

**Sequenzspezifizierte Transposonmutagenese (STM)
in *Pseudomonas aeruginosa***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.- Biochem. Lutz Wiehlmann
geboren am 03.06.1970 in Stadthagen

Hannover 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinischen Forschergruppe „Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“, Zentrum Biochemie und Zentrum Kinderheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 01.12.1996 bis zum 04.04.2001 unter der Leitung von Prof. Dr.Dr. B. Tümmler angefertigt.

Tag der Promotion: 01.06.2001

Referent: Prof. Dr. Dr. B. Tümmler
Klinische Forschergruppe
Zentrum Biochemie und Zentrum Kinderheilkunde
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. G. Gerlach
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Tierärztliche Hochschule Hannover

Lebenslauf

Name: Lutz Wiehlmann

Geboren am: 03.06.1970

in : Stadthagen

Eltern: Jürgen Wiehlmann, geboren am 03.10.39 in Stettin

Erna Wiehlmann, geb. Ferch, geboren 03.06.40 in Nienburg/W.

Ausbildung:

Schule:

1976-1980: Grundschule in Nienburg/ W.

1980-1982: Orientierungsstufe Nienburg/W.

1982-1989: Gymnasium Hindenburgschule Nienburg/W.

Abschluß: allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Bundeswehr:

1989-1991: Ausbildung zu Reserveoffizier

Universität:

1991-1996: Studium der Biochemie an der Universität Hannover

Abschluß: November 1996: Diplom- Biochemiker
Diplomarbeit in der Klinischen Forschergruppe
„Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“

seit 1996: Promotionsstudium

Danksagungen

Mein Dank gilt,

Herrn Prof. Dr. Dr. B. Tümmler für dieses hochinteressante Thema und seine kompetente und verständnisvolle Unterstützung. Sein großes Interesse und seine Diskussionsbereitschaft lieferten entscheidende Impulse für den Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Gerlach für die Übernahme des Korreferats

allen Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe für die gute Arbeitsatmosphäre und die ihre Hilfsbereitschaft bei den großen und kleinen Problemen des Laboralltags: Nikoletta Charizopoulou, Anette Demmer, Horst Flathmann, Franz von Götz, Peter Gudowius, Bärbel Isenberg, Silke Jansen, Claudia Kiewitz, Jens Klockgether, Ulrike Laabs, Anna- Silke Limpert, Karen Larbig, Frauke Mekus, Margit Ritzka, Prabahkar Salunkhe, Christian Weinel.

den Biochemie- Großversuchspraktikanten Anna- Silke Limpert, Kirsten Bacia, Jens Lamertz, Christoph Kalthoff, Sozanne Solmaz, Susanne Frese, Monika Jeromin, Ina Schaffmeister, Kerstin Böhm und Patrick Böker, deren Neugierde und Begeisterung auch in schwierigen Phasen der Arbeit ansteckend wirkte.

ganz besonders denjenigen, die für diese Arbeit Blut spendeten.

allen Mitgliedern der „Welte- Gruppe“ für das Entgegenkommen und Reservieren von Kapazitäten in den Thermocyclern, wenn manchmal auch hunderte von PCR-Reaktionen gefahren wurden.

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen L. Eberl (München) und E. Gulbins (Tübingen) für ihre Unterstützung während meiner Experimente in ihren Labors.

meinen Eltern und meinem Großvater für mehr als ich hier schreiben kann. Danke.

Sylwia . . .

Erklärung

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hannover, den 04.04.2001

Lutz Wiehlmann

Zusammenfassung

Sequenzspezifizierte Transposonmutagenese (Signature- tagged mutagenesis, STM) wurde an dem hochvirulenten *Pseudomonas aeruginosa* Stamm TB durchgeführt, der über die Fähigkeit verfügt, intrazellulär ohne weitere Anpassungen in polymorphkernigen Leukozyten (neutrophile Granulozyten) zu überleben und sich dort sogar zu vermehren. Diese Immunzellen stellen bei Menschen und höheren Säugetieren die erste und effektivste Verteidigungslinie des zellulären Immunsystems dar.

Eine Bibliothek von nicht- redundanten mini- Tn5 Plasposonmutanten wurde durch ein spezielles, an die Anforderungen von *P. aeruginosa* angepaßtes Verfahren zur triparentale Konjugation im Rezipientenstamm angelegt. Bei der Untersuchung von mehr als 1100 nicht- auxotropher Transposonmutanten wurden 13 Mutanten mit deutlich verringerter Überlebensfähigkeit und zwei Mutanten mit erhöhter Fähigkeit zum intrazellulären Überleben in Phagozytostests identifiziert. Die Inaktivierung dieser isogenen Mutanten erfolgte in Genen die an der Oxidativen Stress- Antwort, dem Transport, der TypIV- Pili- oder der Flagellenbiogenese beteiligt waren. Weiterhin wurden Gene mit bisher unbekannter Funktion identifiziert. Alle untersuchten Gene waren in ihrer Nukleotidsequenz zu mehr als 99,5% mit Genen aus *P. aeruginosa* PAO identisch, was darauf hindeutet, daß auch PAO über fast alle Gene verfügt, die für ein intrazelluläres Überleben in polymorphkernigen Leukozyten notwendig sind.

Weiterhin wurden 3800 Transposonmutanten auf Defekte im Quorum Sensing untersucht. Hierbei wurden 18 Mutanten mit deutlich verringerter Produktion von aliphatischen Homoserinlactonen (AHL) und ein Mutant mit erhöhter Konzentration von AHL im Medium identifiziert. 2 der identifizierten Sequenzen, bei denen die Transposoninsertion zu einem völligen Ausfall des Quorum Sensing führte, wiesen keine Homologie zu irgend einer bekannten Sequenz auf, was darauf schließen läßt, daß das Quorum Sensing bei einigen *P. aeruginosa*- Stämmen noch über andere Wege reguliert wird als in *P. aeruginosa* PAO.

Schlagworte:

Pseudomonas aeruginosa, Pathogenitätsfaktoren, Quorum Sensing

Summary

Signature-tagged mutagenesis was applied to the highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* strain TB which is able to constitutively survive and replicate in polymorphonuclear leucocytes (PMN) that represent the most important elements of cellular first line antipseudomonal host defense.

A library of non-redundant mini-Tn5 plasmid mutants was generated by a triparental mating adapted to the *P.aeruginosa* recipient. Screening of more than 1100 non-auxotroph mini-Tn5 transposon mutants uncovered 13 independent loss-of-function and 2 gain-of-function mutants with significantly different survival rates in phagocytosis assays. The isogenic mutants were inactivated in genes involved in oxidative stress response, transport, type IV pili or flagellum biogenesis as well as in genes with yet unknown encoded function. All genes were more than 99.5% identical in nucleotide sequence with known PAO genes, thus showing that *P.aeruginosa* PAO possesses almost all genes necessary for intracellular survival in PMN.

Furthermore, the transposon mutants were examined for quorum sensing defects. 18 loss-of function-mutants as well as one mutant that produced more aliphatic homoserine lactones were found. Two of the identified sequences where the transposon insertion had led to a total knock-out of the quorum sensing showed no homologies to any known sequences, thus implying that the quorum sensing in several *P.aeruginosa*-strains must be regulated via other pathways than known from *P.aeruginosa* PAO.

Key words:

Pseudomonas aeruginosa, pathogenicity factors, quorum sensing

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.2. Genomische Organisation bei <i>P.aeruginosa</i>	2
1.1.3. <i>P.aeruginosa</i> als opportunistisches Pathogen	3
1.1.4. Quorum Sensing bei <i>P.aeruginosa</i>	5
1.1.4.1. Allgemeines	5
1.1.4.2. Quorum Sensing in <i>P.aeruginosa</i>	6
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TB	10
1.2.1. Eigenschaften	10
1.2.2. Intrazelluläre Vermehrung von Bakterien	15
1.3. Methoden zur funktionellen Genomanalyse	17
1.3.1. Transposonmutagenese	17
1.3.2. STM	19
1.3.3. IVET	22
1.3.4. DNA- Chiptechnologie	23
1.4. Ziel der Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Material	25
2.1.1. Geräte	25
2.1.2. Verbrauchsmaterial	25
2.1.3. Chemikalien und Enzyme	26
2.1.4. Lösungen	26
2.1.5. Bakterien	29
2.1.5.1. <i>Escherichia coli</i>	29
2.1.5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30

2.1.6. Vektoren	31
2.1.6.1. pUT mini- <i>Tn5</i> Km2	31
2.1.6.2. pUT Gm	32
2.1.6.3. pTnMod-OGm	32
2.1.6.4. pTnMod-OGm-ST	33
2.1.6.5. pRK2013	33
2.2. Methoden	33
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	33
2.2.1.1. Anzucht von Bakterien	33
2.2.1.2. Bestimmung der Bakterienzellichte	34
2.2.1.3. Anlegen von Glycerolkulturen	34
2.2.2. Auftrennung von DNA	34
2.2.2.1. Agarosegelelektrophorese	34
2.2.2.2. Polyacrylamidgelelektrophorese	35
2.2.2.3. Makrorestriktionsanalyse und Wechselfeldgelelektrophorese	35
2.2.3. Transformation	36
2.2.3.1. „Transformation- buffer“ - Methode	36
2.2.3.1.1. „TB- Methode“ zur Herstellung transf. Zellen	36
2.2.3.1.2. Transformation nach der „Transformation- buffer“- Methode	36
2.2.3.2. Transformation durch Elektroporation	37
2.2.3.2.1. Herstellung v. transf. Zellen zur Elektroporation	38
2.2.3.2.2. Elektroporation	38
2.2.4. Konjugation	39
2.2.4.1. Biparentale Konjugation	39
2.2.4.2. Triparentale Konjugation	40
2.2.4.3. „Filtermating“	40
2.2.4.4. <i>P.aeruginosa</i> -Konjugation	41
2.2.5. Präparation von Plasmiden	42
2.2.5.1. Plasmid- Maxi- Präparation	42
2.2.5.2. Plasmid- Mini- Präparation	42

2.2.6. Präparation genomischer DNA von Gram- negativen Bakterien	42
2.2.7. Polymerase- Kettenreaktion	43
2.2.7.1. Auswahl der Primer	43
2.2.7.2. PCR- Ansatz	44
2.2.7.3. PCR- Parameter	45
2.2.8. Restriktionsverdau von DNA	47
2.2.9. Ligation von DNA- Fragmenten	48
2.2.9.1. Änderung der Antibiotikaresistenz in pUT mini <i>Tn5</i> Km2	48
2.2.9.2. Klonierung der Signalsequenz in Plasmide	48
2.2.9.3. Plasmid- rescue	49
2.2.10. Herstellung DIG- markierter Sonden	49
2.2.10.1. Isolierung eines DNA- Fragments aus Agarose	49
2.2.10.2. Separation kleiner DNA- Fragmente	50
2.2.10.3. „Random primed labelling“ zur DIG-DNA-Sondenherstellung	52
2.2.10.4. DIG- 3´- Endmarkierung von Oligonukleotiden	53
2.2.11. DNA- Fixierung und Hybridisierung	53
2.2.11.1. Southern Transfer	53
2.2.11.2. Dot- Blot	54
2.2.11.3. Hybridisierung spezifischer DNA - Sonden an DNA - Blots	54
2.2.11.4. Immunologische Detektion Digoxigenin- markierter DNA	55
2.2.11.5. Waschen hybridisierter Nylonmembranen	55
2.3. Methoden zur Untersuchung der <i>P.aeruginosa</i> - Transposonmutanten	56
2.3.1. Phagozytostest	56
2.3.1.1. Granulozytenpräparation	56
2.3.1.2. Bestimmung der Granulozytenkonzentration	56
2.3.1.3. Untersuchung der intrazellulären Überlebensfähigkeit	57
2.3.2. Untersuchung des Quorum Sensing	58
2.3.3. Bestimmung d. Invasivität v. <i>P.aeruginosa</i> - Mutanten in Epithelzellen	59
2.3.3.1. Zellkultur eukaryontischer Epithelzellen (Chang- Zellen)	59
2.3.3.2. Mikroskopische Untersuchung der Invasivität	60
2.3.3.3. Quantifizierung der Invasivität von <i>P.aeruginosa</i>	61

2.3.4. Untersuchung zur Pathogenität von <i>P.aeruginosa</i> TB im Mausmodell	62
2.3.5. Flagellinnachweis bei <i>P.aeruginosa</i>	62
2.3.5.1. Fixieren der Bakterien auf Membranen	62
2.3.5.2. Immunologische Detektion	62
2.3.5.3. Färbung von Flagellen zur elektronen- mikroskopischen Untersuchung	63
2.4. Selektion von STM- Mutanten	63
3. Ergebnisse und Diskussion	65
3.1. Entwicklung und Optimierung eines Verfahrens zur Transposonmutagenese von <i>P.aeruginosa</i> TB	66
3.1.1. Konstruktion des Vektors pUT- Gm	66
3.1.2. Vorversuche zur Konjugation von <i>P.aeruginosa</i>	67
3.1.2.1. „Filtermating“ von <i>P.aeruginosa</i> TB	67
3.1.2.2. Elektroporation	68
3.1.2.3. Konjugation auf Agarplatten	69
3.1.3. Optimierung der Konjugation von <i>P.aeruginosa</i>	71
3.1.3.1. Inkubation der Bakterien vor der Konjugation	71
3.1.3.2. Konjugationsbedingungen	74
3.1.3.3. Selektionsbedingungen	77
3.1.3.4. Vergleich der Vektoren	79
3.1.3.5. Transposonmutagenese anderer <i>Pseudomonas</i> - Stämme	81
3.2. Konstruktion der pTnMod-OGm - Donorplasmide	82
3.2.1. Konstruktion der Signalsequenz	82
3.2.2. Ligation der Signalsequenz in pTnMod-OGm	83
3.2.3. Test der pTnMod-OGm -SigTag	85
3.2.3.1. Grundlagen	85
3.2.3.2. Detektionsverfahren	87
3.2.3.3. Auswahl der Signalsequenzen	88
3.2.3.4. Kontrolle der ausgewählten Plasmide	90

3.3. STM in <i>P.aeruginosa</i> TB	92
3.3.1. Durchführung	92
3.3.2. Nachweis der statistischen Insertion	95
3.3.3. Amplifikation der Signalsequenz	97
3.4. Selektion I: Untersuchung der <i>P.aeruginosa</i> TB- Transposonmutanten auf ihre Überlebensfähigkeit in Granulozyten	98
3.4.1. Auswertung der Selektion	99
3.4.2. Ergebnisse	103
3.5. Untersuchungen an ausgewählten <i>P.aeruginosa</i> - Stämmen	103
3.5.1. Invasivität in Epithelzellen	103
3.5.2. Überlebensfähigkeit in Mäusen	107
3.6. Selektion II: Untersuchung der <i>P.aeruginosa</i> TB-Transposonmutanten auf Expression des Quorum Sensing - Systems	109
3.6.1. Durchführung	109
3.6.2. Probleme des Detektionsverfahrens	109
3.6.3. Ergebnisse	111
3.7. Weitere Untersuchungen an ausgewählten Mutanten	111
3.7.1. Liste der Mutanten	111
3.7.2. Quantitativer Test auf intrazelluläres Überleben	112
3.7.3. Quorum Sensing und Proteasesekretion	115
3.7.4. Untersuchung des Metabolismus der <i>P.aeruginosa</i> - Transposonmutanten in der „Bunten Reihe“	121
3.7.5. „Plasmid- Rescue“	121
3.7.6. Sequenzierungen	123
3.7.6.1. Regeln zur Sequenzbestimmung	123
3.7.6.2. Ergebnisse	123
3.8. weitere <i>in vitro</i> und <i>in silico</i> - Charakterisierung einzelner <i>P.aeruginosa</i> TB- Mutanten	125
3.8.1. 2D5	126
3.8.2. 3D1	127

3.8.3. 14B2	130
3.8.4. 14C5	131
3.8.5.15A3	134
3.8.6. 15B10	135
3.8.7. 18A12	136
3.8.8. 19C2	137
3.8.9. 20A6	138
3.8.10. 22D11	139
3.8.11. 23B9	143
3.8.12. 24A12	144
3.8.13. 24C5	146
3.8.14. 37D8	148
3.8.15. 41D3	149
3.8.16. 47D7	151
3.8.17. B7A11	153
3.8.18. B7D3	154
3.8.19. D8A3	155
3.8.20. D8A6	156
3.8.21. D8B6	158
3.8.22.D8B7	158
3.8.23. D9C10	160
3.8.24. D10B10	161
3.9. Funktionelle Interpretation der Phänotypen	162
3.9.1. Sensibilität gegenüber humanem Blutserum	162
3.9.2. Intrazelluläres Überleben in Granulozyten	164
3.9.3. Defekt im Quorum Sensing	168
4. Perspektiven	173

5. Zusammenfassung	174
5.1. Transposonmutagenese in <i>P.aeruginosa</i>	174
5.2. STM in <i>P.aeruginosa</i> TB	175
5.3. Intrazelluläres Überleben in Granulozyten von <i>P.aeruginosa</i> TB und Invasivität	175
5.4. Quorum sensing	177
6. Literatur	179
7. Abkürzungsverzeichnis	190
8. Anhang	191

1. Einleitung

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1. Allgemeines

In der Gattung *Pseudomonas* sind stäbchenförmige, polar begeißelte, gram-negative Bakterien zusammengefaßt (BOTZENHARDT & DÖRING 1993) Bei der Art *Pseudomonas aeruginosa* (aerugo, lat. = Grünspan) handelt es sich um Bakterien der Länge 1,5 - 3 µm und des Durchmessers 0,5- 0,8 µm (PALLERONI, 1986), die der Gruppe der γ- Proteobakterien zugeordnet werden (OLSEN ET AL. 1994). Ihre taxonomische Einteilung erfolgt auf der Grundlage der 16S- rRNA Sequenzen. *P.aeruginosa* zeichnet sich durch die Produktion verschiedener Farbstoffe aus, die zu der Namensgebung des Bakteriums geführt haben: Pyocyanin (blaugrün) (PALLERONI, 1986), Pyoverdin (Fluorescein, gelbgrün), Pyorubin (rötlich) und Pyomelanin (BRAVENY KRUMP- SCHMIDT, 1985) (braun).

P.aeruginosa stellt nur sehr geringe Anforderungen an den Lebensraum (BOTZENHARDT & DÖRING, 1993) und ist durch selektive Regulation seiner Genexpression in der Lage, sich an ein breites Spektrum unterschiedlicher Umweltbedingungen anzupassen. *P.aeruginosa* kann in einem Temperaturbereich von 4° C bis über 43° C wachsen und zahlreiche Verbindungen, so z.B. auch verschiedene Kohlenwasserstoffe oder (halogenierte) Aromaten (HICKLEY & FOCHT 1990; PALLERONI 1986), als Kohlenstoffquelle nutzen. Er wurde sogar in fast reinem Wasser (>71 kΩ) (FAVERO ET AL., 1971) und in einigen Desinfektionsmitteln nachgewiesen (ADAIR 1969; BEAN ET AL. 1967). Diese große Anpassungsfähigkeit macht *P.aeruginosa* zu einem fast ubiquitären Keim (PELLET ET AL. 1983; BOTZENHARDT & DÖRING 1993; CHO ET AL. 1975; HÖFTE ET AL. 1990; MILLER ET AL. 1989; MITCHERLICH & MARTIN 1984; RHAME 1980; ZIELINSKI ET AL. 1992), der nur gegen Austrocknung sehr empfindlich ist. Sie wird von *P.aeruginosa* durch selektive Regulation der Genexpression erreicht, wodurch der Phänotyp der Bakterien je nach Anforderungen des Habitates zwischen einer mukoiden und einer nicht-mukoiden Variante variieren kann (WOODS ET AL. 1991; GOVAN & DERETIC 1996).

In der nicht- mukösen Form ist das Bakterium begeißelt und mit einer vielfältigen Oberfläche ausgestattet, so daß es neue Lebensräume erschließen kann (FLETSCHER & FOODGATE, 1973). Allerdings ist es in dieser Form auch empfindlicher gegen Antibiotika und immunologische Reaktionen eines höheren Organismus. Muköse

P.aeruginosa sind unbegeißelt und unterscheiden sich in vielen phänotypischen Merkmalen von der beweglichen Variante (COSTERTON ET AL. 1987). Der auffälligste Unterschied ist dabei die starke Produktion an Alginate, einem linearen O-acetylierten anionischen Polymer aus 1,4- verknüpfter β - D- Mannuronsäure und α -L- Guluronsäure, das eine hohe Viskosität aufweist (FYFE & GOVAN 1983; GILL ET AL. 1987). Vermutlich wird durch diese Glykokalyx die stabile Anheftung der Bakterien an Oberflächen vermittelt (COSTERTON 1980) und so der Halt der Kolonie gegen Gewässerströmungen oder Zilienbewegungen eines besiedelten Epithels gesichert. Weiterhin wird eine Phagozytose erschwert und die Nährstoffaufnahme erleichtert (COSTERTON 1987).

1.1.2. Genomische Organisation bei *P.aeruginosa*

In den fünfziger Jahren wurden die ersten genetischen Untersuchungen mit Hilfe klassischer Konjugationsmethoden an *P.aeruginosa* PAO durchgeführt, der dadurch zu einem Referenzstamm wurde (HOLLOWAY 1955). Für sein 6,3 MB großes Genom wurde neben einer genetischen Karte (ROYLE ET AL. 1981; O'HOY & KRISHNAPILLAI 1987) mit Hilfe der WFGE eine physikalische Karte unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme erstellt (RÖMLING ET AL. 1989; HOLLOWAY ET AL. 1991; RÖMLING & TÜMMLER 1991; RÖMLING & TÜMMLER 1992). Bisher wurden mehr als 300 Marker auf dem Chromosom lokalisiert (HOLLOWAY ET AL. 1994).

Dabei zeigte sich, daß die zu einer Stoffwechselkette gehörenden Gene in *P.aeruginosa* PAO meistens nicht in einer polycistronischen Genkassette liegen (HOLLOWAY & MORGAN 1986), von einem gemeinsamen Promotor reguliert und, wie z.B. bei *Escherichia coli*, als eine mRNA transkribiert werden, sondern trotz einer gemeinsamen Regulation an verschiedenen Stellen des Genoms kodiert sind (CHANG & CRAWFORD 1990). Die Untersuchung des PAO- Genoms zeigte eine schon von *P.putida* bekannte Zweiteilung: Essentielle und anabole Gene liegen meistens in der Nähe des Replikationsursprungs, katabole und nicht- essentielle zumeist in der anderen Hälfte. Diese Aufteilung ist vermutlich auf die Integration neuer genetischer Elemente, z.B. Plasmide, in ein ehemals kleineres Genom zurückzuführen (KRAWIEC & RILEY 1990; HOLLOWAY & MORGAN 1986, PALLERONI 1993). 2000 wurde die gesamte genomische Sequenz von *P.aeruginosa* PAO veröffentlicht und ist jetzt für weitere *in silico*- Untersuchungen zugänglich (www.pseudomonas.com).

Die genetische Verwandtschaft unterschiedlicher *P.aeruginosa* wurde anhand von 573 Isolaten aus Patienten und Umwelt mit einem Makrorestriktionsverdau und WFGE untersucht. Traten Unterschiede in weniger als 20% der Bandenpositionen auf, wurden die Isolate als klonale Varianten eines Stammes angesehen (RÖMLING ET AL. 1994 (1)), da diese Übereinstimmungen nicht mehr auf statistische Variationen zurückgeführt werden konnten.

Eine als C- Klon bezeichnete dominierende Variante war in 28% der CF- und 21% der aquatischen Umweltisolate zu finden und wies somit keine Präferenz für ein bestimmtes Habitat auf, was eine weite Verbreitung in der Umwelt vermuten läßt. Es konnten sogar „klinikspezifische“ Varianten entdeckt werden (RÖMLING ET AL. 1994 (2)). Die große genetische Ähnlichkeit von Stämmen aus sehr unterschiedlichen Habitaten ist entweder über eine evolutionär sehr junge Radiation oder eine im Prinzip vom Lebensraum unabhängig konservierte Genomorganisation zu erklären. Bei Untersuchung von Isolaten aus *P.aeruginosa*- infizierten CF- Patienten ließ sich neben einer Akquisition aus der Umwelt oft eine nosokomiale Infektion innerhalb einer Klinik oder eine Ansteckung von ebenfalls erkrankten Angehörigen nachweisen (GROTHUES ET AL. 1988; TÜMLER ET AL.1991; HØIBY ET AL. 1989).

1.1.3. *P.aeruginosa* als opportunistisches Pathogen

Neben der saprophytischen Lebensweise besitzt *P.aeruginosa* auch ein pathogenes Potential. Schon 1882 wurde vermutet, daß dieses Bakterium für die grünspanartige Verfärbung von eitrigen Wundverbänden verantwortlich ist (GESSARD 1882). *P.aeruginosa* befällt allerdings Menschen erst dann, wenn deren Immunsystem allgemein oder lokal geschwächt ist. Frühgeborene und Immunsupprimierte sowie Personen, die an Erkrankungen wie Zystische Fibrose (CF), schweren Verbrennungen oder Malignomen leiden, sind die am meisten befallenen Patientengruppen (SCHAAL 1994). Aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit, seiner hohen Antibiotikaresistenz und seinen geringen Nährstoffanforderungen ist *P.aeruginosa* auch in Krankenhäusern zu finden, wo er nach Daten des *National Nosocomial Infections Surveillance System* (USA) mit einem Anteil von 10,1% einer der hauptsächlichen Erreger nosokomialer Erkrankungen ist (BRAVENY, KRUMP- SCHMIDT 1985; POLLAK 1985; HORAN 1986). Während der Besiedelung des Gewebes und der Invasion in Epithelzellen produziert *P.aeruginosa* eine Vielzahl von Virulenzdeterminanten (LORY

& TAI 1985; DÖRING ET AL. 1987). Dazu gehören unter anderem zwei toxische Proteine, Exotoxin A und Exoenzym S, die nach Aufnahme in eukaryontische Zellen deren Zelltod auslösen. Verschiedene Proteasen (Elastase, alkalische Protease, LasA-Fragment) zerstören lokal die Gewebsstruktur im Wirt und hydrolysieren Immunglobuline, Komponenten des Komplementsystems und Rezeptoren der immunkompetenten Zellen. Zusätzlich sezerniert *P.aeruginosa* auch hitzestabile Cytotoxine mit Detergenz- ähnlichen Eigenschaften, sog. Rhamnolipide, die aufgrund ihrer chemischen Struktur weder von Proteasen des Wirtes zersetzt werden können noch eine Immunantwort induzieren.

Ein Großteil der Expression der Pathogenitätsfaktoren von *P.aeruginosa* wird wachstumsabhängig über das Quorum Sensing reguliert (Kap. 1.1.4.). Zusätzlich existiert aber noch ein TypIII- Sekretionssystem, durch das von den Bakterien bei Kontakt mit eukaryontischen Zellen gezielt Toxine durch deren Zellmembran in das Cytosol eingeschleust werden. Diese Enzyme - ExoS (BARBIERI 2000), ExoT (KRALL ET AL. 2000) und ExoU (ALLEWELT ET AL. (2000) - zerstören in den Zielzellen durch ADP-Ribosylierungen das Cytoskelett und die Transportprozesse. Die Ausstattung an Toxinen ist bei den einzelnen *P.aeruginosa* Stämmen unterschiedlich und verursacht die unterschiedlichen Pathogenitätsmechanismen verschiedener *P.aeruginosa*- Isolate. Bei Expression von ExoS und ExoU zeigen die Bakterien einen für Eukaryonten cytotoxischen Phänotyp, bei Expression von ExoT sind die Bakterien invasiv (HAUSER ET AL. 1998).

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen akuten Infektion bleibt der chronische *Pseudomonas*- Befall bei CF- Patienten auf die Lunge beschränkt, ist dort aber ein entscheidender Faktor für den Krankheitsverlauf (PIER 1985; HØIBY 1986).

In der Anfangsphase der Infektion erfolgt eine wiederholte Besiedlung der Lunge durch die nicht- muköse Form von *P.aeruginosa* aus einem geschützten Bereich des Nasen- Rachenraumes. Die dabei von den Bakterien sezernierten Toxine (z.B. Exotoxin A) und Enzyme (z.B. Elastase, Hämolyse und proliferationshemmende Proteinase (WINKLER ET AL. 1985)) führen zur Schädigung des Gewebes und einer Verzögerung der Immunantwort. Diese Pathogenitätsfaktoren werden zum Teil konstitutiv exprimiert und über das TypIII- Sekretionssystem der Bakterien direkt in die Zellen des Wirtes sezerniert oder vom Quorum Sensing reguliert in das umgebende Medium freigesetzt. Während der Infektion kommt es zu einer Anpassung beider Pathogenitätsmechanismen an die Bedingungen in der Lunge des chronisch besie-

delten CF- Patienten (GALLANT CV ET AL.2000; DACHEUX D ET AL. 2000). Eine Wandlung zu dem bei den meisten CF- Patienten gefundenen mukoiden Phänotyp erleichtert den *P.aeruginosa* zusätzlich die chronische Infektion der Lunge (PITT, 1986), ist aber nicht zwingend notwendig. Die bei CF- Patienten gefundene chronische Hypergammaglobinämie und Leukozytose wird durch Toxine und stark antigen wirkende Zellwandbestandteile der Bakterien ausgelöst. Viele der gebildeten Antikörper sind jedoch nicht opsonierend (z.B. durch eine von bakteriellen Enzymen ausgelöste proteolytische Spaltung), so daß die Phagozytose der Bakterien erschwert ist. Werden Immunkomplexe von Leukozyten phagozytiert, können sie nicht abgebaut werden, so daß die Zellen lysiert und die in ihnen enthaltenen Enzyme freigesetzt werden. Dies führt durch Entzündungen und Nekrosen zu weiteren Schädigungen (FICK ET AL., 1985; HØIBY, 1986) und zu einem fibrotischen Umbau des Lungengewebes (HØIBY, 1986). Zusätzlich können durch Alginat und Mucin ganze Bereiche der Lunge verschlossen werden, wodurch es in den so entstehenden Atelektasen zu einem irreversiblen Umbau des Lungengewebes kommt. Die für Respiration zur Verfügung stehende Fläche wird dadurch zunehmend kleiner und die Patienten sterben an einer pulmonalen Insuffizienz. Eine vollständige Eliminierung der Bakterien ist nach Auftreten von mukösen Mikrokolonien nur noch im Einzelfall durch extrem hohe Antibiotikagaben möglich, da die Diffusionswege in den Kern der Kolonie weit sind, und *P.aeruginosa* aufgrund seines vielseitigen Stoffwechsels eine große Anzahl der Antibiotika metabolisieren kann (OLSON ET AL., 1985; MULGRAVE, 1991; IYOPE, 1991).

Im Verlauf der chronischen Infektion kommt es bei den besiedelnden *P.aeruginosa* teilweise zu einer genetisch fixierten Konversion des Phänotyps. Die entstehenden Formen zeichnen sich durch ein mukoide Kolonieform, Verkürzung der Lipopolysaccharidketten der äußeren Zellmembran, Verlust von Pili und Flagellen sowie eine verringerte systemische Virulenz aus (OJENIYI ET AL. 1994; DERETIC ET AL. 1995; GOLDBERG & PIER 1996).

1.1.4. Quorum Sensing bei *P.aeruginosa*

1.1.4.1. Allgemeines

Die meisten Bakterien verfügen über ein als Quorum Sensing bezeichnetes System, um ihre Genexpression entsprechend ihrer Wachstumsdichte zu regulieren. Das zuerst beschriebene Beispiel ist die Luciferaseproduktion in *Vibrio fischerii*, einem

Bakterium, das symbiotisch in den Lichtorganen einiger mariner Lebewesen lebt. Nur bei hoher Zelldichte wird von diesen Bakterien die Luciferase exprimiert. Die Regulation dieser Genexpression erfolgt über die Konzentration eines Acyl-Homoserinlactons (AHL) im umgebenden Medium. Dieses AHL wird von den Bakterien auf geringem Niveau konstitutiv produziert. Solange die Konzentration gering bleibt, erfolgt auch keine Expression der Luciferase. Bei höheren Bakteriendichten steigt die Konzentration der AHL im Medium und durch Diffusion auch im Cytosol der Bakterien an. Dort können die Moleküle an entsprechende Rezeptoren binden, wodurch dann AHL- Synthase und AHL- Rezeptor verstärkt exprimiert werden. Zusätzlich wird in *Vibrio fischerii* auch das Luciferasegen durch Bindung des AHL- Rezeptors verstärkt transkribiert. Es handelt sich somit um einen Prozeß, der ab einer definierten Zelldichte selbstverstärkend abläuft.

Generell werden Acyl- Homoserinlactone in allen Bakterien von einer AHL- Synthase aus S-Adenosylmethionin und einem Zwischenprodukt des Fettsäuremetabolismus, Acyl- Acyl Carrier Protein (ACP), gebildet. Die AHL- Synthase gehört zur Familie der LuxI- ähnlichen Enzyme. Ihre Expression wird in allen gram- negativen Bakterien von einem AHL- Regulator aus der Familie der LuxR- Regulatoren kontrolliert.

1.1.4.2. Quorum Sensing in *P.aeruginosa*

In *P.aeruginosa* ist das Quorum Sensing deutlich komplexer strukturiert. Es existieren dabei mehrere Quorum Sensing - Systeme:

Vom LasR / LasI - System wird die Produktion von 3-Oxododecanoyl-L- Homoserinlactonen reguliert. LasR ist dabei der Regulator, LasI die AHL- Synthase. Ist ein solches 3-Oxododecanoyl-L- Homoserinlacton an LasR gebunden, so kann sich dieser Rezeptor an entsprechende Promotorregionen anlagern und so die Expression von LasR, LasI und weiteren Regulatoren verstärken. (Aufgrund dieser positiven Rückkopplung werden AHL auch als „Autoinducer“ bezeichnet.) Zusätzlich reguliert LasR-AHL auch die Expression weiterer Gene, z.B. Pathogenitätsfaktoren wie Proteasen und Elastasen oder der Gene, die zur Ausbildung eines Biofilms notwendig sind.

Außerdem wird von LasR-AHL die Expression eines zweiten Quorum Sensing- Systems, RhlI/RhIR, durch Bindung an die entsprechenden Promotorregionen stimu-

liert. Die AHL- Synthase RhII produziert als Autoinducer N-Butyryl-L-Homoserinlacton. Dieses zweite Regulationssystem kontrolliert die Pyoverdin-, Pyocyanin-, Cyanid- und Rhamnolipid- Produktion in *P.aeruginosa* (VAN DELDEN C ET AL. 1998). Ferner scheint es eine Wechselwirkung zwischen diesem Regulationssystem und der Expression der Sigma- Faktoren zu geben, durch die der Eintritt der Bakterien in die stationäre Phase eingeleitet wird. Bei der genauen Beschreibung dieser Wechselwirkung gibt es in der aktuellen Literatur allerdings noch Unklarheiten (WHITELEY M ET AL. 2000).

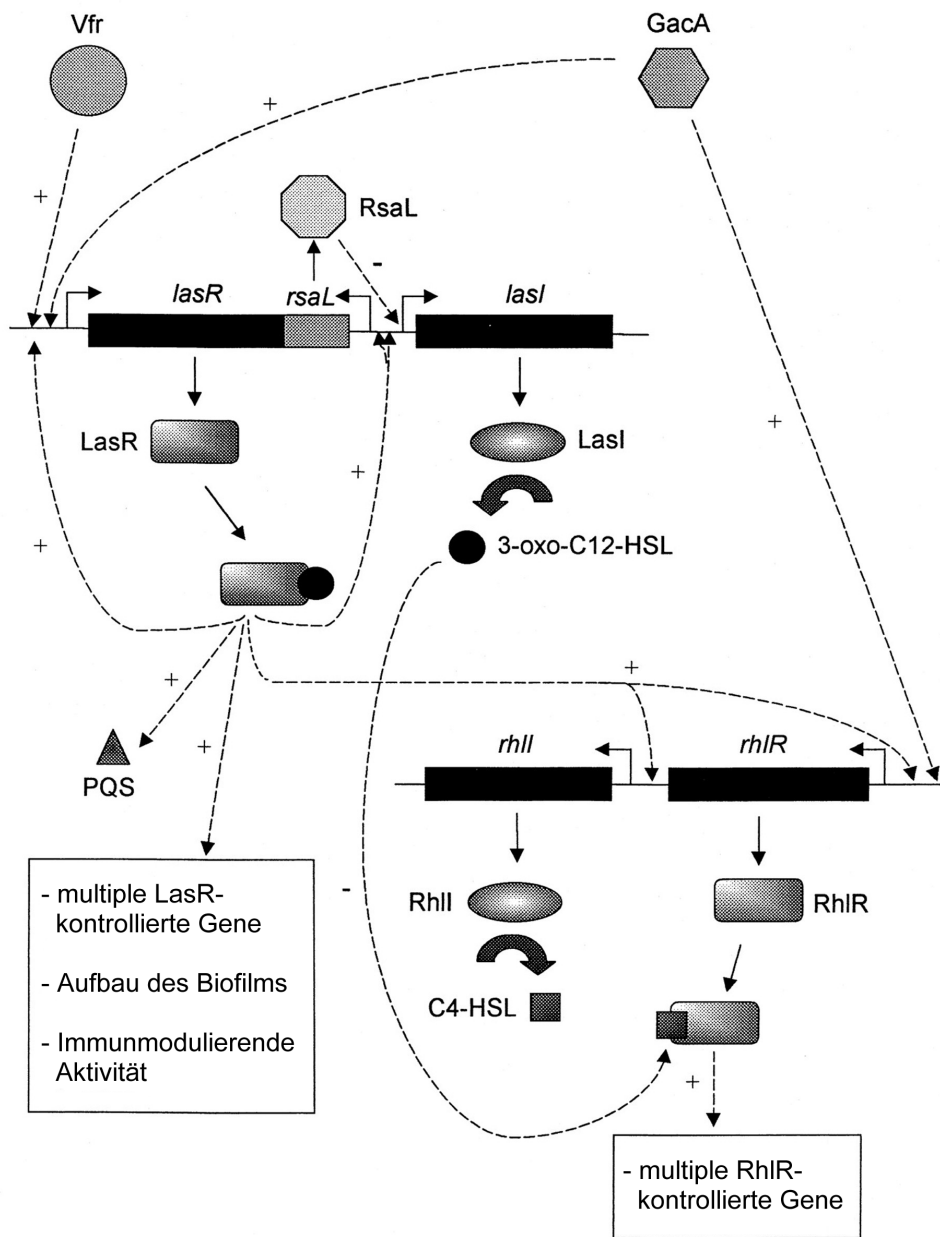


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Regulationsprozesse des Quorum Sensings in *P.aeruginosa* PAO. (Darstellung nach: DEKIEVIT & IGLEWSKI 2000)

Es existieren in *P.aeruginosa* noch weitere Wechselwirkungen, durch die das Quorum Sensing in diesem Organismus zu einem sehr komplexen Regulationssystem mit vielen Rückkopplungsschritten wird. Die wichtigsten sind hierbei:

Vfr: Vfr ist ein cAMP- bindendes Protein der LuxR- Familie. Es bindet nach Aktivierung an die Promotorregion von *lasR* und aktiviert so die Transkription dieses Gens (ALBUS ET AL. 1997).

GacA: Dieses Protein ist wie Vfr ein übergeordneter Regulator des Quorum Sensings und aktiviert die Transkription von *lasR* und *rhIR* (REIMMANN ET AL.1997). Der Aktivator von GacA ist unbekannt.

RsaL: *rsaL* ist in *P.aeruginosa* Genom direkt hinter *lasR*, allerdings auf dem Gegenstrang, kodiert. RsaL wirkt als negativer Regulator auf die AHL- Synthase LasI. Eine starke Expression von RsaL führt so zu einer geringeren Produktion an Homoserinlactonen und einer verminderten Sekretion von Elastase, wodurch wiederum die Virulenz des betreffenden *P.aeruginosa* beeinflusst wird. (DEKIEVIT ET AL. 1999)

PQS: In *P.aeruginosa* PAO existiert noch ein drittes Quorum Sensing - System (PESCI ET AL. 1999). Es wird als PQS bezeichnet. Das hier sezernierte Signalmolekül ist 2-Heptyl-3-hydroxy-4-chinolon. Dieses Signalsystem scheint ebenfalls über Regulatoren der LuxR- Familie gesteuert zu werden und mit den bekannten Systemen LasR/LasI und RhIR/RhII in Wechselwirkung zu stehen (McKNIGHT ET AL. 2000). Die am PQS- System beteiligten Enzyme und Regulatoren sind bisher zum größten Teil unbekannt.

Eine weitere Besonderheit der Regulatoren des Quorum Sensings ist, daß sie in ihrer Struktur sehr ähnlich sind. Somit konkurrieren an jedem Regulator alle AHL mit jeweils unterschiedlichen Bindungskonstanten um einen Bindungsplatz. Die Bindung eines falschen Regulators an eine Promotorsequenz führt zu einer Inhibition der Transkription, die Bindung eines falschen AHL an ein Regulatorprotein zu einer Inaktivierung des Moleküls. Auf diese Weise existieren neben den selbstverstärkenden Reaktionskaskaden auch Prozesse, die bei einer hohen AHL- Konzentration limitierend auf die weitere Produktion von AHL wirken können.

Die große strukturelle Ähnlichkeit der AHL- Rezeptoren vom LuxR- Typ, die bei allen

gram- negativen Bakterien zu finden ist, bedeutet, daß an die Regulatoren des Quorum Sensing einer Bakterienspezies auch AHL anderer Bakterien mit einer abweichenden Struktur der aliphatischen Seitenkette binden können. Es ist daher eine gemeinsame Reaktion und Regulation von bakteriellen Gemeinschaften auch über Speziesgrenzen hinweg möglich (PARSEK & GREENBERG 2000; WHITELEY ET AL. 2000; DEKIEVIT & IGLEWSKI 2000).

Reaktionen auf äußeren Streß

Die Aktivierung des Quorum Sensings erfolgt als Reaktion auf äußeren Streß, sei es durch Limitation der Nährstoffe, was zu einer Aktivierung von Vfr führt, oder durch die Anwesenheit anderer Bakterien. Durch Aktivierung des Quorum Sensings kommt es in allen Fällen zu einer Anpassung der Bakterien an die Bedingungen der stationären Phase. Hierbei bewirkt das Quorum Sensing durch Umstellungen des Expressionsmusters vor allem eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Streß und eine verstärkte Produktion eisenbindender Komplexe:

Die Expression von zwei Superoxiddismutasen und einer Katalase wird direkt über das *lasR/lasI*- System reguliert (HASSETT ET AL. 1999).

- In Biofilmen und in planktonisch schwimmenden *P.aeruginosa* wird durch das Quorum Sensing die Expression von unterschiedlichen Genen reguliert. Unter Eisen- limitierenden Bedingungen ist in *P.aeruginosa* die Expression von Mn-Superoxiddismutase (SOD) am höchsten. In Biofilmen wird allerdings keine Mn-SOD exprimiert. (BOLLINGER ET AL. 2001)
- Bei Ausschalten des Quorum Sensing wird vor allem PvdD, der Proteinanteil des Siderophors Pyoverdin, nicht mehr exprimiert. Es erfolgt somit eine Regulation der Siderophorproduktion durch das Quorum Sensing. Eine hohe Bakteriendichte führt dabei zu einem Produktionsanstieg von (STINTZI ET AL.1998).

Pathogenität

Die Pathogenität von *P.aeruginosa* wird durch das Quorum Sensing moduliert. LasR-AHL reguliert direkt die Expression von LasB (Elastase), LasA (Protease), AprA (alkalische Protease) und ToxA (Exotoxin A) (HORNEF ET AL. 2000; STOREY ET AL.1998; PRESTON ET AL.1997; GAMBELLO ET AL.1993), RhIR-AHL die Produktion von Pyoverdin, Pyocyanin, Cyanid und Rhamnolipid (BRINT & OHMAN 1995; VAN DELDEN ET AL.

1998). Während der logarithmischen Wachstumsphase sind die Bakterien nur wenig pathogen. Die meisten Pathogenitätsfaktoren werden erst während der stationären Phase exprimiert. Die höchste Produktion von AHL wurde bei den *P.aeruginosa*-Isolaten gefunden, die im Tiermodell schwere pathologische Veränderungen hervorriefen (WU ET AL. 2000)

Bei Untersuchungen zur Infektion von Brandwunden zeigte sich im Tiermodell, daß *P.aeruginosa*-Mutanten mit einem Defekt in *lasR*, *lasI*, *rhlR* oder *rhlI* eine deutlich verringerte Virulenz hatten. Mutanten mit einem Knock-out in *lasR* oder einer Doppelmutation in *lasI* und *rhlI* waren im Gegensatz zum Wildtyp nicht in der Lage, sich vom Punkt der Infektion weiter über die ganze Brandwunde auszubreiten (RUMBAUGH ET AL. 1999). Die gleichen Abstufungen in der Virulenz zeigten sich bei Infektion neonataler Mäuse mit *P.aeruginosa*. Mutanten mit einem Defekt in *lasI* und *rhlI* waren nahezu avirulent, bei Defekt in nur einem der beiden Gene waren die Bakterien deutlich attenuiert (PEARSON ET AL. 2000). Die Funktionalität des Quorum Sensings ist somit für die Virulenz von *P.aeruginosa* von entscheidender Bedeutung.

In pathogenen *E.coli* wird zusätzlich über das Quorum Sensing die Expression des TypIII- Sekretionssystems reguliert (SPERANDIO ET AL. 1999). Ein ähnlicher Mechanismus ist aus *P.aeruginosa* bisher nicht belegt.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* TB

1.2.1. Eigenschaften

Dieser Stamm wurde 1983 in einem CF- Patienten mit akuter und chronischer Hypoxämie entdeckt und ließ sich durch Antibiotikagaben nicht aus der Lunge eliminieren. Erst eine hochdosierte kombinierte 14- tägige i.v.- Therapie mit Ceftazidim und Tobramycin erbrachte eine Verbesserung des klinischen Zustandes.

Phänotypisch ist dieser Stamm wie die meisten aus CF- Patienten isolierten *P.aeruginosa* mukös, weicht jedoch in einigen Parametern deutlich ab: Während andere Isolate im Zuge ihrer Adaptation an das Habitat Lunge fast alle Oberflächenmarker verloren haben und daher nicht mehr mit Phagen typisierbar sind, zeigt TB eine Reaktion auf viele Phagen. Dies läßt den Schluß zu, daß bei diesem Bakterium eine vielfältigere Zelloberfläche vorliegen muß (s. Kap. 2.1.5.).



Abb. 1.2. *Pseudomonas aeruginosa* TB
nach 24 h Inkubation (37°C) auf Blutagar

Die schwere Eliminierbarkeit von *P.aeruginosa* TB und das geringe Ansprechen auf eine antibiotische Therapie deuteten darauf hin, daß dieses Bakterium entweder eine ungewöhnlich hohe Resistenz oder einen atypischen Pathogenitätsmechanismus aufweist. Bei den Untersuchung im Labor stellte sich heraus, daß *P.aeruginosa* des Typs TB intrazellulär in Granulozyten überleben können. Zur Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden *P.aeruginosa* (zum einen TB , zum anderen eine nicht intrazellulär überlebensfähige klonale Variante) mit Granulozyten im Verhältnis 20:1 gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Aliquote entnommen und die Lebendkeimzahl bestimmt (MIETHKE N 1985).

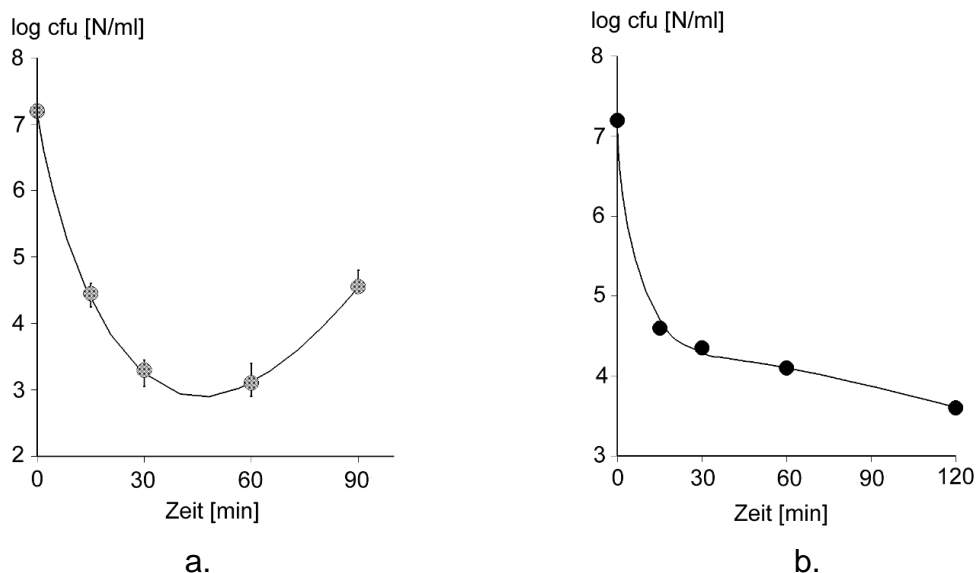


Abb.1.3. Lebendkeimzahlbestimmungen von *P.aeruginosa* bei Inkubation mit Granulozyten. a.: *P.aeruginosa* TB
b.: beliebiges *P.aeruginosa* - Isolat
(Abbildung nach MIETHKE N,1985)

Zu Beginn der Inkubation mit den polymorphkernigen Granulozyten ist fast kein Unterschied zwischen einem intrazellulär nicht überlebensfähigem Stamm und *P.aeruginosa* TB zu sehen. In beiden Fällen sinkt innerhalb weniger Minuten die Lebendkeimzahl um ca. 3 Größenordnungen. Allerdings steigt bei *P.aeruginosa* TB nach ca. 60 min die Lebendkeimzahl wieder an. Für eine eindeutige phänotypische Charakterisierung wurden daher Bakterien der Stämme SG17M, 892 und TB jeweils im Verhältnis 20:1 mit Granulozyten inkubiert und nach bestimmten Inkubationszeiten elektronenmikroskopische Präparate der phagozytierten Bakterien angefertigt:

***P.aeruginosa* SG17M**

Schon nach 15 min Inkubation waren keine lebensfähigen *P.aeruginosa* SG17M mehr in den Granulozyten zu finden. Nur noch die Reste einiger Zellwände waren zu sehen. Dieser Bakterienklon gehört zu der Gruppe der klonalen Varianten des Stammes C, des in Mitteleuropa häufigsten Umwelt- und Klinikisolats (RÖMLING U ET AL. 1994 (1)).

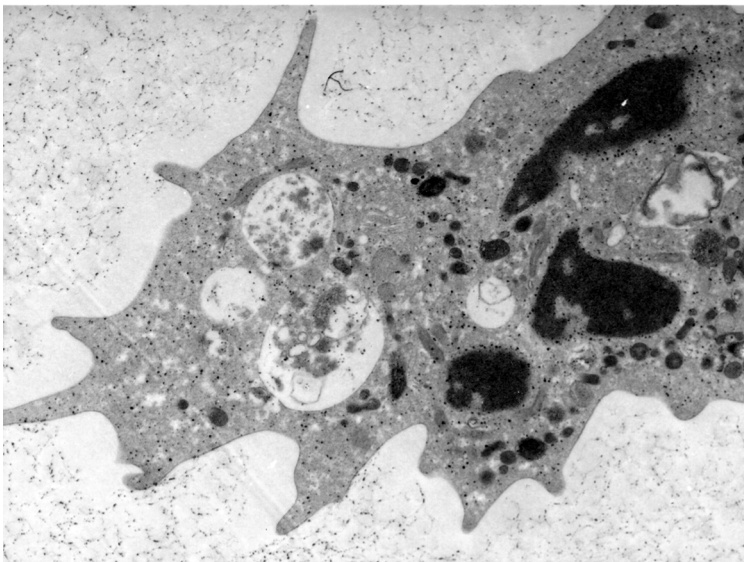


Abb. 1.4.
Granulozyt mit Resten von
phagozytierten *P.aeruginosa*
SG17M nach 15 min
Inkubation.

***P.aeruginosa* 892**

P.aeruginosa 892 ist eine klonale Variante des Stammes TB, der in infizierten CF-Patienten ebenfalls zu schweren Krankheitssymptomen führte. Er zeigte aber in den *in vitro*- Untersuchungen keine Fähigkeit zum intrazellulären Überleben in Granulozyten. Dies bestätigten auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die zeig-

ten, daß die Bakterien in den Granulozyten zwar länger überleben konnten als die des Klons C, aber dennoch nicht unbegrenzt intrazellulär persistieren konnten. Nach 15 min waren noch intakte Bakterien auf den Aufnahmen zu sehen, nach 60 min fast nur noch Reste abgetöteter *P.aeruginosa* 892.

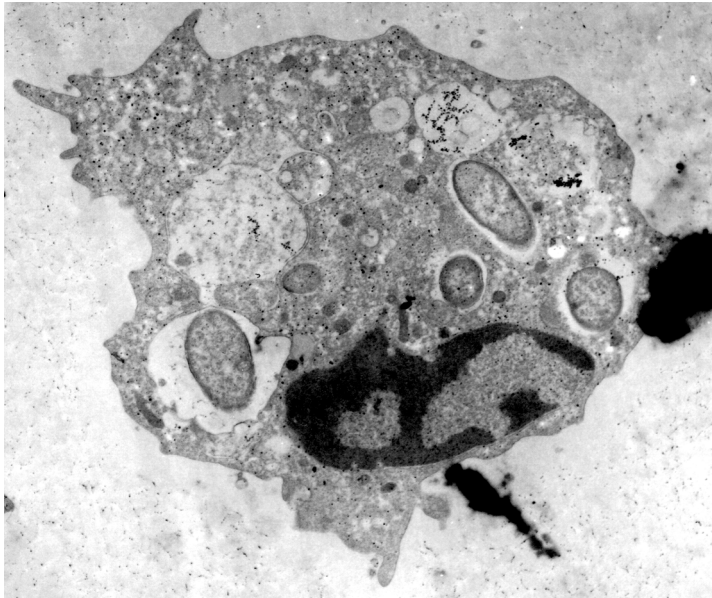


Abb. 1.5.
Granulozyt mit phagozytierten
P.aeruginosa 892 nach 15 min
Inkubation

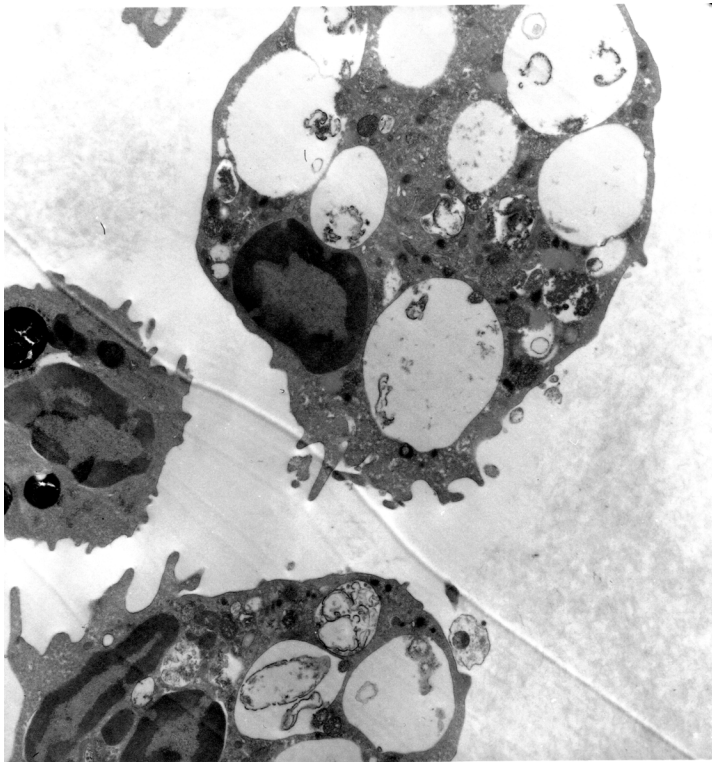


Abb. 1.6.
Granulozyten mit den
Resten von phagozytierten
P.aeruginosa 892 nach
60 min Inkubation

***P.aeruginosa* TB**

Obwohl einige Bakterien des Typs *P.aeruginosa* TB intrazellulär in den Granulozyten lysiert werden, scheint ein großer Teil stabil persistieren zu können. Auch nach 60 min Inkubation mit Granulozyten sind noch intakte Bakterien in den Phagosomen zu sehen. Zusätzlich waren nach 60 min auch einige Zellteilungen zu beobachten.

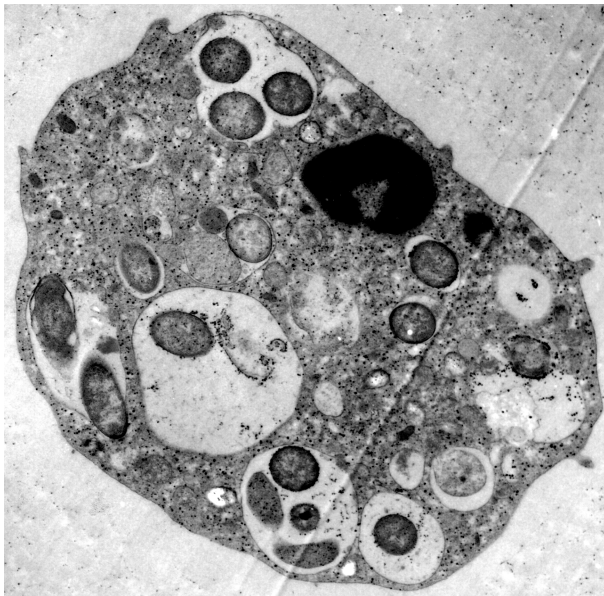


Abb. 1.7.
Stabile intrazelluläre *P.aeruginosa* TB nach 15 min Inkubation mit Granulozyten

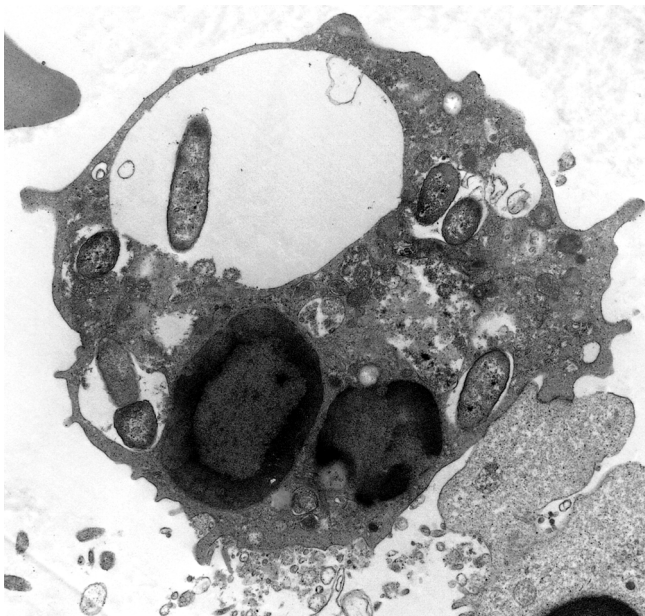


Abb. 1.8.
Granulozyten mit intakten intrazellulären *P.aeruginosa* TB nach 60 min Inkubation

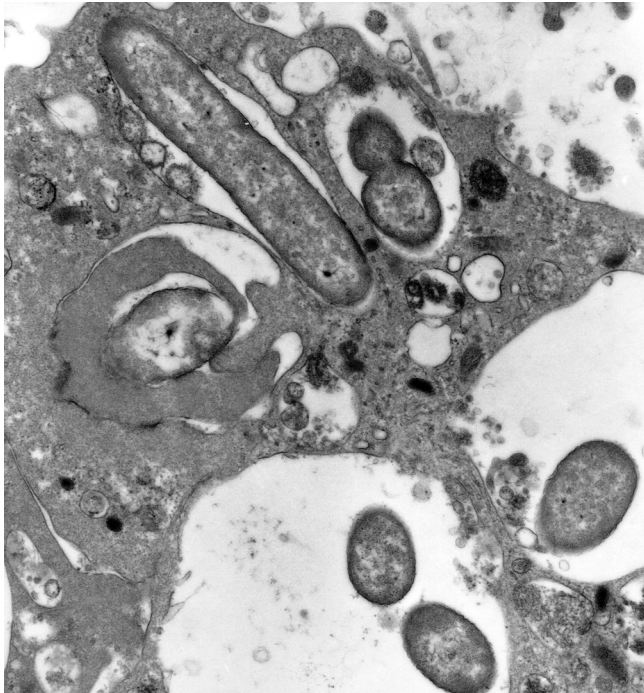


Abb. 1.9.

Ausschnitt eines Granulozyten nach 60 min Inkubation mit *P.aeruginosa* TB. Bei einigen der phagozytierten Bakterien sind Zellteilungen zu beobachten.

P.aeruginosa TB kann also nicht nur in den Phagosomen überleben, er kann sich unter diesen Bedingungen sogar ohne lange Adaptation vermehren. Berücksichtigt man, daß die für diese Experimente verwendeten *P.aeruginosa* TB vorher in der stationären Phase waren, so wurden die Zellteilungen zum frühestmöglichen Zeitpunkt beobachtet. Diese elektronenmikroskopischen Abbildungen bestätigten die Werte der aufgenommenen Wachstumskurven. Bei fortgesetzter Inkubation über mehr als 120 min wurden die Granulozyten sichtbar geschädigt (Große Vakuolen, Form- und Strukturveränderungen bis zur Apoptose) (MIETHKE 1985) und die intrazellulären Bakterien freigesetzt.

Ein Makrorestriktionsverdau der genomischen DNA zeigte nach der Auftrennung in der WFGGE ein Fragmentmuster, das stark von dem des dominierenden C- Klons abwich (s. Kapitel 1.1.2.). Seit Mitte der achtziger Jahre traten keine weiteren Infektionen mit diesem Bakterium oder seinen klonalen Varianten auf.

1.2.2. Intrazelluläre Vermehrung von Bakterien

Ein Überleben oder sogar eine Vermehrung in eukaryontischen Zellen ist bei vielen Bakteriengattungen, wie z.B. *Salmonella*, *Yersinia*, *Legionella*, *Listeria*, *Chlamydia* und *Mycoplasma* (MILLER ET AL. 1994), nicht ungewöhnlich. Sogar ein Laborstamm wie *E.coli* K12 zeigt hierfür ein geringes Potential (SINAI & BAVOIL 1993). Der Aufnahme-

mechanismus ist dabei je nach Bakterium und Gewebe unterschiedlich: Während normalerweise die Aufnahme in eine eukaryontische Zelle von den Prokaryonten selbst durch Stimulierung entsprechender Rezeptoren ausgelöst wird, ist die Phagozytose durch Makrophagen oder polymorphkernige Granulozyten ein Prozeß, an dessen Ablauf die Bakterien nicht beteiligt sind. Die Prozesse, die sich an diese Aufnahme anschließen, können je nach Bakterienstamm und Gewebe unterschiedlich sein; im folgenden werden daher nur die grundlegenden Prinzipien dargestellt.

Nach der Aufnahme in ein Phagosom kommt es in der Zelle zu Prozessen, die der Lyse des Bakteriums dienen sollen. Hierzu werden z.B. in die Phagosomenmembran ATPasen integriert, durch die der pH-Wert der Vakuole auf 4,5 - 5,3 gesenkt wird (ISBERG 1994). Zusätzlich wirken lysosomale Enzyme und kationische Peptide, die als Detergentien der prokaryontischen Zellmembran operieren, auf die Bakterien ein. Daneben findet in Leukozyten noch eine Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen statt. (ISBERG 1994). Gegen die Ansäuerung des Mediums existiert bei einigen Bakterien Resistenz (HACKSTADT & WILLIAMS 1981), andere dagegen verhindern den Einbau der ATPasen durch gezielte Störung des Wirtsstoffwechsels (MILLER ET AL. 1994). Auf die gleiche Art werden auch die anderen lytischen Mechanismen außer Kraft gesetzt (HORWITZ 1983). Diese Fähigkeiten sichern dem aufgenommenen Bakterium aber nur das intrazelluläre Überleben, für eine Vermehrung muß zusätzlich eine Nährstoffquelle verfügbar sein. Dies wird bei einigen Bakterien durch eine Lyse der Phagosomenmembran und damit einen direkten Kontakt zum Zytoplasma sichergestellt (CAMILLI ET AL. 1993), andere dagegen nutzen die Inhaltsstoffe des Phagosoms zum Wachstum. Beide Mechanismen sind in der Anfangsphase nicht sehr effektiv, so daß bei den meisten Bakterien eine mehrstündige Latenzzeit vor der Vermehrung eintritt (MILLER ET AL. 1994).

Sowohl die Aufnahme in eukaryontische Zellen als auch das Ausschalten der lytischen Mechanismen erfolgt durch Einschleusung bakterieller Proteine in das Zytoplasma der Wirtszelle (STEPHENS & SHAPIRO 1996). Hierzu stehen prinzipiell drei Transportsysteme zur Verfügung: Typ I (ein Porenkomplex durch beide prokaryontischen Membranen) und Typ II (Proteine werden mit Hilfe einer Signalsequenz in den periplasmatischen Raum und von dort durch ein zweites Transportsystem aus der Zelle geleitet) sind je nach sezerniertem Protein und Bakterienstamm unterschiedlich aufgebaut. Bei dem unter pathogenen Bakterien (z.B. *Yersinia sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Bordetella sp.*, *P.aeruginosa*) weit verbreiteten Typ III dagegen

handelt es sich um einen großen Proteinkomplex, der im Aufbau und den Proteinsequenzen eine hohe Homologie zum Basalkörper eines bakteriellen Flagellums aufweist (CORNELIS & VAN GIJSEGEM 2000). Der Unterschied des Typ III- Sekretionsystems besteht nur in den anderen Signalsequenzen der auszuschleusenden Proteine und in der Beteiligung eines Proteins des Typ II- Kanals am gebildeten Porenkomplex (PUGSLEY 1993). Im Gegensatz zu den anderen Transportsystemen öffnet der Typ III- Kanal, der eine hohe Ähnlichkeit zum membrangebundenen Teil bakterieller Flagellen aufweist, nur bei direktem Zell- Zell- Kontakt mit einer eukaryontischen Membran und schleust dann entsprechende toxische Proteine direkt in das Cytosol des Eukaryonten ein. Die Funktion dieser Proteine ist je nach Bakterium unterschiedlich. Einige zerstören die Struktur des Cytoskeletts, um so die Invasion der Bakterien zu ermöglichen (CORNELIS 2000, *Yersinia pestis*), andere scheinen gerade eine Phagozytose zu verhindern oder den phagozytierten Bakterien das intrazelluläre Überleben durch Störung des Metabolismus der Wirtszelle zu ermöglichen (HAUSER ET AL. 1998). Interessanterweise zeigen die Typ III- Kanäle unterschiedlicher Bakteriengattungen zueinander eine sehr viel höhere Homologie als zu den entsprechenden Flagellen, so daß das Sekretionssystem einer Gattung korrekt Toxine einer anderen exportieren kann (ROSQVIST ET AL. 1995). So sind die einzelnen Komponenten und Toxine der Transportsysteme von *P.aeruginosa* und *Yersinia enterocolitica* durch ihre entsprechenden Gegenstücke ersetzbar, ohne daß dieses hybride Typ III- Transportsystem seine Funktionalität verliert (FRITZH- LINDSTEN ET AL. 1998). Lediglich die Art der ausgeschleusten Proteine unterscheidet sich. Diese Ähnlichkeit läßt vermuten, daß die betreffenden Bakterienstämme diese Genkassette durch horizontalen Transfer von einem bisher unbekanntem Donorstamm erst vor (evolutionär) relativ kurzer Zeit (wenige Millionen Jahre) erworben haben (BARINAGA 1996).

1.3. Methoden zur funktionellen Genomanalyse

1.3.1. Transposonmutagenese

Bei der Transposonmutagenese wird mit Hilfe eines geeigneten Vektorsystems ein Transposon in eine Zelle eingeführt und in das Genom integriert. Hierbei wird durch eine Transposase die genomische DNA- Sequenz mit einem Einzelstrang- Überhang geschnitten und das Transposon mit glatten Enden integriert. Eine DNA- Poly-

merase füllt die entstandenen Lücken auf, so daß links und rechts der Transposoninsertion eine Duplikation der DNA- Sequenz stattfindet. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Transposon *Tn5* erfolgt die Insertion sequenzunabhängig mit einer Sequenzduplikation von 9-12 Bp. Erfolgt die Insertion in einem kodierenden Abschnitt, wird ein Gen ausgeschaltet und gleichzeitig markiert. Tritt durch diesen Verlust eine phänotypische Veränderung auf, so ist die betreffende Mutante selektierbar. Ausgehend von der bekannten Transposonsequenz kann eine Sequenzierung des umliegenden DNA- Bereichs erfolgen.

Es ergeben sich bei diesem Verfahren zwei Probleme: Zum einen ist das Auftreten einer Transposition selten und daher entsprechende Mutanten nur schwer zu finden, zum anderen ist dieses Ereignis aber dennoch häufig genug, daß nach mehreren Generationen durch weitere Transpositionen Subspezies entstehen können, bei denen wiederum andere Gene zusätzlich ausgeschaltet worden sind. In den meisten Fällen bleibt ein einmal ausgeschaltetes Gen auch dann funktionslos, wenn das Transposon bereits wieder an einer anderen Stelle im Genom inseriert ist: Durch die Art der Transposoninsertion kommt es nämlich neben einer Verdopplung eines Sequenzabschnitts auch häufig zu einer Leserasterverschiebung. Eine verlässliche Detektion, welche Insertion in einem Transposonmutanten zu der beobachteten phänotypischen Veränderung führte, ist somit schwierig.

Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, ist die Verwendung eines Minitransposons in einem Suizid- Plasmid. Dies sei am verwendeten System dargestellt. Ein Minitransposon hat folgenden Aufbau:

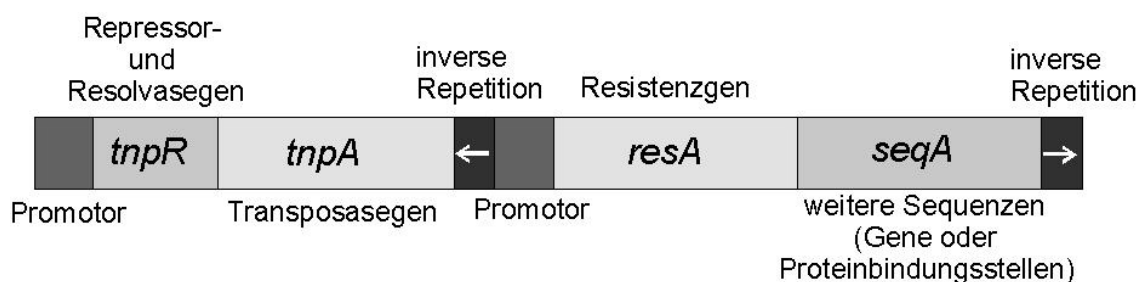


Abb. 1.10. Schematischer Aufbau eines Minitransposons

Zuerst wurde dazu ein resistenzvermittelndes Transposon in ein Plasmid integriert. Die Transposase wurde herausgeschnitten und in einen Bereich außerhalb der IR-Sequenzen inseriert. Eine Transposition transponiert nur den von den IR- Elementen eingeschlossenen Bereich, so daß die Transposase auf dem Vektor verbleibt. Das

Plasmid kann aber nur dann stabil in einer Zelle verbleiben, wenn es replizierbar und kompatibel ist. In dieser Arbeit wurden zwei Vektorsysteme verwendet:

pUT besitzt als Replikationsursprung ein *oriR* 6K, der nur dann korrekt zur Replikation des Plasmides verwendet werden kann, wenn in der Zelle ein sog. π - Protein, das von einem λ pir- Phagen codiert wird, vorliegt. Dies bedeutet, daß das Plasmid in den meisten Bakterienstämmen nicht stabil vermehrt werden kann und zusammen mit der auf ihm codierten Transposase verloren geht, so daß ein Transpositionsergebnis irreversibel wird (DE LORENZO ET AL. 1990).

Bei pTnMod-OGm liegt der Replikationsursprung *oriR* PMB1 im mini- Transposon, so daß nach der genomischen Insertion das übrige Plasmid mit der Transposase nicht mehr replizierbar ist (DENNIS & ZYLSTRA 1998).

Wird nun auf die vom Transposon vermittelte Resistenz selektiert, so werden alle Bakterien ohne Transposoninsertion abgetötet und nur die Mutanten können wachsen.

Soll überprüft werden, ob ein auf diese Weise ausgeschaltetes Gen für die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps verantwortlich ist, kann dies durch den Vergleich von Originalstamm und Transposonmutante in einem geeigneten Differenzierungsansatz geschehen. Kann der Ausgangsstamm eine bestimmte Selektionsbedingung überleben, der Mutant dagegen nicht, so ist das ausgeschaltete Gen für das Überleben unter diesen ausgewählten Bedingungen essentiell.

1.3.2. STM

Das o.g. Verfahren ist vom Prinzip einfach, doch gibt es in der Praxis Probleme: Die Insertion eines Transposons ins Genom erfolgt (im Idealfall) rein statistisch. Soll das Genom von *P.aeruginosa* (6 Mb) mit Hilfe der Transposon- Mutagenese durchsucht werden und bei jedem 1000. Nukleotid eine Insertion erfolgen, so ist dazu die Erzeugung und Überprüfung von 6000 verschiedenen Transposonmutanten notwendig. Berücksichtigt man, daß die Insertion statistisch erfolgt, so sind sogar noch mehr Transposonmutanten zum Erreichen dieses Ziels notwendig. Dies ist in einem vernünftigen Zeit- und Materialrahmen nicht möglich.

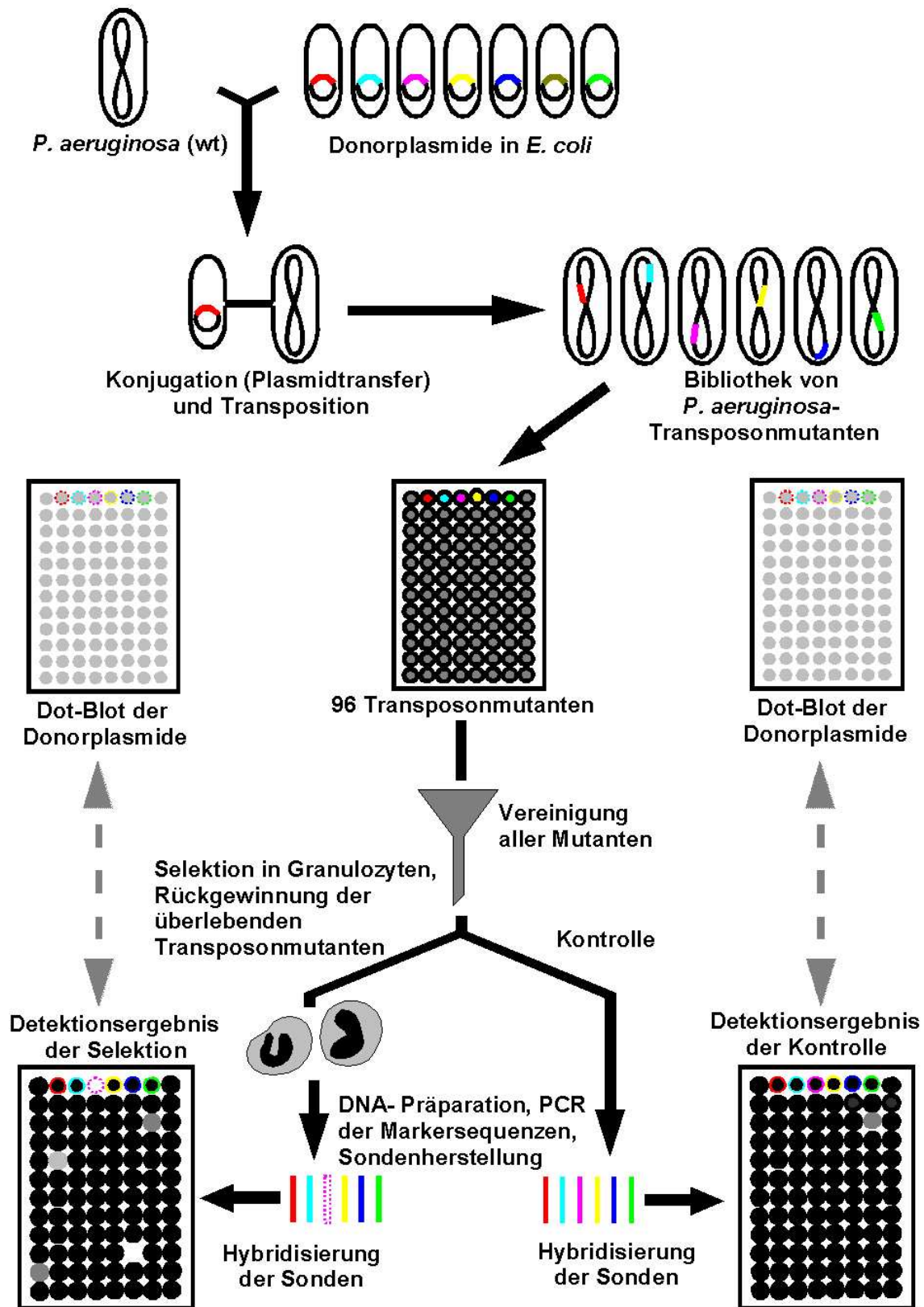


Abb. 1.11. Schematischer Ablauf eines STM- Selektionsexperiments

Das STM- Verfahren ermöglicht die parallele Untersuchung von bis zu 100 verschiedenen Mutanten in einem einzigen Ansatz. Dafür wird ein Unterscheidungsmerkmal zwischen den einzelnen Stämmen benötigt. Dies läßt sich durch den Einbau einer von bekannten Sequenzen flankierten statistischen Zufallssequenz in das Transposon erreichen, die derart konstruiert werden muß, daß zum einen eine möglichst große Vielfalt sichergestellt ist, auf der anderen Seite aber keine Haarnadelschleifen gebildet werden können (s. Kap. 3.2.). Es ist weiterhin von Vorteil, wenn die Sequenz von einigen vorher festgelegten Restriktionsenzymen nicht gespalten werden kann, da so eine einfachere Handhabung bei molekularbiologischen Arbeiten möglich wird.

Beim ursprünglich publizierten STM- Verfahren (HENSEL ET AL.1995) wurden die Transposonmutanten durch Konjugation des Zielstammes mit einem Pool von Donorstämmen erzeugt, in dem mehrere tausend unterschiedliche Signalsequenzen vertreten waren. Von dieser Methode der Mutantenerzeugung wurde in späteren Arbeiten wegen starken Schwankungen in der Signalstärke und häufig fehlerhaften Hybridisierungen ähnlicher Signalsequenzen abgesehen. Außerdem war es sehr schwierig, die Vielfalt der Signalsequenzen in den Donoren aufrechtzuerhalten, da es mit jeder Subkultur zu einer immer stärkeren Verarmung des Donorpool kam. Die Transposonmutanten wurden deshalb in späteren Experimenten aus einer Gruppe von separat angezogenen Donoren erzeugt. Diese Gruppe enthielt zumeist 48 verschiedene Donorplasmide, da es bei Verwendung von 96 verschiedenen Signalsequenzen in einer Detektion oft zu starken statistischen Signalschwankungen kam (DARWIN & MILLER 1999).

Mit diesen Donorplasmiden wurden die Transposonmutanten des zu untersuchenden Stammes erzeugt und in Mikrotiterplatten geordnet. Parallel in einem adäquaten Medium angezogen, konnten dann 48 bis 96 Transposonmutanten vor einer Selektion vereinigt werden, wobei im Idealfall alle Proben bei Versuchsbeginn die gleiche Zelldichte haben sollten. Diese Bakterienmischung wurde in zwei Ansätze aufgeteilt. Ein Teil wurde den gewählten Selektionsbedingungen ausgesetzt, der andere ohne Selektionsdruck inkubiert. Aus beiden Gruppen wurde nach Beendigung der Selektion jeweils die genomische DNA der Bakterien präpariert und die spezifischen Signalsequenzen durch PCR amplifiziert und mit einem geeigneten Verfahren markiert. Diese Sondenlösungen wurden dann mit einen DNA- Blot hybridisiert, auf den die Signalsequenzen der Donorplasmide gebunden waren.

Bei dem ursprünglichem STM- Verfahren (HENSEL ET AL. 1995) wurde die genomischen DNA der Transposonmutanten als Kolonieblot auf eine Membran gebunden. Alternativ erhält man durch das Fixieren der Donor- Plasmide (oder sogar der PCR- Produkte der Signalsequenzen) auf der Membran universell verwendbare Blots, die zusätzlich noch ein exzellentes Signal- Rausch Verhältnis aufweisen.

Im Selektionsansatz fehlen nun die Signalsequenzen von den Bakterien, die den Selektionstest **nicht** überlebt haben. Dementsprechend werden bei der Hybridisierung mit dem DNA- Blot die dazu gehörenden Donor- Plasmide (oder PCR- Produkte) **nicht** markiert. Mutanten, die das zu selektierende Merkmal nicht ausprägen, können somit identifiziert und in dem betreffenden DNA- Abschnitt sequenziert werden, da dort durch das Transposon eine bereits bekannte Sequenz inseriert worden ist (HENSEL ET AL. 1995)

1.3.3. IVET

Die In Vivo Expressionstechnologie (IVET) ist ein Verfahren zur Identifikation aller Gene, die unter definierten Selektionsbedingungen verstärkt exprimiert werden (MAHAN ET AL. 1993; SLAUCH ET AL.1994;RAINEY ET AL.1997). Hierzu wird die genomische DNA des zu untersuchenden Organismus fragmentiert und vor einen promotorlosen Selektionsmarker (z.B. Antibiotikaresistenz, GFP) in ein geeignetes Vektorsystem kloniert. Diese Vektoren werden durch Transformation oder Konjugation in den zu untersuchenden Organismus eingeführt. Je nach Vektor erhält man episomale Plasmide oder durch homologe Rekombination genomisch integrierte Selektionsmarker. In die Bibliothek werden nur die Bakterien übernommen, die unter den gewählten Standardbedingungen den entsprechenden Selektionsmarker nicht exprimieren.

Werden die so ausgewählten Mutanten in einem Versuchsansatz einem entsprechenden Selektionsdruck ausgesetzt, so verändern sie ihr Expressionsprofil. Enthält die in den Vektor eingefügte Sequenz einen Promotor, der unter diesen veränderten Bedingungen abgelesen wird, so wird auch der entsprechende Selektionsmarker abgelesen und die entsprechenden Mutanten können identifiziert werden. Von der bekannten DNA- Sequenz aus ist dann eine Sequenzierung des unbekanntem inserierten DNA- Fragments möglich. Im Gegensatz zur Transposonmutagenese und deren Weiterentwicklung STM ist IVET eine positive Selektion. Es werden daher nicht nur die Gene identifiziert, die für die Anpassung an ein bestimmtes Habitat

essentiell sind, sondern alle Gene, deren Expression durch die Selektionsbedingungen erhöht wurde. Dies können beispielsweise auch Gene des Stoffwechsels sein, wenn die Zusammensetzung des Nährmediums verändert ist. Mit IVET werden daher stets mehr Gene gefunden als bei STM mit einer dominant negativen Selektion. Es ist aber bei IVET keine Aussage möglich, ob diese Gene auch tatsächlich essentiell sind. Zusätzlich ist denkbar, daß Gene für das Überleben in einem Habitat notwendig sind, aber konstitutiv stark exprimiert werden. Auch diese Gene werden nicht gefunden, da hier keine Signaländerung zu detektieren ist. Zusätzlich hat dieses Verfahren noch zwei weitere Nachteile. Da prinzipiell alle Bakterien die Selektion überleben, ist eine parallele Untersuchung mehrerer Mutanten in einem Experiment nur selten möglich. Zusätzlich ist auch eine Untersuchung von Pathogenitätsfaktoren *in vivo* nur schwer durchführbar, da die Bestimmung der veränderten Expression des Selektionsmarkers während des Experiments erfolgen muß.

1.3.4. DNA- Chiptechnologie

Die Anwendung der DNA- Chiptechnologie setzt voraus, daß das Genom des zu untersuchenden Organismus vollständig sequenziert ist. Unter dieser Voraussetzung ist es möglich, einen DNA- Chip zu konstruieren, auf dem die Sequenzen aller putativen ORFs fixiert sind. Wird aus diesem Organismus die gesamte mRNA gewonnen, in cDNA- Fragmente umgeschrieben und entsprechend markiert, so kann durch Hybridisierung mit dem DNA- Chip ein Expressionsprofil des gesamten Genoms unter den gewählten Wachstumsbedingungen erstellt werden. Durch Vergleich der Expressionsprofile in verschiedenen Habitaten ist die Identifizierung aller Unterschiede im Expressionsmuster möglich (WEI ET AL. 2001).

Auch dieses Verfahren hat einige Nachteile. Man erhält -wie bei IVET- die Summe aller Gene, deren Expression verändert wurde. Eine Aussage, ob ein einzelnes Gen für die Anpassung essentiell war, ist auf Grundlage dieses Experiments nicht möglich. Auch werden Gene nicht identifiziert, die zwar eventuell essentiell für die Ausprägung eines Phänotyps waren, aber konstitutiv exprimiert werden. Ebenso ist es mit der bisherigen Technik noch nicht möglich, gute Ergebnisse von Genen zu erhalten, die nur schwach exprimiert werden. Diese kodieren häufig für Schlüsselproteine (z.B. Regulatoren), können aber, selbst wenn eine Änderung im Expressionsmuster vorliegen sollte, aufgrund des schwachen Signals oft nicht identifiziert werden.

1.4. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau einer Bibliothek von STM- Transposonmutanten in *Pseudomonas aeruginosa* TB und die Identifikation von Genen, die für das intrazelluläre Überleben dieses Bakteriums in neutrophilen Granulozyten essentiell sind. Bisher ist nur eine Minderheit von *P.aeruginosa* - Stämmen einer Transposonmutagenese zugänglich. Im ersten Teil dieser Arbeit soll ein effizientes Verfahren zur Erzeugung von Transposonmutanten aus verschiedenen *P.aeruginosa*- Isolaten entwickelt werden. Eine für die Verwendung in *P.aeruginosa* optimierte Signalsequenz ist zu konstruieren und in ein geeignetes Vektorsystem zu klonieren. Diese STM-Vektoren sind auf vergleichbare Signalstärken und spezifische Hybridisierung unter definierten Bedingungen zu optimieren.

Mit diesen Vektoren soll eine Bibliothek von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten aufgebaut und entsprechend den Signalsequenzen geordnet werden.

Die Transposonmutanten sollen gruppenweise mit Granulozyten inkubiert werden, um so in einem kompetitiven Ansatz diejenigen Mutanten zu identifizieren, deren Fähigkeit zum intrazellulären Überleben deutlich vermindert ist. Ziel ist hierbei die Entwicklung eines nichtradioaktiven Detektionsverfahrens zur parallelen quantitativen Identifikation der Signalsequenzen der jeweils eingesetzten Transposonmutanten.

Anhand der Transposonmutanten, die eine Veränderung in ihrer intrazellulären Überlebensfähigkeit aufweisen, soll eine Methode zur Sequenzierung der flankierenden Bereich der Transposoninsertion etabliert werden. Durch Vergleich der gefundenen Sequenzen mit Datenbanken sollen, soweit möglich, die für das intrazelluläre Überleben in Granulozyten essentiellen Gene identifiziert werden. Wo aufgrund von Datenbankhomologien eine eindeutigen Funktionsvorhersage möglich ist, sollen Mutanten durch phänotypische Untersuchungen in ihren individuellen Abweichungen charakterisiert werden.

Bei allen entwickelten Verfahren zum Aufbau der STM- Bibliothek und zur Detektion der Signalsequenzen ist darauf zu achten, daß eine Anwendung auch bei anderen *Pseudomonas*- Isolaten möglich ist.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Brutschrank	Heraeus
Labofuge I	Heraeus
Dri- Block DB-3	Techne
eppendorf- Centrifuge 5415C	Eppendorf
eppendorf- Centrifuge 5417R	Eppendorf
eppendorf- Thermostat 5320	Eppendorf
Hybridisierungssofen 400 HY	Bachofer
UV- Transilluminator	Bachofer
Vacuum Concentrator	Bachofer
Minifold I Vakuum- Blotter	Schleicher und Schuell
Schüttelwasserbad Modell G76	New Brunswick Scientific
Schwenktisch HS250	Janke & Kukul Ika Labortechnik
Sorvall- Zentrifuge RC5B Plus	DuPont
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
Waage BP3100S	
BP210 S	Sartorius

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Filterpapier GB003	Schleicher u. Schuell
Filter Celluloseester HA 0,45 µm	Millipore
Filter Celluloseacetat 5µm Porengröße	Sartorius
Pasteurpipette	Sarstedt
Petrischalen 9 cm Ø	Sarstedt
Pipettenspitzen (1ml, 200µl, 10µl)	Sarstedt
Polaroidfilm 667	Polaroid
Reaktionsgefäß (50 ml, 15 ml)	Greiner
Reaktionsgefäß (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt
Röntgenfilm X-Omat AR	Kodak

2.1.3. Chemikalien und Enzyme

AB- Serum	Blutbank MHH	Nylonmembran	
Agar	Gibco BRL	Hybond N+	Amersham
Agarose	Gibco BRL	Oligonukleotide	MWG Biotech
anti-Digoxigenin AP	Boehringer		Pharmacia,
CDP- Star	Tropix		GibcoBRL
DEA	Tropix	PIPES	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma	PBS- Tabletten	GibcoBRL
FCS	GibcoBRL	Proteinase K	Sigma
Formaldehyd 35%	Merck	Qia- Maxi Prep	Qiagen
Gentamicin	Serva	RNase A	Qiagen
Goldstar- Polymerase + Puffersystem	Eurogentec	Restriktionsenzyme + Puffersysteme	New England Biolabs
Kanamycin	Sigma	RPMI 1640	GibcoBRL
Klenow- Polymerase	Boehringer	T4- Ligase	Boehringer, New England
I-Block	Tropix		
Liquemin (Heparin)	Merck	Taq- Polymerase + Puffersysteme	InViTek
LMP- Agarose	Bethesta Res.	Terminale Transferase	
Lymphozyten- Separationsmedium	GibcoBRL	+ Puffersystem	Boehringer
Nitrocellulosemembran	Schleicher& Schuell	Uranylacetat für EM	Merck, Plan

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

2.1.4. Lösungen

- (1) **LB- Medium :**
- | | | |
|--------|------------------|--------|
| 15 g/l | Caseinhydrolysat | |
| 5 g/l | Hefeextrakt | |
| 10 g/l | NaCl | pH 7,0 |

LB- Gm: LB- Medium mit 25 µg/ml Gentamicin

LB- Km: LB- Medium mit 50 µg/ml Kanamycin

LB- Agar: Zur Herstellung eines festen Nährbodens wurden jeweils 15 g/l Agar zugesetzt.

- (2) **M9- Medium (10x):**
- | | |
|-----------|----------------------------------|
| 68,14 g/l | Na ₂ HPO ₄ |
| 30 g/l | KH ₂ PO ₄ |
| 5 g/l | NaCl |
| 10 g/l | NH ₄ Cl |

Vor Gebrauch Zugabe einer Kohlenstoffquelle.

Glycerol: 0,2 %

Casein: 0,5 %

Gelatine: 0,5 %

M9- Agar: Zur Herstellung eines festen Nährbodens wurden jeweils 15 g/l Agar zugesetzt. Agar und Wasser wurden separat autoklaviert. 10x M9- Medium und die entsprechende Kohlenstoffquelle wurden direkt vor dem Gießen des Agars zugesetzt.

(3) **TBE- Puffer (10x):** 0,9 M Tris (108 g/l)
 0,9 M Borsäure (55 g/l)
 0,02 M EDTA (7,5 g/l) pH 8,3- 8,5

(4) **Auftragspuffer (6x):** 15 % Ficoll 400
 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylencyanol
 0,5 M EDTA pH 8,0

(5) **PBS (10x):** 1,37 M NaCl (80 g/l)
 27 mM KCl (2 g/l)
 4,3 mM Na₂HPO₄ · 7 H₂O (11,5 g/l)
 1,4 mM KH₂PO₄ (2 g/l) pH ~ 7,3

(6) **SOB:** 20 g/l Bactotrypton
 5 g/l Hefeextrakt
 10 mM NaCl (0,58 g/l)
 2,5 mM KCl (0,185 g/l) pH 7,0
 10 mM MgCl₂ (1 g/l) vor Gebrauch zugeben
 10 mM MgSO₄ (1,2 g/l) vor Gebrauch zugeben

(7) **SOC:** SOB + 20 mM Glucose (3,6 g/l)

(8) **TB- Puffer:** 10 mM PIPES (3 g/l)
 15 mM CaCl₂ (1,6 g/l)
 250 mM KCl (18,6 g/l)

mit KOH pH 6,7 einstellen, dann erst
 50 mM MnCl₂ (9,85 g/l Tetrahydrat)
 sterilfiltrieren und bei 4°C lagern

(9) **TE- Puffer:** 10 mM Tris-Cl (1,2 g/l)
 1 mM EDTA (0,38 g/l) pH 7,5

(10) **Plasmid- Präparation:**

Lösung I: 50 mM Tris-Cl (6 g/l)
 10 mM EDTA (0,38 g/l)
 100 µg/ml DNase freie RNase A pH 8,0

Lösung II: 0,4 M NaOH (16 g/l)
 1 % SDS

- Lösung III:** 3 M Kaliumacetat (294 g/l)
2 M Essigsäure (115 ml/l)
- (11) **Lysispuffer :** 40 mM Tris-Acetat (4,84 g/l)
20 mM Natriumacetat (1,64 g/l)
1 mM EDTA (0,38 g/l)
1 % SDS pH 7,8
- (12) **Fixierlösung:** 1 x PBS
1 % Paraformaldehyd
1 mM CaCl₂ (0,11 g/l) pH 7,2-7,4
- (13) **Gelfiltration-Farbstoffgemisch:** 0,8% Dextranblau (2·10⁶ g/mol)
0,5% Phenolrot (376 g/mol)
- (14) **Blotpuffer:** 0,4 M NaOH (16 g/l)
1,5 M NaCl (87 g/l)
- (15) **Blot- Waschpuffer:** 50 mM Natriumphosphat (NaH₂PO₄·2H₂O: 7,8g/l)
mit NaOH pH 6,5 einstellen
- (16) **Prähybridisierungspuffer:**
7% SDS
0,5 M Natriumphosphat (NaH₂PO₄·2 H₂O: 78 g/l)
1 mM EDTA (0,38 g/l)
0,5 % Blockingreagenz (Boehringer)
Durch Erwärmen auf 50-70°C lösen pH 7,2
- (17) **Nicht- radioaktive Detektion:**
- Hybridisierungs- Waschpuffer:**
40 mM Natriumphosphat (NaH₂PO₄·2 H₂O:6,3 g/l)
1 % SDS
1 mM EDTA (0,38 g/l) pH 7,2
- Puffer I:** 100 mM Tris ·Cl (12 g/l)
150 mM NaCl (8,7 g/l) pH 7,5
- Puffer II:** Puffer I + 0,5 % Blocking- Reagenz (Boehringer)
- Antikörperlösung:** 1: 5000 Verdünnung Anti- Digoxigenin AP F_{ab}-
alkalische Phosphatase- Konjugat (Boehringer) in
Puffer II
- Puffer III:** 100 mM Tris·Cl (12 g/l)
100 mM NaCl (5,8 g/l)
50 mM MgCl₂ (4,8 g/l) pH 9,5

(18) Waschlösung:	0,2 M 0,1 %	NaOH (8 g/l) SDS	
(19) Immunoblot- Detektion:			
Waschlösung A:	1 x 0,1 % 0,2 %	PBS ⁽⁵⁾ Tween 20 I-Block	
Waschlösung B:	1 x 0,1 %	PBS ⁽⁵⁾ Tween 20	
Assay-Puffer:	0,96 % 1 mM	DEA MgCl ₂ (0,1 g/l)	pH 10
Nitroblock- Lösung:	5 % 0,96 % 1 mM	Nitroblock DEA MgCl ₂	pH 10
(20) Blutagar:	5 % 1,5 %	Schafblut Columbia-Agar	

Prozentangaben

Bei Einwaage von Feststoffen:	Gewicht/Volumen (g/100 ml)
Bei Zugabe flüssiger Substanzen:	Volumen/Volumen (ml/100 ml)

2.1.5. Bakterien

2.1.5.1. *Escherichia coli*

CC118 λ pir:

$\Delta(ara-leu)$, *araD*, $\Delta lacX74$, *galE*, *galK*, *phoA20*, *thi-1*, *rpsE*, *rpoB*, *argE(Am)*, *recA1*, λ pir Phage lysogen

Verwendung: Stabile Lagerung der Plasmide pUT miniTn5 Km2 und pUT Gm

S17-1 λ pir:

Tp^r Sm^r *recA*, *thi*, *pro*, *hsdR* M^r RP4-2:Tc: Mu : Km Tn7, λ pir

Verwendung: Donorstamm (pUT mini Tn5 Km2 und pUT Gm) in biparentaler Konjugation

DH5 α :

F⁻, ϕ 80, *m80lacZ* Δ M1S, Δ (*lacYZA-argF*)_{U169}, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (r_K⁻; m_K⁺), *supE44*, λ ⁻, *thi*, *gyrA*, *relA1*

Verwendung: Lagerung von pTnMod-OGm und Donorstamm in triparentaler Konjugation

HB101:

F⁻, *leuB6*, *proA2*, *recA13*, *thi-1*, *ara-14*, *lacY1*, *galk2*, *xyl-5*, *mtl-1*, *rpsL20*, *supE44*, *hsdS20* (r_B⁻; m_B⁻)

Verwendung: Als Träger des Plasmides pRK2013 Helferstamm in triparentaler Konjugation

2.1.5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Folgende *P.aeruginosa*- Stämme wurden eingesetzt:

TB: Serotyp: 4
Pyocintyp: 1h
Phagenlysotypie: F8, M4, PS2, PS24, PS31, 352, 46b/2, 1214, Col21, F7, F10, PS21, PS73
Ein Plasmid konnte nicht nachgewiesen werden.

Bereits in Kap. 1.2. beschrieben.

892: Serotyp: 4
Pyocintyp: 1h
Phagenlysotypie: F8, M4, PS2, PS24, PS31
Ein Plasmidnachweis wurde nicht durchgeführt.

Der Stamm 892 ist eine klonale Variante (RÖMLING ET AL. 1994) des Stammes TB

PAO1: Der Stamm *P.aeruginosa* PAO1 gilt als genetischer Referenzstamm. Die meiste veröffentlichte Literatur bezieht sich auf ihn und seine klonalen Varianten.

2.1.6. Vektoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Vektoren zur Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB verwendet. Biparentale Konjugationen wurden mit dem pUT- Vektorsystem durchgeführt, triparentale mit den Vektoren pTnMod-OGm und pRK2013 (Kap. 2.2.4.).

2.1.6.1. pUT mini-*Tn5* Km2

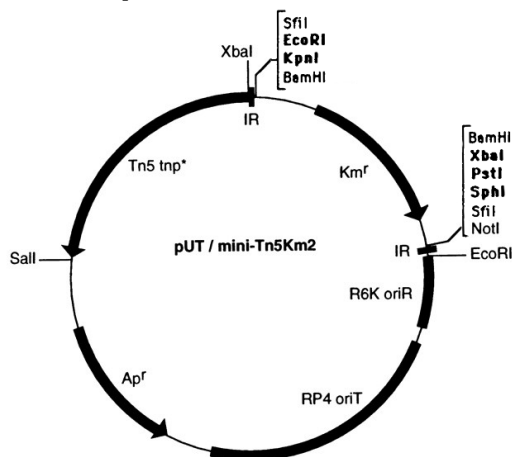


Abb.2.1.
Der Vektor pUT mini-*Tn5*Km2
(Abb. nach DENNIS & ZYLSTRA 1998)

Der Vektor pUT wurde aus pGP704 entwickelt. Durch den *ori* R6K wird dieser Vektor zu einem Suizidplasmid, da er nur in Bakterien, die das π - Protein des λ pir- Phagen exprimieren, korrekt ablesbar ist (DELORENZO & TIMMIS 1990). Die mit *oriT* RP4 gekennzeichnete Region enthält alle Sequenzen, die zur Initiation eines konjugativen Plasmidtransfers nötig sind. Die *Ap^r*- Region kodiert eine Ampicillinase, die als Selektionsmarker in *E.coli* dienen kann, nicht jedoch in *P.aeruginosa*, da diese Bakterien eine genomisch kodierte β - Laktamase besitzen. Mit *tnp^{*}* ist der Bereich des Plasmids gekennzeichnet, der die Transposase des *Tn5* kodiert. Unter Kontrolle des gleichen Promotors wird in diesem Bereich zusätzlich noch ein zur Transposase gehörendes, in seiner Sequenz überlappendes Repressorgen kodiert (BERG 1989). Der Stern weist auf eine eingeführte stille Mutation im Transposasegen hin, durch die eine *NotI*- Schnittstelle eliminiert wurde (DELORENZO & TIMMIS 1990).

Das Transposon wurde in die „multi- cloning- site“ des Plasmids inseriert. Die verwendete Kanamycinresistenz stammte aus dem Transposon *Tn903*, aus dem sie als *BamHI*- Fragment herausgeschnitten und in den Vektor pUC18 inseriert wurde. Aus diesem wurde die Sequenz dann als *SfiI*- Fragment in das ebenso verdaute pUT

mini-*Tn5* ligiert. Die spezifische Markersequenz wurde bei der Vorbereitung des Transposons zur STM in die *KpnI*- Schnittstelle inseriert (HENSEL ET AL. 1995).

2.1.6.2. pUT Gm

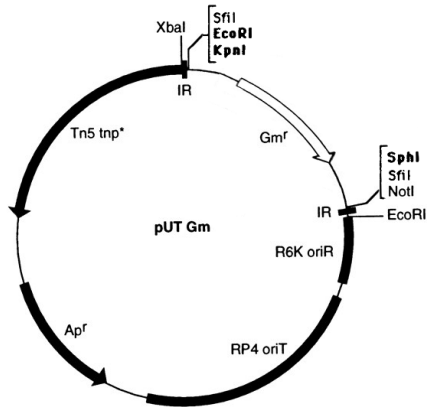


Abb.2.2.
Der Vektor pUT Gm

Zur Konstruktion dieses Plasmids wurde die Kanamycinresistenz mit *KpnI* und *SphI* in einem Doppelverdau herausgeschnitten und eine Gentamicinresistenz (aus pMS246; SCHWEIZER 1993) einkloniert. Dabei kam es zu einem Verlust der ursprünglichen Signalsequenz des pUTmini-*Tn5*Km2, die dann durch eine optimierte Version (s. Kap. 3.2.) ersetzt wurde.

2.1.6.3. pTnMod-OGm

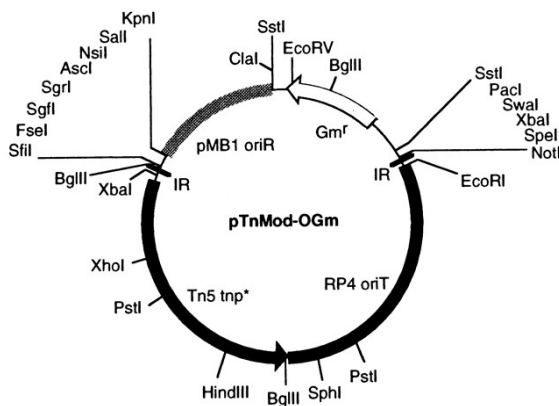


Abb. 2.3.
Der Vektor pTnMod-OGm
(Abb. nach DENNIS & ZYLSTRA 1998)

Beim pTnMod-OGm handelt es sich um ein sog. Plasposon. Von seinem Aufbau ist es den pUT- Plasmiden sehr ähnlich. Auch bei pTnMod-OGm handelt es sich um ein Plasmid mit einem mini-*Tn5* (mit einer Gentamicinresistenz) und einem *oriTRP4* zum konjugativen Transfer. Wie bei pUT verbleibt die Transposase nach einer Transposition auf dem Plasmid. Allerdings umfaßt die transponierte Sequenz bei pTnMod-OGm auch den Replikationsursprung des Plasmides. Dies bedeutet, daß das Rest-

plasmid nach erfolgter Transposition nicht mehr repliziert werden kann und somit verloren geht. Der verwendete Replikationsursprung *oriR* pMB1 ist zudem zwar in den meisten *E.coli* - Stämmen, nicht aber nicht in *P.aeruginosa* stabil exprimierbar. Ein weiterer Vorteil dieses Vektors liegt darin, daß somit eine erneute Mobilisierung der flankierenden Bereiche des inserierten mini- Transposons als Plasmid möglich wird (s. Kap. 2.2.9.3. Plasmid rescue).

2.1.6.4. pTnMod-OGm-ST

In diesem Plasmid wurde die optimierte Signalsequenz flankierend zum Replikationsursprung in die *KpnI*- Schnittstelle des pTnMod-OGm ligiert. Das Plasmid eignet sich somit zur Generierung von Mutanten mit spezifischen Signalsequenzen.

2.1.6.5. pRK2013

pRK2013 ist ein sog. Helferplasmid. Es kodiert für sämtliche Gene, die für eine Konjugation notwendig sind (*tra* und *mob*). Mit seiner Hilfe sind andere Plasmide, die einen RP4- *oriT* besitzen, mobilisierbar, auch wenn der Donor- Stamm selbst nicht über die zur Konjugation notwendigen Gene verfügt (FIGURSKI D & HELINSKI D 1979).

2.2. Methoden

Im den folgenden Kapiteln werden die für die vorliegende Arbeit notwendigen Methoden dargestellt. Hochgestellte Indexzahlen (z.B. LB- Medium⁽¹⁾) verweisen auf die in Kap. 2.1.4. beschriebene Zusammensetzung der entsprechenden Lösung.

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Anzucht von Bakterien

Das meistverwendete Kulturmedium zur Bakterienanzucht war Luria- Bertiani- (LB-) Medium⁽¹⁾. Zumeist erfolgte die Anzucht der Bakterien aus Einzelkolonien in 5 ml LB (37° C, 250 rpm, 12- 16 h). Für größere Ansätze, bei denen Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet werden sollten, wurden 2- 3 ml dieser Vorkultur in ein größeres Volumen (je nach Ansatz 100- 250 ml) LB- Medium überführt und für einige Stunden inkubiert (37° C, 150 rpm), bis die gewünschte Zelldichte erreicht

war. Als lagerfähige Kultur oder zur Selektion diente LB- Agar mit einem entsprechenden Antibiotika- Zusatz. Die so erhaltenen Platten waren - mit Parafilm verschlossen - im Kühlschrank 2- 3 Wochen haltbar.

Selektionsmedien:

<i>E.coli</i> DH5 α pTnMod-OGm	LB + 25 μ g/ml Gentamicin
<i>E.coli</i> HB101 pRK2013	LB + 50 μ g/ml Kanamycin
<i>P.aeruginosa</i>	LB + 50 μ g/ml Gentamicin und M9(Glycerol) ⁽²⁾ + 50 μ g/ml Gentamicin

2.2.1.2. Bestimmung der Bakterienzeldichte

Alle Zelldichte- Bestimmungen wurden auf einem Photometer bei 578 nm vorgenommen. Der Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zelldichte ist unter diesen Bedingungen wie folgt:

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	0,6 OD \approx 1 \cdot 10 ⁹ Zellen/ml
<i>Escherichia coli</i> :	1,0 OD \approx 0,8 \cdot 10 ⁹ Zellen/ml

2.2.1.3. Anlegen von Glycerolkulturen

Glycerolkulturen können bei -70° C über lange Zeiträume gelagert werden. Hierzu wurden die Bakterien einer Ausgangskultur sedimentiert (10 min, 3000 xg), der Überstand verworfen und die Zellen in ca. 1/5 Vol. frischem LB- Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 15% Glycerol eingestellt und bei -70°C gelagert.

2.2.2. Auftrennung von DNA

2.2.2.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurde zumeist eine Elektrophorese in einer Flachbettgelapparatur durchgeführt, wobei der Agarosegehalt je nach Größe der zu trennenden Moleküle zwischen 1 und 2 % (w/v) variiert wurde. Als Pufferlösung wurde 1x TBE⁽³⁾ verwendet, die angelegte Feldstärke betrug 2,0 $\frac{V}{cm}$ (Lauf über Nacht) bis 8,5 $\frac{V}{cm}$. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/5 Vol. Auftragspuffer⁽⁴⁾ versetzt.

Die Gele wurden anschließend für 30 min in 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, in Wasser entfärbt und auf einem UV- Transilluminator bei 312 nm photographiert. (Zur Größenbestimmung der Proben wurde ein *Bst*EII- Verdau der DNA des Phagen λ verwendet.)

2.2.2.2. Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung kleiner DNA- Fragmente bietet sich aufgrund der höheren Trennleistung die Polyacrylamidgelelektrophorese an. Im vorliegenden Versuch erfolgte die Auftrennung der DNA- Fragmente in einem 10% Gel (19+1 Acrylamid/ Bisacrylamid) in TBE- Puffer⁽⁷⁾ bei einer Feldstärke von ca. 6,5 V/cm. Zur Detektion wurden die Gele 5 min in 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und 5 - 10 min in Wasser entfärbt. Längere Färbezeiten sollten vermieden werden, da dies bei kleinen Fragmenten (≤40 Bp) teilweise zu erheblichen Einbußen in der Signalstärke führen kann.

2.2.2.3. Makrorestriktionsanalyse und Wechselfeldgelelektrophorese

Die Entwicklung der Wechselfeldgelelektrophorese ermöglichte die elektrophoretische Auftrennung von DNA- Moleküle bis zu einer Größe von 9 MBp, wodurch die Analyse vollständiger Eukaryonten- und Prokaryonten- Genome möglich wurde (SCHWARTZ & CANTOR 1984; SMITH ET AL.1987). Das intakte Bakterienchromosom wird dabei mit einer selten schneidenden Restriktionsendonuklease in 20 - 60 Fragmente gespalten, die dann mit Hilfe der Wechselfeldgelelektrophorese ihrer Länge entsprechend separiert werden und so ein typisches Makrorestriktionsfragmentlängenmuster ergeben. Anhand dieses Musters sind globale chromosomale Veränderungen (Insertionen, Deletionen, Inversionen, Amplifikationen und Transpositionen) durch Deletion oder Einführung einer Schnittstelle oder einer Veränderung einer Fragmentlänge detektierbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einem *Spe*I- Verdau der genomischen DNA verschiedene *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten typisiert.

Der gesamte technische Ablauf der Makrorestriktionsanalyse, von der Präparation der in Agarose eingebetteten bakteriellen DNA bis zur Auswertung der erhaltenen Fragmentmuster, ist ausführlich in *ADVANCES IN ELECTROPHORESIS* protokolliert (RÖMLING ET AL. 1994) und wurde dementsprechend durchgeführt:

$1,5 \cdot 10^8$ Bakterien der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden in einem Blöckchen aus 1,5% low-gelling Agarose (Sigma) eingeschlossen, mit Proteinase K und Detergentien lysiert (56° C, 48 h) und mit 10 U Spel verdaut (37° C, 48 h). Die Auftrennung erfolgte in einem Zeitraum von 37 h in einer BioRad DR^{II}-Kammer in einem Wechselfeld mit folgenden Bedingungen: U= 200 V, 10° C, zwei lineare Pulsrampen von 5 - 25 s und 5 - 60 s in 1 s- Intervallen.

Zur Detektion wurden die Gele 60 min in 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und zwei mal je 60 min in Wasser entfärbt.

2.2.3. Transformation

2.2.3.1. „Transformation- buffer“ - Methode

Die „Transformation- buffer“- (TB-) Methode wurde von INOUE *et al.* (1990) beschrieben. Sie wurde zur Herstellung transformationskompetenter Zellen der *E.coli*- Stämme S17-1 λpir , CC118 λpir und DH5α verwendet.

2.2.3.1.1. „TB- Methode“ zur Herstellung transformationskompetenter Zellen

10- 12 Kolonien wurden von einer LB- Agar Platte in 250 ml SOB- Medium⁽⁶⁾ überführt und auf ca. 0,6 OD - 0,8 OD herangezogen (18-20° C, 200 rpm). Nach einer zehnmütigen Inkubation in einem Eisbad wurden die Zellen zentrifugiert (2500 xg, 10 min, 4° C) und die Pellets in 80 ml eiskaltem TB- Puffer⁽⁸⁾ resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit den oben genannten Parametern erneut zentrifugiert, das Pellet in 20 ml kaltem TB- Puffer aufgenommen und mit 1,4 ml DMSO versetzt (entspricht ca. 7% DMSO in der Lösung). Nach kurzer Lagerung auf Eis (10 min) wurde die Suspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Bakterien werden bei -70° C gelagert und sind über Monate haltbar.

2.2.3.1.2. Transformation nach der „Transformation- buffer“- Methode

Die vorbereiteten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Je 200 µl der Suspension wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit ca. 5 µl Plasmidlösung, deren Konzentration je nach Experiment variierte, vereinigt und gut durchmischt. Nach einer 30 mütigen Inkubation im Eisbad wurden die Transformationsansätze für 60s auf 42° C erwärmt und wieder auf Eis gestellt. Zu jedem Ansatz wurde 0,8 ml SOC-

Medium⁽⁷⁾ gegeben und die Bakterien für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert (15 min, 3000 xg), 800 µl des Überstandes abgenommen und das im Restvolumen resuspendierte Pellet auf einer LB- Agarplatte mit einem antibiotischen Zusatz (s. 2.2.1.1.) ausgestrichen.

Positive Klone waren nach ca. 12- 24 Stunden Inkubation (37°C) sichtbar.

2.2.3.2. Transformation durch Elektroporation

Bei der Elektroporation handelt es sich um ein physikalisches Transformationsverfahren, bei dem durch Anlegen eines starken elektrischen Feldes kurzfristig Löcher in der Zellmembran der zu transformierenden Zellen entstehen, durch die dann Plasmid- DNA eindringen kann. Prinzipiell soll dieses Verfahren die höchste Effizienz besitzen. Im Gegensatz zu chemischen Verfahren ist bei der Elektroporation die Transformationseffizienz über viele Größenordnungen direkt zu der eingesetzten Menge Plasmid- DNA proportional. Ansätze mit mehreren µg Plasmid sind bei schwer zu transformierenden Stämmen üblich (DOWER ET AL. 1988).

Drei Parameter bestimmen die Effizienz der Transformation: Die gewählte Feldstärke, die Dauer des Pulses und der innere Widerstand der Lösung, die die Bakterien enthält. Im Prinzip ist ein Elektroporator wie folgt aufgebaut:

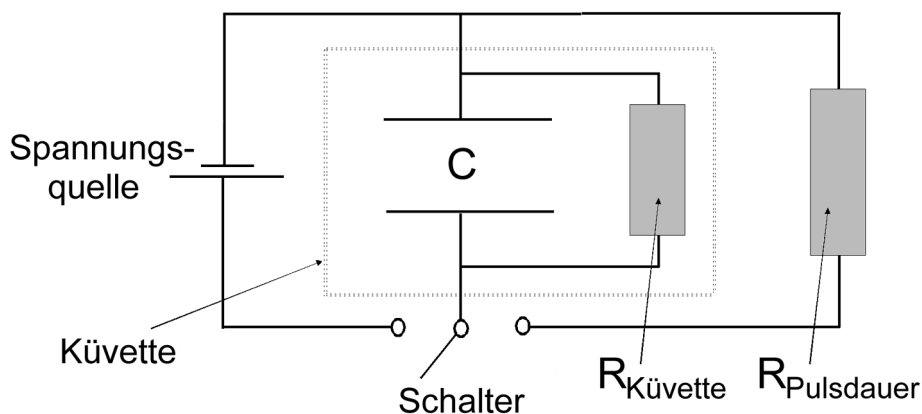


Abb. 2.4. Schaltbild eines Elektroporators

Nach Schließen des Schalters wird vom Kondensator in der Kuvette ein starkes elektrisches Feld aufgebaut, das sich nur über einen parallel geschalteten Widerstand entladen kann. Die Zeitkonstante τ , welche die exponentielle Abnahme der Feldstärke beschreibt, ist unter der Voraussetzung, daß der innere Widerstand der Lösung hoch ist, durch RC (R : Paralleler Widerstands, C : Kondensatorkapazität)

bestimmt. Die Zellmembranen der zu elektroporierenden Zellen wirken jeweils als Dielektrikum. Durch das anliegende äußere Feld kommt es an den Membranen zu einer Akkumulation von Ladungen und zu einer lokalen Erhöhung der Feldstärke, so daß es punktuell zu Ladungsdurchbrüchen und so zu einer Porenbildung kommt. Je länger das Feld anliegt und je höher die Feldstärke ist, desto mehr Poren entstehen. Eine optimale Ausbeute wird nach Angaben eines Herstellers (Invitrogen) erreicht, wenn 40% - 80% der Zellen im Ansatz letal geschädigt werden.

Der innere Widerstand der Zellsuspension hat einen anderen Effekt: Ist er zu gering, kommt es nach dem zweiten Kirchhoffschen Gesetz zu einer Addition der reziproken Widerstände. Dies führt zu einer Senkung des Gesamtwiderstands und zu einer Verkürzung der Zeitkonstanten τ . Weiterhin ist es möglich, daß es zu einer Entladung in Form eines Lichtbogens durch die Küvette kommt, wodurch die meisten Zellen in der Suspension getötet werden.

2.2.3.2.1. Herstellung von transformationskompetenten Zellen zur Elektroporation (INVITROGEN)

500 ml LB- Medium⁽¹⁾ wurden mit einer *E.coli* Vorkultur beimpft und unter heftigem Schütteln (ca. 200 rpm, 37° C) bis zu einer Dichte von ca. 0,5- 0,8 OD inkubiert. Nach 30 min auf Eis wurden die Bakterien zentrifugiert (4000 xg, 15 min, 0° C), der Überstand verworfen und das Pellet in 500 ml dest. Wasser (0° C) resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (Parameter s.o.) wurde das Pellet in 250 ml dest. Wasser (0° C) aufgenommen. Eine weitere Zentrifugation, bei der ein extrem lockeres Sediment erhalten wurde, schloß sich an. Die Bakterien wurden in 80 ml einer eiskalten 10%- Glycerol- Lösung gewaschen (Parameter s.o.). Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml eiskalter 10% Glycerollösung resuspendiert und in Aliquoten von 40- 100 µl bei -70°C eingefroren.

Auf die gleiche Weise wurden auch *P.aeruginosa* TB zur Elektroporation vorbereitet.

2.2.3.2.2. Elektroporation

40 µl gefrorene Zellsuspension wurden langsam auf Eis aufgetaut und zusammen mit max. 5 µl Plasmidlösung (in dest. Wasser) in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Zur Erzeugung des Feldpulses wurde ein Elektroporator II (Invitrogen) - je nach Experiment - mit folgenden Einstellungen verwendet:

Plattenabstand in der Küvette :	1 mm
Kapazität :	71, 50 μ F
Widerstand :	100 Ω , 150 Ω , 200 Ω
Spannung:	1000 V, 1500V , 1800 V

Die fettgedruckten Einstellungen wurden zur Elektroporation von *E.coli* benutzt. Für *P.aeruginosa* TB wurden verschiedene Parameter verwendet (Kap. 3.1.2.2.).

Direkt im Anschluß an die Elektroporation wurde der Ansatz mit 1 ml SOC⁽⁶⁾, bzw. LB⁽¹⁾, versetzt und nach einem Transfer in ein Reaktionsgefäß 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert (15 min, 3000 xg), 800 μ l des Überstandes abgenommen und das im Restvolumen resuspendierte Pellet auf einer LB-Agarplatte mit einem antibiotischen Zusatz (Kap. 2.2.1.1.) ausgestrichen. Positive Klone waren nach ca. 12- 24 Stunden Inkubation (37°C) sichtbar.

2.2.4. Konjugation

2.2.4.1. Biparentale Konjugation

Bei der biparentalen Konjugation wird ein Plasmid direkt von einem Donorstamm auf einen Akzeptorstamm übertragen. Voraussetzung dafür ist, daß

- der Donorstamm über sämtliche zur Konjugation notwendigen Gene verfügt
- das zu übertragende Plasmid über einen *oriT* für den konjugativen Transfer verfügt
- der Akzeptorstamm über kein Restriktionssystem verfügt, das die aufgenommene DNA als fremd erkennt und abbaut.

In den vorliegenden Experimenten wurden folgende Stämme und Vektoren verwendet:

Donor- Stamm :	<i>E.coli</i> S17-1 λ <i>pir</i>
Vektor:	pUT Gm
Akzeptor- Stamm:	<i>P.aeruginosa</i> TB

2.2.4.2. Triparentale Konjugation

Bei diesem Verfahren wird ein mobilisierbares Plasmid mit Hilfe eines Helferstammes, der über die zur Konjugation notwendigen Gene verfügt, von einem selbst nicht zur Konjugation fähigen Donorstamm auf einen Akzeptorstamm übertragen. Wichtig ist hierbei nur, daß der Akzeptor über kein funktionierendes Restriktionssystem verfügt.

Donor- Stamm :	<i>E.coli</i> DH5 α
Vektor:	pTnMod-OGm
Helfer- Stamm:	<i>E.coli</i> HB101 mit pRK2013
Akzeptor- Stämme:	<i>P.aeruginosa</i> TB, 892 und PAO1

2.2.4.3. „Filtermating“

Das sog. „Filtermating“ ist ein Protokoll zur Konjugation, das vor allem bei *E.coli* verwendet wird. Es zeichnet sich gegenüber einer Konjugation in einer Flüssigkultur durch eine höhere Zelldichte und damit eine höhere Konjugationseffizienz aus. Das „Filtermating“ wurde zur Herstellung von Transposonmutanten aus biparentalen Konjugationen (HENSEL & HOLDEN 1995) verwendet. Während das für *E.coli* übliche Protokoll für *P.aeruginosa* nicht geeignet ist, gelingt mit der hier erwähnten Variante auch die Konjugation in *P.aeruginosa*, jedoch ist die Ausbeute gering.

P.aeruginosa TB wurde über 5-7 Tage auf Blutagar bei 42° C inkubiert und dabei täglich überimpft. Der Donorstamm *E.coli* S17-1 λ pir (mit pUT Gm) wurde am Vortag der Konjugation als Flüssigkultur angesetzt und vor Beginn des Filtermatings abzentrifugiert (3000 xg, 10 min). Sowohl Donor als auch Akzeptor wurden in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine Zellzahl von 10⁹ Bakterien/ml Lösung eingestellt. Je 500 μ l von Donor und Akzeptor wurden in 5 ml 10 mM MgSO₄ gegeben, gemischt und mit einer 10 ml Spritze durch die vorbereitete Filterpatrone gedrückt. (Als Filtermembran diente Celluloseester HA mit einer Porengröße von 0,45 μ m (Millipore). Die Filterpatrone wurde vollständig zusammengesetzt autoklaviert und bis zur Verwendung steril gelagert.) Die Patrone wurde geöffnet, der Filter entnommen, mit der bakterienbesetzten Seite nach oben auf eine LB- Agarplatte⁽¹⁾ gelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Filter wurden vom Agar in 5 ml 10 mM MgSO₄ überführt und die Bakterien durch intensives Mischen von der Membran gelöst. Aliquote von je 200 µl wurden auf M9-Agarplatten (Glycerol) mit Gentamicinzusatz (Kap. 2.2.1.1.) ausplattiert. Positive Transposonmutanten waren nach ca. 36- 48 Stunden sichtbar.

2.2.4.4. *P.aeruginosa* -Konjugation

Mit diesem Protokoll ist eine hohe Konjugationseffizienz in *P.aeruginosa* zu erreichen. Lediglich die Länge der Inkubationszeit des Akzeptorstammes vor der Konjugation ist je nach verwendetem *P.aeruginosa*- Isolat verschieden (persönliche Mitteilung LIMPert AS).

P.aeruginosa TB wurde über 5-7 Tage auf Blutagar bei 42° C inkubiert und dabei täglich überimpft. Donorstamm *E.coli* DH5α (mit pTnMod-OGm) und Helferstamm *E.coli* HB101 (mit pRK2013) wurden am Vortag der Konjugation auf LB- Agar mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen.

Die Bakterien wurden in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine Dichte von 1,0 OD eingestellt. Suspensionen von Donor, Helfer und Akzeptor wurden im Verhältnis 10:10:1 gemischt und je 500 µl auf einer LB-Agar Platte ausplattiert. Nach einer Inkubation von mindestens 16 Stunden (37° C) wurde der Bakterienrasen jeder halben Platte in je 5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und Aliquote von je 150 µl auf M9 (Glycerol)- Agarplatten mit Gentamicinzusatz (s. 2.2.1.1.) ausplattiert. Positive Transposonmutanten waren nach ca. 36- 48 Stunden Inkubation (37° C) so weit gewachsen, daß sie auf eine neue M9(Glycerol)- Agarplatte mit Gentamicin überführt werden konnten. Nach einer 16- stündigen Inkubation bei 37° C wurden die Platten für ca. 1 Monat bei 4° C gelagert, bevor die *P.aeruginosa* Mutanten weiteren Experimenten zugeführt oder bei -80° C eingefroren wurden. Diese Lagerung war notwendig, um die mittransferierten *E.coli*, die zwar mit der Kohlenstoffquelle Glycerol fast nicht wachsen, aber dennoch überleben können, von den *P.aeruginosa* Mutanten abzutrennen. Die *E.coli* waren nicht in der Lage, eine derart lange Hungerperiode zu überleben.

2.2.5. Präparation von Plasmiden

2.2.5.1. Plasmid- Maxi- Präparation

Größerer Mengen der Plasmide pUT mini Tn5 Km2 und pTnMod-OGm wurden mit Hilfe eines Qiagen Maxi- Prep Kits entsprechend dem Firmenprotokoll aufgereinigt.

2.2.5.2. Plasmid- Mini- Präparation

Die Aufreinigung von Plasmiden aus transformierten *E.coli* erfolgte im analytischen Maßstab nach einer modifizierten Variante der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY 1979).

Bakterien aus 3 ml Vorkultur wurden abzentrifugiert (5 min, 5000 xg) und in 300 µl Lösung I⁽¹⁰⁾ resuspendiert, bevor 300 µl Lösung II⁽¹⁰⁾ zugegeben wurden. Nach einer Inkubation von 5 min wurden 300 µl Lösung III⁽¹⁰⁾ zugefügt, gründlich gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Präzipitate wurden abzentrifugiert (10 min, 14000 xg, 4°C) und der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt.

Zur Aufreinigung der Plasmidlösung wurde ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben, gründlich gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (14000 xg, 2 min, 4° C). Die wäßrige Phase wurde in einem zweiten Aufreinigungsschritt mit Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Die erhaltene Plasmidlösung wurde mit einem gleichen Volumen Isopropanol gemischt, die ausfallende DNA abzentrifugiert (14000 xg, 15 min, RT), mit 70% Ethanol gewaschen und in einem Vakuum- Konzentratortrocknet. Die Plasmid DNA wurde in 50 µl TE- Puffer⁽⁹⁾ aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.6. Präparation genomischer DNA von Gram- negativen Bakterien

Die Präparation genomischer DNA aus *P.aeruginosa* erfolgte nach einem speziell für Gram- negative Bakterien entwickelten Methode (CHEN & KUO 1993). Die so aufgearbeitete DNA wurde als Matrize in der PCR oder zur Herstellung von Southern Blots eingesetzt.

Aus 1,5 ml einer dicht gewachsenen Bakterienkultur in LB- Medium⁽¹⁾ wurden die Zellen durch Zentrifugation (14000 xg, 3 min) geerntet. Das Pellet wurde in 300 µl Lysispuffer⁽¹¹⁾ aufgenommen und mit 100 µl 5 M NaCl gründlich vermischt. Proteine

und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (60 min, 14000 xg, 4° C) abgetrennt, der Überstand transferiert und zum Verdau der RNA mit 5 µl DNase- freier RNase (10 mg/ml) versetzt (30 min, 37° C). Zur Aufreinigung wurde die DNA- Lösung nacheinander mit je einem gleichen Volumen Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt (15 min, 14000 xg). Die DNA wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol ausgefällt und abzentrifugiert (14000 xg, 15 min, RT). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 50 µl TE- Puffer⁽⁹⁾ aufgenommen.

2.2.7. Polymerase- Kettenreaktion

Seit ihrer Erfindung im Jahre 1983 hat sich die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) (MULLIS ET AL. 1986; MULLIS & FALOONA 1987) zu einem der wichtigsten Standardverfahren in der Molekularbiologie entwickelt. Sie ermöglicht die selektive Anreicherung spezifischer DNA- Sequenzen aus sehr geringen Mengen heterogener DNA (SAIKI ET AL. 1985, 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit nimmt die PCR eine zentrale Rolle ein:

- Herstellung und Amplifikation der Signalsequenzen aus chemisch synthetisierten Oligonukleotid- Einzelsträngen zur späteren Ligation in die Plasmide pUT Gm und pTnMod-OGm
- Amplifikation der spezifischen Signalsequenzen aus den Donorplasmiden pUT Gm und pTnMod-OGm
- Nachweis der genomischen Insertion des Transposons in *P.aeruginosa* TB
- Amplifikation spezifischer Sequenzen des Transposons und des *P.aeruginosa* Genoms zur Herstellung von Sonden für Southern- Hybridisierungen
- Amplifikation spezifischer Genomsequenzen von *P.aeruginosa* TB zur späteren Sequenzierung

2.2.7.1. Auswahl der Primer

Ein kritischer Faktor für Ausbeute und Reinheit der PCR- Produkte ist die Wahl der als Primer verwendeten Oligodesoxyribonukleotide. Bei der Auswahl der Primersequenzen wurden folgende Kriterien beachtet (SPANGENBERG 1997):

- Der GC- Gehalt des Primers soll dem der DNA- Matrize entsprechen
- ≈ 20 Bp Länge
- Der Primer sollte am 3' - Ende auf mindestens 2 Guanin/Cytosin enden, um so eine stabile Hybridisierung dieses Bereichs mit der DNA- Matrize zu gewährleisten.
- Die Primer sollten nicht zu sich selber oder zu dem anderen Primer des entsprechenden Paares komplementäre Sequenzen aufweisen und oberhalb von $T_m = 50^\circ\text{C}$ keine stabilen Haarnadel- Strukturen ausbilden.
- Primer in kodierenden Sequenzen sollten mit ihrem 3' - Ende nicht auf eine 3. Codonposition fallen, da hier Mutationen am häufigsten sind.
- Der Schmelzpunkt T_m der Primer sollte möglichst oberhalb von 60°C liegen, damit die Anlagerung der Primer gegenüber der Reassoziaton der Matrizen- DNA auch bei einem hohen GC- Gehalt - wie bei *P.aeruginosa* - bevorzugt abläuft. (Der Schmelzpunkt kann über die Faustregel $T_m = 4^\circ\text{C} \cdot \Sigma(\text{GC}) + 2^\circ\text{C} \cdot \Sigma(\text{AT})$ berechnet werden.)
- Primer eines zusammengehörenden Paares sollten den gleichen Schmelzpunkt aufweisen.

2.2.7.2. PCR- Ansatz

Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR- Ansätze wurden nach dem gleichen Schema zusammengestellt.

2,5 μl	10x Puffer (InViTek, Eurogentec)
2,5 μl	8 mM dNTP (2 mM je Nukleotid)
2,5 μl	5 μM Primer 1
2,5 μl	5 μM Primer 2
1,25 μl	DMSO
0,75 μl	50 mM MgCl_2
0,2 μl	<i>Taq</i> - DNA Polymerase 5U/ μl
10- 200 ng	Template- DNA (je nach Experiment)
ad 25 μl	bidest. Wasser

Die genomische DNA von *P.aeruginosa* neigt aufgrund des hohen GC- Gehaltes zur Bildung von Sekundärstrukturen, welche die Amplifikation behindern können. DMSO wirkt als denaturierendes Reagenz und senkt als Zusatz in der PCR den Schmelzpunkt der DNA. Hierdurch wird die Bildung von Sekundärstrukturen unterdrückt und auch die Hybridisierungstemperatur herabgesetzt.

2.2.7.3. PCR- Parameter

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde für vier verschiedene Anwendungen DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert.

a.) Herstellung und Amplifikation der Signalsequenzen aus chemisch synthetisierten Oligonukleotid- Einzelsträngen.

Hierzu war am Anfang des PCR- Programms kein Denaturierungszyklus notwendig, da als Matrize ein chemisch synthetisierter Einzelstrang verwendet wurde.

Verwendete Primer (Sequenzen s. Anhang): Kom-1, Kom-2

b.)Amplifikation der spezifischen Signalsequenzen aus den Donorplasmiden pUT Gm und pTnMod-OGm.

Für die einzelnen Temperaturänderungen wurde jeweils ein Intervall (Temperaturrampe) von 10 s programmiert. Über einen weiten Konzentrationsbereich der Plasmide lieferte diese PCR hohe Ausbeuten. Das zu erwartende Produkt hatte eine Länge von nur 80 Bp, so daß alle Temperaturen nur für sehr kurze Zeiten gefahren wurden. Bei längeren Zeiten nahm die Bildung von Nebenprodukten rapide zu. Durch diese kurzen Zykluszeiten konnten nur entsprechend kleine Volumina gleichmäßig temperiert werden, so daß bei Bedarf größerer Mengen an PCR- Produkt entsprechend viele kleinvolumige (max. 25 µl) Ansätze parallel zu fahren waren.

Verwendete Primer (Sequenzen s. Anhang): TAG-1, TAG-2

c.)Amplifikation der Signalsequenzen aus dem Genom der *P.aeruginosa* Transposonmutanten.

Für die einzelnen Temperaturänderungen wurde jeweils ein Intervall (Temperaturrampe) von 10 s programmiert. Diese PCR bedurfte einer sehr genauen Einstellung der eingesetzten Menge an DNA- Matrize. Bereits kleine Ungenauigkeiten führten zu erheblichen Einbußen an Produkt. Auch hier durfte die Ansatzgröße wegen der zwingend notwendig kurzen Zykluszeiten nicht verändert werden. Im Bedarfsfall waren entsprechend viele kleine Ansätze parallel zu fahren.

Verwendete Primer (Sequenzen s. Anhang): TAG-1, TAG-2

d.) Amplifikation genomischer Sequenzen aus *P.aeruginosa* oder codierender Sequenzen aus pUT GM oder pTnMod-OGm.:

Dieses Standardprotokoll wurde für die meisten DNA- Amplifikationen verwendet. Die jeweiligen Hybridisierungstemperaturen sind zusammen mit den Primersequenzen im Anhang abgelegt.

Im folgenden sind die variablen Parameter der verschiedenen PCR je nach Verwendungszweck zusammengestellt.

a.)	b.)	c.)	d.)
	300 s 96°C	300 s 96°C	300 s 96°C
20 s 60°C ↑	20 s 61°C* ↑	20 s 58°C* ↑	20 s variabel ↑
20 s 72°C 20 x	20 s 72°C* 40 x	20 s 72°C* 40 x	20 s 72°C 40 x
30 s 94°C ↓	30 s 94°C* ↓	30 s 94°C* ↓	30 s 94°C ↓
20 s 60°C	20 s 61°C*	20 s 58°C*	20 s variabel
40 s 72°C	40 s 72°C*	40 s 72°C*	40 s 72°C
∞ 10°C	∞ 10°C	∞ 10°C	∞ 10°C
Primer: Kom-1; Kom-2	Primer: TAG-1; TAG-2	Primer: TAG-1; TAG-2	Primer: variabel
DNA/Ansatz: 10 ng	DNA/Ansatz: 5 - 100ng	DNA/Ansatz: 3 - 10ng	DNA/Ansatz: 10 - 100ng
Volumen: 25 µl	Volumen: 25 µl	Volumen: 25 µl	Volumen: 25 µl

*: Bei Programmschritten mit * wurden die jeweils notwendigen Temperaturänderungen in einem Zeitraum von 10 s durchgeführt („Temperaturrampe“). Bei Angaben ohne * war die jeweilige Temperaturänderung so schnell, wie es bauartbedingt im Thermocycler möglich war.

2.2.8. Restriktionsverdau von DNA

Im analytischen Maßstab wurden zum Verdau von DNA die entsprechenden Restriktionsenzyme entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Eine Liste der verwendeten Restriktionsendonukleasen ist im Anhang zu finden.

Restriktionsenzyme wurden auch präparativ bei der Handhabung der artifiziellen Signalsequenzen verwendet. Von diesen relativ kurzen Segmenten (80 Bp) wurden jeweils mehrere Mikrogramm DNA benötigt (s. Kap. 2.2.9. und 2.2.10.). Als Enzyme wurden hierfür *HindIII* oder *KpnI* (New England Biolabs) verwendet.

Unitdefinition: 1 Unit [1 U] entspricht der Menge an Enzym, die 1 µg Assay- DNA in 1 Stunde spaltet.

<i>HindIII</i> :	λ-DNA (48,5 kBp) mit 7 Schnittstellen, d.h. ca. 1 Schnittstelle / 7000 Bp
<i>KpnI</i> :	Adenovirus-2 DNA (36 kBp) mit 8 Schnittstellen, d.h. ca. 1 Schnittstelle / 4500 Bp

Die Signalsequenz besitzt dagegen je 2 Schnittstellen für *KpnI* und *HindIII* auf einer Länge von 80 Bp. Dies bedeutet, daß für den Verdau von 1 µg Signalsequenz unter den Standardbedingungen des Herstellers 175 U *HindIII* und 112,5 U *KpnI* benötigt werden. Allerdings müssen noch zwei weitere Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen die Lebensdauer des Enzyms (bei einem Verdau über Nacht braucht man deutlich weniger), zum anderen sollte für einen vollständigen Verdau das Enzym mindestens im doppelten Überschuß zugegeben werden. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ergaben sich folgende Minimalwerte für den (über Nacht-) Verdau der Signalsequenz:

<i>HindIII</i> :	44 U / µg Signalsequenz
<i>KpnI</i> :	56 U / µg Signalsequenz

Zur Vermeidung von Star- Aktivität sollte der Glycerol- Gehalt des Restriktionsansatzes deutlich kleiner als 0,5 % (v/v) sein. Unter Berücksichtigung der lieferbaren Enzymkonzentrationen ergab sich daher für einen typischen präparativen Ansatz mit 5 µg Signalsequenz ein Volumen von 250 µl. Die dabei eingesetzte Enzymmenge betrug für *HindIII* 200 U, für *KpnI* 250 U.

2.2.9. Ligation von DNA- Fragmenten

2.2.9.1. Änderung der Antibiotikaresistenz in pUT mini Tn5 Km2

pUT mini-*Tn5* Km2 wurde mit *KpnI* und *SphI* in einem Doppelverdau (je 5 U/µg Plasmid) geschnitten (Kap. 3.1.1.) und die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Der pUT- Rahmen wurde mit den in Kap. 2.2.10.1. erläuterten Methoden aufgereinigt und entsprechend den Herstellerangaben (Boehringer) für Fragmente mit 3'-Überhang durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Das Gentamicin-Gen wurde mit Promotor und Terminatorstruktur aus dem Vektor pMS246 (SCHWEIZER 1993) unter Verwendung der gleichen Restriktionsenzyme ausgeschnitten und ebenfalls über eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Zur Ligation wurden äquimolare Mengen des pUT- Rahmens und der Gentamicinkassette (insgesamt 500 ng) in einem 10 µl Ansatz mit 1 U T4- Ligase bei 16° C über Nacht inkubiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde in eine Transformation (TB- Methode, Kap. 2.2.3.) eingesetzt.

2.2.9.2. Klonierung der Signalsequenz in Plasmide

Zur Ligation der Signalsequenzen in das Donorplasmid pTnMod-OGm mußte das von den Herstellern (Boehringer, New England Biolabs) angegebene Standardverfahren deutlich modifiziert werden.

Das Plasmid wurde mit *KpnI* linearisiert (5 U/µg Plasmid) und mit alkalischer Phosphatase (BOEHRINGER) dephosphoryliert. Das Enzym wurde mit einer Phenol/Chloroform- Extraktion entfernt, die DNA mit Ethanol gefällt und in Wasser aufgenommen.

Die Signalsequenz wurde in einer PCR entspr. Kap. 2.2.7.3. Teil a. amplifiziert und die flankierenden Enden mit *KpnI* geschnitten (Kap. 2.2.8.). Das Restriktionsenzym wurde mit einer Phenol/Chloroform- Extraktion entfernt, die DNA mit Ethanol gefällt und in Wasser aufgenommen.

Die Ligation wurde im 20 µl- Maßstab mit einem gegenüber der linearen Plasmid DNA 50-fachen (molaren) Überschuß an Signalsequenz durchgeführt. Hierbei wurden insgesamt 250 ng DNA mit 2 U Ligase bei 4° C für 16 h inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in einer Transformation (TB- Methode, Kap. 2.2.3.) eingesetzt.

2.2.9.3. Plasmid- rescue

Das Plasmid- rescue (AUSUBEL ET AL. 1987-95) ist ein Verfahren, um die flankierende DNA eines inserierten Plasposons in episomal stabile Plasmide zu überführen. Hierzu wurde die genomische DNA eines Transposonmutanten mit einer Restriktionsendonuklease (die möglichst nicht im Transposon schneiden sollte) verdaut und die entstehenden Fragmente in einer Selbstligation zu Ringstrukturen überführt. Nur die genomische Sequenz, in die das Plasposon integriert war, besaß einen Replikationsursprung (*oriR*) und eine Antibiotikakassette (in diesem Fall *gm^r*) und konnte nach Transformation in *E.coli* auf einem entsprechenden Selektionsmedium stabil exprimiert werden. Diese Plasmide wurden dann zur Sequenzierung der flankierenden genomischen DNA- Abschnitte des inserierten Transposons verwendet.

Die genomische *P.aeruginosa*- DNA wurde mit *PstI* (10 U/ μ g DNA) oder *BclI* / *BamHI* (je 5 U/ μ g DNA) verdaut und die DNA über eine Phenol /Chloroform-Extraktion mit einer anschließenden Ethanolfällung aufgereinigt. Um die monomolekulare Selbstligation gegenüber der bimolekularen Verbindung mehrerer DNA- Fragmente zu begünstigen, war es notwendig, eine möglichst geringe DNA- Konzentration in der Ligation einzusetzen. Zur Reaktion wurden daher 100 ng verdaute genomische DNA in 100 μ l Ligationsansatz mit 25 U T4- Ligase (New England Biolabs) 5 h bei 16° C inkubiert. Die Ansätze wurden in einem Vakuumkonzentrator auf ca. 10 μ l eingengt und in einer Transformation nach der TB- Methode (Kap. 2.2.3.) eingesetzt.

2.2.10. Herstellung DIG- markierter Sonden

2.2.10.1. Isolierung eines DNA- Fragments aus Agarose

Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die erste zeichnet sich durch größere Schnelligkeit aus. Allerdings versagt sie bei sehr langen DNA- Fragmenten (>5000 Bp). Außerdem sind die so erhaltenen Proben immer mit Agarose kontaminiert. Dies stört in den meisten Fällen nicht (Restriktionsverdau, DIG- Markierung), kann jedoch bei anderen Verfahren zu erheblichen Störungen führen (Ligation, Sequenzierung). Die zweite Methode ist zeitaufwendiger, die erhaltene DNA ist allerdings auch sauberer.

1. Methode:

Nach einer Agarosegelelektrophorese wurden die gesuchten DNA- Fragmente im Gel mit Hilfe eines UV- Transilluminators lokalisiert und ausgeschnitten. Zur Elution der Fragmente aus dem Agarosegel wurde die „Freeze and Squeeze“- Methode nach WALKER (1984) verwendet. Hierzu wurde das Gelblöckchen mit der gesuchten DNA zerkleinert, mind. 2 h bei -70° C gelagert, aufgetaut und die DNA- Lösung aus der Agarose durch Zentrifugation (1500 xg, 20 min, 4° C) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,5 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und 3,5 Vol. Ethanol bei -70° C gefällt, abzentrifugiert (14000 xg, 15 min, 0° C), gewaschen, getrocknet und in TE- Puffer⁽⁹⁾ gelöst.

2. Methode:

Die DNA- Fragmente wurden in einem Agarosegel aus low- melting- Agarose (1%) separiert und nach Ethidiumbromidfärbung auf einem UV- Transilluminator lokalisiert. Das entsprechende Fragment wurde ausgeschnitten, gewogen und mit 2 Vol. TE- Puffer⁽⁹⁾ versetzt. Durch Erwärmung auf 70° C wurde die Agarose geschmolzen. Die zweimalige Zugabe von 0,5 Vol. Phenol fällte die Agarose an der Phasengrenze aus, so daß nach Zentrifugation (14000 xg, 15 min, 4° C) die wäßrige DNA- Lösung abgenommen werden konnte. Nach einer Chloroform/Isoamylalkohol - Extraktion zur Entfernung der Phenolreste wurde die DNA mit Ethanol ausgefällt und in TE- Puffer⁽⁹⁾ gelöst.

2.2.10.2. Separation kleiner DNA- Fragmente

Zur Herstellung spezifischer Sonden aus *P.aeruginosa* Transposonmutanten mußten die spezifischen, zentralen Bereiche der Signalsequenzen (40 Bp) von den unspezifischen flankierenden Primerbindungsstellen (20 Bp) nach einem *HindIII*- Verdau (Kap. 2.2.8.) separiert werden. Es existiert allerdings kein Standardprotokoll, um solch kleine DNA- Fragmente im hohen Durchsatz zu trennen. Drei Methoden wurden verwendet:

Methode 1:

Theoretisch ist eine Trennung über High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) möglich. Hier wurde eine Jupiter C4- Säule (Phenomenex) mit einem Hochsalz-

gradienten (0,5 - 1,5 M NaCl) verwendet. Eine Separation der 20 Bp- und 40 Bp-Fragmente war möglich, doch war durch den hohen Salzgehalt und das große Volumen des Eluats anschließend eine Membranfiltration (Millipore, Centricon 10) nötig. Die so erhaltene Ausbeute war relativ gering (< 20% der eingesetzten DNA) und der Zeitaufwand sehr hoch. Dieses Verfahren wurde daher später nicht mehr verwendet.

2. Methode:

Die verdaute DNA wurde in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt, in Ethidiumbromid gefärbt und das 40 Bp Fragment auf einem UV- Transilluminator lokalisiert. Dieses Fragment wurde ausgeschnitten und in ein 3% Agarosegel eingesetzt. Durch eine kurze Gelelektrophorese (max. 20 min) wurden die DNA- Fragmente in die Agarose überführt und auf einem UV- Transilluminator lokalisiert. (Ein erneutes Färben mit Ethidiumbromid war zumeist nicht nötig, die Signalstärke war noch ausreichend). Das Fragment wurde ausgeschnitten und nach der „Freeze- Squeeze“- Methode (s.o.) aus der Agarose isoliert.

Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß viele Proben parallel aufgearbeitet werden können und die über PAAGE aufgetrennten 40 Bp- Fragmente quantitativ von allen anderen DNA- Verunreinigungen separiert wurden. Die Nachteile liegen in der relativ geringen Ausbeute (<30% der eingesetzten 40 Bp- Fragmente wurden aus der Agarose zurückgewonnen) und der Agaroseverunreinigung der DNA.

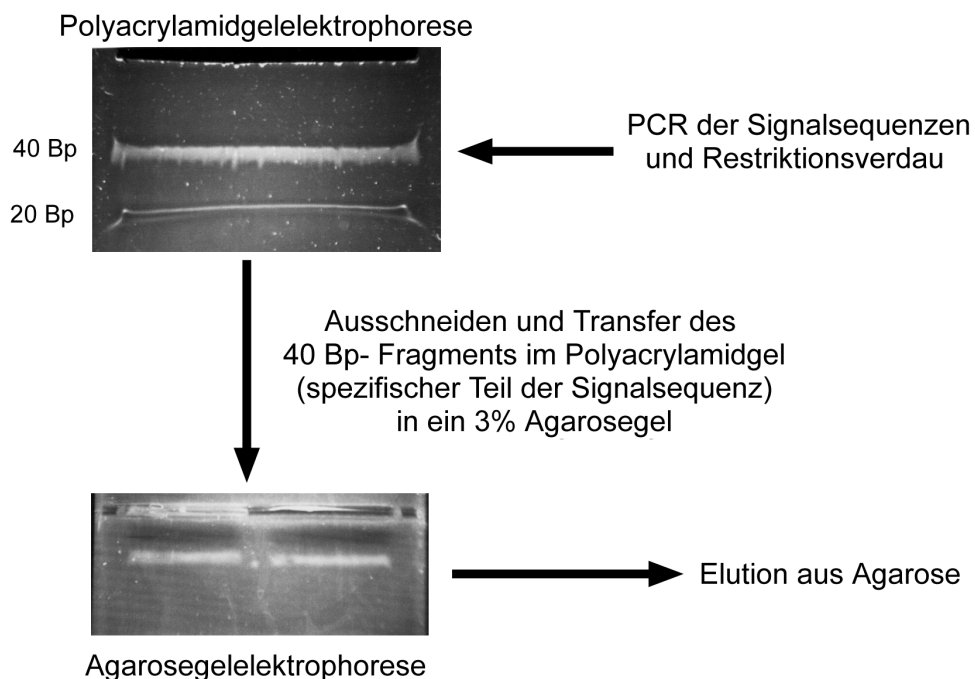


Abb.2.5. Elution kleiner DNA- Fragmente aus Polyacrylamidgelen

3. Methode:

Eine 3 ml- Sephadex G-100 Säule wurde mit TE- Puffer⁽⁹⁾ äquilibriert und trocken zentrifugiert (1000 xg, 1 min). Die verdaute DNA wurde mit einer Farbstoffmischung⁽¹⁵⁾ versetzt, auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert (1000 xg, 2 min). Dextranblau lief zusammen mit einem Großteil der 40 Bp- Fragmenten im Ausschlußvolumen der Säule, die 20 Bp- Fragmente mit dem Phenolrot durch das gesamte Säulenvolumen. Die so angereicherten 40 Bp- Fragmente wurde mit Ethanol gefällt und in TE- Puffer⁽⁹⁾ aufgenommen.

Dieses Verfahren war das schnellste und hatte die höchste Ausbeute (ca. 40%). Leider war die Trennung der 40 Bp- und 20 Bp- Fragmente nicht vollständig. Es konnte mit dieser Methode nur eine Anreicherung der gesuchten DNA- Fragmente um den Faktor 5-10 erreicht werden. Für eine spätere Sondenherstellung reichte dies aus, für andere Zwecke kann es allerdings ungenügend sein.

2.2.10.3. „Random primed labelling“ zur DIG-DNA-Sondenherstellung

Zur Herstellung nicht- radioaktiver DNA- Sonden für Southern- Hybridisierungen wurde die Technik des „random primed labelling“ von FEINBERG und VOGELSTEIN (1983, 1984) verwendet. Die DNA wird dabei thermisch denaturiert und komplementäre Stränge mit Klenow- Polymerase synthetisiert. Als Primer dienen durch DNaseI- Verdau aus Kalbsthymus gewonnene Hexanukleotide, die ca. alle 100 Nukleotide an die Matrizen- DNA binden (Boehringer). Zur Verlängerung wird eine dNTP- Mischung verwendet, bei der $\frac{1}{3}$ des dTTP durch DIG-dUTP (Digoxigenin-11-2'- deoxyuridin-5'-triphosphat (alkalilabil), Boehringer) ersetzt wurde. Durch die gewählten Konzentrationsverhältnisse wird ein DIG-dUTP markiertes Nukleotid ungefähr alle 20- 25 Basen in den neu synthetisierten Strang eingebaut.

Die Markierungsreaktion wurde mit Reagenzien der Firma Boehringer, Mannheim nach Herstellerangaben durchgeführt. Nicht inkorporierte DIG-dUTPs und Hexanukleotide wurde in einer Gelfiltration über eine mit TE-Puffer⁽⁹⁾ äquilibrierte Sephadex G-50 Säule abgetrennt. Die Säule wurde hierzu trocken zentrifugiert (1000 xg, 45 s), der mit 8 µl Farbstoffmischung⁽¹⁵⁾ und TE- Puffer auf 100 µl aufgefüllte Markierungsansatz aufgetragen und zentrifugiert (1000 xg, 30 s). Die markierten DNA- Fragmente und Dextranblau durchliefen dabei die Säule im Ausschlußvolumen. Die so erhaltenen Sondenlösungen wurden bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

2.2.10.4. DIG- 3´- Endmarkierung von Oligonukleotiden

Zur Bestimmung der Überlebensraten der verschiedenen *P.aeruginosa* TB Transposonmutanten mußten die spezifischen 40 Bp- Bereiche der Signalsequenzen markiert werden. Hierzu wurden Reagenzien für eine DIG- Oligonukleotid- 3´- Endmarkierung verwendet (Boehringer). Dabei werden DNA- Einzelstränge von einer Terminalen Transferase matrisenunabhängig mit einem DIG-ddUTP (Digoxigenin-11-2´,3´ dideoxyuridin 5´ triphosphat) verlängert, das als erkennbares Antigen bei der immunologischen Detektion dient. Der Hersteller empfiehlt dieses Verfahren zur Markierung von Oligonukleotiden mit einer Länge von 25- 100 Bp. Bei längeren Fragmenten ist die Signalintensität zu gering, da nur jeweils ein Digoxigenin pro Oligonukleotid eingebaut wird.

Die geschnittene und aufgereinigte spezifische Signalsequenz (Kap. 2.2.8. und Kap. 2.2.10.2.) wurde bei 95° C denaturiert und im Eisbad abgekühlt. Mindestens 1 µg der so erhaltenen einzelsträngigen DNA wurde in einem Reaktionsansatz nach Herstellerangaben (Boehringer) gemischt und 4 - 8 Stunden bei 37° C inkubiert. Der Reaktionsansatz konnte ohne weitere Aufreinigung direkt als Sonde für eine DNA-Hybridisierung in einem geeigneten Puffersystem verwendet werden. Eine weitere Aufreinigung war nicht notwendig, da keine unspezifisch bindenden Oligonukleotide (wie z.B. die Hexanukleotide beim „random - primed - labelling“, s.o.) vorlagen.

2.2.11. DNA- Fixierung und Hybridisierung

2.2.11.1. Southern Transfer

Der Southern Transfer (SOUTHERN 1975) ermöglicht die dauerhafte Fixierung von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA- Fragmenten auf einer Nylonmembran.

Der Kapillartransfer der DNA auf die Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) erfolgte unter alkalischen Bedingungen (Blotpuffer: 0,4 M NaOH) nach dem klassischen Prinzip, wie es unter anderem in den CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (AUSUBEL ET AL. 1987-95) beschrieben ist. Die Dauer des Transfers richtet sich nach der Größe der DNA- Fragmente (1-4 Tage, letzteres bei Wechselfeldgelen). Nach dem DNA- Transfer wurde die Membran 5 min in Blot- Waschpuffer⁽¹⁷⁾ neutralisiert und getrocknet. Die DNA wurde durch 1 min Belichtung (312 nm) irreversibel auf der Membran fixiert.

2.2.11.2. Dot- Blot

Zur Auswertung der STM- Selektionsexperimente waren DNA- Blots nötig, auf welche die aus den Signalsequenzen hergestellte Sonden- DNA spezifisch hybridisiert werden konnte.

Hierzu wurden die Signalsequenzen der Donor- Plasmide mit Hilfe der PCR amplifiziert (Kap. 2.2.7.3.). Je 80 µl PCR- Produkt wurden mit 40 µl 3 M NaOH und 280 µl TE- Puffer ⁽⁹⁾ gemischt und 30 min bei 65° C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 400 µl 2 M Ammoniumacetat zugegeben und nach kurzer Inkubation die denaturierte DNA in 96- well- Platten aliquotiert. Mit einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 95 µl DNA- Lösung pro Bohrung in eine Minifold Dot Vakuum Blot- Apparatur (Schleicher & Schuell) gegeben und durch Anlegen eines leichten Vakuums auf eine mit 1 M Ammoniumacetat angefeuchtete Membran (Hybond N+, Amersham) gebunden. Nach einer kurzen Trocknung wurde die DNA durch 1 min Belichtung (312 nm) irreversibel auf der Membran fixiert.

2.2.11.3. Hybridisierung spezifischer DNA - Sonden an DNA - Blots

Bei geeigneter Ionenstärke und Temperatur ist es möglich, kurze einzelsträngige DNA unter Bildung von Doppelsträngen sequenzspezifisch an membrangebundene DNA- Fragmente zu binden (CHURCH & GILBERT 1984). Hierzu wurde die Nylonmembran zur Blockierung der unspezifischen Bindungen 1 bis 16 Stunden mit Prähybridisierungspuffer⁽¹⁸⁾ (ca. 10 ml/ 100 cm² Membran) bei 68° C inkubiert, woran sich eine weitere 24 bis 48 Stunden lange Inkubation mit einer DIG- markierte Sonden- DNA (Kap. 2.2.10.3 und 2.2.10.4) in 5 - 10 ml Prähybridisierungspuffer anschloß. Die Sondenlösung konnte bei -20° C gelagert und mehrfach verwendet werden. Nach Abnehmen der Sondenlösung wurden die Blots zweimal mit Hybridisierungswaschpuffer⁽¹⁷⁾ inkubiert (68°C, 45 min)

Die Hybridisierungstemperatur für die 3'- endmarkierten 40 Bp- Signalsequenzen betrug abweichend vom o.g. Protokoll 65°C.

2.2.11.4. Immunologische Detektion Digoxigenin- markierter DNA

Die Detektion der auf dem Southern - Blot durch die Sonden-DNA DIG-markierten Fragmente erfolgte mit Hilfe eines Anti- Digoxigenin- (F_{ab} - Fragment)- Alkalische Phosphatase- Konjugates (Boehringer). Die Alkalische Phosphatase katalysiert eine Chemolumineszenzreaktion von CDP-Star^(TM)(Tropix), deren Lichtintensität über mehrere Stunden konstant ist. Die Detektion erfolgte hierbei in Anlehnung an ein von ALLEFS ET AL. (1990) publiziertes Protokoll.

Die gewaschene Membran wurde 5 min in Puffer I⁽¹⁹⁾ äquilibriert und durch 30 minütige Inkubation in Puffer II⁽¹⁹⁾ die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Hieran schlossen sich eine 30 min Inkubation mit der Antikörperlösung⁽¹⁹⁾ (mind. 4 ml pro 100 cm² Membran) und drei 15 minütige Waschschrte mit Puffer I an, ehe die Membran 2 Minuten in frisch filtriertem Puffer III⁽¹⁹⁾ äquilibriert wurde. CDP-Star wurde in einer 1:500- Verdünnung in Puffer III⁽¹⁹⁾ zugegeben und 5 bis 10 min inkubiert, ehe die Blots in Plastikfolie eingeschweißt wurden. Nach 15- 30 min war das Maximum der Chemolumineszenz erreicht (Boehringer 1995; BRONSTEIN *et al.*, 1989), die über viele Stunden ein Signal konstanter Stärke erzeugte und mit Hilfe eines photographischen Films (Kodak X-OMAT AR) nachgewiesen werden konnte.

2.2.11.5. Waschen hybridisierter Nylonmembranen

Die markierten Blots können mehrmals verwendet werden. Das verwendete DIG-dUTP ist in einem alkalischen Milieu nicht stabil und zerfällt unter Freisetzung des Digoxigenins, so daß die an die Membran gebundene Sonden- DNA, bei späteren Hybridisierungen kein Signal mehr zeigt (Boehringer).

Zum Waschen wurden die Membranen zweimal für je 30 min in Waschlösung⁽²⁰⁾ unter kräftigem Schütteln inkubiert. Zur Neutralisation des pH- Wertes wurden die Membranen für einige Minuten in mehrfach erneuertem Wasser gelagert, kurz mit TE- Puffer⁽⁹⁾ inkubiert, in Haushaltsfolie eingeschlagen und bei -20°C gelagert.

2.3. Methoden zur Untersuchung der *P.aeruginosa*-Transposonmutanten

Im folgenden sind die verwendeten Methoden zur Untersuchung und phänotypischen Charakterisierung der *P.aeruginosa* - Transposonmutanten erklärt.

2.3.1. Phagozytostest

Die generierten *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten wurden auf ihre intragranulozytäre Überlebensfähigkeit getestet. Hierzu wurden Granulozyten frisch aus Blut präpariert und mit *P.aeruginosa* Transposonmutanten inkubiert. Die Granulozyten wurden durch Waschen und Filtrieren von den extrazellulären Bakterien separiert und anschließend lysiert, so daß die Fraktion der intrazellulären, lebensfähigen *P.aeruginosa* weiteren Analysen zugänglich wurde.

2.3.1.1. Granulozytenpräparation

Pro Selektionsansatz wurden 10 ml Blut in frisch heparinisierten Spritzen (10 I.E. Heparin/ml Blut) von einem Probanden abgenommen und in ein hohes Glasgefäß gegeben, in dem 5 ml HES vorgelegt worden war. Nach ca. 45 min wurde das Blutplasma von den sedimentierten Erythrozyten abgenommen und vorsichtig mit 2 ml Lymphozyten- Separationsmedium (eine isotonische Ficoll- Lösung der Dichte $\rho=1,077$ g/ml) unterschichtet. In einer Zentrifugation (3000 xg, 15 min) wurden die an der Phasengrenze verbleibenden Lymphozyten und Makrophagen von den sedimentierenden Granulozyten und Erythrozyten separiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml RPMI1640 resuspendiert und auf Eis gelagert.

2.3.1.2. Bestimmung der Granulozytenkonzentration

Die Bestimmung der Granulozytenkonzentration erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählen der Granulozyten in 4 Großquadraten (je 0,004 μ l).

$$1 \text{ Granulozyt / Großquadrat} = 2,5 \cdot 10^5 \text{ Granulozyten / ml}$$

Die in den Versuchen erreichten Konzentrationen lagen im Bereich von 10^7 - $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

2.3.1.3. Untersuchung der intrazellulären Überlebensfähigkeit

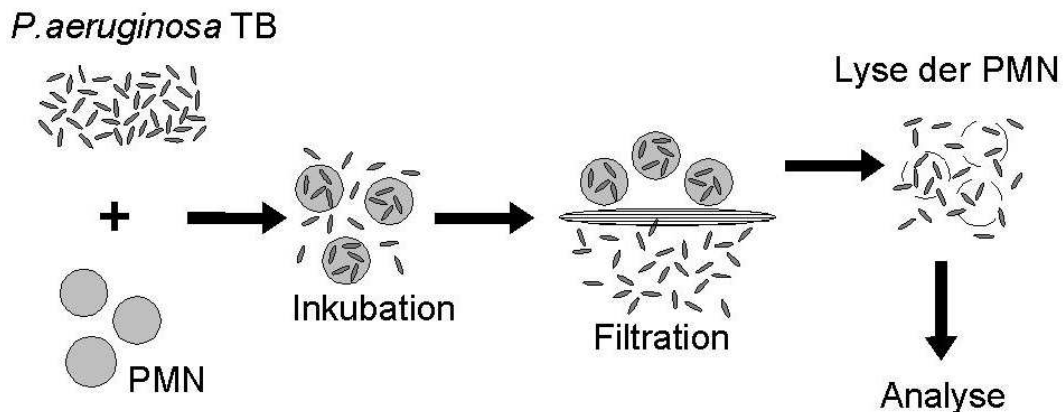


Abb. 2.6. Schema des Selektionsverfahrens zur Bestimmung der intrazellulären Überlebensfähigkeit in Granulozyten von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten

Zur Bestimmung der intragranulozytären Überlebensfähigkeit wurden *P.aeruginosa*-Mutanten aus einer Über-Nacht Kultur mit Granulozyten für 2 h (37° C, 200 rpm) in folgendem Selektionsansatz inkubiert:

10 ⁷	Granulozyten
1-2·10 ⁸ cfu	<i>P.aeruginosa</i> - Transposonmutanten
200 µl	Humanes Blutserum, Blutgruppe AB (AB- Serum)
ad 2 ml	RPMI1640

Der Zusatz des AB- Serums war notwendig, da die Granulozyten zur Erkennung der Bakterien ein funktionsfähiges Komplementsystem benötigen. Ohne eine Opsonisierung der Bakterien würde keine Phagozytose stattfinden. Die Verwendung von Serum der Blutgruppe AB ermöglichte es, Granulozyten verschiedener Spender (ohne Rücksicht auf ihre jeweilige Blutgruppe) mit einem standardisierten Komplementsystem zu versorgen. Ca. 300 ml Serum wurden vor Beginn der Experimente bei -80°C eingefroren, so daß stets Serum des gleichen Spenders vorlag.

Die Auswertbarkeit des Untersuchungsansatzes setzt voraus, daß das Verhältnis von Bakterien zu Granulozyten im Bereich von 10:1 bis 20:1 liegt. Bei kleineren Zahlen ist die Anzahl der überlebenden Bakterien sehr klein, bei größeren Zahlen ist der Streß für die Granulozyten zu hoch, so daß die Ergebnisse nicht reproduzierbar werden. (MIETHKE 1985)

In einem parallel begonnenen Kontrollansatz wuchsen die Bakterien ohne äußere Selektion:

1 - $2 \cdot 10^8$ Bakterien in 2 ml RPMI 1640

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kontrollansätze auf Eis gestellt. Die Selektionsansätze wurden mit RPMI1640 auf 10 ml aufgefüllt und 10 min bei 400 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment (bestehend aus Granulozyten mit intrazellulären Bakterien) in 200 µl RPMI1640 resuspendiert. Diese Suspension wurde auf eine Nutsche mit einem Celluloseacetat -Filter von 5 µm Porengröße aufgebracht und das Retentat zur Abtrennung der extrazellulären Bakterien mit 5 ml PBS gewaschen. Der Filter wurde in 3 ml destilliertes Wasser überführt, zur Lyse der Granulozyten 10 min inkubiert und 5 min intensiv geschüttelt. Die Suspension wurde abgenommen und 10 min bei 3000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest (ca. 100 µl) verworfen, das Pellet resuspendiert und auf LB- Agar ausgestrichen. Mit einem Aliquot (ca. 50 µl) des Kontrollansatzes wurde entsprechend verfahren.

Die gesamte Untersuchung unterlag strengen zeitlichen Begrenzungen:

- Von der Blutabnahme bis zur Filtration der Granulozyten durften nicht mehr als 6 h vergangen sein, da sonst die Granulozyten ihre Funktionen einstellten und der Selektionsdruck sank.
- Von dem Beginn der Inkubation der Granulozyten mit den *P.aeruginosa* bis zur Filtration durfte nicht mehr als 2½ Stunden vergehen. Nach dieser Zeit gingen die Granulozyten im Selektionsansatz in vermehrtem Maße in Apoptose über und die Bakterien wurden freigesetzt, so daß fast keine intrazellulären Bakterien mehr auffindbar waren.

2.3.2. Untersuchung des Quorum Sensing

Die Untersuchungen zur Funktion des Quorum Sensing in den generierten *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten wurden während eines Aufenthalts an der TU München (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Dr. L. Eberl) durchgeführt. Das Prinzip des Untersuchungsverfahrens besteht darin, die *P.aeruginosa* - Mutanten zusammen mit einem *E.coli* - Detektorstamm zu inkubieren, der über eine episomal kodierte, nur bei Anwesenheit von aliphatischen Homoserinlactonen exprimierte Luziferase verfügt.

Hierzu wurden die Transposonmutanten in Mikrotiterplatten (100 μ l LB⁽¹⁾) angeimpft und 4 h bei 37° C inkubiert. Der das Sensorplasmid tragende Detektorstamm wurde in LB⁽¹⁾ (Tetracyclin: 10 μ g/ml) bis zu einer Dichte von 0,3- 0,4 herangezogen und je 100 μ l davon zu jedem *P.aeruginosa*- Transposonmutanten zugegeben. Nach 4 h Inkubation (37° C) wurde die Luziferaseaktivität mit einer Photonenkamera gemessen. Hierbei mußte ein Abkühlen der Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur unbedingt vermieden werden (s. Kap. 3.6.2.).

Die in dieser Untersuchung gefundenen auffälligen Mutanten wurden dann in einem zweiten Experiment auf LB- Agar⁽¹⁾ zusammen mit dem Detektorstamm in folgendem Muster ausgestrichen:

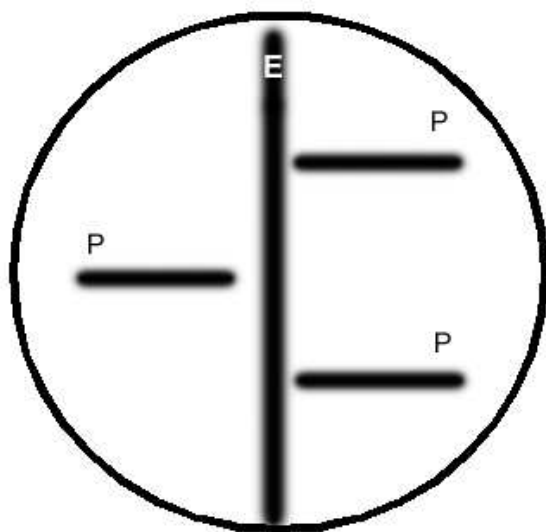


Abb. 2.7.

Muster der ausgestrichenen *P.aeruginosa*-Transposonmutanten zur Bestimmung der jeweiligen Autoinducer- Produktion

P: *P.aeruginosa* -Transposonmutant
E: *E.coli* mit Sensorplasmid

Die jeweiligen induzierten Luziferaseaktivitäten des Detektorstammes wurden nach einer Inkubation von 16 h (37°C) mit einer Photonenkamera gemessen.

Für alle Experimente wurde ein LB- Agar⁽¹⁾ mit einem NaCl- Gehalt von 0,4% (w/v) verwendet.

2.3.3. Bestimmung der Invasivität von *P.aeruginosa*-Mutanten in Epithelzellen

2.3.3.1. Zellkultur eukaryontischer Epithelzellen (Chang- Zellen)

Aus der Ausgangskultur (50 ml, 37° C, 5% CO₂) mit präkonfluent gewachsenen Zellen (d.h. mit der nächsten Zellteilung würde ein konfluent Monolayer aus Epithelzellen entstehen) wurde das Medium (RPMI1640 mit 5% FCS) abgenommen und die

Zellen mit 1 ml Trypsinlösung (1:100 Verdünnung; GibcoBRL) für 5-10 min bei 37° C inkubiert. Sobald sich die Zellen von der Oberfläche gelöst hatten (Kontrolle mit Mikroskop) wurde 10 ml RPMI1640 mit 5% FCS zugesetzt und die Zellzahl in einer Neubauer- Zählkammer bestimmt. (Für die Berechnung s. Kap. 2.3.1.2.) Aus dieser Zellsuspension wurden Aliquote für die folgenden Experimente entnommen.

Zur weiteren Kultur der Epithelzellen wurde ein entsprechendes Volumen der suspendierten Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und mit RPMI1640 (+ 5% FCS) auf 50 ml aufgefüllt. Durch vorsichtiges Schwenken wurden die Zellen gleichmäßig in der Flasche verteilt. Die überführte Zellzahl richtete sich nach der zu erwartenden Inkubationszeit. Da Chang- Zellen sich ungefähr einmal pro Tag teilen, wurde die eingesetzte Menge an Zellen für jeden geplanten Inkubationstag halbiert.

2.3.3.2. Mikroskopische Untersuchung der Invasivität

Die schnellste Möglichkeit zur Bestimmung der Invasivität unterschiedlicher *P.aeruginosa* Mutanten bestand in der mikroskopischen Untersuchung von adhärennten Epithelzellen, die mit den jeweiligen *P.aeruginosa* inkubiert worden waren. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt.

Zur Vorbereitung wurden am Vortag des Experiments runde Deckgläschen in 24-Well Platten verteilt und mit einer 1:10- Verdünnung von poly-L-Lysin (Sigma) für 10 min überschichtet, bevor jeweils 10^6 Epithelzellen in 1 ml RPMI1640 + 5% FCS (s.o.) sehr langsam zentral auf das Deckgläschen aufgetragen wurden. Das Deckgläschen war dabei mit der Pipette auf den Boden zu drücken, um zu verhindern, daß sich Epithelzellen auch an der Unterseite festheften. Hieran schloß sich eine Inkubation über Nacht an (37° C, 5 %CO₂). Ebenfalls wurden 5 ml - Kulturen der zu untersuchenden Bakterien angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Adhärenz der Epithelzellen überprüft (Mikroskop). In 15 ml frischem LB- Medium wurde von den zu untersuchenden Bakterien eine Suspension mit der optischen Dichte von 0,25 hergestellt. Diese Aliquote wurden zentrifugiert (3500 xg, 5 min) und die sedimentierten Bakterien in 1,5 ml PBS⁽⁵⁾ resuspendiert. Das Kulturmedium der Epithelzellen wurde verworfen und 1 ml frisches RPMI1640 (ohne FCS) zugefügt. Jeweils 30 µl der Bakteriensuspension (ca. 100 Bakterien pro Epithelzelle) wurden zugesetzt und die 24-Well Platten für 2 min bei minimaler Drehzahl (ca. 300 xg) zentrifugiert. Hieran schloß sich eine für jeden *P.aeruginosa* - Stamm experimentell zu bestimmende

Inkubationszeit (zumeist 30 min - 2 Stunden bei 37° C und 5% CO₂) an. Cytotoxische Stämme konnten nur für kürzere Zeiten mit den Epithelzellen inkubiert werden, da schon nach 40 min fast alle eukaryontischen Zellen in Apoptose übergingen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände aus den Wells verworfen, die Epithelzellen zweimal mit PBS⁽⁵⁾ gewaschen und 15 min in 0,5 ml einer Fixierlösung⁽¹²⁾ fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit dest. Wasser wurden die Präparate in 1 ml einer 0,07% (w/v) Kristallviolettlösung für mehrere Stunden gefärbt.

Die Auszählung der intrazellulären *P.aeruginosa* erfolgte am Mikroskop bei 1000x Vergrößerung manuell. Hierzu wurden in 50 - 100 zufällig ausgesuchten Epithelzellen die intrazellulären Bakterien gezählt und der Mittelwert berechnet.

2.3.3.3. Quantifizierung der Invasivität von *P.aeruginosa*

Die ersten Arbeitsschritte zur quantitativen Bestimmung der Invasivität von *P.aeruginosa* - Stämmen ähneln denen im obigen Kapitel. Die Behandlung der Bakterien und der Epithelzellen entspricht den o.g. Protokoll, jedoch werden die eukaryontischen Zellen vor der Inkubation direkt und ohne Deckgläschen in die 24- Well Platte eingebracht. Auch in diesem Experiment wurden die Epithelzellen für eine experimentell zu bestimmende Zeit mit einem 100-fachen Überschuß an Bakterien inkubiert. Allerdings sollten von jedem zu untersuchenden Klon mindestens 5 parallele Experimente angesetzt werden, um durch Mittelung der Ergebnisse die Signalschwankungen zu verringern.

Nach Ablauf der Inkubation (37° C, 5% CO₂) wurden die Epithelzellen zur Abtrennung der Bakterien im Überstand dreimal mit 1 ml RPMI1640 gewaschen und für 120 min mit je 1 ml RPMI1640 mit 100 µg/ml Polymyxin B bei inkubiert (37° C, 5% CO₂), um die adhärenenten extrazellulären Bakterien aus dem Ansatz zu entfernen. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit RPMI1640 gewaschen. Zur Freisetzung der intrazellulären Bakterien wurden die eukaryontischen Zellen 5- maximal 10 min mit 0,5 ml Saponinlösung (50 mg/ml) inkubiert und so lysiert. 100 µl dieses Lysats sowie 100 µl einer 1:10- Verdünnung wurden auf LB- Agar⁽¹⁾ ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und die Lebendkeimzahl bestimmt.

Zur Bestimmung der Adhärenz der Bakterien an die Epithelzellen wurde ein vergleichbares Experiment durchgeführt, jedoch entfiel die Inkubation mit Polymyxin B. Die Epithelzellen wurden vor der Lyse nur viermal mit RPMI1640 gewaschen.

2.3.4. Untersuchung zur Pathogenität von *P.aeruginosa* TB im Mausmodell

Zur Bestimmung der Pathogenität von *P.aeruginosa* TB wurden unterschiedliche Mengen an Bakterien Mäusen (Blk6 und heterozygote Mäuse eines daraus abgeleiteten Stammes mit einer ausgeschalteten sauren Sphingomyelinase) intranasal mit einer Sonde verabreicht. Die pro Tier verabreichte Bakterienmenge betrug zwischen $3 \cdot 10^{10}$ (60 μ l Bakterienpellet) und $4 \cdot 10^9$ Bakterien (15 μ l eines 1+1 mit PBS verdünnten Pellets). Mit jeder Bakterienkonzentration wurden zwei Mäuse infiziert. Der Erkrankungsverlauf der Tiere wurde über 72 Stunden beobachtet. Zielgröße war dabei die Bestimmung der minimalen letalen Dosis.

2.3.5. Flagellinnachweis bei *P.aeruginosa*

Bei einem Transposonmutanten wurde ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Überlebensfähigkeit und der Regulation des Flagellenaufbaus gefunden. Zur näheren Charakterisierung wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

2.3.5.1. Fixieren der Bakterien auf Membranen

Die zu untersuchenden Bakterien wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium herangezogen und je 3 ml Bakteriensuspension (ohne Kahmhaut oder andere Aggregationen) für die weiteren Untersuchungen abgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl (Kap. 2.2.1.2.) wurden $4 \cdot 10^{10}$ Bakterien abzentrifugiert und in 1 ml PBS⁽⁵⁾ resuspendiert. Aliquote von 10^8 und 10^7 Bakterien (aus einer 1:10 Verdünnung) wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA85, 0,45 μ m; Schleicher & Schuell) aufgetragen und 5 min bei 37°C getrocknet.

2.3.5.2. Immunologische Detektion

Die Detektion des Flagellins erfolgte nach dem Protokoll der Firma Tropix, das generell für immunologische Detektionen eingesetzt werden kann.

Zum Blockieren der unspezifischen Bindungen wurde die Nitrocellulosemembran mindestens 1 Stunde in Waschlösung A⁽¹⁹⁾ (200 ml) vorinkubiert bevor 1:1333 verdünnter primärer Antikörper (15 μ l Kaninchen-AK gegen Flagellin Typ b, Montie T, Univ. Tennessee, Knoxville) in Waschlösung A⁽¹⁹⁾ (20 ml) für 1 Stunde zugegeben

wurde. Nach dreimaligem Waschen (10 min) mit je 200 ml Waschlösung B⁽¹⁹⁾ wurde der 1:5000 verdünnte sekundäre Antikörper (4 µl anti- Kaninchen- IgG- alkalische Phosphatase- Konjugat aus Ziege, Tropix) in Waschlösung B⁽¹⁹⁾ (20 ml) zugegeben. Nach drei weiteren Waschschrritten (10 min, 200 ml) mit Waschlösung B⁽¹⁹⁾ wurden die Membranen jeweils für 5 min mit Assay-Puffer⁽¹⁹⁾, dann mit Nitroblock- Lösung⁽¹⁹⁾, und erneut zweimal mit Assay- Puffer⁽¹⁹⁾ inkubiert. CDP- Star wurde in einer 1:1000 Verdünnung zugegeben und 5 bis 10 min inkubiert, ehe die Blots in Plastikfolie eingeschlagen wurden. Nach ca. 15 min war das Maximum der Chemolumineszenz erreicht (Boehringer; BRONSTEIN ET AL. 1989), die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR).

2.3.5.3. Färbung von Flagellen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung

P.aeruginosa aus einer über Nacht bei 37° C inkubierten Kultur wurden durch Zugabe von Formaldehyd (Endkonzentration 1%) abgetötet und auf einer Glimmermatrix fixiert. Die Färbung geschah mit 5 mM Uranylacetat (pH 7,0), das für 5 min auf die Bakterien einwirkte. Nach zweimaligem Waschen mit dest. Wasser wurde das Präparat getrocknet und auf einem Kupfer- Träger fixiert. (Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte an der GBF durch Dr. M. Rohde)

2.4. Selektion von STM- Mutanten

Für die Selektion der *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten in Granulozyten und die Bestimmung ihrer jeweiligen intrazellulären Überlebensfähigkeit war eine Vielzahl der o.g. Methoden notwendig. Sie sind in den vorherigen Teilen inhaltlich geordnet, sollen hier aber zur besseren Übersichtlichkeit noch einmal in den experimentellen Zusammenhang eingeordnet werden.

Die *P.aeruginosa*- Transposonmutanten wurden separat in Mikrotiterplatten aus eingefrorenen Glycerol- Kulturen angeimpft (Kap. 2.2.1.3.) und über Nacht bei 37° C inkubiert (Kap. 2.2.1.1.). Je 48 Transposonmutanten mit verschiedenen Signalsequenzen wurden vereinigt und in einem Phagozytostest auf ihre Überlebensfähigkeit in Granulozyten untersucht (Kap. 2.3.1.). Hierbei wurde jede Gruppe von 48 Mutanten je zwei unabhängigen Experimenten unterzogen.

Nach einer Inkubation über Nacht bei 37° C wurden die Bakterien (selektierte und unselektierte Proben) in 5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und ein zweites Mal den Selektionsbedingungen ausgesetzt. (Die Kontrollen wurden entsprechend nur in RPMI1640 suspendiert.) Die auf LB-Agar⁽¹⁾ ausgestrichenen Bakterien wurden über Nacht bei 37° C inkubiert. Erst nach dieser zweiten Selektion wurde die genomische DNA der überlebenden Bakterien isoliert (Kap. 2.2.6).

Aus diesen DNA- Lösungen wurden dann mit PCR die Signalsequenzen der Transposons amplifiziert (Kap. 2.2.7., Parameter c.). Hierbei wurden für jede untersuchte DNA- Mischung 8 PCR- Reaktionen (zu je 25 µl) durchgeführt, um genügend Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Schritte bereitzustellen. Die so erhaltenen Signalsequenzen wurden mit *Hind*III restriktionsverdaut (Kap. 2.2.8, abgewandeltes Protokoll für große Volumina) und die spezifische 40 Bp- Sequenzen über ein geeignetes Verfahren (Kap. 2.2.10.2) aufgereinigt. Die aufgereinigten 40 Bp- Sequenzen wurden mit Hilfe einer Terminalen Transferase am 3'- Ende mit DIG- ddUTP markiert (Kap. 2.2.10.4.).

Die Signalsequenzen der Donor-Plasmide wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert (Kap. 2.2.7, Parameter b.) und als Dot- Blots auf Membranen fixiert (Kap. 2.2.11.2.). Auf diese vorbereiteten Blots wurden die 3'-endmarkierten Signalsequenzen aus dem Phagozytostest bei 65° C (16h) hybridisiert (Kap. 2.2.11.3.). Die Häufigkeit der einzelnen Signalsequenzen wurde durch eine Lichtreaktion bestimmt (Kap.2.2.11.4.). Die erhaltenen Röntgenfilme wurden gescannt und die Schwärzung (od/mm²) der einzelnen Dots mit dem Programm PC-BAS 2.09f ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in MS- Excel.

Die Blotmembranen konnten gewaschen (Kap. 2.2.11.5.) und ca. 3- 4 mal verwendet werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die einzelnen Kapitel dieses Teils bauen aufeinander auf. Die experimentellen Zielsetzungen der einzelnen Abschnitte soll deshalb hier kurz umrissen werden:

Kap. 3.1.: Entwicklung eines Verfahrens zur Konjugation und Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB

Kap. 3.2.: Konstruktion eines geeigneten Vektorsystems zur sequenzspezifizierten Transposonmutagenese (STM) in *P.aeruginosa* TB

Kap. 3.3.: Aufbau und Überprüfung der Bibliothek von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten

Kap.3.4.: Untersuchung von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten auf ihre intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten unter Einsatz des STM-Verfahrens.

Kap. 3.5. Untersuchung der Invasivität einiger in Kap. 3.4. identifizierten *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten mit einem auffällig veränderten Phänotyp.

Kap. 3.6. Untersuchung des Quorum Sensing der *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten durch qualitative Bestimmung ihrer Produktion an aliphatischen Homoserinlactonen.

Kap. 3.7. Weitere Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung der in den Kap. 3.4. und 3.6. gefundenen auffälligen Transposonmutanten.

Kap. 3.8. Beschreibung der Gene, die in den jeweiligen *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten aus Kap. 3.4. und 3.6. durch die Insertion ausgeschaltet wurden. Auflistung der ermittelten phänotypischen Daten. Weitere Untersuchungen einzelner Mutanten zur Überprüfung ihrer individuellen phänotypischen Veränderungen.

Kap. 3.9. Zusammenfassende funktionelle Interpretation der identifizierten Gene

3.1. Entwicklung und Optimierung eines Verfahrens zur Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB

Zur Optimierung eines Verfahrens zur Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB wurde auf vorhergehende Arbeiten (Diplomarbeit L. WIEHLMANN) aufgebaut. Weiterhin wurde meistens die Zielrichtung der in einem Kapitel beschriebenen Untersuchungen durch Ergebnisse aus vorhergehenden Experimenten vorgegeben. Zur besseren Übersichtlichkeit werden daher zu Beginn jedes Kapitels die für diesen Abschnitt relevanten Vorarbeiten kurz zusammengefaßt.

3.1.1. Konstruktion des Vektors pUT- Gm

In den vorhergehenden Versuchen hatte sich gezeigt, daß Kanamycin als Selektionsmarker zur Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB ungeeignet war, obwohl dieser Stamm bei der Bestimmung der MHK empfindlich zu sein schien. Die Erzeugung von *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten war möglich, jedoch war diese Insertion nicht stabil und wurde innerhalb weniger Tage wieder aus dem Chromosom herausgeschnitten. Sowohl die Insertion als auch der Verlust des Transposons wurden über PCR und Southern- Hybridisierung nachgewiesen. Ein vergleichbarer Effekt ist auch in der Literatur beschrieben (GOLDBERG 1990). Auch ein ununterbrochener Antibiotikadruck verhinderte dies nicht. Die Resistenz der initial erzeugten *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten gegenüber Kanamycin blieb -vermutlich durch Adaptation- auch nach mehreren Tagen in Kanamycin- haltigem Medium erhalten, obwohl keine Transposonsequenzen mehr in den Bakterien nachweisbar waren. Diese adaptierten Bakterien konnten selbst auf Antibiotikakonzentrationen von mehr als 1000 µg/ml Kanamycin wachsen. Von der Verwendung von Kanamycin als Selektionsmarker wurde daher in der vorliegenden Arbeit abgesehen.

Untersuchungen mit verschiedenen Antibiotika zeigten eine hohe Empfindlichkeit von *P.aeruginosa* TB gegenüber Gentamicin. Die auf in LB und M9- Medium gemessene MHK lag unter 8 µg/ml und auch bei längerer Inkubation zeigte sich keine durch Adaptation steigende Resistenz.

Die Kanamycinresistenz des pUT- miniTn5 Km2 wurde daher gegen eine Gentamicinresistenz ausgetauscht. Hierzu wurde der Vektor mit *KpnI* und *SphI* in einem Doppelverdau geschnitten, der Plasmidrahmen vom Resistenzgen und der Signalse-

quenz separiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die Gentamicin-kassette wurde aus dem Plasmid pMS246 (SCHWEIZER 1993) mit den gleichen Enzymen ausgeschnitten, in den pUT- Rahmen ligiert und in *E.coli* CC118 λ pir transformiert. Die Karte des erhaltenen Vektors ist in Kap. 2.1.6.2. zu abgebildet.

Dieser Vektor wurde in den weiteren Versuchen zur Entwicklung eines Protokolls für die Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB verwendet.

3.1.2. Vorversuche zur Konjugation von *P.aeruginosa*

Ziel der Vorversuche war es, ein geeignetes Basisprotokoll zu Konjugation und Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* zu finden. Dieses Verfahren sollte dann in einem zweiten Schritt so weit optimiert werden, daß es für die Generierung einer Bibliothek von mehreren tausend verschiedenen Mutanten geeignet ist.

3.1.2.1. „Filtermating“ von *P.aeruginosa* TB

Das „Filtermating“ (HENSEL & HOLDEN 1995) ist das Verfahren, das von M. Hensel bei der Entwicklung der STM zur Generierung der Transposonmutanten verwendet wurde (HENSEL ET AL. 1995). Es war allerdings bereits bei seinen Experimenten nie sehr effektiv. Die maximale Ausbeute in M. Hensels Versuchen betrug ca. 1-2 Mutanten auf 5 Filter (persönl. Auskunft M. HENSEL).

Das gleiche Verfahren wurde für eine biparentale Konjugation verwendet:

Donorstamm:	<i>E.coli</i> S17-1 λ pir mit pUT- Gm
Akzeptorstamm:	<i>P.aeruginosa</i> TB
Vorinkubation:	Alle Stämme auf LB- Agar, 37°C, 16 h
Selektion:	LB-Agar mit 25 μ g/ml Gentamicin und 25 μ g/ml Nalidixinsäure, 37°C, 36h
Anzahl der Experimente:	120
Mutanten:	2

Das „Filtermating“ in der von M. Hensel beschriebenen Art war vom Prinzip zwar zur Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB geeignet, in der Praxis aber zu arbeitsaufwendig, um für die Generierung einer Bibliothek von Transposonmutanten geeignet zu sein.

(Das im Kapitel 2.2.4.3. beschriebene „Filtermating“ ist entsprechend der späteren Resultate für *P.aeruginosa* modifiziert. Die Ausbeute an Transposonmutanten nach dem dort beschriebenen Protokoll beträgt ca. das 10-fache des o.g. Ergebnisses.)

3.1.2.2. Elektroporation

In der Literatur wird beschrieben, daß DNA durch Elektroporation in *P.aeruginosa* eingeführt wurde (z.B. DENNIS 1995; FARINHA 1990). Allerdings gibt es auch Hinweise, daß diese Methode nur bei einigen Stämmen funktioniert, beim überwiegenden Teil der *P.aeruginosa* - Isolate jedoch nicht (DELORENZO & TIMMIS 1994).

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Erzeugung kompetenter *P.aeruginosa* zur Elektroporation unterscheiden sich nicht von dem für *E.coli* verwendeten. Ausgehend von diesen Arbeitsanweisungen wurde versucht, ein Protokoll zur effizienten Elektroporation von *P.aeruginosa* TB zu entwickeln:

Donorplasmid:	pUT- Gm (aus <i>E.coli</i> CC118 λ pir und <i>E.coli</i> S17-1 λ pir) pTnMod-OGm (aus <i>E.coli</i> DH5 α)
Akzeptor:	<i>P.aeruginosa</i> TB (in 10% Glycerol)
Elektroporation:	0,1 und 1 μ g Plasmid- DNA; 800V, 1200V oder 1500 V; 150 Ω ; 71 μ F
Selektion:	LB-Agar mit 25 μ g/ml Gentamicin, 37°C, 36 h
Anzahl der Experimente:	36 mit pUT- Gm aus <i>E.coli</i> CC118 λ pir 24 mit pUT- Gm aus <i>E.coli</i> S17-1 λ pir 12 mit pTnMod-OGm aus <i>E.coli</i> DH5 α
Mutanten:	0

Die Transformationseffizienz ist stark vom Bakterienstamm abhängig, aus dem das zu transformierende Plasmid gewonnen wurde. Große Unterschiede im Restriktions- und Methylierungssystem von Donor- und Akzeptorstamm können eine vollständige

Degradation der transformierten DNA nach der Aufnahme durch den Akzeptor bewirken. Aus diesem Grund wurde zur Elektroporation Plasmid-DNA von unterschiedlichen *E.coli*-Stämmen getestet. Das vollständige Versagen der Elektroporation bedeutet daher nicht notwendigerweise, daß dieses Verfahren für *P.aeruginosa* TB prinzipiell ungeeignet ist. Es beweist allerdings, daß es mit den verwendeten Donorstämmen nicht funktioniert. Die Versuche zur Elektroporation von *P.aeruginosa* TB wurden daher eingestellt.

3.1.2.3. Konjugation auf Agarplatten

Die Ergebnisse aus dem „Filtermating“ zeigten, daß der konjugative Transfer eines Plasmides von *E.coli* zu *P.aeruginosa* TB prinzipiell möglich aber sehr selten ist. Das Ziel einer höheren Ausbeute läßt sich direkt über eine Erhöhung der Zellzahlen erreichen. Bei einer Inkubationstemperatur von 37° C erreichen 10⁹ Bakterien, wie sie für ein „Filtermating“ eingesetzt wurden, schon lange vor Ablauf der Inkubationszeit von 16 h die stationäre Phase. Nur in dieser begrenzten Zellzahl kann ein Konjugationsereignis stattfinden. Zur Erhöhung der Gesamtzellzahl - und damit zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit eines Konjugationsereignisses - wurden daher in einer biparentalen Konjugation die einem Filtermating entsprechenden Zellzahlen von Donor- und Akzeptorstamm (je 10⁹ cfu) direkt auf LB- Agar ausplattiert.

Donor:	<i>E.coli</i> S17-1 λ pir mit pUT- Gm
Akzeptor:	<i>P.aeruginosa</i> TB
Vorinkubation:	Alle Stämme auf LB- Agar, 37°C, 16 h
Selektion:	LB-Agar mit 25 μ g/ml Gentamicin und 25 μ g/ml Nalidixinsäure, 37°C, 36h
Anzahl der Experimente:	72
Mutanten:	11

Das Ergebnis bestätigte die Eingangsvermutung. Die Ausbeute war deutlich höher als bei allen vorhergehenden Experimenten. Zur Kontrolle wurde die genomische Insertion des Transposons in einer Southern- Hybridisierung nachgewiesen:

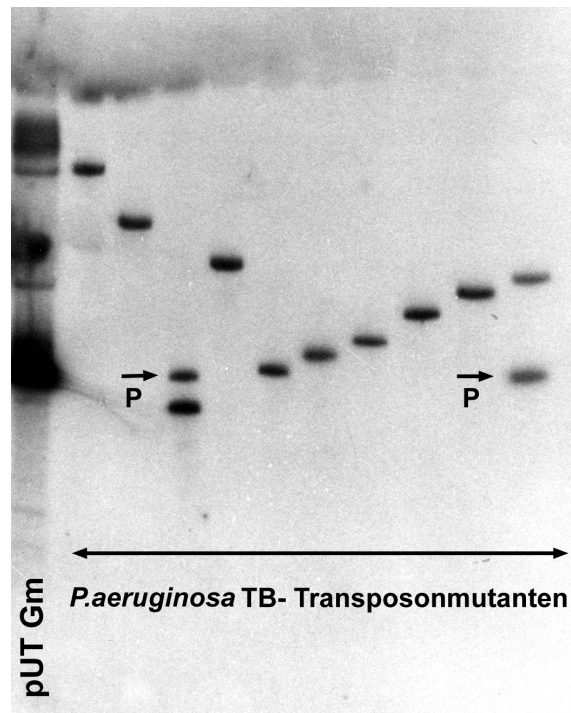


Abb. 3.1. Southern- Hybridisierung von PstI- verdauten genomischen DNA- Fragmenten der *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten mit einer Sonde gegen das Gentamicinogen des Transposons. In der linken Spur ist zusätzlich das ebenfalls mit PstI verdaute Donor- Plasmid pUT Gm aufgetragen. Wie es bei einer statistischen Insertion des mini- Transposons zu erwarten war, wurde bei jedem Transposonmutanten ein anderes DNA- Fragment markiert. Allerdings ist in zwei Spuren noch ein zusätzliches Fragment zu sehen, das von einem episomale pUT Gm stammt. Die Pfeile mit der Beschriftung „P“ weisen auf diese Fragmente hin.

Hierbei wurden drei weitere Probleme deutlich:

- In einigen Spuren war ein zweites Fragment auf Höhe des pUT-Gm- Plasmides zu sehen. Da pUT Gm aufgrund des Replikationsursprungs *ori R6K* in *P.aeruginosa* nicht stabil episomal repliziert werden kann, war dieses Signal auf eine Kontamination mit *E.coli* zurückzuführen. Bei der notwendigen langen Selektionszeit waren auf den Agarplatten stets tausende kleiner Kolonien von *E.coli* zu sehen, die teilweise von den schneller wachsenden *P.aeruginosa* - Transposonmutanten bedeckt wurden und so beim Asservieren der Mutanten zu Kontaminationen führen konnten. Es mußte somit der Selektionsdruck erhöht und / oder ein Protokoll zur Separation der *E.coli* von den *P.aeruginosa* erarbeitet werden, das für einen Durchsatz von mehreren tausend Mutanten geeignet ist.

- Einige der asservierten *P.aeruginosa* waren keine Transposonmutanten. Da nie eine Adaptation an Gentamicin nachgewiesen werden konnte, war zu vermuten, daß die Antibiotikakonzentration durch die resistenztragenden *E.coli* lokal so weit verringert wurde, daß auch nicht mutierte *P.aeruginosa* wachsen konnten. Auch die Lösung dieses Problems erfordert eine Verstärkung des Selektionsdrucks.
- Das dritte Problem lag noch immer in der Ausbeute der Transposonmutagenese. Mit der erreichten Effizienz von ca. 1 Mutant / 6 Experimente wäre der Aufwand zur Erzeugung einer Bibliothek von ca. 3000 Transposonmutanten noch sehr hoch. Eine weitere Erhöhung der Konjugationseffizienz auf Basis des o.g. Protokolls war somit notwendig.

3.1.3. Optimierung der Konjugation von *P.aeruginosa*

Die Vorversuche lieferten ein zur Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB geeignetes Protokoll, das aber nicht sehr effizient war. Zur Erhöhung dieser Effizienz mußten die meisten Parameter modifiziert werden.

3.1.3.1. Inkubation der Bakterien vor der Konjugation

Die Bedingungen, unter denen die Bakterien vor der Konjugation wachsen, haben einen großen Einfluß auf die Konjugationseffizienz. Entsprechend war durch geeignete Variation der Parameter eine Effizienzsteigerung zu erwarten.

Donorstamm/ Helferstamm:

Für den Donorstamm (und den Helferstamm bei triparentalen Konjugationen) sollten möglichst optimale Wachstumsbedingungen vorliegen. Dies bedeutete die Verwendung eines Vollmediums (LB) mit einem entsprechenden Antibiotikazusatz (Gentamicin für den Donorstamm, Kanamycin für den Helferstamm), sowie Inkubation bei optimalen Temperaturen (37°C). Eine weitere Optimierung war nicht notwendig.

Akzeptorstamm *P.aeruginosa*:

Im Gegensatz zum Donorstamm boten sich für den Akzeptorstamm zur Erhöhung der Konjugationseffizienz mehrere Veränderungen in den Inkubationsbedingungen an:

Temperatur:

Bei einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 42° C wird in *P.aeruginosa* das Restriktionssystem ausgeschaltet (DeLORENZO & TIMMIS 1994). Wenn die Ursache für die geringe Konjugationseffizienz der Vorversuche darin lag, daß die aufgenommene DNA verdaut und nicht korrekt prozessiert wurde, sollte die Veränderung der Inkubationstemperatur zu einer deutlichen Ausbeuteerhöhung führen.

Nährmedium:

LB- Agar ist als Nährboden für *P.aeruginosa* zwar gut geeignet, jedoch nicht optimal. Blut- Agar ist in seiner Zusammensetzung vielseitiger und kommt mit seinem hohen Eisengehalt den Bedürfnissen eines aerophilen Bakteriums näher. Es wurde daher als Nährboden vor der Konjugation neben LB- Agar auch Blut- Agar untersucht.

Inkubationsdauer

P.aeruginosa TB wurde für verschiedene Zeiträume auf LB- und Blut- Agar bei 37° C oder 42° C inkubiert. Auch bei mehrtägigen Inkubationen wurden die Bakterien täglich neu überimpft.

Für jede Inkubationsbedingung wurden 10 biparentale Konjugationen durchgeführt (Donor: S17-1λpir pUT-Gm; Mischungsverhältnis 1:1). In der Tabelle ist die Anzahl der Experimente mit Transpositionereignissen aufgeführt (Maximalwert: 10):

Präinkubation [Tage]	37°C		42°C	
	LB-Agar	Blut-Agar	LB-Agar	Blut-Agar
1	1	0	1	2
2	2	1	0	4
3	1	0	3	4
5	0	0	5	9
7	2	0	5	8

Tabelle 3.1. Auswirkungen unterschiedlicher Präinkubationsbedingungen auf die Konjugationseffizienz von *P.aeruginosa* TB

Die aufgeführten Zahlen nennen nur die Anzahl der Selektionsplatten, auf denen Kolonien gewachsen sind. Über die jeweilige Koloniezahl (cfu) pro Agarplatte wurde dabei keine Aussage gemacht.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Effizienz der Konjugation entscheidend von den vorhergehenden Inkubationsbedingungen des Akzeptorstammes abhing.

37°C :

Die Zahlen bestätigten für Inkubationen auf LB-Agar den Wert von ungefähr 1 Mutation auf 5 Experimente (Kap. 3.1.2.3). Die mit *P.aeruginosa* von Blutagar erhaltenen Ausbeuten lagen deutlich tiefer. Die Ursache dafür könnte gewesen sein, daß die *P.aeruginosa* auf Blutagar bei 37° C deutlich mukoider als auf LB- Agar waren. Vermutlich waren die Bakterien durch diese dicke Schleimhülle für das Konjugationssystem des Donor- Stammes schlechter zugänglich.

42°C:

Die Konjugationseffizienz lag bei diesen Temperatur deutlich höher. Die Verwendung von Blutagar verdoppelte noch einmal die Ausbeute. Die Mukoidität der Bakterien war deutlich reduziert, was die Möglichkeit einer Konjugation erhöht haben kann. Ebenfalls kann das Ausschalten des Restriktions- / Modifikationssystems von *P.aeruginosa* durch Inkubation bei 42° C die Konjugation deutlich begünstigt haben. Alle diese Umstellungen sollten aber in *P.aeruginosa* TB innerhalb weniger Generationen abgeschlossen sein. Allerdings wurde nach einer mehrtägigen Inkubation bei 42° C eine weitere Erhöhung der Konjugationseffizienz beobachtet. Dieser Effekt ist vermutlich nicht nur durch Vorgänge wie dem Ausschalten des Restriktionssystems zu erklären - dafür war die Zeitdauer zu lang. Eine Makrorestriktionsanalyse zeigte keine Unterschiede im Fragmentmuster von *P.aeruginosa* TB vor und nach einer 7-tägigen Inkubation bei 42° C. Die Ursache für die erhöhte Konjugationseffizienz blieb unklar, der Effekt war jedoch reproduzierbar.

Mit einer 5-tägigen Vorinkubation der *P.aeruginosa* TB bei 42° C auf Blut-Agar ließ sich somit eine Konjugationseffizienz von mehr als 1 Mutant / Konjugation erreichen. Diese deutliche Effizienzsteigerung ermöglichte den Aufbau einer Bibliothek von *P.aeruginosa* - Transposonmutanten.

Das Einbringen fremder DNA in klinische *P.aeruginosa*- Isolate gilt im allgemeinen als sehr schwierig (DELORENZO & TIMMIS 1994). Die o.g. Ergebnisse belegen, daß durch Veränderung der Präinkubationsbedingungen des *P.aeruginosa*- Isolats eine deutliche Erhöhung der Konjugationseffizienz zu erreichen ist. Interessanterweise entsprachen diese Bedingungen ungefähr denen, die in einem akut infizierten Patienten zu erwarten sind (hohes Fieber - 42° C - für mehrere Tage, Nährmedium Blut). Eine ebenso hohe Konjugationseffizienz konnte auch bei anderen *P.aeruginosa*- Isolaten bei einer entsprechenden Vorinkubation erreicht werden (Kap. 3.1.3.5.).

3.1.3.2. Konjugationsbedingungen

Mischungsverhältnis:

Ein in der aktuellen Literatur (z.B. DARWIN & MILLER 1999, HENSEL ET AL.1995, DELORENZO & TIMMIS 1994) nie in Frage gestellter Parameter ist das Mischungsverhältnis von Donor und Akzeptor in einer Konjugation. Diese werden immer im Verhältnis 1:1 gemischt. Wenn man jedoch bedenkt, daß eine Konjugation ein sehr seltener Prozeß ist, bei dem die Initiative nur vom Donor ausgehen kann, so sollte eine bessere Konjugationsausbeute zu erreichen sein, wenn dieser im deutlichen Überschuß vorliegt. Optimalbedingungen sollten vorliegen, wenn auf der Agarplatte jedes Akzeptor- Bakterium nur von Donoren (und bei der triparentalen Konjugation zusätzlich von Helfer- Bakterien) umgeben ist:

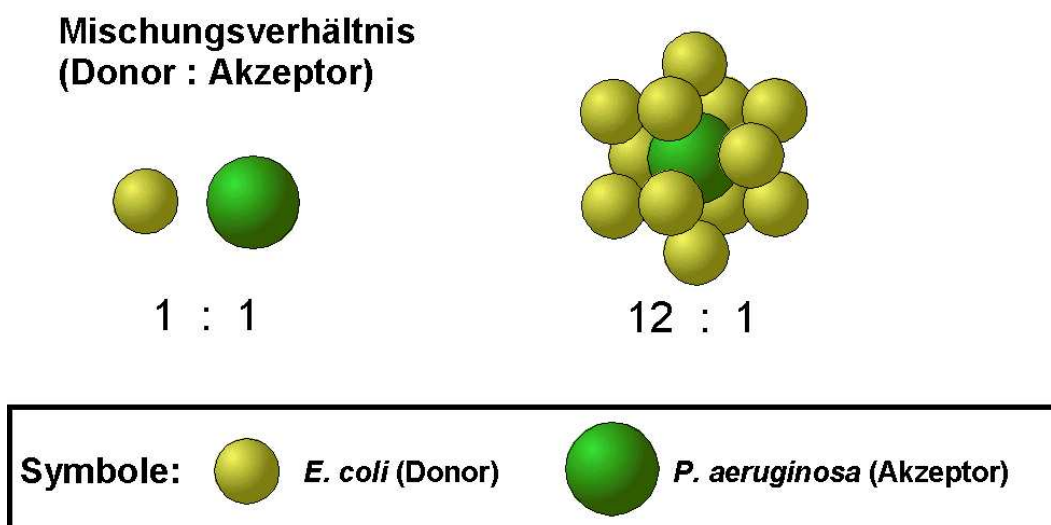


Abb. 3.2. Schematische Darstellung zur Anordnung von Donor und Akzeptor in einer biparentalen Konjugation bei verschiedenen Mischungsverhältnissen.

Dies bedeutet, daß optimale Konjugationsbedingungen (gleiche Bakteriengrößen von Donor und Akzeptor vorausgesetzt) bei einem Mischungsverhältnis von 12 : 1 für Donor und Akzeptor liegen müßte, da dies der dichtesten (hexagonalen) Kugelpackung entspräche. Unter diesen Umständen ist jedes Akzeptor- Bakterium so gut wie möglich von Donoren umgeben. Noch höhere Mischungsverhältnisse zu Gunsten des Donors sollten bei gleicher Zellzahl des Akzeptors keinen Einfluß mehr auf die Konjugationseffizienz ausüben.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in einer biparentalen Konjugation entsprechend vorinkubierte *P.aeruginosa* TB und *E.coli* S17-1 λ pir (mit pUT-Gm) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen auf LB- Agar bei 37° C ausgestrichen und vor der Selektion 16 h inkubiert:

<i>P.aeruginosa</i> [cfu]	<i>E.coli</i> [cfu]	Verhältnis	Versuche	Kolonien Ø [cfu]
10 ⁹	10 ⁸	10 : 1	5	21
10 ⁹	10 ⁹	1 : 1	10	18
3·10 ⁸	10 ⁹	1 : 3	5	30
10⁸	10⁹	1 : 10	10	46
10 ⁸	2·10 ⁹	1 : 20	10	39

Tabelle 3.2. Anzahl der erhaltenen Transposonmutanten bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Donor und Akzeptor

Auch wenn die Ergebnisse etwas streuten, war dennoch ein Trend ablesbar, daß ein höherer Anteil an Donor die Ausbeute einer Konjugation erhöht. Es wurden deshalb in allen folgenden Konjugationen folgende Mischungsverhältnisse eingestellt:

biparentale Konjugation:

<i>E.coli</i> S17-1 λ pir (pUT-Gm)		<i>P.aeruginosa</i> TB
Donor		Akzeptor
10 ⁹ cfu		10 ⁸ cfu
10	:	1

triparentale Konjugation:

<i>E.coli</i> DH5 α (pTnMod-OGm)	<i>E.coli</i> HB101(pRK2013)	<i>P.aeruginosa</i> TB
Donor	Helfer	Akzeptor
10 ⁹ cfu	10 ⁹ cfu	10 ⁸ cfu
10	10	1

Inkubationsbedingungen:

Ebenso wie die Bedingungen der Vorinkubation optimiert wurden, wurde auch nach den optimalen Inkubationsbedingungen während der Konjugation gesucht. Es war zu klären, ob für eine hohe Konjugationseffizienz die Inkubation eher den Anforderungen des Donors oder des Akzeptors entsprechen muß. Hierzu wurden je 5 biparentale Konjugationen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen für 16 h inkubiert und anschließend die durchschnittliche Kolonienzahl bestimmt:

Inkubationsbedingungen	[cfu]
37°C, LB- Agar	74
37°C, Blut-Agar	55
42°C, LB- Agar	20
42°C, Blut-Agar	25

Tabelle 3.3. Vergleich der Konjugationseffizienzen bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen während der biparentalen Konjugation

Die besten Resultate wurden erzielt, wenn die Konjugation bei 37° C auf LB- Agar durchgeführt wurde. Vor allem die Temperatur schien entscheidend zu sein. Dies deutet darauf hin, daß die Effizienz einer möglichen Konjugation in erster Linie vom Donor- Bakterium bestimmt wird. Je besser die Inkubationsbedingungen während der Konjugation an den Donor angepaßt sind, desto höher ist die zu erwartende Ausbeute. Aus diesem Grund wurden alle Konjugationen zu Herstellung der Bibliothek von *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten bei 37°C auf LB- Agar ausgeführt.

3.1.3.3. Selektionsbedingungen

Ein kritischer Faktor bei der Transposonmutagenese ist die Abtrennung des *E.coli*-Donorstammes (der das resistenzvermittelnde Transposon trägt) von den Transposonmutanten des jeweiligen Akzeptorstammes. Im Protokoll von M.Hensel (1995) wurde dazu Nalidixinsäure zum Selektionsmedium zugesetzt. Dieses zweite Antibiotikum verhinderte das Wachstum des Donorstammes, das Wachstum des gegen Nalidixinsäure resistenten Akzeptorstammes wurde dagegen nur durch das Kanamycin verhindert, so daß entstehende Transposonmutanten mit einer inserierten Kanamycinresistenz auf dem Selektionsmedium wachsen konnten. Bei *P.aeruginosa* TB ist diese Separation nicht möglich. Auch ohne vorherige Adaptation stieg die Resistenz von *P.aeruginosa* TB gegenüber Kanamycin bei Zugabe von Nalidixinsäure zum Medium auf weit über 1000 µg/ml an. Außerdem wurde auch das Wachstum der *E.coli* nur verlangsamt, aber nicht vollständig verhindert.

In Anlehnung an eine Arbeitsvorschrift von S. LORY (persönl. Mitteilung) wurde daher eine Selektion auf einem M9- Minimalmedium mit 25 µg/ml Gentamicin und 0,5% Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt. Das Wachstum der bei Konjugationsexperimenten erhaltenen Mutanten war unter diesen Inkubationsbedingungen allerdings relativ langsam. Bei einer Temperatur von 37° C dauerte es 48 h - 60 h , bevor die Kolonien so weit gewachsen waren, daß sie überimpft werden konnten. Das Wachstum von *E.coli* konnte mit dieser Selektion weitgehend unterdrückt werden, Kolonien von *P.aeruginosa* TB ohne Transposoninsertion traten nicht auf.

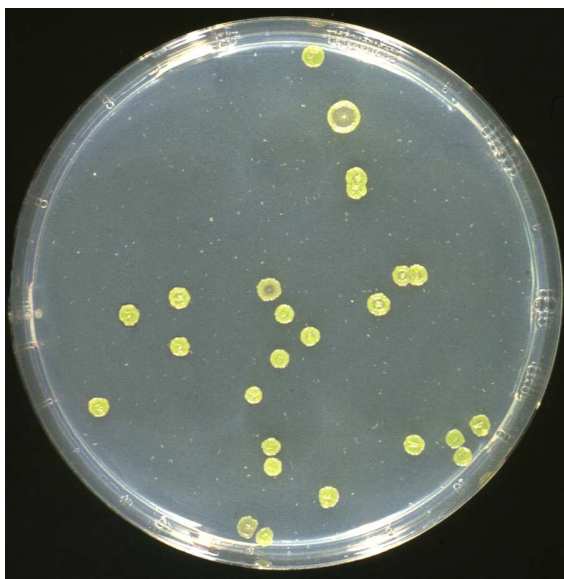


Abb. 3.3. M9- Agar mit 0,2% Glycerol und 25 µg/ml Gentamicin zur Selektion von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten. Dieses Selektionsmedium erlaubt eine eindeutige Diskriminierung der Transposonmutanten (große Kolonien) von *E.coli*- Donoren (als kleine weiße Punkte auf dem Bild zu sehen).

Eine Kontrolle zufällig ausgewählter Isolate bestätigte, daß alle asservierten Kolonien *P.aeruginosa* - Transposonmutanten waren. Allerdings waren in vielen Isolate (mehr als 30%) weiterhin pUT Gm- Donorplasmide nachweisbar. Die Ursache hierfür lag in einer Kontamination der asservierten Transposonmutanten durch *E.coli*-Donoren. Die Inkubation auf einem Medium ohne geeignete Kohlenstoffquelle unterband zwar das Wachstum der *E.coli*, verhinderte aber nicht ihr Überleben, so daß einzelne *E.coli* beim Überimpfen der *P.aeruginosa* - Transposonmutanten mit in das LB- Medium überführt wurden, wo sie ideale Wachstumsbedingungen vorfanden.

Es war daher ein Verfahren zur Abtrennung der *E.coli* von den *P.aeruginosa*- Transposonmutanten notwendig. Ein fraktioniertes Ausstreichen und Transfer einer *P.aeruginosa* Einzelkolonie wäre prinzipiell möglich gewesen, war aber in der Praxis für mehrere tausend Transposonmutanten zu aufwendig. Für die Separation im großen Maßstab wurde die Fähigkeit von *P.aeruginosa* zum Überleben langer Perioden mit begrenztem Nährstoffangebot ausgenutzt. Hierzu wurden die *P.aeruginosa*-Transposonmutanten als Strichkulturen auf M9- Agar (25µg/ml Gentamicin, 0,5% Glycerol) überimpft, 36 h bei 37° C inkubiert und für 8 Wochen bei 4° C gelagert. Dieser Zeitraum ohne geeignete Kohlenstoffquelle wurde von keinen *E.coli* überlebt, bei den *P.aeruginosa* - Transposonmutanten gab es nur sehr vereinzelt Ausfälle (ca. 1-2 %). Zur Überprüfung wurden aus so behandelten *P.aeruginosa* - Transposonmutanten DNA präpariert und auf *E.coli* - Kontamination in einer Southern- Hybridisierung untersucht:

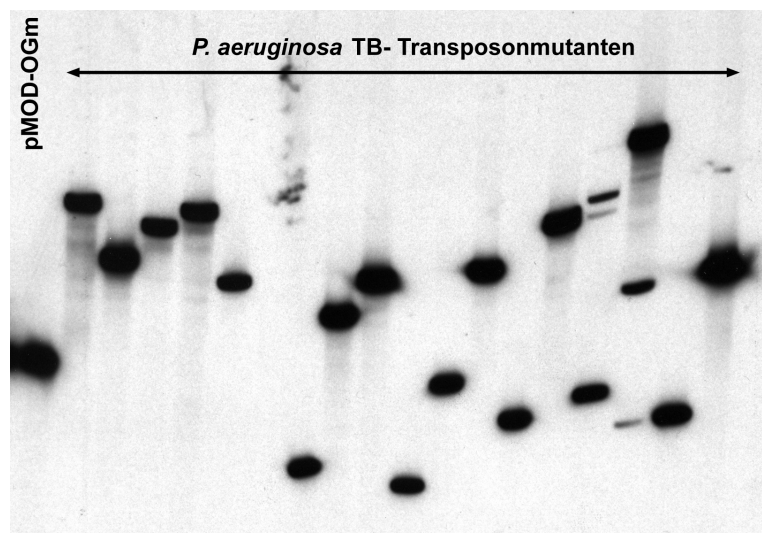


Abb. 3.4. Southern- Hybridisierung von *PstI*- verdauten genomischen DNA- Fragmenten der *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten mit einer Sonde gegen das Gentamicin des Transposons. In der linken Spur ist zusätzlich das ebenfalls mit *PstI* verdaute Plasmid pTnMod-OGm aufge-

tragen. Wie es bei einer statistischen Insertion des mini- Transposons zu erwarten war, wurde bei jedem Transposonmutanten ein anderes DNA-Fragment markiert. In zwei Spuren sind mehrfache Banden zu sehen. Die Fragmentgrößen stimmen aber nicht mit denen des episomalen Plasmids überein. Es handelt sich hierbei vielmehr um partiell verdaute genomische DNA des jeweiligen *P.aeruginosa* - Transposonmutanten.

Bei keinem untersuchten *P.aeruginosa*- Transposonmutanten war nach einer Lagerung von 8 Wochen eine *E.coli*- Kontamination (d.h. freies Plasmid) nachweisbar.

3.1.3.4. Vergleich der Vektoren

Zur Konjugation von *P.aeruginosa* TB konnten prinzipiell zwei Vektoren verwendet werden, die jeweils Vor- und Nachteile für die weitere Arbeit hatten:

pUT-Gm :

Vorteile:

- biparentale Konjugation, dadurch sehr hohe Effizienz

Nachteile:

- *E.coli* CC118 λ pir kann zur Lagerung von pUT-Gm verwendet werden, nicht aber zur Konjugation - die entsprechenden Gene fehlen. In *E.coli* S17-1 λ pir kann das Plasmid konjugiert werden, aber eine Lagerung ist unmöglich, da es in diesem Bakterium umgebaut wird. Das Donor- Plasmid muß daher kurz vor der Konjugation in *E.coli* S17-1 λ pir transformiert werden (HENSEL & HOLDEN 1995).
- Das Restplasmid bleibt im Akzeptorstamm theoretisch replizierbar. Eine Inkompatibilität des Replikationsursprungs bedeutet nicht, daß keine Replikation statt findet, sondern nur, daß sie sehr viel seltener initiiert wird als die chromosomale Replikation des Bakteriums in seiner logarithmischen Wachstumsphase. Bei hohem Antibiotikadruck oder Wachstum auf einem Minimalmedium ist die Replikation des Chromosoms aber verlangsamt. Es ist daher (zumindest theoretisch) möglich, daß einige der asservierten Mutanten ein episomales Donorplasmid tragen. Dies kann zu weiteren Transpositionseignissen innerhalb dieser Population führen.

- pUT-Gm kann ausschließlich in *E.coli* mit einem inserierten λ pir- Phagen stabil exprimiert werden. Gleichzeitig konnte in diesen Bakterienstämmen nur eine geringe Transformationseffizienz (max. $10^4 - 10^5$ cfu / μ g DNA) erreicht werden. Dies erschwerte die molekularbiologischen Arbeiten.

pTnMod-OGm :

Vorteile:

- pTnMod-OGm kann in *E.coli* DH5 α gelagert und direkt zur Konjugation eingesetzt werden.
- Bei der Transposition springt der Replikationsursprung des Plasmids zusammen mit dem Transposon. Dadurch ist keine weitere Replikation des Plasmids und damit auch der Transposase mehr möglich. Die erzeugte Insertion ist stabil.

Zusätzlich ist die Sequenzumgebung des Transposons später wieder in *E.coli* mobilisierbar (s. Plasmid- Rescue, Kap. 2.2.9.3.).

- Das Plasmid pTnMod-OGm ist kleiner als pUT-Gm und in den meisten *E.coli* stabil exprimierbar. Dies vereinfacht die Handhabung dieses Vektors bei molekularbiologischen Arbeiten.

Nachteile:

- Für pTnMod-OGm ist eine triparentale Konjugation notwendig. Nach den theoretischen Überlegungen aus Kap. 3.1.3.2. (Mischungsverhältnis) sollte bei einer triparentalen Konjugation die Effizienz niedriger liegen als bei einer biparentalen, da selbst in Idealfall nur 50% der Bakterien, die dem Akzeptor benachbart liegen, das Donor- Plasmid tragen.

Tatsächlich wurden mit pTnMod-OGm bei Konjugationsexperimenten nur ca. 60% der mit pUT Gm erreichten Ausbeute an Transposonmutanten erzielt.

Die Abwägung dieser Vor- und Nachteile führte zu dem Schluß, die Bibliothek von Transposonmutanten mit dem Vektor pTnMod-OGm zu erzeugen. Dem bei Verwendung von pTnMod-OGm auftretenden Nachteil der etwas geringeren Ausbeute bei Konjugationsexperimenten standen die kompliziertere Vorbereitung zur Konjugation und die schwierigere Handhabung bei molekularbiologischen Arbeiten bei pUT-Gm

gegenüber. Auch wenn alle vorbereitenden Experimente mit pUT-Gm durchgeführt wurden, wurde daher für alle folgenden Experimente nur pTnMod-OGm eingesetzt.

3.1.3.5. Transposonmutagenese anderer *Pseudomonas*- Stämme

Das optimierte Verfahren zur Transposonmutagenese wurde auch mit anderen *Pseudomonas*- Isolaten getestet, um herauszufinden, ob die gewählten Parameter nur bei *P.aeruginosa* TB funktionieren oder die gewählten Bedingungen auch bei anderen Stämmen zu hohen Ausbeuten führen. Hierzu wurden mit jedem möglichen Akzeptor je 10 triparentale Konjugationen (s.o.) durchgeführt und die Anzahl der erfolgreichen Experimente gezählt:

Akzeptor d. Konjugation	Herkunft	Experimente mit pos. Ergebnis (max.10)
<i>P.aeruginosa</i> TB	Klinikisolat MHH	9
<i>P.aeruginosa</i> 892	Klinikisolat MHH Klonale Variante v. <i>P.aeruginosa</i> TB	7
<i>P.aeruginosa</i> PAO	<i>P.aeruginosa</i> - Referenzstamm	7
<i>P.aeruginosa</i> 762	Klinikisolat Uni Tübingen	8
<i>P.putida</i> KT2440 (Vorinkubation 30°C)	<i>P.putida</i> - Referenzstamm	10

Tabelle 3.4. Effizienz des optimierten Verfahrens zur Transposonmutagenese bei verschiedenen *Pseudomonas*- Isolaten. Die Konjugation erfolgte in einem triparentalen Ansatz mit pTnMod-OGm als Donor- Plasmid.

In diesem Zusammenhang ist die Angabe von Koloniezahlen nicht sinnvoll, da verschiedene Stämme unter den vorliegenden Konjugationsbedingungen unterschiedliche Generationszeiten haben können. Die Koloniezahlen lassen daher nur bedingt auf die Zahl der Konjugationsereignisse pro Experiment schließen, da jeder entstandene Mutant abhängig vom Zeitpunkt seiner Entstehung und der jeweiligen Genera-

tionszeit des Bakteriums eine unterschiedliche Anzahl an Nachkommen aufweist. Damit dieser Faktor nicht verfälschend wirkt, wurde nur die Zahl der positiv verlaufenen Konjugationsexperimente gezählt, nicht aber die jeweiligen Koloniezahlen.

Das erarbeitete Konjugationsprotokoll scheint sich nach den vorliegenden Ergebnissen sehr gut für die Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* und verwandten Taxospezies zu eignen, solange die betreffenden Bakterien Gentamicin- sensibel sind.

3.2. Konstruktion der pTnMod-OGm- Donorplasmide

3.2.1. Konstruktion der Signalsequenz

In Anlehnung an die von M. Hensel für STM in *Salmonella typhimurium* entwickelte Signalsequenz (HENSEL ET AL. 1995) wurde eine für den Gebrauch in *P.aeruginosa* optimierte Sequenz entwickelt.

CTGGGTACCCCACTAGTCCAAGCTTV₄₀AAGCTTGGGTGAGTGGAGGTACCGTG

KpnI

SpeI

HindIII

HindII

KpnI

V= A,G,C

Diese Sequenz weist unter Beibehaltung der Schlüsselspezifikationen der ursprünglichen Signalsequenz einige Verbesserungen und Anpassungen auf:

- Beibehalten wurden die verwendeten Restriktionsschnittstellen zur Klonierung (*KpnI*) und Sondenherstellung (*HindIII*).
- Ebenfalls beibehalten wurde die asymmetrische Verteilung von G und C in den flankierenden Bereichen der Signalsequenz. Dies ermöglicht zusätzlich die Verwendung von radioaktivem dCTP zur Markierung des zentralen, variablen Sequenzteils. Die flankierenden Bereiche werden aufgrund der Asymmetrie nur sehr schwach markiert.
- Der GC- Gehalt der Sequenz wurde auf einen Wert angehoben, der dem des *P.aeruginosa*- Genoms entspricht. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit verringern, daß die Sequenz als fremd erkannt und aus dem Genom herausgeschnitten wird (GOLDBERG ET AL. 1990).

- Die ursprüngliche variable Markierungssequenz hatte die Basenfolge (NK)₂₀. Hierdurch wurde die zufällige Entstehung der Erkennungssequenzen einiger weniger Restriktionsenzyme verhindert. Die Verwendung der Sequenz V₄₀ vermeidet die Erkennungssequenzen aller Restriktionsenzyme, die ein A / T in dem von ihnen erkannten Palindrom haben. Zusätzlich wurde der GC- Gehalt auf 67% angehoben, was dem des *P.aeruginosa* Genoms nahe kommt. Außerdem wurde die Variabilität der Markierungssequenz durch diese Modifikation um den Faktor 10 angehoben.
- Die Einfügung einer *SpeI*- Schnittstelle ermöglicht die Überprüfung der Plasmide bei der Ligation der Signalsequenzen in den Vektor pTnMod-OGm. So sind z.B. Mehrfachinsertionen der Signalsequenz einfach diagnostizierbar.

3.2.2. Ligation der Signalsequenz in pTnMod-OGm

Die Signalsequenz wurde chemisch synthetisiert (MWG Biotech) und mit PCR in Doppelstränge überführt und amplifiziert (Kap. 2.7.3., Methode a.).

Zur Ligation (Kap. 2.2.9.2.) mußte die Signalsequenz mit *KpnI* verdaut werden. Aus den in Kap. 2.2.8. dargelegten Gründen mußte die amplifizierte Signalsequenz dabei mit 56 U /µg DNA verdaut werden:

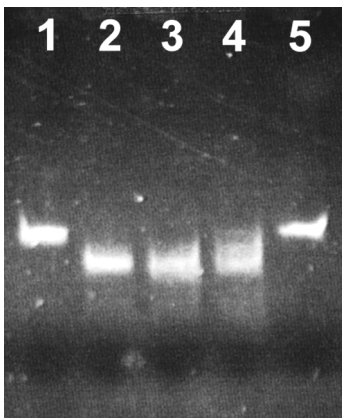


Abb. 3.5.

Verdau von je 1 µg Signalsequenz mit unterschiedlichen Mengen *KpnI* (16 h):

- 1: unverdaute Signalsequenz
- 2: 60 U *KpnI*: vollständiger Verdau
- 3: 40 U *KpnI*: Partialverdau
- 4: 20 U *KpnI*: Partialverdau
- 5: unverdaute Signalsequenz

Die so vorbereitete Signalsequenz wurde dann in den mit *KpnI* linearisierten und dephosphorylierten Vektor pTnMod-OGm ligiert.

Hierbei wurden Signalsequenz und pTnMod-OGm zuerst im äquimolaren Verhältnis eingesetzt. Auch bei Variation der DNA- Gesamtkonzentration (50 ng - 2 µg) wurden in keiner nach Herstellerangaben durchgeführten Ligation korrekt ligierte Plasmide nach der Transformation in *E.coli* gefunden. Erst ein mindestens 50-facher Überschuß an Signalsequenz führte zu den gewünschten Ligationsprodukten. Insgesamt wurden aus 20 Ligationen 328 Plasmide isoliert.

Unter den genannten Ligationsbedingungen war damit zu rechnen, daß häufig mehrere Signalsequenzen in ein Plasmid ligiert wurden, oder der Vektor selber in *E.coli* nach der Transformation verändert wurde. Zur Kontrolle der Vektorgröße wurden daher alle 328 Plasmide präpariert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Vektoren mit falscher Größe wurden aussortiert. Insgesamt 59 veränderte Vektoren wurden so aussortiert. Die übrigen (269) Plasmide wurden mit Hilfe der PCR (Kap. 2.7.3., Methode b.) auf mehrfach inserierte Signalsequenzen überprüft.

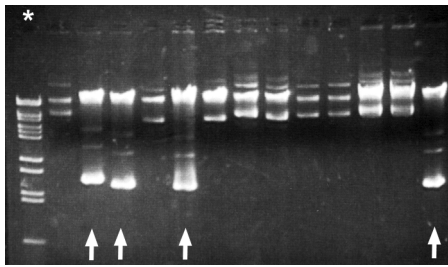


Abb. 3.6.

Überprüfung der Ligation des Vektors pTnMod-OGm mit der Signalsequenz (1% Agarosegel).

Pfeile : Fehlerhafte Ligationsprodukte

* : Standard λ -BstEII Verdau

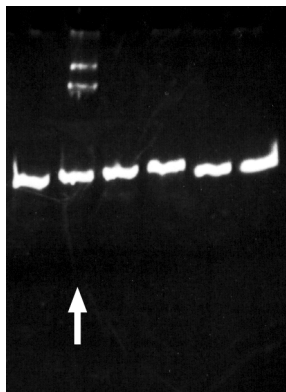


Abb. 3.7.

Kontrolle der Signalsequenz nach der Ligation in den Vektor pTnMod-OGm. Die Signalsequenzen wurde mit einer PCR amplifiziert und die entstehenden Produkte in einem 10% PAA- Gel elektrophoretisch aufgetrennt. In der mit einem Pfeil markierten Spur waren multiple Sequenzen in das Plasmid ligiert worden. Daher waren zusätzlich zum 80 Bp- Produkt (das intensive Signal in allen Spuren) weitere höhermolekulare Produkte zu sehen.

Insgesamt wurden 224 pTnMod-OGm mit korrekt inserierten Signalsequenzen identifiziert.

3.2.3. Test der pTnMod-OGm -SigTag

Ein Problem der Detektion von STM- Mutanten bestand darin, daß Sonden einer Signalsequenz eventuell durch ähnliche Basenfolgen auch auf andere Signalsequenzen hybridisieren können. (Dieses Verhalten wird im weiteren als „Kreuzhybridisierung“ bezeichnet.) Ein weiteres Problem ergab sich daraus, daß bei der späteren Anwendung des STM- Verfahrens die Detektion aller Signalsequenzen auf einem gemeinsamen Dot- Blot und daher bei der gleichen Hybridisierungstemperatur geschieht. Da diese aber Zufallssequenzen waren, deren GC- Gehalt teilweise recht stark vom Durchschnittswert abweichen konnte, waren bei Wahl einer beliebigen Hybridisierungstemperatur auch unterschiedliche Signalstärken der einzelnen Sequenzen zu erwarten. Dieser Effekt wird noch dadurch verstärkt, daß einzelne Signalsequenzen bei der gemeinsamen Amplifikation mit anderen Sequenzen eventuell aufgrund ihrer Basenzusammensetzung in späteren PCR- Zyklen benachteiligt sein können oder Sekundärstrukturen ausbilden. Auch in diesen Fällen wäre mit einer geringeren Signalstärke bei der Hybridisierung zu rechnen.

Zur Vermeidung dieser Probleme wurden alle Signalsequenzen auf Signalstärke und „Kreuzhybridisierungen“ getestet.

3.2.3.1. Grundlagen

Wollte man jede der 200 Signalsequenzen einzeln auf Signalstärke und „Kreuzhybridisierungen“ überprüfen, so wären dafür 200 Hybridisierungen notwendig.

Ordnet man dagegen die Signalsequenzen in einer zweidimensionalen Matrix an, so ist jede Sequenz in ihrer Position durch die x- und y- Koordinate (Reihe und Spalte) definiert. Stellt man nun die Sonden aus den Signalsequenzen jeweils einer Reihe oder Spalte her, so sind erheblich weniger Hybridisierungen notwendig, um alle Signalsequenzen auf Signalstärke und „Kreuzhybridisierungen“ zu testen. Für 196 Sequenzen (14 x 14) reichen 28 Hybridisierungen (14 + 14) aus. Alle folgenden Positionsangaben sind in dem Koordinatenschema angegeben:

zweidimensional (x | y), dreidimensional (x | y | z)

Zweidimensionales Schema:

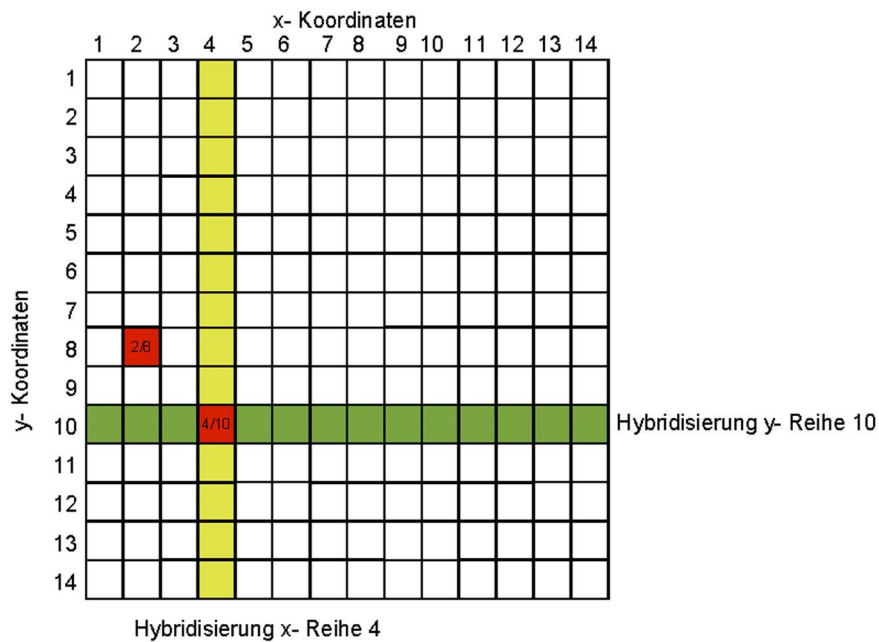


Abb. 3.8. Anordnung von 196 Klonen in einer zweidimensionalen Matrix zur Untersuchung auf Kreuzhybridisierungen (s. Beispiel).

Beispiel für Kreuzhybridisierung:

Die Sequenzen (2 | 8) und (4 | 10) seien identisch.

Bei der Hybridisierung der Sonden aus der x -Reihe 2 und der y- Spalte 8 wird ein zusätzliches Signal an der Position (4 | 10) zu sehen sein. Somit ist durch Angabe beider Koordinaten (2 und 8) die Herkunft des Signals an Position (4 | 10) geklärt. Umgekehrt wird bei Hybridisierung der Sonden aus der x- Reihe 4 und der y- Spalte 10 ein zusätzliches Signal an der Position (2 | 8) zu sehen sein. Dies kann dann als zusätzliche interne Kontrolle dienen.

Von Signalsequenzen mit identifizierten „Kreuzhybridisierungen“ kann jeweils eine zur Erzeugung von Transposonmutanten verwendet werden.

Werden die zu untersuchenden Signalsequenzen in einer dreidimensionalen Matrix (xlylz) angeordnet, so sind noch weniger Experimente nötig, um sämtliche „Kreuzhybridisierungen“ zu erfassen. Es werden dabei jeweils die Sequenzen einer Ebene zusammengefaßt und auf alle Signalsequenzen hybridisiert.

Die Detektion von Kreuzhybridisierungen verläuft im Prinzip wie in einer zweidimensionalen Anordnung, nur sind jetzt drei übereinstimmende Signale zur Bestimmung der Herkunft des Signals nötig. (Für Beispiele s. Kap. 3.2.3.2.)

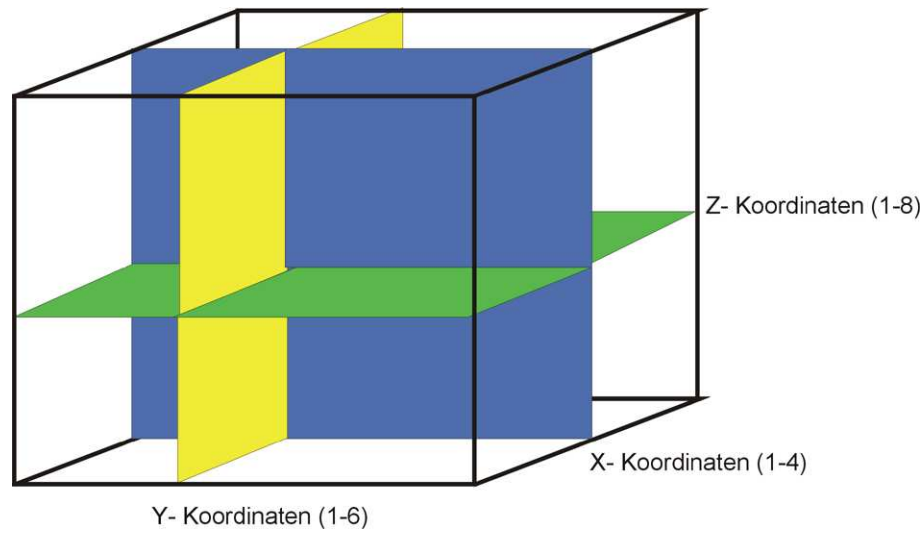


Abb. 3.9. Anordnung von 192 Klonen in einer dreidimensionalen Matrix zur Untersuchung auf Kreuzhybridisierungen

Zur Untersuchung der Signalsequenzen wurde im vorliegenden Fall eine dreidimensionale Matrix mit 192 Plätzen (4 x 6 x 8) verwendet. Dies entspricht 18 Hybridisierungen (4+6+8) zur Bestimmung aller Signalstärken und „Kreuzhybridisierungen“.

3.2.3.2. Detektionsverfahren

Zur Markierung der Sonden wurde eine 3'-Endmarkierung verwendet, bei der ein DNA-Einzelstrang von einer Terminalen Transferase matrixunabhängig mit einem DIG-ddUTP verlängert wurde. Die Markierung der Signalsequenz mit DIG-dUTP im Zuge der PCR war nicht möglich, da zum einen die verwendete Polymerase dieses Nukleotid nur mit sehr geringer Effizienz akzeptiert und in das Oligonukleotid eingebaut hätte, zum anderen die verwendeten Restriktionsschnittstellen nach dem Einbau von DIG-dUTP nicht mehr erkannt worden wären. Zusätzlich wäre - aufgrund

der Konstruktion der Signalsequenz - jeweils nur ein Strang markiert worden, und diese würden sich untereinander je nach AT- Gehalt noch in der Stärke ihrer Markierung unterscheiden. Durch die Verwendung von DIG-ddUTP wurden beide DNA-Stränge unabhängig vom jeweiligen AT- Gehalt markiert. Allein die Häufigkeit eines Oligonukleotids bestimmt somit dessen Signalstärke.

3.2.3.3. Auswahl der Signalsequenzen

192 Signalsequenzen wurden in einer 4 x 6 x 8 Matrix angeordnet. Sonden wurden aus den Plasmiden der einzelnen Ebenen hergestellt (entsprechend Kap. 2.2.7.3. (PCR), 2.2.8. (Restriktionsverdau), 2.2.10.2. (Aufreinigung der Signalsequenz, 2. Methode), 2.2.10.4. (Markierung der Fragmente)). In 18 Hybridisierungen wurden alle Plasmide auf „Kreuzhybridisierungen“ und ihre jeweilige Signalstärke bei einer Hybridisierungstemperatur von 62° C untersucht. Zur leichteren Auswertung der Röntgenfilme wurde ein Maßstab für die einzelnen Signalstärken festgelegt:

- 0: kein Signal
- 1: sehr schwaches Signal (nur wenig dunkler als der Hintergrund)
- 2: gut sichtbares, aber schwaches Signal (hellgraue Färbung)
- 3: deutliches Signal (dunkelgraue Färbung)
- 4: kräftiges Signal (Schwärzung)
- 5: sehr kräftiges Signal (Schwärzung strahlt über die markierte Fläche hinaus)

Beispiele:

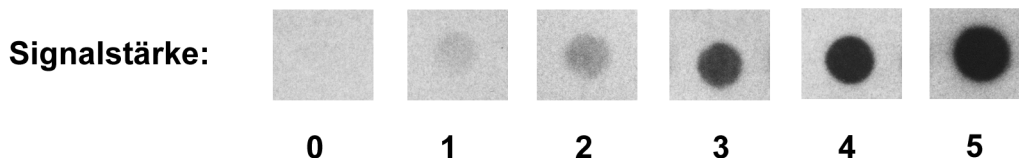


Abb. 3.10. Beispiele für die Normierung der Signalstärke zur Auswertung der Hybridisierungsergebnisse.

Signale der Stärken 3 - 5 wurden als spezifische Hybridisierungen gewertet, schwächere Signale dagegen als unspezifischer Hintergrund.

Die Hybridisierung einer Sonde (hier Ebene (4 I x I x)) lieferte folgendes Bild:

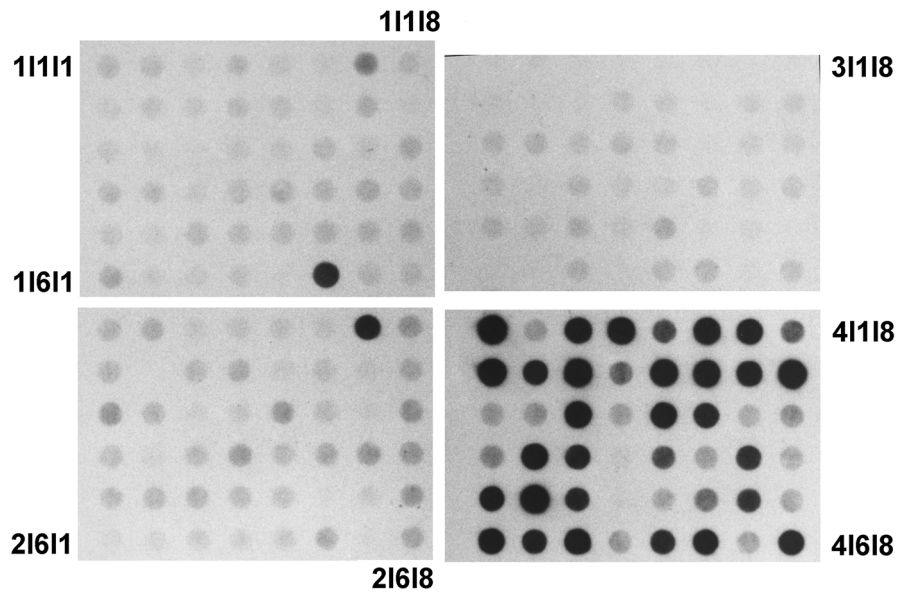


Abb. 3.11. Hybridisierung der Ebene (4 I x I x) auf Dot- Blots aller 192 Plasmide.

In diesem Beispiel sind einige „Kreuzhybridisierungen“ zu sehen. Weiterhin fällt auf, daß einige Sequenzen fast kein Signal geben, obwohl aus ihnen die Sonde zur Hybridisierung hergestellt worden ist.

Für alle 18 Hybridisierungen wurden die erhaltenen Werte in einer Tabelle zusammengefaßt. Die vollständige Tabelle ist im Anhang zu finden. Ein Ausschnitt daraus ist hier dargestellt (Tabelle 3.5.):

Ebene	Signalstärke																		Kreuzhyb. zu
	1--	2--	3--	4--	-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	--1	--2	--3	--4	--5	--6	--7	--8	
Plasmid																			Ø
411	1	2	5	5	5	1	1	1	1	1	5	2	2	4	2	5	div.		
412	1	1	1		1	1	2	1											-
413	2	1	1	4	4	1	1	2				5							4
414	1	1	1	5	4	1	1	1				1	4						4
415	1		1	2	3									4					3
416	1	1	2	5	4	1	1					1			4	4	1		4
417	1	1	1	4	4	1	1								4	4			4
418				2	2														-
421	1	1	1	5		3	1	1			4			1					4
422	2	1	1	4		4	1	2	1			5							4
423	1	2	1	5		4	2	2	1				5	2	1		2	1	5
424	1	1	1	2		1	1	2	1					2					-
425	3	1	1	5		1	4	2	2	1		5			1		2	1	-
																			421

Erklärung:

- In der linken Spalte steht die Positionsnummer des Plasmids.
- In den 18 Spalten mit den Signalstärken aus den jeweiligen Hybridisierungen sind jeweils die Felder dunkelgrau unterlegt, bei denen ein Signal auftreten sollte, weil das entsprechende Plasmid in der Sonde vertreten war. Hellgraue Felder weisen auf zusätzliche Hybridisierungen mit anderen Sonden hin. Ist eine Kreuzhybridisierung eindeutig nachweisbar, so ist sie in der Spalte „Kreuzhyb. zu“ ausgewiesen. War eine eindeutige Identifizierung nicht möglich, wurde das Kürzel „div.“ eingetragen.
- Plasmide mit schwarz unterlegten Positionsnummern wurden für den Aufbau der Transposonmutanten- Bibliothek übernommen. Grau unterlegte Nummern bedeuten eindeutige, aber schwächere Hybridisierungssignale. Die meisten dieser Plasmide wurden nicht zum Aufbau der Bibliothek übernommen.

Aus den so erhaltenen Werten war die Herkunft der meisten „Kreuzhybridisierungen“ bestimmbar. Auch die Plasmide, die unter der vorgegebenen Hybridisierungstemperatur keine oder nur schwache Signale lieferten, konnten aussortiert werden. Zur weiteren Verwendung wurden die Plasmide ausgewählt, die bei jeder für sie spezifischen Hybridisierung mindestens die Signalstärke 3 hatten und deren Signale bei den anderen (für sie unspezifischen) Hybridisierungen mindestens um 2 Intensitätsklassen kleiner waren. Insgesamt wurden aus den 192 untersuchten Plasmiden 66 Vektoren mit hoher Signalstärke erhalten, die keine „Kreuzhybridisierungen“ untereinander aufwiesen.

3.2.3.4. Kontrolle der ausgewählten Plasmide

Die 66 zur STM geeigneten Plasmide wurden vor Verwendung noch einmal überprüft. Hierzu wurden sie zusammen auf eine Membran gebunden und mit drei Sonden hybridisiert:

1. Sonde aus den Mutanten 1 - 36
2. Sonde aus den Mutanten 37 - 66
3. Sonde aus allen Mutanten 1 - 66

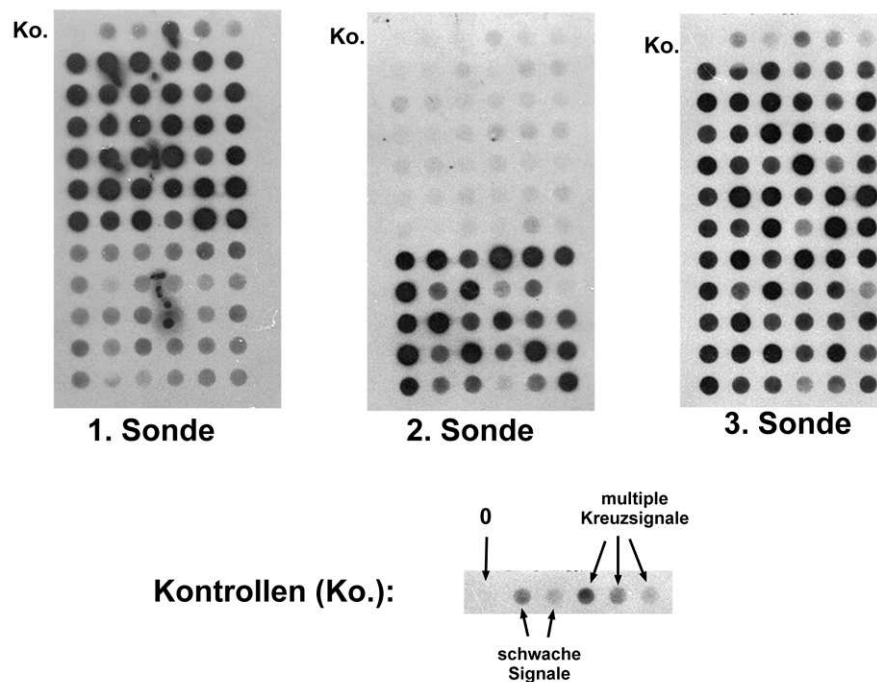


Abb. 3.12. Kontrollhybridisierung der ausgewählten pTnMod-OGm mit Signalsequenz. Als interne Kontrollen zur Bestimmung der jeweiligen Hybridisierungsstärken dienten Plasmide, die in der vorherigen Untersuchung (Kap. 3.2.3.3.) niemals ein Signal („0“), nur schwache Hintergrundsignale der Stärke 1-2 („schwache Signale“) oder in den meisten Hybridisierungen Kreuzsignale („multiple Kreuzsignale“) zeigten.

Die meisten der ausgewählten Sequenzen zeigten im Vergleich zu den unspezifischen Kontrollen eine hohe Intensität und Spezifität. Lediglich 3 Signale waren deutlich zu schwach und wurden aussortiert. Der Rest der Plasmide war zur Transposonmutagenese geeignet. „Kreuzhybridisierungen“ der ausgewählten Plasmide untereinander traten nicht mehr auf. Auch mit den Kontroll- Plasmiden, die im vorhergehenden Experiment bei fast jeder Hybridisierung ein Signal ergeben hatten, trat keine Kreuzhybridisierung auf. Dies bestätigte die geforderte Selektivität der Signalsequenzen. Allerdings nahm das Signal- Rausch Verhältnis mit Zunahme der in einer Sonde verwendeten Plasmide ab. Während bei Verwendung von 36 Plasmiden in einer Sonde noch sehr starke Unterschiede zwischen den spezifischen und den unspezifischen Hybridisierungen beobachtet wurden, war dies bei Verwendung von 66 Plasmiden in einer Sonde nicht mehr der Fall, so daß eine klare Unterscheidung nicht mehr gewährleistet war.

Eine solche Schwächung war zu erwarten, da im vorliegenden Ansatz zur Markierung jeder einzelnen Signalsequenz in der DNA- Mischung nur $1/66$ des im Reaktionsansatz eingesetzten DIG- ddUTP verwendet wurde. Aus diesem Grund wurde von HENSEL ET AL. (1995) zur radioaktiven Markierung ihrer aus 96 Signalsequenzen bestehenden Sonden- DNA eine Aktivitätsmenge eingesetzt, die zur unabhängigen Markierung von 100 Signalsequenzen (100 MBq) ausreichen würde. Eine Umstellung auf eine radioaktive Markierung wurde dennoch nicht erwogen, da es Veröffentlichungen von Arbeiten gibt (DARWIN & MILLER 1999), bei denen trotz radioaktiver Markierung die Anzahl der gleichzeitig untersuchten Transposonmutanten auf 48 (teilweise sogar 10!) reduziert werden mußte, weil das Signal- Rausch Verhältnis keine zufriedenstellende Größenordnung erreichte.

Um ein gutes Signal- Rausch Verhältnis bei den Selektionen der Transposonmutanten zu gewährleisten, wurden daher nicht alle Plasmide für die Konstruktion der Bibliothek vorgesehen. Nur die 48 Plasmide mit den stärksten Signalen wurden zur Transposonmutagenese in *P.aeruginosa* TB ausgewählt.

3.3. STM in *P.aeruginosa* TB

3.3.1. Durchführung

Die Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* TB mit den 48 signalsequenz tragenden Vektoren pTnMod-OGm (ST) wurde entsprechend den Ergebnissen der Optimierung (3.1.) nach dem in Kap. 2.2.4. beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Von entscheidender Bedeutung für die Qualität einer Bibliothek von Transposonmutanten ist es, möglichst keine Mutanten mit identischen Insertionen aus dem gleichen Konjugationsansatz in die aufzubauende Bibliothek zu überführen. Durch Untersuchung redundanter Mutanten wird ohne Erkenntnisgewinn der Aufwand an Zeit und Material vergrößert. Die Inkubationszeit zur Konjugation betrug 16 h. Es war anzunehmen, daß sich ein in dieser Zeit einmal erzeugter Transposonmutant bis zum Ablauf der Inkubation mehrmals teilen konnte. Es sollten daher von jedem Transpositionereignis mehrere Kolonien bei der Selektion zu finden sein.

Hält man die eingesetzte Anzahl der Bakterien, die Inkubationszeit sowie die Menge der zur Selektion ausgestrichenen Bakterien konstant, so sollte es möglich sein, einen Maximalwert für die aus einem Transpositionereignis hervorgegangenen

Kolonien auf der Selektionsplatte abzuschätzen. Aus den Southern- Hybridisierungen der Experimente zur Optimierung der Transposonmutagenese war eine grobe Abschätzung möglich, da hierbei oft mehrere Kolonien vom gleichen Selektionsansatz aufgearbeitet worden waren. Auf Selektionsplatten mit weniger als 8 cfu waren alle Mutanten identisch, bis zu ungefähr 15 - 20 cfu gab es 2 Arten von Mutanten. Bei höheren Zahlen war die Auswertung aufwendiger, es zeichnete sich aber ein ähnliches Muster ab. Es wurde daher folgende Annahme zur Auswertung der Transpositionereignisse aufgestellt:

< 10 cfu = 1 Transpositionereignis

< 20 cfu = 2 Transpositionereignisse

:

Mit dieser Annahme läßt sich nun für einzelne Selektionsplatten berechnen, wieviele Kolonien entnommen werden dürfen, ohne eine hohe Redundanz innerhalb der Bibliothek zu erzeugen.

Hierzu muß berechnet werden, wieviele Kolonien von einem Selektionsansatz gleichzeitig entnommen werden können. Die Wahrscheinlichkeit, nur ungleiche Mutanten entnommen zu haben, sollte dabei größer als 70% sein, damit in der aufgebauten Bibliothek von Transposonmutanten keine zu hohe Redundanz vorliegt.

Beispiel:

100 cfu auf der Selektionsplatte \Rightarrow ca. 10 verschiedene Transposonmutanten, d.h. 1/10 der Bakterien ist jeweils identisch, 9/10 unterscheiden sich.

Hieraus ergibt sich folgende Berechnung:

$$P = 0,9^{n-1}$$

P: Wahrscheinlichkeit, nur ungleiche Mutanten zu entnehmen

n: Anzahl der simultan entnommenen Mutanten

Nach dieser Berechnung sinkt die Wahrscheinlichkeit aus einer Gruppe von 100 cfu nur verschiedene Mutanten zu entnehmen unter 70%, wenn mehr als 4 Kolonien transferiert werden. Somit wurden 4 Kolonien als Maximalentnahme für 100 cfu

gewählt. Entsprechende Berechnungen wurden auch für andere Konjugationsausbeuten durchgeführt und folgende Grenzwerte festgelegt:

cfu _{Selektion}	entnommene Kolonien
< 20	1
20 - 50	2
51 - 80	3
81 - 120	4
121 - 170	5
171 - 230	6
> 230	7

Tabelle 3.6. Anzahl der von den Selektionsplatten transferierten Bakterien.

Die erhaltenen Transposonmutanten wurden auf folgende Weise in Mikrotiterplatten in sog. Selektionsebenen angeordnet:

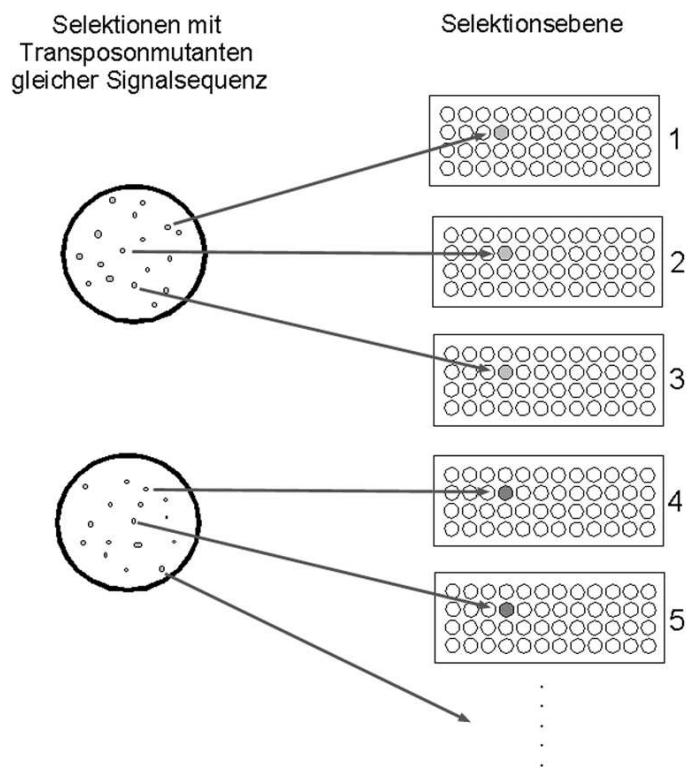


Abb. 3.13. Schema des Transfers der Transposonmutanten von den Agarplatten in die Selektionsebenen

Dies bedeutete, daß Mutanten, die in der gleichen Konjugation entstanden waren, an der gleichen Position in verschiedenen Selektionsebenen angeordnet wurden. Auf diese Weise war es möglich, eventuell doppelt transferierte Mutanten leichter zu erkennen. Ein Mutant z. B. an der Position D1 auf der Selektionsebene 2 kann eventuell mit einem Mutanten an der Position D1 der Ebene 3 identisch sein, aber niemals mit einem Mutanten der Ebene 14 oder der Position D2 auf Ebene 2.

Weiterhin wurden mit den pTnMod-OGm (ST) für die Positionen A1 und A2 keine Transposonmutanten von *P.aeruginosa* TB erzeugt. Diese Positionen wurden auf allen Platten für Kontrollen reserviert. Hierzu wurden je ein Transposonmutant aus folgenden Stämmen hergestellt:

A1: *P.aeruginosa* 892

A2: *P.aeruginosa* PAO

Während der Herstellung der *P.aeruginosa*- Transposonmutanten zeigte sich, daß einige pTnMod-OGm (ST) in der Transposonmutagenese reproduzierbar eine um bis zu 90% geringere Effektivität aufwiesen als das Ausgangsplasmid. Die Ursache dafür mag darin liegen, daß die Signalsequenz in den äußeren flankierenden Bereich des Replikationsursprungs des pTnMod-OGm eingefügt wurde. Dies könnte die Replikation des Plasmides beeinflussen und so seine Kopienzahl in dem Donor-Bakterium senken, was zu selteneren Konjugationsereignissen führen kann.

Insgesamt wurden ca. 3800 *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten in 720 Konjugationen erzeugt. Davon wurden 2300 Mutanten in 96- well Platten so geordnet, daß jeweils 46 Mutanten (+2 Kontrollen) mit unterschiedlichen Signalsequenzen zusammen eine Selektionsebene bilden. Aufgrund der schlechten Effizienz einiger Plasmide konnten darüber hinaus keine weiteren Ebenen vollständig zusammengestellt werden. Die überzähligen Mutanten wurden ebenfalls bei -70° C, aber separat von den zusammengestellten Selektionsebenen gelagert.

3.3.2. Nachweis der statistischen Insertion

Der Nachweis der statistischen Insertion und des Fehlens von *E.coli* - Kontaminationen erfolgte mit Hilfe der Southern- Hybridisierung (Sonde: Gentamicinkassette) auf die mit *Xho*I verdaute DNA verschiedener Transposonmutanten.

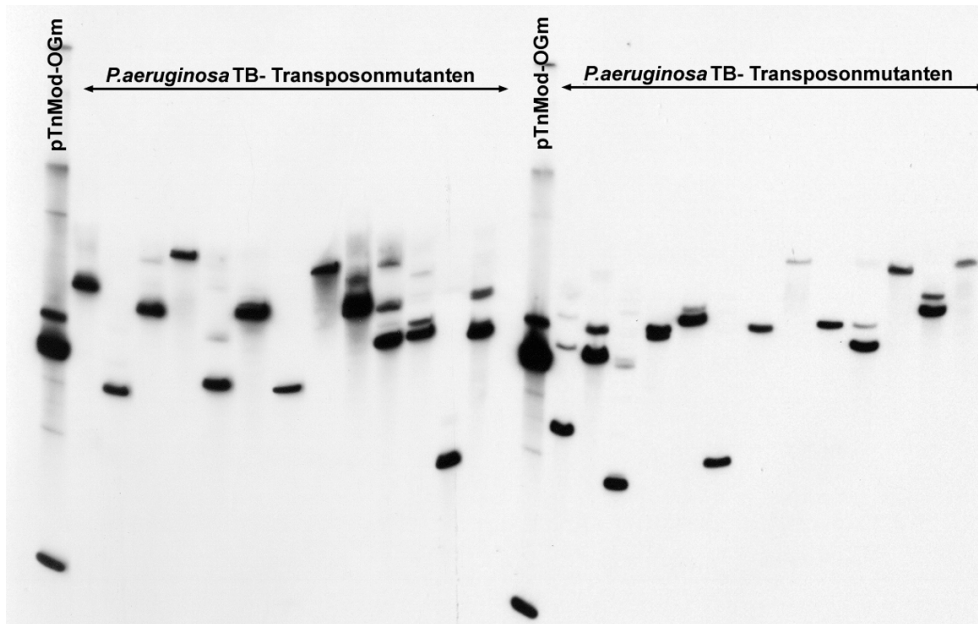


Abb. 3.14. Southern- Hybridisierung genomischer *PstI*- Verdauung zufällig ausgewählter *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten mit einer Sonde gegen das Gentamicin- Gen. Zwei Spuren mit *PstI*- verdautem pTnMod-OGm dienen als Standard.

Zum Nachweis, daß diese Insertionen nicht an einer Stelle des Genoms gehäuft auftreten, wurde zusätzlich die DNA verschiedener Transposonmutanten einer Makrorestriktionsanalyse unterzogen.

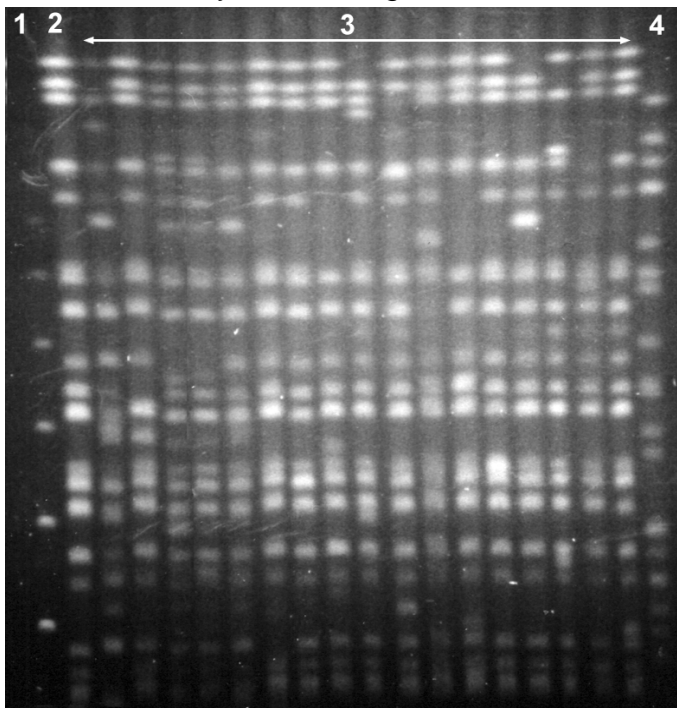


Abb.3.15. Makrorestriktionsanalyse einiger *P.aeruginosa* TB-Transposonmutanten.
 1: λ - DNA- Multimere (Standard)
 2: *P.aeruginosa* TB- Wildtyp (*SpeI*- Verdauung)
 3: *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten (*SpeI*- Verdauung)
 4: *P.aeruginosa* PAO (*SpeI*- Verdauung)

Auf beiden Bildern ist zu erkennen, daß die Transposoninsertionen statistisch erfolgrte. Ebenfalls war auch keine *E.coli*- Kontaminationen mehr nachweisbar.

3.3.3. Amplifikation der Signalsequenz

Die Signalsequenzen zur Identifikation der einzelnen Transposonmutanten sind nur dann sinnvoll, wenn sie nicht nur auf den Donor- Plasmiden, sondern auch aus der genomischen *P.aeruginosa* - DNA amplifiziert werden können. Hierbei ergaben sich unerwartete Schwierigkeiten. Diese beruhten darauf, daß die Primer der Signalsequenzen durch die Schnittstellenpalindrome eine sehr hohe Komplementarität aufweisen. Es mußten Bedingungen gefunden werden, unter denen die Signalsequenz amplifiziert werden, die Primer aber keine Multimere bilden. Unglücklicherweise sind die von den Primern gebildeten Multimere fast genauso groß wie das erwartete PCR- Produkt (Kap. 3.2.1.). Die Nebenreaktion der Primer kann nur durch das Auftreten einer zusätzlichen Nebenbande sicher erkannt werden.

Es wurden fast 200 verschiedene PCR- Bedingungen getestet. Nur in einer einzigen funktionierte die Amplifikation reproduzierbar korrekt. Diese Bedingungen sind in Kap. 2.2.7.3. Methode c. dargestellt. Vor allem die Menge der eingesetzten DNA war hierbei ein kritischer Parameter. Bereits eine Abweichung um den Faktor 4 führte zu einem Versagen der PCR. Zusätzlich konnte es auch unter diesen Bedingungen in den Nullproben zur Bildung von Primer- Multimeren kommen. Bei Zusatz von *P.aeruginosa*- DNA (ohne Transposoninsertion) oder der des Plasmids pTnMod-OGm (ohne Signalsequenz) wurde diese Nebenreaktion unterdrückt. Die Fremd- DNA bot den Primern eine große Zahl an Bindungsplätzen an, wobei die entstehenden Produkte nicht weiter amplifizierbar waren. Somit gab es durch den DNA- Zusatz eine begünstigte Konkurrenzreaktion zur Multimerbildung der Primer.

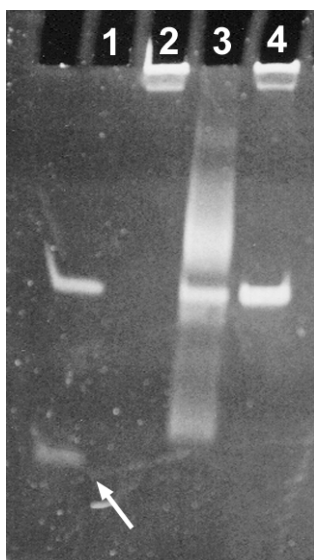


Abb. 3. 16.

Unterdrückung von Primermultimeren:

- 1: PCR ohne DNA- Zusatz. Bildung von Primermultimeren. Der Pfeil weist auf die charakteristische Nebenbande hin.
- 2: PCR mit 10 ng DNA von *P.aeruginosa* TB - Wildtyp. Keine Multimerbildung.
- 3: Amplifikation der Signalsequenz von pTnMod-OGm (ST)- Donorplasmid. Diese PCR wurde zur nach dem Protokoll für genomisch inserierte Signalsequenzen gefahren. Der Hintergrund entstand durch die etwas zu tiefe Hybridisierungstemperatur der Primer in diesem Programm.
- 4: PCR mit 10 ng DNA eines *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten. Auch hier ist keine Multimerbildung zu sehen.

3.4. Selektion I: Untersuchung der *P.aeruginosa* TB-Transposonmutanten auf ihre Überlebensfähigkeit in Granulozyten

Der Stamm *P.aeruginosa* TB zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, intrazellulär in Granulozyten überleben und sich sogar vermehren zu können. Zur Suche nach den für diesen Phänotyp notwendigen Genen bietet sich STM besonders an. Im Gegensatz zu „normalen“ Transposonmutanten können hier 48 Mutanten gleichzeitig in einem Experiment untersucht werden, was die Menge der notwendigen Granulozyten verringert. Weiterhin sind die meisten in einem Experiment zu untersuchenden Mutanten in Bezug auf ihre intrazelluläre Überlebensfähigkeit nicht eingeschränkt, so daß stets ein Überschuß von „Quasi- Wildtyp“ *P.aeruginosa* TB in jedem Selektionsexperiment vorliegt. Dadurch ist der Selektionsdruck auf das einzelne Bakterium konstant und die erhaltenen Ergebnisse sind besser vergleichbar.

Die Selektion in Granulozyten wurde entsprechend der Arbeitsvorschrift in Kap.2.4. durchgeführt. Jeweils 46 *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten wurden zusammen mit je einem Transposonmutanten *P.aeruginosa* 892 (Position A1) und *P.aeruginosa* PAO (Position A2) in einem Selektionsexperiment eingesetzt. Sowohl die Selektion als auch die jeweilige Kontrolle wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Bakterien wurden vor Versuchsbeginn über Nacht in LB inkubiert. Es war von hoher Bedeutung, die *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten in ihrer stationären Phase mit den Granulozyten zu inkubieren. *P.aeruginosa* produziert vor allem während der logarithmischen Wachstumsphase eine hohe Anzahl von zytotoxischen Faktoren, welche die Granulozyten nach der Phagozytose schädigen würden. In der stationären Phase dagegen ist die Produktion dieser Faktoren bei einigen *P.aeruginosa*- Stämmen stark reduziert (DACHEUX ET AL. 2000). In der vorliegenden Arbeit lag das Ziel der Untersuchung in den für das intrazelluläre Überleben notwendigen Genen. Werden die Granulozyten von den phagozytierten *P.aeruginosa* TB geschädigt, sinkt der Selektionsdruck auf die Bakterien, was die Identifizierung der zum Überleben essentiellen Gene erschwert. (Zur Untersuchung zusätzlicher Faktoren, durch die das Bakterium aktiv gegen den Granulozyten vorgehen kann, sind andere Anzuchtbedingungen notwendig.)

3.4.1. Auswertung der Selektion

Die Auswertung der Selektionsergebnisse erfolgte durch Bestimmung des Schwärzungsgrades des auf den hybridisierten Dot- Blot aufgelegten Röntgenfilms. Die entwickelten Filme wurden gescannt und die Schwärzungen der jeweiligen Dots mit dem Programm PC-BAS 2.09 bestimmt. Die Signalintensitäten wurden in Selektions- und Kontrollexperiment separat auf die Intensitäten der jeweiligen Kontrollstämme an den Positionen A1 und A2 normiert. Durch Bildung des Quotienten aus den normierten Signalintensitäten von Selektions- und Kontrollexperiment konnte ermittelt werden, wie jeder einzelne untersuchte *P.aeruginosa* TB- Transposonmutant die Selektion im Vergleich zu den Kontrollstämmen überlebt hat.

Die Kontrollstämme *P.aeruginosa* 892 und *P.aeruginosa* PAO wurden aufgrund ihrer intrazellulären Überlebensfähigkeit gewählt:

***P.aeruginosa* 892 (Position A1):**

Dieses Bakterium ist eine klonale Variante von *P.aeruginosa* TB und überlebt in den Granulozyten fast genauso gut. Eine intrazelluläre Vermehrung konnte aber nicht nachgewiesen werden. Transposonmutanten von *P.aeruginosa* TB, bei denen ein zum intrazellulären Überleben essentielles Gen ausgeschaltet wurde, sollten eine deutlich geringere Überlebensrate aufweisen als *P.aeruginosa* 892.

***P.aeruginosa* PAO (Position A2):**

Dieses Bakterium kann intrazellulär nicht überleben. Transposonmutanten von *P.aeruginosa* TB, bei denen ein für das intrazelluläre Überleben essentielle Gen ausgeschaltet wurde, sollten eine mit *P.aeruginosa* PAO vergleichbare Überlebensrate aufweisen.

Bei den ersten Experimenten zeigte sich, daß die Selektion prinzipiell funktioniert, die Unterschiede der individuellen Überlebensraten aber nur sehr gering waren. Es war schwierig zu unterscheiden, ob die gemessenen Abweichungen auf eine tatsächlich abweichende Überlebensfähigkeit oder nur auf eine zufällige Schwankung in einem der ersten PCR- Zyklen zurückzuführen war:

Beispiel Ebene 3 (normiert auf *P.aeruginosa* PAO (A2)):

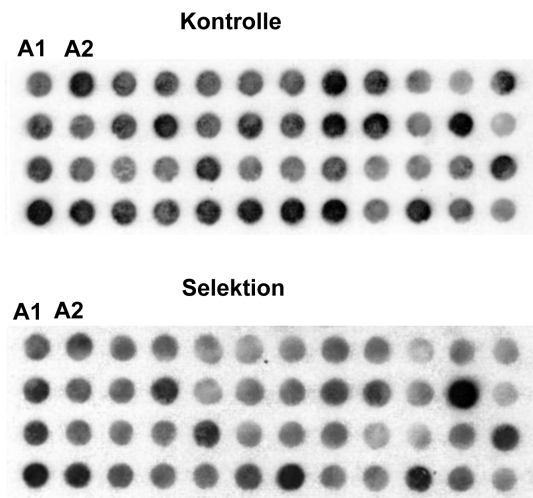


Abb. 3.17. Untersuchung auf intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten (von Nichtrauchern) der *P.aeruginosa* TB- Transpoonmutanten der Selektionsebene 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,2	1,0	1,06	0,8	0,64	0,53	0,7	0,77	0,93	0,54	1,7	0,58
B	1,58	1,55	1,03	1,42	0,52	0,83	0,92	1,16	1,38	1,33	3,23	1,16
C	1,44	1,30	1,31	1,20	1,31	0,84	0,91	0,91	0,77	0,54	1,12	1,55
D	0,64	1,81	1,60	1,04	0,98	0,88	1,20	0,62	1,38	0,86	1,05	1,2

Tabelle 3.7. Auswertung der Selektion von Selektionsebene 3 (Abb. 3.17)

Die Ursache hierfür lag darin, daß die Granulozyten zu Beginn des Experimentes die Bakterien effizient abtöteten. Auch wenn *P.aeruginosa* TB intrazellulär in Granulozyten eine höhere Überlebensrate hat, so war doch aus vorhergehenden Versuchen bekannt, daß initial mehr als 99% der Bakterien lysiert werden und nur eine sehr kleine Population überlebt, die dann versucht, sich den intrazellulären Bedingungen im Granulozyten anzupassen. (Ähnliche Effekte sind auch bei anderen intrazellulären Pathogenen, z.B. *Salmonella spec.* oder *Yersinia spec.*, bekannt.) Für das Selektionsexperiment war eine Inkubationszeit von zwei Stunden vorgesehen. Eine längere Inkubation war nicht möglich, da die gesamte Untersuchung auf intrazelluläre Überlebensfähigkeit innerhalb von 6-8 Stunden nach Entnahme der Granulozyten abgeschlossen sein mußte (die Granulozyten stellten sonst ihre Phagozytose ein (MIETHKE 1985)). Für die überlebenden intrazellulären Bakterien lag ein zentrales Probleme darin, daß die Granulozyten bei der Phagozytose nicht vorstimuliert waren, so daß die Umgebungsbedingungen in den Phagosomen nicht konstant

blieben, sondern sich in dem Maße veränderten, wie die Granulozyten nach der Bakterienaufnahme auf diesen neuen Reiz reagierten. Durch diese variablen Bedingungen wurde auf die phagozytierten Bakterien ein sehr hoher Streß ausgeübt, und nur sehr wenige überlebten die zweistündige Selektionsphase.

Es war daher zwingend notwendig, vorstimulierte Granulozyten zu verwenden, damit die intrazellulären Bedingungen für die aufgenommenen Bakterien konstant gehalten wurden. Außerdem mußten Granulozyten gewählt werden, die in ihrer Wirkung auf Bakterien etwas attenuiert sind, um so die Menge der intrazellulär überlebenden *P.aeruginosa*- Transposonmutanten zu vergrößern und so ein günstigeres Signal-Rausch- Verhältnis bei der Auswertung der jeweiligen Überlebensraten zu erhalten.

Hierzu boten sich Granulozyten von Rauchern an. Bei deren Verwendung wurde in den wiederholten Untersuchungen eine erheblich bessere Selektion erreicht. Um die Unterschiede in den Überlebensraten nochmals zu verstärken, wurden die Bakterien aus der ersten Selektion nach einer Inkubation auf LB-Agar (16h, 37° C) nochmals mit Granulozyten (eines Rauchers) inkubiert.

Beispiel Ebene 3 (normiert auf *P.aeruginosa* PAO (A2)), selektiert mit Granulozyten von Rauchern:

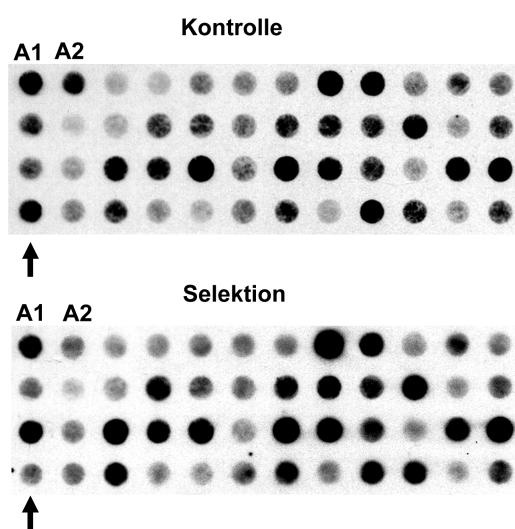


Abb. 3.18.

Untersuchung auf intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten (von Rauchern) der *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten der Selektionsebene 3. Der Pfeil weist auf einen Mutanten mit einer eingeschränkten Überlebensfähigkeit in Granulozyten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,3	1,0	5,6	5,7	5,2	4,0	6,9	2,0	4,1	3,4	6,1	4,3
B	3,8	4,8	6,1	8,3	4,4	4,7	5,7	5,1	5,0	3,7	3,5	4,7
C	10,3	6,2	5,1	3,4	2,6	2,9	3,2	3,1	4,3	4,8	5,8	4,4
D	0,8	3,7	5,2	4,5	3,8	4,9	6,3	5,6	4,3	5,8	3,6	4,5

Tabelle 3.8. Auswertung der Selektion von Selektionsebene 3 (Abb. 3.18)

Diese Unterschiede in den Überlebensraten waren nicht mehr nur durch zufällige Fluktuationen in den ersten PCR- Zyklen zu erklären. Die hier gemessenen Abweichungen waren hauptsächlich auf tatsächliche Unterschiede in den intrazellulären Überlebensfähigkeiten der einzelnen Mutanten zurückzuführen.

Zur weiteren Untersuchung wurden diejenigen Mutanten übernommen, die die deutlichsten Abweichungen vom Durchschnittswert der *P.aeruginosa* - Transposonmutanten im jeweiligen Experiment aufwiesen. Ein Mutant wurde weiter untersucht, wenn seine verdoppelte Überlebensrate noch so niedrig war, daß auch dieser Wert zu den kleinsten 10% der (in dieser Selektion gemessenen) Überlebensraten zählte. (Beispiel: Mutant D1 in der o.g. Selektion)

Diese Mutanten wurden von mehreren Selektionsebenen gesammelt und zusammen mit einigen unauffälligen *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten nochmals einer Selektion unterzogen. Nur diejenigen, deren Überlebensraten max. 20% des Durchschnittswertes der „normalen“ Transposonmutanten aufwiesen, wurden als im Überleben in Granulozyten schwer beeinträchtigt eingestuft und weiter untersucht.

Auf eine vergleichbare Art wurde auch nach Mutanten mit einer besseren Überlebensfähigkeit in Granulozyten gesucht. In beiden Selektionen mußten dazu die betreffenden Transposonmutanten Überlebensraten aufweisen, die deutlich höher als die aller anderen der jeweiligen Selektionsebene lagen und sich vom Durchschnittswert um mindestens das Dreifache unterscheiden.

3.4.2. Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit wurden 24 verschiedene Selektionsebenen (zu je 48 Mutanten) der Bibliothek von *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten auf ihre jeweilige Fähigkeit zum intrazellulären Überleben in Granulozyten untersucht. Hierbei wurden folgende Mutanten gefunden:

eingeschränkte Überlebensfähigkeit:

2D1	2D5	3D1	14C5	14C11	15A3	18A12
19C2	20A6	22D11	23B9	24A12	24C5	

bessere Überlebensfähigkeit:

14 B2	15B10
-------	-------

Der Name der Transposonmutanten bezieht sich auf ihre Position in der Bibliothek der *P.aeruginosa* TB - Mutanten. Eine Selektionsebene enthielt 48 Mutanten, die in vier Reihen (A-D) mit je 12 Positionen (1-12) eingeordnet waren. So bedeutet zum Beispiel 23B9, daß der entsprechende Transposonmutant in der Selektionsebene 23 in der Reihe B an der Position 9 eingeordnet ist.

In Kap. 3.6. sind einige Transposonmutanten mit einem Buchstaben in der ersten Position benannt, z.B. D9C10. Diese Nomenklatur bezieht sich auf die zusätzlichen Transposonmutanten, die nicht in Selektionsebenen zur STM- Transposonmutagenese eingeordnet sind (vgl. Kap. 3.3.1.). Im angeführten Beispiel steht D9 für die Mikrotiterplatte und C10 für die Position des Transposonmutanten in dieser Platte.

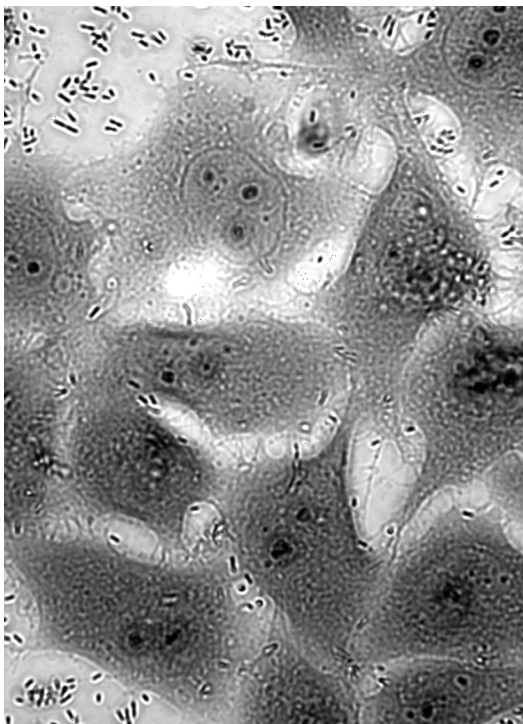
3.5. Untersuchungen an ausgewählten *P.aeruginosa*-Stämmen

3.5.1. Invasivität in Epithelzellen

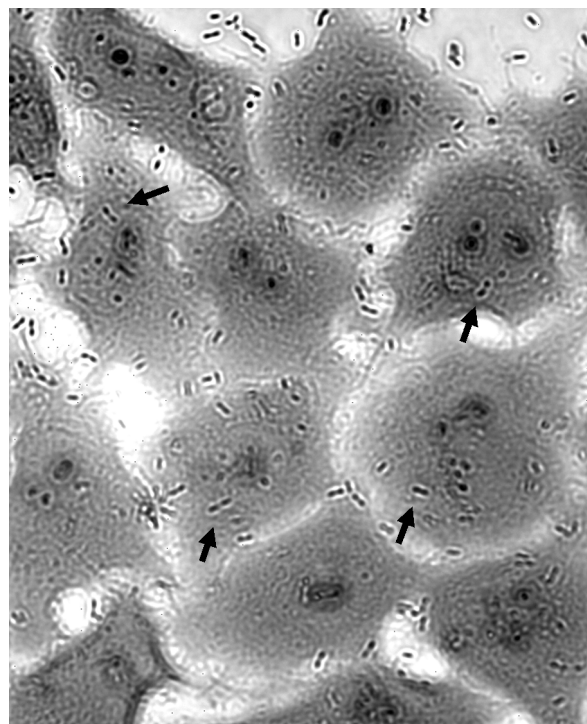
In Kap. 3.4. wurden die *P.aeruginosa* -Transposonmutanten auf ihre intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten untersucht. Die Aufnahme in die Granulozyten erfolgte durch Phagozytose, d.h. die Bakterien wurden aktiv von der eukaryontischen Zelle aufgenommen. Bei *P.aeruginosa* ist aber auch bekannt, daß die Bakte-

rien von sich aus in (Epithel-) Zellen eindringen (HAUSER ET AL. 1998). Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob Transposonmutanten, die in Granulozyten eine verringerte Überlebensfähigkeit aufwiesen, auch in ihrer Invasivität und ihrem intrazellulären Überleben in Epithelzellen beeinträchtigt waren.

In einer ersten Untersuchung wurden alle in ihrer intrazellulären Überlebensfähigkeit beeinträchtigten *P.aeruginosa*- Transposonmutanten, sowie die *P.aeruginosa*- Stämme TB, 892, PAO und CSGB8 mikroskopisch auf ihre Invasivität und Persistenz in Chang- Zellen (Cornealepithelzellen) untersucht (JENDROSSEK ET AL. 2001). Hierbei konnte nachgewiesen werden, daß die Invasivität von *P.aeruginosa* TB und 892 nicht höher liegt als die von *P.aeruginosa* PAO, der als nicht- invasiv gilt und im Tiermodell auch keine Erkrankungen verursacht. Der Stamm CSGB8, ein anderes Klinikisolat, zeigte dagegen eine fast 50 fach erhöhte Invasivität.



P.aeruginosa TB



P.aeruginosa CSGB8

Abb. 3.19. Invasivität von *P.aeruginosa* TB und CSGB8 in Chang- Zellen. Während bei *P.aeruginosa* TB fast nur extrazelluläre Bakterien zu sehen sind, findet man mehrere *P.aeruginosa* CSGB8 in fast jeder Epithelzelle. (Die Pfeile zeigen auf einige Beispiele.) (Lichtmikroskopische Aufnahmen (1000 x), Zellen mit Kristallviolett gefärbt).

Die gleichen Untersuchungen wurden mit den *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde die Bakterienanzahl in jeweils 100 Chang- Zellen bestimmt und der Mittelwert gebildet:

<i>P.aeruginosa</i> - Stamm	Bakterien pro Zelle	<i>P.aeruginosa</i> - Stamm	Bakterien pro Zelle
Wildtyp:		15A3	0,2
CSGB8	> 8	15B10	0,2
PAO	0,2	18A12	0,2
892	0,1	19C2	0,2
TB	0,2	20A6	0,2
		22D11	< 0,05
Mutanten:		23B9	0,2
3D1	0,2	24A12	0,2
14B2	> 5	24C5	0,1
14C5	0,2		

Tabelle 3.9 Durchschnittszahl der pro Chang- Zelle gemessenen intrazellulären *P.aeruginosa* des jeweiligen Stammes.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Anzahl der intrazellulären und der adhärennten Bakterien bei den auffälligsten *P.aeruginosa*- Stämmen quantitativ bestimmt (Kap. 2.3.3.3.). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus fünf Messungen. Die aufgeführten Verhältnisse entsprechen den Verdünnungsfaktoren der auf Agarplatten ausgestrichenen Aliquots:

<i>P.aeruginosa</i> Stamm	Invasivitätstest [cfu]		Adhärenztest [cfu]		
	1:10	1:100	1:10 ⁵	1:10 ⁶	1:10 ⁷
CSGB8	> 1000	> 200	nicht auswertbar, zu dichtes Wachstum		
PAO	68	5	38	7	1
TB	70	8	51	4	1
3D1	22	3	52	5	0
14B2	> 800	> 200	≈ 200	11	0
22D11	5	0	18	0	0
24A12	> 200	21	36	2	0
24C5	21	3	≈ 200	16	1

Tabelle 3.10. Ergebnisse des Invasivitäts- und Adhärenztests

Die Ergebnisse der quantitativen Messung bestätigten die mikroskopische Auszählung. *P.aeruginosa* TB weist ungefähr die gleiche Invasivität und Adhärenz wie *P.aeruginosa* PAO auf. Invasivität und Adhärenz an Epithelzellen von *P.aeruginosa* CSGB8 ist um mehr als eine Größenordnung höher. Bei den aus *P.aeruginosa* TB erzeugten Transposonmutanten gibt es starke Abweichungen. 3D1 zeigte eine dem Wildtyp vergleichbare Adhärenz, aber eine etwas geringere Invasivität. 24A12 wies eine höhere Invasivität, 24C5 eine erhöhte Adhärenz gegenüber dem Wildtyp auf, wobei der jeweils andere Wert gegenüber dem Ausgangswert verringert war. Bei 14B2 wurde zuvor eine erhöhte Überlebensfähigkeit in Granulozyten gemessen. Dies zeigte sich auch hier in erhöhter Adhärenz und Invasivität. Die Ergebnisse bei 22D11 bestätigen ebenfalls die mikroskopischen Untersuchung. Von allen untersuchten Mutanten zeigte dieser die geringste Adhärenz und Invasivität. Zusätzlich war in der mikroskopischen Untersuchung festgestellt worden, daß die Bakterien dieses Typs bei Kontrollen vor der Fixierung der Präparate als einzige keine Beweglichkeit zeigten. Die fehlende Motilität kann aber nicht der Grund für die geringe Invasivität und Adhärenz sein, da die Bakterien direkt vor Beginn der Inkubation in einer Zentrifugation auf die Epithelzellen sedimentiert wurden, so daß für ein Eindringen in die Zellen keine weitere Bewegung notwendig war. Ebenfalls wurden die Selektionsansätze aus Granulozyten und Transposonmutanten (Selektion I, Kap. 3.4.) während der gesamten Inkubation heftig gemischt, so daß die Beweglichkeit der einzelnen Bakterien für die jeweiligen Selektionsergebnisse keine Rolle spielte. Das in 22D11 ausgeschaltete Gen muß daher zwei Funktionen, sowohl für das intrazelluläre Überleben, als auch für die Motilität, haben.

Weiterhin ist auffällig, daß die Invasivität der meisten in Selektion I gefundenen Transposonmutanten nicht von der des Wildtyps abweicht. *P.aeruginosa* TB hat eine geringe Invasivität, kann aber im Falle einer Aufnahme in einer eukaryontische Zelle (z.B. Phagozytose durch einen Granulozyten) besser überleben als andere *P.aeruginosa* - Varianten. *P.aeruginosa* CSGB8 ist dagegen invasiv, kann aber nicht in Granulozyten persistieren. Dies läßt den Schluß zu, daß Invasivität und intrazelluläres Überleben weitgehend getrennte Mechanismen sind.

Die Überlebensstrategien dieser beiden opportunistischen Pathogene in einem Wirt unterscheiden sich daher. Während *P.aeruginosa* CSGB8, wie die meisten bekannten pathogenen *P.aeruginosa* - Varianten (z.B. HAUSER ET AL. 2000), dem Immunsystem des Wirts aktiv durch Invasion in Epithelzellen ausweicht, ist *P.aeruginosa* TB nicht invasiv, sondern hat eine stark erhöhte Resistenz gegen die Abwehrzellen des Immunsystems. Diese Strategie hat eher defensiven Charakter und macht *P.aeruginosa* TB zu einem exzellenten Modell für die Untersuchung der Defensivmechanismen phagozytierter Bakterien.

3.5.2. Überlebensfähigkeit in Mäusen

Zur Überprüfung der Hypothese der unterschiedlichen Überlebensstrategien wurden Mäuse mit unterschiedlichen Mengen an Bakterien intranasal infiziert und der Verlauf der Infektion verfolgt.

Invasive *P.aeruginosa* (wie CSGB8):

Es treten keine Sofortsymptome auf. Je nach Menge der applizierten Bakterien erkranken die Mäuse in zunehmenden Maße nach ca. 16 - 24 Stunden. Bei einer höheren Dosis (je nach Stamm ab ca. 10^9 Bakterien pro Maus) tritt nach ca. 36 -48 Stunden der Tod ein. Diese Untersuchungen wurden im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die genannten Werte stammen aus Infektionsversuchen in der Arbeitsgruppe E. GULBINS. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden die Untersuchungen mit *P.aeruginosa* TB und *P.aeruginosa* PAO durchgeführt.

***P.aeruginosa* PAO:**

Auch bei einer Dosis von mehr als 10^{10} Bakterien pro Maus zeigte kein Tier mehr als ein kurzes Unwohlsein ca. 2-3 h direkt nach der Applikation der Bakterien.

***P.aeruginosa* TB:**

Kurz nach Infektion der Mäuse (innerhalb von 30 min) verschlechterte sich ihr Gesundheitszustand dramatisch. Die Tiere lagen mit gestäubtem Fell schweratmend und apathisch in den Käfigen und reagierten nicht mehr auf äußere Reize. Eine derartige Reaktion war in dieser Schwere und Heftigkeit vorher bei keiner in

dieser Arbeitsgruppe durchgeführten *P.aeruginosa* - Infektion beobachtet worden (persönl. Mitteilung E. Gulbins). Dieser apathische Zustand hielt abhängig von der Infektionsdosis zwischen 16 und 48 Stunden an, danach besserte sich der Gesundheitszustand der Tiere. Auch bei Gaben von 3×10^{10} Bakterien pro Tier überlebten alle Mäuse.

Diese Ergebnisse bestätigten den abweichenden Pathogenitätsmechanismus von *P.aeruginosa* TB. Eine Erklärung für die beobachteten Krankheitsbilder wäre, daß invasive *P.aeruginosa* dem Immunsystem zuerst durch Invasion von Epithelzellen entkommen und sich später aus diesem Reservoir heraus vermehren, was eventuell zu einer tödlichen Sepsis führt. *P.aeruginosa* TB ist dagegen nicht invasiv und daher sofort und andauernd für das Immunsystem präsent. Im Gegensatz zu dem ebenfalls nicht invasiven *P.aeruginosa* PAO verfügt TB allerdings über Defensivmechanismen, die die Lyse der phagozytierten Bakterien erschweren. Es kommt somit sofort nach der Infektion zu einem schweren Krankheitsbild. Der Schutz von *P.aeruginosa* TB gegen das Immunsystem ist aber nicht vollständig (z.B. gegen das Komplementsystem), so daß es trotzdem im Laufe mehrerer Stunden zu einer Eliminierung der Bakterien kommt.

P.aeruginosa ist entsprechend seiner ökologischen Nische in erster Linie kein Pathogen. Es ist daher anzunehmen, daß der bei *P.aeruginosa* TB beobachteten Abwehrmechanismus gegen Phagozytose sich vor allem gegen freilebende Eukaryonten (z.B. Amöben) entwickelt hat. Dies würde erklären, warum das intrazelluläre Überleben in Granulozyten zum einen so perfekt funktioniert, daß sogar Zellteilungen in den PMN zu beobachten sind, andererseits eine Infektion, selbst in hoher Dosierung, nicht letal ist. Die Defensivmechanismen sind gegen die zelluläre Abwehr, nicht aber gegen die anderen Komponenten des Immunsystems gerichtet.

3.6. Selektion II: Untersuchung der *P.aeruginosa* TB-Transposonmutanten auf Expression des Quorum Sensing - Systems

3.6.1. Durchführung

Bei dieser Untersuchung handelte es sich um ein typisches Screening von Transposonmutanten. Jeder Mutant wurde separat untersucht. Die eingefügten Signalsequenzen waren hierbei zur Detektion nicht notwendig. Das Prinzip des Untersuchungsverfahrens besteht darin, die *P.aeruginosa* - Mutanten zusammen mit einem *E.coli*- Detektorstamm zu inkubieren, der über eine episomal kodierte, nur bei Anwesenheit von aliphatischen Homoserinlactonen (AHL) exprimierte Luziferase verfügt. Hierzu standen zwei verschiedene Vektorsysteme zur Verfügung: pSB403 zur Detektion kurzkettiger AHL und pSB1142 für längerkettige AHL.

Alle 3800 erzeugten *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten wurden entsprechend den in Kap. 2.3.2. dargestellten Arbeitsvorschriften in Mikrotiterplatten auf ihre AHL-Produktion untersucht. Mutanten, die bei Inkubation mit beiden verwendeten Detektorsystemen keine Lichtreaktion zeigten, wurden entsprechend Kap. 2.3.2. in einem zweiten Experiment als Strichkulturen gegen beide Detektorsysteme untersucht. Diejenigen Transposonmutanten, die in keinem Experiment eine Lichtreaktion zeigten, wurden als Quorum Sensing- Defektmutanten asserviert und untersucht.

3.6.2. Probleme des Detektionsverfahrens

Im Idealfall lieferte die Untersuchung der *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten in den Mikrotiterplatten folgendes Ergebnis:

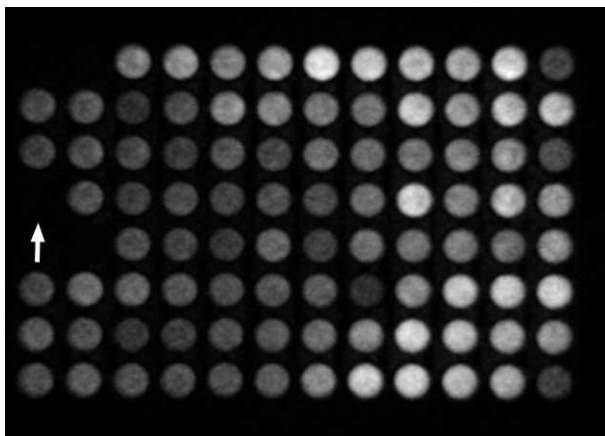


Abb. 3.20.

Untersuchung der *P.aeruginosa* TB-Transposonmutanten aus den Selektionsebenen 3 und 4 auf die Produktion von kurzkettigen AHL. Der Pfeil weist auf die Position eines Quorum Sensing- Defektmutanten hin - 3D1. (Die Positionen A1 und A2 sind in jeder Ebene frei und für interne Kontrollen reserviert.)

Dieses Ergebnis ermöglichte eine klare Bestimmung der AHL- defizienten Mutanten. Leider kam es während des Aufenthalts am Institut für Mikrobiologie der TU München zu einem Ausfall des 37° C- Raumes neben der Photonenkamera. Der Weg zur nächsten Möglichkeit für eine Inkubation der Bakterien betrug ca. 5 min. Die nun erhaltenen Meßwerte waren teilweise von sehr viel schlechterer Qualität. Es stellte sich heraus, daß die Aktivität der Luziferase in den *E.coli* - Detektorstämmen stark von der Temperatur abhängig war. Beim Absinken der Temperatur in den Mikrotiterplatten auf 25°C sank die Luziferaseaktivität auf Null:

Zeit nach Entnahme aus dem Inkubator

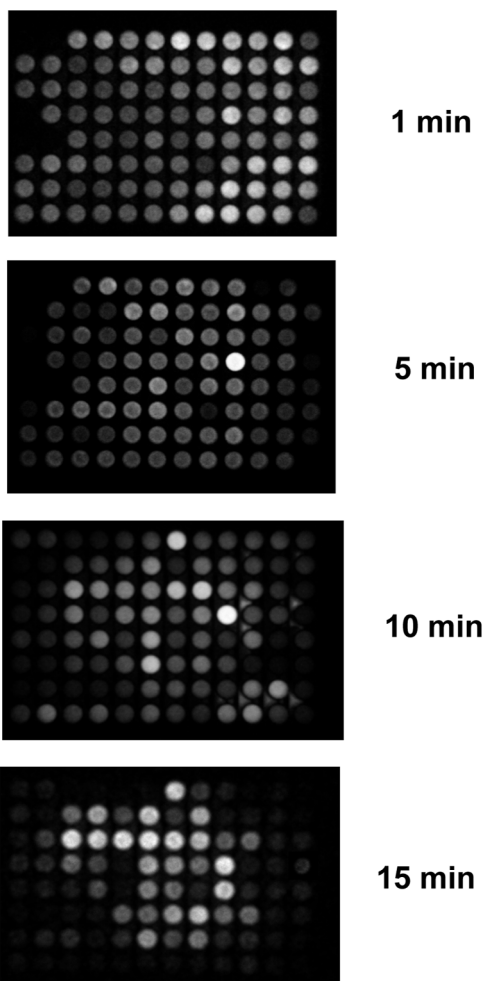


Abb. 3.21.

Gemessene Signalintensitäten der Selektionsebenen 3 und 4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beendigung der Inkubation. Die Signalverstärkungen wurden während der Messung automatisch von Auswertungsprogramm der Kamera angepaßt. Zwischen den Intensitäten der ersten und letzten Aufnahme liegen mehr als drei Größenordnungen. Die Auswertung der Luziferase- Aktivität ist schon nach 5 min nicht mehr für alle Bakterien reproduzierbar möglich.

Zusätzlich traten später auch noch Probleme mit der Software der Photonenkamera auf, was die Aufnahme der Meßwerte nochmals verzögerte, so daß die *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten nicht komplett auf ihre AHL- Produktion untersucht werden konnten. Eine gleichmäßige Temperierung aller Mikrotiterplatten auf 37° C bei Transport und Messung war unter den gegebenen Umständen nicht möglich. Einige Bereiche der untersuchten Platten zeigten zumeist keine Luziferaseaktivität mehr. Auf

diese Weise konnten daher nur von ca. 30 - 50% der Transposonmutanten Meßwerte erhalten werden. In der zweiten Untersuchung (als Strichkultur) war das Absinken der Luziferaseaktivität nicht so deutlich zu bemerken. Eventuell sank die Temperatur während der Untersuchung durch das größere Volumen an Nährmedium nicht so stark ab.

3.6.3. Ergebnisse

Bei folgenden *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten wurden keine AHL detektiert:

2D1	2D5	3D1	37D8	41D3	47D7	48D7
B7A11	D8A3	D8C3	D8E3	D8A5	D8A6	D8B6
D8F9	D9C10	D9E10	D10B10			

Bei dem Mutanten B7D3 wurde eine deutlich erhöhte Signalintensität gemessen, bei D8B7 nur ein Ausfall der Produktion kurzkettiger AHL

(zur Nomenklatur s. Kap. 3.4.2.)

3.7. Weitere Untersuchungen an ausgewählten Mutanten

3.7.1. Liste der Mutanten

Ziel der nächsten Untersuchungen war eine genauere Charakterisierung der in den Selektionsexperimenten gefundenen Transposonmutanten. Alle der o.g. *P.aeruginosa* TB- Mutanten zeigten eine deutliche Abweichung vom normalen Phänotyp.

Durch das Konstruktionsschema der Mutanten- Bibliothek (Abb. 3.13) war es möglich, daß auf benachbarten Selektionsebenen (theoretisch maximal 6 Ebenen Abstand) identische Transposonmutanten eingeordnet wurden. Bei einige *P.aeruginosa* - Mutanten war ein solcher Zusammenhang zu vermuten. In drei Fällen zeigte sich in Southern- Hybridisierungen eine Übereinstimmung in den Fragmentgrößen, so daß diese Mutantenpaare höchstwahrscheinlich aus identischen Klonen bestehen. Es wurde daher jeweils nur einer von beiden Stämmen untersucht:

2D1 ↔ 3D1

47D7 ↔ 48D7

D8A3 ↔ D8C3

Folgende Mutanten wurden näher charakterisiert:

Mutanten aus Selektion I (Kap. 3.4.):

2D5*	3D1*	15A3	15B10	15C1	18A12
19C2	20A6	22D11	23B9	24A12	24C5

Mutanten aus Selektion II (Kap. 3.6.):

37D8	41D3	47D7	B7A11	B7D3	D8A3
D8A6	D8B6	D8B7	D8F9	D9C10	D10B10

*: Sowohl in Selektion I als auch in Selektion II gefunden

3.7.2. Quantitativer Test auf intrazelluläres Überleben

Bei den Untersuchungen zur intrazellulären Überlebensfähigkeit in Granulozyten (Kap. 3.4.) wurden *P.aeruginosa* - Transposonmutanten in einem Phagozytostest untersucht. Es wurde allerdings nicht getestet, ob die verminderte Überlebensfähigkeit einiger Mutanten tatsächlich auf die Einwirkung von Granulozyten oder auf eine höhere Sensibilität gegenüber dem zugefügten AB- Serum zurückzuführen ist. Vor allem Klinikisolate (wie *P.aeruginosa* TB und *P.aeruginosa* 892) zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber AB- Serum. Im Experiment war es nicht möglich, auf das Blutserum zu verzichten, da sonst die Phagozytose der Bakterien durch die Granulozyten (wegen fehlender Opsonierung) nur sehr unvollständig verlaufen wäre. Es war somit möglich, daß einige der im Selektionsexperiment identifizierten Transposonmutanten statt einer verminderten Überlebensfähigkeit in Granulozyten eine höhere Empfindlichkeit gegen AB- Serum aufwiesen.

Zur Untersuchung dieses Befundes und zur Quantifizierung der intrazellulären Überlebensfähigkeit wurden einige der Transposonmutanten nochmals einer Selektion unterzogen, allerdings wurde jetzt ein zweiter Kontrollansatz durchgeführt, bei dem die Bakterien in RPMI1640 mit AB- Serum (aber ohne Granulozyten) inkubiert wurden.

Zu den bereits in Selektion I gefundenen Mutanten wurden bei dieser Untersuchung (neben einigen Transposonmutanten ohne besondere Auffälligkeiten) einige Mutanten aus Selektion II gegeben. Während alle *P.aeruginosa* - Mutanten auf ihre Produktion an Homoserinlactonen untersucht worden waren, waren im Phagozytostest nur die Mutanten bis zu Ebene 24 untersucht worden. Da aber bekannt ist, daß die Expression vieler Pathogenitätsfaktoren über das Quorum Sensing der Bakteriums reguliert wird (Kap.1.4.2), wurden einige der *P.aeruginosa*- Transposonmutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing ebenfalls auf ihre intrazelluläre Überlebensfähigkeit und ihre Resistenz gegenüber Blutserum untersucht.

Mutant	Überlebensrate in Vergleich zu <i>P.aeruginosa</i> 892	
	in AB- Serum	in Granulozyten
892	1,0	1,0
PAO	3,6	0,05
2D5	0,2	0,2
3D1	0,8	0,07
14B2	0,4	0,4
14C5	0,9	0,05
15A3	0,4	0,6
15B10	2,7	1,2
19C2	1,2	0,06
20A6	0,8	0,2
22D11	0,7	0,08
24A12	0,15	1,0
37D8	0,3	0,2
41D3	0,4	0,05
47D7	0,15	0,3

Tabelle 3.11. Überlebensraten verschiedener *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten (im Vergleich zu *P.aeruginosa* 892) in Blutserum und in Granulozyten. In den fettgedruckten Zeilen sind die Mutanten hervorgehoben, deren intrazelluläres Überleben in Granulozyten stark vermindert ist.

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Schwankungen innerhalb dieses Experiments lagen bei max. $\pm 40\%$. Bei Vergleich der Werte aus den vorherigen Untersuchungen lag der maximale Unterschied zwischen zwei Selektionsergebnissen für den gleichen Mutanten bei knapp unter 100%. Dies klingt viel, war aber unter Berücksichtigung des Verfahrens zur Sondenherstellung (Kap. 2.2.10.), bei der eine Amplifikation der Signalsequenzen mit PCR stattfand, zu erwarten. Außerdem zeigen die intrazellulär nicht überlebensfähigen Transposonmutanten im Vergleich zum Wildtyp so geringe Überlebensraten, daß sie auch noch bei einer Verdopplung der erhaltenen Meßwerte auffällig wären.

Die hier durchgeführte Untersuchung erbrachte folgende Ergebnisse:

- Die hohe Resistenz von *P.aeruginosa* PAO in Blutserum entsprach den Erwartungen für ein nicht- pathogenes *P.aeruginosa* - Umweltisolat, ebenso die geringe Überlebensfähigkeit in Granulozyten.
- Die Vermutung, daß bei einem Teil der gefundenen Transposonmutanten die geringen Überlebensraten auf eine höhere Sensibilität gegenüber dem Blutserum und nicht gegenüber den Granulozyten zurückzuführen sind, hat sich bestätigt. Drei von acht Mutanten, die in der Selektion I gefunden worden waren, waren gegen über Blutserum, nicht aber gegenüber den Granulozyten sensibel, sie überlebten teilweise sogar bei Inkubation mit den PMN besser. Dies war vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Bakterien nach der Phagozytose keinem weiteren Streß durch das Serum ausgesetzt waren, ihre Verteidigungsmechanismen gegen den Granulozyten durch die Transposoninsertion nicht beeinflußt worden waren.
- Alle untersuchten Quorum Sensing - defizienten Mutanten wiesen auch eine verringerte Resistenz gegenüber Blutserum, nicht aber gegenüber den Granulozyten, auf. Einzelne Mutanten waren zwar auch in ihrem intrazellulären Überleben eingeschränkt, dies schien aber unabhängig von der Serumsensibilität zu sein.
- 6 der hier untersuchten Transposonmutanten zeigten eine deutlich verringerte Überlebensfähigkeit in Granulozyten. Zumeist lag sie um eine Größenordnung

unter den Werten bei Inkubation mit AB- Serum. Dies entsprach den vorab aufgestellten Kriterien, nach denen die weiter untersuchten Transposonmutanten aus jeder Selektionsebene maximal 10% der Überlebensrate des *P.aeruginosa* TB - Wildtyps aufweisen durften (Kap. 3.4.1.). Die Ausnahme bildete bei dieser Selektion 20A6. Dies war allerdings auch der Mutant mit den höchsten Überlebensraten, der zur weiteren Untersuchung übernommen wurde. Seine Ergebnisse lagen stets relativ hoch, aber immer mindestens um den Faktor 4 unter dem Durchschnitt aller Transposonmutanten

- 15B10 wies in den vorherigen Untersuchungen eine erhöhte intrazelluläre Überlebensrate auf. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Selektion lag dies aber vor allem an einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Blutserum.
- Insgesamt bestätigte dieses Selektionsexperiment die Reproduzierbarkeit des Selektionsverfahrens. Die gefundenen Transposonmutanten zeichneten sich tatsächlich durch eine geringere Überlebensrate in den durchgeführten Selektionsexperimenten aus. Es ist aber bei zukünftigen Untersuchungen stets eine zusätzliche Überprüfung notwendig, um festzustellen, ob die veränderte Überlebensfähigkeit auffälligerer Transposonmutant auf die Granulozyten oder das Blutserum zurückzuführen ist.

3.7.3. Quorum Sensing und Proteasesekretion

Alle identifizierten Transposonmutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing zeichnen sich durch weitere gemeinsame phänotypische Eigenschaften aus. Diese Veränderungen sollen im folgenden im Vergleich des (als Beispiel gewählten) Mutanten 3D1 mit dem *P.aeruginosa* TB - Wildtyp dokumentiert werden.

Keiner der Mutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing ist in Flüssigkultur zur Produktion von Farbstoffen fähig. Dies war zu erwarten, da die Produktion von Pyoverdine erst bei hoher Bakteriendichte einsetzt und über das Quorum Sensing reguliert ist (Kap. 1.1.4.2.):



Abb. 3.22. Flüssigkulturen von *P.aeruginosa* TB- Wildtyp (rechts) und einem *P.aeruginosa* - Transposonmutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing (links)

Beim Wachstum auf Agarplatten war dagegen ein anderer Phänotyp zu beobachten. Die Transposonmutanten produzierten ein anderes Spektrum an Farbstoffen als der Wildtyp. Zusätzlich waren die Kolonien im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr mukoid, sondern sezernierten eine feste Substanz, die den Kolonien einen metallischen Glanz verlieh und einen rissigen Film auf deren Oberfläche bildete. Die Herkunft des metallisch schimmernden Films auf den Kolonien ist ungeklärt.

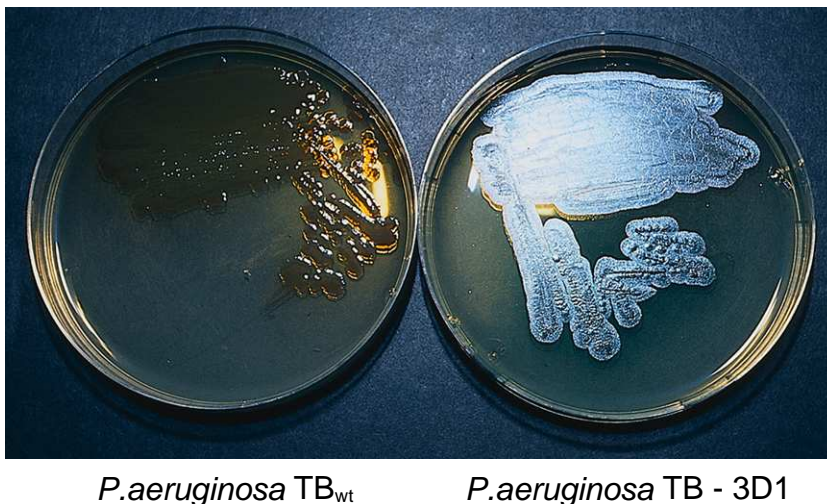


Abb. 3.23. Wachstum auf LB- Agar von *P.aeruginosa* TB- Wildtyp und einem Quorum Sensing- Defektmutanten (3D1).

Eine weitere Eigenschaft, die über das Quorum Sensing bei *P.aeruginosa* reguliert wird, ist die Sekretion von Proteasen (1.1.4.2.), die erst bei hoher Wachstumsdichte sezerniert werden. Das Standardverfahren zur Untersuchung dieser Eigenschaft ist das Ausstreichen der entsprechenden Bakterien auf einem Minimalmedium mit Milchpulver als Kohlenstoffquelle (0,5 - 1 %). Ist bei den Bakterien eine Proteaseaktivität vorhanden, bildet sich ein durchsichtiger Hof um die Kolonien, wo die Milchproteine hydrolysiert wurden. Alle in Kap. 3.7.1 genannten Transposonmutanten wurden auf Milchagar auf ihre Proteaseaktivität untersucht:

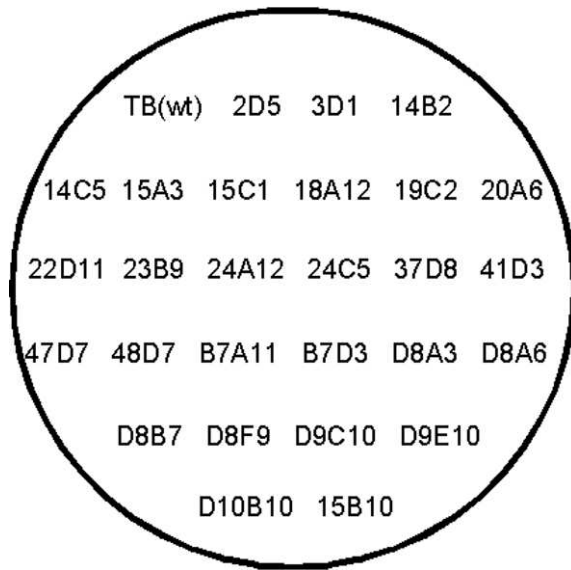


Abb. 3.24.

Auftragsschema der *P.aeruginosa*- Transposonmutanten in den Abb. 3.25.-27.

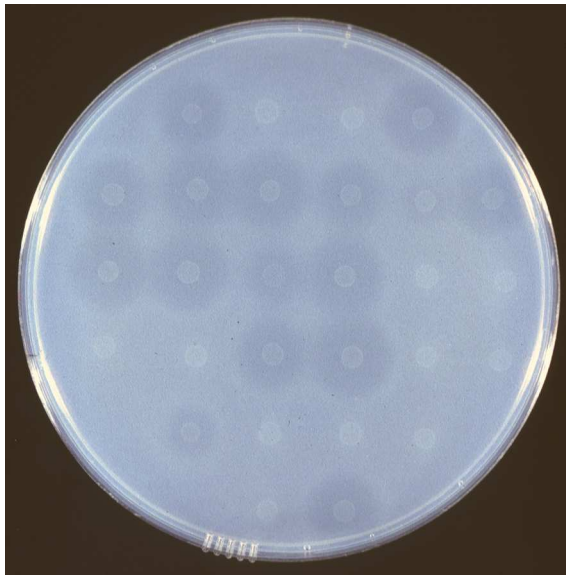


Abb. 3.25

Verschiedene *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten auf Milchagar.

Bei der Untersuchung von *P.aeruginosa* nach diesem Verfahren ergaben sich einige Schwierigkeiten, die hauptsächlich darauf zurückzuführen waren, daß *P.aeruginosa* eine Vielzahl von Proteasen exprimieren kann.

Bei kurzer Inkubationszeit war der durchsichtige Hof um die Kolonien noch nicht vollständig ausgebildet, bei etwas längerer Inkubation entstand um alle *P.aeruginosa* Kolonien eine durchsichtige Zone, weil alle Bakterien auch zusätzlich die in dem Milchpulver enthaltenen Fette und Kohlenhydrate für ihr Wachstum verwenden konnten. Lediglich die Größe des entstehenden Hofes unterschied Mutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing von anderen *P.aeruginosa*.

Es wurden daher zwei neue Selektionsmedien entwickelt, um deutlichere Ergebnisse zu erhalten. Beide Medien wurden auf einem M9 Minimalmedium basierend aufgebaut, wobei reines Protein (jeweils 0,5%) als einzige Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Auf diese Nährmedien wurden dann die gleichen *P.aeruginosa* - Mutanten wie auf dem Milchagar aufgetragen.

Casein- Agar

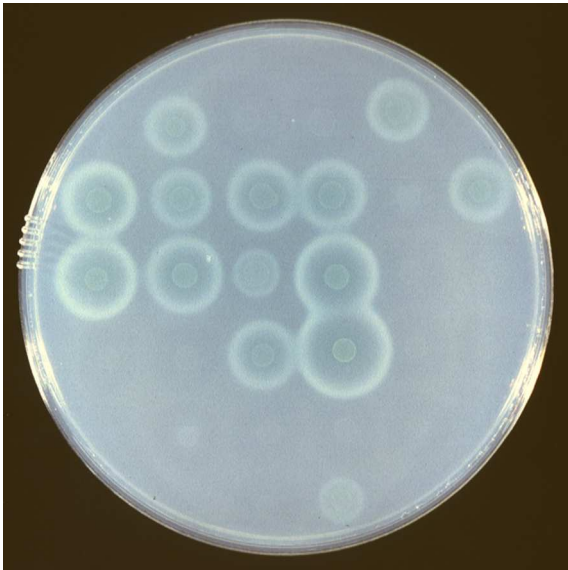


Abb. 3.26
Verschiedene *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten auf Casein-Agar

Das hier erhaltene Ergebnis war erheblich besser als bei Verwendung von Milchagar. *P.aeruginosa*- Transposonmutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing konnten auf diesem Agar nicht wachsen, um die anderen Kolonien bildete sich ein klarer Hof, der von einem trüben Ring aus teilhydrolysierten Proteinen umgeben war. Mit diesem Agar war eindeutig eine Abgrenzung und Identifizierung der Proteaseaktivitäten der einzelnen *P.aeruginosa* - Mutanten möglich. Neben einer eindeutigen Ja/Nein - Antwort war hier zusätzlich auch eine vergleichende Quantifizierung der Proteasesekretion möglich. Die erhöhte Produktion an Homoserinlactonen im Mutanten B7D3 äußerte sich unter den gewählten Bedingungen in einer verstärkten Proteaseproduktion, und der Mutant 19C2, der in den Untersuchungen zum Quorum Sensing nicht aufgefallen war, zeigt eine deutlich verminderte Proteaseaktivität.

Gelatine- Agar

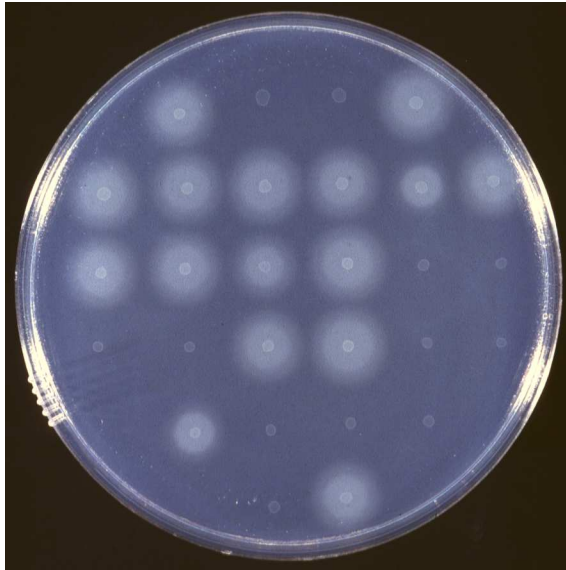


Abb. 3.27
Verschiedene *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten auf Gelatine- Agar.

In diesem Agar wurde als einzige Kohlenstoffquelle Gelatine zugesetzt. Dieses Protein ist gut löslich, so daß ein klarer Agar entsteht. *P.aeruginosa* produziert und sezerniert eine Kollagenase / Elastase, deren Expression über das Quorum Sensing reguliert wird (Kap. 1.1.4.2). Die Diskriminierung der Mutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing war auch hier durch das Fehlen einer trüben Zone aus teilhydrolysiertes Kollagen möglich. Auch diese Selektionsplatte lieferte sehr viel deutlichere Ergebnisse als der übliche Milchagar und eignete sich sogar zur Quantifizierung der Proteaseaktivität. Mit einer Ausnahme bestätigten die hier erhaltenen Ergebnisse die Resultate vom Casein- Agar. Diese Ausnahme ist der Mutant D8B7 der, ebenso wie der Mutant 19C2, eine verminderte aber deutliche Produktion von Elastase aufweist.

Induktion des Quorum Sensing

Bei einem weiteren Experiment wurden die Transposonmutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing zusammen mit *P.aeruginosa* TB Wildtyp auf Caseinagar ausgestrichen. Ziel der Untersuchung war, herauszufinden, ob bei den gefundenen Transposonmutanten eine Produktion von Homoserinlactonen und damit von Protease induzierbar war.

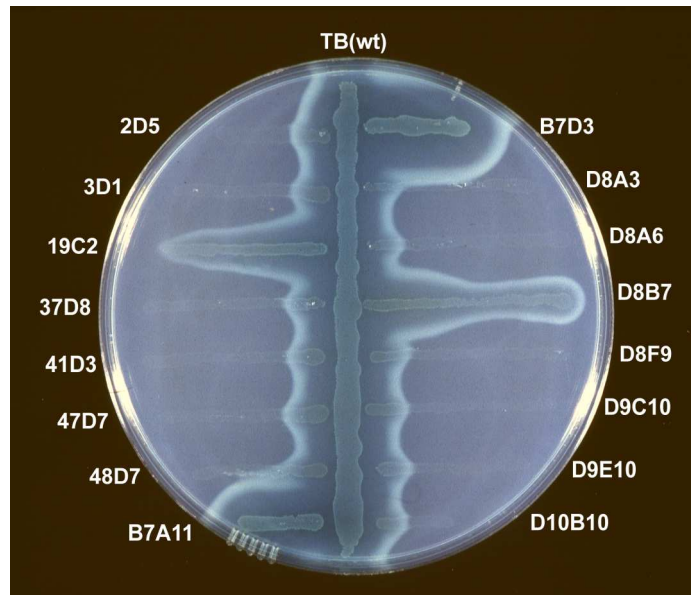


Abb. 3.28. Untersuchung zur Induzierbarkeit des Quorum Sensing- Systems der Quorum Sensing- Defektmutanten durch AHL von *P.aeruginosa* TB- Wildtyp

Bei den Quorum Sensing- Defektmutanten ist eine Verschiebung der Grenze der Proteaseaktivität zu sehen. Die Enzyme schienen dort „schneller“ diffundiert zu sein, was natürlich nicht der Fall sein konnte. Es ist eher anzunehmen, daß die Proteaseproduktion der Defektmutanten als Reaktion auf die von außen (vom *P.aeruginosa* TB- Wildtyp) zugeführten Homoserinlactone einsetzte. Da aber keine eigene Produktion von Autoinducern stattfinden konnte, ist der Effekt auf den Nahbereich der vom TB- Wildtyp ausgehenden Diffusionsfront begrenzt. Deutlicher ist der Effekt bei 19C2 und D8B7 zu sehen, die beide eine verringerte Proteaseaktivität aufwiesen. Hier wurde durch die vom Wildtyp zugeführten Autoinducer nicht nur die Proteaseproduktion verstärkt, sondern auch die Produktion an Homoserinlactonen, wodurch dann wiederum die benachbarten Bakterien stimuliert wurden. Nur so war zu erklären, daß die Proteaseaktivität mit abnehmender Intensität über einen Abstand von mehreren Zentimetern verstärkt wurde.

3.7.4. Untersuchung des Metabolismus der *P.aeruginosa*-Transposonmutanten in der „Bunten Reihe“

Bei der Untersuchung der metabolischen Eigenschaften der in Kap. 3.7.1. aufgeführten *P.aeruginosa*-Transposonmutanten in einer „Bunten Reihe“ (API20NE, bio-Merieux) zeigte sich bei keinem Mutanten eine auffällige Abweichung, mit Ausnahme der fehlenden Grünfärbung der Quorum Sensing- defizienten Mutanten, die nach den Kriterien des Teststreifens jedoch nicht zu bewerten war.

3.7.5. „Plasmid- Rescue“

Zur Sequenzierung der flankierenden Bereiche der Transposoninsertion wurde ein „Plasmid- Rescue“ genanntes Verfahren verwendet (Kap. 2.2.9.3.). Hierzu wird die genomische DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut und die entstehenden Fragmente mit einer Ligase zu Ringen geschlossen. Ist in dem genomisch inserierten Transposon sowohl ein Replikationsursprung als auch eine Antibiotikaresistenz codiert, kann das bei der Selbstligation entstehende Plasmid in einen Akzeptor, z.B. *E.coli*, transformiert und dort vermehrt werden.

Für ein effektives „Plasmid Rescue“ durften die Fragmente der genomischen DNA nicht zu groß sein. Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet:

*Pst*I: Bei Verdau mit diesem Enzym erhält man in *P.aeruginosa* relativ kleine Fragmente (ca. 1000 Bp - 6000 Bp). Da dieses Enzym nicht in dem Transposon schneidet, ist es möglich, in beiden Richtungen aus der bekannten Sequenz heraus die flankierende genomische DNA zu sequenzieren.

*Bam*HI / *Bcl*I: Diese beiden Enzyme wurden zusammen in einem Doppelverdau eingesetzt und ergaben in dieser Kombination Fragmente von ca. 1500 bis 8000 Bp. Für *Bcl*I existiert im Transposon flankierend eine Schnittstelle, so daß nur die genomische Sequenz an einer Seite zugänglich ist.

Die Ligation der DNA- Fragmente erfolgte gemäß Kap. 2.2.9.3. Nach einer Transformation in *E.coli* DH5 α wurden die Plasmide präpariert. Eine Überprüfung, ob die

Plasmide nur durch Zirkularisation der jeweiligen Fragmente entstanden sind, oder ob dabei mehrere Fragmente ligiert wurden, war nur bei den Plasmiden möglich, die aus einem *Pst*I- Verdau stammten. Bei den Plasmiden aus dem *Bam*HI / *Bcl*I - Doppelverdau war diese Überprüfung nicht möglich, da die entsprechenden Schnittstellen bei der Ligation zerstört werden konnten. Insgesamt wurden folgende Plasmide erhalten:

Mutant	Plasmid aus	
	<i>Pst</i> I- Verdau	<i>Bam</i> HI/ <i>Bcl</i> I - Verdau
2D5	+	
3D1		+
14B2		+
14C5	+	+
15A3	+	
15B10	+	
15C1	+	
18A12	+	+
19C2	+	
20A6	+	
22D11	+	+
23B9	+	+
24A12		+
24C5	+	+
37D8	+	
41D3	+	
47D7	+	+
B7D3	+	
D8A3		+
D8A6	+	
D8B6	+	
D8B7		+
D9C10	+	
D10B10	+	

Tabelle 3.12. Liste der beim „Plasmid- Rescue“ erhaltenen Plasmide.

Für den Mutanten D8F9 wurden keine Plasmide mit flankierender DNA erhalten, sondern stets die Sequenz von pTnMod-OGm. Eine *E.coli* - Kontamination ist nach den Ergebnissen der „Bunten Reihe“ auszuschließen. Vermutlich wurde bei der Integration des Transposons nicht nur das mini-*Tn5*, sondern der ganze Vektor integriert.

3.7.6. Sequenzierungen

3.7.6.1. Regeln zur Sequenzbestimmung

Die Sequenzierung der flankierenden Bereiche der Transposoninsertionen mit Hilfe der in Kap. 3.7.6. konstruierten Plasmiden wurde als externer Auftrag an die Firma Qiagen vergeben. Die daraus erhaltenen Sequenzen wurden, mit BlastN auf Nukleotidebene und BlastX auf Proteinebene, auf ihr Vorkommen im bereits sequenzierten PAO- Genom (www.pseudomonas.com) untersucht.

War die Sequenz bekannt, wurde der jeweilige Promotorbereich des identifizierten Gens auf beiden DNA- Strängen überlappend sequenziert. Wurden in der DNA-Sequenz des getroffenen Gens zusätzlich Sequenzvarianten gefunden, die einen Aminosäureaustausch des kodierten Proteins verursachten, wurde das Gen mit PCR amplifiziert und erneut sequenziert (Qiagen). Nicht kodierende Sequenzvarianten wurden nicht weiter überprüft. Nur wenn die Ergebnisse aller Sequenzierungen übereinstimmten, wurde eine Nukleotidsubstitution als bestätigt akzeptiert.

Bei unbekanntem Sequenzen wurde in der NCBI- Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) mit BlastN und BlastX nach homologen Sequenzen gesucht.

3.7.6.2. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Sequenzierungen sollen hier nur kurz dargestellt werden. Die Sequenzen selbst sind -soweit nicht im PAO - Genom vorhanden- im Anhang abgelegt. Eine genaue Interpretation und Bewertung der Resultate erfolgt für jeden Transposonmutanten separat in Kap. 3.8. Die angegebene Nummerierung der Gene, die Prozentangabe der Sequenzidentität und die Beschreibungen beziehen sich auf die Angaben in der PAO- Datenbank.

Mutant	Vergleich zur PAO- Sequenz			Beschreibung
	Gen- Nr.	Identität [%]	Sequenzvarianten	
2D5	PA4621	99,8	L-F,*, P:1	mögl. Oxidoreductase
3D1	PA1288	99,6	(2)	mögl. <i>fadL</i> , <i>ompP1</i>
14B2	PA1992	100		mögl. Sensorprotein
14C5	PA3344	99,4	(3)	<i>recQ</i>
15A3	PA5252	99,8	(1)	mögl. ABC-Transporter YheS
15B10	PA5040	99,4	(3)	<i>pilQ</i>
18A12	PA2613	99,7	(3)	Hypothetisches Protein YcaJ
19C2	PA1572	99,6	T-A,*,(1)	Hypothetisches Protein
20A6	PA3953	99,9	P:1	Hypothetisches Protein
22D11	PA1441	99,6	A-V,V-A,(1) P:2	Hypothetisch, ähnlich <i>fliK</i>
23B9	PA2468	100		mögl. σ 70- Faktor
24A12	PA3192	99,6	(3)	<i>gltR</i>
24C5	PA5551	99,6	G-D,W-L, (1)	Hypothetisches Protein
37D8	PA4785	100		mögl. Acyl- CoA Thiolase
41D3	PA5349	99,8	(2)	mögl. Rubredoxin- Reduktase
47D7	-			unbekannt, keine Homologie
B7A11	PA5415	98,8	G-A,R-Q, (8)	Serinhydroxymethyltransferase
B7D3	PA0740	99,4	*,(6)	mögl. β - Lactamase
D8A3	PA0652	100		<i>vfr</i>
D8A6	-			unbekannt, keine Homologie
D8B6	PA2028	100		mögl. Transkriptionsregulator
D8B7	PA2122	99,7	(1)	Hypothetisches Protein
D9C10	PA2591	100		mögl. Transkriptionsregulator
D10B10	PA1322	99,7	(2)	<i>pfuA</i>

Tabelle 3.13. Liste der Sequenziererergebnisse. Die Spalte „Sequenzvarianten“ enthält die jeweiligen Aminosäuresubstitutionen im Protein (der erste Buchstabe steht für die PAO- Sequenz, der zweite für die in *P.aeruginosa* TB gefundene). Ein „*“ bedeutet, daß das Gen aufgrund seiner Länge nicht vollständig sequenziert wurde. Weitere Sequenzvarianten in der DNA-Sequenz dieses Gens sind daher möglich. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der nichtkodierenden Nukleotidsubstitutionen an, die Angabe hinter dem Kürzel „P“ steht für die Mutationen im Promotorbereich.

Bis auf zwei unbekannte Sequenzen ohne Homologien in den Datenbanken sind alle anderen 22 sequenzierten DNA- Abschnitte aus der PAO- Sequenzierung bekannt. Die Sequenzidentität beträgt durchschnittlich 99,6%. Eine Funktionszuweisung war nur in 17 Fällen möglich, eine eindeutige Bestimmung nur in 6 Fällen.

3.8. weitere *in vitro* und *in silico*- Charakterisierung einzelner *P.aeruginosa* TB- Mutanten

Durch den Einsatz von STM ist es möglich, eine große Anzahl von Transposonmutanten auf ihre Überlebensfähigkeit in einem bestimmten Habitat zu untersuchen. Als Ergebnis erhält man nur die Information, welche Gene essentiell für das Überleben unter den gewählten Selektionsbedingungen sind aber keine Aussage über ihre funktionelle Zuordnung. Hierzu muß jedes identifizierte Protein einzeln auf seine Aufgabe im Organismus untersucht werden. Ebenfalls ist hierzu eine Komplementierung *in trans* für jedes ausgeschaltete Gen anzustreben. Der Arbeitsaufwand für diese Untersuchungen ist groß. So sind z.B. mit der funktionellen Charakterisierung der von M. Hensel (1995) identifizierten Pathogenitätsfaktoren von *S. typhimurium* seit mehreren Jahren Mitarbeiter einer dafür aufgestellten Arbeitsgruppe beschäftigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher der Aufbau einer für STM- Untersuchungen geeigneten Bibliothek von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten, die Etablierung der notwendigen Verfahren zur Auswertung der Selektionen und die Identifizierung von Genen, die für ein intrazelluläres Überleben in Granulozyten essentiell sind. Eine detaillierte funktionelle Analyse der identifizierten Gene war im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen.

In den folgenden Kapiteln sind die sequenzierten Transposonmutanten mit den jeweiligen Ergebnissen der *in vitro*- und *in silico*- Untersuchungen aufgelistet. Im Einzelfall wurden auf der Grundlage dieser Daten weitere Untersuchungen zur phänotypischen Charakterisierung der Mutanten durchgeführt. Diese Resultate sind ebenfalls im jeweiligen Kapitel vermerkt. Sie ersetzen nicht die detaillierte funktionelle Analyse der einzelnen Loci, die ein Ziel späterer Arbeiten sein werden, sondern sollen nur die phänotypischen Eigenschaften des jeweiligen Mutanten näher beschreiben. Abschließend werden die vorhandenen Informationen zu jedem Transposonmutanten zusammenfassend diskutiert und, wenn möglich, eine Arbeitshypothese für die Zielrichtung späterer funktioneller Analysen aufgestellt..

Bei der Auflistung der phänotypischen Eigenschaften ist bei den Transposonmutanten, deren intrazelluläres Überleben in Granulozyten quantitativ bestimmt wurde, ein Quotient Q_{AB} aufgeführt. Dies ist der Quotient aus der Überlebensfähigkeit in AB-Serum geteilt durch die Überlebensfähigkeit in Granulozyten. Der Wert gibt an, um wieviel der entsprechende Transposonmutant im AB- Serum besser überlebte als phagozytiert in Granulozyten. *P.aeruginosa* - Mutanten, deren intrazelluläres Überleben beeinträchtigt ist, erhalten somit Werte, die deutlich größer als Eins sind. Bakterien, die dagegen serumsensitiv sind, in Granulozyten aber weiterhin gut persistieren können, weisen Werte kleiner/gleich Eins auf. Die angegebenen Zahlen sind auf das jeweilige Überleben von *P.aeruginosa* 892 als Referenzwert bezogen.

3.8.1. 2D5

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten:	0,2
in AB- Serum :	0,2
Q_{AB} :	1
Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotypische Veränderung entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA4621
Funktion :	mögliche Oxidoreduktase
Strukturmerkmale / Homologien:	Motive einer Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase am C- Terminus, 2 Transmembranhelices vorhergesagt
Nukleotidsubstitutionen :	nicht- synonym: CTG → TTG: L326F im Promotor: -75 C → T
Länge :	2832 Bp = 944 As.
Transposoninsertion:	Position 731 (11 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA4621 befindet sich keine Terminationsstruktur. Das Gen bildet zusammen mit den drei folgenden Genen PA4620 (4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase), PA4619 (membrangebundene Alkoholdehydrogenase Cytochrom c Untereinheit) und PA4618 (unbekannte Funktion) vermutlich eine polycistronischen Genkassette.

Zusammenfassung

Der Mutant 2D5 zeichnete sich durch einen Defekt im Quorum Sensing und eine verringerte Überlebensfähigkeit in AB- Serum aus, wodurch er in den Selektionsexperimenten mit Granulozyten auffiel. Die in den Datenbanken vorhandenen Informationen über das ausgeschaltete Gen enthalten keine Angaben über ein eventuelles Substrat oder weitere Untersuchungsergebnisse zu dem kodierten Protein. Zusätzlich ist PA4621 das erste Gen einer möglichen polycistronischen Genkassette, so daß auch die Transkription der nachfolgenden Gene durch die Transposoninsertion beeinträchtigt sein kann, und dies erst zu den beobachteten phänotypischen Veränderungen führte.

3.8.2. 3D1

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten:	0,07
in AB- Serum :	0,8
Q _{AB} :	11
Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotypische Veränderung entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA1288
Funktion:	mögliches Transportprotein der äußeren Membran

Strukturmerkmale / Homologien:	47% Ähnlichkeit zu <i>fadL</i> (Transporter für langkettige Fettsäuren in der äußeren Membran von <i>E.coli</i>) 43% Ähnlichkeit zu <i>ompP1</i> aus <i>Haemophilus influenzae</i> (möglicher Virulenzfaktor)
Nukleotidsubstitutionen :	synonym: 638C →T; 935C →T
Länge :	1275 Bp = 425 As.
Transposoninsertion:	Position 530

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA1288 befindet sich eine deutliche Terminationsschleife. Die nächsten drei Gene sind auf dem Gegenstrang kodiert. Ein direkter Einfluß der Transposoninsertion auf die umliegenden Gene ist daher sehr unwahrscheinlich.

weitere Informationen

Zu PA1288 existieren im *P.aeruginosa* PAO - Genom zwei paraloge Gene (PA4589 und PA1764), die beide in der PAO- Datenbank als mögliche Membranproteine der äußeren Bakterienmembran geführt werden. Weitere Informationen waren in den Datenbanken nur zu *fadL* und *ompP1* zu erhalten.

fadL:

FadL transportiert langkettige Fettsäuren durch die äußere Zellmembran. Ein zweites Enzym (Fettsäure- Acyl- CoA Synthetase (FACS)) transportiert die Fettsäuren dann durch die innere Zellmembran und führt sie nach Aktivierung mit CoA der β -Oxidation zu (SCHNEIDER S, ET AL, 1998). FadL legt dabei die Spezifität der Aufnahme fest, FACS macht den Aufnahmeprozess irreversibel (DIRUSSO CC, BLACK PN,1999). Die Struktur von FadL entspricht einem β - Faß aus 20 antiparallelen Strängen, deren Aminosäuresequenz die Spezifität des so gebildeten Kanals festlegen (CRISTALLI G, ET AL,2000). FadL wird vor allem während der stationären Wachstumsphase von *E.coli* exprimiert. Bakterien, bei denen FadL durch Mutation ausgeschaltet wurde, zeigen nur eine geringe Veränderung in der Proteinzusammensetzung beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Phase und überleben nur kurze Zeit bei limitiertem Nährstoffangebot (FAREWELL A ET AL. 1996).

ompP1:

OmpP1 ist ein Protein der äußeren Zellmembran von *Haemophilus influenzae*. (BOLDUC GR 2000). Es existieren in *H.influenzae* verschiedene Varianten dieses Proteins. Während der Infektion eines Wirtsorganismus ist das Protein exprimiert und wird auch bei einer spezifischen Immunantwort gegen seine äußeren Epitope in seiner Expression nicht herunterreguliert. OmpP1 eignet sich daher prinzipiell zur Immunisierung gegen *H.influenzae*.

Weitere zu *fadL* orthologe Gene kodieren in anderen Bakterienspezies für eine Vielzahl von Transportern zur Aufnahme aliphatischer oder aromatischer Verbindungen (z.B. KAHNG HY ET AL. 2000, Toluol; JONES RM ET AL. 2000, Salicylatester).

Zusammenfassung

PA1288 kodiert für ein Protein, daß von seiner Struktur her einem β - Faß entspricht. Die Spezifität des so gebildeten Kanals bleibt unbekannt, vermutlich ist das erkannte Substrat hydrophob (aliphatisch oder aromatisch). Auf der Basis der in der Literatur beschriebenen orthologen Gene ist anzunehmen, daß das entsprechende Substrat innerhalb des Bakteriums mit Coenzym A aktiviert und metabolisiert wird (z.B. β -Oxidation).

Aus den durchgeführten Untersuchungen war bekannt, daß die Funktionsfähigkeit von PA1288 für die Produktion von aliphatischen Homoserinlactonen und das intrazelluläre Überleben in Granulozyten essentiell ist. Diese Beobachtungen werden durch die in der Literatur beschriebenen Untersuchungsergebnisse in *E.coli* und *H.influenzae* bestätigt (s.o.). Auf welche Weise PA1288 einen Einfluß auf die Produktion der Autoinducer oder die intrazelluläre Stabilität ausübt, kann nicht zweifelsfrei erklärt werden.

Eine Hypothese wäre, daß Pa1288 essentiell für die Aufnahme von langkettigen aliphatischen Verbindungen notwendig ist, die nach weiterer Prozessierung als Acyl-Seitenketten in der Produktion von aliphatischen Homoserinlactonen (AHL) notwendig sind. Dies würde auch erklären, warum das entsprechende Gen in *E.coli* in der stationären Phase hochreguliert wird. Unter diesen Bedingungen ist die Produktion an AHL am höchsten und somit auch der Bedarf an aliphatischen Verbindungen zum Aufbau der Seitenkette der Homoserinlactone. Der Knock-out von PA1288 könnte somit die Synthese von AHL in *P.aeruginosa* blockieren.

3.8.3. 14B2

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten : 0,4

in AB- Serum : 0,4

Q_{AB} : 1

weitere Eigenschaften : deutlich erhöhte Invasivität in Epithelzellen und erhöhte Adhärenz

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer : PA1992

Funktion: möglicher 2-Komponenten -Sensor

Strukturmerkmale / Homologien: 56% Ähnlichkeit mit unveröffentlichtem *flhS* von *Paracoccus denitrificans* (nur C-terminal 75% des ORF)
Strukturmotive einer Histidinkinase und eines Response- Regulator Receiver

Länge : 1694 Bp = 565 As.

Transposoninsertion: Position 952

Einfluß auf benachbarte Gene

PA1992 ist das letzte Gen einer möglichen polycistronischen Genkassette. Diese schließt ohne Terminationsschleife, allerdings sind auf den folgenden 8 kB die Gene auf dem Gegenstrang kodiert. Ein cis- Effekt der Transposoninsertion ist somit unwahrscheinlich.

weitere Informationen

Im PAO- Genom existieren zwei paraloge Gene zu PA1992. PA1976 ist etwas länger, weist aber einige sehr homologe Bereiche auf. Das zweite paraloge Gen ist PA3271. Beide Gene sind funktionell als 2-Komponenten - Sensoren eingeordnet.

In den Datenbanken ist keine weitere Information zur Funktion von PA1992 oder *flhS* zu erhalten.

weitere Untersuchungen

Bei der Untersuchung des intrazellulären Überlebens in Granulozyten zeigte der Mutant 14B2 meistens eine Überlebensrate, die deutlich über der des Durchschnitts lag. Auffällig waren aber vor allem die Ergebnisse der Invasivitätstests mit Epithelzellen (Kap. 3.5.1.). Hierbei zeigte der Transposonmutant eine deutlich höhere Adhärenz und eine 10- 20 fach höhere Invasivität in Epithelzellen als der Wildtyp.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse für diesen Transposonmutanten sind nur schwer interpretierbar, da in den Datenbanken keine weiteren Informationen zu diesem Gen zu erhalten waren. Wechselwirkungspartner und Substrate, die als mögliche Aktivatoren dienen können, sind nicht bekannt. Eine genauere Einordnung des Funktionsmechanismus ist bisher nicht möglich, das Strukturmotiv einer Histidinkinase läßt aber die Vermutung zu, daß es sich bei dem ausgeschalteten Protein um einen Regulator in einer Signalkaskade handelt.

Sicher ist nur, daß durch das Ausschalten des Gens PA1992 Adhärenz und Invasivität in Epithelzellen um mindestens den Faktor 10 gesteigert wurde. Die genomische Umgebung läßt keinen cis - Effekt zu. Die phänotypischen Veränderungen sind somit dem Ausschalten des Gens PA1992 direkt zuzuordnen.

3.8.4. 14C5

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten:	0,05
in AB- Serum :	0,9
Q _{AB} :	18

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA3344
Bezeichnung:	<i>recQ</i>
Funktion:	ATP- abhängige DNA-Helicase

Strukturmerkmale / Homologien:	DEAD- Box Unterfamilie der ATP- abhängigen Helicasen, für Helicasen typischer konservierter C- Terminus, HRDC- Domäne
Nukleotidsubstitutionen :	synonym: 95A → C; 337A → G; 382C → T
Länge :	2138 Bp = 713 As.
Transposoninsertion:	Position 102 (+ 10 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

4 weitere Gene unbekannter Funktion sind im Anschluß an *recQ* in gleicher Leserichtung auf dem PAO- Chromosom lokalisiert. Ein cis- Effekt wäre theoretisch denkbar, durch die Ergebnisse der weiterführenden Untersuchungen erscheint aber *recQ* tatsächlich für den beobachteten Phänotyp verantwortlich zu sein.

weitere Informationen

Die aus der PAO- Datenbank erhaltene Funktionsvorhersage lautet: DNA -Replikation, -Rekombination, -Modifikation und -Reparatur

weitere Untersuchungen

Unter normalen Wachstumsbedingungen oder bei Inkubation mit AB- Serum zeigt ein Transposonmutant mit einer Insertion in *recQ* keinen signifikant veränderten Phänotyp. Allerdings führt das Ausschalten von RecQ zu einer signifikanten Verringerung der intrazellulären Überlebensfähigkeit in den Granulozyten. Die Funktion dieses Proteins muß daher in der Reparatur der unter diesen Umständen induzierten DNA- Schäden liegen.

Der hauptsächliche Streß, dem die phagozytierten Bakterien in Granulozyten ausgesetzt sind, ist oxidativ. Zur Simulation dieser Bedingungen wurde der Transposonmutant 14C5 auf LB- Agar mit unterschiedlichen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid ausgestrichen und bei 37° C für 16 Stunden inkubiert. Eine genaue Angabe der Peroxidkonzentration im Agar war nicht möglich, da die Halbwertszeit von Wasserstoffperoxids unter diesen Bedingungen nur sehr kurz war. Der auf die Bakterien ausgeübte Streß dauerte somit auch nicht über die ganze Inkubationszeit an, son-

dem wirkte nur initial für relativ kurze Zeit. Wurden die *P.aeruginosa* in dieser Anfangsphase nicht abgetötet, konnten sie anschließend unbehelligt wachsen.

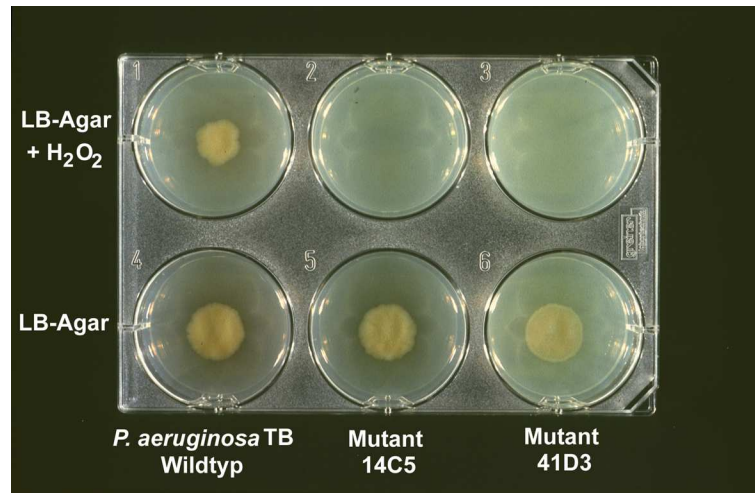


Abb. 3.29. Resistenz von *P.aeruginosa* - Mutanten gegenüber Wasserstoffperoxid. Obere Reihe : LB mit 1mM H₂O₂ (initial)
Untere Reihe : Kontrolle (LB)
Links: *P.aeruginosa* TB_{wt}
Mitte: *P.aeruginosa* 14C5
Rechts: *P.aeruginosa* 41D3

Auf dem Bild ist zu erkennen, daß die Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid bei dem Transposonmutanten 14C5 im Vergleich zum Wildtyp deutlich eingeschränkt ist. Dies gilt ebenfalls für den Mutanten 41D3, dessen Eigenschaften im Kap. 3.8.16. beschrieben werden.

Zusammenfassung

AB- Serum schädigte die Mutanten nicht stärker als den Wildtyp. Nur die Fähigkeit zum intrazellulären Überleben nach der Phagozytose durch die Granulozyten war stark vermindert. Das Ausschalten von *recQ* erhöhte bei dem Transposonmutanten 14C5 die Sensitivität gegenüber dem oxidativen Streß in den Granulozyten. Dies ist durch das fehlende Wachstum auf peroxidhaltigem Vollmedium bestätigt worden. Vermutlich ist *recQ* an der Reparatur von Schäden beteiligt, die durch oxidativen Streß an der DNA auftreten.

Die erhöhte Sensibilität des Transposonmutanten 14C5 gegenüber oxidativem Streß ist hinreichend zur Erklärung der beobachteten phänotypischen Eigenschaften.

3.8.5. 15A3

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten:	0,6
in AB- Serum :	0,4
Q_{AB} :	0,7

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA5252
Bezeichnung:	<i>yheS</i>
Funktion:	möglicher ATP- Bindungsteil eines ABC- Transporters

Strukturmerkmale / Homologien: 70% Ähnlichkeit zu hypothetischem Protein YheS aus *E.coli*
Strukturmotiv der ABC- Transporter - Familie

Nukleotidsubstitution: synonym: 1646 A → T

Länge : 1917 Bp = 638 As.

Transposoninsertion: Position 1379 (8 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

PA5252 liegt in gleicher Leserichtung auf dem PAO- Genom direkt hinter *algP*, dem Transkriptionsregulator der Alginatsynthese und ist das letzte bekannte Gen in einem Cluster von Genen, die der Alginatsynthese zuzuordnen sind. Alle sind in der gleichen Leserichtung wie *algP* und PA5252 codiert. Auf PA5252 folgen ohne offensichtliche Terminationsstruktur 5 weitere (hypothetische) Gene ohne bekannte Homologien. Ein Einfluß der Insertion auf die Transkription dieser Gene ist wahrscheinlich.

Zusammenfassung

PA5252 könnte aufgrund seiner Lage im PAO- Genom eventuell eine bisher unbekannt Funktion in der Regulation der Alginatsynthese haben. Das Ausschalten dieses Gens führte zu einer deutlich erhöhten Sensibilität gegenüber Blutserum, das intrazelluläre Überleben in Granulozyten schien hingegen kaum beeinflusst zu sein. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Beobachtung wäre, daß es durch das Aus-

schalten von PA5252 zu einer Verringerung der Alginatproduktion der Transposonmutanten kam. Die Bakterien hatten dadurch keine oder eine dünnere Alginathülle, so daß das Komplementsystem des Blutserums die bakteriellen Zellmembranen besser angreifen konnte.

Solange aber keine Bindungspartner für PA5252 bekannt sind und somit auch keine eindeutige Funktionszuweisung möglich ist, bleibt jeder Erklärungsversuch eine Spekulation.

3.8.6. 15B10

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten:	1,0
in AB- Serum :	2,7
Q _{AB} :	2,7
weitere Eigenschaften :	Überlebte von allen untersuchten Transposonmutanten bei Inkubationen mit Granulozyten am besten.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA5040
Bezeichnung:	<i>pilQ</i>
Funktion:	Notwendig zum Aufbau von TypIV- Fimbrien. Bildet eine basale Komponente, durch die die Pili- Proteine ausgeschleust werden. Typ IV- Fimbrien sind notwendig für Motilität ("Twitching motility") und Kontakt zu Oberflächen (HOBBS & MATTICK 1993)
Strukturmerkmale / Homologien:	Signatur eines bakteriellen Typ II- Sekretions- systems. Zu Beginn Signatur eines Signalpeptids zur Ausschleusung des Proteins aus dem Bakterium.
Nukleotidsubstitutionen:	synonym: 488C → T; 743C → T; 803T → C
Länge :	2145 Bp = 714 As.
Transposoninsertion:	Position 436 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

pilQ ist das letzte Gen der polycistronischen Genkassette *pilMNOPQ*. Direkt im Anschluß sind ohne offensichtliche Terminationsstrukturen weitere Gene kodiert, die eine Funktion im Aminosäuremetabolismus (aromatische Aminosäuren) oder der Häm- Synthese haben. Inwieweit diese Gene zusammen mit den Pili- Genen abgelesen werden, ist unklar.

Zusammenfassung

Die hohe Überlebensrate des *P.aeruginosa* - Transposonmutanten 15B10 ließ sich in erster Linie auf eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Blutserum zurückführen. Die eventuell zusammen mit *pilQ* von RNA- Polymerasen abgelesenen Gene zur Aminosäure- oder Häm- Synthese werden wahrscheinlich keinen entscheidenden Einfluß auf die Serumstabilität von Bakterien haben. Es ist daher anzunehmen, daß die beobachteten Veränderungen im Phänotyp tatsächlich auf das Fehlen des entsprechenden Genprodukts zurückzuführen sind.

3.8.7. 18A12

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten :	nicht quantifiziert
in AB- Serum :	nicht quantifiziert
weitere Eigenschaften :	Überlebt schlecht in Granulozyten, Überlebensrate in Selektion I: ca.0,2 (Kap. 3.4.)

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA2613
Bezeichnung:	<i>ycaJ</i>
Funktion:	Konserviertes, hypothetisches Protein
Strukturmerkmale / Homologien:	74% Ähnlichkeit mit möglichem Polynukleotid- Enzym YcaJ (<i>E.coli</i>); ATPase- Domäne
Nukleotidsubstitutionen :	synonym: 248G → C; 332A → G; 1028C → T
Länge :	1326 Bp = 441 As.
Transposoninsertion:	Position 621 (10 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

PA2613 liegt in *P.aeruginosa* PAO ohne eigenen Promotor oder Terminationsstruktur in einer vermuteten polycistronischen Genkassette:

ftsK → *lolA* → PA2613 → *serS* → *cysG*

ftsK: Regulation der Zellteilung

lolA: Chaperone

serS: Seryl-t-RNA Synthetase

cysG: Sirohäm Synthase (UroporphyrinogenIII- Methylase)

Es ist zu vermuten, daß die Insertion des Transposons in PA2613 ebenfalls die Transkription der Gene *serS* und *cysG* beeinflußt hat.

Zusammenfassung

Es blieb unklar, ob die Veränderung des Phänotyps auf das Ausschalten des Gens PA2614 zurückzuführen ist, oder auf die verringerte Transkription eines der Gene *serS* oder *cysG*. Solange keine Informationen über die Funktion oder die Bindungspartner des ausgeschalteten Gens verfügbar sind, ist nicht einmal eine Spekulation über die Ursache der erhöhten Sensitivität der Transposonmutanten möglich.

3.8.8. 19C2

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten:	0,06
in AB- Serum :	1,2
Q_{AB} :	20
Quorum Sensing :	verringerte Produktion v. Auto-inducern
weitere Eigenschaften :	verringerte Proteasesekretion (vergl. Kap.3.7.3)

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA1572
Funktion :	Hypothetisches Protein, unklassifiziert
Strukturmerkmale / Homologien:	56% Ähnlichkeit zu einem 377 As. langen hypothetischen Protein bei <i>Pyrococcus horikoshii</i> .

Nukleotidsubstitutionen : nicht- synonym: ACC → GCC: T354A
synonym: 1007C → G
Länge : 1146 Bp = 382 As.
Transposoninsertion: Position 980 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Die letzten 20 Basen der kodierenden Sequenz von PA1572 bilden zusammen mit der nachfolgenden Sequenz eine typische Terminationsstruktur. Es ist daher nicht anzunehmen, daß weitere Gene zusammen mit PA1572 transkribiert werden.

weitere Untersuchungen

In Kap. 3.7.3. wurde gezeigt, daß die verringerte Sekretion von Proteasen und Homoserinlactonen durch Inkubation mit *P.aeruginosa* TB_{wt} bis fast auf die Ausgangswerte des Wildtyps gesteigert werden konnte.

Zusammenfassung

Bei dem Transposonmutanten 19C2 wurde ein Gen ausgeschaltet, das für das intrazelluläre Überleben in Granulozyten essentiell ist. Von allen untersuchten Transposonmutanten zeigte 19C2 die deutlichsten Unterschiede zwischen den Überlebensraten in AB- Serum und denen in Granulozyten. Zusätzlich ist auch die Produktion von Homoserinlactonen durch die Transposoninsertion deutlich verringert worden. Durch Inkubation mit *P.aeruginosa* TB_{wt} kann deren Produktion aber deutlich stimuliert werden. Da in den Datenbanken keine Informationen über das ausgeschaltete Gen verfügbar sind, kann dem kodierten Protein bisher keine Funktion zugeordnet werden.

3.8.9. 20A6

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten : 0,2
in AB- Serum : 0,8
Q_{AB} : 4

weitere Eigenschaften : zeigte bei Selektionsexperimenten mit Granulozyten konstant Überlebensraten, die geringer als beim *P.aeruginosa* TB- Wildtyp, aber höher als bei den anderen im Selektionstest gefundenen Mutanten waren.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer : PA3953
Funktion : Konserviertes hypothetisches Protein
Strukturmerkmale / Homologien: 55% Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Protein YrdC (*B.subtilis*)
Domäne mit schwacher Ähnlichkeit zur Isochorismatase- Familie
Nukleotidsubstitution: Promotor: -237C →T
Länge : 582 Bp = 193 As.
Transposoninsertion: Position 29 (10 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA3953 existiert keine offensichtliche Terminationsstruktur. Es wäre somit möglich, daß dieses Gen zusammen mit den nachfolgenden (alle unklassifiziert und hypothetisch) in einer polycistronischen Genkassette transkribiert wird.

Zusammenfassung

Aufgrund der wenigen verfügbaren Informationen aus den Datenbanken war eine Funktionszuordnung nicht möglich.

3.8.10. 22D11

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten : 0,08
in AB- Serum : 0,7
Q_{AB} : 9

weitere Eigenschaften : In mikroskopischen Beobachtungen erschien der Mutant unbeweglich, in Invasivitätstests mit Epithelzellen zeigte er fast keine Invasivität.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA1441
Funktion :	hypothetisches, unklassifiziertes Protein vermutl. Flagellenaufbau
Strukturmerkmale / Homologien:	47% Ähnlichkeit mit <i>fliK</i> (<i>S.typhimurium</i>)
Nukleotidsubstitutionen:	nicht-synonym: GCC → GTC: A74V GTC → GCC: V82A synonym: 164G → A; 776C → T Promotor: -82C → G; -29G → A
Länge :	1284 Bp = 427 As.
Transposoninsertion:	Position 583 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

An PA1441 schließt sich eine deutliche Terminationsstruktur an. Es ist daher nicht anzunehmen, daß andere Gene zusammen mit PA1441 transkribiert werden.

weitere Informationen

Der Aufbau von Flagellen wurde am Beispiel von *S.typhimurium* und *E.coli* detailliert untersucht. Hiernach sind die zur Synthese der Flagellen notwendigen Gene in drei großen benachbarten Operons angeordnet. Erst nachdem alle Proteine, die in einem Operon kodiert sind, vollständig synthetisiert und entsprechend ihrer Funktion in das entstehende Flagellum eingebaut sind, wird das nächste Operon abgelesen. *fliK* ist dabei das letzte Gen des zweiten Operons, mit dem die Basalplatte des Flagellums vollständig aufgebaut ist. FliK hat dabei in *S.typhimurium* mindestens zwei Funktionen. Zum einen legt es die Spezifität des zentralen Kanals der Basalplatte fest und reguliert, ob Proteine für den Haken des Flagellums oder das Flagellin selber exportiert werden (MACNAB 1992). Zum anderen funktioniert es als Chaperon für die durch den Kanal geschleusten Proteine. Wird *fliK* in *S.typhimurium* ausgeschaltet, so sind die Mutanten unbeweglich und weisen entweder keine Flagellen auf oder haben anstelle korrekt zusammengesetzter Flagellen funktionslose verlängerte Flagellenhaken („Poly- Hooks“), die eine korkenzieherartige Struktur aufweisen (MINAMINO ET AL. 1999).

Die o.g. Operonstruktur ist prinzipiell auch in *P.aeruginosa* zu finden. Allerdings ist das letzte Gen des zweiten Operons (*fliK*) durch eine Insertion von 372 kBp vom

Rest des Operons getrennt, das nun mit *fliJ* endet. *fliK* selber liegt weiterhin direkt vor dem 3. Operon zur Flagellensynthese, wird von diesem aber durch eine deutliche Terminationsschleife getrennt.

weitere Untersuchungen

Bei den Untersuchungen zur Invasivität in Epithelzellen (Kap. 3.5.1.) zeigten Mutanten mit einer Transposoninsertion in *fliK* die geringste Invasivität. Ebenfalls fiel bei der Beobachtung im Mikroskop auf, daß sie vollständig unbeweglich waren. Zur genaueren Untersuchung wurden daher elektronenmikroskopische Aufnahmen ihrer Flagellen angefertigt:

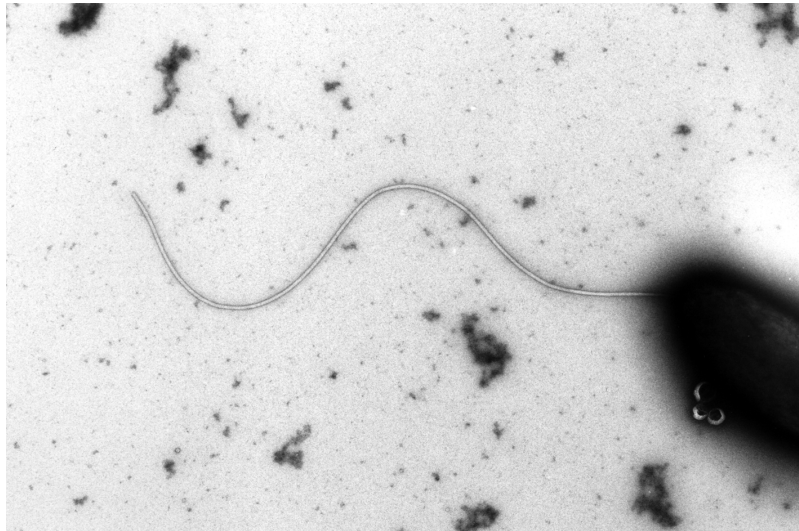


Abb. 3.30. Elektronenmikroskopische Aufnahme des Flagellums von *P.aeruginosa* TB- Wildtyp (34500 x)

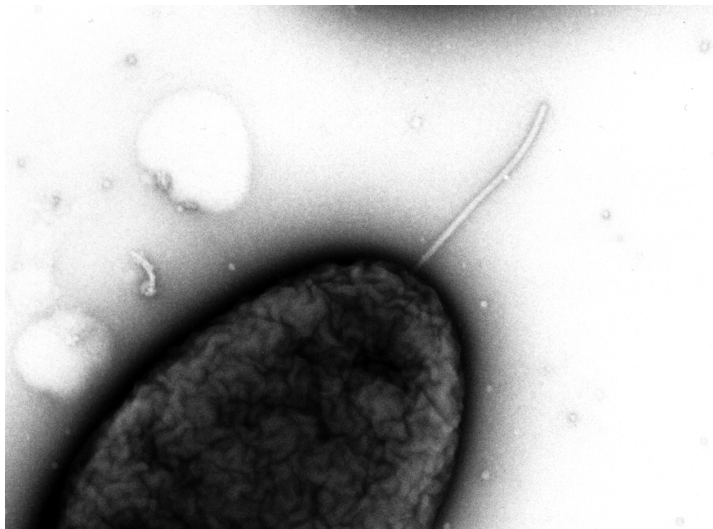


Abb. 3.30. Elektronenmikroskopische Aufnahme des Flagellums des *P.aeruginosa* Mutanten 22D11 (69000 x)

Auf diesen Aufnahmen ist zu sehen, daß die Flagellen des *P.aeruginosa*- Transposonmutanten 22D11 deutlich verkürzt ist. Ca. 90% der beobachteten Bakterien zeigten den abgebildeten Phänotyp, bei den restlichen war gar kein Flagellum zu sehen. In *S.typhimurium* führt das Ausschalten von *fliK* zur Bildung verlängerter Hakenstrukturen. Um entscheiden zu können, ob die gesehenen Strukturen verkürzte Flagellen oder verlängerte Haken sind, wurden die Flagelline fixierter Bakterien (*P.aeruginosa* TB_{wt}, *P.aeruginosa* 22D11 und *E.coli* DH5 α) mit einem spezifischen Anti- Flagellin- Antikörper (gegen Flagellin Typ b, SPANGENBERG 1997) detektiert.

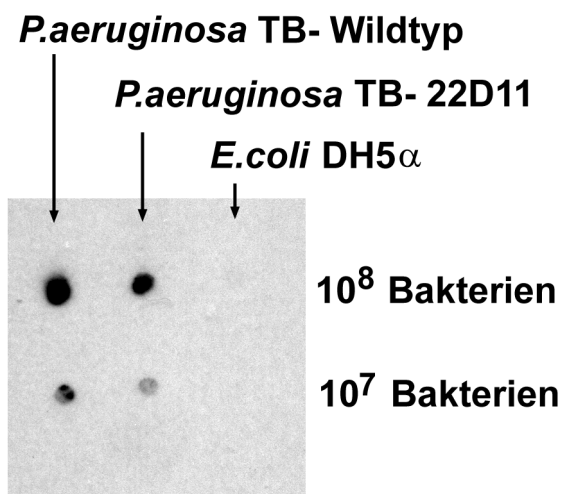


Abb. 3.32.

Immunologische Detektion der Flagellen von *P.aeruginosa* TB- Wildtyp, dem Mutanten 22D11 und *E.coli* DH5 α mit einem *P.aeruginosa*- spezifischen Anti- Flagellin- Antikörper.

Es ist deutlich zu sehen, daß das Signal der Transposonmutanten schwächer ist als das des Wildtyps. Es ist aber trotzdem sehr viel stärker als das unspezifische Signal, das bei *E.coli* zu sehen ist. Dies war ein deutlicher Hinweis darauf, daß die elektronenmikroskopisch beobachteten Strukturen verkürzte Flagellen und keine verlängerten Haken sind. Die Verkürzung führte zu den beobachteten schwächeren Färbungen, bei einem verlängerten Haken wäre das zu erwartende Signal aber eher mit dem von *E.coli* vergleichbar gewesen.

Zusätzlich wurde zur Überprüfung der Genomstruktur in *P.aeruginosa* TB noch eine PCR mit Primern auf *fliK* und *fliJ* durchgeführt. Erwartungsgemäß gab es kein PCR-Produkt. Dies bestätigt, daß auch in *P.aeruginosa* TB diese beiden Gene nicht benachbart liegen.

Zusammenfassung

Die Expression von FliK ist essentiell für die Motilität von *P.aeruginosa*. Allerdings wird im Gegensatz zu *E.coli* und *S.typhimurium* bei Ausschalten des Gens auch weiterhin ein verkürztes Flagellum aufgebaut. In *P.aeruginosa* ist *fliK* vom Rest des zweiten Operons zur Flagellensynthese durch eine große Insertion getrennt. Es ist daher anzunehmen, daß die Expression von FliK noch durch weitere Faktoren reguliert wird. Auch die Funktion ist nicht vollständig geklärt. Während die Aufgabe von FliK in der Flagellensynthese gut untersucht werden konnte, ist dennoch nicht vollständig aufgeklärt, warum das Ausschalten des entsprechenden Gens zu einer verringerten intrazellulären Überlebensfähigkeit in Granulozyten führte. Eine logische Vermutung aufgrund der großen Ähnlichkeit im Aufbau von Flagellen und TypIII-Sekretionssystemen (MACNAB 1999) wäre, daß FliK auch am Aufbau von TypIII-Transportsystemen beteiligt ist und auch dort eine Aufgabe in der Erkennung der auszuschleusenden Proteine hat. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, daß es evolutionär für *P.aeruginosa* keinen Nachteil darstellte, die Expression von *fliK* und die Flagellensynthese zu entkoppeln.

3.8.11. 23B9

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten :	nicht quantifiziert
in AB- Serum :	nicht quantifiziert
weitere Eigenschaften :	Überlebt schlecht in Granulozyten, Überlebensrate in Selektion I: ca.0,2

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA2468
Funktion:	Möglicher σ^{70} - Faktor (ECF- Familie)
Strukturmerkmale / Homologien:	70% Ähnlichkeit zu σ^{70} - Faktor Fecl (<i>E.coli</i>) Strukturelemente der σ^{70} - Faktor ECF- Familie
Länge :	519 Bp = 173 As.
Transposoninsertion:	Position 367 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Im *P.aeruginosa* PAO- Genom sind hinter PA2468 viele Gene angeordnet, die dem Bereich Signalübertragung und Regulation zuzuordnen sind. PA2468 und PA2467 (mögl. Transmembransensor) werden zusammen transkribiert, evtl. sogar noch weitere Gene (z.B. PA2466: mögl. TonB- abhängiger Rezeptor).

Zusammenfassung

Die phänotypischen Veränderungen waren bei diesem Mutanten nicht eindeutig dem ausgeschalteten Gen zuzuweisen. Auf den nächsten 20 kBp, die auf das Transposon folgen sind insgesamt 10 Proteine kodiert, die alle Funktionen als Signalrezeptoren oder Transmembransensoren haben.

3.8.12. 24A12

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten:	1,0
in AB- Serum :	0,15
Q _{AB} :	0,15
weitere Eigenschaften :	Dieser Mutant zeigte an Epithelzellen eine zehnfach höhere Invasivität als der Wildtyp (s. Kap. 3.5.1.) Im Proteasetest (Kap.3.7.3.) zeigte er eine verringerte Proteasesekretion.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA3192
Bezeichnung:	<i>gltR</i>
Funktion:	2-Komponenten Response Regulator, Transkriptionsregulator für Katabolismus von Kohlenhydraten, im besonderen Glucoseabbau.
Strukturmerkmale / Homologien:	Strukturmerkmale eines Transkriptionsregulators (C- terminal) und einer Response Regulator Receiver- Domäne
Nukleotidsubstitutionen:	synonym: 302C → T; 449G → A; 518T → C
Länge :	729 Bp = 242 As.
Transposoninsertion:	Position 429

Einfluß auf benachbarte Gene

PA3192 liegt in einem Cluster zusammen mit anderen Genen, die für Enzyme zum Abbau von Glucosephosphat kodieren oder die diese Stoffwechselprozesse regulieren. Das Ende der kodierenden Sequenz von PA3192 könnte eine Haarnadelschleife ausbilden, es fehlt aber eine AT-reiche Sequenz, so daß diese Struktur, selbst wenn sie eine Terminationsschleife darstellt, sicher nur ein schwaches Terminationssignal ist. Es ist wahrscheinlicher, daß die nachfolgenden Gene zusammen mit PA3192 in einer RNA transkribiert werden.

weitere Informationen

Über die Funktion des Gens PA3192 als Regulator des Glucosetransports existiert zur Zeit nur eine einzige Quelle (SAGE AE ET AL., 1996).

weitere Untersuchungen

In den veröffentlichten Untersuchungen wird GltR eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Glucosetransports unter aeroben Bedingungen zugesprochen. Knock-out Mutanten waren nach den publizierten Untersuchungen nicht mehr in der Lage, auf einem Minimalmedium mit 20 mM Glucose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Ebenfalls war bei Pulse-Chase-Experimenten mit radioaktiv markierter Glucose keine Aufnahme oder Metabolisierung nachweisbar (SAGE AE ET AL., 1996). Um dies für *P.aeruginosa* TB zu überprüfen, wurden Wildtyp und Transposonmutant auf glucosehaltigem M9-Minimalmedium inkubiert.

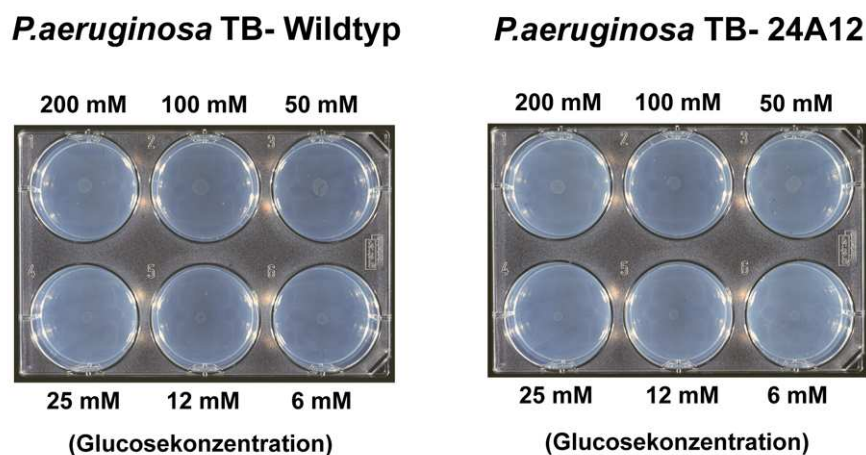


Abb 3.33. *P.aeruginosa* TB- Wildtyp und Mutant 24A12 wurden auf M9- Minimalmedium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen aufgetragen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Es waren keine Unterschiede im Wachstum zu sehen.

Bei keiner der untersuchten Glucosekonzentrationen war eine Abweichung im Wachstum von Wildtyp und Transposonmutant zu sehen. Dies bedeutet, daß entweder die Schlußfolgerungen aus den in der Literatur angegebenen Resultaten fehlerhaft sind oder daß *P.aeruginosa* TB die Aufnahme von Glucose auf eine andere Art reguliert als *P.aeruginosa* PAO1.

Beide Möglichkeiten sind bisher nicht auszuschließen. Zum Ausschalten von *gltR* wurde das Gen in der Literatur durch Einfügen eines ca. 4 kB großen DNA-Fragments ausgeschaltet. Dies kann nicht nur *gltR* selbst ausgeschaltet haben, sondern auch die Expression der nachfolgenden Gene verhindert haben, die alle eine Funktion im Metabolismus oder Transport von Glucose haben. GltR mag tatsächlich eine Rolle im Glucose-Stoffwechsel spielen -die genomische Lokalisation legt dies nahe- ob aber der in der Literatur erhobene Anspruch der Kontrolle des gesamten Glucosetransports berechtigt ist, bleibt nach den vorliegenden Ergebnissen zweifelhaft.

Zusammenfassung

GltR ist in *P.aeruginosa* TB nicht für die Regulation der Glucoseaufnahme unter aeroben Bedingungen verantwortlich. Das Ausschalten dieses Gens verringerte deutlich die Resistenz des Transposonmutanten gegenüber Blutserum. Das intrazelluläre Überleben in Granulozyten wurde davon nicht beeinträchtigt. Bei Inkubation mit Epithelzellen wurde eine fast zehnfach erhöhte Invasivität beobachtet. Dies könnte eventuell auf eine veränderte Oberflächenstruktur des Bakteriums durch einen abweichend regulierten Kohlenhydratmetabolismus hindeuten. Über den Zusammenhang des ausgeschalteten *gltR* mit der verringerten Proteasesekretion liegen in den Datenbanken keine weiteren Informationen vor.

3.8.13. 24C5

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten :	nicht quantifiziert
in AB- Serum :	nicht quantifiziert
weitere Eigenschaften :	Überlebt schlecht in Granulozyten, Überlebensrate in Selektion I: ca.0,1 Die Invasivität in Epithelzellen war ebenso wie des Adhärenz verringert.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA5551
Funktion:	hypothetisches Protein
Strukturmerkmale / Homologien:	In <i>E.coli</i> bilden <i>glmS</i> und <i>glmU</i> ein Operon. In <i>P.aeruginosa</i> PAO liegen PA5551 und PA5550 zwischen diesen Genen.
Nukleotidsubstitutionen:	nicht-synonym: GGC → GAC : G82D TGG → TTG : W154L synonym: 494A → G
Länge :	510 Bp = 169 As.
Transposoninsertion:	Position 393 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

glmS, PA5550 (Regulator), PA5551 und *glmU* bilden in *P.aeruginosa* PAO zusammen eine polycistronische Genkassette und werden zusammen transkribiert. Durch die Insertion des Transposons in PA5551 ist daher auch mit einem Ausfall der Gene PA5550 und *glmS* zu rechnen.

weitere Informationen

Die Gene *glmS* und *glmU* kodieren für Enzyme, die am Metabolismus von Aminozuckern beteiligt sind. Ein Ausfall dieser Gene kann somit zu Veränderungen in der Zellwand und der LPS- Struktur führen.

Zusammenfassung

Der Mutant 24C5 wies eine geringere Überlebensrate bei Inkubation mit Granulozyten auf. Ebenso zeigte er in Invasivitätstests mit Epithelzellen eine geringere Adhärenz und Invasivität. Auch wenn bisher unklar ist, ob PA5551 selbst etwas mit dem Metabolismus von Aminozuckern zu tun hat, so ist dennoch durch die Position der Transposoninsertion zumindest das Gen *glmS* in seiner Transkription beeinflusst. Dies kann zu Veränderungen in der Struktur der Zellwand und des LPS führen und damit schließlich auch eine veränderte Adhärenz des Transposonmutanten verursachen.

3.8.14. 37D8

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten :	0,2
in AB- Serum :	0,3
Q _{AB} :	1,5
Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA4785
Funktion:	AcylCoA- Thiolase
Strukturmerkmale / Homologien:	74% Ähnlichkeit zu FadA2 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) Strukturmerkmal von Thiolase- Acyl Enzymen
Länge :	1278 Bp = 425 As.
Transposoninsertion:	Position 926 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene



Abb.3.34. Schematische Darstellung der Sequenzumgebung der Transposoninsertion bei dem Mutanten 37D8.

Die Gene PA4785 und PA4786 kodieren beide für Enzyme des Fettsäuremetabolismus. Sie sind allerdings auf verschiedenen DNA- Strängen kodiert. Das Gen PA4784 kodiert für ein Regulatorprotein und liegt auf dem gleichen DNA- Strang wie PA4786. Entsprechendes gilt für PA4787 (Regulator) und PA4785. Im Sequenzbereich von PA4784 bis PA4787 existieren keine offensichtlichen Terminationsstrukturen. Es wäre daher denkbar, daß hier jeweils ein Regulator und ein Protein für den Fettsäurestoffwechsel zusammen transkribiert werden. Aufgrund dieser überlappen-

den Struktur wäre es deshalb möglich, daß die Transposoninsertion in PA4785 ebenfalls die Transkription von PA4786 (Bestandteil des Acyl- Carrier- Protein-Komplexes) beeinflußt, obwohl dieses Gen auf dem Gegenstrang kodiert ist.

Zusammenfassung

Welches der Gene PA4785 oder PA4786 hier für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist, ist nach den vorliegenden Daten nicht zu entscheiden. Für bei dem Aufbau der Homoserinlacton- Seitenkette durch LasI oder RhII ist ein Acyl- Acyl Carrier Protein (PA4786) als Donor notwendig (Kap. 1.1.4.2.). Die AcylCoA- Thio-lase (PA4785) katalysiert dagegen einen Schritt in der Elongation von Fettsäuren. Ein Ausschalten dieses Proteins kann daher ebenfalls zu einem Defekt in der Produktion der Homoserinlacton- Seitenkette führen.

3.8.15. 41D3

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten :	0,05
in AB- Serum :	0,4
Q _{AB} :	8
Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA5349
Funktion:	mögliche Rubredoxin Reduktase
Strukturmerkmale / Homologien:	59% Ähnlichkeit mit Rubredoxin Reduktase von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> partielle Signatur einer Aromaten-Hydroxylase (Flavoproteinmonooxygenase), Strukturmerkmal einer Pyridinnukleotid- Disulfidoxidoreduktase
Nukleotidsubstitutionen:	synonym: 893G → C; 1055T → C
Länge :	1155 Bp = 384 As.
Transposoninsertion:	Position 977 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Die Gene vor PA5349 kodieren für verschiedene Enzyme des Kohlenstoffkatabolismus. PA5350 und PA5351 für zwei Rubredoxin- ORFs, das auf PA5349 folgende Gen (PA5348) kodiert für ein mögliches DNA- bindendes Protein, dem (in den Datenbanken) eine Funktion in der DNA- Replikation, - Modifikation, - Rekombination oder - Reparatur zugewiesen wird. Alle diese Gene (von PA5355 bis 5347) werden vermutlich in einem Zuge von der RNA- Polymerase abgelesen.

weitere Informationen

Rubredoxin Reduktase ist eine Flavoproteinioxidoreduktase (EGGINK G ET AL., 1990). Sie arbeitet zusammen mit Rubredoxin und oxidiert so aliphatische Kohlenwasserstoffe mit Sauerstoff zu der entsprechenden Carbonsäure, die dann von anderen Enzymen weiter metabolisiert werden kann. Rubredoxin Reduktase hat allerdings auch noch eine weitere Funktion: Sie wirkt in einigen anaeroben Bakterien zusätzlich als Schutz gegen oxidativen Streß (LUMPPPIO HL ET AL.,2001). Auch bei Bakterien mit aerobem Stoffwechsel können Rubredoxin und Rubredoxin Reduktase ein wichtiger Schutz gegen oxidativen Streß sein. So können sie z.B. in *E.coli* die Superoxiddismutase ersetzen (PIANZZOLA MJ ET AL. 1996).

In *P.aeruginosa* wird die Expression zweier Superoxiddismutasen und einer Katalase direkt über das LasR/LasI- System reguliert. Das Quorum Sensing ist somit auch in diesem Bakterium notwendig zur Kontrolle von oxidativem Streß. Mutanten mit einem Defekt in einem der beiden Regulationssysteme zeigen eine verringerte Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid (HASSETT DJ ET AL. 1999), wie es auch hier beim Ausschalten der Rubredoxin- Reduktase zu beobachten war (s. unten).

weitere Untersuchungen

Entsprechend den Untersuchungen bei dem Mutanten 14C5 wurde auch der Mutant 41D3 auf seine Sensibilität gegenüber Peroxiden überprüft. Das entsprechende Bild ist in Kap. 3.8.4. zu sehen. Auch dieser Mutant zeichnete sich durch eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativem Streß aus.

Zusammenfassung

Der Transposonmutant 41D3 zeigte in der Inkubation mit Granulozyten eine deutlich verringerte Überlebensfähigkeit. Dies kann - ähnlich wie bei dem Mutanten 14C5 mit dem Defekt in der Helikase - auf Grundlage der Ergebnisse der Inkubation auf peroxidhaltigem Vollmedium, direkt auf eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativem Streß zurückgeführt werden. Ob hierbei die verminderte Resistenz auf das Ausschalten der Rubredoxin Reduktase durch die Transposoninsertion direkt zurückzuführen ist, oder ob das folgende Gen, dem (in den Datenbanken) eine mögliche Funktion in der DNA- Reparatur zugesprochen wird, ist aus diesen Ergebnissen noch nicht abschließend zu entscheiden.

Allerdings ist bekannt, daß in *P.aeruginosa* an der Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid in der stationären Phase mindestens zwei Superoxiddismutasen und eine Katalase beteiligt sind (HASSETT DJ ET AL. 1999). In diese Kategorie könnte auch die funktionell sehr ähnliche Rubredoxinreductase einzuordnen sein. Dies würde die verringerte Überlebensfähigkeit in Granulozyten erklären.

Weiterhin produzierte der Mutant 41D3 keine Homoserinlactone. Wie es durch die Transposoninsertion in der Rubredoxin Reduktase zu einem Ausschalten des Quorum Sensings kommen kann, ist bislang unbekannt. Eine Vermutung wäre, daß die Rubredoxin Reduktase notwendig ist, um aliphatische hydrophobe Verbindungen so zu oxidieren, daß sie im Fettsäuremetabolismus verarbeitet werden können. Der Ausfall dieses Enzyms könnte die Synthese von aliphatischen Homoserinlactonen beeinflussen, da durch den Knock- out keine oder nur wenige aliphatischen Seitenketten für die AHL- Synthese in den Mutanten vorhanden sind. (s. Mutant 3D1)

3.8.16. 47D7

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten :	0,3
in AB- Serum :	0,15
Q_{AB} :	0,5
Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer : Nicht im PAO- Genom vorhanden

weitere Informationen

Auf Proteinebene existiert eine geringe Ähnlichkeit ($2 \cdot e^{-19}$) zwischen der sequenzierten Region und einem hypothetischen ORF von *Salmonella typhi*. Auf Nukleotidebene gab es keine Homologien.

weitere Untersuchungen

In einer Southern- Hybridisierung wurde die mit *Pst*I- verdauten genomischen DNA verschiedener *P.aeruginosa* - Isolate mit der flankierenden Sequenz der Transposoninsertion hybridisiert:

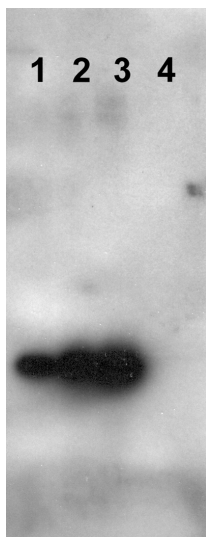


Abb. 3.35.

Southern Hybridisierung *Pst*I- verdauter genomischer DNA verschiedener *P.aeruginosa*- Isolate mit der unbekanntes DNA-Sequenz aus dem Mutanten 47D7.

- 1: *P.aeruginosa* CSGB8
- 2: *P.aeruginosa* SG17M
- 3: *P.aeruginosa* TB
- 4: *P.aeruginosa* PAO

Die unbekanntes DNA- Sequenz ist nicht nur in *P.aeruginosa* TB sondern auch in den beiden untersuchten Isolaten *P.aeruginosa* CSGB8 und SG17M vorhanden. Mit *P.aeruginosa* PAO zeigte sich erwartungsgemäß kein Signal.

Zusammenfassung

Die unbekanntes Sequenz ist keine klonspezifische DNA von *P.aeruginosa* TB, da sie auch in zwei Isolaten des Klons C (*P.aeruginosa* SG17M und CSGB8) vorkommt. Eine Transposoninsertion in diesem Bereich, der in *P.aeruginosa* PAO nicht existiert, schaltete das Quorum Sensing von *P.aeruginosa* TB vollständig aus. Dies bedeutet, daß das Quorum Sensing in diesen Bakterien teilweise anders reguliert

wird. Außerdem werden in der unbekannt DNA- Sequenz - zumindest in einer Subpopulation von *P.aeruginosa* - zusätzliche entscheidende Faktoren für die Expression des Quorum Sensings kodiert, die bei Untersuchungen des genetischen Referenzstammes PAO nicht gefunden werden.

3.8.17. B7A11

Phänotypische Eigenschaften

Quorum Sensing :	keine Produktion von kurzkettigen AHL, nur sehr geringe Produktion von langkettigen AHL.
weitere Eigenschaften :	Proteasesekretion nicht ausgeschaltet

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA5415
Funktion:	Serinhydroxymethyltransferase (Aminosäurebiosynthese und -metabolismus: Gly-, Ser-, Thr- Metabolismus, Lys- Synthese, CH ₄ - Metabolismus und C ₁ - Reservoir)
Strukturmerkmale / Homologien:	82% Ähnlichkeit mit Serinhydroxymethyltransferase aus <i>E.coli</i> . Strukturmotiv einer Aminotransferase Klasse II und eine Bindungsstelle für Pyridoxalphosphat.
Nukleotidsubstitutionen:	nicht-synonym: CGG → CAG : R76Q GGG → GCC : G304A synonym: 161C → T; 228G → A 251T → C; 287G → A; 308A → G; 416A → C; 770T → C; 935T → C
Länge :	1254 Bp = 417 As.
Transposoninsertion:	Position 567 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA5415 existieren mindestens 4 verschiedene Möglichkeiten, um Terminationsstrukturen auszubilden. Möglicherweise handelt es sich dabei um Proteinbindungsstellen, durch die die Transkription und Translation der folgenden Gene (Sarkosin- Oxidase und Proteine des C₁- Metabolismus) reguliert werden können.

Zusammenfassung

Eine inhaltliche Verbindung der Serinhydroxymethyltransferase zum Quorum Sensing ist der aktuellen Literatur nicht zu entnehmen. Der einzige bekannte Zusammenhang besteht darin, daß die Serinhydroxymethyltransferase eine Funktion im C1- Metabolismus hat. S-Adenosylmethionin ist sowohl ein internes Reservoir für den C1- Metabolismus, andererseits aber auch für die Produktion von Homoserinlactonen notwendig. Eventuell kommt es durch das Ausschalten der Serinhydroxymethyltransferase zu einer Verringerung der Konzentration an verfügbarem S-Adenosylmethionin.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß das Substrat des ausgeschalteten Proteins nicht Serin, sondern Homoserin ist und so das Quorum Sensing direkt betroffen wäre. Die bei der Erstellung der Datenbank verwendeten Algorithmen zur Funktionszuweisung können einen solchen Unterschied nicht erkennen.

3.8.18. B7D3

Phänotypische Eigenschaften

Quorum Sensing :	Verstärkt
weitere Eigenschaften :	Verstärkte Proteasesekretion (s. Kap.3.7.3.)

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA0740
Bezeichnung :	<i>yjcS</i>
Funktion:	mögliche β - Lactamase
Strukturmerkmale / Homologien:	62% Ähnlichkeit mit hypothetischem Protein YjcS aus <i>E.coli</i> Strukturmerkmale der Metallo- β - Laktamase Superfamilie
Nukleotidsubstitutionen:	synonym: 452T \rightarrow C; 545T \rightarrow G; 551T \rightarrow C; 893C \rightarrow T; 908T \rightarrow C; 950T \rightarrow C
Länge :	1977 Bp = 658 As.
Transposoninsertion:	Position 680 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Alle Gene in der Umgebung von PA0740 werden auf dem anderen DNA- Strang kodiert. PA0740 selber hat eine typische Promotor- und Terminatorstruktur. Cis-Effekte sind somit auszuschließen.

weitere Untersuchungen

Eine Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) verschiedener β -Lactam- Antibiotika zeigte keine gesteigerte Sensibilität des Transposonmutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Zusammenfassung

Aufgrund der fehlenden Kenntnisse über die Spezifität der gefundenen β -Lactamase ist keine Aussage über die Funktion des gefundenen Enzyms möglich. Eine Hypothese wäre, daß es sich bei dem kodierten Enzym nicht um eine β -Lactamase, sondern um eine Homoserinlactonase handelt, die an der Inaktivierung von Autoinducern beteiligt ist. Über den Abbau von Homoserinlactonen ist bisher nichts bekannt. Ein Defekt im Abbauweg würde aber die in den Messungen (Kap. 3.6.) gefundene erhöhte Konzentration an Homoserinlactonen bei diesen Transposonmutanten gut erklären. Ebenfalls kann mit dieser Hypothese durch die erhöhte Autoinducerkonzentration auch die verstärkte Proteasesekretion des Mutanten B7D3 erklärt werden.

3.8.19. D8A3

Phänotypische Eigenschaften

Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA0652
Bezeichnung:	vfr
Funktion:	Transkriptionsregulator für Quorum Sensing

Strukturmerkmale / Homologien: cAMP- Rezeptor
Länge : 645 Bp = 214 As.
Transposoninsertion: Position 349

Einfluß auf benachbarte Gene

Alle Gene in der Umgebung von PA0652 werden auf dem anderen DNA- Strang kodiert. PA0652 selber hat eine typische Promotor- und Terminatorstruktur. Cis-Effekte sind somit auszuschließen.

weitere Informationen

Vfr ist ein übergeordneter Regulator für das gesamte Quorum Sensing in *P.aeruginosa* (ALBUS AM, IGLEWSKI BH ET AL. 1997) (s. Kap. 1.1.4.2.).

Zusammenfassung

Vfr ist einer der zentralen Regulatoren des Quorum Sensing. Daß die Transposoninsertion in dieses Gen die Sekretion von Homoserinlactonen ausschaltete, war demnach zu erwarten gewesen. Auf der anderen Seite aber war dieses Ergebnis positiv zu bewerten, bewies es doch die Funktionsfähigkeit des gewählten Selektionssystems. Auch wenn die Funktion der entdeckten Gene teilweise noch nicht dem Quorum Sensing zugeordnet werden konnte, bestätigte dieses Ergebnis, daß die identifizierten Gene tatsächlich die Homoserinlacton-Produktion der Bakterien beeinflussen.

Das Auffinden von *vfr* lieferte keine neue Erkenntnis, kann aber als Bestätigung für die Korrektheit der Ergebnisse gelten.

3.8.20. D8A6

Phänotypische Eigenschaften

Quorum Sensing : Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften : keine Proteasesekretion
Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer : Nicht im PAO- Genom vorhanden

weitere Untersuchungen:

Wie bei dem Mutanten 47D7 (3.8.16.) wurde auch hier in einer Southern-Hybridisierung die mit *Pst*I- verdauten genomische DNA verschiedener *P.aeruginosa*- Isolate mit der flankierenden Sequenz der Transposoninsertion hybridisiert:

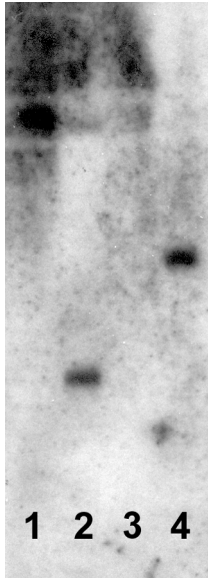


Abb. 3.36.

Southern Hybridisierung *Pst*I- verdauter genomischer DNA verschiedener *P.aeruginosa*- Isolate mit der unbekanntes DNA-Sequenz aus dem Mutanten D8A6.

- 1: *P.aeruginosa* CSGB8
- 2: *P.aeruginosa* SG17M
- 3: *P.aeruginosa* PAO
- 4: *P.aeruginosa* TB

Die unbekanntes DNA- Sequenz ist nicht nur in *P.aeruginosa* TB sondern auch in den beiden untersuchten Isolaten *P.aeruginosa* CSGB8 und SG17M vorhanden. Mit *P.aeruginosa* PAO zeigte sich erwartungsgemäß kein Signal.

Zusammenfassung

Wie bei dem Mutanten 47D7 (3.8.16.) ist die unbekanntes Sequenz keine klonspezifische DNA von *P.aeruginosa* TB, da sie auch in zwei Isolaten des Klons C (*P.aeruginosa* SG17M und CSGB8) vorkommt. Eine Transposoninsertion in diesem Bereich, der in *P.aeruginosa* PAO nicht existiert, schaltete das Quorum Sensing von *P.aeruginosa* TB vollständig aus. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß das Quorum Sensing von *P.aeruginosa* TB - und eventuell auch von anderen *P.aeruginosa*- Isolaten - durch zusätzliche Faktoren reguliert wird, die von den Untersuchungen bei PAO unbekannt sind.

3.8.21. D8B6

Phänotypische Eigenschaften

Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA2028
Funktion:	möglicher Transkriptionsregulator
Strukturmerkmale / Homologien:	61% Ähnlichkeit mit <i>azlB</i> (<i>B.subtilis</i>) Signatur eines bakteriellen Regulatorproteins der <i>asnC</i> Familie
Länge :	474 Bp = 157 As.
Transposoninsertion:	Position 144 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

PA2028 verfügt über keine Terminationsstrukturen. Es bildet wahrscheinlich zusammen mit PA2029 (hypothetisches Protein) eine polycistronische Genkassette.

Zusammenfassung

Der Einfluß der Transposoninsertion in PA2028 auf die Produktion an Homoserinlactonen und die Proteasesekretion war eindeutig. Leider existieren keine Informationen über Art der Aktivierung oder Bindungspartner von PA2028 oder PA2029.

3.8.22. D8B7

Phänotypische Eigenschaften

Quorum Sensing :	stark reduziert, nur langkettige aliphatische Homoserinlactone werden produziert
weitere Eigenschaften :	geringe Proteasesekretion, die durch Zugabe von <i>P.aeruginosa</i> TB _{wt} stimuliert werden kann. Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA2122
Funktion:	Hypothetisches Protein, unklassifiziert
Strukturmerkmale / Homologien:	4 vorhergesagte Transmembranhelices
Nukleotidsubstitution:	synonym: 479C → A
Länge :	1137 Bp = 378 As.
Transposoninsertion:	Position 155

Einfluß auf benachbarte Gene

Eine mögliche Terminationsstruktur von PA2122 ist nur schwach ausgeprägt. Wahrscheinlich wird das Gen zusammen mit den folgenden (PA2123 (Transkriptionsregulator), PA2124 und PA2125 (beides Dehydrogenasen)) transkribiert.

weitere Untersuchungen

D8B7 zeigte auf Caseinagar (Kap. 3.7.3.) eine geringe Sekretion von Protease. Diese konnte bei Anwesenheit von *P.aeruginosa* TB_{wt} deutlich bis auf das Niveau des Wildtyps angehoben werden. (s. Kap. 3.7.3.; Abb.3.28.)

Zusammenfassung

Durch die Transposoninsertion in PA2122 kam es zu einer Verringerung der Produktion an Homoserinlactonen und der Sekretion von Proteasen. Nur langkettige aliphatische Homoserinlactone wurden noch auf niedrigem Niveau produziert. Bei exogener Supplementierung, z.B. durch *P.aeruginosa* - Wildtyp, wurde auch in den Transposonmutanten die Produktion von allen Homoserinlactonen und Protease induziert. Dies deutet darauf hin, daß der Defekt nicht in der Produktion oder Sekretion der Autoinducer liegt, sondern in deren Regulation, da sonst keine Stimulation von außen möglich wäre. Als Ursache des Defektes kommen zwei Gene in Frage. PA2122 als membrangebundenes Protein mit 4 Transmembranhelices könnte eine Sensorfunktion z.B. für Homoserinlactone haben, PA2123 könnte als Transkriptionsregulator direkten Einfluß auf die Regulation des Quorum Sensing haben.

3.8.23. D9C10

Phänotypische Eigenschaften

Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA2591
Funktion:	Transkriptionsregulator
Strukturmerkmale / Homologien:	46% Ähnlichkeit mit DMSO - Reduktase - Regulatorprotein DorX (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>) Signatur der LuxR- Familie
Länge :	807 Bp = 268 As.
Transposoninsertion:	Position 156 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA2591 liegt eine mögliche Terminationsschleife. Diese Struktur ist allerdings nicht besonders stark ausgeprägt. Eventuell werden daher die nachfolgenden Gene PA2590 und PA2589 (beides hypothetische ORFs) von der RNA- Polymerase mittranskribiert.

Zusammenfassung

Das identifizierte Gen PA2591 gehört zur Familie der LuxR- Regulatoren, wie z.B. auch Vfr (s. Kap. 3.8.20.). Bei allen gram- negativen Bakterien, deren Quorum Sensing bisher untersucht wurde, gehört mindestens ein LuxR- verwandtes Protein zum Regulationssystem des Quorum Sensings (s. Kap. 1.1.4.). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß das Ausschalten von PA2591 zum vollständigen Ausfall des Quorum- Sensings in *P.aeruginosa* TB führte. Es könnte sich hier also um einen weiteren - bisher unbekanntem - Regulator des Quorum Sensings in *P.aeruginosa* handeln.

3.8.24. D10B10

Phänotypische Eigenschaften

Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion Phänotyp entsprechend Kap. 3.7.3.

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA1322
Bezeichnung :	<i>pfuA</i>
Funktion:	möglicher TonB- abhängiger Rezeptor
Strukturmerkmale / Homologien:	44% Ähnlichkeit zu einem Ferrichrom- Eisenrezeptor (<i>S.paratyphi</i>) C-terminale TonB- Rezeptor- Kasette
Nukleotidsubstitutionen:	Synonym: 1559G → A; 1613G → A)
Länge :	2199 Bp = 732 As.
Transposoninsertion:	Position 1756 (9 Bp überlappend)

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter *pfuA* liegt eine starke Terminationssequenz. Sogar bei der Sequenzierung traten in diesem Bereich große Probleme auf. Eine Auswirkung der Transposoninsertion auf die Transkription der nachfolgenden Gene ist somit auszuschließen.

weitere Informationen

TonB ist ein sezerniertes Protein, daß Eisen aus dem umgebenden Medium mit hoher Affinität bindet und *P.aeruginosa* zuführt. Wird TonB in *P.aeruginosa* PAO ausgeschaltet, so wird auch kein Pyoverdin und Pyochelin mehr produziert. Ebenfalls sind *P.aeruginosa* PAO- Mutanten mit einem Defekt in *tonB* im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage, immunsupprimierte Mäuse letal zu schädigen oder auch nur zu überleben. Die TonB- abhängige Eisenaufnahme ist somit für *P.aeruginosa* essentiell, um einen Wirt zu infizieren (TAKASE H ET AL. 2000)

Zusammenfassung

In der aktuellen Literatur ist beschrieben, daß die Eisenaufnahme von *P.aeruginosa* über das Quorum Sensing reguliert wird (STINTZI ET AL.1998). Bei dem hier gefundenen Transposonmutanten läuft die Regulation aber in der entgegengesetzten Richtung: Das Ausschalten eines TonB abhängigen Eisen- Rezeptors führt zum Ausschalten der Produktion von Homoserinlactonen. Ein solcher Regulationsmechanismus ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. In anderem Zusammenhang wurde jedoch bei einer Inaktivierung von TonB gezeigt, daß dieser Mutant ebenfalls keine Pyoverdininproduktion mehr aufweist. Die Produktion dieser Siderophore ist aber direkt über das Quorum Sensing reguliert, so daß auch hier ein Zusammenhang zwischen der Eisenaufnahme und der Expression des Quorum Sensings nachgewiesen wurde (TAKASE H ET AL. 2000). Die Ergebnisse der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit beweisen zweifelsfrei die Richtung der hier vorgefundenen Regulation, in der PfuA einen regulatorischen Einfluß auf das Quorum Sensing hat.

3.9. Funktionelle Interpretation der Phänotypen

Im folgenden Abschnitt werden die Transposonmutanten, bei denen eine Funktionsvorhersage möglich war, entsprechend ihren phänotypischen Eigenschaften eingeordnet und die jeweiligen Ursachen kurz zusammenfassend interpretiert.

3.9.1. Sensibilität gegenüber humanem Blutserum

Serumsensible Transposonmutanten:

2D5 15A3 24A12 47D7

Serumresistente Transposonmutanten:

15B10

Alle Transposonmutanten, die eine Veränderung in ihrer Serumsensibilität aufwiesen und bei denen den ausgeschalteten Proteinen eine Funktion zugeordnet werden konnte, weisen vermutlich eine Veränderung ihrer Membranstruktur oder ihrer Alginatehülle auf.

15A3 weist eine Mutation in einem Gen direkt hinter dem bekannten Alginate- Operon auf und ist von diesem durch keine offensichtliche Terminationssequenz getrennt. Es ist daher anzunehmen, daß dieses Gen zusammen mit den folgenden 5 (unbekannten) Genen bei der Transkription des Alginate- Operons ebenfalls transkribiert wird. Aufgrund dieser genomischen Anordnung ist zu vermuten, daß auch diese unbekanntes Gene eine Funktion in der Alginate-synthese oder deren Regulation haben.

Bei 24A12 ist das Gen *gltR* ausgeschaltet. Auch wenn die in der Literatur postulierte Funktionszuordnung (SAGE ET AL. 1996) zumindest bei *P.aeruginosa* TB nicht nachgewiesen werden konnte, so ist trotzdem aufgrund von Sequenzhomologien und der genomischen Umgebung im *P.aeruginosa*- Genom eine Regulatorfunktion im Kohlenhydratmetabolismus wahrscheinlich. Die Transposoninsertion könnte daher eine veränderte Oberflächenstruktur oder Unterschiede in der Extrazellulärmatrix bewirken. Diese Änderungen in der Bakterienoberfläche können auch die Ursache für die beobachtete höhere Invasivität in Epithelzellen sein.

Der Transposonmutant 15B10, bei dem das Transposon in das Gen *pilQ* inseriert wurde, weist eine deutlich erhöhte Serumstabilität auf. PilQ ist ein Bestandteil der TypIV- Fimbrien von *P.aeruginosa* (MARTIN ET AL. 1993). Es ist unbekannt, wie das Ausschalten dieses Gens zu einer erhöhten Serumstabilität führen kann, ist aber ein weiterer Hinweis darauf, daß die Struktur von äußerer Zellmembran und Extrazellulärmatrix entscheidend für die Serumresistenz sind.

Über die Mutanten 2D5 und 47D7 liegen leider so wenig Informationen vor, daß eine detaillierte Interpretation der Ergebnisse nicht möglich ist.

Fast alle darauf untersuchten Transposonmutanten mit einem Defekt im Quorum Sensing wiesen eine erhöhte Serumsensibilität auf (2D5, 37D8, 41D3, 47D7). Da die Alginate- Synthese über das Quorum Sensing reguliert wird, bestätigt diese Koinzidenz ebenfalls, daß die Extrazellulärmatrix ein entscheidender Faktor für die Serumresistenz ist.

3.9.2. Intrazelluläres Überleben in Granulozyten

Verringerte intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten:

3D1 14C5 19C2 20A6 22D11 41D3

Keine sichere Zuordnung des Phänotyps möglich:

18A12 23B9 24C5 37D8

Bei den Mutanten 14C5 und 41D3 wurden durch die Transposoninsertion Gene ausgeschaltet, die für die Resistenz der Bakterien gegenüber oxidativem Streß notwendig waren. Dies war eindeutig durch die erhöhte Peroxidsensibilität dieser Mutanten nachweisbar. Die Funktionszuordnung ist für den Mutanten 14C5 eindeutig: Das Ausschalten der Helicase RecQ führte zu einem Defekt in der Reparatur oxidativer DNA- Schäden. Bei dem Mutanten 41D3 kann das Fehlen von zwei verschiedenen Proteinen die erhöhte Peroxidsensibilität verursacht haben: In *E.coli* wurde nachgewiesen, daß die Rubredoxin Reduktase, deren Gen in diesem Transposonmutanten ausgeschaltet wurde, anstelle einer Superoxiddismutase die Entgiftung reaktiver Sauerstoffverbindungen übernehmen kann. Dabei wird eine Methylgruppe eines Akzeptormoleküls durch Übertragung von zwei Sauerstoffatomen zu der entsprechenden Carbonsäure oxidiert. In *P.aeruginosa* sind bisher zwei Superoxiddismutasen und eine Katalase zur Entgiftung von aktiven Sauerstoffradikalen bekannt, die in der stationären Phase durch das Quorum Sensing verstärkt exprimiert werden. Die Entgiftung von Sauerstoff hat somit für *P.aeruginosa* eine entscheidende Bedeutung. Der Ausfall eines der Entgiftungsmechanismen kann eventuell die Ursache dafür sein, daß die phagozytierten Mutanten des Stammes 41D3 nicht mehr intrazellulär in Granulozyten überleben können. Die Transposoninsertion fand allerdings in einer polycistronischen Genkassette statt, so daß auch die Expression weiterer Gene beeinträchtigt sein kann. Das der Rubredoxin Reduktase im Operon folgende Gen kodiert für ein DNA- bindendes hypothetisches Protein, dem in der PAO- Datenbank eine Funktion bei der DNA - Modifikation und - Reparatur ohne nähere Angaben zugesprochen wurde. Auch dieses Gen könnte für die verringerte Überlebensfähigkeit in Granulozyten verantwortlich sein, wenn das kodierte Protein, ähnlich RecQ, eine Funktion in der Reparatur von oxidativen DNA- Schäden hat.

Der Transposonmutant 22D11 weist einen Defekt in der Flagellensynthese auf. Das ausgeschaltete Protein ähnelt in Proteinsequenz und Lage dem FliK in *E.coli*. Seine Funktion scheint aber abweichend zu sein, da die *P.aeruginosa*- Transposonmutanten trotz der Insertion in der Lage sind, Flagellin zu exportieren, was in *E.coli* nicht mehr möglich ist. Trotzdem sind die Flagellen stark verkürzt und nicht mehr funktionell. Diese phänotypische Veränderung kann aber weder die Ursache für die verringerte Überlebensfähigkeit in Granulozyten noch für die geringere Invasivität in Epithelzellen sein. In der Selektion I (Kap. 3.4.) wurde der Selektionsansatz aus Bakterien und Granulozyten ständig geschüttelt, so daß die Eigenbewegung der *P.aeruginosa* vernachlässigbar war. In der Untersuchung zur Invasivität in Epithelzellen (Kap. 3.5.) wurden die Bakterien durch Zentrifugation auf die adhärenen Zellen sedimentiert, so daß ein Zell- Zell Kontakt bei Beginn des Experiments hergestellt wurde. In beiden Untersuchungen war somit die Motilität der Bakterien für die Ergebnisse unwichtig. Die gemessenen phänotypischen Veränderungen müssen daher eine andere Ursache haben. Eine Möglichkeit wäre, daß das *P.aeruginosa*- homologe Gen zu *fliK* für ein Protein kodiert, das auch bei dem Aufbau und den Sekretionsprozessen des Typ III- Transportsystems beteiligt ist. Dieses Sekretionssystem ähnelt im Aufbau dem Flagellum und ist evolutionär mit ihm verwandt, unterscheidet sich jedoch von diesem in den exportierten Proteinen (MACNAB 1999). Das Typ III- System transportiert Pathogenitätsfaktoren (z.B. lytische Enzyme, die das Cytoskelett der Wirtszelle auflösen) nur bei direktem Zell- Zell Kontakt durch die Zellmembran einer eukaryontischen Wirtszelle in deren Cytosol. Dieses Sekretionssystem ist neben *P.aeruginosa* auch in anderen pathogenen, intrazellulären Bakterien, wie *Yersinia spec.* oder *Salmonella spec.* (CORNELIS & VAN GIJSEGEM 2000) zu finden. Ein Ausschalten des *fliK*- homologen Gens in *P.aeruginosa* hätte somit einen direkten Einfluß auf die Invasivität und das intrazelluläre Überleben phagozytierter Bakterien, deren Eindringen in das Cytosol der Granulozyten deutlich erschwert wäre. Gestützt wird diese Theorie dadurch, daß das *fliK*- homologe Gen durch eine große Insertion vom Rest des Operons getrennt ist, in dem es in *E.coli* zu finden ist. Die Regulation dieses Gens ist somit von der Flagellensynthese unabhängig. Diese Entkopplung scheint beim Auftreten für *P.aeruginosa* kein evolutionärer Nachteil gewesen zu sein, was ebenfalls die Vermutung stützt, daß dieses Gen eine doppelte Funktion im Aufbau der Flagellen und im Typ III- Sekretionssystem haben könnte.

Bei dem Mutanten 3D1 kodierte das ausgeschaltete Gen für ein Protein, das einen

Kanal durch die äußere Bakterienmembran bildet. Das erkannte Substrat ist unbekannt - es handelt sich jedoch um ein kleines hydrophobes Molekül, das bei dem anschließenden Transport durch die innere Membran durch Kopplung mit Coenzym A aktiviert und im Cytosol metabolisiert wird. Die genaue Aufgabe dieses Proteins ist für *P.aeruginosa* nicht bekannt, das orthologe Protein FadL aus *E.coli* ist jedoch detailliert untersucht worden. In *E.coli* transportiert FadL langkettige Fettsäuren durch die äußere Zellmembran. Bei äußerem Streß (hohe Wachstumsdichte oder Inkubation bei 42° C) wird die Expression dieses Gens deutlich verstärkt. Ein Ausschalten von *fadL* führt dazu, daß die Bakterien nicht länger aus dem logarithmischen Wachstum in die stationäre Phase umschalten können (FAREWELL ET AL. 1996). Ebenfalls werden Hungerphasen von diesen Mutanten nur schlecht überlebt. In *Haemophilus influenzae* ist ein entsprechendes orthologes Gen für eine Infektion (BOLDUC ET AL. 2000) essentiell. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß auch in *P.aeruginosa* die Funktion des FadL- ähnlichen Proteins in irgendeiner Weise mit der Antwort auf äußere Streßfaktoren verbunden ist. Wie diese Verbindung von einem Transportmolekül der äußeren Zellmembran zu einer Regulation von Streßantwort und Proteinexpression aussieht, ist bisher unklar.

Eine Möglichkeit wäre, daß das FadL- ähnliche Protein ein Transportsystem für langkettige Homoserinlactone darstellt, die ohne Transportsystem nicht die bakterielle Zellmembran passieren können (DEKIEVIT & IGLEWSKI 2000). Diese Theorie würde erklären, warum die Transposonmutanten nicht zu einer verstärkten Produktion von Homoserinlactonen fähig sind. Sie können die Wachstumsdichte der sie umgebenden Bakterien nicht mehr erkennen.

Eine andere Hypothese wäre, daß das FadL- ähnliche Protein essentiell für die Aufnahme von langkettigen aliphatischen Verbindungen ist, die nach weiterer Prozessierung als Acyl- Seiten in der Produktion von aliphatischen Homoserinlactonen (AHL) notwendig sind. Dies würde erklären, warum das entsprechende Gen in *E.coli* in der stationären Phase hochreguliert wird. Unter diesen Bedingungen ist die Produktion an AHL am höchsten und somit auch der Bedarf an aliphatischen Verbindungen zum Aufbau der Seitenkette der Homoserinlactone. Ob diese Erklärung ausreicht, um so durch den Knock- out eines einzigen Transporters den Ausfall der Produktion an AHL zu erklären, ist zweifelhaft. Es ist nicht anzunehmen, daß *P.aeruginosa* für den Aufbau einer C12-Fettsäure nur auf exogene Quellen angewiesen ist. Ein Zusammenhang ist jedoch eindeutig nachgewiesen, da die Transposonmutanten

nicht mehr in der Lage waren, auf verschiedene Arten von äußerem Streß angemessen zu reagieren: Intrazellulär in Granulozyten konnten die Bakterien den oxidativen Streß nicht überleben, und bei der Untersuchung des Quorum Sensing war eine verstärkte Produktion von Homoserinlactonen, die angemessene Reaktion auf Streß durch hohe Wachstumsdichte, nicht mehr zu beobachten. Dies ist vergleichbar mit der Reaktion von *E.coli* auf das Ausschalten von *fadL*.

Im *P.aeruginosa* - Wildtyp werden durch die Umstellung auf die Bedingungen der stationären Phase ebenfalls Mechanismen zur Abwehr von äußerem Streß hochreguliert. Bei der Untersuchung der intrazellulären Überlebensfähigkeit wurden Bakterien aus dieser Wachstumsphase in die Granulozyten überführt. Fand in den Transposonmutanten vom Typ 3D1 aber keine Umstellung an die Bedingungen der stationären Phase statt, worauf die geringe Produktion an Pyoverdinin und Homoserinlactonen hindeutet, so waren sie gegenüber äußerem Streß viel anfälliger und konnten so in den Granulozyten nicht überleben. Dies deckt sich mit dem Befund, daß *P.aeruginosa* in der stationären Phase stärkere Abwehrmechanismen gegen die Immunantwort eines Wirts hat als in seiner logarithmischen Wachstumsphase.

Bei dem Transposonmutanten 19C2 ist das ausgeschaltete Gen unklassifiziert, so daß weder Bindungspartner noch Substrate bekannt sind. Dennoch ist dies eines der interessantesten Gene, die in diesen Untersuchungen gefunden wurden. Während die Serumresistenz gegenüber dem Wildtyp unverändert, vielleicht sogar etwas erhöht ist, überleben fast keine Transposonmutanten des Stammes 19C2 eine Phagozytose durch Granulozyten. Ebenfalls zeigen sie eine stark verringerte Produktion von Homoserinlactonen, aber keinen Totalausfall. Durch Zugabe von Autoinducern konnte im Stamm 19C2 die eigene Produktion dieser Moleküle induziert werden. Dies läßt den Schluß zu, daß durch die Transposoninsertion weder Aufnahme noch Erkennung oder Produktion von Homoserinlactonen, sondern deren Regulation beeinflußt worden ist.

Eine funktionelle Interpretation der Transposoninsertion im Mutanten 20A6 ist aufgrund mangelnder Informationen nicht möglich.

Die Auswirkungen der Transposoninsertionen auf das intrazelluläre Überleben in Granulozyten bei den Mutanten 18A12, 23B9, 24C5 und 37D8 werden nicht interpretiert, da bei diesen drei Mutanten die Transposoninsertionen in polycistronischen Genkassetten oder in einer anderen genomischen Umgebung stattfanden, die keine eindeutige Aussage über das Gen zuließ, das für den beobachteten Phänotyp verantwortlich war.

3.9.3. Defekt im Quorum Sensing

Keine Produktion von Homoserinlactonen:

2D5	3D1	37D8	41D3	47D7
D8A3	D8A6	D8B6	D9C10	D10B10

Verringerte Produktion von Homoserinlactonen

19C2	24A12	B7A11	D8B7
------	-------	-------	------

Verstärkte Produktion von Homoserinlactonen

B7D3

Die meisten Transposonmutanten, bei denen die Produktion von Homoserinlactonen ausgeschaltet wurde, lassen sich in eine der folgende Klassen einordnen:

1. Mutanten mit einem Defekt in einem Regulator

Die Transposoninsertion erfolgte beim Mutanten D8A3 im Gen *vfr*, das für einen der zentralen Regulatoren des Quorum Sensing kodiert (ALBUS ET AL. 1997). Daß diese Insertion zu einem Totalausfall der Produktion von Homoserinlactonen führte, war zu erwarten und ist in der angegebenen Literatur beschrieben. Das Auffinden dieser Mutation belegt die Funktionsfähigkeit des angewendeten Selektionsverfahrens.

Bei dem Transposonmutanten D9C10 wurde ein Regulator vom LuxR- Typ ausgeschaltet. Über seine Spezifität und Bindungspartner ist nichts bekannt, jedoch sind die zentralen Regulatoren des Quorum Sensing aller gram- negativen Bakterien vom LuxR- Typ. So ist z.B. auch Vfr ein Regulatorprotein dieser Familie. Das Ausschal-

ten des Regulators im Mutanten D9C10 führte zum völligen Fehlen von Homoserinlactonen. Dies bedeutet, daß auch dieser Regulator in die Steuerung des Quorum Sensing eingreift. Bisher war als übergeordneter Regulator nur Vfr bekannt. Der Funktion des gefundenen LuxR- Regulators war bisher unbekannt. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, daß durch Transposoninsertion in dieses Gen weder kurz-kettige noch langkettige aliphatische Homoserinlactone von dem Transposonmutanten produziert werden konnten. Dies bedeutet, daß dieser bisher funktionell uncharakterisierte Regulator in einer ähnlich zentralen Position in die Produktion der Autoinducer eingreift wie Vfr, bislang aber übersehen wurde.

Bei dem Mutanten D8B6 wurde ein Transkriptionsregulator ausgeschaltet. Weitere Informationen über das betroffene Gen waren in Datenbanken nicht verfügbar, eine Interpretation ist daher nicht möglich.

Die Mutanten 19C2, 24A12 und D8B7 zeigten alle eine verringerte Produktion an Homoserinlactonen, aber keinen völligen Ausfall. Sowohl für den Mutanten 19C2 (Kap. 3.9.2.) als auch für den Mutanten 24A12 (Kap. 3.9.1.) ist eine Regulatorfunktion zu vermuten, der genaue Mechanismus ihrer Wirkung auf das Quorum Sensing ist aber nicht bekannt. Auch bei dem Mutanten D8B7 ist aufgrund des veränderten Sekretionsmusters eine Sensor- oder Regulatorfunktion zu vermuten, wobei unklar bleibt, ob die Wirkung der Insertion auf das ausgeschaltete Protein (unbekannte Struktur, 4 Transmembranhelices) oder das nachfolgend kodierte (Regulator unbekannter Spezifität) zurückzuführen ist.

2. Mutanten mit einem Defekt im oxidativen Metabolismus hydrophober Moleküle

Der Mutant 2D5 weist eine Transposoninsertion in einer Oxidoreduktase unbekannter Spezifität auf. Eventuell ist die beobachtete Veränderung im Phänotyp aber auch auf eines der nachfolgend kodierten Gene zurückzuführen, die ebenfalls für Proteine des oxidativen Abbaus aromatischer oder aliphatischer Substrate kodieren.

Bei 3D1 ist ein Transportprotein der äußeren Zellmembran ausgeschaltet, das einen Kanal für ein hydrophobes, bisher nicht genau definiertes Substrat bildet, welches in einem zweiten Schritt von einem unspezifisch wirkenden Transportprotein durch die innere Zellmembran transportiert und dabei mit CoA aktiviert wird (s. Kap. 3.9.2.). Das an CoA gebundene Substrat wird in den Fettsäuremetabolismus eingeschleust und kann dort nach entsprechender Prozessierung eventuell als aliphatische Seitenkette bei der Synthese von Autoinducern verwendet werden.

Bei dem Mutanten 37D8 ist das für die Expression der phänotypischen Veränderung notwendige Gen nicht eindeutig bestimmbar. Es kommen zwei Gene in Betracht, die am Aufbau des Multienzymkomplexes um das Acyl Carrier Protein (ACP) beteiligt sind und eine Aufgabe im Fettsäuremetabolismus haben. Eine an ein ACP gebundene aliphatische Verbindung ist die für den Aufbau von aliphatischen Homoserinlactonen notwendig.

Die im Mutanten 41D3 ausgeschaltete Rubredoxin Reduktase ist eine Monooxygenase und oxidiert Methylgruppen aliphatischer Substrate zu den entsprechenden Carbonsäuren (s. Kap. 3.9.2.). Es liegt hier entweder ein bisher unbekannter Regulationsmechanismus des Quorum Sensings vor, oder die ausgeschaltete Rubredoxin Reduktase hat eine essentielle Funktion in der Prozessierung aliphatischer Verbindungen zu Aufbau der spezifischen Seitenkette von Homoserinlactonen.

Alle diese Mutanten haben einen Defekt im Metabolismus hydrophober, vermutlich aliphatischer Moleküle. Eine Hypothese für die Funktionszuordnung zum Quorum Sensing wäre, daß die ausgeschalteten Gene oder deren mittranskribierte Nachbarn eine Funktion im Metabolismus der aliphatischen Seitenketten der Homoserinlactone oder bei deren Erkennung und Transport haben.

3. Mutanten mit Insertionen in unbekanntem Sequenzen

Die Mutanten 47D7 und D8A6 weisen Transposoninsertionen in Sequenzen auf, die nicht aus der Genomsequenzierung von *P.aeruginosa* PAO bekannt sind. Trotzdem sind diese Sequenzen keine für *P.aeruginosa* TB klonspezifische DNA, sondern sind auch in anderen *P.aeruginosa* vorhanden, z.B. *P.aeruginosa* CSGB8 oder SG17M.

Die Ergebnisse der Untersuchungen (Kap. 3.6.) belegen, daß diese DNA- Sequenzen eine Funktion im Quorum Sensing haben. Die Art dieses Einflusses ist jedoch unbekannt. In PAO funktioniert das Quorum Sensing auch ohne diese Sequenzen. Wieso eine Transposoninsertion in diesem Bereich der DNA dann zu einem Ausfall der Produktion an Autoinducern führt, kann solange nicht geklärt werden, wie die weltweit durchgeführten Forschungsarbeiten zum Quorum Sensing überwiegend auf *P.aeruginosa* PAO begrenzt bleiben.

4. Mutanten ohne Gruppenzugehörigkeit

Bei dem Transposonmutanten B7A11 wurde eine Serinhydroxymethyltransferase ausgeschaltet. Wie das Ausschalten dieses Gens mit dem Verlust des Quorum Sensing zusammenhängt, ist für *P.aeruginosa* ungeklärt. Es existieren allerdings Ergebnisse aus *E.coli*, wonach diese Bakterien unter Streß ihr Expressionsmuster ändern. Die Serinhydroxymethyltransferase wird in diesem Fall zusammen mit dem Protein FadL und dem Acyl- Carrier- Protein deutlich verstärkt produziert (OHBA ET AL. 1997). Ein Mutant mit der Transposoninsertion in einem FadL entsprechenden Protein wurde im Zuge der Untersuchungen gefunden - 3D1 (Kap. 3.9.2.). Auch dieser Mutant zeigt einen Defekt im Quorum Sensing und in der Reaktion auf Streßfaktoren. Transposonmutanten, bei denen das Acyl- Carrier- Protein betroffen ist, wurden nicht gefunden. Der Mutant 37D8 (s.o.) weist jedoch eine Transposoninsertion an einer Position auf, wo sie ein anderes Protein dieses Multienzymkomplexes ausschaltet. Der Zusammenhang zwischen der Expression der Serinhydroxymethyltransferase und der Produktion von Homoserinlactonen konnte nicht aufgeklärt werden. Der einzige bekannte Zusammenhang besteht darin, daß die Serinhydroxymethyltransferase eine Funktion im C₁- Metabolismus hat. S-Adenosylmethionin ist sowohl ein internes Reservoir für den C₁- Metabolismus, andererseits aber auch für die Produktion von Homoserinlactonen notwendig. Eventuell kommt es durch das Ausschalten der Serinhydroxymethyltransferase zu einer Verringerung der Konzentration an verfügbarem S-Adenosylmethionin und so zu einem Mangel an Homoserin zum Aufbau der Autoinducer.

Eine andere Erklärung wäre, daß das Substrat des ausgeschalteten Proteins nicht Serin, sondern Homoserin ist und so das Quorum Sensing direkt betroffen wäre.

Der Transposonmutant B7D3 weist eine Insertion in einem Gen auf, das für eine putative β -Lactamase kodiert. Dieser Mutant zeigt eine deutlich gesteigerte Sekretion von Autoinducern und Proteasen. Ein Substrat aus der Klasse der β -Lactame konnte bisher für dieses Protein noch nicht gefunden werden. Berücksichtigt man, daß die Aufgabe von β -Lactamasen in der Spaltung des Ringsystems der β -Lactamantibiotika liegt, so kann man vermuten, daß das getroffene Enzym eventuell eine Homoserinlactonase ist, die einen ersten Schritt im Abbau der Homoserinlactone katalysiert. Das Ausschalten dieses Gens hätte somit einen deutlichen Anstieg der Konzentration an Homoserinlactonen im Medium und damit eine verstärkte Reaktion der Bakterien auf dieses Signal zur Folge. Allerdings ist bisher nichts über den Mechanismus des Abbaus von Autoinducern bekannt, so daß diese Vermutung nicht belegt werden kann.

Durch die Transposoninsertion im Mutanten D10B10 wurde PfuA ausgeschaltet, ein TonB-abhängiger Rezeptor, der eine Funktion in der Gewinnung von Eisen aus dem umgebenden Medium hat. In dem zur Zeit bekannten Regulationsschema des Quorum Sensing gibt es eine klare hierarchische Gliederung, nach der die Eisenaufnahme (z. B. über TonB) vom Quorum Sensing reguliert wird (DEKIEVIT & IGLEWSKI 2000). Der umgekehrte Weg - eine Regulation des Quorum Sensing über einen Eisenrezeptor - ist bisher nicht bekannt. Trotzdem ist eine solche Regulation die einzige Erklärungsmöglichkeit dafür, wie es durch das Ausschalten eines Eisenrezeptors zu einem Totalausfall der Produktion von Homoserinlactonen kommen kann.

Bei der Untersuchung der *P.aeruginosa* TB-Transposonmutanten auf ihre Produktion von Homoserinlactonen wurden einige Gene gefunden, die in das bereits bekannte Bild der Regulation des Quorum Sensing paßten (z.B. *vfr*). Andere waren in ihrer Bedeutung bisher nicht dem Quorum Sensing zugeordnet worden, sind aber aufgrund von Untersuchungen orthologer Gene in anderen Bakterien dem Quorum Sensing zuzuordnen (z.B. die Gene der Mutanten 3D1, B7A11, 37D8). Die meisten der gefundenen Gene deuten jedoch auf zusätzliche Regulations- und Feedbackmechanismen hin, die in den bisherigen Modellen zum Quorum Sensing nicht berücksichtigt werden.

4. Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit ist ein Verfahren zur STM in *P.aeruginosa* entwickelt worden. Als Selektionskriterium wurde die intrazelluläre Überlebensfähigkeit von *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten in Granulozyten gewählt. Bei Mutanten, die diese Selektion nicht überleben konnten, wurden die flankierenden Bereiche der genomischen Transposoninsertion sequenziert. Nur in einigen ausgewählten Genen wurde in der vorliegenden Arbeit eine funktionspezifische Analysen begonnen.

Ein vorrangiges Ziel weiterführender Untersuchungen ist daher die funktionelle Charakterisierung der identifizierten Gene in einer habitat- und ORF- spezifischen Analyse. Hierzu müssen die jeweiligen Gene auf Wechseleffekte, Substrate und ihre habitatspezifische Expression untersucht werden. Die dazu notwendigen Experimente sind für jedes Gen speziell zu entwerfen.

Zusätzlich müssen noch weitere Aspekte untersucht werden. Zum einen ist bei den Transposonmutanten durch episomale Komplementierung des zerstörten Gens nachzuweisen, daß das von der Transposoninsertion betroffene Gen tatsächlich für die beobachtete Veränderung im Phänotyp verantwortlich war. Zum anderen ist zu untersuchen, ob die hohe intrazelluläre Überlebensfähigkeit von *P.aeruginosa* TB eventuell auf eine der Sequenzvarianten der identifizierten PAO- Gene zurückzuführen ist. Hierzu ist das entsprechende Gen aus *P.aeruginosa* TB in PAO zu integrieren und die intrazelluläre Überlebensfähigkeit dieses PAO- Mutanten in Granulozyten zu messen.

Das entwickelte Verfahren zur Transposonmutagenese ist am Beispiel *P.aeruginosa* TB zur Untersuchung der intrazellulären Überlebensfähigkeit in Granulozyten optimiert worden. *P.aeruginosa* TB oder seine klonalen Varianten sind aber seit mehr als 10 Jahren nicht mehr von CF- Patienten isoliert worden. Die meisten Isolate gehören in Mitteleuropa zum Klon C. Es bietet sich daher an, in Ergänzung der Bibliothek von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten auch eine Bibliothek von Mutanten einer klonalen Variante des Klons C aufzubauen.

5. Zusammenfassung

5.1. Transposonmutagenese in *P.aeruginosa*

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren zur effizienten Transposonmutagenese von *P.aeruginosa* - Isolaten entwickelt. Die meisten veröffentlichten Ergebnisse, bei denen durch Transposoninsertionen Mutanten von *P.aeruginosa* erzeugt wurden, beziehen sich auf den Stamm PAO oder dessen klonale Varianten. Gerade für die Mutagenese von Klinikisolaten existierte kein etabliertes Protokoll und nur vereinzelte Stämme waren für eine Transposonmutagenese zugänglich.

Ausgehend von einem für gram-negative Bakterien verwendeten Standardprotokoll wurden die Konjugationsbedingungen so optimiert, daß die Effizienz der Transposoninsertion in *P.aeruginosa* um 2 bis 3 Größenordnungen gesteigert werden konnte. Neben einer Vielzahl von Faktoren, die jeweils die Konjugationseffizienz leicht erhöhten, erwies sich vor allem die Wahl der Vorinkubationsbedingungen der *P.aeruginosa*- Isolate als entscheidend. Eine mehrtägige Vorinkubation bei 42° C auf Blutagar führte zu einer deutlichen Erhöhung der Konjugationseffizienz. Es ist auffällig, daß genau die Bedingungen *P.aeruginosa* zur Aufnahme von fremder DNA befähigten, die auch während einer akuten Infektion in einem Menschen vorliegen.

Zur Selektion wurde ein Minimalmedium mit Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle verwendet. Dies ermöglichte zum einen eine bessere Separation der Transposonmutanten von den *E.coli*- Donoren, die Glycerol nicht metabolisieren können, zum anderen mußten die entstandenen Transposonmutanten auf diesem Minimalmedium zum Wachstum alle anabolen Stoffwechselwege aktivieren. Eine Transposoninsertion in einem dieser Wege war für den entsprechenden Mutanten letal. Es war daher sichergestellt, daß die Insertionen in den asservierten Transposonmutanten nur Gene betrafen, die nicht im anabolen Metabolismus verwendet wurden.

Das so optimierte Konjugationsprotokoll wurde auch zur Transposonmutagenese bei anderen gentamicinsensiblen *P.aeruginosa* - Isolaten und zusätzlich auch bei einem *P.putida*- Stamm verwendet. In allen Fällen konnten Transpositionseffizienzen erreicht werden, die deutlich über den Literaturangaben lagen. Durch das hier erarbeitete Konjugationsprotokoll sind somit eine Vielzahl von gentamicinsensiblen *Pseudomonas*- Isolaten, auch über die Artgrenze von *P.aeruginosa* hinweg, einer Transposonmutagenese zugänglich geworden.

5.2. STM in *P.aeruginosa* TB

Zum Aufbau einer Bibliothek von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten mit spezifischen Signalsequenzen wurde als Donor- Plasmid der Vektor pTnMod-OGm verwendet. Hiermit wurden zwar geringere Ausbeuten an Transposonmutanten als bei Verwendung des pUT- Vektorsystems erzielt, dafür bot er methodisch große Vorteile in der Handhabung und durch die Möglichkeit eines späteren „Plasmid- Rescue“. Die in diesen Vektor eingefügte Signalsequenz wurde auf der Grundlage der Arbeit von M. Hensel neu konstruiert und für den Gebrauch in *P.aeruginosa* optimiert. Durch Anordnung von 192 pTnMod-OGm- Vektoren mit unterschiedlichen Signalsequenzen in einer dreidimensionalen Matrix (8 x 6 x 4) war es möglich, unter definierten, einheitlichen Hybridisierungsbedingungen in 18 Detektionen die Signalstärke und eventuelle Kreuzhybridisierungen sämtlicher Signalsequenzen zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, daß nicht mehr als 48 Sequenzen parallel markiert werden konnten, ohne ein starkes Hintergrundrauschen in den gemessenen Intensitäten zu erhalten. Die Bibliothek an *P.aeruginosa*- Transposonmutanten wurde daher mit 48 unterschiedlichen Signalsequenzen, die keine Kreuzhybridisierungen und vergleichbare Signalstärken aufwiesen, aufgebaut. Die erzeugten *P.aeruginosa* - Mutanten wurden derart in die aufzubauende Bibliothek übernommen, daß der statistisch zu erwartende Anteil mehrfach vorhandener, identischer Transposonmutanten kleiner als 20% war.

Insgesamt wurden ca. 3800 *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten in 720 Konjugationen erzeugt. Davon wurden 2300 Mutanten in Selektionsebenen zur Untersuchung in einem STM- Ansatz geordnet.

5.3. Intrazelluläres Überleben in Granulozyten von *P.aeruginosa* TB und Invasivität

Der Vorteil des STM- Verfahrens liegt darin, daß eine Gruppe unterschiedlicher Transposonmutanten kompetitiv in einem gemeinsamen Selektionsansatz auf ihre individuellen Überlebensfähigkeiten untersucht wird. Dies verringert zum einen die Anzahl der Experimente, die notwendig sind, um eine Bibliothek von Mutanten auf ihre individuellen phänotypischen Veränderungen zu untersuchen. Zum anderen entspricht bei Wahl eines lebenden Selektionssystems (hier Granulozyten) der sum-

marische Effekt der Mutanten in einer Selektion ungefähr dem des jeweiligen Wildtyps, da die meisten Transposonmutanten in einem Selektionsexperiment eine unveränderte Virulenz aufweisen.

Bei den ersten Selektionsexperimenten stellte sich heraus, daß der von den Granulozyten initial ausgeübte Druck auf die Transposonmutanten so hoch war, daß nur wenige Bakterien überlebten, und somit die anschließend erhaltenen Ergebnisse schwer interpretierbar waren. Um ein besseres Signal- Rausch Verhältnis zu erreichen, wurden daraufhin für die Selektionsexperimente Granulozyten von Rauchern verwendet, da deren Abwehrzellen zum einen vorstimuliert, zum andern aber auch attenuiert sind. Die so erhaltenen Differenzen in den Überlebensraten der einzelnen Transposonmutanten lagen um ungefähr den Faktor 5 höher.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden mehr als 1000 Transposonmutanten auf ihre intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten untersucht. Diejenigen *P.aeruginosa*- Mutanten mit den deutlichsten phänotypischen Abweichungen wurden gesammelt und erneut untersucht. Bei den auffälligsten der so in ihrer phänotypischen Abweichung bestätigten Bakterien wurde genauer differenziert und quantifiziert, zu welchen Teilen die gemessenen geringen Überlebensraten auf eine geringe Überlebensfähigkeit in Granulozyten zurückzuführen sind und welchen Anteil eine Sensibilität gegen Blutserum an dem gemessenen Effekt hat. Weiterhin wurden die identifizierten Transposonmutanten auf ihre Invasivität in Epithelzellen untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten und die Invasivität eines Bakteriums in Epithelzellen nicht miteinander verbundene phänotypische Eigenschaften sind.

Die Sequenzierungen der flankierenden DNA- Bereiche der genomisch inserierten Transposons zeigten, daß in allen gefundenen *P.aeruginosa* TB-Transposonmutanten, die das Selektionsexperiment nicht überlebt hatten, Gene ausgeschaltet wurden, die auch im *P.aeruginosa* PAO- Genom vorkommen.

Bei Transposonmutanten, deren Sensitivität gegenüber Blutserum verändert war, scheint die Ursache in allen Fällen eine Modifikation in der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix oder des Aufbaus der äußeren Zellmembran zu sein. Die Ursachen für die verminderte Überlebensfähigkeit in Granulozyten lassen sich zum einen auf Defekte in der Abwehr von oxidativem Streß oder der Reparatur von oxidativen Schäden an der DNA zurückführen. Zum anderen wurde ein *fliK*- ähnliches Gen

gefunden, dessen Ausschalten einerseits den Flagellenaufbau störte, andererseits aber auch die intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten und die Invasivität in Epithelzellen stark verminderte. Möglicherweise hat das Gen sowohl eine Funktion in der Flagellensynthese als auch im Aufbau des TypIII- Sekretionssystems. Bei zwei weiteren Mutanten mit deutlich verringerter intrazelluläre Überlebensfähigkeit, war bisher keine Funktionszuordnung der gefundenen Proteine möglich.

Eine detaillierte funktionelle Charakterisierung der identifizierten Gene war im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen und ist Ziel weiterführender Forschungsprojekte. Im Einzelfall durchgeführte Experimente dienten nur der Überprüfung spezieller Eigenschaften der jeweils untersuchten Transposonmutanten und sollten keine umfassende funktionelle Analyse ersetzen.

Bei der Bewertung der gefundenen Transposonmutanten fällt auf, daß alle Gene bereits aus der Genomsequenzierung von *P.aeruginosa* PAO bekannt sind. Dies bedeutet, daß auch in PAO die Möglichkeit zu einer gesteigerten Pathogenität zumindest latent vorhanden sein sollte. Der Unterschied in der intrazellulären Überlebensfähigkeit zwischen *P.aeruginosa* PAO und *P.aeruginosa* TB kann eventuell sogar auf eine einzelne Punktmutation in einem Regulator zurückzuführen sein. Es ist daher zweifelhaft, ob die augenblickliche Sicherheitseinstufung von PAO gerechtfertigt ist.

5.4. Quorum sensing

Die Untersuchung auf die Funktionstüchtigkeit des Quorum Sensing erfolgte durch Inkubation der *P.aeruginosa*- Transposonmutanten mit einem *E.coli*- Detektorstamm. Dieser trug ein Plasmid, auf dem eine Luciferase hinter einem Promotor kodiert war, an den nur bei Anwesenheit von Homoserinlactonen eine RNA- Polymerase binden konnte. Für diese Messung war daher kein STM- Ansatz notwendig, da jeder einzelne Mutant in Mikrotiterplatten separat untersucht werden konnte. Die so identifizierten Transposonmutanten mit einem deutlichen Defekt in der Produktion von lang- und kurzkettigen aliphatischen Homoserinlactonen (AHL) wurden auf zwei neu entwickelten Selektionsmedien auf ihre Proteaseaktivität untersucht. In diesen Medien wurde reines Protein - Casein oder Gelatine - als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Der auf die Bakterien ausgeübte Selektionsdruck war somit deutlich höher als bei der Verwendung von Milchpulver als Kohlenstoffquelle, das neben Protein auch

Kohlenhydrate und Fett enthält und so auch proteasedefizienten Bakterien das Wachstum ermöglicht. Wie zu erwarten war, zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Produktion von AHL und der Sekretion von Proteasen.

Die gefundenen Gene kodieren für eine Vielzahl verschiedener Proteine, in der Majorität jedoch für Regulatoren mit zumeist bisher unbekannter Funktion. Eine zweite Gruppe von Genen ist mit dem Fettsäuremetabolismus assoziiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß diese Genprodukte für die Synthese der aliphatischen Seitenketten der Homoserinlactone essentiell sind. Weiterhin wurde ein TonB-abhängiger Eisenrezeptor gefunden, dessen Inaktivierung zu einem Totalausfall des Quorum Sensing führte. Bisher war nur bekannt, daß das Quorum Sensing die Eisenaufnahme reguliert, der umgekehrte Mechanismus war bisher noch nicht beschrieben worden. Weiterhin wurde ein Protein identifiziert, das strukturelle Ähnlichkeiten mit einer β -Lactamase aufweist und dessen Inaktivierung die Menge der freien Homoserinlactone erhöht. Es wäre möglich, daß dieses Protein tatsächlich die Funktion einer Homoserinlactonase hat. Zusätzlich wurden Transposoninsertionen in zwei weiteren DNA-Sequenzen gefunden, die nicht aus der Sequenzierung von *P.aeruginosa* PAO bekannt sind, aber keine klonspezifische DNA des Stammes TB sind, sondern auch bei Isolaten des Klons C gefunden wurden. Mit einer Ausnahme waren alle gefundenen Gene bisher nicht dem Quorum Sensing zugeordnet worden. Dies deutet darauf hin, daß das bisher existierende Regulationsmodell für die Produktion von AHL sehr lückenhaft ist. Das Fehlen zweier DNA-Sequenzen in *P.aeruginosa* PAO, deren Inaktivierung zu einem Defekt im Quorum Sensing des untersuchten Transposonmutanten führte, war ein überraschender Befund und deutet darauf hin, daß die AHL-Produktion verschiedener *P.aeruginosa*-Stämme unterschiedlich reguliert sein kann. In PAO fehlen DNA-Sequenzen, die bei mehreren anderen *P.aeruginosa*-Stämmen vorkommen und dort eine essentielle Funktion für die Regulation und Produktion der Homoserinlactone haben. Die aus der Untersuchung von *P.aeruginosa* PAO erhaltenen Informationen werden somit das Quorum Sensing in anderen *P.aeruginosa*-Stämmen nur lückenhaft beschreiben können.

Auch für die hier identifizierten Gene war im Rahmen dieser Arbeit keine detaillierte funktionelle Charakterisierung vorgesehen. Hierfür sind weiterführende Forschungsvorhaben geplant.

6. Literatur

- ADAIR FW, GEFTIC SG, GELZER J (1969): Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quarternary ammonium compounds. *Appl Microbiol* 1969; **18**: 299-320
- ALBUS AM, PESCI EC, RUNYEN-JANECKY LJ, WEST SEH, IGLEWSKI BH(1997): Vfr Controls Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997 June, **179** (12): 3928-95
- ALLEFS JJHM, SALENTIJN EMJ, KRENS FA, ROWENDAHL GJA(1990): Optimization of non-radioactive Southern blot hybridization: single copy detection and reuse of blots. *Nuc Ac Res* 1990; **18**: 3099 - 3100
- ALLEWELT M, COLEMAN FT, GROUT M, PRIEBE GP, PIER GB(2000): Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 2000 Jul; **68**(7):3998-4004
- ALPUCHE- ARAND CM, RACOONSIN EL, SWANSON JA, MILLER SI (1994): *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes; *J. Exp. Med.*; **179**: 601-608
- Current Protocols in Molecular Biology (AUSUBEL ET AL, 1987-95)
- BARBIERI JT (2000): *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *Int J Med Microbiol* 2000 Oct; **290**(4-5):381-7
- BARINAGA M (1996): A shared strategy for virulence; *Science*; **272**: 1261-1263
- BEAN HS, FARELL RC (1967): The persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous solutions of phenols. *J Pharm Pharmacol* 1967; **19**: 183- 188
- BERG DE (1989); 185. In: BERG DE, HOWE MM (ed.): Mobile DNA; American Society of Microbiology, Washington DC
- BIRNBOIM HC, DOLY J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Ac Res* 1979; **7**: 1513-23
- BOLDUC GR, BOUCHET V, JIANG RZ, GEISSELSODER J, TRUONG- BOLDUC QC, RICE PA, PELTON SI, GOLDSTEIN R (2000): Variability of outer membrane protein P1 and ist evaluation as a vaccine candidate against experimental otitis media due to nontypeable *Haemophilus influenzae*: an unambiguous, multifaceted approach. *Infect Immun* 2000 Aug; **68**(8):4505-17
- BOLLINGER N, HASSETT DJ, IGLEWSKI BH, COSTERTON JW, McDERMOTT TR(1993): Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* : Evidence of Iron Override Effects on QuorumSensing and Biofilm-Specific Gene Regulation; *J Bacteriol* 20001 Mar 15;**183**(6):1990-1996
- BOTZENHARDT K. & DÖRING G (1993): Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*; 1-18. In: CAMPA M, BENDINELLI M, FRIEDMAN H (ed.): *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen; Plenum Press New York
- BRAVENY I, KRUMP- SCHMIDT W (1985): *Pseudomonas aeruginosa*; W. Zuckschwerdt Verlag, München

- BRINT JM, OHMAN DE (1995): Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 1995 Dec; **177** (24):7155-63
- BRONSTEIN I, EDWARDS B, VOYTA JC (1989): 1,2-Dioxethanes: novel chemoluminescent enzyme substrates Application to immunoassays. *J Biolumin Chemolumin* 1989; **4**: 99-111
- CAMILLI A, TILNEY LG, PORTNOY DA (1993): Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis; *Mol. Microbiol.*; **8**: 143-157
- CHANG M, CRAWFORD I (1990): The roles of indoleglycerol phosphate and the TrpI protein in the expression of *trpBA* from *Pseudomonas aeruginosa*; *Nuc. Ac. Res.*; **18**: 979-988
- CHEN W, KUO T (1993): A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA; *Nuc. Ac. Res.*; **21** No. 9
- CHO JJ, SCHROTH MN, KOMINOS SD, GREEN SK (1975): Ornamental plants as carriers of *Pseudomonas aeruginosa*; *Phytopathology*; **65**:4034-4042
- CHURCH GM, GILBERT W (1984): Genomic sequencing; *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**:1991-95
- CORNELIS GR (2000): Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Aug 1; **97**(16):8778-83
- CORNELIS GR, VAN GIJSEGEM F (2000): Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* 2000; **54**: 735-74
- COSTERTON JW. (1980): *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease; 15-24. In: SABATH CD (ed.): *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes, and their treatment*; Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna
- COSTERTON JW ET AL., CHENG KJ, GEESEY GG, LADD TI, NICKEL JC, DASGUPTA M, MARRIE TJ (1987): Bacterial biofilms in nature and disease; *Ann. Rev. Microbiol.*; **41**: 435-464
- CRISTALLI G, DIRUSSO CC, BLACK PN (2000): The amino-terminal region of the long-chain fatty acid transport protein FadL contains an externally exposed domain required for bacteriophage T2 binding. *Arch Biochem Biophys.* 2000 May 15; **377** (2): 324-33
- DACHEUX D, TOUSSAINT B, RICHARD M, BROCHIER G, CROIZE J, ATTREE I (2000): *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 2000 May; **68**(5): 2916-24
- DARWIN AJ, MILLER VL (1999): Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999 Apr; **32**(1): 51-62
- DE KIEVIT TR, SEED PC, NEZEZON J, PASSADOR L, IGLEWSKI BH (1999): RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1999 Apr; **181** (7): 2175-84

- DEKIEVIT TR, IGLEWSKI BH (2000): Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infect Immun* 2000 Sep.; **68** (9): 4839-4849
- DE LORENZO V, HERRERO M, JAKUBZIK U, TIMMIS KN (1990): Mini-*Tn5* transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria; *J. Bacteriol.*; **172**: 6568-6572
- DE LORENZO V, TIMMIS KN (1994): Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with *Tn5*- and *Tn10*- derived minitransposons; (No.31); *Methods in Enzymology*, Academic Press; **Vol.235**: 386-405
- DENNIS JJ & SOKOL PA (1995): Elektrotransformation of *Pseudomonas*. *Methods Mol Biol* 1995; **47**:125- 133
- DENNIS JJ, ZYLSTRA GJ (1998): Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* 1998 Jul; **64**(7):2710-15
- DERETIC V, SCHURR MJ, YU H (1995): *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol* 1995; **3**: 351-356
- DIRUSSO CC, BLACK PN(1999): Long-chain fatty acid transport in bacteria and yeast. Paradigms for defining the mechanism underlying this protein-mediated process. *Mol Cell Biochem* 1999 Feb; **192**(1-2):41-52
- DÖRING G, MAIER M, MÜLLER E, BIBI Z, TÜMLER B, KHARAZMI A(1987): Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 1987; **39**, 136-48
- DOWER WJ, MILLER JF, RAGSDALE CW (1988); *Nucleic Acids Res.*; **16**: 6127
- EGGINK G, ENGEL H, VRIED G, TERPSTRA P, WITHOLT B(1990): Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J Mol Biol* 1990 Mar; **212** (1): 135-142:
- FAREWELL A, DIEZ AA, DIRUSSO CC, NYSTROM T(1996): Role of the *Escherichia coli* FadR regulator in stasis survival and growth phase-dependent expression of *uspA*, *fad* and *fab* genes. *J Bacteriol* 1996 Nov; **178**(22):6443-50
- FARINHA MA, KROPINSKI AM(1990): High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions. *FEMS Microbiol Lett* 1990; **58**: 221-225
- FAVERO MS, CARSON LA, BOND WW, PETERSEN NJ (1971): *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in distilled water from hospitals; *Science*; **173**: 836-838
- FEINBERG AP, VOGELSTEIN B (1983): Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity; *Anal. Biochem.*; **132**: 6-13
- FICK RB, SQUIER SU, REYNOLDS HY (1985): IgG proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis; *J. Infect. Dis.*; **151**: 589-598
- FIGURSKI D, HELINSKI D (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**:1648-1652

- FLETSCHER M, FOODGATE GD (1973): An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces; *J. Gen. Microbiol.*; **74**: 325-334
- FRITZH-LINDSTEN E, HOLMSTROM A, JACOBSSON L, SOLTANI M, OLSSON J, ROSQVIST R, FORSBERG A (1998): Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 1998 Sep; **29**(5):1155-65
- FYFE JAM, GOVAN JRW (1983): Synthesis, regulation and biological function of bacterial alginate; *Prog. Ind. Microbiol.*; **18**: 45-83
- GALLANT CV, RAIVIO TL, OLSON JC, WOODS DE, STOREY DG (2000): *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP-ribosyltransferase activity and cytotoxicity. *Microbiology* 2000 Aug; **146** (Pt 8):1891-9
- GAMBELLO MJ, KAYE S, IGLEWSKI BH (1993): LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* 1993 Apr; **61**(4):1180-4
- GESSARD C (1882): Sur les colorations bleue et verte des lignes à pansements; *C. R. Acad. Sci. Serie D*; **94**: 536-538
- GILL JF, DERETIC V, CHAKRABARTY AM (1987): Alginate production by the mucoid *Pseudomonas aeruginosa* associated with cystic fibrosis; *Microbiological Sciences*; **4**: 296-299
- GOLDBERG JB, WON J, OHMAN DE (1990): Precise excision and instability of the transposon *Tn5* in *Pseudomonas aeruginosa*; *J. Gen. Microbiol.*; **136**: 789-796
- GOLDBERG JB, PIER GB (1996): *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends Microbiol* 1996; **4**: 490- 93
- GROTHUES D, KOOPMANN U, VON DER HARDT H, TÜMLER B (1988): Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains; *J. Clin. Microbiol.*; **26**: 1973-1977
- GOVAN JRW, DERETIC V (1996): Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; **60**: 539-574
- HACKSTADT T, WILLIAMS JC (1981): Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **78**: 3240-3244
- HASSETT DJ, MA JF, ELKINS JG, MC DERMOTT TR, OCHSNER UA, WEST SE, HUANG CT, FREDERICKS J, BURNETT S, STEWART PS, MCFETERS G, PASSADOR L, IGLEWSKI BH(1999): Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 1999 Dec; **34**(5):1082-93
- HAUSER AR, FLEISZIG S, KANG PJ, MOSTOV K, ENGEL JN (1998): Defects in type III secretion correlate with internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells. *Infect Immun* 1998 Apr; **66**(4):1413-20

- HENSEL M, HOLDEN DW (1995): Comments on methods for signature tagged mutagenesis (STM)
- HENSEL M, SHEA JE, GLEESON C, JONES MD, DALTON E, HOLDEN DW (1995): Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection; *Science*; **269**: 400-403
- HERRERO M, DE LORENZO V, TIMMIS KN (1990): Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram negative bacteria; *J. Bacteriol.*; **Vol.172**: 6557-6567
- HICKEY WJ, FOCHT DD (1990): Degradation of mono-, di- and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2; *Appl. Environ. Microbiol.*; **56**: 3842-3850
- HOBBS M, MATTICK JS (1993): Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein- secretion apparatus: a general system for the formation of surface- associated protein complexes. *Mol Microbiol* 1993 Oct; **10**(2): 233-43
- HÖFTE M, MERGEAY M, VERSTRAETE W (1990): Marking the rhizopseudomonas strain 7NSK₂ with a Mu d(lac) element for ecological studies; *Appl. Environ. Microbiol.*; **56**: 1046-1052
- HØIBY N, DÖRING G, SCHIØTZ PO (1986): The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections; *Ann. Rev. Microbiol.*; **40**: 29-53
- HØIBY N, PEDERSEN SS (1989): Cross infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Danish cystic fibrosis patients 42: 124-129 In: HØIBY N, PEDERSEN SS, SHAND GH u Mitarb.(ed.): *Pseudomonas aeruginosa* infection; *Antibiot Chemother*, Karger, Basel
- HOLLOWAY BW (1955): Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*; *Jour. Gen. Microbiol.*; **13**: 572-581
- HOLLOWAY BW, MORGAN AF (1986): Genome organization in *Pseudomonas*; *Ann. Rev. Microbiol.*; **40**: 79-105
- HOLLOWAY BW, DHARMSTHITI S, KRISHNAPILLAI V, MORGAN AF, RATNANINGSIH E, SINCLAIR ME, Saffery R (1991): Chromosome organization in *Pseudomonas aeruginosa*; 44: 23-28. In: HOMMA, TANIMOTO, HOLDER HOIBY, DÖRING (ed.): *Pseudomonas aeruginosa* in human diseases; Karger, Basel
- HOLLOWAY BW, RÖMLING U, TÜMLER B (1994): Genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO; *Microbiology*; **140**: 2907-2929
- HORAN TC (1986): Nosocomial infection surveillance 1984, *Morbid. Mortal. Wkl. Rep.*; **35**: 17-29
- HORNEF MW, ROGGENKAMP A, GEIGER AM, HOGARDT M, JACOBI CA, HEESEMANN J (2000): Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis. *Microb Pathog* 2000 Dec; **29**(6): 329-43
- HORWITZ MA (1983): The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome- lysosome fusion in human monocytes; *J. Exp. Med.*; **158**: 2108-2126

- INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids; *Gene*; **96**: 23-28
- INVITROGEN: The Electroporator II ; instruction manual; Version A
- ISBERG RR (1994): Intracellular trafficking of *Legionella pneumophila* within phagocytic cells; 263-278. In: MILLER VL, KAPER JB, PORTNOY DA, ISBERG RR (ed.): Molecular genetics of Bacterial Pathogenesis; Part 3; 209- 308
- IYOBE S, HIRAI K, HASHIMOTO H (1991): Drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to new quinolones; *Antibiot. Chemother.*; **44**: 209-214
- JENDROSSEK V, GRASSME H, MUELLER I, LANG F, GULBINS E(2001):*Pseudomonas aeruginosa*-Induced Apoptosis Involved Mitochondria and Stress- Activated Protein Kinases. *Infect Immun* 2001 Apr; **69**(4): 2675-83
- JONES RM, PAGMANTIDIS V, WILLIAMS PA(2000): *sal* genes determining the catabolism of salicylate esters are part of a supraoperonic cluster of catabolic genes in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol* 2000 Apr; **182** (7): 2018-25
- KAHNG HY, BYRNE AM, OLSEN RH, KUKOR JJ(2000): Characterization and role of *tbuX* in utilization of toluene by *Ralstonia pickettii* . *J. Bacteriol* 2000 Mar; **182** (5):1232-1242
- KRALL R, SCHMIDT G, AKTORIES K, BARBIERI JT (2000): *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect Immun* 2000 Oct; **68**(10):6066-8
- KRAWIEC S, RILEY M (1990): Organization of the bacterial chromosome; *Microbiol. Rev.*; **54**: 502-539
- KUBESCH P (1988): Membranständige Pathomechanismen von *Pseudomonas aeruginosa*. Studie zur Pathogenese der Lungeninfektion mit *P.aeruginosa* bei Patienten mit Cystischer Fibrose; Dissertationsschrift Universität Hannover
- LORY S, TAI PC (1985): Biochemical and genetic aspects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* 1985; **118**: 53- 69
- LUMPPPIO HL, SHENVI NV, SUMMERS AO, VOORDOUW G, KURTZ DM(2001): Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgans*: novel oxidative stress protection system. *J Bacteriol.* 2001 Jan; **183** (1): 101-8
- MACNAB RM (1992): Genetics and Biogenesis of bacterial flagella. *Annu Rev Genet* 1992; **26**:131-58
- MACNAB RM (1999): The Bacterial Flagellum: Reversible Rotary Propellor and Type III Export Apparatus. *J Bacteriol* 1999 Dec; **181**(23):7149-53
- MAHAN JM, SLAUCH JM, MEKALANOS JJ (1993): Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues; *Science*; **259**: 686-688
- MAHAN JM, TOBIAS JW, SLAUCH JM, HANNA PC, COLLIER RJ, MEKALANOS JJ (1995): Antibiotic- based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host; *Genetics*; **92**: 669-673
- MARTIN PR, HOBBS M, FREE PD, JESKE Y, MATTICK JS (1993): Characterization of *pilQ*, a new gene required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1993 Aug; **9**(4) : 857-68

- McKNIGHT SL, IGLEWSKI BH, PESCI EC (2000): The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2000 May; **182**(10):2702-8
- MIETHKE N (1985): Das Exopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa*: Zusammensetzung und Bedeutung für die Pathophysiologie des Lungenbefalls bei Mukoviszidose; Dissertationsschrift Med. Hochschule Hannover
- MILLER JF, MEKALANOS JJ, FALKOW S (1989): Coordinate Regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* 1989; **243**: 916- 922
- MILLER J (1994): Bacterial transformation by Electroporation; (No.30); *Methods in Enzymology*, Academic Press; 375-385
- MILLER VL, KAPER JB, PORTNOY DA, ISBERG RR (ed.)(1994): Molecular genetics of Bacterial Pathogenesis; Part 3; 209- 308
- MINAMINO T, GONZALES-PEDRAJO B, YAMAGUCHI K, AIZAWA SI, MACNAB RM (1999): FliK, the protein responsible for the flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. *Mol Microbiol* 1999 Oct; **34** (2)
- MITCHERLICH E, MARTH EH (1984): Microbial survival in the environment; Springer, Berlin
- MULGRAVE L (1991): The changing ecology of hospital bacteria and the selective role of cephalosporines; *Epidemiol. Infect.*; **106**: 121-132
- MULLIS K., FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H(1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Sym* 1986; **51**: 263-73
- MULLIS K, FALOONA F (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**: 335-50
- OHBA A, MIZUSHIMA T, KATAYAMA T, SEKIMIZU K(1997): Amounts of proteins altered by mutations in the dnaA gene of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 1997 Mar; **404**(2-3):125-8
- O'HOY K, KRISHNAPILLAI V (1987): Recalibration of the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO chromosome map in time units using high-frequency-of-recombination donors; *Genetics*; **115**: 611-618
- OJENIYI B, BAEK L, HØIBY N (1985): Polyagglutinability due to loss of O-antigenic determinants in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients; *Pathol. Microbiol. Scand. [B]*; **93**: 7-13
- OJENIYI B (1988): Bacteriophages in sputum of cystic fibrosis patients as a possible cause of in vivo changes in serotypes of *Pseudomonas aeruginosa*; *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*; **96**: 294-298
- OJENIYI B (1994): Special properties of *Pseudomonas aeruginosa* from CF patients. *APMIS* 1994, Supplementum No. 46; **102**: 9- 12
- OLSON B, WEINSTEIN RA, NATHAN C, CHAMBERLIN W, KABINS SA (1985): Occult aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology and implications for therapy and control; *J. Infect. Dis.*; **152**: 769-774

- OLSEN GJ, WOESE CR, OVERBEEK R (1994): The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* 1994; 176: 1- 6
- PALLERONI NJ (1986): Taxonomy of *Pseudomonads*, 3-25. In: Sokatch JR (ed.): The Bacteria, Volume X; The Biology of *Pseudomonas*. Academic Press, Orlando, FL.
- PALLERONI NJ (1993): Structure of the bacterial genome; 57-113. In: GOODFELLOW M, O'DONNELL AG (ed.): Handbook of new bacterial systematics; Academic Press, London
- PEARSON JP, FELDMAN M, IGLEWSKI BH, PRINCE A (2000): *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* 2000 Jul; **68** (7): 4331-4
- PARSEK MR, GREENBERG EP (2000): Acyl- homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Aug; **97**: 8789-8793
- PESCI EC, MILBANK JB, PEARSON JP, MCKNIGHT S, KENDLE AS, GREENBERG EP, IGLEWSKI BH (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11229-11234
- PELLET S, BIGLEY DV, GRIMES DJ (1983): Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem; *Appl. Environ. Microbiol.*; **45**: 328-332
- PETERSON PK, VERHOEF J, SCHMELING D, QUIE PG (1977): Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes; *J. Clin. Invest.*; **136**: 502-509
- PIANZZOLA MJ, SOUBES M, TOUATI D (1996): Overproduction of the rbo gene product from *Desulfovibrio* species suppresses all deleterious effects of lack of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 1996 Dec; **178** (23): 6736-42
- PIER GD (1985): Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host - bacterium interaction; *J. Infect. Dis.*; **151**: 575-580
- POLLAK M. (1985): *Pseudomonas aeruginosa*; 1236-1250. In: MANDELL GL, DOUGLAS RG JR., BENNET JE (ed.): Principles and practice of infectious diseases, 2. Auflage; John Wiley & Sons, New York
- PRESTON MJ, SEED PC, TODER DS, IGLEWSKI BH, OHMAN DE, GUSTIN JK, GOLDBERG JB, PIER GB (1997): Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun* 1997 Aug; **65**(8):3086-90
- PUGSLEY A (1993): The complete general secretory pathway in gram- negative bacteria; *Microbiol. Rev.*; **57**: 50-108
- RAINEY PB, HEITHOFF DM, MAHAN MJ (1997): Single-step conjugative cloning of bacterial gene fusions involved in microbe-host interactions. *Mol Gen Genet* 1997 Sep; **256**(1):84-7
- REIMMANN C, BEYELER M, LATIFI A, WINTELER H, FOGLINO M, LAZDUNSKI A, HAAS D (1997): The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N- butyryl- homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide and lipase. *Mol Microbiol*; **24**: 309-319

- 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 Stuttgart Vienna
- RÖMLING U, GROTHUES D, BAUTSCH W, TÜMMLER B (1989): A physical genome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO; *EMBO Journal*; **8**: 4081-4089
- RÖMLING U, TÜMMLER B (1992): A *Pacl*/*Swal* map of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome; *Electrophoresis*; **13**: 649-651
- RÖMLING U, WINGENDER J, MÜLLER H, TÜMMLER B (1994 (1)): A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats; *Appl. Environ. Microbiol.*; **60**: 1734-1738
- RÖMLING U, FIEDLER B, BOSSHAMMER J, GROTHUES D, GREIPEL J, VON DER HARDT H, TÜMMLER B (1994 (2)): Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis; *J. Infect. Dis.*; **170**: 1616-1621
- ROSQVIST R, HAKANSON S, FORSBERG A, WOLF-WATZ H (1995): Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersiniae*, *Salmonellae* and *Shigellae*; *EMBO J.*; **14**: 4187-4195
- ROTHMEL RK, CHAKRABARTY AM, BERRY A, DARZINS A (1991): Genetic Systems in *Pseudomonas*; (No.23); *Methods in Enzymology*, Academic Press; **Vol. 204**: 485-474.
- RUMBAUGH KP, GRISWOLD JA, IGLEWSKI BH, HAMOOD AN (1999): Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* 1999 Nov; **67** (11):5854-62
- SAGE AE, PROCTOR WD, PHIBBS JR(1996): A Two-Component Response Regulator *gltR*, Is Required for Glucose Transport Activity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol* 1996 Oct.; **178** (29): 6064-66
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988): Primer- directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **238**: 487-91
- SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N (1985): Enzymatic amplification of beta- globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350-54
- SCHAAL KP (1994): Die Gattung *Pseudomonas*; 464-471. In: BRANDIS H, KÖHLER W, EGGERS HJ, PULVERER G (ed.): *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 7. Auflage; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- SCHNEIDER S, WUBBOLTS MG, SANGLARD D, WITHOLT B(1998): Biocatalyst engineering by assembly of fatty acid transport and oxidation activities for In vivo application of cytochrome P-450BM-3 monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 1998 Oct; **64** (10): 3784-3790
- SCHWARTZ DC, CANTORCR(1984): Separation of yeast chromosome- sized DNAs by pulsed- field gel electrophoresis. *Cell* 1984; **37**: 67-75

SCHWEIZER HD (1993): Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *Biotechniques* 1993 Nov; **15**(5):831-4

SINAI AP, BAVOIL PM (1993): Hyper-invasive mutants define a novel *pho*-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*; *Mol. Microbiol.*; **10**: 1125-1137

SLAUCH JM, MAHAN MJ, MEKALANOS JJ (1994): In vivo expression technology for selection of bacterial genes specifically induced in host tissues. *Methods Enzymol* 1994; **235**:481-92

SMITH CL, ECONOME JG, SCHUTT A, KLEO S, CANTOR CR(1987): A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science* 1987; **236**:1448-53

SOUTHERN EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis; *J. Mol. Biol.*; **98**: 503-517

SPANGENBERG C (1997): Sequenzdiversität von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation Hannover 1997

SPEERT DP (1993): *Pseudomonas aeruginosa* - phagocytic cell interactions;163-181. In: CAMPA M, BENDINELLI M, FRIEDMAN H (ed.): *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen; Plenum Press New York

SPERANDIO V, MELLIES JL, NGUYEN W, SHIN S, KAPER JB (1999): Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Dec 21; **96** (26): 15196-201

STEPHENS C, SHAPIRO L (1996): Bacterial pathogenesis: Delivering the payload; *Current Biology*; **6**: 927-930

STINTZI A, EVANS K, MEYER JM, POOLE K (1998): Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* : lasR/lasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis; *FEMS Microbiol Lett* 1998 Sep 15; **166**(2): 341-5

STOREY DG, UJACK EE, RABIN HR, MITCHELL I (1998): *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1998 Jun; **66**(6):2521-8

TAKASE H, NITANAI H, HOSHINO K, OTANI T (2000): Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun* 2000 Aug; **68** (8): 4498-504

THOMASSEN MJ, DEMKO CA, DOERSHUK CF, ROOT JM (1985): *Pseudomonas aeruginosa* isolates: Comparison of isolates from campers and from sibling pairs with cystic fibrosis; *Pediat. Pulmonol.*; **1**: 40-45

TODER DS (1994): Gene replacement in *Pseudomonas aeruginosa* (No.36); *Methods in Enzymology*, Academic Press; **Vol.235**: 466-474

TÜMLER B, KOOPMANN U, GROTHUES D, WEISSBRODT H, STEINKAMP G, VON DER HARDT H (1991): Nosocomial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* by cystic fibrosis patients; *J. Clin. Microbiol.*; **29**: 1265-1267

- VAN DELDEN C, PESCI EC, PEARSON JP, IGLEWSKI BH (1998): Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant; *Infect Immun* 1998 Sep; **66**(9): 4499-502
- VOET D, VOET JG (1992): Biochemie, VCH
- WALKER JM (1984): In: *Methods in molecular microbiology*; Bd.2: Nucleic Acids; Humana Press, Clifton, New Jersey
- WEI Y, LEE JM, RICHMOND C, BLATTNER FR, RAFALSKI JA, LAROSSA RA (2001): High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001 Jan; **183** (2): 545-56
- WIEHLMANN L (1996): Etablierung der Sequenz-spezifisierten Transposonmutagenese zur Charakterisierung eines intrazellulär vermehrungsfähigen *Pseudomonas aeruginosa* Stammes. Diplomarbeit Universität Hannover
- WHITELEY M, PARSEK MR, GREENBERG EP (2000): Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2000 Aug; **182**(15):4356-60
- WILSON K (contr.): Preparation of genomic DNA from bacteria; *Current Protocols in Microbiology* (1987); **2.4**
- WINKLER U, WINGENDER J, JÄGER KE (1985): Infektion der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa* bei der Cystischen Fibrose; *Klin. Wochenschr.*; **63**: 490-498
- WOODS DE, SOKOL PA, BRYAN LE, STOREY DG, MATTINGLY SR, VOGELHJ, CERI H(1991): *In vivo* regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J Infect Dis* 1991; **163**: 143-149
- WU H, SONG Z, HETZNER M, ANDERSEN JB, HEYDORN A, MATHEE K, MOSER C, EBERL L, MOLIN S, HOIBY N, GISKOV M (2000): Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2000 Oct; **146** (Pt 10): 2481-93
- ZIELINSKI NA, MAHARAY R, ROYCHOUHDURY S, DANGANAN CE, HENDRICKSON W, CHAKRABARTY AM (1992): Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Environmental regulation of the *algC* promotor. *J Bacteriol* 1992; **174**: 7680-7688

7. Abkürzungsverzeichnis

A	2'-Desoxyadenosin- 5'-monophosphat
As.	Aminosäuren
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	2'-Desoxycytosin- 5'-monophosphat
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cfu	„colony forming units“ = Lebendkeimzahl
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
F	Farad, Einheit der elektrischen Kapazität
FCS	fetales Kälberserum
G	2'-Desoxyguanosin- 5'-monophosphat
h	Stunde
I.E.	Injektionseinheiten
Kap.	Kapitel
kBp	1000 Basenpaare
Konz.	Konzentration
M	molar
max.	maximal
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mögl.	möglich
o.	oder
Ω	Ohm, Einheit d. elektrischen Widerstands
OD	Optische Dichte
ORF	„open reding frame“; mögliches Gen
PAAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
T	2'-Desoxythymidin- 5'-monophosphat
U	Unit (Einheit der enzymatische Aktivität)
V	Volt
% v/v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumeneinheiten
w/v	Gewichtsprozent
xg	Zentrifugalbeschleunigung (Vielfaches der Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²)

8. Anhang

Fragmentgrößen des *Bst*EII- Verdaus der DNA des Phagen λ (Bp):

8454	7242	6369	5686	4822	4324	3675
2323	1929	1371	1264	702	224	117

Oligonukleotidsequenzen:

Signalsequenz

Kom-1	CTG GGT ACC CCA CTA GTC C
Kom-2	CAC GGT ACC TCC ACT CAC C
TAG-1	GTA CCC CAC TAG TCC AAG C
TAG-2	TAC CTC CAC TCA CCC AAG C

Transposasegen

Tsp-1	CAA GTT GGC TCA GGA GTT TCC C
Tsp-2	ATC TGA TAG CCA CCC AAC TCC G

Kanamycinresistenzgen

Km-1	TCT ATC GAT TGT ATG GGA AGC CC
Km-2	ATG AAG GAG AAA ACT CAC CGA GG

Gentamycinresistenzgen

Gm-1	AAC GAT GTT ACG CAG CAG GGC
Gm-2	TGT ATA GAG AGC CAC TGC GGG

Sequenzierung von Transposonmutanten

2D5:	2D5P- L	AAG GCA GCG AAC GCC TGG C
	2D5P-R	GAG GAA GGG ACG ATG GCG C
	2D5LF-L	CAT GCC AAG CGC ATG GCC G
	2D5LF-R	CAC CCT CGC CAT ACA GCG C
3D1:	3D1P-L	CTG GCA ACG CTG CAT CGG C
	3DD1P-R	CCG TTG GCG AGG GTG TAG G
14B2:	14B2-P2-L	CTT TCC TCT CGC GCC ACG C
	14B2-P2-R	GGA AGA TGC CGT GCA CCG C
	14B2-P1-L	AAT CGC GCC CAT GCG CTG C
	14B2-P1-R	GAC CAG CAG GAC CTT GCG C
15A3:	15A3P-L	GGA GTC GGA TCA TGG CGG C
	15A3P-R	CTG CTT CGG CAA CGC CTG C

15B10:	15B10P-L 15B10P-R	GAT CGA GGG CGA TTC GCG C CGT TCC TGA CGG AGA GGG G
19C2:	19C2P-L 19C2P-R 19C2AT-L 19C2AT-R	TGG GCG TCG ATG ATG GCG C ACC CTT CAA GGC GAC CGG G CGT TGC TGG TCG ACA GCG G GTC CAG TTG CCG GTA GGC C
22D11:	22D11P-L 22D11P-R 22D11AV-L 22D11AV-R	GTC AGG TAG CCG TGG GTC G TAC ATC AGG CGT CGG CGG C GGC TTC GGT AAG GCT GGC C GGA GAC CGC GAA GAA GCC C
24A12:	24A12P-L 24A12P-R 24C5DG-L 24C5DG-R 24C5LW-L 24C5LW-R	GCT GAA CGG CTT GCC CAG G GCG TTT CAT CGC CAG CGG C GAG GCT ATC GAG ATG GGC G GCC CGG CAG AAG AAC CTG G TGC CCT ATC CCT GGC TGG C TGA TCC GCG CAT GCT CGC G
37D8:	37D8P-L 37D8P-R	GGG AAT ACG GTT GCC GCC G ACG GGG GAG TTG GCG AAG G
41D3:	41D3P-L 41D3P-R	AAG AAC GGC CGT CGT CGG C GGG CCT GCC CGA AGA AGG C
D9C10:	D9CRK-L D9CRK-R	AGG GTC TGC GCC AGG ATC C GGC CGA CCA TCA GCT TGC C
D10B10:	D10BP-L D10BP-R D10BT-L D10BT-R	TGG GCG CGC AAG CTG TTC G CCA GGG GAT CGT CCT TGC G CAA GGC CTA CGT CGA GCG G CGG CGA GCA TGC TGT TGG C

Auswertung der 18 Hybridisierungen zur Bestimmung der „Kreuzhybridisierungen“ der konstruierten pTnMod-OGm mit Signalsequenzen

Klon	Signalstärke																Ø	Kreuzhyb. zu	
	1--	2--	3--	4--	-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	--1	--2	--3	--4	--5	--6			--7
Plasmid																			
111	2				2	1	2	1											-
112	4				3	1	1	1		4	1								4
113	1																		-
114	3	1			3	1		1				4							3
115	1																		-
116	2																		-
117	5	3		1	4			3	4					2	2	4		4	166,217,445
118	4	1	1		3	1		2	2										-
121	4				1	4				3									4
122	4				1	4					4	1							4
123	3				1	3			1			2							(3)
124	2				2				1										-
125	2	3			2	1	1		4	2			3	2					-
126	3								1										-
127	3	1	1		1		1	2	2			1		1					-
128	2							1	1										-
131	1				1		1		1										-
132	4		4		2		1	1	1		2	3							-
133								2											-
134	4				1		3		4				4			4			4
135		2						2					2						-
136	1	2			1	1	1	3	1			3					1		-
137	4						2									4			(3)
138	1	2			2		1	2	2										-
141	1	2			2				1										-
142	1	1			2	1			2										-
143	1	1	1			1			2										-
144	1				2	1			2										-
145	1	2	1		2	1	1	3	2					2			2		-
146	1	1			2	1	1		1										-
147	5	2			2	1	1	5	1		1	1				5	3	4	div
148	5	3	3		2		1	4	2			1	3				4	4	div
151	1	1	1		2		1												-
152	4	1			1				1			3							-
153	1	2	1		2	1	2	1	1	2			1				1		-
154	3				1				1	2				4					-
155	4	1			2	3	1		3	2			3	4					4
156	3	1			2	1	1	1	4	2					3				3
157	2	1			1		2	1	1	1						2			-
158	1	1	1		1	2	2			1									-
161	5	4	5		2	2	5	2	1	5		5		4	1			2	5
162	1	2	2			1		3		1									-
163	4		2			1				5			4						4
164		1			1	1	1			2									-
165	2									1					3				-
166	5	4	1	4	5	1	3	4	1	5				2	4	5	5	4	5
167	4	1	1				3			5				4			4		4
168	3	1					2			3							3		3
211	1					1	1	1	2	1				1				1	-
212		2	1	1		1	1	1	2	1			2					2	-
213		1				1			3										-
214						1								2					-

Anhang

Klon	Signalstärke																Ø	Kreuzhyb. zu			
	1--	2--	3--	4--	-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	--1	--2	--3	--4	--5	--6			--7	--8	
215		1				1									1				-		
216		4	4			4	3	1	1				4		4				4	323	
217	5	4	1	4		4	1	3	4	1	5			2	4	4	5	3	4	117,166,445	
218	1	5	5			5	3	2	1		5		5	3	2		2	5	5	363	
221		4	1	1			4		1	1		4							4		
222													3	1					-		
223		4	1			1	3	4	1	1	1		4						-	332/232	
224		4	1	1		1	4	2	1	1	1			5	1		1	1	4		
225																			-		
226		1	1			1	1	1											-		
227	1																		-		
228	1	1	1			1		1	1		1								-		
231	5	4	1	1		1	2	5	2	2	5		5		1	2		1	2	5	161
232		4	1			1	3	4	2	1	1			4	3				1	4	?
233																				-	
234		4	3				3	1		2				5					4	?	
235		2		1		1	2	1	1	1			1				1		-		
236	1					1			1										-		
237																			-		
238		4	1	1		1		4	1								1	4	4		
241		3				1	2		5	1		4							4		
242						1													-		
243		4				1	1	1	4					4	4			1	4	244	
244		4	1	1		1	1	2	4	1	1			1	5	2		1	1	4	
245		1	1				2	1		1									-		
246		4	1			1		2	4		1					4	1		4		
247	1		2	1		1		2	1		1								-		
248	1		1	1		1		2	1		1								-		
251	1	4	2			1	2		2	4			4						4		
252				1		1	2	1	1	1								1	-		
253				1		1	1	1	1	1				1				1	-		
254	1	4	1			3	2	1	5	1			1	4	2		1	1	4	125/224	
255		4	1			1	2	1	4	1				4					4		
256		2	2																-		
257		3	2						2	1							4		-	357	
258	1	1	2	1		1	2	2	1		1							1	-		
261		3	3			1	1			2									-		
262		1	1			1	2	1	1		1								-		
263	1	1	1				2	1	1	1									-		
264		1	1				1		1										-		
265	1	1	1				1		1		1								-		
266		4	2	1		2	2	2	1		4			1	4	1	2		4		
267		3								4			2				4		4		
268	1	1	2	1		1	2	2	1		1							1	-		
311	4		4			1			1			1	2						-	132	
312			3						1										-		
313																			-		
314			3			1								2					-		
315			2					1	1					4					-		
316			4			3			1							2			(3)		
317																			-		
318		1	4			2			1					1				1	-		
321		1	2							1									-		
322																			-		
323		2	3			1	2							3		3			(3)	216 div	
324		4	4			1	2	1	2		3			3	2			1	-		
325		1	4				3	1	2	1	1			1	3				3		
326		1	4				2		1	1									-		

Anhang

Klon	Signalstärke																Ø	Kreuzhyb. zu	
	1--	2--	3--	4--	-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	--1	--2	--3	--4	--5	--6			--7
327		1	4			4	1	3		1			1	1			4		4
328		1	5			4	1	3		1			1				4		4
331		1	5		1	2	5	2	1	1	4			1					5
332		2	5			2	4	2	1	1		4	1				1		4
333		1	4			1	4	1				3							4
334		1				1	1	1		1			1						-
335					1	1	1	1		1			1	1					-
336			3																-
337		1	5		1	1	5						1	1			5		5
338		1	5			1	5	1		2							4		5
341					2	1	1	1	1	1									-
342			3					1				3							-
343			4		2	1	2	3	1	1			2		1				(3)
344		1	4		1		1	4					4	1					4
345		1	4		1		1	4	2	1				5					4
346		1	1		3	1	2	2		1			1						-
347		1	4		2			3		1							4		4
348		1	5		2	1		4		1			1				4		4
351		1	1				1	1	1										-
352		1	1				1												-
353		1	1				1	1		1									-
354		1	4						3				3						3
355			3	1	2	1	1	2	2	1			1		3				(3)
356		1	4		1				3						3				3
357		4	5		2	1	1	1	4	3			2	1	2	2	5	1	5
358																			-
361			3							2									-
362																			-
363		5	5		4	1	1	1		4			4	1	1			5	4
364			3							3				2					(3)
365			5		2	1	1	1	2	3			1		4				4
366		4	4		3	2	1	1		3			2	1	1	1		2	-
367					1														-
368			4		2	1		1		5			1	1	1			4	4
411	1	2	5	5	5	1	1	1	1	1	5		2		2		4	2	5
412	1	1	1		1	1	2	1											-
413	2	1	1	4	4	1	1	2					5						4
414	1	1	1	5	4	1	1	1					1	4					4
415	1		1	2	3										4				(3)
416	1	1	2	5	4	1	1						1			4	4	1	4
417	1	1	1	4	4	1	1								4	4			4
418				2	2														-
421	1	1	1	5		3	1	1			4			1					4
422	2	1	1	4		4	1	2	1			5							4
423	1	2	1	5		4	2	2	1				5	2	1		2	1	5
424	1	1	1	2	1	1	2	1						2					-
425	3	1	1	5	1	4	2	2	1		5			1		2	1		-
426	1	1	1	5	1	4	1	1	1			5	2	1					-
427	2	1	1	4	1	4	1	2	1				4	1					-
428		4	4	5	3	4	1	1	1	3			2	4	1	1	2	3	4
431	1	1	1		1	1	1	1	1										-
432	1	1	1		2	2	1	1	1									1	-
433	2	1	2	5	2	1	5	2	1				5				1	1	5
434	1	1			1	1	1	1											-
435	1	3	3	5	1	1	5	1	4	2			2		5		2	2	5
436	1	1	1	3	1	1	3	1	1					2	4	1	1		3
437	1		1		1	1	1	1											-
438	1		1	1	1	2	1	2	1										-

Anhang

Klon	Signalstärke																Ø	Kreuzhyb. zu		
	1--	2--	3--	4--	-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	--1	--2	--3	--4	--5	--6			--7	--8
441	1	1	1			2	2	1	1									1	-	
442	1	1	1	4			1		4	4		5							4	
443	1		1	3			1		4				4						4	
444	1																		-	
445	5	3	1	2		3	1		3	1					2	3	4	1	-	117,166,217
446	1	1	1			1	1	1					1						-	
447	1	1		3			1	1	4								4		4	
448	2	1	1				1		2						3				-	
451	2			4			1		2	4		5							4	
452	1	2	1	5		1	2	1	1	5			5	3			2	1	5	
453				3						3				3	1				3	
454																			-	
455	2	1	1				1	1	1	1					2				-	
456	1	2	1	2			1	1	2	2						3			-	
457	1	1	1	3			1			3							5		3	
458	1		1				2	1	2				1						-	
461		1		4		1	1		1		5	4					1	1	4	
462	2			4				1	1		4		4						4	
463	1			4		1		1			4			4	2		1		4	
464	1		1			1	1	1	1										-	
465	1	1	1	3			1	1	2	2	3				4		1	1	3	
466	1		2	4			1	1	1		4				2	4	2		4	
467	1	1	1				2		1										-	
468	1		1	4			1	1	1		4							4	4	