	CP93	CP92	CP91	CP90	CP89	CP88	CP87	CP83	CP81	CP79
CP78	CP77	CP76	CP73 -74	CP68	CP67	CP66	CP65	CP64	CP56	CP55	CP54
CP52 -53	CP51	CP49	CP47 -48	CP46	CP27	CP22	CP20	CP19	CP18	CP17	CP1
	ori2	CP94a	CP33	CP34	CP37	CP39	CP40	CP41	CP42	CP62	
	CP84	CP85	CP86	CP94b	CP94c	CP99	CP100	CP21	CP25	CP103b	
	CP28	CP44	CP32	CP43	CP57	CP58	CP59	CP60	CP63	CP69	
	CP70	CP96	CP97	CP98	CP12	CP11	CP10	CP80	CP75	CP101	
	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP30	CP50	

Die unterschiedliche Färbung stellt den Konservierungsgrad der verschiedenen homologen ORFs innerhalb der untersuchten Stämme dar; schwarz:  $\geq 96\%$ ; dunkelgrau:  $\geq 90\%$ ; hellgrau:  $\geq 50\%$ ; weiss:  $< 50\%$

Für 90% der analysierten pKLC102 ORFs wurden homologe Regionen in den untersuchten Stämmen gefunden. Einzig die in pKLC102 CP94 – CP101 umspannende Region konnte in den meisten untersuchten Isolaten nicht detektiert werden. In nur neun Stämmen wurde ein zu CP32 homologer ORF entdeckt. Er weist den niedrigsten GC – Gehalt aller in pKLC102 gefundenen ORFs auf. In Stamm C (Nr. 49) diente er als Integrationspunkt für ein Integron (Klockgether et al., 2004), dessen Insertion zu chromosomalen Inversionen führte.

Geninseln vom Typ pKLC102 scheinen innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* weit verbreitet zu sein. Sie weisen alle eine hochkonservierte Grundstruktur auf, in die zusätzliche inselspezifische cargo – Regionen integriert werden können. Die hier detektierten Subtypen scheinen dabei durch spezifische Kombination verschiedener Genkassetten entstanden zu sein. Die unterschiedlichen definierten Inseltypen waren in den 50 untersuchten Stämmen nicht mit gleicher Häufigkeit vertreten. Ein Vergleich der Konservierungsmuster der verschiedenen Inseltypen und –subtypen zeigte aber, dass die unterschiedlichen Vertreter der Geninseltypen große Ähnlichkeiten zueinander aufweisen (siehe Abbildung 3.20).



### **3.4 Verlust pKLC102 – verwandter Geninseln in *P. aeruginosa* Stämmen**

Für die Stämme SG17M und PA14 wurde per kombinatorischer PCR nachgewiesen, dass jeweils in einem Teil der Bakterienzellen die Geninsel pKLC102 bzw. PAPI – 1 aus dem Genom ausgeschnitten werden kann. Das Ziel war es, Klon C- und Klon PA14 – Stämme zu detektieren, die einen vollständigen Verlust der Geninsel aufwiesen. Hierfür wurden vorhandene Mikroarraydaten (L. Wiehlmann, unveröffentlichte Daten) analysiert und einige Stämme unserer *P. aeruginosa* Stammsammlung für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Mikroarraydaten wurden mit Hilfe des Clondiag<sup>®</sup> AT-Array generiert. Es ist ein Array, auf dem sich kurze Oligonukleotidsequenzen befinden, die den hochkonservierten und variablen (z. B. Sequenzabschnitte der Geninseln pKLC102 und PAPI - 1) Teil des *P. aeruginosa* Genoms repräsentieren. Mit seiner Hilfe konnten unterschiedliche *P. aeruginosa* Stämme innerhalb kurzer Zeit typisiert werden.

#### **3.4.1 Analytierte Bakterienstämme**

Zur näheren Analyse wurden die Klon C – Stämme C2, C5, C20 und C21, sowie die Klon PA14 – Stämme PA14 und BT72 ausgewählt.

Bei den Stämmen C2 und C5 handelt es sich um isoklonale Varianten, die innerhalb eines Zeitraums von drei Monaten aus den Lungen zweier an CF erkrankter Geschwister isoliert wurden. Die Isoklonalität dieser beiden Varianten wurde durch Wechselfeldgelelektrophorese (K. Larbig, Dissertation 2001) und Mikroarray – Analysen (L. Wiehlmann, unveröffentlichte Daten) bestätigt. Der einzige mit Hilfe dieser Methoden detektierte Unterschied war die An- (C2) bzw. Abwesenheit (C5) der Geninsel pKLC102.

Die Stämme C20 und C21 wurden zum gleichen Zeitpunkt aus dem Rachen eines anderen CF – Patienten isoliert, d. h. sie teilten sich zum gleichen Zeitpunkt das gleiche Habitat. Anhand von Mikroarray – Daten (L. Wiehlmann, unveröffentlichte Daten) wurde in beiden Stämmen ebenfalls nur ein Unterschied in der An- (C20) bzw. Abwesenheit (C21) der Geninsel pKLC102 detektiert.

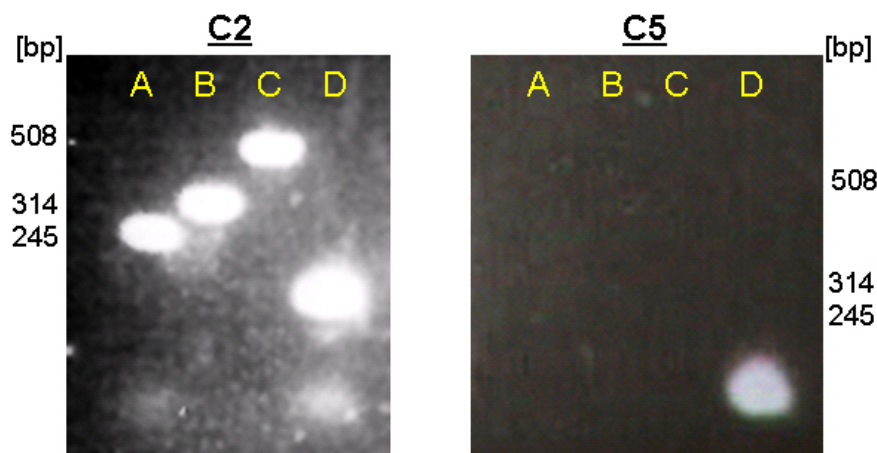
Beim Klon PA14 – Stamm BT72 handelt es sich ebenfalls um ein Isolat aus dem Rachenabstrich eines CF – Patienten. Mikroarray – Vergleiche (L. Wiehlmann, unveröffentlichte Daten) mit dem für diese Versuche verwendeten, sequenzierten PA14 –

Typenstamm aus Boston ergaben nur geringe Abweichungen zwischen diesen beiden Stämmen. Am auffälligsten war hierbei die Abwesenheit von PAPI – 1 im Stamm BT72.

### 3.4.2 Vergleich verschiedener *P. aeruginosa* Stämme mit Hilfe der kombinatorischen PCR

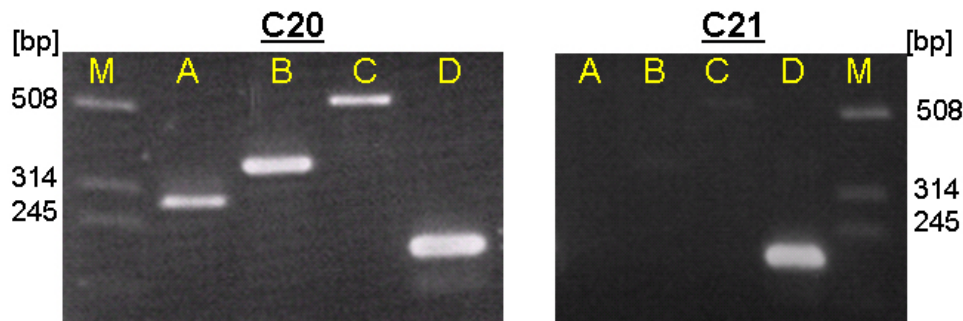
Die Stämme C2, C5, C20 und C21, sowie PA14 und BT72 wurden mit den bereits in Kapitel 3.1 beschriebenen PCRs untersucht. Ziel war es, die Unterschiede bezüglich der Integration der beiden Geninseln in den jeweiligen Stämmen zu analysieren. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.21 – 3.23 dargestellt.

**Abbildung 3.21: Gelfoto der PCR der isoklonalen Varianten C2 und C5 zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninsel pKLC102**



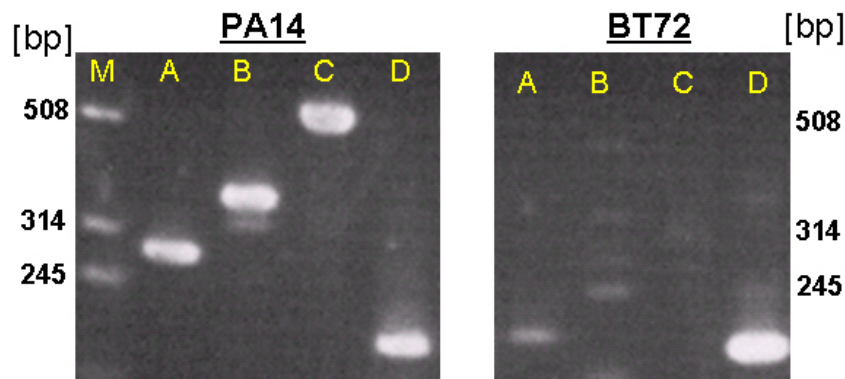
Die Spuren A – D bezeichnen die jeweils erwarteten PCR – Produkte nach 35 Zyklen für A: linke Integrationsseite B: rechte Integrationsseite C: freies Plasmid und D: tRNA<sup>Lys</sup> ohne integrierte Geninsel; die Zahlen am linken bzw. rechten Rand bezeichnen den Größenstandard

**Abbildung 3.22: Gelfoto der PCR der Klon C Stämme C20 und C21 zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninsel pKLC102**



Die Spuren A – D bezeichnen die jeweils erwarteten PCR – Produkte nach 35 Zyklen für A: linke Integrationsseite B: rechte Integrationsseite C: freies Plasmid und D: tRNA<sup>Lys</sup> ohne integrierte Geninsel; M: Größenstandard

**Abbildung 3.23: Gelfoto der PCR der Klon PA14 Stämme PA14 und BT72 zur Detektion von episomalen und chromosomalen integrierten Formen der Geninsel PAPI - 1**



Die Spuren A – D bezeichnen die jeweils erwarteten PCR – Produkte nach 35 Zyklen für A: linke Integrationsseite B: rechte Integrationsseite C: freies Plasmid und D: tRNA<sup>Lys</sup> ohne integrierte Geninsel; M: Größenstandard

Alle untersuchten Stämme zeigten die erwarteten Bandenmuster und bestätigten die vorhandenen Daten. Im Falle von pKLC102 kann die Geninsel komplett verloren gehen. Für die Klon C Stämme C20 und C21 ergaben die Analysen, dass der gleiche Stamm die Geninsel einmal besitzt und das andere Mal verloren hat. Da sie zur gleichen Zeit aus dem gleichen Habitat isoliert wurden, scheinen beide Stammvarianten nebeneinander existieren zu können. Inwiefern der Stamm C21 wieder in der Lage ist, pKLC102 durch z.B. Konjugation zu erlangen und in sein Genom zu integrieren, bleibt ungeklärt.

Für die beiden isoklonalen Varianten C2 und C5 trifft ebenso zu, dass die Stämme mit bzw. ohne pKLC102 in der Lunge von CF – Patienten existieren können.



Für den PA14 - Stamm BT72 wurde ebenso gezeigt, dass er ohne PAPI – 1 Insertion in der Lunge des CF – Patienten existiert hat und PAPI – 1 wahrscheinlich verloren hat.

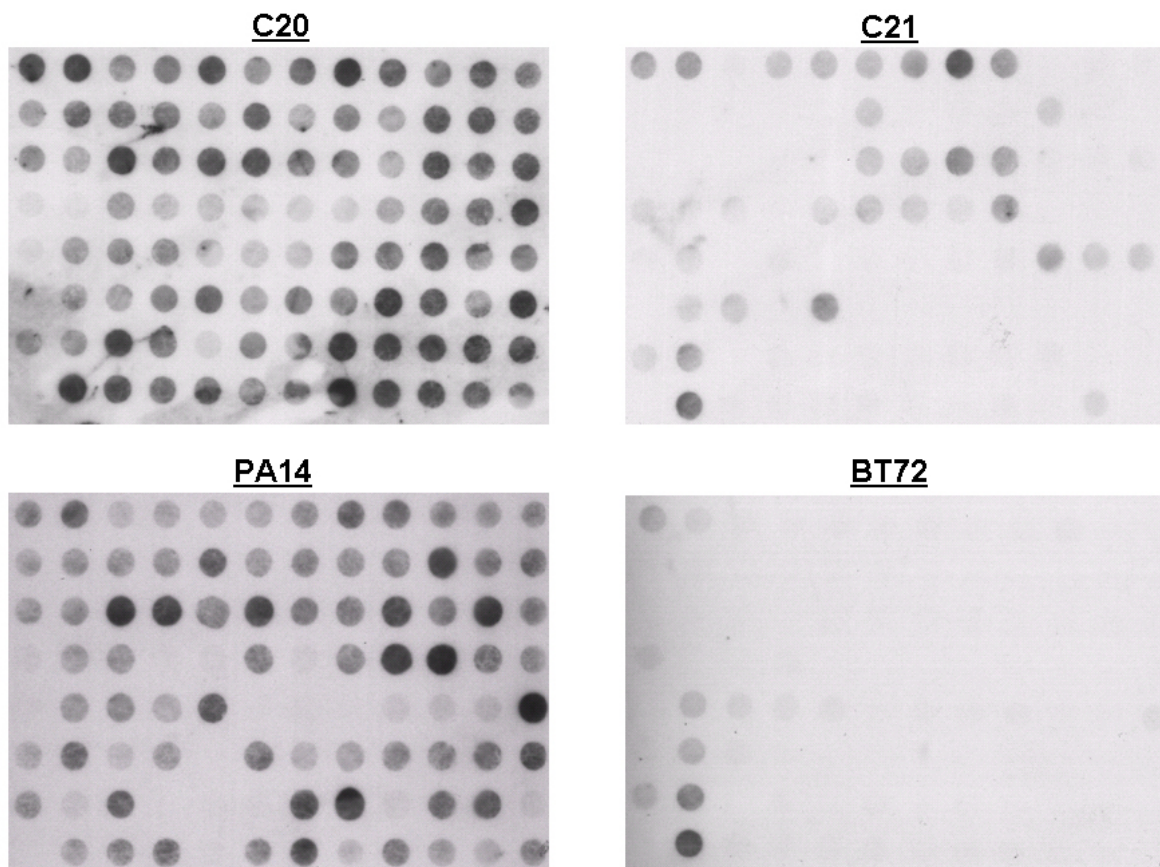
### 3.4.3 Dot Blots verschiedener *P. aeruginosa* Stämme

Um zu analysieren, ob die oben erwähnten Bakterienstämme pKLC102 und PAPI – 1 wirklich komplett verloren haben, oder die Geninsel an einer anderen Stelle im Genom, z. B. dem zweiten tRNA<sup>Lys</sup> – Gen PA0976.1 integriert vorlag, wurden Makroarrayanalysen (wie in Kapitel 3.3 beschrieben) der betreffenden Stämme durchgeführt.

Für den Stamm C5 waren die Daten schon bekannt (Negativkontrolle für Makroarrayanalysen).

Die Ergebnisse der Stämme C20 und C21 sowie PA14 und BT72 sind in Abbildung 3.24 dargestellt.

**Abbildung 3.24: Makroarrays hybridisiert mit genomischer DNA von *P. aeruginosa* - Stämmen**



Dargestellt sind Signalmuster für die vier *P. aeruginosa* Stämme C20, C21, PA14 und BT72



Die Hybridisierungsmuster der Stämme C20 und C21 wiesen deutliche Unterschiede auf. Für den Stamm C20 konnten positive Hybridisierungssignale unterschiedlicher Intensitäten für alle untersuchten pKLC102 – repräsentierenden ORFs detektiert werden. Dieser Stamm besitzt demnach eine eng verwandte Variante der Geninsel pKLC102. Für Stamm C21 wurden 24 Hybridisierungssignale detektiert. In vielen Klon C - Stämmen ist die Geninsel PAPI – 4 (siehe Einleitung) integriert. Teile dieser Insel weisen nahezu identische ORFs zu pKLC102 auf. Hiermit würden sich die Signale der pKLC102 - ORFs CP103 – CP102 sowie CP92 – CP87 erklären. Die 16 weiteren Signale deuten auf homologe Sequenzen im C21 - Genom hin, für die z.B eine weitere verwandte Geninsel verantwortlich sein könnte. Eine Anwesenheit von Fragmenten der Insel pKLC102 neben dem tRNA<sup>Lys</sup> – Gen PA4541.1 wird aufgrund der PCR – Ergebnisse (Abbildung 3.22) ausgeschlossen.

Die Hybridisierungsmuster der Stämme PA14 und BT72 zeigten ebenfalls deutliche Unterschiede. Für den Stamm PA14 wurden Hybridisierungssignale in fast allen pKLC102 repräsentierenden Sonden detektiert. Dies entsprach den Erwartungen, da Sequenzvergleiche (siehe Kapitel 3.2) zeigten, dass nicht alle pKLC102 – ORFs Homologien zu PAPI – 1 – ORFs aufwiesen. Für den Stamm BT72 wurden positive Signale für die pKLC102 – homologen ORFs CP103, CP102, CP100, CP99, CP86 – CP84 und CP83 detektiert. Die positiven Signale für CP103 und CP102 ließen sich durch die Anwesenheit der Geninsel PAPI – 2 erklären, die auch im Genom des sequenzierten Stammes PA14 integriert ist (L. Wiehlmann, unveröffentlichte Daten). Sequenzvergleiche mit der ebenfalls im Stamm PA14 integrierten Insel ergaben, dass in dieser zwei ORFs annotiert wurden, die eine hohe Sequenzidentität zu den beiden pKLC102 – ORFs CP103 und CP102 aufwiesen. Die Signale für CP83 – CP86 wurden bei Hybridisierungen mit genomischer DNA von PAO1 (pKLC102 Negativkontrolle) detektiert (siehe Abbildung 3.15). Hierbei handelte es sich um ORFs, die eine hohe Sequenzidentität zu den PAO1 Genen PA0982 (CP83) sowie PA2564 – PA2566 (CP86 – CP84) aufweisen und ebenfalls im Genom des Stammes BT72 präsent waren. Diese sind wahrscheinlich Teil des PAO1 Kerngenoms und daher auch im Stamm BT72 vorhanden. Die positiven Hybridisierungssignale der Sonden für CP100 und CP99 wurden anscheinend durch Homologe in BT72 verursacht, die nicht in allen Stämmen vorkommen.

Diese Versuche haben gezeigt, dass pKLC102 und verwandte Geninseln vollständig aus dem Genom der jeweiligen *P. aeruginosa* Stämme ausgeschnitten werden und die Bakterien auch ohne diese Geninseln existieren können. Sie scheinen also keine essentiellen Funktionen zu codieren, die für das Überleben der Bakterien eine Rolle spielen. Generell scheinen sie aber

dennoch eine wichtige Rolle im Lebenszyklus der Bakterien einzunehmen, da sie mit großer Häufigkeit in verschiedenen *P. aeruginosa* – Stämmen zu finden ist (siehe Kapitel 3.3).

Für den Klon PA14 Stamm wurde gezeigt, dass die zu pKLC102 hochverwandte Geninsel PAPI – 1 nicht ins Genom integriert sein muss. Eine Aussage darüber, ob PAPI – 1 im Stamm BT72 verloren gegangen ist oder gar nicht erst integriert war, kann nicht getroffen werden. Mikroarray – Analysen eines sieben Monate später isolierten Klon PA14 – Stammes des gleichen Patienten zeigten, dass dieser Stamm eine PAPI – 1 – Insel besaß. Dieser Klon PA14- Stamm könnte sich auch schon zu einem früheren Zeitpunkt im Rachenraum des Patienten befunden haben, ohne dass diese Variante aus dem Rachenabstrich isoliert worden war.

### **3.5 Phänotypische Analysen verschiedener *P. aeruginosa* Isolate**

Die Geninsel pKLC102 codiert laut Annotation für 105 Gene, von denen 60 als hypothetisch oder konserviert hypothetisch klassifiziert wurden. Um zu analysieren, ob in isoklonalen Isolaten, die sich nur in An- bzw. Abwesenheit der Geninsel unterscheiden, phänotypische Unterschiede detektiert werden können, wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

#### **3.5.1 Virulenz im *Caenorhabditis elegans* – Infektionsmodell**

Die Rolle pKLC102s bei der Virulenz *P. aeruginosa*s wurde durch „Fast – killing“ – Versuche mit dem Nematoden *C. elegans* untersucht.

*C. elegans* (siehe Abbildung 3.25) ist ein freilebender, anspruchsloser Nematode, der meistens in gemäßigten Zonen auftritt. Er lebt im Erdreich und ernährt sich von den dort vorkommenden Mikroorganismen. Für Wachstum und Reproduktion benötigt er lediglich eine feuchte Umgebung mit gemäßigten Temperaturen und ausreichend Sauerstoff. Aufgrund dieser Anspruchslosigkeit ist *C. elegans* problemlos im Labor auf Agarplatten mit *E. coli* als Nahrungsquelle zu kultivieren. Da er eine geringe Größe von etwa 2 mm aufweist, ist die Anzucht einer großen Anzahl von Würmern auf kleinstem Raum möglich. Die Dauer der Entwicklung vom Ei bis zum reproduktionsfähigen adulten Wurm beträgt temperaturabhängig etwa drei (25 °C) bis sechs (15 °C) Tage. Diese Entwicklung beinhaltet vier Larvenstadien (L1 bis L4). Die maximale Lebenszeit des adulten Wurms beträgt etwa vier Wochen. Bei Nahrungsmangel oder zu hoher Populationsdichte ist die Entstehung eines resistenteren Dauerstadiums möglich (Riddle et al., 1997). Die Sequenzierung des *C. elegans* Genoms hat ergeben, dass mindestens 37% der exprimierten Proteine Äquivalente in anderen Organismen wie dem Mensch und anderen Säugern, besitzen. So kann, trotz der großen evolutionären Distanz zwischen Mensch und Nematode, *C. elegans* als ein gültiges, auch auf den Säugetierwirt übertragbares Modell für infektionsbiologische Studien herangezogen werden (Mahajan-Miklos et al., 2000).

Im „Fast – killing“ – Modell wird untersucht, ob die Nematoden durch sezernierte Virulenzfaktoren der Bakterien, mit denen sie inkubiert werden, sterben. In diesem Versuchsmodell wurden die beiden in Kapitel 3.4 näher beschriebenen isoklonalen Varianten C2 und C5 untersucht. Als Positivkontrolle wurde der Stamm SG17M verwendet, für den schon in früheren Versuchen hohe „Killing“ - Raten nachgewiesen wurden (unveröffentlichte

Daten, D. Jordan). Als Negativkontrolle wurde der für *C. elegans* avirulente *E. coli* – Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

**Abbildung 3.25: *C. elegans***



**Das Bild zeigt verschiedene *C. elegans*, die mit *P. aeruginosa* inkubiert wurden. Das Bild wurde mit Hilfe einer Digitalkamera durch das Okkular eines Durchlichtmikroskopes aufgenommen.**

Die Ergebnisse zeigten, dass nach 28 h Inkubation mit Stamm C2 5% der *C. elegans* Nematoden nicht mehr am Leben waren, bei Inkubation mit Stamm C5 23%. Der *P. aeruginosa* Klon C Stamm C2, welcher eine pKLC102 – verwandte Geninsel besaß, zeigte somit in diesem Versuch eine verminderte Virulenz im Vergleich zum pKLC102 – freien Stamm C5. Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen. Vermutet worden war, dass ein Stamm, welcher eine pKLC102 – verwandte Geninsel aufweist, in diesem Modell auch erhöhte Virulenz zeigt. Grundlage dieser Überlegungen waren die auf pKLC102 lokalisierten potentiellen Virulenzgene. Deren Homologe in der Pathogenitätsinsel PAPI – 1 kodieren für Proteine, die mit Hilfe von Infektionsversuchen in Mäusen nachgewiesen, als Virulenzfaktoren charakterisiert wurden (He et al., 2004).

In diesem Fall würde es bedeuten, dass die pKLC102 – verwandte Geninsel in C2 bzw. die von ihr codierten Proteine an der Virulenz in diesem Modell unbeteiligt sind.

**Tabelle 3.8: Abtöten von *C. elegans* durch *P. aeruginosa* im „Fast - killing“ – Assay in %**

Stamm	0 h	11 h	28 h
DH5 $\alpha$	0%	0%	0%
C2	0%	4%	5%
C5	0%	8%	23%
SG17M	0%	86%	88%

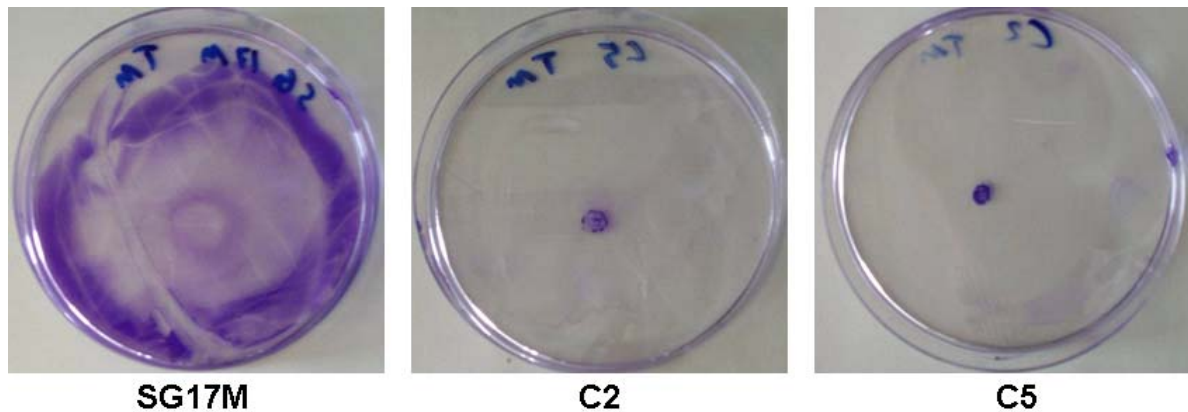
linke Spalte: Bezeichnung der verwendeten Bakterienstämme;  
obere Zeile: Inkubationszeit [h]

### **3.5.2 Analysen verschiedener *P. aeruginosa* Stämme auf die Fähigkeit zur „Twitching Motility“**

„Twitching motility“ ist eine Fähigkeit der Bakterien, sich mit Hilfe ihrer Typ IV Pili fortzubewegen. Diese Fähigkeit spielt eine entscheidende Rolle bei der initialen Gewebebesiedlung (z.B. der CF – Lunge) (Hahn 1997) und der Ausbildung von Biofilmen in einem späteren Infektionsstadium (Klausen et al., 2003).

CF-Isolate sind aufgrund fehlender Typ IV Pili meist nicht motil (Luzar et al., 1985). Da die pKLC102 – ORFs CP33 – CP42 für Typ IV Pili codieren, wurde anhand dieses Assays überprüft, ob ein unterschiedliches „Twitching“ der beiden isoklonalen Varianten C2 und C5 beobachtet werden kann. Als Positivkontrolle wurde der Stamm SG17M verwendet. Bei diesem handelt es sich um ein Umweltisolat, dessen Fähigkeit, sich mit Typ IV Pili auf Oberflächen zu bewegen, in früheren Experimenten nachgewiesen wurde.

**Abbildung 3.26: Analysen verschiedener *P. aeruginosa* Stämme auf die Fähigkeit zur „Twitching Motility“**



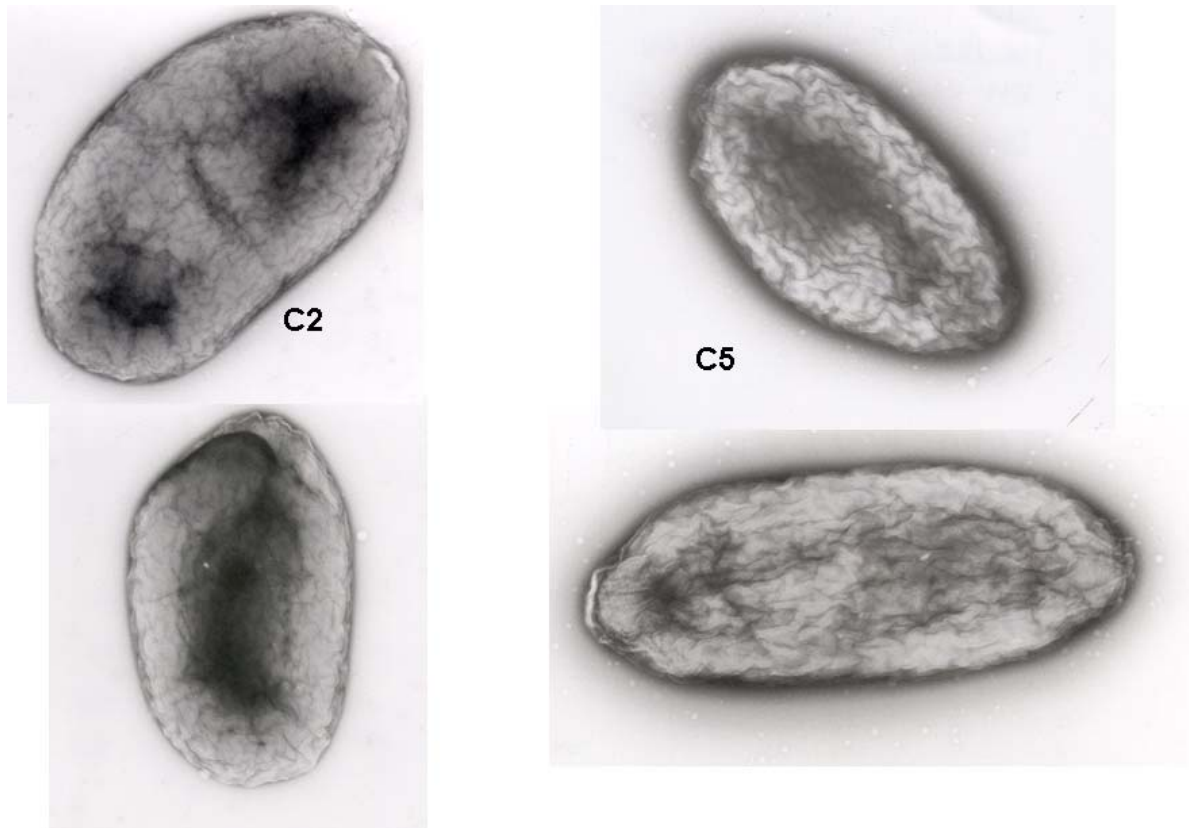
Drei unterschiedliche *P. aeruginosa* Stämme wurden für diese Analyse verwendet: die beiden isoklonalen Klon C – Stämme C2 / C5 und SG17M als Positivkontrolle.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.26 zeigen, wiesen beide untersuchten isoklonalen Varianten kein nachweisbares „Twitching motility“ im Vergleich zur Positivkontrolle SG17M auf. Unterschiede zwischen C2 und C5 konnten dabei nicht detektiert werden. Die von pKLC102 codierten Typ IV Pili spielen demnach keine Rolle für das „Twitching“ – Verhalten der untersuchten Isolate und unterstützen die von Klockgether et al. (2004) postulierte Funktion als Sex – Pili.

### **3.5.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen isoklonaler *P. aeruginosa* Stämme**

Da 60 der 105 putativen ORFs auf pKLC102 als hypothetisch oder konserviert hypothetisch klassifiziert sind, war nicht auszuschließen, dass sie eine Auswirkung auf den Phänotyp der pKLC102 besitzenden Stämme haben könnten. Um zu überprüfen, ob phänotypische Unterschiede zwischen ihnen zu erkennen sind, wurden elektronenmikroskopische Bilder der Stämme C2 und C5 angefertigt (siehe Abbildung 3.27).

**Abbildung 3.27: Elektronenmikroskopiebilder der isoklonalen *P. aeruginosa* Stämme C2 und C5**



(die Bilder wurden angefertigt von Dr. M. Rohde, HZI, Braunschweig)

Wie in Abbildung 3.27 zu sehen, sind keine Unterschiede zwischen den beiden Bakterienstämmen zu erkennen. Die Präsenz von pKLC102 im Genom scheint also keinen Einfluss auf den äußeren sichtbaren Phänotyp der pKLC102 besitzenden Bakterien zu haben. Das Fehlen von Typ IV Pili bestätigt ebenfalls die in 3.5.2 durchgeführten „Twitching motility“ – Versuche.

#### **3.5.4 Analyse der Siderophorenproduktion isoklonaler Varianten**

*P. aeruginosa* bildet die Siderophore Pyochelin und Pyoverdin (Cornelis und Matthijs, 2002). Diese werden von den Bakterien produziert, um hochaffin  $\text{Fe}^{2+}$  - und  $\text{Fe}^{3+}$  - Ionen zu komplexieren und in die Zelle aufzunehmen.

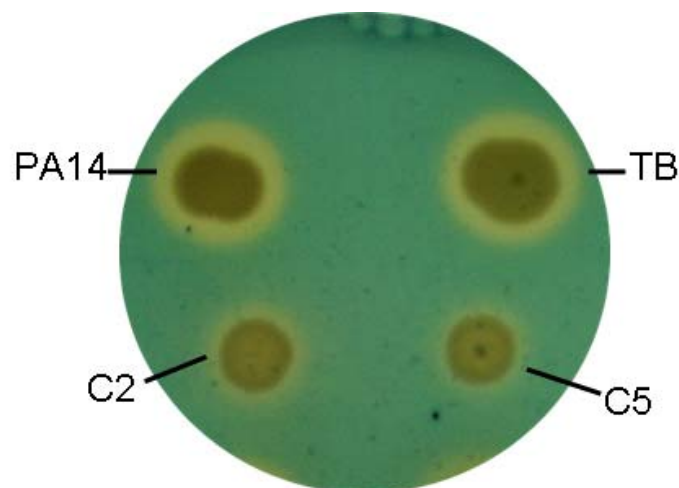
Für diese Untersuchungen wurde ein Medium verwendet, welches Fe (III) als dreifachen Komplex mit einem Farbstoff Chromazurol S (CAS) und dem Detergenz Hexadecyl –

Trimethylammonium Bromid (HDTMA) enthält. Wird diese CAS – Indikator – Agarplatte mit Bakterien beimpft, die in der Lage sind, Siderophore zu produzieren und in das umgebende Medium zu sezernieren, können diese Siderophore die Fe (III) – Ionen aus dem Chromazurol S / HDTMA – Komplex herauslösen. Dadurch verändert sich die Farbe des Farbstoffes von blaugrün zu orange. Bakterienkolonien, die Siderophore sezernieren, weisen dadurch einen orangefarbenen Hof auf. Die Größe des entstehenden Hofes ist abhängig von der Siderophoreproduktion.

Um zu analysieren, ob pKLC102 Einfluss auf die Siderophorenproduktion der beiden Stämme C2 und C5 hat, wurden diese auf den oben beschriebenen Platten inkubiert. Als Positivkontrollen wurden die *P. aeruginosa* Stämme PA14 und TB (CF – Isolat) verwendet, für die beide schon in früheren Versuchen nachgewiesen wurde, dass sie Siderophore sezernieren.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.28 zeigen, dass in keinem der untersuchten Stämme C2 und C5 Unterschiede in der Siderophorenproduktion detektiert werden konnten. pKLC102 scheint dem Stamm C2 keinen Vorteil im Bezug auf die Sezernierung von Siderophoren gegenüber dem Stamm C5 zu verleihen. Beide Stämmen zeigten einen deutlich kleineren Hof um die Bakterienkolonie, als er für die Positivkontrollen zu sehen war.

**Abbildung 3.28: Nachweis der Siderophorenproduktion auf Chrom Azurol S – Platten**



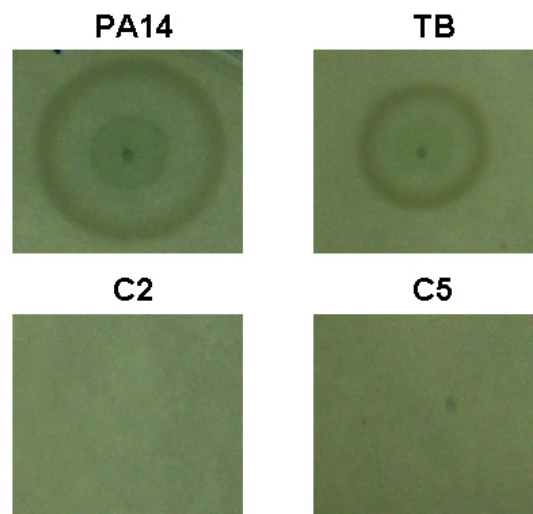
**Vier unterschiedliche *P. aeruginosa* Stämme wurden für diese Analyse verwendet: die beiden isoklonalen Klon C – Stämme C2 (besitzt pKLC102) und C5 (besitzt kein pKLC102). Als Positivkontrollen wurden die Stämme PA14 und TB verwendet.**



### **3.5.5 Untersuchung der Proteaseaktivität isoklonaler *P. aeruginosa* Varianten**

*P. aeruginosa* produziert verschiedene Proteasen wie LasB, alkalische Protease und Protease IV (Cowell et al., 2003). Diese Proteasen stellen Virulenzfaktoren dar, die unter der Kontrolle des „Quorum Sensing“ – Systems stehen, und in der Lage sind, Casein zu degradieren. Mit Hilfe von Caseinplatten wurde untersucht, ob die Bakterien in der Lage sind, Casein als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Sind die Bakterien in der Lage, Casein abzubauen und es für ihren Metabolismus als Kohlenstoffquelle zu nutzen, kann dies durch die Bildung eines weißen Rings um die Bakterienkolonie detektiert werden. Sind sie nicht in der Lage, Casein abzubauen, könnte dies auf einen Defekt des Typ II Sekretionssystems in den Protease – codierenden Genen oder in den “Quorum Sensing” Systemen, die die Sezernierung regulieren (Passador et al., 1993), hindeuten.

**Abbildung 3.29: Vergleich isoklonaler *P. aeruginosa* Varianten auf Proteaseaktivität nach Wachstum auf Caseinplatten**



Verglichen wurden die beiden isoklonalen Klon C – Stämme C2 (besitzt pKLC102) und C5 (besitzt kein pKLC102). Als Positivkontrollen wurden die Stämme PA14 und TB verwendet.

Die Ergebnisse des Caseinassays sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Die beiden Positivkontrollen PA14 und TB sind beide in der Lage Proteasen zu produzieren und zu sezernieren. Für die beiden Stämmen C2 und C5 konnte kein Unterschied bezüglich ihrer

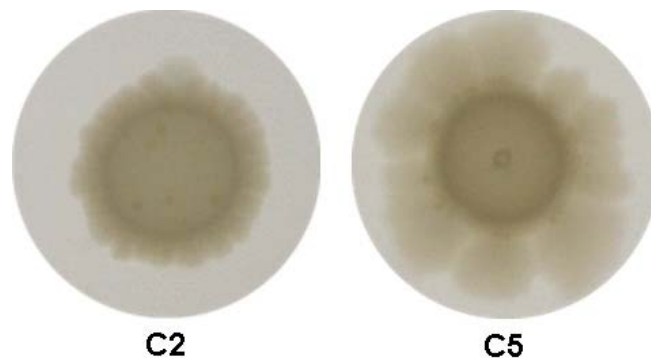
Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Im Versuch erwiesen sich beide als defizient im Caseinabbau und waren nicht in der Lage, auf Caseinagar zu wachsen.

Weiterhin wurden auch die beiden Klon C Stämme C20 (besitzt pKLC102) und C21 (besitzt kein pKLC102) auf ihre Proteaseaktivität untersucht. In diesem Versuch wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Varianten detektiert (Bilder nicht gezeigt).

### **3.5.6 Wachstumvergleich isoklonaler Varianten auf LB – Agar**

In diesem Versuch wurden die beiden Stämme C2 und C5 bezüglich ihres Wachstums auf LB – Agar verglichen. Hierfür wurden die LB - Platten mit je 3 µl einer Bakterienkultur  $OD_{578nm}$  0,5 beimpft und anschließend für drei Tage bei 37°C inkubiert.

**Abbildung 3.30: Wachstumsvergleich isoklonaler Varianten auf LB - Agar**



**Wachstum der Stämme C2 (besitzt pKLC102) und C5 (besitzt kein pKLC102) auf LB – Agarplatten nach drei Tagen Inkubation bei 37°C**

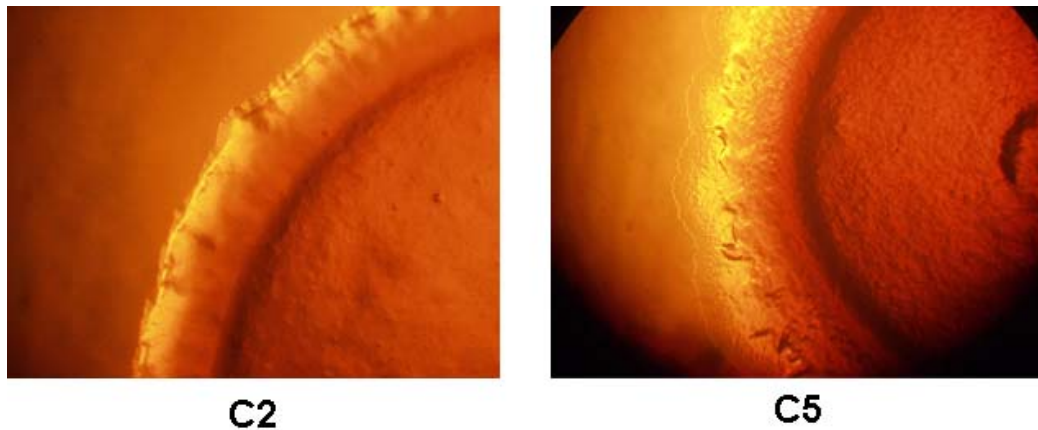
Abbildung 3.30 zeigt deutliche Unterschiede im Wachstum der verschiedenen isoklonalen Varianten. Stamm C2, in dessen Genom pKLC102 integriert ist, zeigt ein gleichmäßiges Ausschwärmen der Bakterien in den Randzonen der Kolonie. Bei Stamm C5, der kein pKLC102 aufweist, schwärmen einige Bakterien der Kolonie schneller und im Verbund mit anderen als der Rest der Kolonie.

### **3.5.7 Vergleich der Koloniemorphologie isoklonaler Varianten auf Kongorot – Agar**

Kongorot bindet unspezifisch an verschiedene Typen von Exopolysacchariden, aber auch an einige Proteine auf der Zelloberfläche von Bakterien (Römling, 1998). Durch Wachstum der Bakterien auf Kongorot – Agar kann die Morphologie der verschiedenen *P. aeruginosa* Kolonien analysiert werden.

Das Ergebniss dieses Versuchs für die beiden C - Stämme C2 und C5 ist in Abbildung 3.31 dargestellt.

**Abbildung 3.31: Morphologieuntersuchung der Klon C - Stämme C2 und C5 auf Kongorot – Agar**



Beide Bilder wurden mit Hilfe einer Digitalkamera durch das Okkular eines Durchlichtmikroskopes aufgenommen.

Dieser Versuch verdeutlicht noch einmal die schon in 3.5.6 gezeigten Unterschiede im Schwärmen der beiden Klon C – Stämme. Der pKLC102 besitzende Stamm C2 zeigt ein gleichmäßiges Schwärmen der gesamten Bakterien am Rand der Kolonie, wohingegen beim Stamm C5, der kein pKLC102 besitzt, deutlich zu erkennen ist, dass die Bakterien der äußersten Randzone stärker ausschwärmen als der Rest der Kolonie.

### **3.5.8 Vergleich verschiedener Klon C – Stämme auf Resistenz gegen oxidativen Stress**

Phagozytierende Zellen gehören u. a. zu den Zellen der primären Immunantwort beim Menschen. Zu ihnen gehören die Makrophagen, die eingedrungene Erreger vor allem durch Phagozytose eliminieren. Weitere zur Phagozytose befähigte Zellen sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs). Sie sind kurzlebig und wandern nur bei Entzündung ins Gewebe ein. PMNs sind in der Lage, Bakterien zu phagozytieren. Hierbei werden die Bakterien von Phagosomen umschlossen. In diesen werden die Bakterien nach dem Verschmelzen mit Lysosomen abgetötet. Außerdem erzeugen Phagozyten eine Reihe von für Bakterien toxische Metabolite, z.B. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) und Stickstoffmonoxid (NO) (Roitt et al., 1995).

Zur Simulation dieser Bedingungen wurden die *P. aeruginosa* Klon C – Stämme C2, C20 (beide besitzen pKLC102) und C5, C21 (beide besitzen kein pKLC102) auf ihre Sensitivität für oxidativen Stress getestet. Hierfür wurde das Wachstum auf LB – Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $H_2O_2$  getestet.

Das Ergebniss dieses Versuchs ist in Tabelle 3.9 dargestellt.

**Tabelle 3.9: Maximal tolerierte  $H_2O_2$  - Konzentration der Bakterien**

$H_2O_2$ - Konzentration	Bakterienstämme
4,8 mM	C2, C20, SG17M, PA14, TB
2,4 mM	C5, C21

Untersucht wurden die Stämme C2, C20 (beide besitzen pKLC102), C5, C21 (beide besitzen kein pKLC102) und die Vergleichsstämme SG17M, PA14 und TB

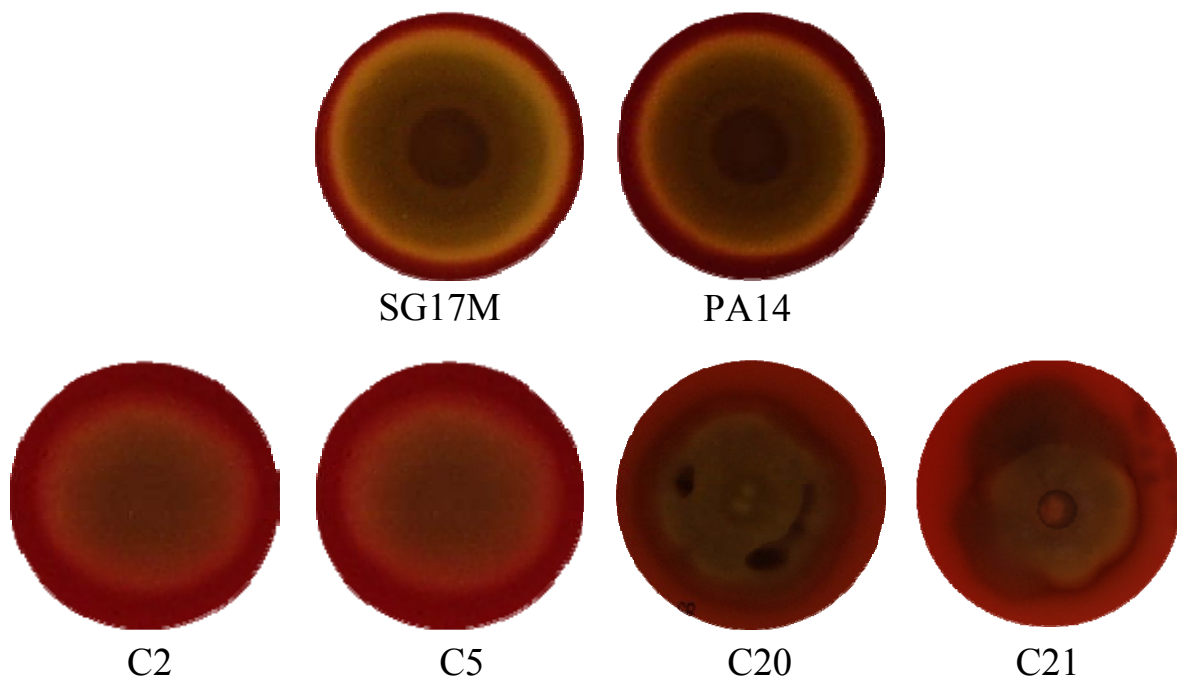
Das Ergebnis dieses Versuchs zeigte, dass die Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid für die nicht pKLC102 – besitzenden Bakterien (C5, C21) leicht eingeschränkt war. Da sich die untersuchten Stämme lediglich in der An- bzw. Abwesenheit von pKLC102 unterschieden, könnte pKLC102 das Wachstum der Stämme C2 und C20 positiv beeinflusst haben. Die hypothetischen Funktionsvorhersagen der pKLC102 – ORFs weisen hingegen keine Verbindung zur  $H_2O_2$  - Resistenz auf. Vielleicht ist der zu beobachtende Unterschied auf einige der hypothetischen Proteine zurückzuführen.

### 3.5.9 Analyse der Hämolyseaktivität unterschiedlicher Klon C – Stämme

Beim Wachstum von *P. aeruginosa* auf Blutagarplatten kommt es zur Lyse der Erythrozyten des in diesen Platten enthaltenen Blutes (Hämolyse). Sie wird durch verschiedene Virulenzfaktoren, sog. Hämolsine (wie z.B. Phospholipasen), ausgelöst. Die Kolonien sind hierbei von einem klaren bis gelblichen Hämolysehof umgeben.

Um die hämolytischen Eigenschaften der Klon C - Stämme C2 und C20 (beide besitzen pKLC102) sowie C5 und C21 (beide besitzen kein pKLC102) zu vergleichen, wurden diese bei 37°C für drei Tage auf Blutagarplatten kultiviert. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 3.32 dargestellt.

**Abbildung 3.32: Vergleiche verschiedener *P. aeruginosa* Stämme bezüglich ihrer hämolytischen Eigenschaften**



Die Klon C – Stämme C2 und C20 (beide besitzen pKLC102) sowie C5 und C21 (beide besitzen kein pKLC102) wurden bezüglich ihrer Hämolyseaktivität auf Blutagarplatten untersucht. Als Positivkontrollen dienten die Stämme SG17M und PA14

Vergleiche der Stämme C2 und C5, sowie C20 und C21 zeigten keine Unterschiede in ihren hämolytischen Eigenschaften.

Ein Vergleich mit den Positivkontrollen SG17M und PA14 zeigt, dass alle vier untersuchten Stämme ein geringeres Hämolysevermögen aufwiesen.

Die Phänotypvergleiche der beiden isoklonalen Varianten C2 und C5 sowie der beiden Isolate C20 und C21 ergaben kaum Unterschiede. Das Verhalten war charakteristisch für attenuierte Stämme, die sich an ein bestimmtes Habitat (in diesen Fällen die Lunge eines CF – Patienten: C2 und C5, sowie dem Rachenraum eines CF – Patienten: C20 und C21) angepasst haben. Dieses ist eine Erklärung für die geringere Produktion an Siderophoren (siehe Kapitel 3.5.4), Hämolytinen (siehe Kapitel 3.5.9) und die herabgesetzte Proteaseaktivität (siehe Kapitel 3.5.5)

Ebenso wurde für Stämme, die einen Patienten chronisch infizieren, gezeigt, dass sie keine Motilität mehr aufweisen, konform mit den Ergebnissen in Kapitel 3.5.2 und 3.5.3.

Die Unterschiede bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber oxidativem Stress ( $H_2O_2$ ; siehe Kapitel 3.5.8) könnten durch die Integration von pKLC102 verursacht worden sein, da die pKLC102 - negativen Stämme nur bei geringerem oxidativen Stress wachsen konnten. Keiner der annotierten pKLC102 - ORFs weist Ähnlichkeiten zu Genen bekannter Funktion auf, die hier einen positiven Einfluss haben könnten. Die Ursache für die verstärkte Wasserstoffperoxidtoleranz könnte also in einem der ORFs liegen, die unbekannte Proteine zu codieren scheinen.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die in pKLC102 annotierten Typ IV Pili keine Rolle für ein eventuelles „Twitching Motility“ - Vermögen der jeweiligen Stämme spielen. Beide analysierten Isolate (C2 und C5) zeigten nur eine sehr geringe „Twitching Motility“. Elektronenmikroskopische Untersuchungen beider Stämme zeigten ebenfalls keine Anwesenheit von Typ IV Pili. Es wird daher angenommen, dass es sich bei ihnen, wie von Klockgether et al. (2004) annotiert, um Typ IV Sex - Pili handelt. Diese sind filamentöse Proteinstrukturen, die am Austausch von genetischem Material zwischen Bakterien beteiligt sind. Die Plasmid – Konjugation könnte mit Hilfe dieser Sex – Pili erfolgen.

## **4. Diversität pKLC102 – verwandter Geninseln in *P. aeruginosa***

### **4.1 Vergleich der Geninseln pKLC102 und PAPI - 1**

Die Geninsel pKLC102 wurde zuerst in *P. aeruginosa* Klon C – Stamm C (Isolat aus CF-Lunge) detektiert (Klockgether et al., 2004). Die Pathogenitätsinsel PAPI – 1 wurde im Stamm PA14 (Brandwundenisolat) gefunden (He et al., 2004).

pKLC102 und PAPI - 1 inserieren in das gleiche tRNA<sup>Lys</sup> – Gen des zu PAO1 homologen ORFs PA4541.1. Beide Inseln weisen eine mosaikartige Struktur, die aus einem konservierten Grundgerüst mit 75 homologen ORFs besteht, und Bereichen, in denen stammspezifische DNA inseriert ist, auf.

Mutationsanalysen verschiedener Gene der Pathogenitätsinsel PAPI - 1 haben ergeben, dass mindestens 19 ORFs zur Virulenz in Maus– und Pflanzeninfektionsmodell beitragen (He et al., 2004). 12 dieser potentiellen Virulenz – ORFs sind mit hoher Homologie auch in pKLC102 zu finden. Mindestens drei weitere pKLC102 - ORFs kodieren putative Virulenzfaktoren. Der ORF CP94 kodiert für ein potentielles ChvB - Protein, eine cyclo-β-(1,2)-Glucan-Synthetase. Solche Proteine sind essentiell für die Interaktion zwischen bakteriellen Spezies und eukaryontischem Wirt (De Iannino et al., 1998). Aus diesem Grund wurde das *chvB*-Gen als wichtige Komponente für die Besiedlung von Wirtsgewebe und / oder Virulenzfaktor charakterisiert. Des Weiteren wurden auf pKLC102 mit CP57 (putatives Polyketid-Synthase-Gen) und CP26 (besitzt eine *VagC*-Domäne, die nicht weiter klassifizierten putativen Virulenz-assoziierten Proteinen zugeschrieben wird) zwei weitere mögliche Virulenzgene detektiert (Klockgether et al., 2004). Alle drei befinden sich im stammspezifischen Abschnitt von pKLC102 und sind nicht in PAPI – 1 konserviert.

Der einzige Abschnitt der pKLC102 – Sequenz, der eine hohe Ähnlichkeit zu PAO1 aufwies, war das Chemotaxisoperon CP84 – CP86. Dieses befand sich ebenfalls im stammspezifischen Abschnitt von pKLC102 und war nicht in PAPI – 1 konserviert.

In pKLC 102 sind verschiedene potentielle Gene, die für die Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA eine Rolle spielen könnten, detektiert worden. Hierunter befanden sich u.a. Gene für die Ausbildung von Sex – Pili, ein *traI*- Relaxase-Gen, ein *soj* – Gen zur Chromosomenaufteilung und ein *xerC*-Integrase-Gen. Alle ORFs wurden mit hoher Sequenzidentität auch in PAPI – 1 gefunden, so dass auf beiden Geninseln scheinbar alle nötigen Komponenten für die Plasmid-Konjugation kodiert sind.

Mikroarray Analysen unseres Labors, bezüglich des Vorkommens der beiden Geninseln in Umwelt- und Patientenisolaten, ergaben, dass PAPI – 1 in beiden Habitaten gleich stark vertreten ist. pKLC102 wurde hingegen häufiger in Umweltisolaten als in CF – Isolaten identifiziert (unveröffentlichte Daten, L. Wiehlmann).

Die Geninsel pKLC102 vermittelt den *P. aeruginosa* Stämmen, die z. B. in den Lungen von CF – Patienten vorkommen, demnach keinen Vorteil. Im Gegensatz dazu ist die Integration der Geninsel PAPI – 1 ins Genom für Umwelt- sowie Patienten – Isolate von gleichbleibendem Nutzen. Ein möglicher Grund könnten sieben Virulenzfaktoren, die im stammspezifischen Teil der Insel PAPI – 1 codiert sind, sein. Für diese wurde nachgewiesen, dass sie für die Virulenz im Maus- und Pflanzenmodell eine Rolle spielen (He et al., 2004).

In Kapitel 3.1.2 wurde gezeigt, dass pKLC102 stärker in der stationären als in der logarithmischen Wachstumsphase in den Bakterien mobilisiert wurde. Zumindest im *in vitro* Modell scheint pKLC102 in der stationären Wachstumsphase eine geringere Rolle zu spielen. Für Bakterien, die längere Zeit in einem Habitat mit gleich bleibenden Bedingungen leben, wurde nachgewiesen, dass eine Genomoptimierung stattfindet (Ochman und Davalos, 2006). Es kommt zu einer Deletion der nicht essentiell in diesem Habitat benötigten Gene. Ein Beispiel sind die in Kapitel 3.5.2 dargestellten Ergebnisse. *P. aeruginosa*, die längere Zeit in der CF – Lunge leben, verlieren ihre Typ IV Pili, da sie keine neuen Habitate kolonisieren müssen. Außerdem werden so Angriffe des Immunsystems durch z. B. Pili – spezifische Antikörper vermieden. pKLC102 könnte also ebenfalls durch eine Optimierung des Bakteriengenoms verloren gehen.

Bei in der Umwelt (z.B. dem Boden) vorkommenden pathogenen Bakterien, kommt es dagegen zu einer Akquirierung neuer Gene und mobiler Elemente (z. B. Geninseln), um sich besser wechselnden Lebensbedingungen anpassen zu können (Ochman und Davalos, 2006).

Diese Beobachtungen decken sich mit dem oben beschriebenen Vorkommen von pKLC102. pKLC102 und PAPI - 1 integrieren in das tRNA<sup>Lys</sup> Gen des zu PAO1 homologen ORFs PA4541.1. und sind in der Lage, sich durch Exzision aus dem Genom zu entfernen. Hierbei wurde für pKLC102 beobachtet, dass die Exzisionrate von der frühlogarithmischen bis zur spätstationären Wachstumsphase zunimmt, wohingegen sie bei PAPI – 1 zu allen Zeitpunkten der untersuchten Wachstumsphasen konstant blieb (siehe Kapitel 3.1.2). Die Integration und Exzision dieser wird wahrscheinlich durch die in beiden Inseln codierte XerC - Integrase nach einem phagenartigen Mechanismus katalysiert.



Beide Geninseln sind als episomale Elemente in den jeweiligen Bakterienstämmen zu finden. Hierbei beträgt die Anzahl an pKLC102 Plasmiden zwischen drei und 30 pro Zelle, wohingegen im Stamm PA14 nur in 2% der Bakterien episomale Elemente detektierbar sind (siehe Kapitel 3.1.2). pKLC102 ist demnach in der Lage, sich in den jeweiligen Bakterien selbstständig zu replizieren, wohingegen PAPI – 1 diese Fähigkeit entweder verloren oder nie besessen hat. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine in PAPI – 1 nicht konservierte *oriV* – Struktur sein. Der rechte Teil in pKLC102 besteht aus 16 hochkonservierten wiederholten Basenabfolgen (*direct repeats*) von 57 bp Länge die u.a. Bindungsstellen für Replikationsstellen darstellen könnten (siehe Kapitel 3.2.5). Da alle Gene, die laut Annotation, für die Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA eine Rolle spielen könnten, in beiden Geninseln konserviert sind, ist die unterschiedliche *oriV* – Struktur ein entscheidender Faktor. Allerdings könnten auch Abweichungen in der Sequenzidentität der nicht zu 100% konservierten oben genannten Gene eine Rolle spielen.

Aufgrund seines funktionellen Plasmidmoduls stellt pKLC102 die Geninsel mit der höchsten bisher bekannten Mobilität dar. Da die Geninselnzusammensetzung Merkmale von Phagen- und Plasmidintegration aufweist, stellt pKLC102 die Zwischenstufe eines mobilen genetischen Elements und einer Geninsel dar.

Aufgrund der oben erwähnten hohen Ähnlichkeiten dieser Elemente wird angenommen, dass beide von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen und die Unterschiede im spezifischen Bereich auf verschiedene Rekombinationsereignisse im Laufe der Evolution zurückzuführen sind.

Eine weitere pKLC102 – verwandte Geninsel wurde von Kulasekara et al. (2006) beschrieben. In der 88 kb großen ExoU Insel A wurden 33 ORFs mit hoher Homologie zu pKLC102 – ORFs detektiert. Die ExoU Insel A codiert für den Virulenzfaktor ExoU. In pKLC102 und PAPI – 1 wurden keine *exoU* homologen ORFs detektiert. Ähnlich wie pKLC102 und PAPI – 1 weist auch die ExoU Insel A einen niedrigeren GC – Gehalt als das Gesamtgenom des Referenzstammes PAO1 (66,6%) auf.

Insertionspunkt ins Genom war ebenfalls ein  $tRNA^{Lys}$  - Gen. Allerdings integrierte die ExoU Insel A nicht wie pKLC102 in PA4541.1, sondern, wie die pKLC102 – verwandte Geninsel des Stammes PA7 (siehe Kapitel 3.2) in die identische  $tRNA^{Lys}$  (entspricht PA0976.1 im PAO1 – Genom).

Zu den detektierten homologen ORFs der ExoU Insel A zählt ein zum entsprechenden pKLC102 bzw. PAPI – 1 – ORF fast identisches *xerC* – Integrase Gen. Die flankierenden

TAGI – Sequenzen der ExoU Insel A waren zu 90% identisch mit den pKLC102 – verwandten Geninseln (siehe Kapitel 3.2).

Allerdings wurde innerhalb der Sequenz der ExoU Insel A kein *soj* – Gen, das für die Aufrechterhaltung der Eigenschaften von selbstständig replizierenden DNA – Elementen wichtig ist, detektiert. Ebenso fehlte eine duplizierte, verkürzte Kopie des 3` Endes der tRNA<sup>Lys</sup> – Sequenz (*attP* des freien Elements), wie sie in pKLC102 und PAPI – 1 gefunden wurde. Durch das Fehlen dieses tRNA – Abschnittes ist keine Exzision aus dem Chromosom mehr möglich (van der Meer et al., 2001).

Aufgrund der hohen Homologie zu pKLC102 / PAPI – 1 wurde von Kulasekara et al. (2006) postuliert, dass es sich bei der ExoU Insel A ebenfalls um eine pKLC102 – verwandte Geninsel handelt. Nach der Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläuferelement wurde zu einem späteren Zeitpunkt in einem Teil der pKLC102 – verwandten Geninseln das ExoU Gen integriert. Hiernach würde es zwei Gruppen von pKLC102 verwandten Geninseln in *P. aeruginosa* geben, die sich in der Präsenz bzw. der Abwesenheit des ExoU Gens unterscheiden.

#### **4.2 Vergleich pKLC102- und PAGI-2 – verwandter Geninseln**

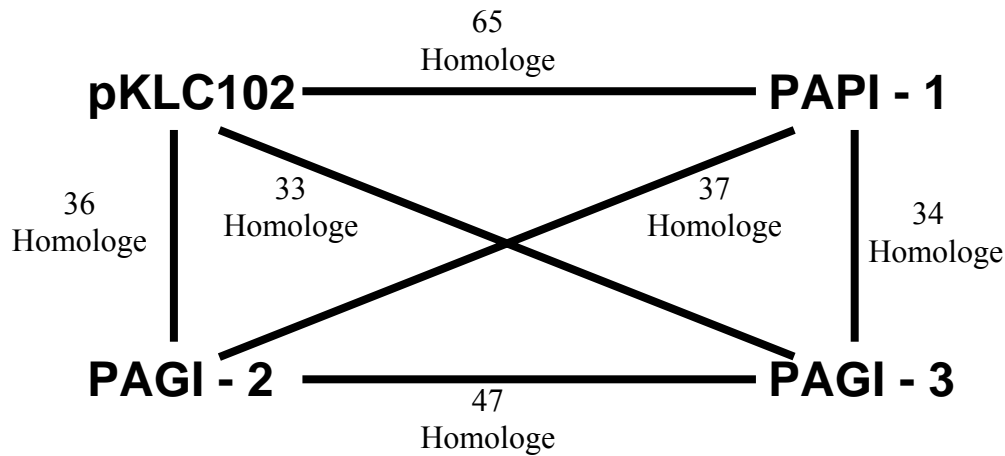
Die bisher im *P. aeruginosa* Genom detektierten Geninseln, mit Ausnahme von PAGI – 1 (Liang et al., 2001), inserieren in tRNA - Gene. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Typen von Inseln entdeckt, PAGI - 2 und PAGI - 3 (Larbig et al., 2002) sowie pKLC102 (Klockgether et al., 2004) - und PAPI - 1 (He et al., 2004) Geninseln. Allgemeine Charakteristika dieser Geninseln sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

**Tabelle 4.1: Allgemeine Charakteristika der Geninseln pKLC102, PAPI - 1, PAGI - 2 und PAGI - 3**

Geninsel	<i>P. aeruginosa</i> Stamm	Größe [kb]	GC-Gehalt	Anzahl der ORFs	Integrationspunkt im Genom	Integrasetyp
pKLC102	SG17M	104	60,9 %	105	tRNA <sup>Lys</sup>	XerC
PAPI - 1	PA14	108	59,7 %	115	tRNA <sup>Lys</sup>	XerC
PAGI - 2	C	105	64,7 %	113	tRNA <sup>Gly</sup>	P4
PAGI - 3	SG17M	103	59,2 %	106	tRNA <sup>Gly</sup>	P4

PAGI - 2 und PAGI - 3 wurden in den Klon C – Stämmen C (Isolat aus CF-Lunge) bzw. SG17M (Umweltisolat) detektiert. Beide inserieren in tRNA<sup>Gly</sup> - Gene Nahe des zu PAO1 homologen ORFs PA2820. Beide Inseln weisen eine zweigeteilte Struktur auf. Der erste Teil der Inseln, nahe des tRNA<sup>Gly</sup> – Gens, besteht aus inselspezifischer DNA („Cargo“). Im zweiten Teil befinden sich überwiegend ORFs, die in beiden Inseln konserviert sind. Zwischen diesen sind aber auch mosaikartig weitere Abschnitte inselspezifischer DNA zu finden. 47 ORFs sind in beiden Inseln gleich angeordnet und mit einer Aminosäureidentität von 35 – 88% konserviert.

Die Geninseln pKLC102, PAPI – 1, PAGI – 2 und PAGI – 3 inserieren in tRNA - Gene, die sich in zwei der drei hypervariablen Bereichen des *P. aeruginosa* Genoms befinden (Römling et al., 1995). Ein Vergleich der Gensequenzen von pKLC102, PAPI – 1, PAGI – 2 und PAGI – 3 zeigte, dass viele annotierte ORFs Homologien aufweisen (siehe Abbildung 4.1). Obwohl die Funktionen der meisten konservierten Gene zwischen diesen Inseln noch unbekannt ist, wird mindestens ein Teil eine Rolle für die Integration, Exzision oder den Transfer spielen.

**Abbildung 4.1: Homologe ORFs der Geninseln pKLC102, PAPI – 1, PAGI – 2 und PAGI – 3**

Untersuchungen des Oligonukleotidgebrauchs dieser vier Geninseln wurden von O. Reva durchgeführt. Hierbei wurden 5 kb große Abschnitte der Inseln in 0,5 kb Abständen auf ihre Tetranukleotidsignatur hin untersucht und mit den Ergebnissen für PAO1 verglichen (Klockgether et al., 2006a). Tetranukleotide sind Abschnitte von vier Basenpaaren, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung aus den vier Basen A, G, T und C in 256 verschiedenen Varianten auftreten können. Anhand der Häufigkeit ihres Auftretens ließen sich charakteristische konservierte Signaturen für verschiedene Bakteriengenome analysieren (Reva et al., 2004). Für alle vier Geninseln ergab sich eine unterschiedliche Tetranukleotidsignatur verglichen zu PAO1. Der Tetranukleotidgebrauch war innerhalb der Geninsel PAGI – 2 homogen. Innerhalb PAGI – 3, pKLC102 und PAPI – 1 fielen hingegen Regionen durch deutliche Abweichungen im Tetranukleotidgebrauch auf (Klockgether et al., 2006a).

Die verglichen zu PAO1 atypische Oligonukleotidsignatur und die Tatsache, dass alle vier Geninseln für ORFs codieren, die an der Mobilisierung dieser Inseln beteiligt sein könnten, ließen vermuten, dass die Inseln in der Lage sind, aus dem Bakteriengenom zu exzidieren. Wie in Kapitel 3.1 gezeigt wurde, trifft dies auf die Geninseln pKLC102 und PAPI – 1 zu. PCR – Analysen der Geninseln PAGI – 2 und PAGI – 3, die analog zu denen in Kapitel 3.1 beschriebenen durchgeführt wurden, waren negativ. Es konnten keine episomalen Elemente und auch kein geninselfreies Genom für PAGI – 2 und PAGI - 3 detektiert werden. Eine

mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Exzisionsrate unter  $1 \times 10^{-7}$  und damit außerhalb des in dieser Analyse detektierbaren Bereichs liegt.

Für die Geninsel PAGI – 2 wurden weiterhin Makroarray - Analysen durchgeführt, mit denen nachgewiesen wurde, dass PAGI – 2 ebenfalls spontan verloren gehen kann. Untersuchungen von Isolaten der Hannoveraner Stammsammlung zeigten einen vollständigen Verlust von PAGI – 2 in zwei Fällen. Eines dieser Isolate war ein C – Stamm, der 17 Jahre nach der Erstkolonisation keine PAGI – 2 Geninsel mehr besitzt (Klockgether et al., 2006a). Bei diesem Stamm handelt es sich um den in Kapitel 3.4 beschriebenen Klon C – Stamm C21, für den ebenfalls der Verlust der Geninsel pKLC102 (siehe Kapitel 3.4) nachgewiesen wurde. Spätere Isolate desselben Patienten zeigten, dass dieser mit einem anderen *P. aeruginosa* Klon infiziert war, der Klon C – Stamm jedoch nicht mehr zu detektieren war. Möglicherweise war C21 durch den Verlust einer oder beider Geninseln in seiner Fitness so stark beeinträchtigt, dass er durch einen anderen *P. aeruginosa* Klon verdrängt werden konnte.

## **5. Verbreitung von pKLC102-artigen Geninseln in anderen Bakterienstämmen**

Die pKLC102 – Sequenz zeigt auffällige Ähnlichkeiten zu denen der Geninseln PAPI – 1, PAGI – 2 und PAGI – 3. Für 15 der 36 homologen Gene, die zwischen den Geninseln pKLC102 und PAGI – 2 konserviert waren, wurden außerdem ähnliche Sequenzen in den Geninseln weiterer Proteobakterien detektiert (Klockgether et al., 2006b).

Durch Datenbankanalysen wurden von Mohd – Zain et al. (2004) mehr als 30 ähnliche Gene in den konservierten Bereichen unterschiedlicher Geninseln verschiedener  $\beta$ - und  $\gamma$  – Proteobakterien identifiziert.

Um das Vorkommen pKLC102 - homologer Proteine in anderen  $\beta$ - und  $\gamma$  – Proteobakterien zu analysieren, wurde unter Verwendung des Programms „PHI- and PSI-BLAST“ des NCBI die Sequenzdatenbank „GenBank®“ auf pKLC102 – verwandte Elemente untersucht.

Die gefundenen homologen Sequenzen wurden mit der kompletten Genomsequenz des jeweiligen Bakterienstammes verglichen. Wurden mehr als fünf homologe Sequenzen innerhalb eines 150 kb großen Bereichs des Bakteriengenoms lokalisiert, wurde dieser Bereich als potentielle Geninsel angesehen (siehe Abbildung 5.1). Jede Sequenz, die den oben aufgeführten Daten entsprach, wurde auf die Präsenz einer tRNA untersucht. Als weitere Grundlage dienten dabei die Ergebnisse der von Klockgether et al. (2006b) veröffentlichten Daten.

Für die *P. aeruginosa* Stämme PACS2, 2192, PA7, PA14 und C3719 wurde keine weitere „PHI- and PSI-BLAST“ – Suche durchgeführt, da ihre Homologie zu pKLC102 in Kapitel 3.2 analysiert wurde. Stattdessen wurden die in Abb. 3.8 dargestellten Ergebnisse des Vergleichs der Nukleotidsequenzen verwendet.

Eine genaue Auflistung aller untersuchten Bakterienstämme und der zugehörigen hypothetischen Geninseln ist in Tabelle 5.1 dargestellt.

Insgesamt wurden 46 verschiedene Sequenzabschnitte gefunden, die den oben genannten Kriterien entsprachen. Diese verteilten sich auf 27 verschiedene Taxa von  $\beta$ - und  $\gamma$  – Proteobakterien. 31 dieser Sequenzabschnitte integrierten in tRNA – Gene oder wurden in ihrer Nähe lokalisiert. 16 der analysierten Sequenzabschnitte waren bereits als Geninseln annotiert.

**Tabelle 5.1: Liste der Bakterienstämme, in denen pKLC102 – homologe Proteine detektiert wurden und ihre hypothetischen Geninseln**

Spezies	Stamm	Abk. in Abb. 5.1	Geninsel	tRNA	Quelle / Habitat	GenBank acc. Nr.
<i>Acidovorax avenae subsp. citrulli</i>	AAC00-1	38	-	-	pathogenes Pflanzenisolat	NZ_AASX00000000
<i>Acidovorax avenae subsp. citrulli</i>	AAC00-1	40	-	-	pathogenes Pflanzenisolat	NZ_AASX00000000
<i>Acidovorax avenae subsp. citrulli</i>	AAC00-1	39	-	Gln (?)	pathogenes Pflanzenisolat	NZ_AASX00000000
<i>Acidovorax sp.</i>	JS42	14	-	Cys	Isolat aus einem nitrobenzol-kontaminierten Sediment	NZ_AASD00000000
<i>Acidovorax sp.</i>	JS42	42	-	-	Isolat aus einem nitrobenzol-kontaminierten Sediment	NZ_AASD00000000
<i>Azoarcus sp.</i>	EbN1	13	-	Gly	Bodenisolat	NC_006513
<i>Azotobacter vinelandii</i>	AvOP	44	-	-	Bodenisolat	NZ_AASD01000020
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	406e	36	-	-	Klinikisolat Thailand	NZ_AAMM00000000
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	S13	23	-	-	Referenzisolat	NZ_AAHW00000000
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	G4	45	-	-	Teichwasserisolat (Industriemüll)	NZ_AAEH00000000
<i>Burkholderia xenovorans</i>	LB400	20	-	Gly	Isolat aus PCB enthaltender Geländeauffüllung	NC_007951 - NC_007953
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	CH34	12	PAGI-2	Gly	Isolat aus dem Bodensatz eines Tanks in Belgien	NC_007973
<i>Erwinia carotovora subsp. atroseptica</i>	SCRI1043	29	-	Phe	Pflanzenisolat (Kartoffel)	NC_004547
<i>Haemophilus ducreyi</i>	35000HP	37	-	Gly / Phe ?	Humanisolat	NC_002940
<i>Haemophilus influenzae</i>	86-028NP	30	(ICEHin1056)	Leu	Klinikisolat	NC_007146
<i>Haemophilus influenzae</i>	1056	24	ICEHin1056	-	Humanisolat (Blut)	AJ627386
<i>Haemophilus influenzae</i>	R2866	25	-	-	Humanisolat (Blut)	NZ_AADP00000000
<i>Haemophilus somnus</i>	129PT	26	-	Asn (?)	Tierisolat (Mucus)	NZ_AABO00000000
<i>Haemophilus somnus</i>	2336	28	-	-	bovines Isolat (Lungenentzündung)	NZ_AACJ00000000
<i>Haemophilus somnus</i>	2336	27	-	-	bovines Isolat (Lungenentzündung)	NZ_AACJ00000000
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	C71	22	-	Gly	Bodenbakterium	NZ_AAJE00000000
<i>Photobacterium luminescens subsp. laumondii</i>	TTO1	31	-	Phe	Nematoden-symbiont	NC_005126
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C	6	PAGI-2	Gly	Humanisolat (CF)	AF440523
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SG17M	7	PAGI-3	Gly	Flussisolat	AF440524
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PACS2	1	(pKLC102)	Lys	Klinikisolat	NZ_AAQW00000000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA7	3	(pKLC102)	Lys	Humanisolat (CF)	NZ_AAQE00000000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA14	4	PAPI-1	Lys	Klinisches Isolat	AY273869
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2192	2	(pKLC102)	Lys	Humanisolat (CF)	NZ_AAKW00000000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C3719	5	(pKLC102)	Lys	epidemischer Stamm, Manchester	NZ_AAKV00000000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6077	41	ExoU island A	Lys	Humanisolat (Augeninfektion)	DQ437742

Spezies	Stamm	Abk. in Abb. 5.1	Geninsel	tRNA	Quelle / Habitat	GenBank acc. Nr.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pf-5	8	-	Lys	Pflanzen Kommensale	NC_004129
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PfO-1	18	-	Leu	Bodenisolat (Agrarfläche)	NC_007492
<i>Pseudomonas putida</i>	F1	17	-	-	Flussisolat, Urbana	NZ_AALM00000000
<i>Pseudomonas putida</i>	RR21	16	<i>clc</i> -element	Gly	Derivat der Stammes F1 auf den das <i>clc</i> - element des Stammes B13 übertragen wurde	CAE92954.
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. phaseolicola</i>	1302A	10	PPHGI-1	Lys	Pflanzenisolat (Bohne)	AJ870974
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i>	B728a	9	(PPHGI)	Lys	Pflanzenisolat (Brechbohne)	NC_007005
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv.</i>	DC3000	43	-	-	Pflanzenisolat (Tomate)	NC_004578
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	PM1	15	-	-	Abwasserisolat (Klärwerk)	NZ_AAEM01000012
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. enterica serovar</i> <i>typhi</i>	CT18	32	SPI-7	Phe	Patientenisolat (Typhus)	NC003198
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. enterica serovar</i> <i>typhi</i>	Ty2	33	-	Phe	Patientenisolat (Typhus)	NC_004631
<i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>pv. citri</i>	306	19	-	-	Pflanzenisolat (Zitrone)	NC_003919
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. vesicatoria</i>	85-10	11	-	Gly	Extraktion aus Zellen	NC_007508
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. vesicatoria</i>	85-10	46	-	Gly	Extraktion aus Zellen	NC_007508
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. campestris</i>	8004	21	-	Gly (?)	Pflanzenisolat (Blumenkohl)	NC_007086
<i>Xylella fastidiosa</i>	9a5c	35	-	Gly	Pflanzenisolat (Orangenbaum)	NC_002488
<i>Yersinia</i> <i>pseudotuberculosis</i>	32777	34	YAPI	Phe	Patientenisolat	AJ627388

Bei homologen Sequenzen putativer Geninseln, die in der Literatur noch nicht bezeichnet sind, zu bekannten Inseln wurde der Geninselname in Klammern gesetzt

Konnte für eine putative Geninsel keine tRNA als Insertionspunkt ausgemacht werden, befand(en) sich diese tRNA(s) aber in der unmittelbaren Umgebung der Geninsel, wurde in der Tabelle ein Fragezeichen hinzugefügt.

Die meisten homologen Sequenzabschnitte wurden in den Genomen der Stämme *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* 1302A und *Pseudomonas syringae pv. syringae* B728A gefunden. Bei beiden Stämmen handelt es sich um Pflanzenisolate. Im Genom des Stammes 1302A ist die Geninsel PPHGI - 1 inseriert. Diese ist, wie pKLC102, in ein tRNA<sup>Lys</sup> – Gen integriert. Analysen von Pitman et al. (2005) ergaben, dass diese Geninsel ebenfalls aus dem Genom ausgeschnitten werden und als episomales Element in den jeweiligen Stämmen vorliegen kann. Im Stamm B728A ist eine zu PPHGI – 1 fast identische Insel, ebenfalls in ein tRNA<sup>Lys</sup> – Gen inseriert. Die Sequenzen beider Inseln weisen Ähnlichkeiten zu 55 möglichen pKLC102 – ORFs auf.

Im Stamm *Haemophilus somnus* 2336 wurden nur sechs homologe Sequenzabschnitte, und damit die wenigsten pKLC102 - homologen Proteine, detektiert. Bei diesem Stamm handelte



es sich um ein bovines Isolat, für das bisher noch keine Geninsel annotiert wurde. In der näheren Umgebung der pKLC102 – ähnlichen Sequenzen innerhalb des Genoms wurde kein tRNA – Gen detektiert. Möglicherweise stellen diese homologen Bereiche nur noch Überreste einer pKLC102 – verwandten Geninsel dar, die zu einem früheren Zeitpunkt ins Genom inseriert war und entweder nicht komplett ausgeschnitten oder durch Rekombinationsereignisse in ihrer Struktur verändert wurde. Ebenso ist es möglich, dass weitere Sequenzabschnitte eine zu hohe Diversität zur pKLC102 – Sequenz aufweisen und aus diesem Grund nicht gefunden werden konnten.

Insgesamt wurden mehr als 30 verschiedene pKLC102 – ähnliche Sequenzen in mehr als der Hälfte der untersuchten Stämme gefunden. Dabei wurde keine Präferenz bezüglich des Vorkommens pKLC102 – homologer Proteine in Umwelt- oder Klinikisolaten festgestellt.

Eine genaue Auflistung der am häufigsten gefundenen pKLC102 – ähnlichen Proteinsequenzen ist in Tabelle 5.2 aufgeführt. Fünf der 20 (siehe Abbildung 3.8) potentiellen pKLC102 ORFs, die für Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA eine Rolle spielen könnten, wurden in 50% der analysierten Sequenzen gefunden. Unter ihnen ist das Soj – Protein, für das eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Eigenschaften von selbstständig replizierenden DNA - Elementen postuliert wird (Kulasekara et al., 2006).

**Tabelle 5.2: Prozentuale Häufigkeit des Vorkommens pKLC102-ähnlicher Proteinsequenzen in 46 analysierten Geninseln**

<b>22 – 42% (13 insges.)</b>	<b>43 – 63% (10 insges.)</b>	<b>64 – 87% (23 insges.)</b>
CP14 – 26%	CP33 – 43% (PiL)	CP1 – 78% (Soj)
CP34 – 22% (PiIN)	CP51 – 50%	CP17 – 78%
CP37 – 22% (PiIQ)	CP54 – 48%	CP18 – 80%
CP38 – 22% (PiIR)	CP55 – 59%	CP19 – 80%
	CP56 – 54% (Helikase)	CP20 – 65%
CP41 – 22% (PiIV)		CP22 – 74% (Ssb)
	CP63 – 52%	
CP47 – 33%		CP46 – 76%
	CP74 – 59%	
CP49 – 33%		CP64 – 78%
	CP78 – 63%	CP65 – 74%
CP52 – 32%		CP66 – 67%
CP53 – 37%	CP80 – 59%	CP67 – 78% (TraG)
		CP68 – 83%
CP69 – 22% (Helikase)	CP83 – 52% (Membranprotein)	
		CP73 – 83%
CP82 – 24%		
		CP75 – 70%
CP90 – 39%		CP76 – 78%
		CP77 – 83%
CP103a – 37% (Integrase)		
		CP79 – 87%
		CP81 – 87%
		CP87 – 78%
		CP88 – 85%
		CP89 – 85% (Membranprotein)
		CP91 – 83%
		CP102 – 76%

**Rosa unterlegte Bereiche bezeichnen potentielle pKLC102 ORFs, die für Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA eine Rolle spielen könnten.**

**Die Prozentwerte wurden analog zum Farbcode der Absolutwerte aus Abbildung 5.1 gewählt.**

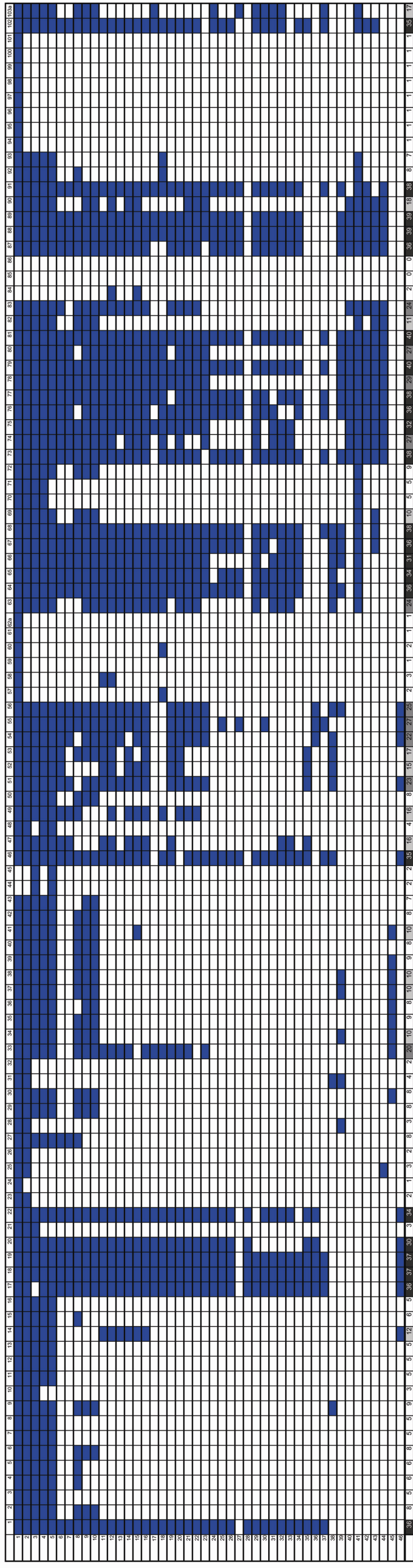
**Die Zahl in Klammern neben den Prozentwerten gibt die absolute Zahl an gefundenen ORFs für diesen Prozentbereich an.**

Abbildung 5.1 (am Ende dieses Kapitels) zeigt, dass alle analysierten Sequenzabschnitte eine mehr oder weniger stark konservierte, mosaikartige Struktur besitzen. Die meisten dieser Gene wurden schon von Mohd – Zain et al. (2004) einer Kernstruktur, die in vielen Geninseln konserviert ist, zugeschrieben. Die variablen Bereiche zwischen den Kernstrukturen codieren für stammspezifisches „Cargo“ der einzelnen Stämme.

Die untersuchten Geninseln scheinen alle zu einer Familie verwandter genomischer Inseln zu gehören, die einen gemeinsamen Vorläufer besitzen und sich im Laufe der Evolution durch z. B. Aufnahme weiterer mobiler Elemente (z. B. IS – Elemente), Deletionen, Umstrukturierungen u. ä. weiter verändert haben.

pKLC102 ist bisher die Geninsel mit der höchsten nachgewiesenen Mobilität. Viele der 20 potentiellen pKLC102 ORFs, die für Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA eine Rolle spielen könnten, wurden in den analysierten Sequenzen nicht gefunden. Dies ist ein möglicher Grund, warum bisher noch keine ähnlich mobile Geninsel wie pKLC102 detektiert wurde. Allerdings wurden diesbezüglich auch nur wenige Geninseln in der Literatur beschrieben. Die Konservierung aller dieser ORFs innerhalb der Geninsel und die *oriV* – Struktur könnten eine Ursache für die hohe Mobilität pKLC102s sein.

**Abbildung 5.1: Vorkommen pKLC102 – homologer Proteine in putativen Geninselsequenzen von  $\beta$ - und  $\gamma$  - Proteobakterien**



oberste Zeile: Nummern der analysierten pKLC102 – Proteine laut Annotation

linke Spalte: numerische Bezeichnung der in Tabelle 5.1 aufgeführten Stämme und putativen Geninselsequenzen

untere Zeile: Anzahl der jeweiligen pKLC102 homologen Proteine in allen untersuchten Stämmen

Farbcode der eingefärbten Kästchen:

weiss: 0 – 9 Stämme besitzen ein pKLC102 – homologes Protein

helles grau: 10 – 19 Stämme besitzen ein pKLC102 – homologes Protein

dunkleres grau: 20 – 29 Stämme besitzen ein pKLC102 – homologes Protein

schwarz: 30–40 Stämme besitzen ein pKLC102 – homologes Protein

## **6. Zusammenfassung: Mobile Geninseln in *P. aeruginosa***

Geninseln wurden in vielen Familien der Gattung *Pseudomonas* entdeckt. Die chromosomale Integration von Geninseln stellt neben der Aufnahme von Plasmiden und Phagen eine der Hauptursachen der Genomdiversität von *P. aeruginosa* dar.

Genomische Inseln weisen meist einen mosaikartigen Aufbau aus konservierten und stammspezifischen Bereichen auf. Die weite Verbreitung ähnlicher Geninseltypen weist auf Übertragung durch horizontalen Gentransfer hin. Ihre Integration findet meist durch ortsspezifische Rekombination nach einem phagenartigen Mechanismus statt. Insertionspunkte im Genom sind dabei meist tRNA – Gene. Je nach Funktion werden sie als Pathogenitätsinseln, Metabolismusinseln oder Resistenzinseln bezeichnet.

Die mobile Geninsel pKLC102 wurde zuerst in *P. aeruginosa* Klon C-Stämmen als Plasmid und ins Genom inserierte Geninsel detektiert. Sequenzanalysen der pKLC102 - DNA zeigten einen mosaikartigen Aufbau aus modulartigen Abschnitten mit Homologien zu anderen Spezies. Die Annotation der Geninsel pKLC102 ergab 105 mögliche ORFs, von denen 60 als hypothetisch oder konserviert hypothetisch klassifiziert wurden (Klockgether et al., 2004).

Durch Datenbankvergleiche mit den Genomsequenzen vier neusequenzierter *P. aeruginosa* Stämme wurden weitere pKLC102 – verwandte Geninseln entdeckt (siehe Kapitel 3.2). Diese vier homologen Inseln inserierten ebenfalls in tRNA<sup>Lys</sup> – Gene. Durch Sequenzvergleiche mit pKLC102 konnten ein konserviertes Grundgerüst und stammspezifische Bereiche innerhalb dieser Geninseln ermittelt werden. In diesen spezifischen Teilen ist individuell unterschiedliches „Cargo“ inseriert, das mit diesen Elementen transferiert werden kann. Viele der homologen ORFs der konservierten Bereiche codieren Proteine für die Stabilisierung und strukturelle Organisation der DNA in den Geninseln und zum DNA-Transfer. 20 ORFs, die vermutlich für Proteine codieren, die bei Konjugation, Rekombination und dem Transfer von DNA beteiligt sind, wurden in allen analysierten Geninselsequenzen mit hoher Homologie konserviert gefunden. Hierzu gehörte auch ein in allen Geninseln konserviertes *xerC* – Integrase – Gen. Die konservierten Regionen könnten somit eine Art Grundgerüst einer solchen „Familie“ mobiler Elemente bzw. der nach der Integration vorliegenden Geninseln darstellen. Unterschiede zwischen den analysierten Geninselsequenzen wurden im Aufbau des möglichen Replikationsursprungs *oriV* detektiert. Dieser besteht in pKLC102 aus 16 57 bp langen *direct repeats*. Diese Struktur ist in vier der fünf analysierten Geninseln

durch Deletionen bzw. Insertionen nicht konserviert. Ob diese unterschiedliche *oriV*-Struktur Auswirkungen auf die Replikation dieser Geninseln als episomales Element hat, müssen weitere Analysen zeigen.

Diese partielle Konservierung und der jeweils verwendete Phagen-ähnliche Integrationsmechanismus deuten auf eine Verwandtschaft dieser DNA-Elemente und die Entwicklung aus gemeinsamen Vorläufern hin.

Mit Hilfe pKLC102 – spezifischer Makroarrays wurden epidemiologische Untersuchungen durchgeführt. Diese Analysen zeigten eine weite Verbreitung pKLC102 – verwandter Geninseln innerhalb der Spezies *P. aeruginosa*. Analysiert wurden die Genome 50 verschiedener *P. aeruginosa* – Stämme unterschiedlicher Herkunft und Habitate (siehe Kapitel 3.3.2). In allen untersuchten Isolaten wurden partiell bzw. vollständig konservierte Geninseln detektiert. Anhand der konservierten pKLC102 - ORFs erfolgte eine Zuordnung zu verschiedenen Typen dieser Familie. Insgesamt wurden fünf verschiedene Inseltypen definiert, die wiederum in insgesamt 15 verschiedene Subtypen unterteilt wurden. Geninseln vom Typ pKLC102 scheinen innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* weit verbreitet zu sein. Sie weisen alle eine hochkonservierte Grundstruktur auf, in die zusätzliche inselspezifische „Cargo“-Regionen integriert werden können. Die hier detektierten Subtypen scheinen dabei durch spezifische Kombination verschiedener Genkassetten entstanden zu sein. Die Geninsel pKLC102 stellt sich so als weitverzweigte Familie dar, in denen je nach dem Grad der Verwandtschaft unterschiedlich viele ORFs konserviert waren (siehe Kapitel 3.3.3).

Um das Vorkommen der einzelnen postulierten pKLC102 - Proteine in anderen  $\beta$ - und  $\gamma$  – Proteobakterien zu analysieren, wurden Datenbankanalysen durchgeführt. Hierbei wurden homologe Proteine in 46 putativen Geninselsequenzen in 27 verschiedenen Taxa von  $\beta$ - und  $\gamma$  – Proteobakterien detektiert (siehe Kapitel 5).

Die meisten homologen Proteine wurden dabei in der Geninsel PPHGI – 1 des Stammes *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1302A detektiert. Diese Geninsel kann, wie pKLC102, ebenfalls aus dem Genom ausgeschnitten werden und als episomales Element in den jeweiligen Stämmen vorliegen (Pitman et al., 2005). Die Konservierung der pKLC102 – homologen Proteine könnte einen möglichen Grund für die Mobilität der Geninsel PPHGI – 1 darstellen.

Die durchgeführten Analysen bestätigten die schon von Mohd – Zain et al. (2004) und Klockgether et al. (2006b) beschriebene Kernstruktur innerhalb dieser Geninsel – Familie. pKLC102 – verwandte Geninseln weisen demnach eine konservierte Kernstruktur und variable Bereiche auf, die für stammspezifisches „Cargo“ der einzelnen Stämme codieren.

Vertreter dieser Familie mobiler Elemente können in ein breites Spektrum an Wirtsgenomen inserieren. Die Geninseln dienen dabei als universelles Vehikel für die Integration unterschiedlichen „Cargos“.

Um zu analysieren, ob pKLC102 Einfluss auf den Phänotyp von *P. aeruginosa* hat, wurden isoklonale Isolate, die sich nur in An- bzw. Abwesenheit der Geninsel unterschieden, untersucht.

Phänotypvergleiche isoklonaler Varianten ergaben dabei kaum Unterschiede (siehe Kapitel 3.5). Das Verhalten war charakteristisch für attenuierte Stämme, die sich an ein bestimmtes Habitat angepasst haben.

Die analysierten *P. aeruginosa* Isolate, die pKLC102 in ihrem Genom integriert haben, wiesen eine geringere Sensitivität gegenüber oxidativem Stress ( $H_2O_2$ ) auf. Die Ursache für die verstärkte Wasserstoffperoxidtoleranz könnte in einem der ORFs liegen, die unbekannte Proteine zu codieren scheinen. Keiner der annotierten pKLC102 – ORFs weist Ähnlichkeiten zu Genen bekannter Funktion auf, die hier einen positiven Einfluss haben könnten.

Außerdem wurde gezeigt, dass die in pKLC102 annotierten Typ IV Pili keine Rolle für ein eventuelles „twitching motility“ Vermögen der jeweiligen Stämme spielen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen beider Stämme zeigten ebenfalls keine Anwesenheit von Typ IV Pili. Dies verstärkt die von Klockgether et al. (2004) postulierte Annotierung, dass es sich um Typ IV Sex Pili handelt.

Die Geninsel pKLC102 wurde in Klon C-Stämmen als episomales Plasmid und ins Genom integrierte Insel detektiert. Mit Hilfe pKLC102 – spezifischer Makroarrays und „Primern“, die die Integrationspunkte von pKLC102 im Genom überspannten, wurde nachgewiesen, dass pKLC102 und verwandte Geninseln vollständig aus dem Genom der jeweiligen *P. aeruginosa* Stämme ausgeschnitten werden und die Bakterien auch ohne diese Geninseln existieren können. pKLC102 scheint also keine essentiellen Funktionen zu codieren, die für das Überleben der Bakterien eine Rolle spielen (siehe Kapitel 3.4).

Die Exzisionsrate, mit der pKLC102 aus dem Genom ausgeschnitten wird, wurde durch eine kinetische PCR bestimmt. Die Analysen unterschiedlicher Wachstumsphasen zeigten, dass sich die Anzahl an episomalem Plasmid von der frühlogarithmischen bis zur spätstationären Phase stark verringerte. Parallel dazu sank die Zahl an integrierten Geninseln im Genom. pKLC102 scheint für Bakterien in der spätstationären Phase eine geringere Rolle zu spielen, als für solche, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden.

Die bei diesen Analysen detektierte Menge an episomalem Plasmid war höher als die Zahl der im Genom integrierten Form der Insel. Dies ist ein Beweis dafür, dass pKLC102 in den Bakterien als Plasmid repliziert wird. Die vorhandenen Plasmidgene sind anscheinend dafür verantwortlich, dass pKLC102 die höchste bisher bekannte Mobilität einer Geninsel aufweist. Ebenfalls durchgeführte Analysen der Geninsel PAPI-1 des Stammes PA14 zeigten, dass in allen untersuchten Wachstumsphasen in nur ca 2% der Bakterien zirkuläres Plasmid vorlag. PAPI – 1 ist demnach nicht in der Lage, sich als eigenständiges episomales Element in den Bakterien zu replizieren. Da die postulierten pKLC102 - Gene für Konjugation, Rekombination und Transfer von DNA in PAPI - 1 hochkonserviert vorliegen, könnten die detektierten Unterschiede in der *oriV* – Struktur eine mögliche Ursache für die geringere Menge an freien Plasmiden im Stamm PA14 sein (siehe Kapitel 3.2.5).

Mobilitätsanalysen weiterer sequenzierter pKLC102 – verwandter Geninseln könnten zeigen, ob die *oriV* – Struktur in pKLC102 ein Grund für die Replikation als eigenständiges Element ist. Hierfür könnten die *P. aeruginosa* – Stämme verwendet werden, deren pKLC102 verwandte – Geninseln in Kapitel 3.2 analysiert wurden. Die analysierte Geninsel des Stammes PACS2 wies hierbei eine zu pKLC102 100% identische *oriV* – Region auf und müsste demzufolge ebenfalls Eigenschaften eines sich selbstständig replizierenden Elementes aufweisen.

Konkrete Aussagen könnten z. B. durch die Analyse von „knockout“ - Mutanten mit einzelnen ausgeschalteten ORFs der Geninsel und damit möglichen veränderten Mobilisierungsraten getroffen werden. Hierbei wären vor allem die ORFs der in allen Geninseln konservierten Regionen von Interesse. Da die ORFs dieser Regionen in vielen mobilen Geninseln hohe Ähnlichkeiten aufweisen, könnten sie eine bedeutende Rolle für die Mobilität dieser Inseln spielen.

Diese Arbeit zeigt, dass die Geninsel pKLC102 eine weite Verbreitung innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* aufweist. Alle analysierten Beispiele gehören einer Familie partiell



konservierter Geninseln an und wurden in unterschiedlichen Habitaten detektiert. Aufgrund seines funktionellen Plasmidmoduls stellt pKLC102 dabei die Geninsel mit der höchsten bisher bekannten Mobilität dar. Da die Geninselzusammensetzung Merkmale von Phagen- und Plasmidintegration aufweist, stellt pKLC102 die Zwischenstufe eines mobilen genetischen Elements und einer Geninsel dar.

## **7. Abkürzungsverzeichnis**

aa	Aminosäuren
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CF	zystische Fibrose
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
ddUTP	Didesoxyuridin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanidin-Triphosphat
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxynucleosid-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetracetat
et al.	und andere (et a)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GC	Guanosin u. Cytosin
kb	Kilobasenpaare
kons.	konserviert
M	molar (mol/l)
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
mind.	mindestens
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“; mögliches Gen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pot.	potentiell
put.	putativ
rel.	relativ
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s. o.	siehe oben:
<i>sp.</i>	Spezies
s. u.	siehe unten
sog.	sogenannt
Std.	Standard/Standardisierung
Tris	2-Amino-2-(hydroxymehtyl) -aminomethan
U	„Unit“ (Einheit für enzymatische Aktivität)
u.	und
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer

## **8. Literaturverzeichnis**

**Adair, FW; Geftic, SG; Gelzer, J;** (1969) Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. I. Growth in benzalkonium chloride solution. *Appl. Microbiol.*; 18(3):299-302.

**Al-Ani, FY; Al-Shibib, AS; Khammas, KM; Taher R;** (1986) Pyocyanin preparation from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from heterogeneous clinical materials. *Folia Microbiol (Praha)*; 31(3):215-219.

**Altschul, SF; Gish, W; Miller, W; Myers, EW; Lipman, DJ;** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*; 5;215(3):403-410.

**Ball, CA; Dolinski, K; Dwight, SS; Harris, MA; Issel-Tarver, L; Kasarskis, A; Scafe, CR; Sherlock, G; Binkley, G; Jin, H; Kaloper, M; Orr, SD; Schroeder, M; Weng, S; Zhu, Y; Botstein, D; Cherry, JM;** (2000) Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database. *Nucleic Acids Res.* 1;28(1):77-80.

**Birnboim, HC; Doly, J;** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.*; 24;7(6):1513-1523.

**Blattner, FR; Plunkett, G 3rd; Bloch, CA; Perna, NT; Burland, V; Riley, M; Collado – Vides, J; Glasner, JD; Rode, CK; Myahew, GF; Gregor, J; Davis, NW; Kirkpatrick, HA; Goeden, MA; Rose, DJ; Mau, B; Shao, Y;** (1997) The complete sequence of *Escherichia coli* K12. *Science*; 277(5331):1453-1474.

**Botzenhardt, K; Döring, G;** (1993) Etiology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, 1-18. In: Campa M, Bendinalli M, Friedmann H (eds.). *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen; Plenum Press New York.

**Bremer, S; Hoof, T; Wilke, M; Busche, R; Scholte, B; Riordan, JR; Maass, G; Tümmler, B;** (1992) Quantitative expression patterns of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) and differentially spliced cystic-fibrosis transmembrane-conductance regulator mRNA transcripts in human epithelia. *Eur. J. Biochem.* 206:137-149.

**Cho, JJ; Panopoulos, NJ; Schroth, MN;** (1975) Genetic transfer of *Pseudomonas aeruginosa* R factors to plant pathogenic *Erwinia* species. *J. Bacteriol.*; 122(1):192-198.

**Cornelis, P; Matthijs, S;** (2002) Diversity of siderophore mediated iron uptake systems in fluorescent *pseudomonads*: not only pyoverdins. *Environ. Microbiol.*; 4(12):787-798.

**Cowell, BA; Twinning, SS;** (2003) Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiology*; 149 (Pt 8):2291 – 2299.

**de Iannino, NI; Ugalde, RA;** (1989) Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens* *chvA* mutants: synthesis and excretion of beta-(1-2)glucan. *J. Bacteriol.*; 171(5):2842-2849.

**Dobrindt, U; Hochhut, B; Hentschel, U; Hacker, J;** (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.*; 2(5):414-24.

**Döring, G; Maier, M; Müller, E; Bibi, Z; Tümmler, B; Kharazmi, A;** (1987) Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother.*; 39:36-48.

**Evans, GA; Lewis, K; Rothenberg, BE;** (1989) High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene*; 30;79(1):9-20.

**Favero, MS; Carson, LA; Bond, WW; Petersen, NJ;** (1971) *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science*; 27;173(999):836-838.

**Feinberg, AP.; Vogelstein, B.;** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*; 132(1): 6-13.

**Gaillard, M; Vallaey, T; Vorholter, FJ; Minoia, M; Werlen, C; Sentchilo, V; Pühler, A; van der Meer, JR;** (2006) The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *J. Bacteriol.*; 188:1999-2013.

**Gelfand, DH;** (1988) In Erlich, H. A. (ed.) *PCR Technology*. p.17. Stockton Press, NY.

**Govan, JRW; Deretic, V; Chakrabarty, AM;** (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.*; 60:539-574.

**Greener, A; Filutowicz, MS; McEachern, MJ; Helinski, DR;** (1990) N-terminal truncated forms of the bifunctional  $\pi$  initiation protein express negative activity on plasmid R6K replication. *Mol. Gen. Genet.*; 224(1):24-32.

**Guiliano, D; Ganatra, M; Ware, J; Parrot, J; Daub, J; Moran, L; Brennecke, H; Foster, JM; Supali, T; Blaxter, M; Scott, AL; Williams, SA; Slatko, BE;** (1999) Chemiluminescent detection of sequential DNA hybridizations to high-density, filter-arrayed cDNA libraries: a subtraction method for novel gene discovery. *Biotechniques.*; 27(1):146-152.

**Hacker, J; Kaper, J B;** (2002) *Pathogenicity islands and the evolution of pathogenic microbes*. Springer, Berlin.

**Hahn, HP;** (1997) The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* – a review. *Gene*; 192:99-108.

**Hanahan, D;** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*; 166(4): 557-580.

**Hardalo, C; Edberg, SC;** (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.*; 23(1):47-75.

**He, J; Baldini, RL; Deziel, E; Saucier, M; Zhang, Q; Liberati, NT; Lee, D; Urbach, J; Goodman, HM; Rahme, LG;** (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A; 101(8):2530-5.

**Henke, W; Herdel, K; Jung, K; Schnorr, D; Loening, SA;** (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC – rich DNA sequences. Nucleic. Acids Res.; 1;25(19):3957-3958.

**Hickey, WJ; Focht, DD;** (1990) Degradation of mono-, di-, and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2. Appl. Environ. Microbiol.; 56(12):3842-3850.

**Hoiby, N; Pedersen, PP;** (1989) Estimated risk of cross-infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Danish cystic fibrosis patients. Acta. Paediatr.Scand.; 78(3):395-404.

**Hoof, T; Riordan, JR; Tümmler, B;** (1991) Quantitation of mRNA by the kinetic polymerase chain reaction assay; a tool for monitoring P-glycoprotein gene expression. Anal. Biochem. 196:161-169.

**Kiewitz, C; Larbig, K; Klockgether, J; Weinel, C; Tümmler, B;** (2000) Monitoring genome evolution *ex vivo*: reversible chromosomal integration of a 106 kb plasmid at two tRNA<sup>Lys</sup> gene loci in sequential *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates. Microbiology; 146, 2365-2373.

**Kiewitz, C; Tümmler, B;** (2000) Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: Impact on population structure and genome evolution. J. Bacteriol.; 182(11):3125-3135.

**Klausen, M; Heydorn, A; Ragas, P; Lambertsen, L; Aaes-Jorgensen, A; Molin, S; Tolker-Nielsen, T;** (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol. Microbiol.; 48:1511-1524.

**Klockgether, J;** (2004) Geninseln als Quelle der Genomdiversität von *Pseudomonas aeruginosa*; Dissertation

**Klockgether, J; Reva, O; Larbig, K; Tümmler, B;** (2004) Sequence Analysis of the Mobile Genome Island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. J. Bacteriol.; 186(2):518-534.

**Klockgether, J; Würdemann, D; Reva, O; Tümmler, B;** (2006a) Diversity of the abundant pKLC102 / PAGI-2 family of genomic islands in *P. aeruginosa*. (eingereicht)

**Klockgether, J; Würdemann, D; Wiehlmann, L; Ussery, DW; Tümmler, B;** (2006b) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa*. in: *Pseudomonas* genomics and molecular biology; Herausgeber: P. Cornelis

**Kulasekara, BR; Kulasekara, HD; Wolfgang, MC; Stevens, L; Frank, DW; Lory, S;** (2006) Acquisition and Evolution of the *exoU* Locus in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol.; 188(11):4037-4050.

**Larbig, KD;** (2001) Intraklonale Genomdiversität in *Pseudomonas aeruginosa*; Dissertation

**Larbig, KD; Christmann, A; Johann, A; Klockgether, J; Hartsch, T; Merkl, R; Wiehlmann, L; Fritz, HJ; Tümmler, B;** (2002) Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. J. Bacteriol.; 184(23): 6665-6680.

**Lawrence, JG; Roth, JR;** (1996) Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. Genetics; 143(4):1843-1860.

**Lee, DG; Urbach, JM; Wu, G; Liberati, NT; Feinbaum, RL; Miyata, S; Diggins, LT; He, J; Saucier, M; Deziel, E; Friedman, L; Li, L; Grills, G; Montgomery, K; Kucherlapati, R; Rahme, LG; Ausubel, FM;** (2006) Genomics analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol.; 7(10):R90.

**Lee, PS; Grossman, AD** (2006) The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol.; 60(4):853-869.

**Lesic, B; Bach, S; Ghigo, J.M.; Dobrindt, U; Hacker, J; Carniel, E;** (2004) Excision of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* requires the combined actions of its cognate integrase and Hef, a new recombination directionality factor. *Mol. Microbiol.*; 52:1337-1348.

**Lesic, B; Carniel, E;** (2005) Horizontal transfer of the High-Pathogenicity Island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol.*; 187(10):3352-3358.

**Liang, X; Pham, XQ; Olson, MV; Lory, S;** (2001) Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*; 183(3):843-853.

**Luzar, MA; Montie, TC;** (1985) Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*; 50: 572-576.

**Mahajan-Miklos, S; Tan, MW; Rahme, LG; Ausubel, FM** (1999) Molecular Mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.*; 96:47-56.

**Miller, RA; Britigan, BE;** (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.*; 1:1.18.

**Mohd-Zain, Zaini; Turner, Sarah L; Cerdeno-Tarraga, Ana M; Lilley, Andrew K; Inzana, Thomas J; Duncan, Jane A; Harding, Rosalind M; Hood, Derek W; Peto, Timothy E; Crook, Derrick W;** (2004) Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands. *J. Bacteriol.*; 186(23):8114-8122.

**Morales, G; Wiehlmann, L; Gudowius, P; van Delden, C; Tümmler, B; Martinez, JL; Rojo, F;** (2004) Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *J. Bacteriol.*; 186(13):4228-4237.



**Müller, AT; Werlen, C; Spain, J; van der Meer, JR;** (2003) Evolution of a chlorobenzene degradative pathway among bacteria in a contaminated groundwater mediated by a genomic island in *Ralstonia*. Environm.Microbiol.; 5:163-173.

**Nicas, TI; Iglewski, BH;** (1986) Production of elastase and other exoproducts by environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol.; 23(5): 967-969.

**Ochman, H; Davalos, LM;** (2006) The nature and dynamics of bacterial genomes. Science. 2006. 311:1730-1733.

**Olsen, GJ; Woese, CR; Overbeek, R;** (1994) The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. J. Bacteriol.; 176:1-6.

**Passador, L; Cook, JM; Gambello, MJ; Rust, L; Iglewski, BH;** (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. Science; 260:1127-1130.

**Palleroni, NJ;** (1986) Taxonomy of the pseudomonads. Sokatch JR (Ed) The bacteria. A treatise on structure and function. Academic Press Inc., Orlando. Volume X:3–25.

**Pier, GB;** (1985) Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. J. infect. Dis.; 151(4):575-580.

**Pitman, AR; Jackson, RW; Mansfield, JW; Kaitell, V; Thwaites, R; Arnold, DL;** (2005) Exposure to host resistance mechanisms drives evolution of bacterial virulence in plants. Curr. Biol.; 15(24):2230-2235.

**Quinn, JP;** (1998) Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. Clin. Infect. Dis.; 27 Suppl 1: S117-124.

**Rajanna, C; Wang, J; Zhang, D; Xu, Z; Ali, A; Hou, YM; Karaolis, DK;** (2003) The vibrio pathogenicity island of epidemic *Vibrio cholerae* forms precise extrachromosomal circular excision products. J. Bacteriol. 185:6893-6901.

**Rahme, LG; Stevens, EJ; Wolfort, SF; Shao, J; Tompkins, RG; Ausubel, FM;** (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*; 268: 1899-1902.

**Rakin, A; Noelting, C; Schropp, P; Heesemann, J;** (2001) Integrative module of the high-pathogenicity island of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.*; 39:407-415.

**Ravatn, R; Studer, S; Zehnder, AJ; van der Meer, JR;** (1998) Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase *clc*- element of *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.*; 180:5505-5514.

**Reva, ON; Tümmler, B;** (2004) Global features of sequences of bacterial chromosomes, plasmids and phages revealed by analysis of oligonucleotide usage patterns. *BMC Bioinformatics*; 7;5:90.

**Reva, ON; Tümmler, B;** (2005) Differentiation of Regions with atypical oligonucleotide composition in bacterial genomes. *BMC Bioinformatics*; 6:251.

**Rhame, FS;** (1980) The ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, 31-54. In: SABATH CD (ed.) *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes, and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern.

**Ridgway, HF; Safarik, J; Phipps, D; Carl, P; Clark, D;** (1990) Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*; 56(11): 3565-3575.

**Riddle, DL; Blumenthal, T; Meyer, BJ; Pries, JR;** (1997) Introduction to *C. elegans*. In *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York S. 1-22.

**Römling, U; Wingender, J; Müller, H; Tümmler B;** (1994) A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol.*; 60(6): 1734-1738.

**Römling, U; Greipel, J; Tümmler, B;** (1995) Gradient of genomic diversity in the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. Mol. Microbiol.; 17:353-406.

**Römling, U; Schmidt, KD; Tümmler, B;** (1997) Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. J. Mol. Biol.; 271(3): 386-404.

**Römling, U; Sierralta, WD; Eriksson, K; Normark, S;** (1998) Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. Mol. Microbiol.; 28(2):249-264.

**Römling, U; Abdul, K; Dinesh, SD; Simm, R; Kronvall, G;** (2005) Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. Environ. Microbiol.; 7(7):1029-1038.

**Roitt ,IM; Brostoff J; Male, DK;** (1995). Kurzes Lehrbuch der Immunologie. (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag), S.1-399.

**Saiki, RK; Gelfand, DH; Stoffel, S; Scharf, SJ; Higuchi, R; Horn, GT; Mullis, KB; Erlich, HA;** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science; 239(4839):487-91.

**Sakellaris, H; Luck, SN; Al-Hasani, K; Rajakumar, K.; Turner, SA; Adler, B;** (2004) Regulated site-specific recombination of the *she* pathogenicity island of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol.; 52:1329-1336.

**Schaal, KP;** (1994) Die Gattung *Pseudomonas*; Brandis, H; Köhler, W; Eggers, HJ; Pulverer, G; Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 464-471.

**Schmidt, KD; Tümmler, B; Römling, U;** (1996) Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. J. Bacteriol.; 178(1):85-96.

**Schwyn, B; Neilands, JB;** (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*; 160:47 – 56.

**Spencer, DH; Kas, A; Smith, EE; Raymond, CK; Sims, EH; Hastings, M; Burns, JL; Kaul, R; Olson MV;** (2003) Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*; 185:1316-1325.

**Stover, CK; Pham, XQ; Erwin, AL; Mizoguchi, SD; Warrenner,P; Hickey, MJ; Binkman, FS; Hufnagle, WO; Kowalik, DJ; Lagrou, M; Garber, RL; Goltry, L; Tolentino, E; Westbrook-Wadman, S; Yuan, Y; Brody, LL; Coulter, SN; Folger, KR; Kas, A; Larbog, K; Lim, R; Smith, K; Spencer, D; Wong, K; Wu, Z; Paulsen, IT;** (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an oppotunistic pathogen. *Nature*; 406:956-964.

**Tennant, I; Harding, H; Nelson, M; Roye-Green, K;** (2005) Microbial isolates from patients in an intensive care unit, and associated risk factors. *West. Indian. Med. J.*; 54(4):225-31.

**van Delden, C; Iglewski, BH;** (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.*; 4(4):551-560.

**van der Meer, RJ; Ravatn, R; Sentschilo, V;** (2001) The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Arch. Microbiol.*; 175:79-85.

**Wick, MJ; Hamood, AN; Iglewski, BH;** (1990) Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol. Microbiol.*; 4(4):527-535.

**Wolfgang, MC; Kulasekara, BR; Liang, X; Boyd, D; Wu, K; Yang, Q; Miyada, CG; Lory, S;** (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 100:8484-8489.

---

**Wu, W; Zongchao, J; Liu, P; Zhigang, X; Qun, W;** (2005) A novel PCR strategy for high-efficiency, automated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*; 33(13):e110

## **9. Anhang**

### **9.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen**

**Krause, S; Würdemann, D; Wentzel, A; Christmann, A; Fehr, H; Kolmar, H; Friedrich, K; (2004)**

Bacteria displaying interleukin-4 mutants stimulate mammalian cells and reflect the biological activities of variant soluble cytokines.

Chembiochem;5(6):804-10.

**Klockgether, J; Würdemann, D; Wiehlmann, L; Ussery, DW; Tümmler, B; (2006)**

Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa*.

in: *Pseudomonas* genomics and molecular biology; Herausgeber: P. Cornelis

**Klockgether, J; Würdemann, D; Reva, O; Tümmler, B; (2006)**

Diversity of the abundant pKLC102 / PAGI-2 family of genomic islands in *P. aeruginosa*. (eingereicht)

**9.2 Lebenslauf**

	<p><b>Dieco Würdemann</b> Diplom-Biologe</p> <p>*20. Januar 1976 in Oldenburg</p>
Seit 11/03	<p><b>Promotion</b> Medizinische Hochschule Hannover Abteilung für Pädiatrische Pneumologie und Neonatologie Klinische Forschergruppe – „Molecular pathology of cystic fibrosis and <i>Pseudomonas</i> genetics“ bei Prof. Dr. Dr. B. Tümmler „Mobile gene islands of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>“ Stipendiat des Europäischen Graduiertenkollegs „<i>Pseudomonas</i> – Pathogenicity and Biotechnology“ der DFG</p>
10/97 – 05/03	<p><b>Studium</b> <b>Fachrichtung Biologie</b></p>
10/97 – 03/00	Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
03/00 – 04/01	Universität zu Köln
04/01 – 05/02	Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
05/02 – 12/02	Friedrich-Schiller-Universität Jena
12/02 – 05/03	Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diplomarbeit im Institut für Biologie, Geo- und Umweltwissenschaften bei apl. Prof. Dr. P. Jaros; praktischer Teil der Diplomarbeit mit Schwerpunkt Immunologie an der “Friedrich – Schiller – Universität” in Jena in Kooperation mit der Universitätsklinik in Freiburg und Selecore (einer Göttinger Biotechnologiefirma)</li> </ul>
	<p><b>Zivildienst</b></p>
09/96 – 10/97	Zentrallabor der Städtischen Kliniken Oldenburg in Oldenburg
	<p><b>Schule</b></p>
88 – 96	Graf Anton Günther Gymnasium Oldenburg - Abitur
86 – 88	Orientierungsstufe Wardenburg
82 – 86	Grundschule Tungeln/Hundsmühlen

Hannover, den 29.11.06

**9.3 Sequenzen der verwendeten Primer****Produkt Größe Primer A  
[bp]****Primer B****Primer für den pKLC102 Macroarray:**

Template: Cosmid pKSCC 785

CP1	497	CP01l	CTACGACCTGGTGCTGATCG	CP01r	CCTTGACCAGTGCTGCTACC
CP2	602	CP02l	CCAACAGGCCAAGTTGACCG	CP02r	CGTCTGTCCAGAGCTGAAGG
CP3	465	CP03l	CCTCCAGAACCGCAACAACC	CP03r	AGCACTGCACTTGCCTCTGC
CP4	531	CP04l	CGATACAGCGAGTGGATCCC	CP04r	GCTGCTGGGTTTAGCTTGGG
CP5	423	CP05l	TCAAGCCCTGTCCACTCTGC	CP05r	CGTCGTCGTTGCTGGTATCG
CP6	611	CP06l	AGGTCGAGAAGCTGATGGCC	CP06r	GTTTTTGCCGTGCTCCCAGC
CP7	608	CP07l	GCATCCGCGAAACCTGGACC	CP07r	CTCGACCTCCTGAATGGTGC
CP8	286	CP08l	CTTTGCCACCATCGAAGGCC	CP08r	GGTGATCGCCGACAATGTCC
CP9	569	CP09l	GGAGGAGATCGAGCAGAAGC	CP09r	GCATCAGCTGCAGGTAGTCG
CP10	255	CP10l	CGGACCACTAGATAGCCAGG	CP10r	GGACGCCATTGAGTATGCGC
CP11	510	CP11l	ACACTGAAGCCCGCTTTCCG	CP11r	CCTTGCTGAGTGCATCACCG
CP12	279	CP12l	CGTCAAGTTCAATGGCGCCG	CP12r	GCATCAGCTCGCCTTTCTGG
CP17	483	CP17l	TCCCGGGTAATCCCTCTACC	CP17r	GCTGGTCGTGTGAGTTCAGG
CP18	556	CP18l	GAAAATCCTGGCCACAGCCG	CP18r	TGGTGTGCTATCGCCTTCGG
ori2	274	ori2l	CATCATCGAGCAGTGGCAGC	ori2r	CCGAATGAGGTCCTTGAGCC
CP19	356	CP19l	GACGATCCGTACTCCGACTG	CP19r	CCCGAGAAGTGGTAGCTCTG
CP20	350	CP20l	GGCAGCTCGATAAGGACCAG	CP20r	GTCCTGGCGCAGCATTTCGG
CP21	375	CP21l	GTAAGGCCGTATCCCACTCG	CP21r	GCAGGTGGTTGTGACTGAGG
CP22	304	CP22l	CAGGGTGGCTACAAGGATCG	CP22r	CATCCTGCTGAGCAGGTTGC
CP25	346	CP25l	GTCCTCAACTCTCAAGCCGG	CP25r	CAAAAACCGCCCGCAAGAGG
CP27	370	CP27l	CGCACTACCAGATCCTCTCG	CP27r	AGGACCACCAGGTACACAGC
CP28	271	CP28l	GGTTTCGGCTTCATCACCCC	CP28r	GCTGACGGAGATAGTGACG
CP30	450	CP30l	CGAACCGCTACCTGCTTACC	CP30r	GCTCGCAGAGTTCCTTCAGC

Template: Cosmid pKSCC187

CP32	429	CP32l	GCCAGGTTCCGAACGAAACC	CP32r	CTTCTTCGCTTGGGTCGTGC
CP33	475	CP33l	ACACCCTCCAGGTCCTCTCC	CP33r	CAGGACTGTGCCAACTGTGC
CP34	502	CP34l	CGAGCTGAAGACCTCGATCC	CP34r	GGCCAGGTAGCTGTGCTAGC



CP35	310	CP35l	GACCTCGAGGACATGCTACG	CP35r	GGTACAGATGGCTGGTGAGC
CP37	476	CP37l	GAAGACCGTCGAGCAGTACC	CP37r	CATAGACCAGTGGGGTCTGG

Template: genomische DNA Stamm C

CP39	338	CP39l	GATCATCATCGCCATCGGGG	CP39r	TCTTCGCGATCTTGGTGGCC
CP40	587	CP40l	GGGAGTTCCAAGAGATCGGC	CP40r	GATCTTGTGCGGCATGGACG
CP41	568	CP41l	GCCAACGAGTACCTCTACCG	CP41r	CGTGCAACGTACACCAGTCC

Template: Cosmid pKSCC050

CP42	361	CP42l	GCTGATGTGGATCGTCCTGG	CP42r	CGTACTAACTGGCCGTTGC
CP43	375	CP43l	CCACCAGCTTCGAAATCGGC	CP43r	AGCAGGTCAGCGGATCAACC
CP44	272	CP44l	GGGTCCGCAAACTTTCCGC	CP44r	GCTTGAGGTTGGGCCAATCG
CP46	397	CP46l	GAGCAACAACACCCAAGCCC	CP46r	CTTCGCATCGTAGACGGTGG
CP47/48	535	CP47/48l	CCATCTTCATCTCGAACTGC	CP47/48r	CTTTACGCCGAGCCTTCTGG
CP49	523	CP49l	CCCGGCTATGAGAGTTTCCG	CP49r	GGATCTCCAGGCACTCATCC
CP50	316	CP50l	CTCAACAACCACTCCAGCGC	CP50r	GGCTTTCTCCTGCAGCTCG
CP51	265	CP51l	TCCGTCCCTCCTACTACACC	CP51r	GGAGGGTCCATACCGAAAGG
CP52/53	585	CP52/53l	GGAAGACCTGCTGCGTAAGC	CP52/53r	CGAACGCTCTTGGTGTGAGG
CP54	532	CP54l	AGAGTGCCAGACCTGTACG	CP54r	GATCAGCTCACCGAGAGTGG
CP55	504	CP55l	TGGTCGTGAAGGGTGACACC	CP55r	AGTCGCTAGGGAGCAACAGG
CP56	416	CP56l	CAACGTAAGTCCCGACTACC	CP56r	GTAGCACTGCCACCTTCAGC
CP57	575	CP57l	GTACCGAGGCTGCTTACTGC	CP57r	CTCAAAGCTGAGGTCCCTCC
CP58	255	CP58l	GTGCTGTAAACCACTGCCGC	CP58r	AGAGTTCGGCGCACATTCCC
CP59	435	CP59l	CACAGTCTCACCTTCCCTGG	CP59r	GCAGACGCGGTAGGTATTCCG
CP60	337	CP60l	AGGACGTCTTGTGCGGAGAGC	CP60r	CTGGTAGCTCAGGGCAAACC
CP62	481	CP62l	CCTCAAGCTCCTGGTCATCC	CP62r	CAGCTCTACGCCTCCAATCC
CP63	303	CP63l	GCTGGGCTACCAGCAATACC	CP63r	TCCAGCGTCTCCACTGTAGC
CP64	319	CP64l	GTGCTGCTGCTGAGCTATCC	CP64r	GGTAGGCGAGTTCCTTCTCG
CP65	551	CP65l	GGCAACGTCTGTAATCCGCG	CP65r	CGAGGACTTGGCTAAGGTGG
CP66	312	CP66l	CAGGTGCGTTTCCAGTTCCGC	CP66r	TGGCGGTGGATGTGATGAGG
CP67	555	CP67l	CCATGGTCAACAAAGCGGGC	CP67r	CGAGGTGACGGAAATCGTCG
CP68	320	CP68l	CCCAGTTGGCCTATGACTGG	CP68r	CGCCTTGTGGTAGAGGTAGC
CP69	512	CP69l	CGAGGGACAGGACATCAACC	CP69r	CCACGTAAGTGGGTGTAGTCG

CP70	587	CP70l	CAGCGCAGAGTTCAATGGCG	CP70r	TTGGTAGGCCTTGTGCGTCC
CP73/74	321	CP73/74l	CGGACAGCGCTTCTACTTCG	CP73/74r	GCTGTCCGAGGTTGTTGGTGG
CP75	329	CP75l	GAAACTGTCCACCCTCTGCC	CP75r	TGGTGGTGGCTTTGGTGACC
CP76	267	CP76l	TTCAGGATGGGACCCTCAGC	CP76r	GGCGGTAGAACCAGGTATCC
CP77	283	CP77l	GGCGGACTACAAGAGCAACC	CP77r	GATGACGTGCAACGGGTAGC
CP78	581	CP78l	ACTCTACCTGCTCGCCAACG	CP78r	GATACACGGTGGTGGTGTCC
CP79	510	CP79l	GACGGGACGGTCAATGATCC	CP79r	GGAGAGGATGCTGTTGAGGG
CP80	327	CP80l	CCAACATGCTCGACGTCTGG	CP80r	AGTAGTCCTCCGTACGCTCC
CP81	525	CP81l	TGCCACGGCTTCATCTTCG	CP81r	CTGGAGGCCTGGTAGAGTGC
CP83	451	CP83l	CGTTGGGGTAGAGCTTCTGG	CP83r	CGCTGTAATGCCGTTCCGACC

Template: Cosmid pKSCC867

CP84	518	CP84l	GCACGGCTACGACTATCTGG	CP84r	CACACTCCCTGACGACATCC
CP85	326	CP85l	CAAGCTGCAGCCACTGATCC	CP85r	CACCATGGGTGATCTCCTGC
CP86	572	CP86l	CGAACACCGAGACACACTGG	CP86r	ATCTACCTCTGCGCAGAGCG
CP87	326	CP87l	GGCCGTTGGCTTACTACTGG	CP87r	AGACCACGTAAGTGCCTGTCC
CP88	570	CP88l	GCAGTCGTCTCCAGCTATGC	CP88r	GGTCAGCTCCTGCCATTTCC
CP89	354	CP89l	CAGTCATCCAGAACGCGACC	CP89r	CGATGCCAATGGGCTTCTGG
CP90	297	CP90l	TGGCAGATACGCTCACCACC	CP90r	GGATCAGCAACAGCACCAGG
CP91	405	CP91l	GGGTAGCCTGGCTTACTTCC	CP91r	CTGAGATCGCTGAGGAGAGC
CP92	244	CP92l	AGCTATCTGCCGACTGGAGC	CP92r	GGTGATCTCGTCGTAAGTCCG
CP93	344	CP93l	GGCCAAGTACCGCATATCCC	CP93r	GCTCCAGTCGGCAGATAGCT
CP94a	605	CP94-1l	GCTCGTCCAACCAGTTGAGC	CP94-1r	CAGGCGTCTTGCTGACAACG
CP94b	500	CP94-2l	TCGAGCCACTCTTCGCATGC	CP94-2r	GCTCTGGGCGTACCCTTCAT
CP94c	540	CP94-3l	CCTGGTAGACATCCGAGACC	CP94-3r	GCATTGATGCGCGACAGTCC
CP96	510	CP96l	CCTGGAGCGAGTTACTACTGC	CP96r	CCGAGTTTCTGCAGCTTGGC
CP97	337	CP97l	CGATATCTACGTACCCCGGC	CP97r	CTTTTTACCCGCAGTGGCGG
CP98	478	CP98l	GCTACAGCCACCAGGTATCC	CP98r	CTGATGTCCATGTGCACGCC
CP99	560	CP99l	GGTGAATGCTGCGACTACC	CP99r	GCCTCTGAATGGAGCAGTCC
CP100	535	CP100l	GCGATAGCCGAAAGCATGGC	CP100r	CGGCATCTTACAGCCAACGC
CP101	301	CP101l	TCTTGACGGCTGGTGCAGC	CP101r	GCTGGTGTAGATCAGGCTGC
CP102	536	CP102l	CGCTCCAGCCTTGATTTGGG	CP102r	CGACGGTATGCACCAAAGCC
CP103a	534	CP103al	CCGGAAGTTGACCGAGAAGG	CP103ar	GATCCCCTTCCACCAGATCC

CP103b 296 CP103bl GGAGCTGGAACACGTACTIONG CP103br GCACAGCAGCGCATTCAACC

### **Positiv- und Negativkontrollen:**

P1	650	cit2	CATGTCGACCGCCTCCTGCG	cit3	GCTTCGTTGCGGCCCCCATG
P2a	530	fla3a	GAGCGCAGAGTCGCTGAACG	fla4a	GTTGATGGTGTGTGTCGAAGCGG
P2b	800	fla3b	TCCGATACCACCACCTTCGG	fla4b	TCGCAGCCAGGGCGTTATCG
N1	1289	PP5a	AGAGATCGCGGACAAGACCG	PP5b	AAGCAGGGTGGTTATGGGCC
N2	300	hOb1	ATTCCTGTAATTTTCCC	hOb2	AGTGGTCCTGAGGTGACG

### **Zusätzliche Belegung auf den pKLC102 - Makroarrays**

ori1	324	ori1l	GTTCGGCATCCGAACCTCTGC	ori1r	CGAAGATCCTCGGACACTCG
PA0977	275	PA0977l	AGCCCGCCTTTATAGGTGGG	PA0977r	CCGAAGCAATCTCGCCTAGC
PA0981	320	PA0981l	GGTCACTGTTTCTGCCAGCG	PA0981r	GGACCTCACCATACACTGCC
TB-spec	503	TBspec1	TGCTATGCCAGAGCTTCCGG	TB-specr	GGAAATGGGCTTGAAGGGCG
D8A6	506	D8A6l	GCTTCGAAATGCCCTCCAGG	D8A6r	CGAAGATTCAGGAGCGCTGG

### **Kombinatorische PCR:**

#### **pKLC102/PAPI-1 - Integrationsstellen umspannende Primer**

genomisch	KAD-A	CGAATCTCTCTACCCGACCACC	KAD-5r	ATGGTGGGTCGTGTAGGATTC
	KAD-B	GGAGTTCGAATCTCTCTACCC	KAD-6r	TCCTTCCCACAGGCCAGCATTCCG
pKLC102 und PAPI-1	KAD-1	ATCGTCCTGGAGATGATCCTC	KAD-Cr	ATTGCTACGCCTGCAGAATGG