

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

**Anpassung von *Pseudomonas aeruginosa* an die
Mukoviszidose-Lunge: anaerobe Regulation
metabolischer Schlüsselenzyme**



Vollständiger Abdruck
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Anja Eichner

2012

.... meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Herrn PD Dr. Michael Hogardt angefertigt.

1. Gutachter	Prof. Dr. Dirk Schüler
2. Gutachter	Prof. Dr. Heinrich Jung

Eingereicht am	23. April 2012
Tag der mündlichen Prüfung	27. September 2012

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den angegebenen Quellen angefertigt wurde. Ich habe weder anderweitig versucht eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung zu absolvieren, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 23. April 2012

Anja Eichner

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
A. ZUSAMMENFASSUNG	17
B. EINLEITUNG	19
1. Mukoviszidose	19
2. Pathophysiologie der CF-Lunge	21
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.1. Taxonomie und allgemeine Eigenschaften	24
3.2. Zellgebundene und extrazelluläre Virulenzfaktoren	25
3.3. Biofilmbildung und Quorum Sensing	26
3.4. Mutatorstämme	28
4. Phäno- und genotypische Anpassungen	29
5. Aerober und anaerober Energiemetabolismus	33
6. Ziele dieser Arbeit	36
C. MATERIALIEN	38
1. Patientenisolat	38
2. Bakterienstämme	38
3. Plasmide und Oligonukleotide	40
4. Nährmedien, Antibiotika und andere Zusätze	46
4.1. Medien und Puffer	46
4.2. Antibiotika und andere Zusätze	48
5. Chemikalien, Geräte und Labormaterialien	49
5.1. Chemikalien	49
5.2. Geräte und Labormaterialien	54

D.	METHODEN	57
1.	Kultivierung und Stammhaltung von Mikroorganismen	57
2.	Bestimmung der optischen Dichte	57
3.	Arbeiten mit Nukleinsäuren	57
3.1.	Isolierung bakterieller DNA	58
3.2.	Isolierung von Plasmid-DNA	58
3.3.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	58
3.4.	Sequenzierung	58
3.5.	Agarosegelelektrophorese	58
3.6.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	59
3.7.	Präzipitation von DNA	59
3.8.	<i>In-vitro</i> -Amplifikation durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	59
3.9.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	61
3.10.	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	62
3.11.	Ligation von DNA-Fragmenten	63
3.12.	Transfer von DNA	63
3.12.1.	Herstellung Kalzium-kompetenter Zellen	63
3.12.2.	Transformation von Plasmid-DNA	64
3.12.3.	Blau-Weiß-Test	65
3.12.4.	Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	65
4.	Zielgerichtete Mutagenese	66
5.	Proteinchemische Arbeiten	68
5.1.	Herstellung rekombinanter Proteine	68
5.2.	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	69
5.3.	Bestimmung der Isocitratdehydrogenase-Aktivität	70
5.4.	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	71
5.5.	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
5.6.	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
5.7.	Färbung von Proteingelen	74
6.	Gelretardierungsexperimente	74
6.1.	Markierung von DNA-Sonden	75
6.2.	Überprüfung der DNA-Markierung	75
6.3.	Band Shift Reaktion	77
6.4.	Chemilumineszente Detektion	78
7.	Isotopolog-Experimente	78
7.1.	$U\text{-}^{13}\text{C}$ -markierte Aminosäure-Mischung	80
7.2.	$U^{13}\text{C}$ -markiertes Algenlipid	81

7.3.	Probenaufarbeitung GC/MS	82
7.4.	Probenaufarbeitung NMR	83
E.	ERGEBNISSE	85
1.	Sauerstoffabhängige Regulation metabolischer Gene von <i>P. aeruginosa</i>	85
1.1.	<i>In silico</i> Analyse metabolischer Gene	85
1.2.	Anaerobe Expression in LB-Medium	88
1.3.	Anaerobe Expression im artifizialen Sputummedium (ASM)	91
2.	ANR-abhängige Regulation metabolischer Gene in <i>P. aeruginosa</i>	92
2.1.	Rekombinante ANR-Proteine	92
2.2.	Überexpression von <i>anr</i> in Reporterstämmen	96
2.3.	Autoregulation des ANR-Proteins	101
3.	Charakterisierung und Regulation der Isocitratdehydrogenase	
	Isoenzyme ICD und IDH in <i>P. aeruginosa</i>	104
3.1.	Mikrobielle Isocitratdehydrogenasen	104
3.2.	Sequenzvergleiche und Konservierung der Isocitratdehydrogenase	106
3.3.	Kofaktor-Abhängigkeit	107
3.4.	Regulation der Isocitratdehydrogenasen	109
3.4.1.	Wachstumsphasenabhängige Regulation	109
3.4.2.	RpoS-abhängige Regulation	112
3.4.3.	Posttranslationale Regulation	119
4.	Flussanalyse des Kohlenstoffmetabolismus von <i>P. aeruginosa</i>	123
4.1.	¹³ C-Markierungsmuster bei Wachstum mit Aminosäure-Mischung	126
4.2.	¹³ C-Markierungsmuster bei Wachstum mit Fettsäuren	129
4.3.	¹³ C-Markierungsmuster unter aeroben und anaeroben Bedingungen	136
4.4.	¹³ C-Markierungsmuster der Patientenisolate M1 und M26	138
F.	DISKUSSION	143
1.	Sauerstoffabhängige Regulation metabolischer Gene von <i>P. aeruginosa</i>	143
2.	ANR-abhängige Regulation metabolischer Gene von <i>P. aeruginosa</i>	151
3.	Regulation der Isocitratdehydrogenasen ICD und IDH von <i>P. aeruginosa</i>	155
3.1.	RpoS-abhängige Regulation	156
3.2.	Posttranslationale Regulation	158
4.	Metabolische Flussanalysen	160

G.	LITERATURVERZEICHNIS	166
H.	ANHANG	179
1.	Isotopolog-Rohdaten	179
2.	Publikationen und Tagungsbeiträge	188
3.	Danksagung	189

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

B.1.	CFTR-Mutationsklassen I-VI _____	20
B.2.	Altersabhängige Prävalenz CF-typischer Erreger _____	22
B.3.	Quorum-Sensing-Systeme in <i>P. aeruginosa</i> _____	27
B.4.	Adaptationsmechanismen von <i>P. aeruginosa</i> _____	31
B.5.	TCA-Zyklus von <i>P. aeruginosa</i> Mutatorstämmen _____	32
B.6.	Schema der Denitrifikation _____	34
B.7.	Konsensussequenz von ANR in <i>P. aeruginosa</i> _____	35
B.8.	Regulation der Denitrifikation _____	36
D.1.	Prinzip der zielgerichteten Mutagenese _____	67
D.2.	Umsetzung von ONPG zu Galaktose und o-Nitrophenyl _____	71
E.1.	Sauerstoffkurven von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>picdlacZ</i> unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen _____	87
E.2.	Reporterplasmid pMP220 _____	88
E.3.	β -Galaktosidase-Aktivität in LB-Medium unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen _____	90
E.4.	β -Galaktosidase-Aktivität in ASM unter aeroben und anaeroben Bedingungen _____	91
E.5.	Plasmide für die Überproduktion von ANR-Fusionsproteinen _____	93
E.6.	ANR-Histag-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel _____	94
E.7.	Vorgehen zur Untersuchung der ANR-abhängigen Regulation _____	97
E.8.	ANR-abhängige Regulation des <i>azu</i> -Gens unter aeroben Wachstumsbedingungen _____	97
E.9.	ANR-abhängige Regulation der Gene <i>ccpR</i> , <i>cbb₃-2</i> und <i>icd</i> unter aeroben Wachstumsbedingungen _____	99
E.10.	Reporteraktivität des <i>idh</i> -Gens unter ANR-Überproduktion _____	101
E.11.	Aerobe Promotoraktivität des <i>anr</i> -Gens Wildtyp PAO1 und der isogenen <i>anr</i> -Mutante PAO6261 _____	102
E.12.	Positive Autoregulation des <i>anr</i> -Gens unter anaeroben Wachstumsbedingungen in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 _____	103
E.13.	Reaktion der Isocitratdehydrogenase _____	104
E.14.	Anordnung der Gene <i>icd</i> und <i>idh</i> für die Isocitratdehydrogenase Isoenzyme im <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Genom mit benachbarten Genen und Angabe der Transkriptionsrichtung _____	105
E.15.	Kofaktor-Abhängigkeit der Isocitratdehydrogenasen von <i>P. aeruginosa</i> Zelllysaten _____	108

E.16.	Spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase-Mutanten von <i>P. aeruginosa</i> PA14 im Verlauf der Wachstumskurve unter aeroben Bedingungen _____	110
E.17.	Spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase-Mutanten von <i>P. aeruginosa</i> PA14 im Verlauf der Wachstumskurve unter anaeroben Bedingungen _____	111
E.18.	Vorhergesagte RpoS-Bindestellen zwischen den Startkodons von <i>icd / idh</i> _____	113
E.19.	Wachstumskurven von <i>P. aeruginosa</i> unter aeroben Bedingungen _____	114
E.20.	LacZ-Aktivität der <i>idh</i> - und <i>icd</i> -Reporterfusionen im Wildtyp PAO1 und in der isogenen <i>rpoS</i> -Mutante (SS24) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase _____	115
E.21.	LacZ-Aktivität der <i>idh</i> - und <i>icd</i> -Reporterfusionen im Wildtyp PA14 und in der isogenen <i>rpoS</i> -Mutante (Tn:: <i>rpoS</i>) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase _____	116
E.22.	Spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenasen im Wildtyp PAO1 und in der isogenen <i>rpoS</i> -Mutante (SS24) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase _____	117
E.23.	Spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenasen im Wildtyp PA1 4 und in der isogenen <i>rpoS</i> -Mutante (Tn:: <i>rpoS</i>) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase _____	118
E.24.	Regulation der Isocitratdehydrogenase ICD in <i>E. coli</i> durch die ICD Kinase/Phosphatase AceK _____	120
E.25.	Spezifische ICD/IDH-Enzymaktivitäten des <i>P. aeruginosa</i> Wildtyps PA14 und der Mutante Tn:: <i>aceK</i> im Verlauf der Wachstumskurve _____	121
E.26.	Vergleich der Aminosäuresequenz der Isocitratdehydrogenase ICD aus <i>E. coli</i> und der ICD aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PA14 _____	122
E.27.	Anteil der Teilmarkierung bei Wachstum mit [U- ¹³ C]-Aminosäuren _____	127
E.28.	¹³ C-Anreicherung pro Aminosäure in <i>P. aeruginosa</i> unter aeroben Bedingungen _____	130
E.29.	Citratzyklus von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 bei Wachstum mit Fettsäuren _____	132
E.30.	¹³ C-NMR-Spektrum von Cytidin _____	134
E.31.	Cytidin-Biosyntheseweg in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 _____	135
E.32.	Isotopologverteilung unter aeroben und anaeroben Bedingungen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PA14 _____	137
E.33.	Gemittelte Gesamtmarkierung der CF-Patientenisolate M1 und M26 _____	141
F.1.	<i>cbb₃</i> -Oxidase-Operons in <i>P. aeruginosa</i> _____	147
F.2.	Aufbau des FNR-Proteins in <i>E. coli</i> _____	153
F.3.	Intermediärer Metabolismus von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 _____	163

TABELLENVERZEICHNIS

C.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stämme _____	38
C.2.	<i>Escherichia coli</i> Stämme _____	39
C.3.	Plasmide _____	40
C4.	Rekombinante Plasmide mit klonierter <i>P. aeruginosa</i> DNA _____	41
C.5.	Oligonukleotide und DNA-Sonden _____	43
C.6.	Antibiotika und andere Zusätze _____	49
D.1.	Pipettierschema für SDS-Gele _____	73
D.2.	Pipettierschema für native Gele _____	74
D.3.	Verdünnungsreihe für markierte DNA-Sonden _____	76
D.4.	Pipettierschema der Band Shift Reaktion _____	77
E.1.	<i>In silico</i> Analyse potenziell ANR-regulierter Gene _____	86
E.2.	Promotorbereiche der zu untersuchenden Gene _____	89
E.3.	Sequenzvergleiche des <i>icd</i> -Gens von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 mit Isocitrat- dehydrogenasen anderer Bakterienarten _____	106
E.4.	Sequenzvergleiche des <i>idh</i> -Gens von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 mit Isocitrat- dehydrogenasen anderer Bakterienarten _____	107
E.5.	Zusammensetzung der verwendeten [U ¹³ C]-Aminosäure-Mischung _____	126
E.6.	Markierungsverteilung von Aminosäure-Derivaten _____	128
E.7.	Gemittelte Gesamtmarkierung des Patientenisolats M1 _____	139
E.8.	Gemittelte Gesamtmarkierung des Patientenisolats M26 _____	140
H.1.	Isotopologverteilung in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 unter aeroben Bedingungen (Aminosäure-Mischung) _____	179
H.2.	Isotopologverteilung in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PA14 unter aeroben Bedingungen (Algenlipid) _____	181
H.3.	Isotopologverteilung in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PA14 unter anaeroben Bedingungen (Algenlipid) _____	183
H.4.	Isotopologverteilung in <i>P. aeruginosa</i> Patientenisolate M1 und M26 _____	185

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
Tryptophan	Trp	W
Valin	Val	V

Sonstige Abkürzungen

A	Adenin
α	alpha
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
abs.	absolut, 100%
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	destilliertes Wasser

Amp	Ampicillin
ANR	Anaerober Regulator der Arginindeiminase und Nitratreduktion
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
Bp	Basenpaar(e)
BSA	engl. ' <i>bovine serum albumin</i> '
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CIAP	engl. ' <i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> '
CF	engl. ' <i>cystic fibrosis</i> '
CFTR	engl. ' <i>cystic fibrosis transmembrane conductance</i> '
Cm	Chloramphenicol
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CSPD	chemilumineszentes Substrat
d	Durchmesser
Δ	delta
Da	Dalton
dest.	destilliert
ddNTP	Didesoxynukleosid-5`-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid - 5` - triphosphat
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNR	Regulator der dissimilativen Nitratrespiration
E	Extinktion
ε	Epsilon
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	lat. ' <i>et alii</i> ' (und andere)
EtOH	Ethanol

Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GC	Gaschromatographie
g	Gramm
HCl	Salzsäure
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
ICD	Isocitratdehydrogenase, dimere Form
IDH	Isocitratdehydrogenase, monomere Form
IHF	engl. <i>'integration host factor'</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
k	kilo
kDa	Kilo-Dalton
kB	Kilo-Basenpaar(e)
Km	Kanamycin
L	Liter
λ	lambda; Wellenlänge
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (Molare Masse bzw. Molekulargewicht in g/mol)
μ	Mikro
m	Milli
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MCS	engl. <i>'multiple cloning site'</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute(n)
mind.	mindestens
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie
N	Normal (Anzahl Mole Äquivalentteilchen pro Liter)
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NMR	engl. <i>'nuclear magnetic resonance'</i>
OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
o.g.	oben genannt
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	engl. <i>'open reading frame'</i> , offener Leserahmen
<i>ori</i>	engl. <i>'origin'</i> , Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgel
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PBST	Phosphat gepufferte Saline mit Tween
PCR	engl. <i>'polymerase chain reaction'</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>'pondus hydrogenii'</i>
poly [d(I-C)]	Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid (unspez. Kompetitor)
PPP	Pentose-Phosphat-Weg
PQS	Pseudomonas Quinolone Signal
QS	Quorum Sensing

R	Resistenz
RBS	Ribosomenbindesstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	engl. ' <i>reactive oxygen species</i> '
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s, sec	Sekunde(n)
σ	sigma
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamidgel mit SDS
SSC	Standard-Saline-Citrat
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
T	Thymin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc	Tetrazyklin
T _m	Schmelztemperatur
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
üN - Kultur	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galaktopyranosid
z.T.	zum Teil

A. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die metabolische Anpassung von *Pseudomonas aeruginosa* an sauerstoffarme Bedingungen der chronisch infizierten CF-Lunge untersucht (CF = 'cystic fibrosis').

Insgesamt wurden 13 metabolische Gene, welche in *P. aeruginosa* Isolaten von chronisch infizierten CF-Patienten verstärkt exprimiert werden, hinsichtlich ihrer sauerstoffabhängigen Regulation untersucht. Für die Gene *azu* (Azurin), PA1554 (Cytochrom Oxidase *cbb₃-1*), PA1557 (Cytochrom Oxidase *cbb₃-2*), *ccpR* (Cytochrom Peroxidase c551), *icd* bzw. *idh* (Isocitratdehydrogenase) und *oprF* ('outer membrane protein F', Porin F) war die Expression anaerob in LB-Medium signifikant erhöht. Unter anaeroben Bedingungen in artifiziellem Sputummedium (ASM) war zusätzlich die Expression der Gene *himD* ('integration host factor') und *nuoA* (NADH Dehydrogenase) erhöht. Die gesteigerte Expression dieser Gene in *P. aeruginosa* CF-Isolaten kann als Erregeranpassung an die anaeroben Wachstumsbedingungen in der CF-Lunge gewertet werden. Die Rolle des anaeroben Transkriptionsfaktors ANR ('*anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction*') für die Regulation der o.g. Gene wurde mittels Reportergentechnologie in *P. aeruginosa* PAO1 und der isogenen *anr*-Mutante PAO6261 in Abhängigkeit einer ANR-Überexpression bestimmt. Von den unter anaeroben Bedingungen verstärkt exprimierten neun Genen konnte für *azu*, *ccpR*, PA1557 (*cbb₃-2*) und *icd* eine ANR-abhängige Regulation gezeigt werden. Des Weiteren wurde eine mögliche positive oder negative Autoregulation des ANR-Proteins unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht. Unter Sauerstoffanwesenheit konnte kein autoregulatorischer Effekt von ANR für das *anr*-Gen festgestellt werden. Unter anaeroben Bedingungen zeigte sich jedoch, dass die Transkription des *anr*-Gens im Vergleich zu aeroben Bedingungen signifikant erhöht ist. Außerdem ließ sich die Aktivität des *anr*-Promotors bei gleichzeitiger Überproduktion des ANR-Proteins anaerob steigern, was eine positive Autoregulation des *anr*-Gens unter anaeroben Bedingungen bestätigt.

Die Charakterisierung der beiden Isocitratdehydrogenase-Isoenzyme IDH und ICD von *P. aeruginosa* zeigte, dass beide Enzyme strikt NADP⁺-abhängig sind, während mit NAD⁺ im *in vitro*-Enzymtest kein Umsatz zu NADH nachweisbar war. Darüber hinaus wurde die Enzymaktivität vergleichend von den Transposoninsertionsmutanten PA14 Tn::*idh* und PA14 Tn::*icd* bestimmt. Es zeigte sich, dass die ICD-Aktivität gegenüber der IDH-Aktivität signifikant höher war. Die ICD-Aktivität in der Tn::*idh* Mutante übertraf in allen Experimenten die IDH-Aktivität der Tn::*icd* Mutante, während die Summe der Enzymaktivitäten beider Mutanten der Aktivität des Wildtypstammes entsprach. Die Aktivität der ICD zeigte unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen in der stationären Wachstumsphase von PA14 (Tn::*idh*) ein Maximum (aerob 0,760 ± 0,109 U/mg und anaerob 0,817 ± 0,052 U/mg). Die Aktivität der IDH blieb

dagegen aerob und anaerob über alle Wachstumsphasen weitgehend unverändert (0,2 - 0,3 U/mg). In den *rpoS*-Mutanten von *P. aeruginosa* PAO1 (SS24) und PA14 (Tn::*rpoS*) zeigte die Reporteraktivität für den *icd*-Promoter, nicht aber für den *idh*-Promoter, eine signifikant Zunahme in der stationären Phase, was die RpoS-abhängige Regulation des *icd*-Gens belegt. Die Gesamtaktivität im Isocitratdehydrogenase-Test (Summe aus ICD und IDH) der Transposoninsertionsmutante PA14 (Tn::*aceK*) war im Vergleich zum Wildtyp PA14 in der stationären Phase dagegen signifikant erniedrigt. In *E. coli* dephosphoryliert die AceK phosphoryliertes ICD am Serin 113 und aktiviert damit die ICD. Der Aminosäuresequenzvergleich von PAO1/PA14 ICD mit *E. coli* ICD zeigt, dass die Position Serin 115 der ICD von *P. aeruginosa* ebenso phosphoryliert werden sollte, nicht dagegen die IDH. Dies deutet darauf hin, dass in *P. aeruginosa* die Phosphatase-Aktivität der AceK (wahrscheinlich gegenüber der ICD) in der stationären Wachstumsphase überwiegt.

Die Etablierung und Durchführung des sogenannten 'Isotopologue Profiling', das den Kohlenstofffluss einer Zelle anhand des Einbaus ¹³C-markierten Kohlenstoffs in Bausteinen und Metaboliten widerspiegelt, wurde zur Untersuchung von *P. aeruginosa* PAO1 bzw. PA14 und CF-adaptierter Stämme angewandt (unter Einsatz vollmarkierter Aminosäuren bzw. Fettsäuren). Trotz hoher Aminosäurekonzentrationen in ASM und Einsatz einer ¹³C-Aminosäure-Mischung war eine *de novo* Synthese für die Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Thr und Val nachweisbar. *P. aeruginosa* metabolisiert im ASM (und wahrscheinlich auch im Sputum) die vorhandenen Aminosäuren, um sie als Energiequelle bzw. Bausteine nutzen zu können. Unter Einsatz einer ¹³C-Lipidmischung (vollmarkiertes Algenlipid) konnte die *de novo* Synthese von Ala, Asp, Glu, Pro und Thr gezeigt werden. Die Auswertung der NMR-Ergebnisse belegt das Vorhandensein und die Aktivität aller TCA-Zyklus-Enzyme in *P. aeruginosa*, wobei eine Unterscheidung von Enzymaktivität zwischen TCA- und Glyoxylatzyklus nicht möglich war. Die Detektion eines ¹³C-NMR-Spektrums von Cytidin belegt die Synthese dieses Nucleosids unter Metabolisierung (β -Oxidation) von ¹³C-markierten Fettsäuren. Mittels NMR-Studien konnte der Biosyntheseweg des Cytidins in *P. aeruginosa* dargestellt werden. Im Vergleich von aeroben mit anaeroben Wachstumsbedingungen war kein Unterschied im ¹³C-Aminosäuremuster nachweisbar, was den Ablauf des kompletten TCA-Zyklus auch unter anaeroben Bedingungen wahrscheinlich macht. Die Alanin- und Glycinbiosynthese war im Mutatorstamm M26 im Vergleich zum Non-Mutatorstamm M1 erhöht, die Aspartatbiosynthese dagegen erniedrigt. Beide Stämme zeigten eine hohe Glutamatmarkierung. Alle übrigen ¹³C-markierten Aminosäuren (Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Val) kamen in annähernd gleichem Ausmaß im Mutator- wie Non-Mutatorstamm vor. Damit konnte die metabolische Anpassung CF-adaptierter *P. aeruginosa*-Stämme im Aminosäurestoffwechsel gezeigt werden. Durch den Einsatz von ¹³C-markierten Substraten konnte erstmals der zentrale Metabolismus von *P. aeruginosa in vitro* unter infektionsähnlichen Bedingungen dargestellt werden.

B. EINLEITUNG

1. Mukoviszidose

Bei der Mukoviszidose (lat.: ´mucus´ = Schleim; ´viscidus´ = zäh, klebrig) oder Zystischen Fibrose (engl. ´cystic fibrosis´, CF) handelt es sich mit einer Inzidenz von 1:3000 um die häufigste autosomal-rezessiv angeborene Stoffwechselerkrankung (Herrmann *et al.*, 2010). In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Heterozygotenfrequenz etwa 1:25, dies entspricht vier Millionen Genträgern, die die Krankheit weiter vererben (<http://www.mukoviszidose.de>). Die Mukoviszidose ist eine Multiorganerkrankung, da alle exokrinen Drüsen des Körpers betroffen sind. Derzeit ist eine kausale Therapie der Krankheit nicht möglich, weshalb das Augenmerk auf der Prävention von Infekten und der symptomatischen Behandlung liegt. Die mittlere Lebenserwartung von CF-Patienten liegt derzeit bei etwa 38 Jahren (Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry Report, 2010).

Die genetische Ursache der Erkrankung wurde Ende der 80er Jahre den Mutationen des CFTR Gens zugeschrieben, das auf dem langen Arm des Chromosoms Nr. 7 (Lokus 7q31.2) lokalisiert (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989) ist. Dieses aus 27 Exons bestehende 250 kB große Gen kodiert für einen cAMP-regulierten Ionenkanal, den „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR). Dieser Kanal gehört zur Superfamilie der ABC-Transportproteine, die sich durch eine sogenannte „ATP-Binding Cassette“ auszeichnen. Nach Translation der CFTR mRNA ergibt sich ein 1480 Aminosäure großes Protein (Gallati, 2003), das den transepithelialen Elektrolyttransport reguliert. Je nach Zell- und Epitheltyp werden Chloridionen durch den CFTR-Kanal sezerniert bzw. absorbiert. Daneben reguliert der CFTR auch die Aktivität anderer Ionenkanäle wie beispielsweise den epithelialen Natriumkanal (ENaC) (Riordan, 2008). Darüber hinaus werden Zellvolumen und pH-Wert der Epithelzellen beeinflusst (Treharne *et al.*, 2006). Der CFTR-Kanal befindet sich an der apikalen Seite polarisierter Epithelzellen und setzt sich aus zwei Membran-assoziierten (MSD1, MSD2) und drei zytoplasmatischen (NBD1, NBD2, R) Domänen zusammen (Riordan, 2008).

Mittlerweile sind mehr als 1900 Mutationen des CFTR Gens bekannt (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>), welche unterschiedliche Auswirkungen auf die CFTR-Funktion haben. Generell korreliert der zugrunde liegende Gendefekt mit der Schwere des Krankheitsverlaufs. Der Gendefekt beider Allele kann homozygot (gleiche Mutationen) oder heterozygot (unterschiedliche Mutationen) sein. Die von einem CFTR-Defekt ausgelösten Störungen werden in sechs Klassen (I-VI) unterteilt (Abb. B.1.).

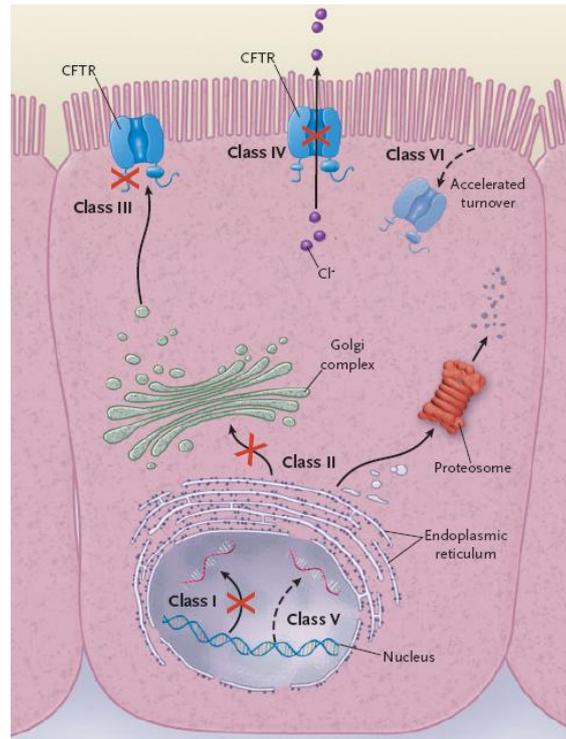


Abb. B.1. CFTR-Mutationsklassen I-VI

Klasse I: fehlende mRNA-Synthese; Klasse II: fehlerhafte Reifung und frühzeitige Degradation des CFTR-Proteins; Klasse III: gestörte Regulation; Klasse IV: unzureichende Kanalfunktion; Klasse V: inkorrektens Spleißen der CFTR-mRNA; Klasse VI: beschleunigter CFTR-Proteinabbau von der Zelloberfläche (aus Rowe *et al.*, 2005).

Die am häufigsten vorkommende und am besten charakterisierte Mutation des CFTR Gens ist eine Deletion der Aminosäure Phenylalanin an der Position 508 des Proteins ($\Delta F508$, Klasse II Mutation), bei welcher die kodierende Region der NBD1-Domäne betroffen ist (Übersicht: Döring und Ratjen, 2005). Zwischen 60 und 80 % der CF-Patienten der kaukasischen Bevölkerung (Europa, USA, Kanada, Australien) weisen diese Mutation im CFTR Gen auf (Becq, 2010). Sie beeinflusst die Struktur, Funktion und Faltung des Proteins, was zu einer defekten Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum und zum vorzeitigen proteolytischen Abbau führt.

Zur Verbesserung der CFTR-Aktivität bei Mutationen der Klassen III-VI werden verschiedene Substanzen (Potentioren) getestet. Flavonoide galten früher als geeignet, jedoch weisen sie eine geringe Löslichkeit und systemische Absorption auf (Sloane *et al.*, 2010). Neuere Forschungsansätze fokussieren sich nicht nur auf die Verbesserung der Kanalaktivität, sondern auch auf die endogene Regulation (z.B. durch cAMP) und den Ionentransport. Klinische Studien mit verschiedenen Potentioren (z.B. VX-770, VRT-532) ergaben eine Erhöhung der Chloridionen-Leitfähigkeit und eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion (Accurso *et*

al., 2008). Bei Mutanten der Klasse II wird das CFTR-Protein aufgrund seiner fehlerhaften Faltung von Chaperonen (Calnexin, Hsp70) im endoplasmatischen Retikulum gebunden und vorzeitig proteolytisch degradiert (Rubenstein *et al.*, 1997). Chemische Substanzen wie z.B. 4-Phenylbutyrat regulieren diese Chaperone herunter und fördern somit den Transport des CFTR-Proteins an die Zelloberfläche (Rubenstein *et al.*, 1997). Weitere Ansätze zur Erhöhung von CFTR-Molekülen auf der Zelloberfläche sind der Einsatz von Inhibitoren der Phosphodiesterase (z.B. Sildenafil) (Robert *et al.*, 2008; Lubamba *et al.*, 2008; 2011). Diese erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel, was zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase PKA führt. Das CFTR-Protein wird wiederum durch die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA phosphoryliert und damit aktiviert. Ebenso wird der Einsatz von Inhibitoren von Histon-Deacetylasen (HDACs) diskutiert. HDACs (de-) acetylieren nicht nur Histone, sondern auch Transkriptionsfaktoren und andere zytosolische Proteine (z.B. Hsp90/10). Der Einsatz von Inhibitoren der HDACs führt zu einer Erhöhung von CFTR-Molekülen auf der Zelloberfläche (Hutt *et al.*, 2010).

2. Pathophysiologie der CF-Lunge

Mukoviszidose manifestiert sich vor allem im Respirations- und Gastrointestinaltrakt der Patienten. Die Beeinträchtigung bzw. der Verlust der CFTR-Aktivität führt zu einer Elektrolyttransportstörung der Epithelzellen aller exokrinen Drüsen. Der CFTR-Kanal ist u.a. an der Regulation des epithelialen ENaC-Kanals (Natriumtransporter) beteiligt. Fällt diese Regulation aus, führt dies zu einer Überaktivität der ENaC-Kanäle. Die massiv erhöhte Reabsorption von Natriumionen bewirkt einen passiven Influx von Chloridionen und Wasser. Die exzessive Absorption von Wasser führt wiederum zu einer Abnahme des 'airway surface liquid' (ASL), ein Flüssigkeitsfilm auf der apikalen Epitheloberfläche. Erschwerend kommt hinzu, dass die zwischen dem Epithel liegenden Becherzellen im großen Umfang Schleim absondern, der aufgrund des extrazellulären Wassermangels eindickt und die Aktivität der respiratorischen Ziliarzellen zum Erliegen bringt (Boucher, 2007). Dadurch ist die mukoziliäre Reinigung des Respirationstraktes von Fremdkörpern beeinträchtigt. Der Sekretstau führt im betroffenen Epithelium zu entzündlichen Reaktionen, in Folge dessen das betroffene Gewebe allmählich abstirbt und durch zystenähnliches Bindegewebe ersetzt wird (daher der Name Zystische Fibrose). Die veränderten Bedingungen im Respirationstrakt von CF-Patienten stellen eine Prädisposition für chronische Pneumonien dar, ausgelöst durch virale, fungale und vor allem bakterielle Infektionen. Daher ist die chronische Pneumonie der Hauptgrund für die reduzierte Lebenserwartung von CF-Patienten. Die progressive Zerstörung des Lungengewebes und die daraus resultierende respiratorische Insuffizienz sind mit über 95 % die häufigste Todesursache von CF-Patienten (Dodge *et al.*, 2007).

Neben der chronischen Pneumonie ist die Malabsorption von Nahrungsbestandteilen ein weiteres charakteristisches Symptom der Mukoviszidose. Durch verminderte Produktion von Enzymen des Pankreas kann die Nahrung nicht optimal aufgespalten werden, eine ausreichende Absorption von Fetten, Proteinen und Kohlenhydraten ist somit nicht möglich. Dem Patienten drohen Gewichtsverlust und Unterernährung, was vor einigen Jahren noch oft zum Tod führte. Durch entsprechende Substitutionstherapien mit Enzymen kann eine Mangelernährung heutzutage ausgeglichen werden (Sikkens *et al.*, 2010).

Die möglichen Mechanismen, die zu chronischen Entzündungen und defekten Immunabwehr der CF-Lunge führen, werden kontrovers diskutiert. Der eingedickte Mukus von CF-Patienten begünstigt die Kolonisation mit Bakterien, vor allem mit *P. aeruginosa*. Die unteren Atemwege sind bei gesunden Menschen normalerweise keimfrei, die oberen sind mit verschiedenen Mikroorganismen (Normalflora) besiedelt. Bei CF-Patienten jedoch wird der untere Respirationstrakt schon in frühester Kindheit mit pathogenen Keimen kolonisiert, da das Lungenmilieu eine ideale Umgebung für die Keime darstellt. Der bakterielle Befall ist altersabhängig (Abb. B.2.): in den ersten Lebensjahren sind Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* vorherrschend, später etabliert sich vor allem *P. aeruginosa*.

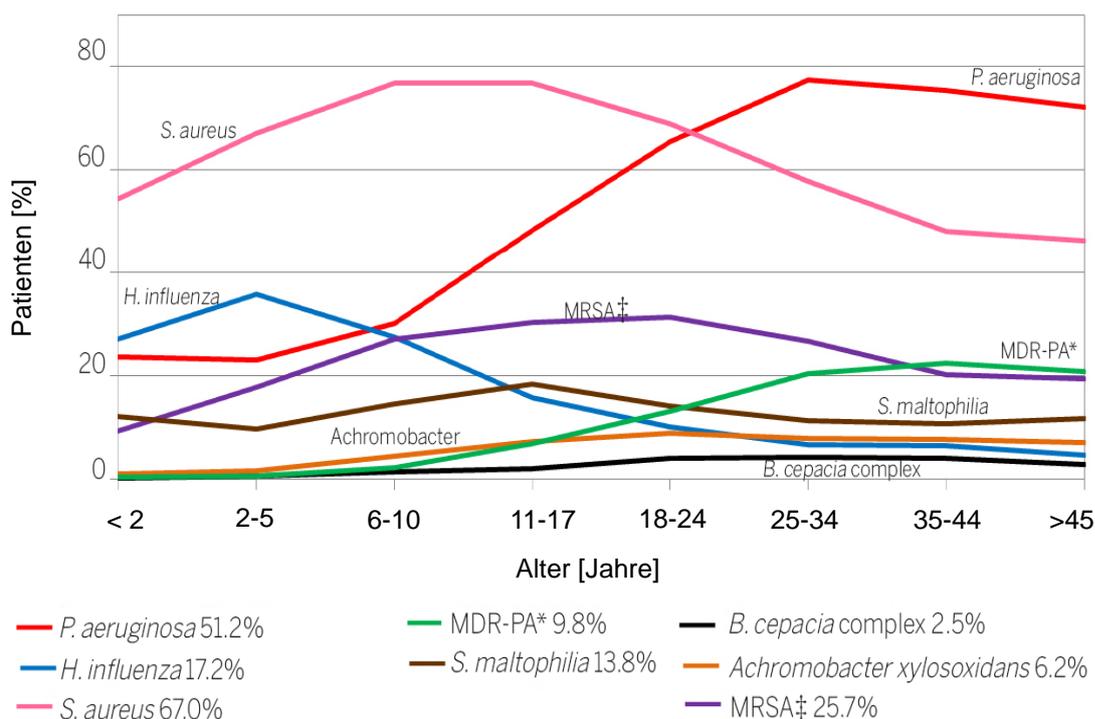


Abb. B.2. Altersabhängige Prävalenz CF-typischer Erreger

MDR-PA = multi-drug resistant *P. aeruginosa*; MRSA = Methicillin resistenter *S. aureus* (modifiziert nach `Patients Registry Annual Data Report, 2010`)

Über 90% der CF-Patienten sind im Alter von ca. 20 Jahren mit *P. aeruginosa* besiedelt (Tümmler und Kiewitz, 1999; Reinhardt *et al.*, 2001), darüber hinaus lassen sich nicht selten Erreger des *Burkholderia-cepacia*-Komplexes (BCC), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* und gelegentlich auch *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus* spp., *Serratia* spp. und andere Keime nachweisen.

Neben der bakteriellen Besiedelung der CF-Lunge spielt die Fehlfunktion des CFTR-Kanals für die Entstehung von chronischen Entzündungsprozessen eine weitere wichtige Rolle. Eine erhöhte Expression von Entzündungsmediatoren sowie eine Erhöhung des NFκB-‘Signallings’ bei CF-Föten mit steriler Lunge deuten auf eine intrinsische Entzündungsneigung der CF-Lunge hin (Khan *et al.*, 1995; Verhaeghe *et al.*, 2007; Belcher und Vij, 2010). Dies bedeutet, dass das Lungengewebe von CF-Patienten auch ohne Besiedelung von pathogenen Keimen eine Entzündungsneigung zeigt (Machen, 2006). Diverse Studien konnten eine erhöhte Produktion von u.a. proinflammatorischem Interleukin 8 (IL-8) und eine erhöhte Anzahl entzündungsfördernder Zellen zeigen (Bonfield *et al.*, 1995, 1999; Rosenfeld *et al.* 2001), des Weiteren ist die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-10) und Lipoxinen reduziert (Bonfield *et al.*, 1995, 1999; Karp *et al.*, 2004). Außerdem zeigte sich eine konstitutive Expression von NF-κB und eine erhöhte Expression bzw. Sekretion von IL-8 oder anderen Entzündungsmediatoren in CF-Epithelzellen (Machen, 2006).

Darüber hinaus konnte ein bedeutender Zusammenhang zwischen Ceramid-reichen Domänen in epithelialen Membranen und Entzündungsreaktionen der CF-Lunge gezeigt werden. Durch die Aktivität der sauren Sphingomyelinase (acid sphingomyelinase; ASM) wird Sphingomyelin zu Ceramid umgesetzt, welches sich in sog. ‘*membrane rafts*’ zusammen schließt und Ceramid-reiche Domänen in der Membran bildet. Bei einer bakteriellen Infektion führt dies zur Internalisation der Keime mit nachfolgender Apoptose der Zelle (Becker *et al.*, 2010). Ebenso wichtig ist die Tatsache, dass das CFTR-Protein eine Internalisation von *P. aeruginosa* direkt vermitteln kann (Pier *et al.*, 1997, Grassmé *et al.*, 2003). Ferner scheinen die Ceramid-reichen Domänen an einer kontrollierten Ausschüttung von Zytokinen beteiligt zu sein (Grassmé *et al.*, 2003).

Studien an CF-Mäusen sowie an bronchialen Epithelzellen von CF-Patienten zeigten eine anormale Akkumulation an Ceramid, was zum Absterben epithelialer Zellen und damit zur Freisetzung von viskoser DNA führt (Teichgräber *et al.*, 2008). Dies kann die mukoziliäre Reinigung beeinträchtigen und eine Infektion mit *P. aeruginosa* begünstigen (Becker *et al.*, 2010). Zudem zeigten Studien an CFTR-defizienten Mäusen keine Aktivität der Sphingomyelinase bzw. keine Bildung der ‘*membrane rafts*’ (Yu *et al.*, 2009), welches sich ebenso für eine bakterielle Infektion begünstigend auswirken könnte. Andere Studien belegen, dass Ceramid Transkriptionsfaktoren wie NF-κB aktiviert (Boland und O’Neil, 1998; Gill und Windebank, 2000) und damit eine entzündungsfördernde Wirkung erzielen kann.

Neben dem direkten Einfluss des CFTR-Proteins auf bakterielle Erreger führt ein Defekt des Ionenkanals zu hoch viskosen Sekreten in der Lunge. Dies kann den Transport von antibakteriellen Oligopeptiden im Bereich des ASL verringern und die Migration von neutrophilen Granulozyten negativ beeinflussen (Döring *et al.*, 2011). Im eingedickten Mukus entstehen mikro-aerobe bzw. anaerobe Bereiche (Worlitzsch *et al.*, 2002), da Bakterien wie *P. aeruginosa* oder auch eingewanderte Neutrophile den Sauerstoff schnell verbrauchen. Daher kann die Bildung sog. 'reactive oxygen species' (ROS) sehr vermindert sein und bakterielle Keime können nicht effizient genug abgetötet werden (Döring *et al.*, 2011).

3. *Pseudomonas aeruginosa*

3.1. Taxonomie und allgemeine Eigenschaften

Erstmals wurde die Gattung *Pseudomonas* (griech. 'pseudo' = falsch, 'monas' = Einheit) 1894 von Walter Migula benannt. Ursprünglich wurden dieser Gattung viele verschiedene Bakterienarten zugeordnet und erst die Analyse der 16S rRNA erlaubte eine genauere phylogenetische Einordnung. Die Gattung *Pseudomonas* umfasst über 85 Spezies (<http://www.bergeys.org/outlines.html>), bei der die bekanntesten Arten *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* und *P. stutzeri* sind.

Pseudomonas aeruginosa ist ein ubiquitär vorkommendes Gram-negatives Bakterium, das vor allem als Boden- und Nasskeim bekannt ist. Es gehört zu den γ -Proteobakterien, ist stäbchenförmig und monotrich begeißelt. Die Größe beträgt etwa 0,5-0,8 μm x 1,5-3,0 μm . Den Namen ('aerugo' = lat. für Grünspan) erhielt die Spezies durch die charakteristischen Farbpigmente Pyocyanin (blaugrün) und Pyoverdin (grüngelb). Darüber hinaus kommt auch die seltenere Pigmentierung durch Pyorubin (rötlich) und Pyomelanin (bräunlich) vor. Ein weiteres Merkmal ist der süßlich-aromatische („lindenblütenartige“) Geruch durch Bildung von o-Aminoacetophenon.

Genomsequenzen von verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies sind bereits über eine Datenbank zugänglich (<http://www.pseudomonas.com>). Aufgrund seiner metabolischen Vielseitigkeit kann *P. aeruginosa* mehr als 100 verschiedene organische Kohlenstoffverbindungen als Energiequelle nutzen, hierzu gehören Mono-, Di- und Tricarbonsäuren, Zucker, Fettsäuren, (Poly-) Alkohole, Glykole, Amine und Aminosäuren sowie aromatische Verbindungen. Generell hat *P. aeruginosa* eine ausgeprägte Fähigkeit sich an verschiedenste Umweltbedingungen anzupassen. Selbst in destilliertem Wasser kann der Keim überleben, sofern Spuren von organischen Substanzen enthalten sind (Favero *et al.*, 1971).

P. aeruginosa gilt als opportunistischer Krankheitserreger, da der Keim bei immunsupprimierten Patienten (z.B. Diabetes-, Krebs-, HIV-Patienten) schwere Infektionen verursachen kann. Problematisch ist auch eine fehlende mechanische Abwehrbarriere wie nach großflächigen Verbrennungen der Haut. Bei solchen Patienten sowie auch bei Diabetespatienten entwickeln sich oft chronische Entzündungen der Wunde, die nur schwer beherrschbar sind. Infektionen der Lunge, der Harnwege oder auch Besiedelung von Kathetern treten vielfach in Krankenhäusern auf, so dass *P. aeruginosa* zu einem der häufigsten nosokomialen Erreger zählt. Eine zentrale Rolle spielt *P. aeruginosa* auch bei CF-Patienten, die schon in jungen Jahren infiziert werden und in Folge dessen an einer früh letal verlaufenden chronischen Pneumonie leiden.

3.2. Zellgebundene und extrazelluläre Virulenzfaktoren

Zu den zellassoziierten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* gehören Lipopolysaccharide (LPS), Alginat, Geißeln, Fimbrien, Pili und verschiedene Protein-Sekretionssysteme. LPS ist Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und weist eine heterogene, dreiteilige Struktur auf (O-Antigen, Kernpolysaccharid, Lipid A). Die Freisetzung des LPS durch eine bakterielle Infektion kann zu Übelkeit, Erbrechen und Fieber führen, im schlimmsten Fall zum tödlich verlaufenden Endotoxinschock (Lipid A: Endotoxinaktivität).

Alginat ist ein Exopolysaccharid, welches aus 1,4- β -glykosidisch verknüpfter D-Mannuronsäure, L-Guluronsäure und 2,3-O-Acetyl-Mannuronsäure besteht. Alginat bietet Schutz vor Phagozytose und fördert die Biofilmbildung auf Oberflächen (z.B. in Kathetern). Vor allem mukoide *P. aeruginosa* Varianten, die sich während der chronischen Infektion der Lunge entwickeln, zeigen eine Überexpression von Genen für die Alginatsynthese (Ryder *et al.*, 2007). Weitere zellgebundene Virulenzfaktoren sind Geißeln, Fimbrien und Typ IV Pili. Sie sind neben der Motilität auch für die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle nötig und somit essentiell für die Etablierung einer Infektion (Sadikot *et al.*, 2005).

P. aeruginosa besitzt vier Typen von Protein-Sekretionssystemen (T1SS, T2SS, T3SS, T6SS): das Typ I-Sekretionssystem mit den Substanzen alkalische Protease, Lipase A und 'Heme Acquisition Protein' (Ma *et al.*, 2003), das Typ II-Sekretionssystem (T2SS) mit den Substanzen Elastase, Exotoxin A, alkalische Phosphatase, Phospholipase C und Hämolyse, das Typ III-Sekretionssystem (ExoS, ExoT, ExoU und ExoY) und das Typ VI-Sekretionssystem (Filloux *et al.*, 2008). Das T3SS ist für die Injektion von Effektorproteinen (Exotoxine) in die Wirtszelle verantwortlich. ExoS und ExoT sind GTPase-aktivierende Proteine und ExoS zusätzlich eine ADP-Ribosyltransferase, ExoY wirkt als Adenylatzyklase und ExoU als Phospholipase A2. Die T3SS-Exotoxine führen zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, Inhibition der DNA-Synthese

sowie zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und damit zu unterschiedlicher Expression mehrerer cAMP-regulierter Gene. Die Wirkung von Phospholipasen kann sehr schnell zur Nekrose der eukaryotischen Zelle führen (Pederson und Barbieri, 1998; Barbieri *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2003; Hauser, 2009).

P. aeruginosa bildet auch Siderophore (Pyochelin, Pyoverdin), die für die Eisenaufnahme und somit auch für metabolische Aktivitäten des Bakteriums (Katalasen, Cytochrome, Enzyme des TCA-Zyklus, etc.) von großer Bedeutung sind (Andrews *et al.*, 2003). Das farbige Pigment Pyocyanin als redoxaktives Molekül kann durch die Bildung von Hydroxylradikalen zur Gewebeschädigung beitragen (Lau *et al.*, 2004).

3.3. Biofilmbildung und Quorum Sensing

Ein weitere wichtige zur Pathogenität beitragende Fähigkeit von *P. aeruginosa* ist die Biofilmbildung. Biofilme stellen strukturierte und organisierte Verbände von Bakterien dar, die eingeschlossen in einer extrazellulären Matrix an einer inerten oder organischen Oberfläche haften. Diese Matrix besteht aus Exopolysacchariden, DNA- und Proteinmolekülen (Matsukawa *et al.*, 2004). In der CF-Lunge entsteht ein komplexer Biofilm, der nachhaltig zur Chronifizierung von *P. aeruginosa* beiträgt. Bei der Entstehung von Biofilmen unterscheidet man fünf verschiedene Phasen: Die Bildung eines Biofilms beginnt mit der Anheftung von planktonischen Bakterien an eine Oberfläche (z.B. Lungenepithel) (I), worauf die zunächst reversible Adhäsion in eine irreversible übergeht (II). Durch Vermehrung der sessilen Bakterien entstehen Mikrokolonien (III), die sich zu pilzartigen Strukturen weiterentwickeln und vermehrt Exopolysaccharide sowie Alginate produzieren (IV). Diese Biofilmmatrix schließt große bakterielle Verbände (Makrokolonien) ein, von denen sich gelegentlich einzelne Bakterien (Schwärmerzellen) oder größere Assoziationen lösen und einen neuen Bereich besiedeln können (V) (Wagner und Iglewski, 2008; Davies und Bilton, 2009). Die Bildung von Biofilmen ist für Bakterien außerordentlich wichtig. Zum einen bietet der Biofilm aufgrund seiner polymeren Matrix einen ausgezeichneten Schutz gegen das Immunsystem des Wirtes und gegen Antibiotika, zum anderen können bereits angepasste Keime durch konstante Umweltbedingungen eines Biofilms effektiv überleben. In der fortgeschrittenen Erkrankung der CF-Lunge findet man *P. aeruginosa* in den stark geschädigten Bereichen der Lunge, wo er im Mukus in Form von Makrokolonien persistiert (Worlitzsch *et al.*, 2002).

Die Expression vieler Virulenzfaktoren sowie die Bildung eines Biofilms unterliegen der Kontrolle des zell-dichte-abhängigen Zell-Zell-Kommunikationssystems (Quorum Sensing, QS). Über kleine frei diffundierbare Moleküle, sog. Autoinducer, können Bakterien untereinander kommunizieren und koordiniert agieren (Greenberg, 1997; Reading und Sperandio, 2006). In

Gram-positiven Bakterien sind dies meist Aminosäuren und kurze Peptide, in Gram-negativen vorwiegend N-Acyl-L-Homoserinlaktone (AHLs) (Høiby *et al.* 2010). QS-Systeme bei Gram-negativen Bakterien basieren auf der AHL-Synthese und dem AHL-Rezeptor (vermittelt Signaltransduktion). Steigt die Zelldichte, so steigt auch die Konzentration der AHL-Moleküle, die frei durch die bakterielle Zellmembran diffundieren können. Ab einem bestimmten Wert (Schwellenkonzentration) der AHL-Moleküle binden diese an den AHL-Rezeptor und aktivieren bzw. inhibieren die Transkription von Zielgenen. Über das QS-System können die Bakterien gleichzeitig beispielsweise die Bildung von Exotoxinen anregen, was zu einer besseren Überwindung der Immunabwehr und zur effektiveren Invasion führen kann.

In *P. aeruginosa* existieren zwei hierarchisch angeordnete QS-Systeme, das LasR/LasI-System und das RhlR/RhlI-System, wobei letzteres dem LasR/LasI-System untergeordnet ist. Beide QS-Systeme regulieren auf direkte oder indirekte Weise über 10 % der Gene von *P. aeruginosa* (Schuster und Greenberg, 2006) und unterliegen einer Reihe von transkriptionellen Regulatoren (z.B. GacA, Vfr und PprB, siehe Abb.B.3.).

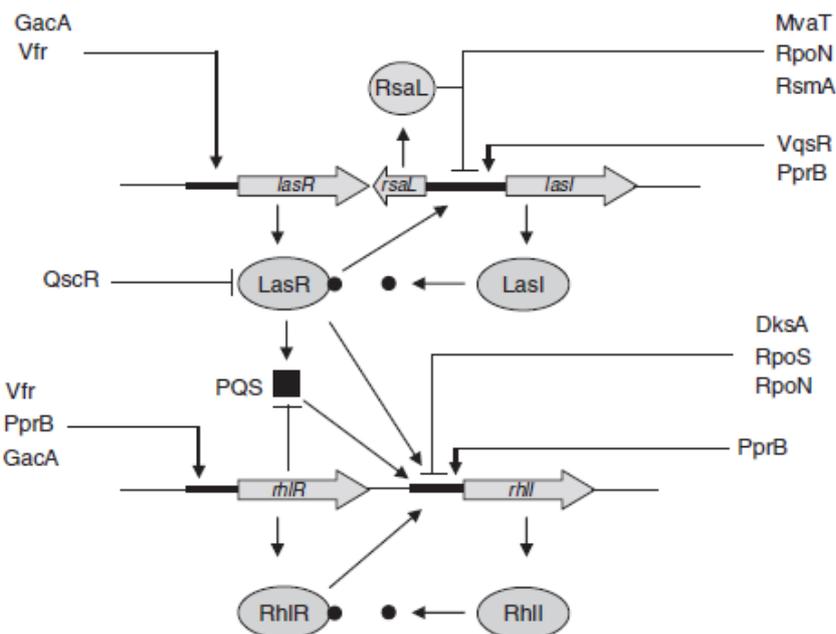


Abb. B.3. Quorum-Sensing-Systeme in *P. aeruginosa*

GacA: Regulatorprotein des GacA/GacS-2-Komponentensystems; Vfr: cAMP-abhängiger Regulator; MvaT, RsaL, RsmA, DksA: Transkriptionsregulatoren; RpoN: alternativer Sigmafaktor; RpoS: Sigmafaktor der stationären Phase; VqsR, QscR: Lux-R Homologe; PprB: Regulatorprotein des PprA/PprB-2-Komponentensystems; PQS: Pseudomonas Quinolone Signal; LasI/RhlI: AHL-Synthasen; LasR/RhlR: Transkriptionsfaktoren (aus Venturi, 2006).

Die Regulatoren beider Systeme (LasR bzw. RhIR) gehören zur Familie der LuxR-Transkriptionsfaktoren (Williams und Cámara, 2009). LasI ist die Synthase für das Autoinducer-Molekül N-3-oxododecanoyl-Homoserinlaktone 3-oxo-C12-HSL, RhII bildet das N-butanoyl-Homoserinlaktone C4-HSL. Die Homoserinlaktone aktivieren die Regulatoren RhIR bzw. LasR durch Bindung, wobei der entstehende Komplex u.a. für die Transkription weiterer Homoserinlaktone (daher der Name Autoinducer), sowie etlicher Virulenzfaktoren (Elastase, alkalische Protease, Exotoxin A, Hämolytine, Pyocyanin, Biofilm, etc.) sorgt. Manche QS-abhängige Gene werden von beiden Systemen reguliert, andere wiederum stehen unter der Kontrolle nur eines Systems (Venturi, 2006).

Neben den oben beschriebenen Autoinducer-Molekülen wurde 1999 von Pesci und Kollegen ein drittes Signalmolekül identifiziert, welches mit den QS-Systemen LasR/LasI bzw. RhIR/RhII interagiert. Das Molekül gehört der Gruppe der 2-Alkyl-4-Quinolone (AQs) an und wird als „Pseudomonas Quinolone Signal“ (PQS) bezeichnet. Das *pqsABCDE*-Operon kodiert für die Synthese von PQS. Anthranillat ist hierbei der zentrale Ausgangspunkt, welches mit β -Keto-Dekansäure kondensiert und zur biologisch inaktiven Vorstufe 2-Heptyl-4-Quinolone (HHQ) umgesetzt wird. Die FAD^+ -abhängige Monooxygenase PqsH katalysiert schließlich die Umsetzung von HHQ zu PQS (Dubern und Diggle, 2008). PQS reguliert verschiedene Gene von Virulenzfaktoren wie Pyocyanin, Elastase und Lektin (LecA), beeinflusst die Verfügbarkeit von Eisen (Fe^{3+}) und ist an der Regulation des eigenen Syntheseoperons sowie an der Transkription des *rhIR*-Gens beteiligt (Dubern und Diggle, 2008).

3.4. Mutatorstämme

Hypermutierende Bakterienstämme (Mutatorstämme) besitzen im Vergleich zu Non-Mutatorstämmen eine um bis zu 1000-fach erhöhte spontane Mutationsrate (Hogardt *et al.*, 2006; Oliver und Mena, 2010). Die Bakterien müssen sich fortlaufend den speziellen Bedingungen wie der Beeinträchtigung durch Leukozyten, dem antibiotischen Stress oder dem spezifischen Nährstoffmangel der CF-Lunge anpassen (Oliver *et al.*, 2000). Viele solcher Mutationen führen zum Absterben des Keims, sofern sich die Mutation auf lebenswichtige Gene bezieht und diese durch die Mutation negativ beeinflusst werden. Erwirbt ein Keim jedoch eine nützliche Eigenschaft (z.B. Resistenz gegen Antibiotika), so kann er sich in seinem Habitat durchsetzen und sich dort etablieren. Die am häufigsten vorkommenden Mutationen betreffen DNA-Reparatursysteme, wobei das 'mismatch'-Reparatursystem (MMR) das wichtigste ist. Mutationen in den Genen des MMR (*mutS*, *mutL*, *mutH*, *uvrD*, *mutU*) – bei *Pseudomonas* vor allem im *mutS*-Gen (Oliver *et al.*, 2002) – führen zu Basenfehlpaarungen und zu einer erhöhten Rekombination von weniger strikt homologen DNA-Sequenzen. Mutationen des MMR sind der

häufigste Grund für die Entstehung von hypermutablen Stämmen einer natürlichen Bakterienpopulation. Die Prävalenz von *P. aeruginosa* Mutatorstämmen aus Sputen von CF-Patienten beträgt bis zu 20 %, wohingegen Patienten mit nosokomialer akuter *Pseudomonas* Infektion keine Mutatorstämmen aufweisen (Oliver *et al.*, 2000).

Die Etablierung einer chronischen Infektion der Atemwege ist ein komplexer, adaptiver Prozess, der sowohl physiologische als auch genotypische Veränderungen betrifft. Nachteile für den CF-Patienten, die sich mit der Entwicklung zum Mutatorstamm ergeben, sind neben der verschlechterten Lungenfunktion die Differenzierung eines mukoiden Phänotyps (Waine *et al.*, 2008; Ferroni *et al.*, 2009), häufigere Mutationen in Genen, die wahrscheinlich für die Lungenadaptation eine große Rolle spielen (Mena *et al.*, 2008) und vor allem die Resistenz gegen Antibiotika (Oliver *et al.*, 2000; Hogardt *et al.*, 2006; Henrichfreise *et al.*, 2007). Hypermutierende Stämme besitzen eine besondere klinische Relevanz, da sie für eine erhöhte Morbidität und Mortalität von CF-Patienten verantwortlich sind (Carmeli *et al.* 1999).

In der CF-Lunge zeichnen sich Mutator- und Non-Mutator-Stämme durch eine Koexistenz aus, Revertanten von Mutatorstämmen können durch eine weitere spontane Mutation des betreffenden Genes entstehen (Ciofu *et al.*, 2008). Aufgrund des sehr heterogenen Habitats der CF-Lunge werden solche Bakterien begünstigt, die sich schnell an wechselnde Bedingungen anpassen können. Klone, die sich durch Mutationen heraus selektionieren, scheinen einen Überlebensvorteil darin zu haben. Häufig sind CF-Patienten mit nur einem *P. aeruginosa* Klon besiedelt, der sich über Jahre genetisch und physiologisch verändert. Interessanterweise entsteht kein einheitlicher Typ, vielmehr existieren gemeinsame Entwicklungstendenzen: Verlust oder Abschwächung von Virulenz-assoziierten Merkmalen, reduzierte Zytotoxizität, Multiresistenz und Adaptation des Stoffwechsels an Sauerstoff- und Nährstoffbedingungen (Hogardt *et al.*, 2007; Foweraker, 2009).

4. Phäno- und genotypische Anpassungen

Bereits in jungen Jahren infizieren sich die meisten CF-Patienten mit einem *P. aeruginosa* Stamm, der aus verschiedenen Reservoirs der Umwelt entstammen kann (Foweraker, 2009). Unabhängig voneinander entwickelt sich im Verlauf der Krankheit jeweils ein dominierender Klon, der sich an das Milieu der CF-Lunge optimal anpasst. Über Jahre hinweg differenzieren sich verschiedene Varianten heraus, die sich hinsichtlich morphologischer Eigenschaften z.T. erheblich unterscheiden. So sind beispielsweise häufig mukoide Varianten beschrieben worden, aber auch Unterscheidungsmerkmale bezüglich der Größe (*'small colony variants'*), Autolyse oder autoaggregativem Wachstum konnten gezeigt werden (Häussler *et al.*, 1999; Hogardt *et al.*, 2007; Mena *et al.* 2008). Die Eigenschaften dieser Varianten unterscheiden sich erheblich

von den Klonen, die zu Beginn einer Infektion vorherrschend waren. Derzeit geht man davon aus, dass die klonale Diversität von *P. aeruginosa* während der Infektion durch sog. 'loss-of-function'-Mutationen in verschiedenen Genen entsteht (Hogardt und Heesemann, 2010).

Es ist bekannt, dass die Entwicklung eines mukoiden Phänotyps mit einer schlechten Prognose des Krankheitsverlaufes bzw. mit einer verminderten Lungenfunktion einher geht (Hogardt und Heesemann, 2010). Diese phänotypische Anpassung ist durch eine Überproduktion von Alginat gekennzeichnet. Die Biosynthese des Alginat-Operons *algD-algA* wird in *P. aeruginosa* über den Sigmafaktor AlgT positiv reguliert. Über den Anti-Sigmafaktor MucA wird die Expression von *algD* negativ reguliert, da MucA an AlgT bindet und somit die Alginatsynthese negativ beeinflusst wird. In *P. aeruginosa* treten Mutationen häufig im *mucA*-Gen auf, dies kann zur Umwandlung vom non-mukoiden zum mukoiden Phänotyp führen (Govan und Deretic, 1996). Da die Überproduktion von Alginat die Entstehung von Biofilmen begünstigt, fördert dies die Persistenz von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass mukoide sowie non-mukoide Phänotypen von *P. aeruginosa* gleichzeitig im Sputum vom CF-Patienten vorkommen. Außerdem können non-mukoide Stämme wieder durch Reversion der *mucA*-Mutation aus mukoiden Varianten entstehen.

Die Anpassung von *P. aeruginosa* an das spezielle Habitat der CF-Lunge ist auch durch Mutationen von Virulenz-assoziierten Genen gekennzeichnet. Patientenisolat aus dem chronischen Stadium der Pneumonie zeigen beispielsweise weder 'Twitching'- noch 'Swimming'-Verhalten, was auf den Verlust von Pili und Flagellen zurück zu führen ist. Verantwortlich für den Verlust der Pili kann entweder eine Mutation im *pilB*- oder im *pilQ*-Gen sein (Chang et al., 2007). Des Weiteren zeigen späte CF-Isolate eine „raue“ Kolonieform (R-Form), die auf ein verändertes Lipid-A-Molekül zurück zu führen ist. Dies resultiert in einer erhöhten proinflammatorischen Immunantwort und einer erhöhten IL-8-Expression (Hajjar et al., 2002). Weitere Virulenzfaktoren wie Pyoverdin und Pyocyanin sowie die Elastase werden von späten CF-Isolaten nicht mehr produziert. Grund hierfür ist die Inaktivierung des *lasR*-Gens, wodurch die Expression dieser Virulenzfaktoren geschwächt ist.

Für eine akute Infektion nutzt *P. aeruginosa* das Typ III-Sekretionssystem, um Exotoxine in die Wirtszelle zu translozieren. CF-Isolate im chronischen Stadium besitzen kein funktionelles T3SS mehr, was sich in einer deutlich geringeren Zytotoxizität widerspiegelt (Hogardt et al., 2007). Es wird spekuliert, dass der Wechsel von der planktonischen Lebensweise hin zur Biofilm-assoziierten Persistenz die Selektion von T3SS-negativen Varianten begünstigt (Hogardt et al., 2004).

Insgesamt lässt sich sagen, dass während der Entwicklung vom Non-Mutator- zum Mutatorstamm die Produktion von verschiedenen Virulenzfaktoren durch 'loss-of-function'-Mutationen ausbleibt oder vermindert wird (Abb. B.4.).

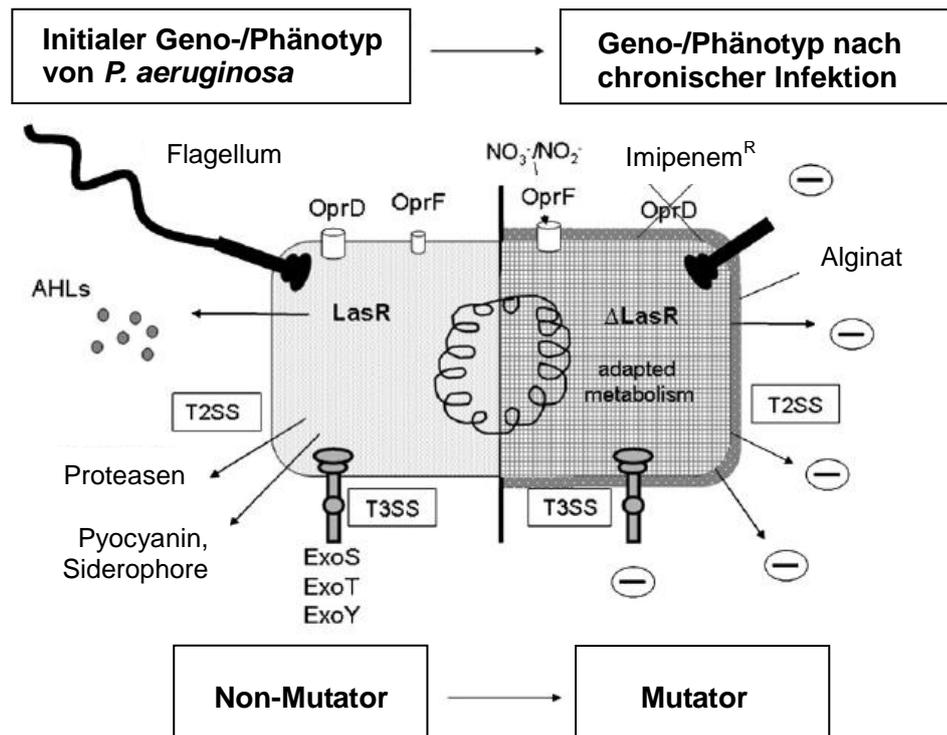


Abb. B.4. Adaptationsmechanismen von *P. aeruginosa*

AHL: N-Acetyl-Homoserinlaktone; T2SS/T3SS: Typ II/III-Sekretionssystem; ExoS, ExoT, ExoY: T3SS-Exotoxine; OprF: Nitrataufnahme-Proteine; LasR: QS-Regulator; NO_3^- : Nitrat; NO_2^- : Nitrit; OprD: Porin für Imipenem; Imipenem^R: Imipenem-Resistenz (modifiziert nach Hogardt und Heesemann, 2010).

Aufgrund des großen Genoms und der Redundanz zahlreicher Enzyme ist *P. aeruginosa* in der Lage, verschiedenste Habitats erfolgreich zu besiedeln. Die hohe Variabilität und metabolische Vielseitigkeit ermöglicht es dem Keim, unterschiedlichste Nischen des heterogenen Milieus der CF-Lunge zu besiedeln. Somit ist die metabolische Anpassung ein weiteres charakteristisches Merkmal später Mutatorstämme.

Sputen von CF-Patienten weisen eine hohe Verfügbarkeit verschiedenster Nährstoffe auf, dazu gehören insbesondere Muzin, DNA, Aminosäuren, Lipide und Proteine. Späte Mutatorstämme sind häufig auxotroph für Aminosäuren, in besonderem Falle für Methionin (Barth *et al.*, 1998). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass *P. aeruginosa* bestimmte Aminosäuren bevorzugt metabolisiert (Palmer *et al.*, 2007; Max Schobert, persönliche Mitteilung), Nährstoffe wie beispielsweise Glukose und Laktat werden weniger verstoffwechselt. Diese Daten zeigen, wie wichtig der Aminosäure-Metabolismus für die Adaptation von *P. aeruginosa* ist.

Prinzipiell lässt sich aus Transkriptom- und Proteomanalysen sagen, dass die Expression von Genen des intermediären Stoffwechsels in adaptierten CF-Isolaten deutlich erhöht ist (Hoboth *et al.*, 2009). Die Hochregulierung des Glyoxylatzyklus (*aceA* und *glcB*) deutet auf einen verstärkten Lipidstoffwechsel hin. Membranteile von absterbenden Zellen des Lungenepithels

stellen eine gute Lipidquelle dar, so dass es aufgrund der Hochregulierung zum vermehrten Lipidabbau durch β -Oxidation kommt. Generell ist auch die Expression von Genen des TCA-Zyklus in Mutatorstämmen erhöht (Abb. B.5.). Es ist bekannt, dass *P. aeruginosa* Dicarbonsäuren wie z.B. Succinat als Kohlenstoff- und Energiequelle bevorzugt. Eine vorangegangene Dissertation der *Pseudomonas* Gruppe konnte die Hochregulierung des Dicarbonsäure-Transporters PA0119 in angepassten CF-Isolaten zeigen (Henke, Dissertation 2009), was einen weiteren Adaptationsmechanismus auf Ebene des intermediären Stoffwechsels von *P. aeruginosa* darstellt.

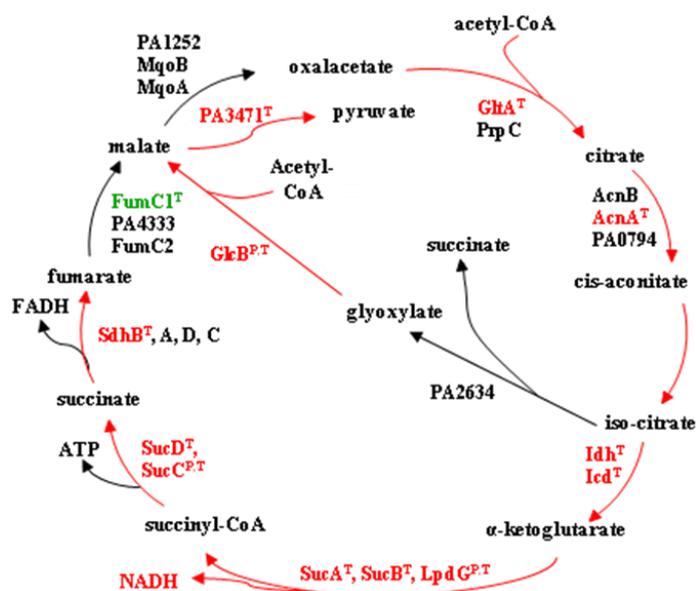


Abb. B.5. TCA-Zyklus von *P. aeruginosa* Mutatorstämmen

In rot ist die erhöhte Expression der entsprechenden Gene dargestellt, in grün eine erniedrigte Expression. T = Transkriptomdaten; P = Proteomdaten (aus Hoboth *et al.*, 2009).

Intraluminale Messungen des respiratorischen Mukus haben einen Sauerstoffgradienten nachgewiesen (Worlitzsch *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* adhärert zunächst an der Oberfläche, wandert in den mikro-aeroben Bereich ein und passt sich durch eine erhöhte Alginatsynthese, Biofilmbildung und Formierung von Makrokolonien den verminderten Sauerstoffbedingungen an. Daher ist es nicht verwunderlich, dass einige Marker für die anaerobe Adaptation in späten Mutatorstämmen erhöht sind. Dazu gehört u.a. der globale Transkriptionsfaktor ANR (engl. 'anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction'), der Gene für den anaeroben Metabolismus kontrolliert. Real-time-PCR-Experimente mit frühen und späten CF-Isolaten ergaben einen signifikanten Anstieg der *anr* mRNA in den späten Patientenisolaten (Hoboth *et al.*, 2009), was auf einen anaeroben Anpassungsmechanismus von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge hindeutet.

5. Aerober und anaerober Energiemetabolismus

Für die erfolgreiche Besiedelung eines Wirts ist eine ausreichende Energiegewinnung bzw. die Aufnahme energiereicher Verbindungen von entscheidender Bedeutung. Viele Bakterien nutzen den aeroben Abbau von Glukose, um daraus Reduktionsäquivalente, ATP und Pyruvat zu gewinnen. *P. aeruginosa* besitzt einen effizienten aeroben Energiestoffwechsel und kann sehr viele verschiedene Kohlenstoffquellen nutzen. Für den Abbau von Glukose nutzt das Bakterium den Entner-Doudoroff-Weg, der wegen des charakteristischen Zwischenprodukts 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat auch KPDG-Weg genannt wird. Im Vergleich zum Embden-Meyerhoff-Weg (Glykolyse), den Enterobakterien bevorzugt nutzen, ergibt sich aus dem KPDG-Weg 50% weniger ATP-Ausbeute. Trotz der besseren Energiebilanz unter sauerstoffreichen Wachstumsbedingungen scheint *P. aeruginosa* eher mikro-aerobe Verhältnisse zu bevorzugen. Hohe Sauerstoffraten führten in Untersuchungen zu vermindertem Wachstum und zu einer längeren 'lag-Phase', wohingegen niedrige Sauerstoffwerte (1%-ige Sauerstoffsättigung) zur größten Wachstumsrate (Sabra *et al.*, 2002) führten. Außerdem sind mikro-aerobe Bedingungen für das Wachstum mit Kohlenwasserstoffen optimal (Chayabutra *et al.*, 2000).

Neben der oxidativen Carboxylierung von Glukose kann *P. aeruginosa* Energie durch Fermentation generieren. Obwohl Pseudomonaden allgemein nicht in der Lage zur Gärung sind, konnte die Fermentation von Arginin und Pyruvat in *P. aeruginosa* gezeigt werden (Eschbach *et al.*, 2004). Als alternative Elektronenrezeptoren fungieren dann Nitrat bzw. Nitrit. Unter anoxischen Bedingungen kann *P. aeruginosa* Elektronen auf Nitrat übertragen, ein Prozess, der als Denitrifikation bezeichnet wird. Die Denitrifikation ist der wichtigste Mechanismus ohne Sauerstoff ATP zu generieren und wird der dissimilatorischen Nitratreduktion zugeordnet, d.h. Nitrat wird als alternativer Elektronenakzeptor für die Energiekonservierung genutzt kann höchstens als Stickstoffquelle genutzt werden. An der schrittweisen Umsetzung von Nitrat zu gasförmigem Stickstoff sind insgesamt vier Enzyme beteiligt (Abb. B.6.).

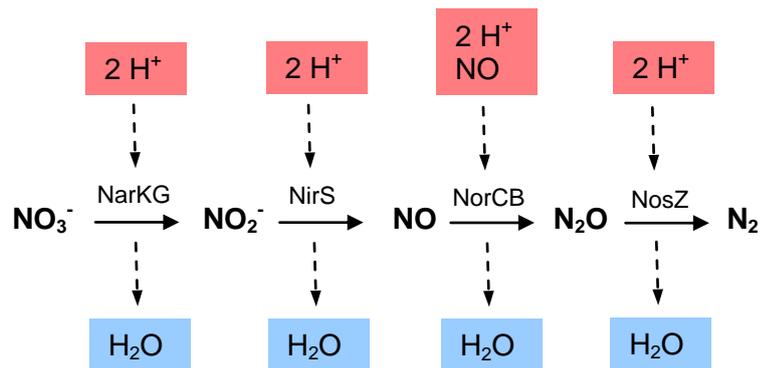


Abb. B.6. Schema der Denitrifikation

NO_3^- : Nitrat; NO_2^- : Nitrit; NO : Stickstoffmonoxid; N_2O : Distickstoffmonoxid (Lachgas); N_2 : Stickstoff; H^+ : Proton; H_2O : Wasser; NarKG: Nitrat-Reduktase; NirS: Nitrit-Reduktase; NorCB: Stickstoffmonoxid-Reduktase; NosZ: Distickstoffmonoxid-Reduktase.

P. aeruginosa besitzt insgesamt drei Nitrat-reduzierende Systeme (Nar, Nap, Nas), eine periplasmatische Nitrit-Reduktase (Nir), eine Stickstoffmonoxid-Reduktase (Nor) und eine Distickstoffmonoxid-Reduktase (Nos) (Williams *et al.*, 2007). Die Expression der Gene für die Denitrifikation hängt u.a. von zwei Transkriptionsfaktoren ab, ANR und DNR (engl. '*dissimilative nitrate respiration*'). Beide gehören der FNR-Transkriptionsfamilie (engl. '*fumarate nitrate reduction*') an. ANR weist 51% Ähnlichkeit zur Sequenz von FNR von *E. coli* auf (Sawers, 1991) und ist ein Einkomponentensystem, d.h. das Protein ist sowohl Sensor kinase als auch Transkriptionsfaktor. Über den Redoxzustand der Zelle kann das Bakterium den Sauerstoffgehalt in der Umgebung wahrnehmen. Der N-Terminus von FNR wie von ANR enthält vier konservierte Cystein-Reste, die an der Bildung eines Eisen-Schwefel-Zentrums beteiligt sind. Über dessen Integrität wird der Redoxzustand der Zelle gemessen. Unter anoxischen Bedingungen liegt das Zentrum als [4Fe-4S]-Cluster vor, bei Anwesenheit von Sauerstoff zerfällt dieses in ein [2Fe-2S]-Cluster oder wird abgebaut. Nur mit einem intakten Eisen-Schwefel-Zentrum, also unter Sauerstoffausschluss, bildet FNR bzw. ANR ein Dimer und kann somit an Promotorbereiche von FNR/ANR-regulierten Genen binden (Yoon *et al.*, 2007; Lazazzera *et al.*, 1996). Unter oxidierenden Bedingungen bzw. bei Vorliegen von Stickstoffmonoxid (NO) liegt FNR/ANR als inaktives Monomer vor (Yoon *et al.*, 2007). Erstmals im Jahr 2003 konnte eine Konsensussequenz für ANR beschrieben werden (Münch *et al.*, 2003), die der FNR Sequenz aus *E. coli* ähnelt (TTGAT NNNN ATCAA; Winteler und Haas, 1996; Yoon *et al.*, 2007). Die Konsensussequenz für ANR wurde aus bereits in der Literatur beschriebenen Bindemotiven von ANR abgeleitet (Abb. B.7.).

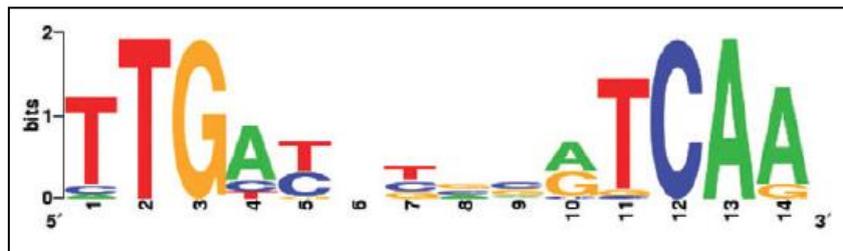


Abb. B.7.: Konsensussequenz von ANR in *P. aeruginosa*

T = Thymin; A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; die Größe der Buchstaben gibt die Häufigkeit der Nukleotide an der entsprechenden Position wieder (aus Trunk *et al.*, 2010).

Die Transkription von DNR ist von ANR abhängig. Auf Aminosäureebene besteht eine 25%ige Ähnlichkeit zu ANR. Die DNA-Bindemotive für ANR und DNR sind nicht voneinander zu unterscheiden (Trunk *et al.*, 2010), auch eine Studie aus dem Jahre 2005 konnte keine Unterschiede im Bindemotiv von ANR und DNR nachweisen (Rodionov *et al.*, 2005). Dennoch aktivieren beide Proteine unterschiedliche Promotoren mit sehr hoher Spezifität. DNR aktiviert beispielsweise die Transkription von Denitrifikationsgenen wie *nirS*, *norCB* und *nosZ* (Arai *et al.*, 1997; 2003). Mittlerweile sind etwa 170 verschiedene Gene bekannt, die direkt von ANR reguliert werden, dagegen sind nur vier Gene strikt DNR-abhängig (Trunk *et al.*, 2010). Darüber hinaus existiert eine Reihe von Genen, die sowohl durch ANR als auch durch DNR reguliert werden.

Neben ANR und DNR existieren noch zwei weitere Faktoren, die für die Aktivierung der Denitrifikationsgene wichtig sind: ein Zweikomponenten-System NarXL (Varughese, 2002) und das Protein NirQ (Arai *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1998; Abb. B.8.). NarX ist eine Sensor kinase, die sich bei Anwesenheit von Nitrat autophosphoryliert (van Alst *et al.*, 2009). NarX überträgt seine Phosphatgruppe auf den Transkriptionsfaktor NarL, der dadurch aktiviert wird und spezifisch an die DNA binden kann (Stewart und Bledsoe, 2003). Das derzeit angenommene regulatorische Netzwerk der Denitrifikation in *P. aeruginosa* ist schematisch in Abbildung B.8. dargestellt.

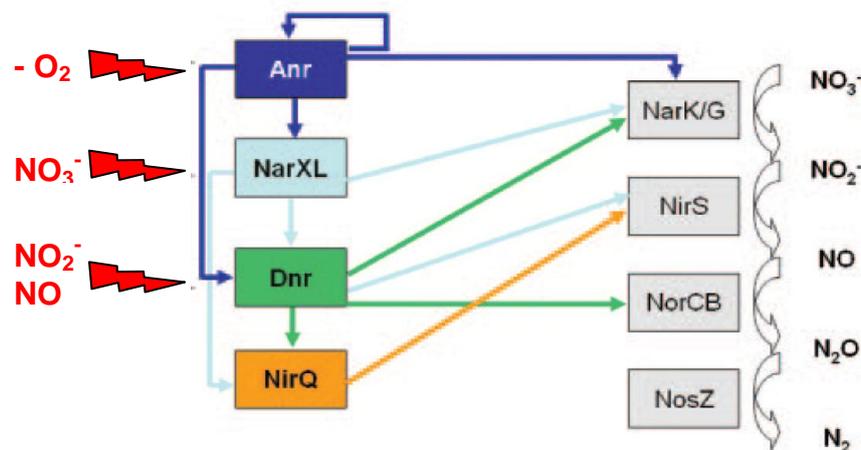


Abb. B.8.: Regulation der Denitrifikation (aus Schreiber *et al.*, 2007)

Das Hauptsignal für die Induktion der Denitrifikation ist die geringe Konzentration an Sauerstoff. Dieses Signal wird über das Eisen-Schwefel-Zentrum von ANR wahrgenommen. ANR erhöht die Transkription des *narXL*-Operons, welches selbst auch durch das Vorhandensein von Nitrat stimuliert wird. ANR und NarL zusammen aktivieren das *dnr*-Gen, dessen Transkription auch durch Stickstoffmonoxid beeinflusst wird (Arai *et al.*, 1997). Für die Aktivierung der vierten Regulationseinheit NirQ wird DNR und NarL benötigt (Arai *et al.*, 1994).

Die Initiation der Denitrifikation setzt ein, sobald sauerstoffarme und nitratreiche Verhältnisse vorherrschen. Die Transkription des *narK1K2GHJI*-Operons (Nitratreduktase, Transportproteine für Nitrat/Nitrit) wird durch ANR und NarL, in Verbindung mit IHF (engl. 'integration host factor') aktiviert. Sowohl die genannten Transkriptionsfaktoren als auch Umweltsignale wie Nitrat, Nitrit und Stickstoffmonoxid führen zur verstärkten Transkription aller an der Denitrifikation beteiligten Gene. Dies führt letztendlich zur Umsetzung von Nitrat zu molekularem Stickstoff (Schreiber *et al.*, 2007).

6. Ziele dieser Arbeit

Grundlage aller Untersuchungen war die detaillierte Charakterisierung isogener, hypermutierender *P. aeruginosa* Stämme von CF-Patienten in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Hogardt am Max von Pettenkofer Institut, München.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren die von Christina Hoboth in ihrer Doktorarbeit (2007) erzielten Ergebnisse zur Charakterisierung von *mutS*-negativen *P. aeruginosa* Stämmen mittels Transkriptom- und Proteomanalysen. Die Ergebnisse weisen auf einen veränderten Metabolismus in den Mutatorstämmen hin. Besonders die Expression von Genen des

intermediären Stoffwechsels war im Vergleich zum Wildtypstamm signifikant erhöht. Darüber hinaus wurde in den Mutatorstämmen mittels RT-PCR-Analysen eine erhöhte Transkription von ANR festgestellt. ANR als globaler Transkriptionsfaktor für mikro-aerobes bzw. anaerobes Wachstum ist nur unter sauerstoffarmen Bedingungen aktiv. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen ANR und der Überexpression ´metabolischer´ Gene existieren, da das Milieu der CF-Lunge im eingedickten Mukus sauerstoffarm ist. Putative Bindestellen des ANR-Proteins im Promotorbereich von Genen der Atmungskette (*ccpR*, *coxB*, *cbb₃-1*- und *cbb₃-2*-Oxidasen, *azu*, *nuoA*), des intermediären Stoffwechsels (*icd*, *idh*, *lpdG*, *accB*, *atuA*), sowie der Nitrataufnahme (*oprF*) und der β -Untereinheit des IHF (*himD*) könnten auf eine anaerobe, möglicherweise ANR-abhängige Regulation hindeuten.

Das Vorhandensein von zwei Genen für die Isocitratdehydrogenase (*icd* und *idh*) ist bei Bakterien eher selten. Lediglich wenige Bakterienspezies wie z.B. *Ralstonia eutropha*, *Colwellia* spp., *Pseudomonas* spp. besitzen Gene für beide Isoenzyme. Die Gene der Isocitratdehydrogenase in *P. aeruginosa* unterscheiden sich auf Sequenz- und Proteinebene. Die Isocitratdehydrogenase der Verzweigungspunkt zwischen TCA- und Glyoxylatzyklus dar und wurde bereits u.a. in *E. coli*, *C. glutamicum* und *H. pylori* charakterisiert. Die Umsetzung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat (TCA-Zyklus) oder Glyoxylat/Succinat (Glyoxylat-Zyklus) ist eine wichtige Schlüsselstelle im Metabolismus, da sich hier entscheidet, wie Acetyl-CoA oxidiert wird. Bei *E. coli* ist dies z.B. bei Wachstum mit Acetat und Fettsäuren wichtig, weil Intermediate wie Oxalacetat und α -Ketoglutarat durch anaplerotische Reaktionen wieder aufgefüllt werden müssen, um in z.B. Aminosäurebiosynthesen eingespeist zu werden. Da bei *P. aeruginosa* wenig über die Isocitratdehydrogenasen bekannt ist, soll in dieser Arbeit die Regulation beider Isoenzyme analysiert werden.

Des Weiteren soll der Kohlenstoffmetabolismus durch metabolische Flussanalysen von *P. aeruginosa* untersucht werden. Durch die neue Methode des ´*Isotopologue profilings*´ soll das Aminosäuremuster der Referenzstämme PAO1 und PA14, der CF-Isolate M1(Non-Mutator) und M26 (Mutator) sowie von Mutanten der Isocitratdehydrogenase analysiert werden. Die Experimente sollen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durchgeführt werden, u.a. durch die Verwendung des artifiziellen Sputummediums (ASM), das die Bedingungen der CF-Lunge *in vitro* simuliert.

Bisher ist wenig über die genaue Anpassung des Stoffwechsels von *P. aeruginosa* bekannt, daher soll diese Arbeit einen detaillierten Einblick in den aeroben / anaeroben Stoffwechsel geben und damit zum besseren Verständnis der Adaptationsprozesse an die CF-Lunge beitragen.

C. MATERIALIEN

1. Patientenisolat

Bei Patient M (männlich, geboren 1967) war seit 1997 eine chronische Pneumonie mit *P. aeruginosa* Besiedelung dokumentiert, frühere Daten waren nicht verfügbar. 2001 verstarb er im Alter von 34 Jahren. Während der letzten sieben Lebensmonate wurde zusätzlich eine Koinfektion mit *Stenotrophomonas maltophilia* nachgewiesen. Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenisolat sind der Stamm M1 (Non-Mutator) und M26 (*mutS*-Mutator) (Hogardt *et al.*, 2007).

2. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen C.1. bzw. C.2. angeführt.

Tab. C.1. *Pseudomonas aeruginosa* Stämme

Stamm	Geno-/Phänotyp	Referenz
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Referenzstamm	Suh <i>et al.</i> , 1999
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Referenzstamm	Rahme <i>et al.</i> , 1995
<i>P. aeruginosa</i> PAO6261	<i>anr</i> Deletionsmutante von PAO1	Ye <i>et al.</i> , 1995
<i>P. aeruginosa</i> SS24	<i>rpoS</i> Deletionsmutante von PAO1, Gm ^R	Suh <i>et al.</i> , 1999
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Tn::icd	Transposoninsertionsmutante von PA14, Gm ^R , Tn::icd	Liberati <i>et al.</i> , 2006
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Tn::idh	Transposoninsertionsmutante von PA14, Gm ^R , Tn::idh	Liberati <i>et al.</i> , 2006
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Tn::rpoS	Transposoninsertionsmutante von PA14 Gm ^R , Tn::rpoS	Liberati <i>et al.</i> , 2006

<i>P. aeruginosa</i> PA14 Tn::aceK	Transposoninsertionsmutante von PA14 Gm ^R , Tn::aceK	Liberati <i>et al.</i> , 2006
<i>P. aeruginosa</i> M1	Sequenzielles CF-Isolat von Patient M (1998)	Hogardt <i>et al.</i> , 2007
<i>P. aeruginosa</i> M26	Sequenzielles CF-Isolat von Patient M (2001)	Hogardt <i>et al.</i> , 2007

Gm^R: Gentamicin-Resistenz

Tab. C.2. *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Geno-/Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH 5α	F ⁻ , φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> , ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galJ</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Sm ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqlqZ</i> ΔM15]	Promega, Mannheim
<i>E. coli</i> M15	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mt ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	Qiagen, Hilden
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> HB101	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>hsdR-M+</i> , Cm ^R	Boyer und Roulland-Dussoix, 1969
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7</i> gene 1 ind1 sam7 nin5])	New England Biolabs, Frankfurt am Main

<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), pLysS, Cm ^R	Promega, Mannheim
------------------------------------	--	-------------------

Cm^R: Chloramphenicol-Resistenz; Sm^R: Streptomycin-Resistenz

3. Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, Oligonukleotide und DNA-Sonden sind in den Tabellen C.3., C.4. bzw. C.5. gelistet.

Oligonukleotide und DNA-Sonden wurden von der Fa. Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in destilliertem Wasser aufgenommen, um eine Konzentration von 100 pmol/ μ l zu erhalten. Wenn nicht anders vermerkt, wurde mit einer Konzentration von 20 pmol/ μ l gearbeitet.

Tab. C.3. Plasmide

Plasmid	Geno-/Phänotyp	Größe (kB)	Referenz
pRK2013	Carb ^R , Km ^R , <i>tra+</i> , <i>mob+</i> , ColE1- <i>oriR</i> (Helferplasmid)	4,8	Figurski und Helinski, 1979
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Carb ^R , Km ^R , <i>lacZα</i> , pUC <i>ori</i> , <i>f1 ori</i>	3,9	Invitrogen, Karlsruhe
pMP220	Tc ^R , <i>oriT+</i> , IncP (3-5 Kopien/Zelle)	10,5	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pBBR1MCS	Cm ^R , <i>rep</i> , <i>mob</i> midcopy (50 Kopien/Zelle)	4,7	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pQE30	Amp ^R , ColE1-Replikon, <i>lacO</i> , PT5, 6x histag	3,5	Qiagen, Hilden
pET21b	Amp ^R , <i>f1</i> und pMB1 <i>ori</i> , <i>lacI</i> , T7 Promotor, 6x histag pMB1-Derivat	5,4	Novagen (Merck, Darmstadt)

Amp^R: Ampicillin-Resistenz; Carb^R: Carbenicillin-Resistenz; Cm^R: Chloramphenicol-Resistenz
Gm^R: Gentamicin-Resistenz; Km^R: Kanamycin-Resistenz; Tc^R: Tetrazyklin-Resistenz

Tab. C.4. Rekombinante Plasmide mit klonierter *P. aeruginosa* DNA

Plasmid	Geno-/Phänotyp	Größe (kB)	Referenz
Plasmide zur Analyse von Promotorregionen ¹			
paccBlacZ	Tc ^R , 227 Bp- <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>accB</i>	10,7	diese Arbeit
panrlacZ	Tc ^R , 256 Bp- <i>XbaI/KpnI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>anr</i>	10,7	diese Arbeit
patuAlacZ	Tc ^R , 272 Bp- <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>atuA</i>	10,8	diese Arbeit
pazulacZ	Tc ^R , 216 Bp- <i>XbaI/KpnI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>azu</i>	10,7	diese Arbeit
pcbb ₃ -1lacZ	Tc ^R , 321 Bp- <i>XbaI/KpnI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>cbb₃-1</i>	10,8	diese Arbeit
pcbb ₃ -2lacZ	Tc ^R , 146 Bp- <i>XbaI/KpnI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>cbb₃-2</i>	10,6	diese Arbeit
pccpRlacZ	Tc ^R , 246 Bp- <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>ccpR</i>	10,7	diese Arbeit
pcoxBlacZ	Tc ^R , 313 Bp- <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>coxB</i>	10,8	diese Arbeit
phimDlacZ	Tc ^R , 280 Bp- <i>XbaI/KpnI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>himD</i>	10,8	diese Arbeit
picdlacZ	Tc ^R , 424 Bp- <i>XbaI/KpnI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>icd</i>	10,9	diese Arbeit
pidhlacZ	Tc ^R , 424 Bp- <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>idh</i>	10,9	diese Arbeit
lpdGlacZ	Tc ^R , 181 Bp- <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>lpdG</i>	10,7	diese Arbeit

poprFlacZ	Tc ^R , 103 Bp- <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>oprF</i>	10,6	diese Arbeit
-----------	---	------	--------------

pnuoAlacZ	Tc ^R , 667 Bp- <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment stromaufwärts von <i>lpdG</i>	11,2	diese Arbeit
-----------	---	------	--------------

Plasmide für die Überproduktion von rekombinanten Proteinen

pQE30_anr	Amp ^R , 732 Bp- <i>BamHI/HindIII</i> - Fragment von <i>anr</i> ²	4,1	diese Arbeit
-----------	---	-----	--------------

pQE30_anr_ D149A	Amp ^R , 732 Bp- <i>BamHI/HindIII</i> - Fragment von <i>anr</i> ² ; Mutation D149A	4,1	diese Arbeit
---------------------	---	-----	--------------

pET21b_anr	Amp ^R , 729 Bp- <i>NdeI/XhoI</i> - Fragment von <i>anr</i> ²	6,1	diese Arbeit
------------	---	-----	--------------

pET21b_anr_ D149A	Amp ^R , 729 Bp- <i>NdeI/XhoI</i> - Fragment von <i>anr</i> ² ; Mutation D149A	6,1	diese Arbeit
----------------------	---	-----	--------------

Plasmide für die Überproduktion von ANR

panr50 (pBBR1MCS)	Cm ^R , 1155 Bp- <i>KpnI/BamHI</i> - Fragment von <i>anr</i> ²	5,9	diese Arbeit
----------------------	--	-----	--------------

panr50_D149A (pBBR1MCS)	Cm ^R , 1155 Bp- <i>KpnI/BamHI</i> - Fragment von <i>anr</i> ² ; Mutation D149A	5,9	diese Arbeit
----------------------------	--	-----	--------------

¹ Basisplasmid: pMP220; klonierte DNA stammt aus *P. aeruginosa* PAO1

² Klonierte DNA stammt aus *P. aeruginosa* PAO1

Amp^R: Ampicillin-Resistenz

Cm^R: Chloramphenicol-Resistenz

Tc^R: Tetrazyklin-Resistenz

Tab. C.5. Oligonukleotide und DNA-Sonden

Oligonukleotid	Zielgen	Schnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Primer für Reportergenklonierungen			
accB-for	PA 4847	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCCCATAC CAGCGTCGCGTTAC
accB-rev	PA 4847	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGAAGCGCT AGCACTCCCAGTGA
atuA-for	PA 2886	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCGGGCTT TCTGATCGTCCAAC
atuA-rev	PA 2886	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGATTGTTC TTGACCCGTGACGG
azu-for	PA 4922	<i>XbaI</i>	TGATAATCTAGACAGCCT CCTAGGCAGGTT
azu-rev	PA 4922	<i>KpnI</i>	AAGGCTGGTACCTCGACC AAGCCGTGCGAA
cbb ₃ -1-for	PA 1554	<i>XbaI</i>	TGATAATCTAGAAGGGGT TCCACGGTTAAT
cbb ₃ -1-rev	PA 1554	<i>KpnI</i>	AAGGCTGGTACCCCCCGG TCTCAGACCTTA
cbb ₃ -2-for	PA 1557	<i>XbaI</i>	TGATAATCTAGATTCCGG CAGTTGGGATGC
cbb ₃ -2-rev	PA 1557	<i>KpnI</i>	AAGGCTGGTACCGCCACA CCTCGTATGCAG
ccpR-for	PA 4587	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCACGGCT TCGAGCAATGCC
ccpR-rev	PA 4587	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGAACAACC GGTCCTGTGAGG
coxB-for	PA 0105	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCCCGGC TAAGACGCGATTGT
coxB-rev	PA 0105	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGATTCCGGG TTCCCCTTATCGTT
himD-for	PA 3161	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCGCGTC ATCAGCCTCTCC

himD-rev	PA 3161	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGAGGTTTT CCCTTCTTTTTCAAG
icd-for	PA 2623	<i>XbaI</i>	TGATAATCTAGATCCGTG TTGTGGTTAAAAC
icd-rev	PA 2623	<i>KpnI</i>	AAGGCTGGTACCTACGGT AACTCTCTTTTTTG
idh-for	PA 2624	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCACATGT CGGCATTACAG
idh-rev	PA 2624	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGAATCTAC GGTAACTCTCTTTT
lpdG-for	PA 1587	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCATGTAT CTGGCGCTGTCCT
lpdG-rev	PA 1587	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGACAATCC TTATTCGGGTGAAAC
nuoA-for	PA 2637	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCCGCCTG CGAAATGGTCT
nuoA-rev	PA 2637	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGATGCTGA TACTCCTTCTGTA
oprF-for	PA 1777	<i>KpnI</i>	TGATAAGGTACCCTCTCT ATGCGGGAAGTTC
oprF-rev	PA 1777	<i>XbaI</i>	AAGGCTTCTAGATCAGTT TCATCCGTTAAATCC

Primer für Sequenzierungen

icd-1-Fw	PA 2623	-	AGCGCGGATGCGGAAATGA
icd-1-Rv	PA 2623	-	GAAGATCCGCTTCACCGAG
icd-2-Fw	PA 2623	-	TGTTGCCCTTGTGCACCAG
icd-2-Rv	PA 2623	-	CCTAGAAGGCTGCAACAG
idh-1-Fw	PA 2624	-	GCGTATCGAGACTCTGTGC
idh-1-Rv	PA 2624	-	GCATGTCCGAAGACGATCG
idh-2-Fw	PA 2624	-	CAAGCTGCGCGACTTCTTC
idh-2-Rv	PA 2624	-	GACCGGTCAGGTCGTGGT
idh-3-Fw	PA 2624	-	GTCAAGCTGGCCGTCACC
idh-3-Rv	PA 2624	-	GGTACGGAAAAGGCCTCG
icd/idh-ir-for	intergen. Bereich <i>icd/idh</i>	-	CATCACCTCGATGAACGG
icd/idh-ir-rev	intergen. Bereich <i>icd/idh</i>	-	CGAGGTCGTCTTCGATACG

pQE-promotor region-seq-for	pQE	-	CCCGAAAAGTGCCACCTG
pQE-seq-rev	pQE	-	GTTCTGAGGTCATTAAGG
T7 promotor	pET21b	-	TAATACGACTCACTATAGG
T7 terminator	pET21b	-	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pBBR1MCS -seq-for	pBBR1MCS	-	ACAATTTACACAGGAAAC
pBBR1MCS -seq-rev	pBBR1MCS	-	GTTGTAAAACGACGGCCAG
pMP220-for	pMP220	-	
pMP220-rev	pMP220	-	

Primer für Klonierungen bzw. Mutagenese von *anr*

D149A	PA1544	-	GGGAAATCCGCGAT GCC CAGCAGATGATGCT ³
D149A-antisense	PA1544	-	AGCATCATCTGCTG GGC ATCGCGGATTTCCC ³
anr-pQE30-Fw	PA1544	<i>Bam</i> HI	TGATAA <u>GGATCC</u> ATGGCC GAAACCATCAAG
anr-pQE30-Rv	PA1544	<i>Kpn</i> I	AAGGCT <u>GGTACC</u> GCCTTC CAGCTGGCC
anr-pET21b-Fw	PA1544	<i>Nde</i> I	TGATAA <u>CATATG</u> CCGAA ACCATCAAGGTG
anr-pET21b-Rv	PA1544	<i>Xho</i> I	AAGGCT <u>CTCGAG</u> GCCTTC CAGCTGGCCG
anr-pBBR1MCS -Fw	PA1544	<i>Kpn</i> I	TGATAA <u>GGTACCT</u> GCCTG GGAAAGCTGTACATG
anr-pBBR1MCS -Rv	PA1544	<i>Bam</i> HI	AAGGCT <u>GGATCCT</u> CAGCC TTCCAGCTGGCCG

DNA-Sonden für Gelretardierungsexperimente

azu-Sonde +	PA 4922	-	GTCCGGTTCGGGTTTGACC TGAATCAGTGGAAGTCCGGT C
-------------	---------	---	--

azu-Sonde -	PA 4922	-	GCACCGAGTTCCACTGATT CAGGTCAAACCCGAACCGC
ccpR-Sonde +	PA 4587	-	GATCCCGGTGCGCTTGATC CACGTCAAGCCGGGCAGC GCG
ccpR-Sonde -	PA 4587	-	CGCGCTGCCCGGCTTGAC GTGGATCAAGCGCACCGG GATC
cbb ₃ -2-Sonde +	PA 1557	-	GTCGGGAAGCCAATTGATC CCGATCAATATTTTCATAACG C
cbb ₃ -2-Sonde -	PA1577	-	GCGTTATGAAATATTGATCG GGATCAATTGGCTTCCCGA C

³ In blau dargestellt ist die Mutagenese (GAC → GCC; Alanin → Asparaginsäure)
Schnittstellen sind unterstrichen

4. Nährmedien, Antibiotika und andere Zusätze

4.1. Medien und Puffer

Die verwendeten *E. coli* bzw. *P. aeruginosa* Stämme wurden in folgenden Medien kultiviert:

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH 7,4	

Artifizielles Sputum-Medium (ASM) (modifiziert nach Sriramulu *et al.*, 2005)

Albumin	25 mg/ml
Muzin	5 mg/ml
DNA	2,7 mg/ml
Glukose	0,8 mg/ml
Aminosäuren (20)	0,25 mg/ml (je)

NaCl	69 mM
CaCl ₂	3 mM
Hepes	20 mM
Harnstoff	0,5 mM
Serum	1 %
Eigelb (Egg Yolk)	0,5 %
pH 6,9	

Frisch angesetztes ASM wurde bei 4°C für maximal 4 Wochen gelagert.

SOC-Medium (Hanahan, 1983)

Trypton	2 % [w/v]
Hefeextrakt	0,5 % [w/v]
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mM
Glukose	20 mM
pH 7,0	

***Pseudomonas* Isolationsagar (PIA)**

PIA (Difco™, Becton Dickinson, USA)	45 g/l
Glycerol	20 ml/l

NZY⁺- Broth

Casein Hydrolysat (Casamino acids)	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
pH 7,5	

Nach dem Autoklavieren folgende Substanzen steril zugeben (Endkonzentration):

12,5 mM MgCl₂, 12,5 mM MgSO₄, 20 mM Glukose.

M9-Minimalmedium

M9-Puffer	1x
MgSO ₄	2 mM
C-Quelle	40 mM

10x M9-Puffer

Na ₂ HPO ₄	60g/l
KH ₂ PO ₄	30g/l
NH ₄ Cl	10g/l
NaCl	5g/l
pH 7,4	

10 x Phosphat-Puffer (PBS) (Sambrook *et al.*, 1989)

Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	26,5 g/l
KH ₂ PO ₄	2,4 g/l
NaCl	80 g/l
KCl	2 g/l
pH 7,4	

M9-Minimalmedium: Magnesiumsulfat sowie die Kohlenstoffquelle wurden als 1 M Stammlösungen angesetzt, steril filtriert und dem autoklavierten Medium entsprechend der gewünschten Endkonzentrationen zugesetzt.

Alle Medien und Puffer wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem jeweiligen Medium (außer PIA) vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.

4.2. Antibiotika und andere Zusätze

Zur Selektion von plasmidtragenden Stämmen wurden dem jeweiligen Medium nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur < 60 °C folgende steril filtrierte Antibiotikallösungen zugesetzt:

Tab. C.6. Antibiotika und andere Zusätze

Substanz	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	
			<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicillin	50 mg/ml	H ₂ O _{dest.}	100	-
Carbenicillin	500 mg/ml	H ₂ O _{dest.}	100	500
Chloramphenicol	50 mg/ml	EtOH _{abs.}	20	200
Gentamicin	100 mg/ml	H ₂ O _{dest.}	15	150-300
Kanamycin	10 mg/ml	H ₂ O _{dest.}	20	-
Tetrazyklin	50 mg/ml	EtOH 70%	15	150
X-Gal ⁴	20 mg/ml	Dimethylformamid		
IPTG ⁵	1 M	H ₂ O _{dest.}		
NaNO ₃	5 M	H ₂ O _{dest.}		

⁴ X-Gal = 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galaktopyranosid

⁵ IPTG = Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid

Die IPTG und X-Gal-Stammlösungen wurden steril filtriert und bis zur Verwendung bei – 20°C gelagert. Zur Herstellung von IPTG- und X-Gal-haltiger Nährböden wurden 20 μl bzw. 40 μl eine halbe Stunde vor Inokulation ausplattiert.

5. Chemikalien, Geräte und Labormaterialien

5.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind nachfolgend alphabetisch aufgelistet:

Aceton	Merck AG, Darmstadt
Acrylamid-Mix (37,5 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L-Alanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Albumin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Algal Aminoacid Mixture [U- ¹³ C]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Algal Lipid Mixture [U- ¹³ C]	Euriso-Top GmbH, Saarbrücken
Ampicillin-Na ⁺ -Salz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Asparagin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacillol	Bode Chemie, Hamburg
Bacto-Agar	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
BioRed Mix	Bioline GmbH, Luckenwalde
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brij [®] 58	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck AG, Darmstadt
Carbenicillin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Merck AG, Darmstadt
Coomassie-Brilliantblau G250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Desoxynukleotidtriphosphat-Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DIG Gel Shift Kit, 2nd generation	Roche Applied Science, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Egg Yolk Emulsion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure 100%	Merck AG, Darmstadt
Ethanol abs., unvergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol abs., vergällt	Apotheke Universität München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Foetal Bovine Serum	Gibco BRL Life Technologies, Inc., Eggenstein
Formaldehyd, 37%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Gentamicin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-(+)-Glukose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin (99 %, wasserfrei)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Größenstandards	
- 1 kB-DNA-Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
-100 Bp-DNA-Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- Proteinmarker 'Page Ruler'	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	MP Biomedicals Europe, Frankreich
Hepes	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
L-Histidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D_S-(+)-threo-Isocitrat, Kaliumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck AG, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck AG, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	Merck AG, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck AG, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Leucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid x 6 H₂O	Merck AG, Darmstadt
Magnesiumsulfat x7 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mangan-(II)-chlorid x4 H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mangan-(II)-sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

β-Mercaptoethanol	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Methanol	Merck AG, Darmstadt
L-Methionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth GmbH & Co. KG
Muzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Merck AG, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt
<i>d</i> -Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>d</i> -Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck AG, Darmstadt
Natriumhydroxidlösung (5N)	Merck AG, Darmstadt
Natriumhydroxidplättchen	Merck AG, Darmstadt
Natriumnitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco BRL Life Technologies, Inc. Eggenstein
Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat (NADP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nucleobond Kit AX 100	Macherey-Nagel, Düren
Ösen (Plastik, steril)	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Oligonukleotid-Primer	Metabion AG, Martinsried
O-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I+ II	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>Pfu</i> -Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphorsäure (85%)	Merck AG, Darmstadt
Pseudomonas-Isolationsagar (PIA)	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
L-Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange II Mutagenese Kit	Stratagene (Agilent Technologies, Waldbronn)
Röntgen-Entwicklerkonzentration	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Röntgen-Fixierkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure (1N)	Merck AG, Darmstadt
Salzsäure (25%, 37%)	Merck AG, Darmstadt
L-Serin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Taq-Polymerase (Gold-Taq)	Roche Applied Science, Mannheim
Temed	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetrazyklin	Merck AG, Darmstadt
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Threonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris[hydroxymethyl]aminoethan	MP Biomedicals
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween20	Fluka-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
UltraClean GelSpin DNA Purification Kit	MoBio Laboratories, Inc., Kanada (Deutschland: Dianova, Hamburg)
ultraPURE distilled water	Gibco (zu beziehen über Invitrogen GmbH)
L-Valin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wizard SV Gel and PCR CleanUp	Promega, Madison, WI, USA

5.2. Geräte und Labormaterialien

Alle in dieser Arbeit benutzten Geräte und Labormaterialien sind nachfolgend alphabetisch geordnet aufgeführt:

Agarose-Gelkammer (Modell 40-1214)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Brutschrank (37°C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank (30 °C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Ceranheizplatte	Schott Geräte GmbH, Hofheim
DNA Speed Vac.	Savant Instruments Inc., NY, USA
Einmalkanülen Microlance 3 No.20	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einmalspritzen (5 ml, 25 ml)	B. Braun Biotech International, Melsungen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen Nr. 352059	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Fotodokumentationsanlage	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gasbrenner 'gasprofi 2^{SCS}'	WLD Tec GmbH, Göttingen
Heizblock	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG, Bielefeld
Heizofen	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inkubationsschüttler	
- Certomat HK (Haube)	B. Braun Biotech International, Melsungen
- Certomat R (Schüttler)	Sartorius AG, Göttingen
Küvetten	
- Quarzküvetten	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
- Einmalküvetten (1,5 ml halbmikro)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

Magnetrührer IKA RCT basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Leitz Aristoplan	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikrowellengerät	Samsung Electronics GmbH, Schwalbach/Ts.
Nylonmembran (positiv geladen) (Zeta-Probe Blotting Membrane)	BioRad Laboratories GmbH, 80901 München
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pasteurpipetten (Plastik)	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
PCR - Mastercycler 5330	Eppendorf AG, Hamburg
PCR - Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Petrischalen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
pH - Meter (PB-11)	Sartorius AG, Göttingen
Pipetten (Plastik, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Labor Schubert und Weiss GmbH, München
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac 200/300	BioRad Laboratories GmbH, München
Rühr - und Heizplatte (IKAMAG RCT)	IKA® - Labortechnik, Staufen
Sauerstoffmessgerät OXY-4-mini (Sensortyp PSt3)	Presens GmbH, Regensburg
Sensorkolben für Sauerstoffgerät	Presens GmbH, Regensburg
Spitzen (weiß, gelb, blau)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Spitzen (steril, gesteckt)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Sterilfilter	
- Stericup (Vacuum Filtration System)	Millipore Corporation, USA
- Millex GP / HV (0,22 µm/0,45 µm)	Millipore, Ireland
Sterilwerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermomixer, kompakt	Eppendorf, D-22339 Hamburg
Tiefkühltruhe - 80 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Ultraschallgerät 'Branson Sonifier 250'	Branson Inc., Danbury, CT, USA
UV Stratalinker 2400	Stratagene (Agilent Technologies, Waldbronn)
UV-/Visible Spektrometer	Amersham Biosciences (GE Healthcare,
Ultrospec 3100 pro	München)

UV-/Visible Spektrometer
GeneQuant 1300

GE Healthcare, München

Vakuumpumpe ME2S
Vortexer (Vortex-Genie 2)

Vacuubrand GmbH, Wertheim
Scientific Industries Inc., NY, USA

Waagen

- Sartorius PT3100
- Kern PCB
- Feinwaage Sartorius PB-11
Whatmanpapier
Wasserbad

As Wägetechnik GmbH, Freising
Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Sartorius AG, Göttingen
Whatman International Ltd. Maidstone, England
Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen

Zentrifugen

- Mikrozentrifuge DW-41
- Zentrifuge 5417 R
(Rotor F45-30-11)
- Sigma 3K30
(Rotor 19776)
- Sigma 1K15
(Rotor 12024)
- Sorvall Super T21
(Rotor ST-H750)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)

Qualitron, Inc.
Eppendorf AG, Hamburg

Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz

Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz

Thermo Fisher Scientific Inc.,
Waltham, MA, USA
Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien

D. Methoden

1. Kultivierung und Stammhaltung von Mikroorganismen

P. aeruginosa und *E. coli* wurden aerob in Erlenmeyerkolben mit Schikanen (100, 250, 500, 1000 ml), anaerob in Schottglasflaschen (25, 50, 100 ml) angezogen. Die Menge an Medium entsprach unter aeroben Bedingungen 10 – 25 %, unter anaeroben Bedingungen 100 % des Fassungsvermögens (in ml) der verwendeten Glasmaterialien. Vorkulturen wurden in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium kultiviert.

In Flüssigmedium erfolgte die Inkubation bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler mit einer Frequenz von 200 Upm. Die Kultivierung fester Medien erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C.

Für die Dauerkonservierung wurden Stammkulturen angelegt. In einem sterilen Reaktionsgefäß (1-2 ml Fassungsvermögen) wurden die Kulturen in steril filtriertes LB-Medium mit 30 % [v/v] Glycerin eingerieben. Die Aufbewahrung der Stammsammlung erfolgte bei – 80 °C.

2. Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der Zelldichte einer Flüssigkultur wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) im Spektralphotometer (Ultrospec 3100pro, Amersham Biosciences GE Healthcare, München) durchgeführt. Als Leerwert diente das jeweilige Lösungsmittel der zu messenden Kultur. Zur Wahrung der Messgenauigkeit wurden die Proben bei einer $OD_{600} > 0,3$ entsprechend verdünnt.

3. Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.1. Isolierung bakterieller DNA

Einige Kolonien einer frischen Bakterienkultur wurden mit einer sterilen Impföse in 1 ml $H_2O_{dest.}$ eingerieben und die Suspension bei 100 °C im Heizblock für 10 min erhitzt. Danach wurde bei 8000 Upm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit $H_2O_{dest.}$ 1:10 verdünnt. Die Lösung kann anschließend als Template für eine PCR-Reaktion verwendet werden.

3.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Je nach Verwendungszweck und benötigter Menge, wurde die Plasmid-DNA mit dem peqGold-Plasmid Mini prep Kit I[®] bzw. Kit II[®] (peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen) oder mit dem Nucleobond AX[®] (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Aufbewahrung der Plasmide erfolgte bei – 20 °C.

3.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden mit Ethidiumbromid angefärbten Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution fand gemäß den Herstellerangaben mit dem 'Wizard[®] SV Gel & PCR CleanUp' System (Promega GmbH, Madison, WI, USA) statt.

3.4. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte durch Agowa (Gesellschaft für molekularbiologische Technologie GmbH Berlin) auf Grundlage der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

3.5. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird eingesetzt, um DNA-Moleküle anhand ihrer Größe in einem elektrisch geladenen Feld aufzutrennen. Agarose besteht aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose. DNA-Moleküle wandern aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode. Die Geschwindigkeit mit der die Moleküle durch das Gel laufen hängt von Molekülgröße, Konformationszustand, Agarosekonzentration und der angelegten Spannung ab. Lineare, doppelsträngige DNA Fragmente bewegen sich im Gel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Molekülmasse.

50x TAE-Puffer, pH 8,0

Tris	242 g/l
EDTA	9,3 g/l
Eisessig (100%)	0,057 %

1x Auftragepuffer

Glycerin	50 %
EDTA	0,2 M
Bromphenolblau (w/v)	0,05 %

Die in dieser Arbeit verwendete DNA wurde in 0,8 bis 2 %-igen [w/v] Agarosegelen aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA diente der Längenstandard 'MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use' (Fermentas, St. Leon-Rot). Der 1x TAE-Puffer wurde sowohl zum Lösen der Agarose (Aufkochen in der Mikrowelle) als auch als Laufpuffer verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 60 min bei 100 V.

Zur Färbung der aufgetrennten DNA-Fragmente nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einer Ethidiumbromid-Lösung (4 µg/ml) etwa 30 min gefärbt und anschließend kurz im Wasser entfärbt. Ethidiumbromid lagert sich interkalierend in die DNA ein und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Dadurch können DNA-Banden sichtbar gemacht und mittels einer Fotodokumentationsanlage abgebildet werden.

3.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Agarosegelen erfolgte visuell anhand der Bandenintensität. Als definierter Standard in Agarosegelen wurde eine 1 kB große DNA-Leiter (MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready to use, Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Exakte Konzentrationsbestimmungen wurden photometrisch bestimmt. In einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) wurde die Extinktion der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht $\Delta E_{260} = 1$ für doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50 µg/ml (Ausubel *et al.*, 1987).

3.7. Präzipitation von DNA

DNA wurde entweder mit Ethanol oder Isopropanol gefällt. Für die Ethanolfällung wurden 0,1 Vol 3M Na-Acetat (pH 4,8) und 2,5 Vol absoluter Ethanol ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) zugegeben. Für die Präzipitation mit Isopropanol wurden 0,7 Vol Isopropanol zugegeben. Danach wurde die DNA-Lösung für 2 Stunden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und anschließend durch Zentrifugation bei 14000 Upm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pelletiert. Danach wurde das Pellet 2 x mit 70 % EtOH gewaschen, unter dem Abzug getrocknet und im gewünschten Endvolumen in A. bidest gelöst.

3.8. *In-vitro*-Amplifikation durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht eine einfache und schnelle exponentielle Amplifikation von DNA-Fragmenten durch hitzestabile DNA-Polymerasen.

Diese Methode wurde von Kary B. Mullis (1986) entwickelt und von Saiki *et al.* (1988) durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* optimiert. Voraussetzung für die Anwendung sind Sequenzkenntnisse über die flankierenden Bereiche des gewünschten DNA-Abschnitts (Template).

Für die PCR werden synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) (Fa. Metabion, Martinsried) verwendet, die homolog zu den flankierenden Bereichen des gewünschten DNA-Abschnitts sind. Nach einer Inkubation bei 95 °C liegt die DNA einzelsträngig vor (Denaturierung), so dass sich im anschließenden Schritt die Primer an das Template anlagern können (Annealing). Die Annealing-Temperatur hängt vom GC-Gehalt der Primer ab, sie liegt aber meist zwischen 50 und 60 °C. Die Verlängerung (Elongation) der Primer wird von der DNA-Polymerase bei 72 °C durchgeführt. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus kann ein DNA-Template im Idealfall bei n Zyklen in 2ⁿ Kopien vervielfältigt werden.

Standard PCR

5 µl	10x PCR Puffer
0,25 µl	2 mM dNTP Mix
0,5 µl	Primer 1 (20 pmol/µl)
0,5 µl	Primer 2 (20 pmol/µl)
2,5 µl	DMSO (100 %)
2,5 µl	40 mM MgSO ₄
0,25 µl	Gold-Taq-Polymerase ⁶
5µl	50-500 ng DNA Template
ad 50 µl	A. bidest

BioRed Mix PCR

10 µl	2x BioRed Mix ⁷
0,2 µl	50 mM MgCl ₂
0,5 µl	Primer 1 (20 pmol/µl)
0,5 µl	Primer 2 (20 pmol/µl)
0,6 µl	100 % DMSO
5 µl	50-500 ng DNA-Template
ad 25 µl	A. bidest

⁶ Roche Applied Science, Mannheim

⁷ Bioline GmbH, Luckenwalde

PCR Programm für Standard und BioRed Mix PCR

Vorabdenaturierung	95 °C	10 min	} 35 x
Denaturierung	95 °C	45 s	
Annealing	50-60 °C	45 s	
Elongation	72 °C	60 s / 1 kB	
Endextension	72 °C	7 min	
Kühlung	8 °C	∞	

PCR mit 'proof-reading' Taq-Polymerase

Um einem fehlerhaften Einbau von dNTPs in ein Amplifikat zu vermeiden, wurde für Klonierungen in Expressionsplasmiden eine Taq-Polymerase mit 3' → 5' -Exonukleaseaktivität ('proof reading'-Aktivität) der Fa. Fermentas, St. Leon-Rot verwendet.

Pfu-PCR

5 µl	10x Pfu-Puffer
5 µl	dNTPs, jeweils 2 mM
5 µl	Primer 1 (20 pmol/µl)
5 µl	Primer 2 (20 pmol/µl)
2,5 µl	100% DMSO
5 µl	50-500 ng Template-DNA
0,5 µl	Pfu Polymerase (2,5 U/µl)
ad 50 µl	A. bidest

PCR Programm für Pfu-PCR

Vorabdenaturierung	95 °C	10 min	} 35 x
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	50-60 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min / 1 kB	
Endextension	72 °C	7 min	
Kühlung	8 °C	∞	

3.9. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Fa. Fermentas bzw. Invitrogen nach Herstellerangaben. Für alle verwendeten Enzyme wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Inkubationstemperaturen angewendet. Für den Fall

eines Doppelverdau wurde ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme zu mindestens 50 % aktiv sind. Für einen Ansatz wurde maximal 1/10 Vol des Gesamtansatzes an Restriktionsenzym zugegeben, da eine zu große Menge an Glycerin, in welchen die Enzyme gelagert werden, die DNA-Spaltung beeinträchtigen kann. Wenn möglich, wurde das Enzym nach dem Verdau nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert. Die anschließende Kontrolle des Verdau erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

Analytischer Verdau

Der analytische Verdau wurde vor allem zur Kontrolle rekombinanter Plasmide durchgeführt. Etwa 1 µg DNA wurde in einem Volumen von 20 µl mit dem entsprechenden Enzym über Nacht inkubiert.

1 µg	DNA
2 µl	10x Puffer
0,5 µl	Enzym
ad 20 µl	A. bidest

Präparativer Verdau von Plasmid-DNA

Für präparative Restriktionen wie z.B. zur Linearisierung von Plasmid-DNA oder zum Verdau von PCR-Fragmenten wurden größere Mengen an DNA eingesetzt (8-10 µg).

8-10 µg	Plasmid-DNA
5 µl	10x Puffer
3 µl	Enzym
ad 20 µl	A. bidest

3.10. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Plasmide, die nach einem Restriktionsenzymverdau in Ligationen eingesetzt werden, wurden zur Vermeidung von Religationen an den 5'-Enden dephosphoryliert, um die Effizienz zu erhöhen (Sambrook *et al.*, 1989). Das eingesetzte Enzym '*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*' (CIAP) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von Nukleinsäuren ab. Der Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert.

10 µl	10x CIAP Puffer
2 µl	CIAP (0,1 U/µl)
x µl	Plasmid 0,2 pmol
ad 100 µl	A. dest

Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen, die gewünschte Bande ausgeschnitten und aufgereinigt (UltraClean™ GelSpin DNA Purification Kit, Dianova, Hamburg).

3.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Alle Ligationen wurden mit dem Enzym T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Das Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch doppelsträngige DNA-Moleküle über Phosphodiesterbindungen mit dem geschnittenen Plasmid. Verdaute DNA-Fragmente wurde im Verhältnis von 3:1 bis 6:1 mit der gewünschten dephosphorylierten Plasmid-DNA gemischt und üN bei 16 °C inkubiert.

2 µl	10x Ligasepuffer
1,5 µl	T4-DNA-Ligase
x µl	Insert
y µl	Plasmid
ad 20 µl	A. bidest

3.12. Transfer von DNA

Für den Transfer von fremder DNA in *E. coli* müssen die Zellen speziell vorbereitet werden, da sie keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNA besitzen.

3.12.1. Herstellung Kalzium-kompetenter Zellen

- Vorkultur: 5 ml LB üN bei 37 °C im Inkubator schütteln
- Hauptkultur 1:100 animpfen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 wachsen lassen.
- Zellen 10 min auf Eis kühlen
- In vorher gespülten und sterilen Zentrifugenröhrchen (bei kleineren Mengen Falcon-

Röhrchen) bei 4 °C und 3000 Upm für 10 min zentrifugieren

- Zellen auf Eis sorgfältig in 30 ml (pro 100 ml Ausgangskultur) eiskalter TFB1-Lösung resuspendieren und in vorgekühlte Falcon-Röhrchen überführen
- Bei 4 °C und 3000 Upm für 10 min zentrifugieren
- Pellet in 4 ml (pro 100 ml Ausgangskultur) eiskalter TFB2-Lösung vorsichtig resuspendieren
- Je 200 µl der Zellsuspension in vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettieren und sofort mit flüssigem Stickstoff einfrieren
- Lagerung bei – 80 °C

TFB1

K ⁺ -Acetat	30 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	50 mM
RbCl ₂	100 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mM
Glycerin	15 %

- pH mit Essigsäure auf 5,8 einstellen
- auf 200 ml mit A. bidest auffüllen und steril filtrieren
- Lagerung: 4 °C

TBF2

MOPS (pH 7,0)	10 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	75 mM
RbCl ₂	10 mM
Glycerin	15 %

- pH mit konzentrierter Salzsäure auf 7,0 einstellen
- auf 100 ml mit A. bidest auffüllen und steril filtrieren
- Lagerung: 4 °C

3.12.2. Transformation von Plasmid-DNA

Plasmide wurden nach der modifizierten Methode nach Hanahan (1983) in *E. coli* wie folgt transformiert:

- Ca^{2+} -kompetente *E. coli* Zellen etwa 30 min auf Eis auftauen lassen
- Maximal 10 μl Ligationsansatz zugeben, gut mischen und Ansatz 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec, Ansatz danach sofort wieder auf Eis stellen
- je Ansatz 800 μl SOC-Medium zufügen und 1 Std. bei 37 °C schüttelnd inkubieren
- 100 μl des Ansatzes auf eine entsprechende Antibiotikum-Agarplatte (AB-Platte) ausplattieren und üN bei 37 °C inkubieren
- restlicher Ansatz kurz abzentrifugieren, in 100 μl SOC-Medium resuspendieren, auf eine zweite AB-Platte ausplattieren und ebenfalls üN bei 37 °C inkubieren

3.12.3. Blau-Weiß-Test

Neben der Selektion rekombinanter Klone auf Antibiotika-Resistenz kann bei bestimmten *E. coli* Stämmen (z. B. DH5 α) nach Transformation der sog. Blau-Weiß-Test angewendet werden. Solche Wirtsstämme tragen eine aminoterminal Deletion im β -Galaktosidase-Gen. Nach der Induktion durch IPTG wird eine verkürzte, enzymatisch inaktive β -Galaktosidase gebildet. Plasmide, die das *lacZ*-Gen besitzen, das für die ersten 146 Aminosäuren der β -Galaktosidase kodiert, können mit der verkürzten β -Galaktosidase des Wirtsstammes zu aktivem Enzym assoziieren (sog. α -Komplementierung). Die multiple Klonierungsstelle des Plasmids befindet sich innerhalb des *lacZ*-Gens, so dass bei erfolgreicher Klonierung eines Inserts das *lacZ*-Gen unterbrochen wird. Somit können nur Klone ohne Insert die aktive Form der β -Galaktosidase bilden. Das Enzym setzt ein zuvor auf die Platte gebrachtes Substrat (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid, X-Gal) zu einem blauen Indigo-Derivat (5-Brom-4-Chlor-Indigo) um. Kolonien mit Insert im Plasmid bleiben dagegen weiß.

Etwa 30 min vor dem Ausplattieren folgende Volumina ausplattieren:

- 40 μl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid)
- 8 μl IPTG (0,2 M in Wasser)

3.12.4. Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Der Transfer von Plasmiden von Donor- auf Rezipienten-Stämme wurde über die triparentale Konjugation erreicht (Figurski und Helinski, 1979). Als Donor-Stamm diente *E. coli* DH5 α mit den jeweiligen konjugierbaren Plasmiden, als Rezipient fungiert *P. aeruginosa*. Da die zu konjugierenden Plasmide nur einen oriT, jedoch keine *tra*-Gene besitzen, wurde ein *E. coli*

Stamm mit dem Helferplasmid pRK2013 (trägt *tra*-Gene) für die Konjugation benötigt.

- Vorkultur: Donor- und der Helferstamm üN bei 37 °C in LB-Medium (+ Antibiotikum), Rezipientenstamm üN bei 43 °C in LB-Medium inkubieren
- 2 ml üN Kultur 5 min bei RT und 6000 Upm abzentrifugieren
- Pellet in 1 ml LB-Medium waschen und erneut zentrifugieren
- Pellet in 400 µl LB-Medium aufnehmen
- 100 µl des Donor- und Helferstammes mischen und 30 min ohne Erschütterungen bei RT inkubieren
- 200 µl vom Rezipientenstamm in ein frisches Reaktionsgefäß geben und mit Donor- und Helferstamm mischen.
- 50 µl Aliquots auf eine vorgewärmte LB-Platte tropfen, Inkubation für mind. 4 Std. bei 37 °C.
- Spots mit einem sterilen Tupfer von der Platte nehmen und in 1 ml steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung resuspendieren.
- Je 100 µl von geeigneten Verdünnungsstufen der Konjugation auf AB-PIA-Agarplatten ausplattieren und üN bei 37 °C inkubieren.

4. Zielgerichtete Mutagenese

Durch die ortsspezifische Mutagenese (engl. '*site-directed mutagenesis*') ist eine gezielte Veränderung einer DNA möglich. Durch Verwendung eines mutagenisierten Primerpaares wird die Veränderung, die ein Basenaustausch, eine Deletion oder Insertion sein kann, an der gewünschten Stelle der DNA eingeführt (Abb. D.1.).

In dieser Arbeit wurde das 'QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit' der Fa. Stratagene verwendet. Besonderheit hierbei ist, dass als Template ein komplettes Plasmid mit gewünschtem Insert eingesetzt wird. Wichtig ist, dass das entsprechende Plasmid von einem Dam-positiven *E. coli* Stamm isoliert wurde (Grund: Methylierung der eingesetzten Plasmid-DNA).

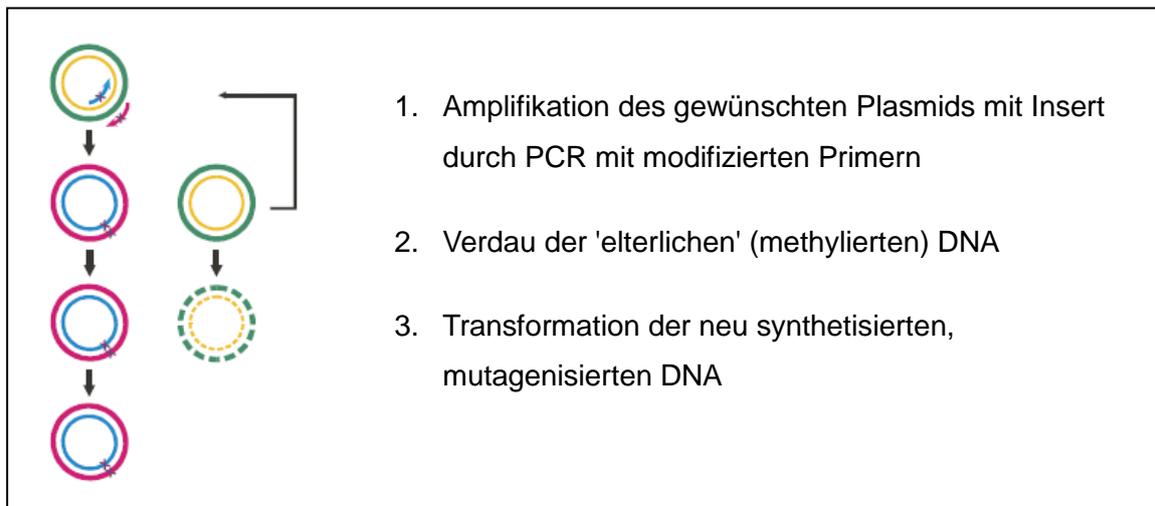


Abb. D.1. Prinzip der zielgerichteten Mutagenese

(<http://users.drew.edu/jliu3/Docs/Stratagene%20Quikchange%20mutagenesis.pdf>)

Kontroll-PCR

5 µl	10x Reaktionspuffer
2 µl	pWhitescript Kontrollplasmid (5 ng/µl)
1,25 µl	Kontrollprimer 1 [34mer (100 ng/µl)]
1,25 µl	Kontrollprimer 2 [34mer (100 ng/µl)]
1 µl	dNTP Mix
38,5 µl	A. bidest
1 µl	<i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase (2,5U/µl)

Proben-PCR

5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	dsDNA Template (Plasmid), 50 ng/µl
1 µl	Primer 1 (125 ng)
1 µl	Primer 2 (125 ng)
1 µl	dNTP Mix
40 µl	A. bidest
1 µl	<i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)

PCR-Programm

95 °C	30 sec	Vorabdenaturierung	} 12x Probe / 18x Kontrolle
95 °C	30 sec		
55 °C	1 min		
68 °C	1 min / kB Plasmidgröße		

Anschließend müssen die Proben sofort auf Eis gestellt werden.

Verdau der methylierten DNA

- 1 µl *DpnI* (10 U/µl) direkt zu jeder Reaktion geben.
- Vorsichtig mischen (auf- und abpipettieren), kurz abzentrifugieren (1 min) und Reaktionen für 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.

Transformation

- 50 µl *E. coli* XL1-blue vorsichtig auf Eis auftauen, in ein vorgekühltes 15 ml Falcon-Röhrchen überführen (Falcon Röhrchen Nr. 352059).
- 1 µl der *DpnI*-behandelten DNA (Kontrolle bzw. Probe) zugeben, vorsichtig mischen und Ansatz für 30 min auf Eis inkubieren. Kontrolle der Transformationseffizienz: 1 µl pUC18 Kontrollplasmid (0,1 ng/µl) zu 50 µl XL1-blue Zellen geben und mischen.
- Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C (Wasserbad), danach den Ansatz für 2 min auf Eis stellen.
- Auf 42 °C vorgewärmtes NZY⁺-Medium (500 µl) zugeben, Transformanten für eine Std. bei 37 °C schüttelnd inkubieren.
- Folgende Volumina auf LB-Selektivplatten ausplattieren:
 - pWhitescript mutagenesis control: 250 µl (Blau-Weiß-Selektion)
 - pUC18 transformation control: 5 µl (Blau-Weiß-Selektion)
 - Probe: 250 µl je Platte (2 Platten)
- Inkubation der Platten üN bei 37 °C

Auswertung der Transformation

- pWhitescript-Kontrolle: 50-800 Kolonien/Platte, mindestens 80 % der Kolonien müssen die Mutation tragen und als blaue Klone sichtbar sein.
- pUC18 Transformationskontrolle: > 250 Kolonien/Platte, mindestens 98 % blaue Klone (Transformationseffizienz: > 10⁸ cfu/µg)
- Probe: 10-1000 Kolonien/Platte

5. Proteinchemische Arbeiten

5.1. Herstellung rekombinanter Proteine

Die Überproduktion von ANR erfolgte als Hexahistidin-Fusionsprotein über diverse Plasmide (siehe Tabelle B.4.) unter aeroben Bedingungen in *E. coli*. Expressionsstämme wie z.B. BL21 DE3 tragen chromosomal das Gen für die T7-DNA-Polymerase, welches unter transkriptioneller Kontrolle des *lac*-Repressors steht. Durch Zugabe des künstlichen Induktors IPTG wird die Repression des Gens für die Polymerase aufgehoben und diese entsprechend gebildet.

- üN-Kultur: 5 ml LB + entsprechendes Antibiotikum, einmal mit 1x PBS waschen
- Hauptkultur: 200 ml LB + Antibiotikum, 1:50 mit üN-Kultur animpfen und bis $OD_{600} \sim 0,6$ wachsen lassen (Rotationsschüttler: 200 Upm, 37 °C)
- 2 ml Kultur abnehmen, zentrifugieren bei 8000 Upm für 5 min (RT), Pellet in 100 µl 1x SDS-Laufpuffer aufnehmen, mit 4x Probenpuffer mischen und bei – 20 °C einfrieren
- restliche Kultur mit 1mM Endkonzentration IPTG induzieren, 3-4 Std. wachsen lassen.
- 2 ml Kultur abnehmen, zentrifugieren bei 8000 Upm für 5 min (RT), Pellet in 200 µl 1x SDS-Laufpuffer aufnehmen, mit Auftragspuffer mischen und bei - 20 °C einfrieren
- restliche Hauptkultur abzentrifugieren (8000 Upm, 10 min, RT) und mit 1x PBS waschen. Pellet bei – 20 °C bis zur Aufreinigung lagern

Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte in der hauseigenen Biotech-Abteilung über eine HisTrap-Säule sowie über das ÄKTAexplorer-System™ (GE Healthcare, München). Zur besseren Reinigung wurde anschließend eine Größentrennung der Proteine über eine Gelfiltration (Superdex S75-Säule, Trennungsbereich 5-70 kDa) vorgenommen. Die erhaltenen Fraktionen wurden über eine SDS-PAGE kontrolliert.

5.2. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test (Bradford, 1976) ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 liegt im sauren pH-Bereich als Anion vor und kann daher mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen blaue Farbkomplexe bilden. Das Absorptionsmaximum dieser Farbkomplexe liegt bei 595 nm, wobei die Zunahme der Absorption direkt proportional zur Proteinkonzentration ist. Die Bestimmung der Konzentration einer unbekanntem Proteinlösung erfolgt durch die Eichgerade einer mit BSA erstellten Eichlösung. Jeder Wert der Eichgeraden wurde mindestens drei Mal unabhängig voneinander bestimmt.

Eichlösung BSA (Stammlösung)

0,5 mg / ml in $H_2O_{dest.}$

Färbereagenz

20 mg Coomassie-Brilliantblau G250, in 25 ml $EtOH_{abs.}$ lösen

50 ml o-Phosphorsäure (85 %) zugeben

ad 500 ml $H_2O_{dest.}$

Lösung durch einen Faltenfilter filtrieren

Aufbewahrung: 4 °C (dunkel)

Reaktionsansatz

100 µl Proteinlösung + 1 ml Färbereagenz

Referenzwert 100 µl Wasser/Puffer

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 5 min bei RT, anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen den Referenzwert gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der aus der Eichgeraden ermittelten Steigung m .

5.3. Bestimmung der Isocitratdehydrogenase-Aktivität

Für die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase aus *P. aeruginosa* wurde 25 ml LB Medium mit einer optischen Dichte von OD_{600} 0,01 angeimpft. Die Zellernte erfolgte durch Abzentrifugieren bei 4 °C und 6000 Upm für 10 min. Das Pellet wurde 1-2 x in 1x PBS gewaschen, in 1-3 ml $H_2O_{dest.}$ aufgenommen und ün bei - 80 °C eingefroren. Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall (Branson Sonifier, Duty Circle 50 %, Output Control 3, mind. 1 min, 1-2 Durchläufe). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (6000 Upm, 15 min, 4 °C) beseitigt und der Überstand als Zellextrakt in die Reaktion eingesetzt.

Reaktionsansatz (1 ml)

0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

0,66 mM Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP⁺)

1 mM $MnSO_4$

1 mM $D_S-(+)$ -threo-Isocitrat, Kaliumsalz

Die Reaktion wurde mit 25-300 µl Zellextrakt gestartet, die Zunahme des gebildeten NADPHs wurde bei einem Absorptionsmaximum von 340 nm gegen die Zeit (3 min) gemessen. Die Bestimmung der Konzentration C_{NADPH} wurde mit dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt bestimmt:

$$C_{NADPH} = \frac{\Delta E / \text{min}}{\varepsilon \cdot d}$$

$\Delta E/\text{min}$	= Extinktionsänderung pro Minute (im linearen Bereich)
ϵ	= Extinktionskoeffizient für NADPH = $6,22 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$
d	= Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Ein Unit (U) entspricht 1 μmol umgesetztes Substrat pro Minute. Die spezifische Enzymaktivität E_s lässt sich wie folgt errechnen:

$$E_s = \frac{U / \text{ml}}{\text{mg} / \text{ml} \text{ Gesamtprotein}} = \frac{U}{\text{mg} \text{ Gesamtprotein}}$$

5.4. Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität

Die Aktivität der β -Galaktosidase (LacZ) wurde photometrisch bei 420 nm durch die Umsetzung von o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) zum gelben o-Nitrophenyl ermittelt (Abb. D.2.).

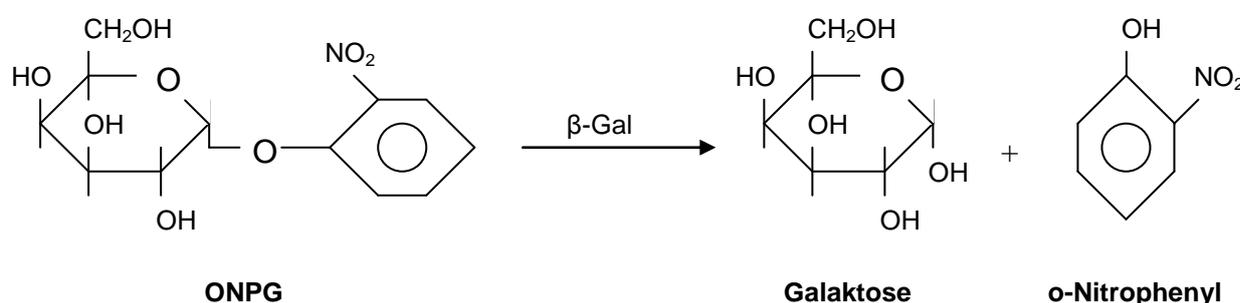


Abb. D.2. Umsetzung von ONPG zu Galaktose und o-Nitrophenyl

Zum Zeitpunkt der Probennahme wurde die OD_{600} ermittelt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von SDS und Chloroform bei 28 °C für 5 min. Sobald eine erkennbare Gelbfärbung auftritt, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μl Na_2CO_3 gestoppt. Vorhandene Zelltrümmer wurden bei RT für 10 min bei 14000 Upm abzentrifugiert. Anschließend wurde die OD bei 420 nm und 550 nm im Spektralphotometer bestimmt.

Reaktionsansatz

250 μl	Zellprobe
750 μl	Z-Puffer
10 μl	Chloroform
5 μl	0,1 % SDS

Reaktionsstart

Zugabe von 200 µl ONPG (4 mg/ml in Phosphat-Puffer)

Reaktionsstopp

Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃

Die ONPG-Umsatzrate wurde nach Miller J.H. (1972) durch folgende Formel berechnet:
(t = Reaktionszeit [min], V = Zellprobe [ml]).

$$\text{Miller Units} = 1000 \times \frac{(\text{OD}_{420} - 1,75 \cdot \text{OD}_{550})}{(\text{OD}_{600} \Delta t \cdot V)}$$

Z-Puffer, pH 7

60 mM	Na ₂ HPO ₄
40 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	KCl
1 mM	MgSO ₄
50 mM	β-Mercaptoethanol

0,1 M Phosphat-Puffer

60 mM	Na ₂ HPO ₄
40 mM	NaH ₂ PO ₄

5.5. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen ihrer molaren Masse nach auftrennen. Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) lagert sich an Proteine an und bestimmt deren Eigenladung proportional zur Masse, so dass alle zu trennenden Proteine negativ geladen sind. Demnach wandern die Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer molaren Masse und der Porengröße des Polyacrylamid-Gels zur Anode. Die Porengröße eines Gels lässt sich durch die Konzentration an Acrylamid beeinflussen. Die Elektrophorese wurde bei 200 V Spannung und RT für 60-70 min mit dem Mini-Protean 2 System (Biorad) durchgeführt. Die Größe eines Gels betrug 10 x 7 x 0,75 cm.

Tab. D.1. Pipettierschema für SDS-Gele

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	14%	5%
4 Mini-Gele				
30% Acrylamid (37,5:1)	5,1 ml	6,1 ml	7,1 ml	1,3 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8				2 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml	
H ₂ O _{dest.}	4,3 ml	3,3 ml	2,2 ml	4,5 ml
10% SDS	150 µl	150 µl	150 µl	100 µl
10% APS	110 µl	110 µl	110 µl	30 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	25 µl

SDS-Laufpuffer (10x)

1,92 M	Glycin
0,25 M	Tris
1 %	SDS

Probenpuffer (4x)

0,25 M	Tris/HCl (pH 6,8)
0,4 M	β-Mercaptoethanol
8%	SDS
0,4%	Bromphenolblau
40%	Glycerin (v/v)

5.6. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Form der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der die zu trennenden Proteine nicht durch SDS oder ein anderes Detergenz negativ geladen werden, wird beim sog. Gelretardierungsexperiment eingesetzt (siehe auch Kapitel 6).

Das Gel besteht im Gegensatz zur SDS-PAGE aus nur einem Stück und enthält meist zwischen 6 % und 8 % Acrylamid. Die Porengröße wird aufgrund des zu trennenden Komplexes aus DNA und Protein größer gewählt. Die Vorelektrophorese dient der korrekten Ausrichtung aller Ionen im Gel und wurde bei 80 V für 10 min ausgeführt. Die Hauptelektrophorese wurde bei 150 V und RT für 30 min mit dem Mini-Protean 2 System (Biorad Laboratories, München) durchgeführt.

Tab. D.2. Pipettierschema für native Gele

2 Mini-Gele	6%	7%	8%
30% Acrylamid (37,5:1)	2 ml	2,3 ml	2,6 ml
H ₂ O _{dest.}	7,4 ml	7,1 ml	6,8 ml
10x TBE Puffer	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
10% APS	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

10x TBE Puffer

890 mM Tris

890 mM Borsäure

20 mM EDTA

pH 8,0

5.7. Färbung von Proteingelen

Um Proteine in Polyacrylamidgelen zu visualisieren, wurden die Gele für 30 min mit ca. 50 ml Coomassie-Färbelösung überschichtet. Nach Abgießen der überschüssigen Lösung wurde das tief blau gefärbte Gel entweder \ddot{u} N mit Wasser oder mit Entfärbelösung entfärbt, bis die gewünschte Farbintensität der Banden erreicht war. Die Nachweisgrenze für Coomassie-Brilliantblau G250 liegt bei etwa 0,5 µg Protein.

Coomassie-Färbelösung

0,125 % Coomassie-Brilliantblau G250

50 % Methanol

10 % Eisessig

Entfärbelösung

40 % EtOH

10 % Eisessig

6. Gelretardierungsexperimente

Gelretardierungsexperimente wurden mit dem DIG Gel Shift Kit (2nd generation) der Fa. Roche Applied Science, Mannheim durchgeführt. DNA-Sonden wurden von der Fa. Metabion, Martinsried synthetisiert.

6.1. Markierung der DNA-Sonden

- Inkubation der DNA bei 95 °C für 10 min, anschließend schrittweise Abkühlung auf RT
- 100 ng DNA mit sterilem A. bidest auf 10 µl auffüllen (für die Kontrollreaktion: 1 µl Kontroll-DNA (Cup 6) und 9 µl A. bidest)
- Zugabe von 4 µl 5x Labeling Puffer (Cup 1, Endkonzentration 1x)
4 µl CoCl₂ (Cup 2, Endkonzentration 5 mM)
1 µl DIG-ddUTP (Cup 3, Endkonzentration 0,05 mM)
1 µl Transferase (Cup 4), 20 U/µl
- Ansätze mischen und kurz abzentrifugieren
- Inkubation bei 37 °C für 15 min
- Reaktionsstopp: Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0), kurz mischen
- Zugabe von 3 µl A. bidest., dies entspricht einem Finalvolumen von 25 µl und einer Finalkonzentration von 4 ng/µl

6.2. Überprüfung der DNA-Markierung

Zuerst muss die markierte DNA mit einer Ausgangskonzentration von 4 ng/µl wie folgt verdünnt werden (Tab. D.3.):

Tab. D.3. Verdünnungsreihe für markierte DNA-Sonden

Nr.	µl markierte DNA bzw. Kontroll-DNA	TEN-Puffer [µl]	Verdünnung	Finalkonzentration [ng/µl]
1	1	0	0	4
2	1	9	1:10	0,4
3	1	99	1:100	0,04
4	1	999	1:1000	0,004
5	0	1	0	0

- Je 1 µl jeden Ansatzes (Nr. 1-5) auf eine Nylonmembran spotten
- Fixieren der markierten DNA durch Crosslinking mit UV-Licht (0,5 - 1 min, 120 mJ), Membran dabei auf ein mit 2x SSC Puffer getränktes Whatmanpapier legen
- Membran schwenkend in 20 ml Waschpuffer für 2 min bei RT inkubieren
- Inkubation für 30 min in 10 ml 1x Blockingreagenz

- Inkubation für 30 min in 10 ml AK-Lösung (1 µl AK auf 10 ml 1x Blockingreagenz)
- Membran 2 x 15 min in 10 ml Waschpuffer waschen
- Membran 2-5 min in 10 ml Detektionspuffer equilibrieren
- 100 µl CSPD-Lösung auf die Membran pipettieren
- 10 Minuten bei 37 °C inkubieren
- Membran auf einen Röntgenfilm auflegen und entwickeln

Durch Vergleich der Verdünnungsreihen der markierten DNA mit der Kontroll-DNA kann man nun auf die Quantität der markierten DNA schließen. Der Spot Nr. 1 (4 ng/µl) sollte auf jeden Fall sichtbar sein.

Waschpuffer

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
0,3 % Tween20
pH 7,5

Maleinsäurepuffer

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5

Detektionspuffer

0,1 M Tris
0,1 M NaCl
pH 9,5

TEN Puffer

10 mM Tris
0,1 M NaCl
1 mM EDTA
pH 8,0

2x SSC Puffer

0,3 M NaCl
0,03 M Trinatriumcitrat
pH 7,0

10x Blockingreagenz

10 % (w/v) Blockingpulver in Maleinsäurepuffer lösen, bei 65 °C rührend auf der Heizplatte lösen. Aliquotieren und steril filtrieren und bei – 20 °C einfrieren. Die Lösung ist 4 Wochen bei 4 °C haltbar.

1x Blockingreagenz

Stets frisch in Maleinsäurepuffer verdünnen.

Antikörper-Lösung

Antikörper (AK) für 5 min bei 10000 Upm und 4 °C abzentrifugieren. Benötigte Menge an AK vorsichtig von der Oberfläche pipettieren und in 1x Blockingreagenz 1:10000 verdünnen (entspricht 75 mU/ml). Die Lösung ist für zwölf Stunden bei 4 °C haltbar.

CSPD-Lösung

Benötigte Menge an CSPD entnehmen und 1:100 in Detektionspuffer verdünnen. Die Lösung ist lichtempfindlich, die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

6.3. Band Shift Reaktion

Für die Band Shift Reaktion sowie für die Kontrollreaktion müssen je 3 Ansätze angefertigt werden. Ansatz 1 enthält die markierte DNA ohne Protein, Ansatz 2 die markierte DNA mit Protein und Ansatz 3 die markierte DNA mit Protein und einem 125-fachen Überschuss an unmarkierter DNA (spezifische Kompetition).

Alle Ansätze müssen auf Eis angesetzt werden. Tabelle D.4. zeigt das Pipettierschema für die Band Shift Reaktion.

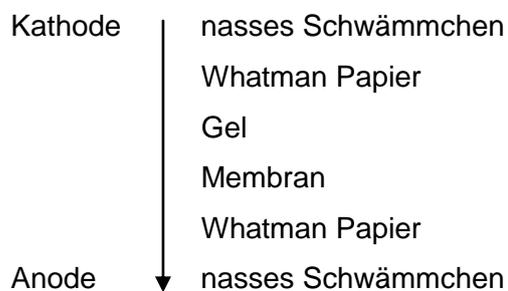
Tab. D.4. Pipettierschema der Band Shift Reaktion

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Bindepuffer	4 µl	4 µl	4 µl
Poly-[d(I-C)]	1 µl	1 µl	1 µl
Poly-L-Lysin	1 µl	1 µl	1 µl
A. bidest	12 µl	11 µl	10 µl
Markierte DNA bzw. Kontroll-DNA [4 ng/µl]	2 µl	2 µl	2 µl
Unmarkierte DNA bzw. Kontroll-DNA [0,1 µg/µl]	-	-	1 µl
Gereinigtes Protein [25-75 ng/µl] bzw. Kontrollprotein	-	1 µl	1 µl

- Ansätze vorsichtig mischen und für 15 min bei RT inkubieren, anschließend Ansätze sofort auf Eis stellen
- Zu jedem Ansatz 5 µl Ladepuffer (Cup 13) zugeben und kurz mischen
- Ansätze sofort auf ein natives Polyacrylamid-Gel laden und auftrennen (siehe auch Kapitel 5.6.)

6.4. Chemilumineszente Detektion

- Zwei Lagen Whatmanpapier sowie die Membran auf die Größe des Gels zuschneiden und für 2-5 min in Transferpuffer (0,5 x TBE) equilibrieren.
- Der Blot wird folgendermaßen zusammen gefügt (luftblasenfrei):



- Der Transfer erfolgt für 30 min bei 400 mA.
- Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgt durch Crosslinking bei 120 mJ für 0,5 min⁻¹ min. Die Membran dazu auf ein mit 2x SSC Puffer getränktes Whatman Papier legen.
- Membran für 2 min in Waschpuffer spülen
- Membran für 30 min in 100 ml 1x Blockingreagenz schwenken
- Membran für 30 min in 20 ml Antikörperlösung schwenken
- Membran 2 x 10 min in 100 ml Waschpuffer spülen
- Membran 5 min in 20 ml Detektionspuffer equilibrieren
- Membran im dunklen Gefäß mit 1 ml CSPD-Lösung überschichten und für 10 min bei 37 °C inkubieren
- Membran auf einen Röntgenfilm auflegen und entwickeln

7. Isotopolog-Experimente

Isotopologe sind alle Moleküle einer Art, die sich nur durch ihre atomaren Isotopologe (z.B. ¹²C, ¹³C, ¹⁴C) im Molekül unterscheiden. Am Beispiel des Laktats (= Molekül mit 3 C-Atomen) soll die Isotopolog-Schreibweise erläutert werden:

- [1-¹³C] Laktat: C-1 ist ein ¹³C-Atom, C-2 und C-3 jeweils ein ¹²C-Atom
- [2-¹³C] Laktat: C-2 ist ein ¹³C-Atom, C-1 und C-3 jeweils ein ¹²C-Atom
- [1,2-¹³C] Laktat: C-1 und C-2 sind ¹³C-Atome, C-3 ist ein ¹²C-Atom

Die Anzahl aller möglichen Isotope eines Moleküls berechnet sich aus 2^n , wobei n die Anzahl der C-Atome des Moleküls ist. Natürlicherweise kommen ¹³C-Isotopologe selten vor. Die Häufigkeit beispielsweise von vollmarkiertem Laktat [1,2,3-¹³C] liegt bei nur 0,00011%. Markierungsexperimente mit universellen/vollständig ¹³C-markierten Vorstufen (in unseren Experimenten Aminosäure-Mischung oder Algenlipide) führen zu spezifischen Mischungen von Isotopologen für jeden neu synthetisierten Metaboliten, d.h. für die metabolische „Vorgeschichte“ existiert ein authentisches Muster, welches mit Hilfe der o.g. Verfahren detektiert werden kann.

Für die Messung von Molekülen durch die Massenspektroskopie muss der zu detektierende Stoff i.d.R. gasförmig vorliegen. Hierfür ist oft eine Derivatisierung der Moleküle notwendig. Da ¹³C-markierte Moleküle bzw. Derivate im Vergleich zu unmarkierten Molekülen bzw. Derivaten eine um mindestens 1 erhöhte Masse ($m+1$) haben, können diese eindeutig durch die Massenspektroskopie voneinander getrennt und detektiert werden. Über die Markierungsmuster der Derivate können dann Rückschlüsse über die Isotopologverteilung und den Entstehungsweg des Metaboliten gezogen werden.

Bei der NMR-Spektroskopie wird die Kernspinresonanzenergie im Einfluss eines starken äußeren Magnetfeldes aufgezeichnet. Die Kernspinresonanzenergie ist die Energie, die für die Umdrehung des Kernspins eines Moleküls notwendig ist und wird als Frequenz gemessen. Da die Resonanzfrequenz auch von der Umgebung der Kerne abhängt, erhält man so Informationen über die Position eines Isotops. Dies ist ein wesentlicher Vorteil der NMR gegenüber der GC/MS, welche nur die Häufigkeit der Isotope eines Moleküls wieder geben kann. Nachteil der NMR-Technologie sind die oft sehr langen Messzeiten (bis zu mehreren Tagen) und die benötigte Bakterienmasse (im Grammbereich). Die Kombination beider Techniken dagegen liefert einen hervorragenden Einblick in den Metabolismus. Die Rohdaten der Isotopologbestimmung werden tabellarisch zusammengefasst. Um die Häufigkeit jedes vorkommenden Isotops eines Moleküls bzw. Derivats aufzeigen zu können werden die Isotopologe mit Hilfe eines binären Codes dargestellt (siehe auch Abschnitt H.). Die Schreibweise besteht aus insgesamt zwei Buchstaben (X und Y), zwei Ziffern (0 und 1) und geschweiften Klammern.

- Die Anzahl der Buchstaben und/oder Zahlen in der geschweiften Klammer gibt an, wie viele C-Atome sich im betreffenden Molekül/Derivat befinden (Bsp.: {000}, {XYY} oder {011} bedeutet, das Derivat besteht aus jeweils drei C-Atomen, {1111}, {XYYY} oder {0YYY}

bedeutet, das Derivat besteht aus jeweils vier C-Atomen. etc. Die erste Ziffer bzw. der erste Buchstabe steht für das erste C-Atom, die zweite Ziffer bzw. der zweite Buchstabe für das zweite C-Atom, etc.).

- Die „0“ steht für ein ^{12}C (unmarkiert), die „1“ steht für ein ^{13}C (markiert) und „X“ steht für ^{12}C oder ^{13}C (unbekannt).
- Der Buchstabe „Y“ steht für ^{12}C oder ^{13}C , hier gibt die Zahl außerhalb der geschweiften Klammer die Gesamtanzahl an ^{13}C -Atomen im Molekül an, wobei aber die Position der markierten C-Atome nicht bekannt (Bsp.: {0YY}1 = ein C-Atom von insgesamt drei C-Atomen ist ein ^{13}C -Atom, entweder das C-2 oder das C-3, das erste C-Atom ist unmarkiert). Diese Isotopologe bezeichnet man auch als m+1 (im Molekül ist ein ^{13}C vorhanden), m+2, m+3, usw., wobei m für die Masse des Moleküls steht.

Die Vorbereitungen der Bakterienproben sowie alle Messungen am Gaschromatographen/Massenspektrometer und am NMR-Spektrometer wurden durch Dr. Eva Eylert und PD Dr. Wolfgang Eisenreich an der Technischen Universität München, Abteilung für Biochemie, durchgeführt.

7.1. [U- ^{13}C]-markierte Aminosäure-Mischung

Für Isotopolog-Experimente mit markierten Aminosäuren wurde zunächst das ASM folgendermaßen modifiziert:

- Alle gelösten Aminosäuren (je 0,25 mg/ml) in einem großen Becherglas mischen und den pH-Wert von 6,9 mit 5M NaOH einstellen
- 0,5 mM Urea und 0,8 mg/ml Glukose zugeben
- Zugabe der markierten [U- ^{13}C] Aminosäure-Mischung (0,5 mg/ml, gelöst in A. bidest)
- pH Wert kontrollieren
- mit A. bidest bis zur Hälfte des gewünschten Gesamtvolumens auffüllen
- Lösung steril filtrieren

Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen folgende Lösungen zugesetzt:

- 125 mg/ml Albumin
- 20 mg/ml Muzin
- 67,5 mg/ml DNA-Lösung
- 1/100 des Gesamtvolumens an FBS (HI)
- 10x Sputumpuffer-Fettsäure-Mix

Um die Sterilität des fertigen Mediums zu gewährleisten, wurden Reinheitskontrollen auf LB-Agarplatten ausgestrichen und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Anzucht der Bakterien in ASM erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler (200 Upm), die Anzucht der üN-Kultur erfolgte stets in 25 ml modifiziertem ASM in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Für jeden Stamm wurden ca. 5 g Feuchtgewicht generiert, d.h. jeder Stamm wurde in 1 L ASM angezogen (4 x 250 ml ASM in 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen).

- Animpfen der Hauptkultur mit OD_{600} 0,01
- Wachstum bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase
- Zellernte erfolgt bei 4 °C, 4300 Upm, 15 min zentrifugieren
- Waschschrift 1: Pellet in 300 ml kaltem PBS resuspendieren und bei 4 °C und 4300 Upm für 15 min zentrifugieren
- Waschschrift 2 und 3: analog Waschschrift 1, evtl. noch weitere Waschschriffe durchführen, bis der Überstand klar ist
- Bakteriensedimente sammeln
- Abtöten der Bakterien: Sediment in 4% Paraformaldehyd (PFA) resuspendieren, üN bei 4°C lagern oder Pellet autoklavieren
- Am nächsten Morgen: PFA-Bakterienlösung mind. 15 min bei 4 °C und 14000 Upm zentrifugieren, Überstand gesondert entsorgen (Sondermüll!)
- Anfertigen von Sterilitätskontrollen: Ausstreichen einer Spatelprobe auf einer LB-Agarplatte
- Bis zur Übergabe des Pellets an Dr. Eva Eylert wurde es bei – 20 °C aufbewahrt

7.2. [U-¹³C]-markiertes Algenlipid

Für diese Experimente wurde das im ASM enthaltene Egg Yolk durch die Fettsäuren Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Linolsäure und Ölsäure in der Konzentration von insgesamt 1 g/L ersetzt (0,1 g/L Isotop, 0,9 g/L unmarkierte Fettsäuren). Die unmarkierten Fettsäuren wurden zusammen mit dem Sputumpuffer dem ASM beigemischt. Für die Herstellung der 10x Sputumpuffer-Fettsäure-Mischung wurde 53,24 % Palmitinsäure, 9,15 % Palmitoleinsäure, 6 % Linolsäure und 28,2 % Ölsäure verwendet. Um die Fettsäuren in Lösung zu bringen wurde 10x Sputumpuffer mit 1 % Brij[®]58 (Detergenz) versetzt. Anschließend wurden der Puffer-Brij[®]58-Lösung die entsprechenden Fettsäuren zugesetzt und mindestens üN auf einem Magnetprüher gerührt, bis eine Emulsion entstand.

Am Versuchstag wurde 0,1 g/L [U-¹³C] markiertes Algenlipid in Aceton vollständig gelöst (1 % Aceton, bezogen auf das Gesamtvolumen des Mediums) und anschließend vorsichtig der

Sputumpuffer-Fettsäure-Mischung zugegeben. Die Herstellung des modifizierten Mediums sowie die Zellernte erfolgte analog Kapitel 7.1., mit folgenden Ausnahmen:

- Bakterienpellets mit markiertem Algenlipid wurden ausschließlich durch 4 % PFA abgetötet,
- dem ASM wurden keine markierten Aminosäuren zugesetzt.

Unter aeroben Bedingungen wurde der zu testende Stamm in insgesamt 1 L ASM (4 x 250 ml in je 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen) angezogen, unter anaeroben Bedingungen wurden die Bakterien direkt in 1 L ASM (1 L Schottglasflasche) + 100 mM NaNO₃ (Schüttelbedingung: 120 Upm, 37 °C) gezüchtet.

7.3. Probenaufbereitung GC/MS

(aus Bachelorarbeit Pamina Andrä, Lehrstuhl für Biochemie, TU München)

Gaschromatographie

Mobile Phase: Helium, stationäre Phase: 5 % Phenyl-95 % Dimethylsiloxan)

Prinzip einer Gaschromatographie bzw. Massenspektroskopie siehe auch: http://www.biotic-interactions.de/ausstattung/analytische_verfahren/GCMS_analytik.

Probenaufbereitung

- Ca. 5 mg Probe mit 500 µl 6 N Salzsäure versetzen, im verschlossenen Gefäß 24 Std. bei 105 °C inkubieren
- Probe mit Stickstoff trocknen (Heizblock 70 °C, unter N₂-Zufuhr)
- 200 µl Eisessig (50 %) zugeben und im Ultraschallbad lösen (1 min)
- Aufreinigung der Aminosäuren über eine selbst hergestellte Mikrosäule + [Kationenaustauscher Dowex 50WX8, 200 - 400mesh (= 37-74µm), H⁺-Form), 300 µl]
- Säule mit 1 ml 70 % Methanol vorbereiten, Spülen mit 1 ml H₂O bidest.
- Probe auf die Säule geben und einsickern lassen
- Waschen mit 2 x 1000 µl H₂O bidest., Eluate verwerfen
- Aminosäuren mit 1 ml 2 M NH₃ eluieren und im N₂-Luftstrom bis zur Trockene eindampfen
- Für die Derivatisierung wird zur trockenen Probe 50 µl Acetonitril und 50 µl N-(Tertbutyldimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamid zugegeben und für 30 min bei 70 °C inkubiert

7.4. Probenaufbereitung NMR

(aus Bachelorarbeit Pamina Andrä, Lehrstuhl für Biochemie, TU München)

Methanolextrakt (hydrophile Fraktion)

- Bestimmung des Trockengewichts (TG) der Probe (Lyophylle)
- Zugabe von 70 % Methanol gemäß der Formel 10 ml / 100 mg TG
- Extraktion für 20 min bei 50 °C unter Rückfluss
- Probe abfiltrieren, am Rotationsverdampfer einengen und lyophilisieren
- Probe in 880 µl D₂O aufnehmen, 100 µl KPO-Puffer (pH 7,2) und 20 µl TSP-Standard zugeben (KPO-Puffer: 68,05 mg KH₂PO₄ + 87,09 mg K₂HPO₄ in ca. 5 ml D₂O lösen)
- Probe zentrifugieren, 560 µl Überstand als NMR-Probe verwenden

Dichlormethanextrakt (lipophile Fraktion)

- Zugabe von 70 % Methanol gemäß der Formel 10 ml / 100 mg TG
- Extraktion für 60 min bei 38 °C unter Rückfluss
- Probe abfiltrieren, am Rotationsverdampfer einengen und lyophilisieren
- Probe in deuteriertem Chloroform aufnehmen, in NMR-Röhrchen überführen (Füllhöhe 4 cm)

Saure Hydrolyse

- Dichlormethanextrakt mit 25 ml 6 N HCl und 2 ml Thioglykol versetzen
- Erhitzen der Probe unter N₂-Zufuhr auf 120 °C
- Suspension 24 Std ohne N₂-Zufuhr unter Rückfluss kochen
- Abkühlphase: N₂-Zufuhr
- Suspension filtrieren, am Rotationsverdampfer einengen und 10x mit H₂O_{bidest.} waschen, schließlich in 5 ml H₂O_{bidest.} aufnehmen

Reinigung der Aminosäuren

- Kationenaustauscher Dowex 50 Wx8 (mesh 200 – 400 H⁺-Form): 60 g in eine Säule packen (Ø = 2,5 cm)
- Säule mit 250 ml H₂O vorbereiten
- Säuregradient: 2 L 0 – 3 N HCl, dann 1 L 3 N HCl
- Tropfgeschwindigkeit: 1 Tropfen / 3 Sek

Dünnschichtchromatographie

- Cellulose-Platten: TCL Cellulose F (Fa. Merck, Darmstadt)
- Aminosäurefraktionen aus der Auftrennung auf Cellulose-Platten pipettieren
- Entwicklung 2 Std in DC-Kammer: Laufmittel: 50 % n-Butanol, 30 % H₂O, 20 % Eisessig
- Platten trocken föhnen
- Cellulose-Platten mit Ninhydrin-Reagenz gleichmäßig besprühen, trockenen lassen, im Trockenschrank bei 120 °C entwickeln (Ninhydrin-Reagenz: 300 mg Ninhydrin in 100 ml n-Butanol)
- Platten trocken föhnen und anschließend einscannen
- AS-Fractionen vereinigen, unter Vakuum einengen und lyophilisieren
- Probe in 1 ml D₂O aufnehmen und abzentrifugieren
- 560 µl für NMR-Probe verwenden

E. ERGEBNISSE

1. Sauerstoffabhängige Regulation metabolischer Gene von *P. aeruginosa*

In Vorarbeiten konnte in *mutS*-defekten *P. aeruginosa* CF-Isolaten des Endstadiums der Lungeninfektion eine signifikante Erhöhung vor allem in der Expression metabolischer Gene gezeigt werden. Diese Änderungen deuteten auf eine Anpassung von *P. aeruginosa* an die speziellen Bedingungen in den Atemwegssekreten der CF-Lunge, z.B. hinsichtlich Nährstoff- und Sauerstoffangebot hin. Ursache hierfür sind wahrscheinlich Mutationsereignisse in regulatorischen Genen und Proteinen, welche eine veränderte Genexpression in verschiedenen Stoffwechselwegen wie beispielsweise der anaeroben Argininfermentation und Denitrifikation zur Folge haben. In Übereinstimmung hierzu stellt die Umgebung des dehydrierten CF-Mucus ein sauerstoffarmes Milieu dar. Sauerstoffmessungen in der Tiefe des CF-Mucus zeigen einen Sauerstoffgradienten zu mikro-aeroben bzw. anaeroben Bedingungen hin. Ein wesentlicher Teil der in den vorangegangenen Microarray- und Proteomanalysen positiv selektionierten Gene in chronischen CF-Isolaten könnte somit direkt oder indirekt einer O₂-abhängigen Regulation unterliegen. Ob die in den späten Mutatorstämmen erhöhte Expression metabolischer Gene im Zusammenhang mit einer mikro-aeroben oder anaeroben Anpassung von *P. aeruginosa* steht, sollte zunächst durch vergleichende Expressionsanalysen der entsprechenden Gene unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht werden.

1.1. *In silico* Analyse metabolischer Gene

Der anaerobe Energiestoffwechsel in *P. aeruginosa* wird durch das Protein ANR kontrolliert. Als globaler Transkriptionsfaktor und Sauerstoffsensor reguliert ANR die Anpassung verschiedener Stoffwechselwege unter Sauerstoffmangel. Als Ein-Komponenten-System nimmt ANR den Sauerstoffgehalt über den Redoxzustand der Zelle wahr und agiert in Abwesenheit von Sauerstoff als Transkriptionsfaktor. Anhand der Konsensussequenz des Bindemotivs von ANR sollte zunächst nach putativen Bindestellen im Promotorbereich auf Basis der in den vorangegangenen Microarray- und Proteomanalysen differentiell exprimierten Gene gesucht werden. Eine *in silico* Analyse zeigte ein mögliches ANR-Bindemotiv im Promotorbereich folgender Gene (Tab. E.1.): PA4922 (*azu*), PA4847 (*accB*), PA2886 (*atuA*), PA1554 (*cbb₃-1* Oxidase), PA1557 (*cbb₃-2* Oxidase), PA4587 (*ccpR*), PA0105 (*coxB*), PA3161 (*himD*), PA2623

(*icd*), PA2624 (*idh*), PA1587 (*lpdG*), PA1777 (*oprF*) und PA2637 (*nuoA*) aus *P. aeruginosa* PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>).

Tab. E.1. *In silico* Analyse potenziell ANR-regulierter Gene

Gen	Putative ANR-Bindestelle	Region [Bp] stromaufwärts vom ATG	'Fold Change' Microarray ⁸	Funktion
<i>cbb₃-1</i>	TTTTTTAGGGCAA	25	2,80 ↑	Cytochrom Oxidase <i>cbb₃-1</i>
<i>cbb₃-2</i>	TTGATCGGGATCAA	130	1,07 ↑	Cytochrom Oxidase <i>cbb₃-2</i>
<i>ccpR</i>	TGGATCCACGTCAA	70	1,56 ↑	Cytochrom Peroxidase c551
<i>coxB</i>	TTGTTATGTCGCAG	160	0,10 ↓	Cytochrom c Oxidase
<i>nuoA</i>	TTGAAGCCTTGCAA	280	4,80 ↑	NADH-Dehydrogenase
<i>azu</i>	CTGATTCAGGTCAA	70	1,10 ↑	Redox-aktives Protein Azurin
<i>icd</i>	TCGATTCAACCGA	260	2,33 ↑	Isocitratdehydrogenase
<i>idh</i>	TTGAGCGAAGGCAT	60	10,23 ↑	Isocitratdehydrogenase
<i>lpdG</i>	CTGGTGGCGATCAA	110	3,12 ↑	α-Ketoglutaratdehydrogenase
<i>accB</i>	TTGAACAACCTTCAA	30	2,82 ↑	Fettsäure Metabolismus
<i>atuA</i>	TTGTCGGCATTCAAT	130	3,98 ↑	Citronellol Katabolismus
<i>oprF</i>	TTGTTGGACAACCTA	28	1,26 ↑	Nitrat Aufnahme
<i>himD</i>	TTGGACCTGTTCAA	60	1,80 ↑	IHF β-Untereinheit

Die in der putativen Bindestelle rot markierten Basen stimmen mit den an dieser Stelle am häufigsten vorkommenden Basen der ANR-Konsensussequenz überein. Die ANR-Bindestelle befindet sich bei *P. aeruginosa* meist im unmittelbaren Bereich vor dem Startkodon der Transkription. Die dargestellten putativen Bindestellen befinden sich in Übereinstimmung hiermit zwischen 25 bis 280 Bp vor dem Startkodon des jeweiligen Gens. Der 'Fold Change' entspricht der Zunahme der Expression der Gene in den späten Mutatorstämmen M25 und M26 im Vergleich zum frühen Non-Mutatorstamm M1 (Hoboth *et al.*, 2009).

⁸ Hoboth *et al.*, 2009

Für diese Gene kann aufgrund des Vorhandenseins einer putativen ANR-Bindestelle zunächst angenommen werden, dass sie unter sauerstoffarmen Bedingungen durch ANR reguliert und wahrscheinlich verstärkt exprimiert werden. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde mittels Reporterstudien die Expressionshöhe der Gene unter aeroben und anaeroben Bedingungen miteinander verglichen.

Als erstes wurde hierfür exemplarisch der Reporterstamm *P. aeruginosa* PAO1 *picdlacZ* ausgewählt, um die Bedingungen „aerob“ (25 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen) und „anaerob“ (25 ml Medium in 25 ml Schottglasflasche) zu kontrollieren. Mittels einer nicht-invasiven Sauerstoffsonde (Oxy4-mini, Sensortyp PSt3, Fa. Presens, Regensburg) wurde der Sauerstoffgehalt einer wachsenden Bakterienkultur *in vitro* gemessen. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen zeigten Messungen mit der Sauerstoffsonde, dass es bereits innerhalb der ersten zwei Stunden des Wachstums zu einem steilen Abfall der Sauerstoffkonzentration von 18 % auf < 0,03 % (Messgrenze) Sauerstoff kommt. Der Verbrauch des Restsauerstoffs im Medium ändert sich während des anaeroben Bakterienwachstums nicht mehr. Unter aeroben Bedingungen bleibt die Sauerstoffkonzentration nicht konstant, sondern fällt in der exponentiellen Wachstumsphase stetig bis auf < 0,03 % ab und erreicht in der stationären Phase wieder ein Niveau von etwa 18 % Sauerstoff (Abb. E.1.).

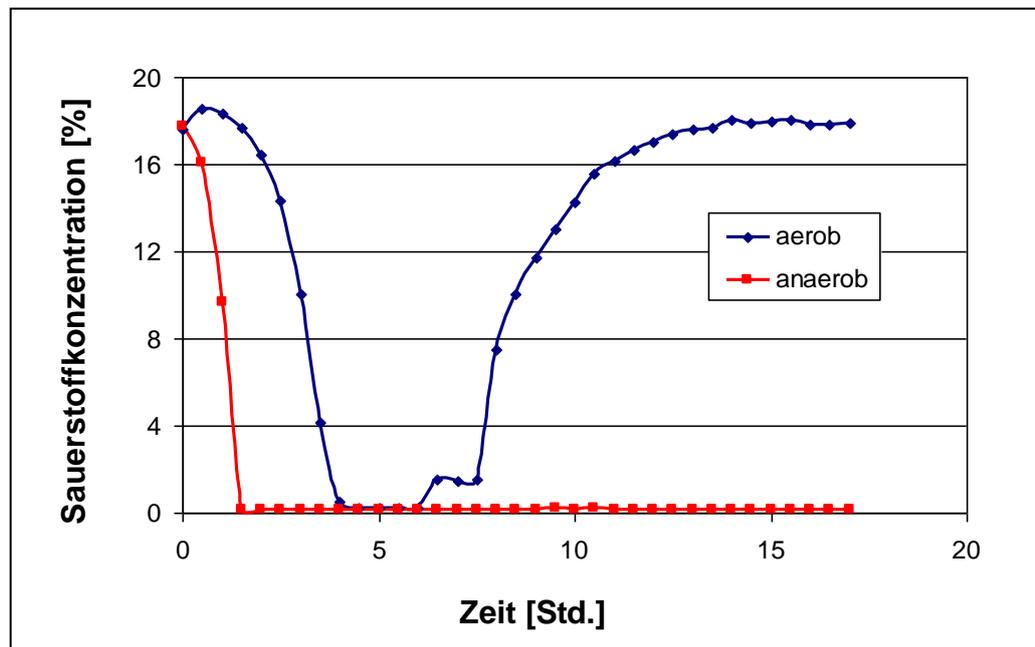


Abb. E.1. Sauerstoffkurven von *P. aeruginosa* PAO1 *picdlacZ* unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen.

1.2. Anaerobe Expression in LB-Medium

Für die Reporterstudien wurden 103-667 Bp lange Bereiche (Tab. E.2.) vor dem Startkodon der Transkription der jeweiligen Gene per PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *KpnI/XbaI* bzw. *XbaI/KpnI* (je nach Leserichtung im PAO1 Genom) in das promotorlose *lacZ*-Reporterplasmid pMP220 kloniert (Abb. E.2., Tab. E.2.).

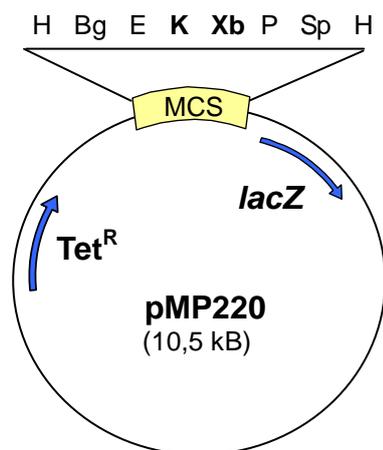


Abb. E.2. Reporterplasmid pMP220 (Spaink *et al.*, 1987)

H: *HindIII*; Bg: *BglII*; E: *EcoRI*; K: *KpnI*; Xb: *XbaI*; P: *PstI*; Sp: *SphI*

Tet^R: Tetrazyklin-Resistenz-Gen; *lacZ*: β -Galaktosidase-Gen

Tab. E.2. Promotorbereiche der zu untersuchenden Gene

Gen	Klonierter Promotorbereich [Bp]	Schnittstellen	Reporterplasmide
<i>accB</i>	227	<i>KpnI/XbaI</i>	paccBlacZ
<i>atuA</i>	130	<i>KpnI/XbaI</i>	patuAlacZ
<i>azu</i>	216	<i>XbaI/KpnI</i>	pazulacZ
<i>cbb₃-1</i>	321	<i>XbaI/KpnI</i>	pcbb ₃ -1lacZ
<i>cbb₃-2</i>	146	<i>XbaI/KpnI</i>	pcbb ₃ -2lacZ
<i>ccpR</i>	246	<i>KpnI/XbaI</i>	pccpRlacZ
<i>coxB</i>	313	<i>KpnI/XbaI</i>	pcoxBlacZ
<i>himD</i>	280	<i>XbaI/KpnI</i>	phimDlacZ
<i>icd</i>	424	<i>XbaI/KpnI</i>	picdlacZ
<i>idh</i>	424	<i>KpnI/XbaI</i>	pidhlacZ
<i>lpdG</i>	247	<i>KpnI/XbaI</i>	plpdGlacZ
<i>oprF</i>	103	<i>KpnI/XbaI</i>	poprFlacZ
<i>nuoA</i>	667	<i>KpnI/XbaI</i>	pnuoAlacZ

Durch eine Sequenzierung der MCS-Region der Reporterplasmide wurde die korrekte Klonierung der Promotorbereiche bestätigt. Anschließend wurden die Plasmide sowie das promotorlose Plasmid pMP220 (Kontrolle) in den Wildtypstamm PAO1 konjugiert. Die Selektion von Transkonjuganten erfolgte über Tetrazyklin-haltige PI-Agarplatten (150 µg/µl). Ob die Transkonjuganten das Reporterplasmid tatsächlich aufgenommen haben, wurde mittels PCR und plasmidspezifischen Primern (pMP220-for bzw. pMP220-rev) überprüft. Für den β-Galaktosidasetest wurden alle Reporterplasmid-positiven Klone der jeweiligen Gene (Tab. E.1.) sowohl in LB-Medium als auch in ASM bei 37 °C und 200 Upm üN angezogen. Zur aeroben Anzucht wurden die Klone in 25 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen und unter anaeroben Bedingungen in 25 ml Medium (+ 50 mM Nitrat) in einer 25 ml Schottglasflasche kultiviert. Nach dem Zellaufschluss wurde die Aktivität der β-Galaktosidase (*lacZ*-Assay) gemessen.

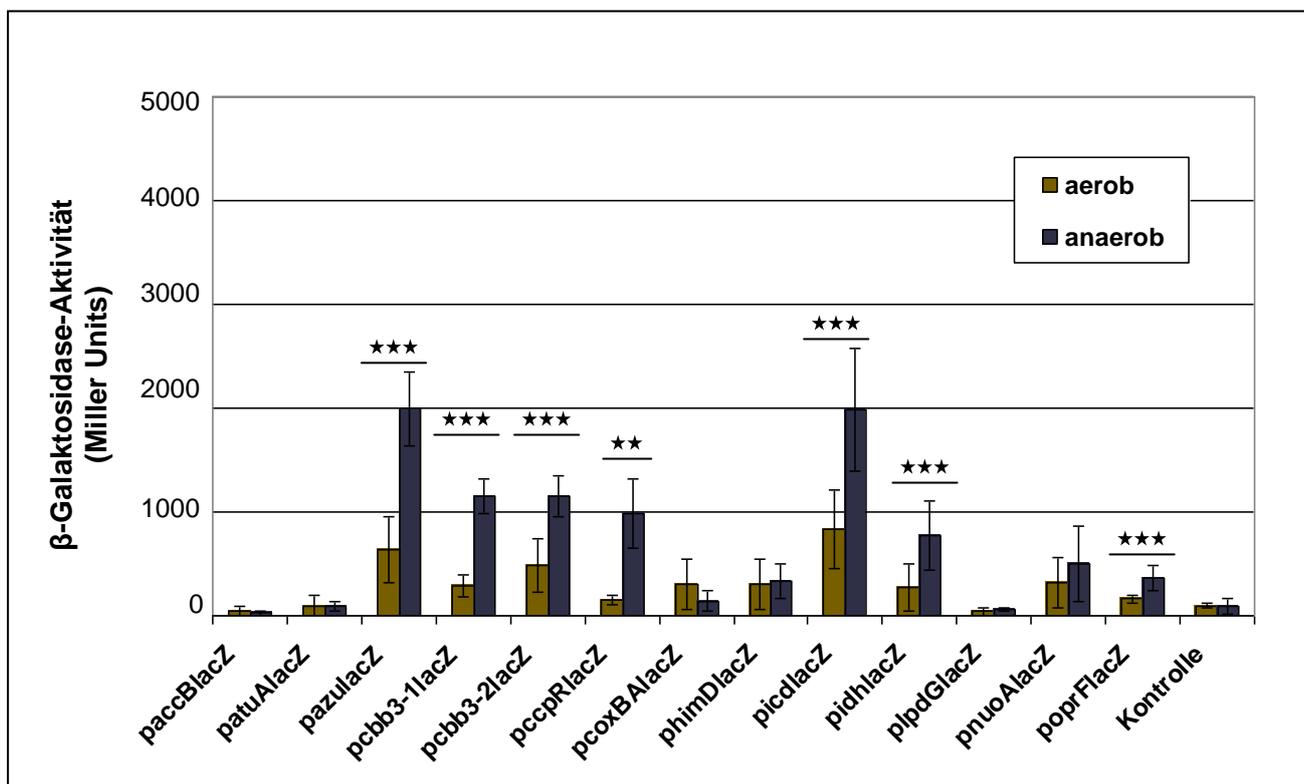


Abb. E.3. β -Galaktosidase-Aktivität in LB-Medium unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen.

Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$, die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

Alle getesteten Reportergergenkonstrukte außer *paccBlacZ*, *patuAlacZ*, *pcoxBlacZ*, *phimDlacZ* und *plpdGlacZ* zeigen unter Sauerstoffausschluss in LB-Medium eine höhere Promotoraktivität als unter aeroben Bedingungen (Abb. E.3.). Für die Gene *accB*, *atuA* und *lpdG* konnte weder aerob noch anaerob eine messbare Expression festgestellt werden. Die Höhe der β -Galaktosidase-Aktivität entspricht lediglich der des promotorlosen Kontrollplasmids pMP220, obwohl durch die Sequenzierungen eine korrekte Klonierung dieser Konstrukte bestätigt werden konnte.

Eine signifikante Zunahme der Expression unter anaeroben Bedingungen konnte für die Gene *azu* ($p \leq 0,001$), *cbb₃-1* ($p \leq 0,001$), *cbb₃-2* ($p \leq 0,001$), *ccpR* ($p \leq 0,01$), *icd* ($p \leq 0,001$), *idh* ($p \leq 0,001$) und *oprF* ($p \leq 0,001$) gezeigt werden. Offenbar spielen diese Gene bei der Anpassung von *P. aeruginosa* an sauerstoffarme Verhältnisse eine Rolle.

1.3. Anaerobe Expression im artifiziellem Sputummedium (ASM)

Das artifizielle Sputummedium soll die Wachstumsbedingungen der CF-Lunge *in vitro* simulieren. Die metabolische Anpassung von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge wird sehr wahrscheinlich nicht allein vom Sauerstoffgehalt im Mukus beeinflusst, sondern hängt auch von dessen speziellen Nährstoffangebot ab. Die Kombination von Sauerstoffmangel und Nährstoffangebot könnte die Expression gerade metabolischer Gene in besonderem Maße beeinflussen. Außerdem ist die Tendenz zur Makrokoloniebildung bzw. zur Bildung Biofilm-ähnlicher Zellaggregate von *P. aeruginosa* in ASM ebenfalls ausgeprägter als in LB-Medium. Daher wurde die Expression der oben genannten Gene in ASM unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen durchgeführt (Abb. E.4.), um eine evtl. Erhöhung der Genexpression im Vergleich zum LB-Medium zu erreichen.

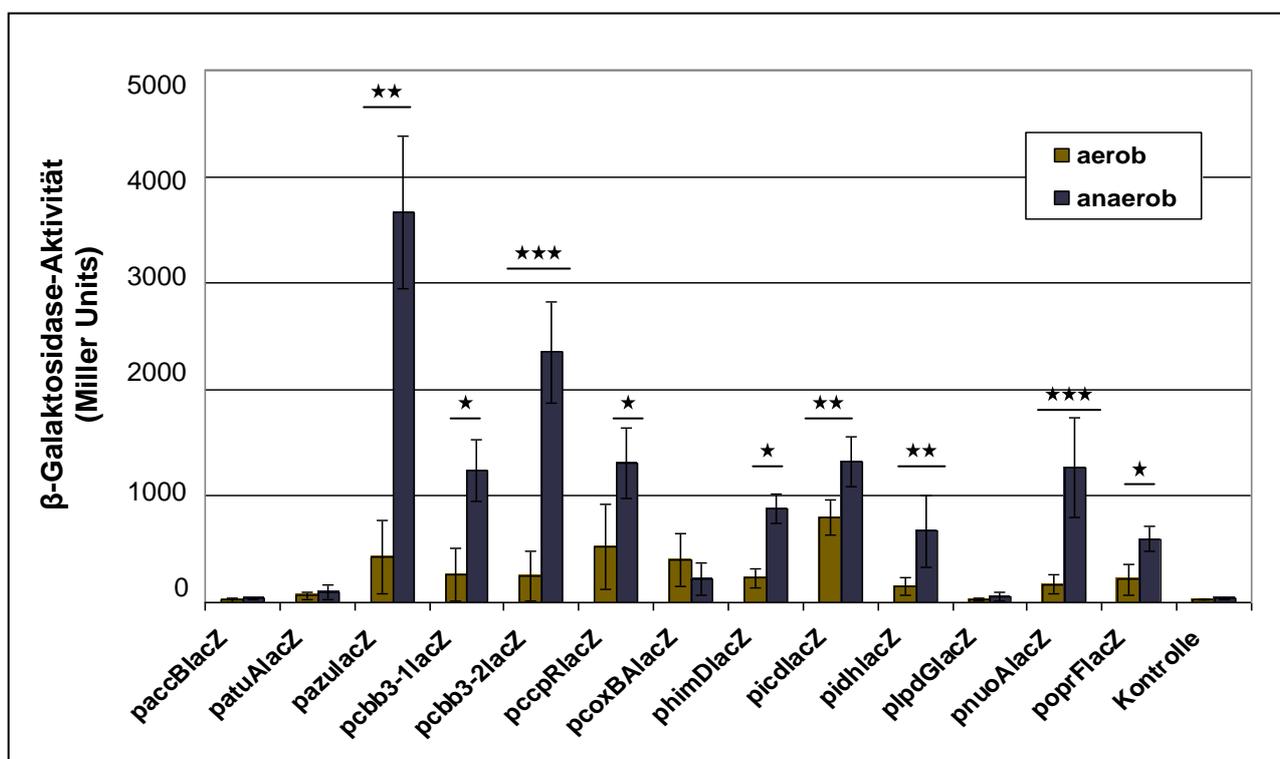


Abb. E.4. β -Galaktosidase-Aktivität in ASM unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen.

Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$, die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

Wie bereits in LB-Medium zeigt sich in ASM ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Genexpression unter anaeroben Bedingungen von *azu* ($p \leq 0,01$), *cbb₃₋₁* ($p \leq 0,05$), *cbb₃₋₂* ($p \leq 0,001$), *ccpR* ($p \leq 0,05$), *icd* ($p \leq 0,01$), *idh* ($p \leq 0,01$) und *oprF* ($p \leq 0,05$), was die

sauerstoffabhängige Regulation dieser Gene bestätigt. Zusätzlich wurden in ASM noch die Gene *himD* ($p \leq 0,05$) und *nuoA* ($p \leq 0,001$) unter anaeroben Bedingungen verstärkt exprimiert. Diese Daten sprechen dafür, dass diese neun Gene an der Anpassung von *P. aeruginosa* an die sauerstoffarmen Bedingungen in der CF-Lunge beteiligt sein dürften. Ob diese Erhöhung der Expression unter Sauerstoffmangel von ANR als zentralem Regulator des anaeroben Stoffwechsels in *P. aeruginosa* abhängt, sollte im Folgenden geklärt werden

2. ANR-abhängige Regulation metabolischer Gene in *P. aeruginosa*

Um die Abhängigkeit der Regulation der betreffenden Gene von ANR zu untersuchen, sollten sog. Gelretardierungsexperimente ('Band Shift Assays') etabliert und durchgeführt werden. Bei einem 'Band Shift' Experiment wird das zu untersuchende Bindeprotein und dessen potentielle DNA-Bindesequenz zusammen gegeben. Als Bindeprotein wird i.d.R. ein aufgereinigtes und rekombinant hergestelltes Protein verwendet. Als DNA-Bindesequenz wird eine synthetisch hergestellte und markierte DNA-Sonde eingesetzt. Bindet das Protein an die DNA, so entsteht ein Protein-DNA-Komplex, der aufgrund seiner Größe in einem nativen Polyacrylamidgel langsamer läuft als die ungebundene DNA-Sonde. Durch den Größenunterschied von Protein-DNA-Komplex und DNA-Sonde alleine erkennt man im Gel zwei unterschiedliche Banden, was als 'Band Shift' bezeichnet wird. Zur Detektion der DNA-Sonde wurde diese am 3'-Ende mit Digoxigenin-Didesoxy-UTP (ddUTP) markiert und über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen.

2.1. Rekombinante ANR-Proteine

Die Herstellung von rekombinanten ANR-Proteinen erfolgte über eine Klonierung in verschiedene Überexpressionsplasmide, die entweder N- oder C-terminal eine Sequenz aus sechs hintereinander liegenden Kodons für die Aminosäure Histidin tragen. Über diesen sog. '6x-Histag' können die in *E. coli* generierten Proteine durch eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Abbildung E.5. zeigt die für die ANR-Überproduktion verwendeten Plasmide.

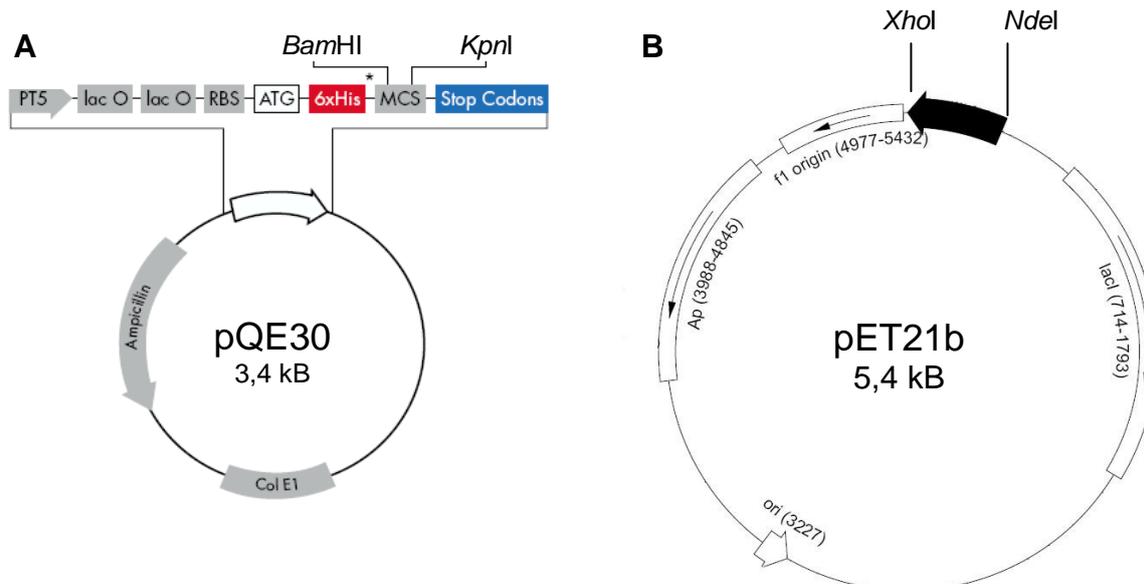


Abb. E.5. Plasmide für die Überproduktion von ANR-Fusionsproteinen

A: pQE30; N-terminaler 6x-Histag (modifiziert nach <http://www.qiagen.com/products/>)

B: pET21b; C-terminaler 6x-Histag (modifiziert nach <http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/>). Schwarzer Pfeil = MCS

Das ANR-Protein fungiert als Sauerstoffsensoren, der bekanntermaßen empfindlich gegenüber einer Exposition mit Sauerstoff ist, d.h. bei Anwesenheit von Sauerstoff liegt ANR in seiner inaktiven monomeren Form vor. Erst unter mikro-aeroben bzw. anaeroben Bedingungen bildet sich über ein Eisen-Schwefel-Zentrum die aktive dimere Form. Die Herstellung von rekombinantem ANR unter anaeroben Bedingungen wäre methodisch sehr aufwendig, weshalb hier ANR unter aeroben Bedingungen in *E. coli* überproduziert und aufgereinigt wurde. Um das Protein in seinen aktiven dimeren Zustand zu überführen, wurde die anschließende Bindereaktion zunächst unter Sauerstoffabschluss durchgeführt, was eine Dimerisierung von ANR *in vitro* aufgrund der anoxischen Bedingungen zur Folge haben sollte. Band Shift Experimente unter diesen Bedingungen waren nicht erfolgreich, weshalb eine alternative Methode gewählt wurde. Durch eine zielgerichtete Mutation sollte ein unter Sauerstoff funktionelles ANR-Protein hergestellt werden. Das Vorgehen wurde bereits bei *E. coli* beschrieben.

In *E. coli* wurde durch eine gezielte Mutagenese des FNR-Proteins die Aminosäure Asparaginsäure an der Stelle 154 durch Alanin ausgetauscht (D154A), was in einer erhöhten Aktivität von FNR unter sauerstoffreichen Bedingungen, einer vermehrten Dimerisierung des FNR-Proteins und einer 40 bis 250-fach erhöhten Affinität zum FNR-Bindemotiv resultierte (Ziegelhoffer und Kiley, 1995). Dieses Vorgehen wurde vor kurzem auch bei *P. putida* angewandt. Experimente mit einem mutagenisierten ANR-Protein (D149A) zeigten die

Funktionalität des Proteins in DNase I Footprinting Assays unter aeroben Bedingungen (Ugidos *et al.*, 2008).

Für die Experimente mit *P. aeruginosa* wurde daher dieselbe Strategie gewählt. Die Aminosäure Asparaginsäure an Stelle 149 des ANR-Proteins aus *P. aeruginosa* PAO1 wurde durch eine zielgerichtete Mutagenese durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Mit Hilfe des sauerstofftoleranten ANR-Proteins können die Band Shift Experimente unter aeroben Bedingungen ausgeführt werden. Es wurden sowohl N-terminal als auch C-terminal mit Histidin markierte und rekombinant hergestellte ANR-Proteine verwendet. Die Wildtyp-Proteine wurden dann wie oben beschrieben mutagenisiert, so dass insgesamt vier Varianten des rekombinanten ANR-Proteins zur Verfügung standen (Abb. E.6.).

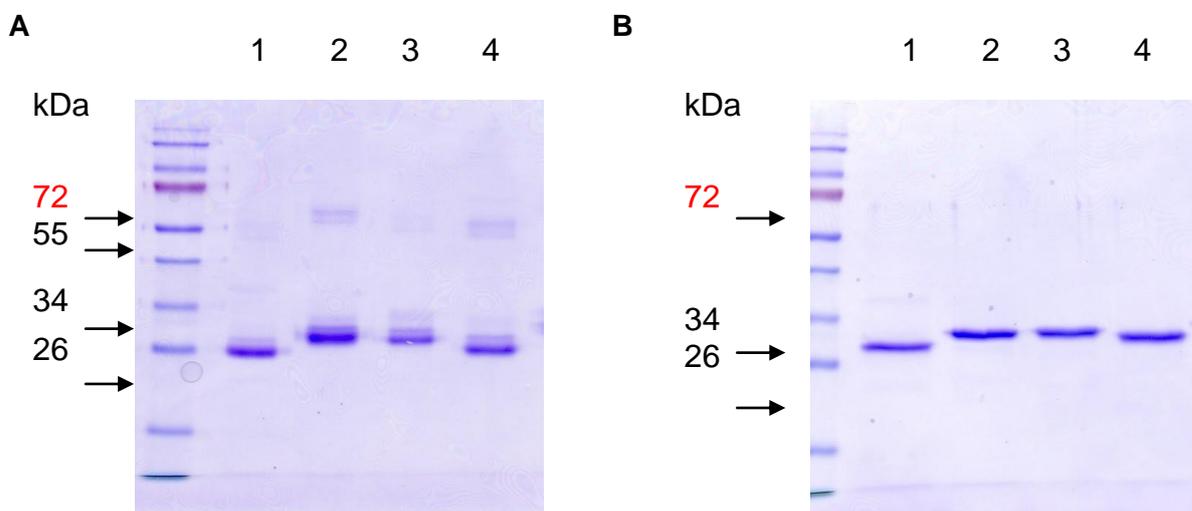


Abb. E.6. ANR-Histag-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel

A: natives Gel (12 %); B: SDS-PAGE (12 %).

Spuren: 1: N-terminale Klonierung, Wildtyp-ANR; 2: N-terminale Klonierung, mutagenisiertes ANR (D149A); 3: C-terminale Klonierung, Wildtyp-ANR; 4: C-terminale Klonierung, mutagenisiertes ANR (D149A). Aufgetragen wurden gereinigte Proteine.

Die N-terminale (His)₆-Variante des ANR-Proteins weist als Monomer eine Masse von 30,2 kDa auf, die C-terminale (His)₆-ANR-Variante beläuft sich auf 28,1 kDa. Die Molekülmassen sind im Vergleich zum „natürlichen“ ANR (27,1 kDa als Monomer) etwas größer, da die jeweiligen Klonierungen die verwendeten Schnittstellen und den 6x-Histag berücksichtigen.

Abbildung E.6., A zeigt ein natives Polyacrylamidgel, welches mit Coomassie angefärbt wurde. Das Gel sowie der Auftragepuffer enthielten keine Detergenzien, um die Proteine in ihrer nativen Form darzustellen. Abbildung E.6., B zeigt ein SDS-Gel mit denselben Proteinen. Die Spuren 2 und 4 beider Abbildungen enthalten jeweils das mutagenisierte ANR-Konstrukt (N-terminale bzw. C-terminale Variante), die Spuren 1 und 3 enthalten die nicht mutagenisierte

Variante.

In Abbildung E.6., A, Spuren 2 und 4 ist jeweils eine zweite Bande oberhalb der Hauptbande (ca. 26-28 kDa) zu sehen, welche in Abbildung E.6., B nicht zu sehen ist. Bei diesen beiden schwach ausgeprägten Banden (ca. 58-60 kDa) handelt es sich vermutlich jeweils um die aktive, dimere Form des ANR-Proteins, da die höheren Banden etwa der doppelten Größe der Hauptbanden entsprechen. Im Vergleich zu den Spuren 1 und 3 (Wildtyp-ANR) sind die Proteine in den Spuren 2 und 4 trotz Mutagenese hauptsächlich als inaktive Monomere zu erkennen. Offensichtlich erfolgt eine Dimerisierung trotz Mutagenese nur zu einem geringen Teil, der größere Proteinanteil verbleibt in der monomeren Form. Obwohl die Proteine in den Spuren 1 und 3 keine Mutagenese tragen, kann man jeweils eine schwache Bande über den Hauptbanden (ca. 26 kDa) sehen, die ebenfalls in etwa die doppelte Größe wie die Hauptbande hat. Im Vergleich zu den Spuren 2 und 4 fällt die Dimerisierung aber geringer aus. Daher ist anzunehmen, dass die Mutation D149A im ANR-Protein von *P. aeruginosa* PAO1 zu einer verstärkten Dimerisierung unter aeroben Verhältnissen führt.

In Abbildung E.6., B ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel dargestellt. Die Reihenfolge der aufgetragenen Proben der Spuren 1-4 entspricht dem des nativen Gels (Abb. E.6., A). Die ANR-Proteine der Spuren 1 und 2 (N-terminale Klonierung, 30,2 kDa) bzw. 3 und 4 (C-terminale Klonierung, 28,1 kDa) unterscheiden sich jeweils nur durch das Vorhandensein der Mutation D149A (Spuren 2 und 4), d.h. die Molekülmassen sind somit nahezu identisch. Trotzdem lässt sich hinsichtlich der Laufeigenschaften ein Unterschied zwischen den einzelnen Konstrukten feststellen.

Die nachfolgenden Band Shift Experimente mit markierten DNA-Sonden der Gene *azu*, *ccpR* und *cbb₃-2* und rekombinanten ANR-Protein (mutagenisiert oder unmutagenisiert) wurden mit dem 'DIG Gel Shift Kit, 2nd generation' der Fa. Roche Applied Science, Mannheim durchgeführt. Das Gen *azu* diente hierbei als Positivkontrolle, da die ANR-abhängige Regulation für dieses Gen bereits beschrieben wurde (Vijgenboom *et al.*, 1997). Auch bei diesem Ansatz und durch Austestung von verschiedenen Variationen der Testbedingungen (z.B. Protein- und Sondenkonzentration, Reaktionstemperatur und -dauer, Salzkonzentration, etc.) war kein Band Shift nachweisbar weder mit der DNA-Sonde von *azu*, *ccpR* oder *cbb₃-2*. Lediglich die Detektionskontrolle [Kontrolloligonukleotid, 39mer und Kontrollprotein Oct2A (Transkriptionsfaktor)] des Kits erbrachte ein positives Ergebnis, was zeigt, dass der Aufbau des Experiments mit dem Kit grundsätzlich funktioniert. Daher wurde nochmals ein neuer experimenteller Ansatz verfolgt, die um die ANR-abhängige Regulation der genannten Gene zu untersuchen.

2.2. Überexpression von *anr* in Reporterstämmen

Hierfür wurde jeweils das Reporterplasmid der zu untersuchenden Gene und ein Überexpressionsplasmid für das ANR-Protein in die Stämme *P. aeruginosa* PAO1 (Wildtyp) und PAO6261 (isogene *anr*-Mutante; Ye *et al.*, 1995) durch Konjugation eingebracht. Die Überexpression von *anr* unter aeroben Bedingungen sollte dann zur Aktivierung ANR-abhängiger Promotoren und einer deutlichen β -Galaktosidasebildung führen. Durch die Anwesenheit von Sauerstoff liegen zwar viele ANR-Proteine als Monomere vor, jedoch kann die Überproduktion von ANR vorhandene Sauerstoffmoleküle wahrscheinlich effizient abfangen. Der verbleibende Rest an ANR-Molekülen könnte dann die entsprechenden Promotorbereiche des Reporterplasmids aktivieren. D.h. bei der Überproduktion von ANR unter sauerstoffreichen Bedingungen sollte sich das Gleichgewicht von Monomer und Dimer zu Gunsten der dimeren Form verschieben und dadurch eine Aktivierung der zu untersuchenden Promotorbereiche ermöglichen.

Als Kontrolle diente ein Stamm, der nur das Reporterplasmid pMP220 ohne Insert enthielt. Vergleichende Experimente unter anaeroben Bedingungen waren nicht möglich, da die *anr*-Mutante ohne Sauerstoff nicht wachsen kann. Die Zunahme der β -Galaktosidase Aktivität lässt keinen Rückschluss darüber zu, ob eine direkte oder indirekte Regulation der untersuchten Gene durch ANR vorliegt. Die Aktivierung eines Reporterplasmids weist jedoch auf eine ANR-abhängige Regulation des jeweiligen Gens hin. Als Überexpressionsplasmid wurde das Plasmid pBBR1MCS verwendet, welches etwa 50 Kopien pro Zelle besitzt. Der plasmideigene T3-Promotor kann in *P. aeruginosa* problemlos abgelesen werden. Späte Mutatorstämme von *P. aeruginosa* zeigen vermehrte anaerobe Stoffwechselreaktionen und auch eine Überexpression von *anr* (Hoboth *et al.*, 2009), was den Mechanismus der anaeroben Anpassung von CF-Isolaten erklären könnte. Die Expression von *anr* war in den späten Mutatorstämmen M25 bzw. M26 im Vergleich zum frühen Non-Mutatorstamm M1 um das ca. sechsfache erhöht (Hoboth *et al.*, 2009). Eine zu starke Überexpression von *anr* in den geplanten Experimenten sollte durch die geringe Kopienzahl des Plasmids pBBR1MCS vermieden werden, um die *in vivo* Situation in der Bakterienzelle so genau wie möglich zu simulieren.

Neben dem plasmideigenen Promotor wurden 420 Bp vor dem Startkodon des *anr*-Gens mit in das Überexpressionsplasmid kloniert, um regulatorische Sequenzen mit einzubeziehen und eine gesicherte Expression von *anr* zu erzielen. Abbildung E.7. stellt anschaulich die gewählte Strategie zur Überprüfung der ANR-abhängigen Regulation dar.

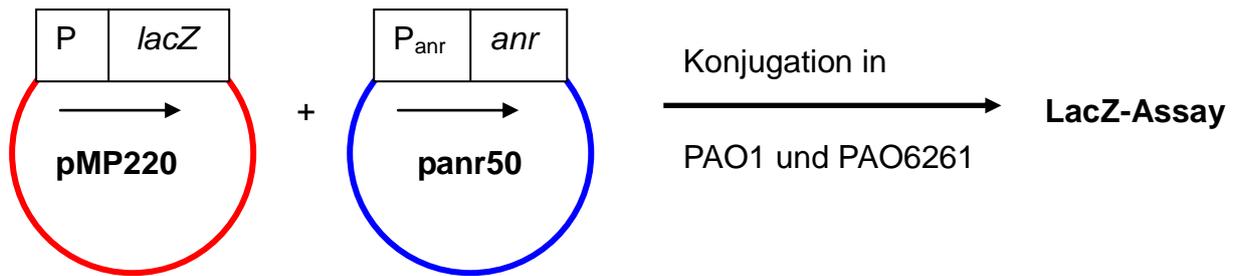


Abb. E.7. Vorgehen zur Untersuchung der ANR-abhängigen Regulation

P: zu testender Promotorbereich; P_{anr}: Promotorbereich (420 Bp) des *anr*-Gens; *lacZ*: β-Galaktosidase-Gen; pMP220: Reporterplasmid; pBBR1MCS: Überexpressionsplasmid; PAO1: Wildtypstamm; PAO6261 isogene *anr*-Mutante von PAO1.

Die folgenden LacZ-Experimente wurden in 25 ml LB-Medium und 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter aeroben Standardbedingungen (37 °C, 200 Upm, Inkubation üN) durchgeführt. Für diese Experimente wurden diejenigen Reporterstämme ausgewählt, die eine erhöhte Expression unter anaeroben Bedingungen gezeigt hatten (*azu*, *cbb₃-1*, *cbb₃-2*, *ccpR*, *himD*, *icd*, *idh*, *nuoA*, *oprF*). Zunächst wurde das Reporterplasmid des *azu*-Gens (*pazulacZ*), dessen ANR-abhängige Regulation bekannt ist, verwendet. Damit sollte die gewählte Strategie zunächst auf ihre Funktionalität getestet werden (Abb. E.8.).

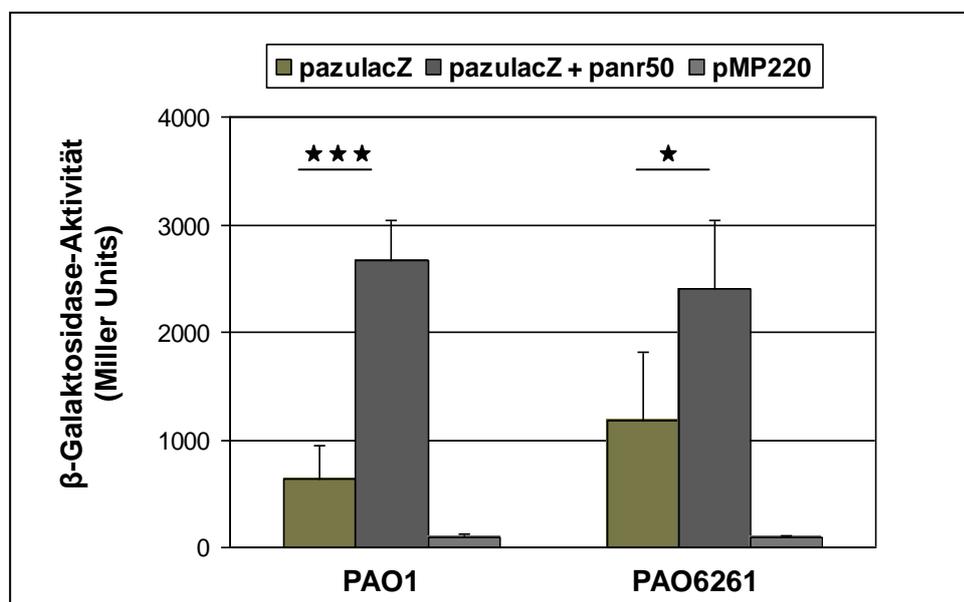


Abb. E.8. ANR-abhängige Regulation des *azu*-Gens unter aeroben Wachstumsbedingungen.

Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$, die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

Unter aeroben Bedingungen ist eine Promotoraktivität des *azu*-Gens sowohl im Wildtyp-Stamm PAO1 als auch in der isogenen *anr*-Mutante PAO6261 nachweisbar (Abb. E.8., gelbe Säulen), wobei diese in der Mutante etwas höher ausfällt als im Wildtyp. Da in der Mutante kein ANR-Protein vorhanden ist, deutet die Aktivierung des *azu*-Promotors auf einen ANR-unabhängigen Effekt durch andere Transkriptionsfaktoren bestimmt sein kann (z.B. durch RpoS, Vijgenboom *et al.*, 1997). Durch das Einbringen des Überexpressionsplasmids konnte die Promotoraktivität des *azu*-Gens im Wildtyp und in der Mutante signifikant gesteigert werden (Abb. E.8., graue Säulen). Die vermehrte Expression des *azu*-Gens resultiert aus einer gesteigerten ANR-Produktion über das Expressionsplasmid panr50. Wie in der Literatur beschrieben, wird das *azu*-Gen durch das ANR-Protein reguliert, was in diesem Experiment nochmals belegt werden konnte. Somit ist sichergestellt, dass die gewählte Strategie zur Überprüfung der ANR-abhängigen Regulation der betreffenden Promotorbereiche funktioniert.

Von den getesteten Reporterstämmen der Gene *cbb₃-1*, *cbb₃-2*, *ccpR*, *himD*, *icd*, *idh*, *nuoA* und *oprF* konnten drei weitere als ANR-abhängig identifiziert werden (Abb. E.9., A, B, C). Das Kontrollplasmid pMP220 zeigte wie zu erwarten zu keiner Zeit eine relevante β -Galaktosidase-Aktivität.

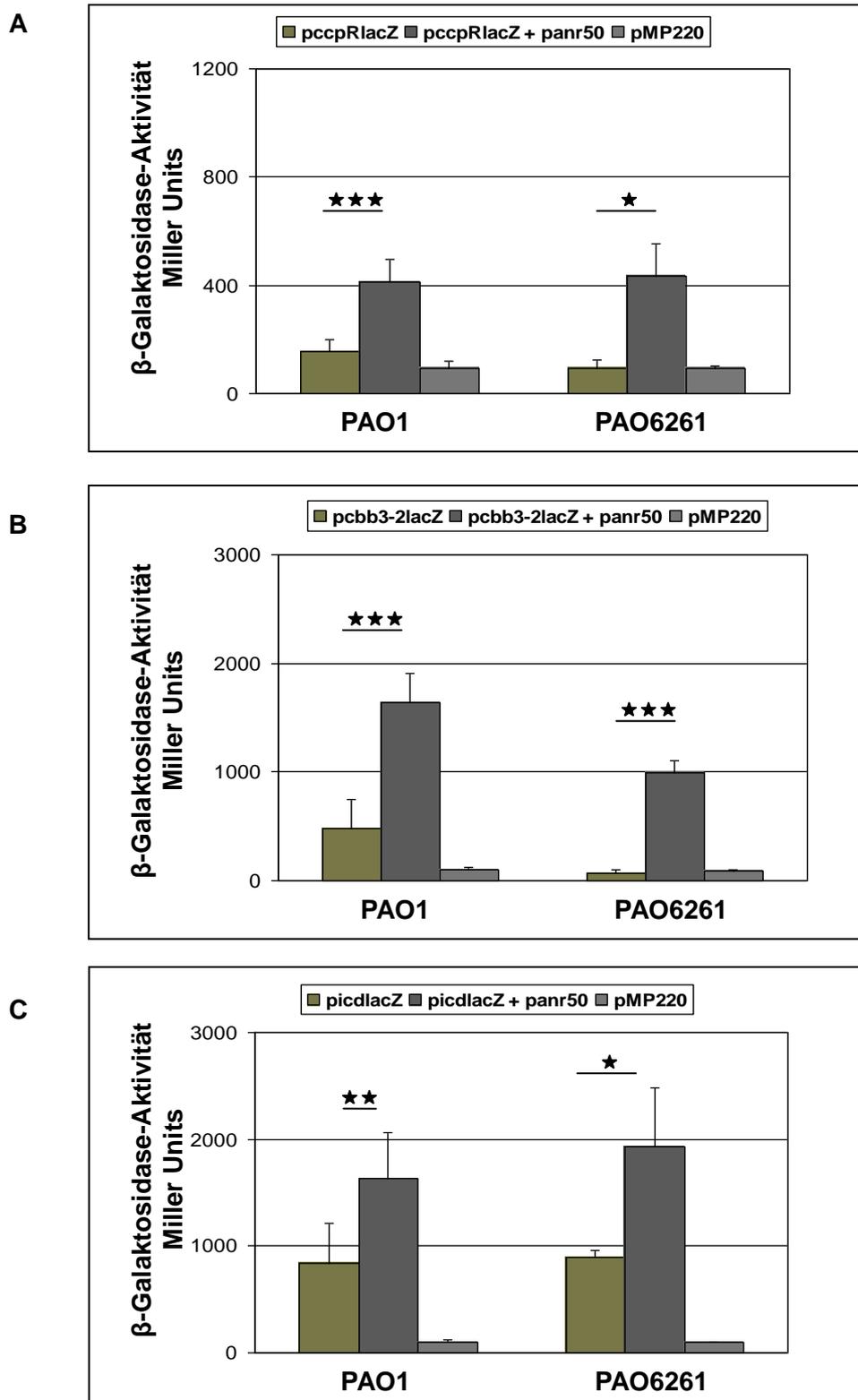


Abb. E.9. ANR-abhängige Regulation der Gene *ccpR* (A), *cbb₃-2* (B) und *icd* (C) unter aeroben Wachstumsbedingungen.

Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$, die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

Das *ccpR*-Gen kann als weitere Positivkontrolle gewertet werden, da auch hier die ANR-abhängige Regulation bereits beschrieben wurde (Trunk *et al.*, 2010). Die Aktivität des *ccpR*-Promotorbereichs im Reporterstamm liegt nur geringfügig über der des Kontrollplasmids pMP220 (Abb. E.9., A, gelbe Säulen). Daraus lässt sich schließen, dass unter den gewählten Bedingungen keine nennenswerte Expression bzw. positive Regulation von *ccpR* vorliegt. Erst durch einen ANR-Überschuss steigt die Promotoraktivität des *ccpR*-Gens deutlich an (Abb. E.9., B, graue Säulen). Offenbar ist die *ccpR* Expression unter aeroben Versuchsbedingungen vernachlässigbar gering und wird erst unter anaeroben Bedingungen durch ANR kontrolliert. Eine Regulation durch einen anderen Transkriptionsfaktor scheint diesen Daten zur Folge keine nennenswerte Rolle zu spielen. Die Expression des *azu*-Gens hingegen wird auch durch einen anderen Faktor beeinflusst und bereits unter aeroben Bedingungen exprimiert.

Über die *cbb₃*-Oxidasen aus *P. aeruginosa* PAO1 ist bisher wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass die *cbb₃-2* Oxidase bei sauerstoffarmen Bedingungen eine Rolle spielt (Comolli und Donohue, 2004). Die Promotoraktivität des Konstruktes *cbb₃-2lacZ* ist unter aeroben Bedingungen in der *anr*-Mutante mit der des Leerplasmids pMP220 vergleichbar, im Wildtyp PAO1 scheint eine geringfügige Expression vorzuliegen.

Gemessen an der relativ hohen Standardabweichung im Falle von PAO1 liegt für das *cbb₃-2*-Gen unter diesen Bedingungen im Vergleich zum Leerplasmid keine statistisch signifikante Expression vor (Abb. E.9., B, gelbe Säulen). Eine ANR-abhängige Regulation des *cbb₃-2*-Gens zeigt sich eindeutig durch die deutliche Zunahme der Reporteraktivität bei gleichzeitiger Überexpression des *anr*-Gens, d.h. sowohl das Reporterplasmid als auch das Überexpressionsplasmid wurden in den Wildtyp PAO1 bzw. in die isogene *anr*-Mutante konjugiert. Der Anstieg des Expressionssignals in Gegenwart erhöhter ANR-Konzentration ist für beide Stämme mit $p \leq 0,001$ hoch signifikant (Abb. E.9., B, graue Säulen).

In ähnlicher Weise stellen sich die Ergebnisse für das *icd*-Gen dar. Unter aeroben Bedingungen ist die Promotoraktivität des *icd*-Gens im Wildtyp und der *anr*-Mutante im Vergleich zum Kontrollplasmid pMP220 deutlich erhöht (Abb. E.9., C, gelbe Säulen). Dies zeigt eine Expression des *icd*-Gens unter den Versuchsbedingungen an und spricht für eine positive Regulation in Abhängigkeit weiterer Umweltsignale außer Sauerstoff alleine. Bei einer Überproduktion von ANR-Protein ist ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,01$ im Wildtyp; $p \leq 0,05$ in der *anr*-Mutante) zu den jeweiligen Reporterstämmen erkennbar, d.h. das *icd*-Gen ist direkt oder indirekt ANR-abhängig reguliert (Abb. E.9., C, graue Säulen). Interessanterweise konnte nur für das Gen der Isocitratdehydrogenase *icd* die Regulation durch ANR gezeigt werden. Das *idh*-Gen dagegen scheint nicht durch ANR beeinflusst zu sein (Abb. E.10.).

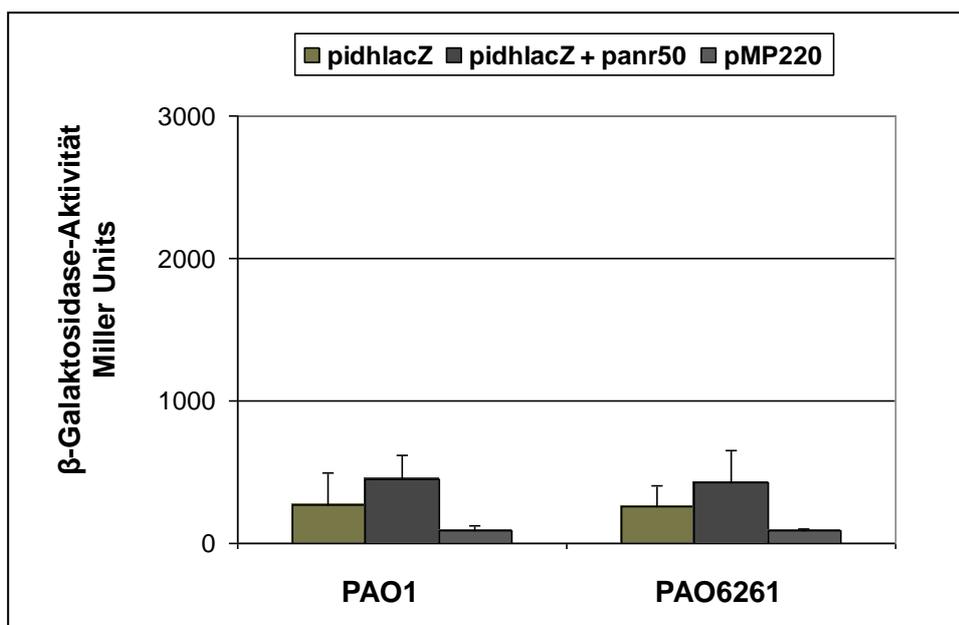


Abb. E.10. Reporteraktivität des *idh*-Gens unter ANR-Überproduktion

Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

Unter aeroben Bedingungen ist der Promotorbereich des *idh*-Gens sowohl im Wildtyp PAO1 als auch in der *anr*-Mutante PAO6261 nur geringfügig exprimiert (Abb. E.10., gelbe Säulen). Im Gegensatz zum *icd*-Gen steigt die Expression von *idh* bei einer Überproduktion von ANR nicht signifikant an, d.h. das *idh*-Gen ist nicht direkt oder indirekt von ANR reguliert (Abb. E.10., graue Säulen). Ähnliche Ergebnisse waren bei den übrigen getesteten Reporterkonstrukten *pcbb₃-1lacZ*, *phimDlacZ*, *pnuoAlacZ* und *poprFlacZ* zu sehen, d.h. auch diese genannten Konstrukte sind nicht ANR-abhängig reguliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression sowohl der Gene *azu* und *ccpR*, als auch *icd* und *cbb₃-2* von ANR direkt oder indirekt reguliert werden. Die Daten zeigen auch, dass die Gene *azu* und *icd* sehr wahrscheinlich in ihrer aeroben Expression durch andere Transkriptionsfaktoren als von ANR allein beeinflusst werden. Für die Konstrukte *pcbb₃-1lacZ*, *phimDlacZ*, *pnuoAlacZ* und *poprFlacZ* konnte keine signifikant höhere Expression unter Überproduktion von ANR erreicht werden, d.h. diese Gene sind höchstwahrscheinlich nicht durch ANR reguliert.

2.3. Autoregulation des ANR-Proteins

Für das *fnr* Gen von *E. coli* wurde experimentell eine negative Genregulation unter anaeroben Bedingungen gezeigt, d.h. unter Sauerstoffabschluss bindet das FNR-Protein an den eigenen Promotor und verringert die Expression. Ein entsprechendes FNR-Bindemotiv konnte im *fnr*

Promotor identifiziert werden. Unter aeroben Bedingungen liegt bei FNR keine derartige Regulation vor (Spiro und Guest, 1987). Da sich FNR- und ANR-Protein ähneln (53 % Ähnlichkeit auf Proteinebene, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), könnte die ANR-abhängige Expression der Gene *azu*, *ccpR*, *cbb₃-2* und *icd* in den voran gegangenen Experimenten von einer ANR-Autoregulation überlagert sein. Schwach ANR-abhängige Promotoren könnten somit nur schwer zu erfassen sein. Bisher wurde eine eindeutige Autoregulation von ANR in *P. aeruginosa* nicht beschrieben. Um die Möglichkeit eines positiven oder negativen autoregulatorischen Effekts des *anr*-Gens durch ANR zu untersuchen, wurde auch der Promotorbereich des *anr*-Gens in das Reporterplasmid pMP220 kloniert und entsprechend den voran gegangenen Experimenten (Kapitel E., 2.2.) im Wildtypstamm PAO1 und in der isogenen *anr*-Mutante PAO6261 untersucht (Abb. E.11.). Die Stämme wurden μ N aerob in 25 ml LB-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37 °C und 200 Upm inkubiert.

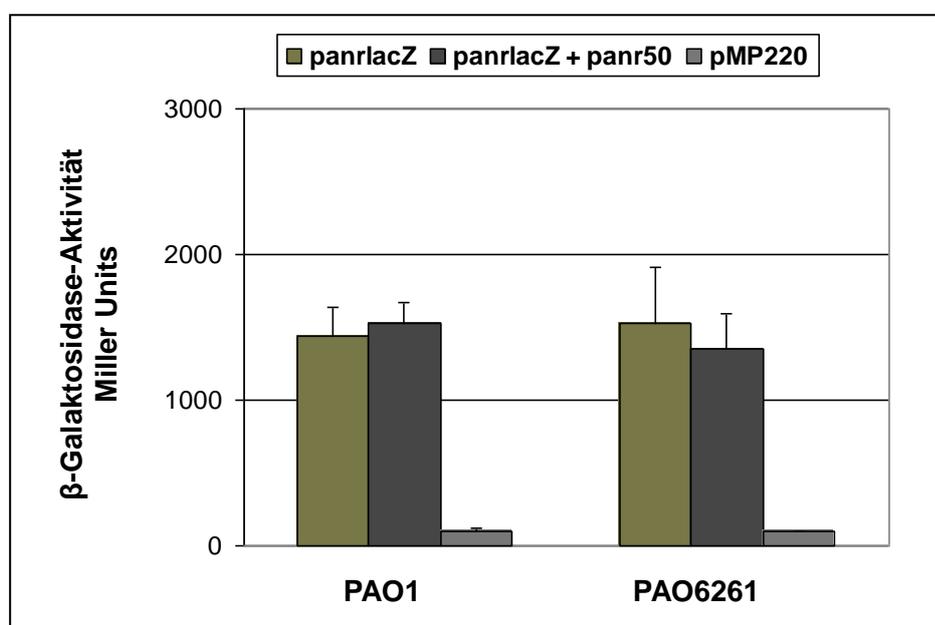


Abb. E.11. Aerobe Promotoraktivität des *anr*-Gens im Wildtyp PAO1 und der isogenen *anr*-Mutante PAO6261.

Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

Sowohl im Wildtyp als auch in der *anr*-Mutante ist die Expression von *anr* unter aeroben Bedingungen deutlich gegeben (Abb. E.11., gelbe Säulen), vermutlich liegt hier eine konstitutive Expression des *anr*-Gens vor. Andererseits kann vermutet werden, dass das *anr*-Gen möglicherweise durch andere Transkriptionsfaktoren unter aeroben Bedingungen reguliert wird. Im Gegensatz zu den ANR-abhängigen Genen *azu*, *ccpR*, *cbb₃-2* und *icd* ist das *anr*-Gen nicht durch das ANR-Protein beeinflussbar. Durch die Überexpression entsteht keine signifikante Zunahme der Promotoraktivität, weder im Wildtyp, noch in der *anr*-Mutante (Abb. E.11., graue Säulen). Dies scheint ein Indiz für die ANR-Unabhängigkeit des *anr*-Promotors zu sein. Somit

liegt unter aeroben Bedingungen keine Autoregulation des *anr*-Gens vor. Damit kann davon ausgegangen werden, dass unter den getesteten Bedingungen die Gene *azu*, *ccpR*, *ccb₃-2* und *icd* von ANR direkt oder indirekt reguliert werden.

Da bei *E. coli* die negative Autoregulation von FNR erst unter anaeroben Bedingungen greift (Spiro und Guest, 1987), sollte geklärt werden, ob dies bei *P. aeruginosa* auch vorliegen könnte. Durch den Sauerstoffmangel und die Überexpression könnte bei einer Autoregulation die Promotoraktivität von *anr* im Vergleich zu aeroben Bedingungen gesteigert werden. Hierfür wurden Wildtyp-Klone mit dem Reporterkonstrukt *panlacZ* sowie dem Überexpressionskonstrukt *panlacZ+panr50* unter anaeroben Bedingungen angezüchtet (Abb. E.12.). Beide Stämme wurden in 25 ml LB-Medium in einer 25 ml Schottglasflasche mit 50 mM Nitrat üN bei 37 °C und 200 Upm kultiviert. Die Expressionsstudien unter anaeroben Bedingungen konnten nur mit dem Wildtypstamm PAO1 durchgeführt werden. Da ANR die Gene der Denitrifikation reguliert, kann die *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen nicht wachsen. Somit sind Experimente unter anaeroben Bedingungen und unter Einsatz von Nitrat als alternativer Elektronenrezeptor nur im Wildtypstamm möglich.

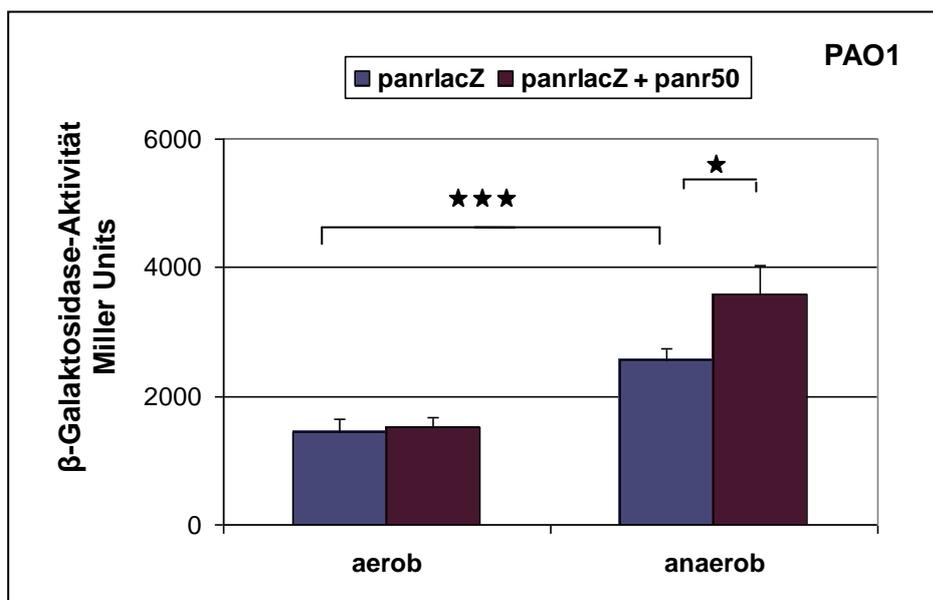


Abb. E.12. Positive Autoregulation des *anr*-Gens unter anaeroben Wachstumsbedingungen in *P. aeruginosa* PAO1

Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

*** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$, die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

Unter aeroben Bedingungen ist eine Promotoraktivität des *anr*-Gens gegeben, sowohl im Reporterstamm (*panlacZ*) als auch im Überexpressionsstamm (*panlacZ + panr50*). Wie bereits oben erwähnt, kann somit eine positive Autoregulation nahezu ausgeschlossen werden.

Dagegen erhöht sich die Promotoraktivität unter Sauerstoffmangel deutlich: (i) Die Aktivität im Reporterstamm nimmt unter Sauerstoffmangel signifikant zu ($p \leq 0,001$) (Abb. E.12., blaue Säulen), (ii) die Aktivität lässt sich durch eine Überexpression von *anr* nochmals signifikant steigern ($p \leq 0,05$) (Abb. E.12., blaue Säule vs. violette Säule, anaerob). Das bedeutet zum einen, dass die Transkription des *anr*-Gens unter anaeroben Bedingungen deutlich erhöht wird und zum anderen, dass das ANR-Protein im Gegensatz zum FNR-Protein einen offensichtlich positiven Effekt auf seinen eigenen Promotor ausübt.

Insgesamt zeigen diese Daten unter anaeroben Bedingungen eine erhöhte Aktivität des *anr*-Promotors sowie eine positive Autoregulation des *anr*-Gens durch das ANR-Protein. Bei Sauerstoffanwesenheit scheint das *anr*-Gen konstitutiv exprimiert zu sein, eine Autoregulation liegt dann nicht vor.

3. Charakterisierung und Regulation der Isocitratdehydrogenase Isoenzyme ICD und IDH in *P. aeruginosa*

3.1. Mikrobielle Isocitratdehydrogenasen

Die Isocitratdehydrogenase ist ein zentrales Schlüsselenzym im Metabolismus, denn es katalysiert die Reaktion von Isocitrat über Oxalsuccinat zu α -Ketoglutarat (Abb. E.13.) in einer Redoxreaktion unter Entstehung von NAD(P)H und CO_2 . Damit ist das Enzym ein wichtiger Lieferant für Reduktionsäquivalente. Es kontrolliert den metabolischen Kohlenstofffluss zwischen dem Zitronensäurezyklus und dem Glyoxylat-Shunt. Im Prokaryoten existiert die Isocitratdehydrogenase in zwei Formen, als Monomer von etwa 80 kDa und/oder als Dimer von etwa 45 kDa je Untereinheit. Auf Aminosäureebene gibt es zwischen beiden Enzymen kaum Gemeinsamkeiten. Die meisten Bakterien besitzen nur eine Form des Enzyms, entweder die ICD (Dimer) oder IDH (Monomer). Es gibt jedoch einige Bakterienarten, die beide Isoenzyme besitzen, dazu gehört auch *P. aeruginosa*.

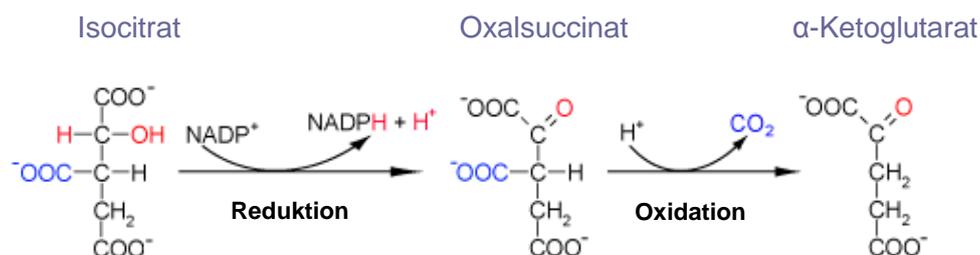


Abb. E.13. Reaktion der Isocitratdehydrogenase

(Grafik modifiziert nach <http://www.chemgapedia.de>)

Interessanterweise sind die Gene für die Isocitratdehydrogenase (*icd* = Dimer; *idh* = Monomer) im *P. aeruginosa* PAO1 Genom hintereinander, aber in entgegengesetzter Leserichtung angeordnet (Abb. E.14.). Der intergenische Bereich umfasst 358 Bp und enthält regulatorische Sequenzen und Bindungsmotive. Für andere Bakterienspezies konnte bereits experimentell der Nutzen bzw. die unterschiedliche Funktion beider Isoenzymen gezeigt werden: die IDH-I (Dimer) von *Colwellia maris* ist ein mesophiles Enzym, wohingegen die IDH-II (Monomer) sehr instabil bei Temperaturen über 25 °C ist (Ochiai *et al.*, 1979; 1984). Die Expression der IDH-I hängt von Acetat ab, die Expression der IDH-II wird bei niedrigen Temperaturen induziert (Suzuki *et al.*, 1995). Über die Funktionen der Isocitratdehydrogenase Isoenzyme in *P. aeruginosa* existieren kaum experimentelle Untersuchungen.

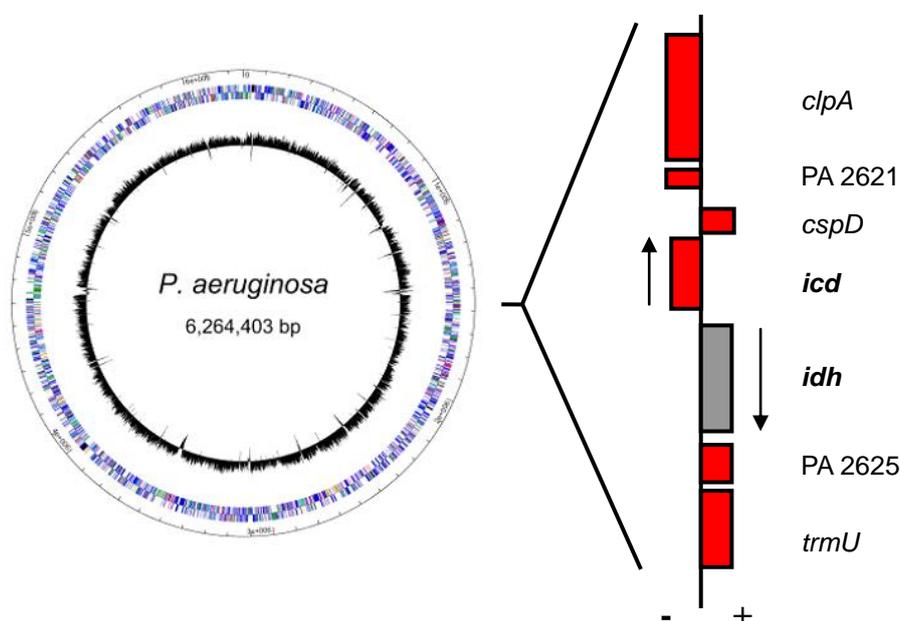


Abb. E.14. Anordnung der Gene *icd* und *idh* für die Isocitratdehydrogenase Isoenzyme im *P. aeruginosa* PAO1 Genom mit benachbarten Genen und Angabe der Transkriptionsrichtung

(modifiziert nach <http://www.pseudomonas.com>)

Nach Angabe der *Pseudomonas* Datenbank (<http://www.pseudomonas.com>) ist das ICD-Enzym im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen die Lokalisation des IDH-Enzyms als „unbekannt“ angegeben wird. Sowohl das ICD- als auch das IDH-Enzym weisen keine Signalsequenz für eine Sekretion auf (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), so dass offenbar beide Proteine im Zytoplasma lokalisiert sind.

3.2. Sequenzvergleiche und Konservierung der Isocitratdehydrogenase

Sequenzvergleiche des *icd*- bzw. *idh*-Gens ergaben erwartungsgemäß eine relativ hohe Homologie zu anderen Bakterienarten (Tab. E.3. bzw. E.4.). Dies zeigt die starke Konservierung der beiden Gene. Das *icd*-Gen ist u.a. sehr verwandt mit dem *icd*-Gen aus *Thioalkalivibrio* spp., *Ralstonia* spp. und auch Enterobakterien wie *Citrobacter* spp. und *Escherichia* spp. (Tab. E.3.). Das *idh*-Gen von *P. aeruginosa* weist hohe Homologie zum *idh*-Gen von *Thioalkalivibrio* spp., *Burkholderia* spp. und *Mycobacterium* spp. auf (Tab. E.4.).

Tab. E.3. Sequenzvergleiche⁹ des *icd*-Gens von *P. aeruginosa* PAO1 mit Isocitratdehydrogenasen anderer Bakterienarten

Homologie	Bakterienart
81 %	<i>Thioalkalivibrio</i> sp.
79 %	<i>Ralstonia eutropha</i> , <i>Leptothrix choldonii</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>B. pertussis</i>
78 %	<i>Allochromatium vinosum</i>
77 %	<i>Thiobacillus denitrificans</i> , <i>Citrobacter rodentium</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Serratia proteamaculans</i>
74 %	<i>E. coli</i> K12 (ICD Enzym)

⁹ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Tab. E.4. Sequenzvergleiche¹⁰ des *idh*-Gens von *P. aeruginosa* PAO1 mit Isocitratdehydrogenasen anderer Bakterienarten

Homologie	Bakterienart
77 %	<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> , <i>Ralstonia eutropha</i>
76 %	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Azoarcus</i> spp.
74 %	<i>Burkholderia</i> spp.
73 %	<i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. Tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> <i>Stenotrophomonas maltophila</i>
72 %	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>C. diphtheriae</i>

3.3. Kofaktor-Abhängigkeit

In der Literatur sind zwei Formen von unterschiedlichen Isocitratdehydrogenasen bei Prokaryoten beschrieben, je nachdem ob NAD^+ (EC 1.1.1.41) oder NADP^+ (EC 1.1.1.42) als Kofaktor fungiert (<http://www.brenda-enzymes.org>). Über die Kofaktor-Abhängigkeit der Isoenzyme in *P. aeruginosa* ist bisher nichts bekannt. Um die spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenasen in *P. aeruginosa* erfassen zu können, sollte ein Enzymtest etabliert und durchgeführt werden. Hierfür ist die Zugabe des Kofaktors notwendig. Je nach Abhängigkeit von NAD^+ bzw. NADP^+ erfolgt die Umsetzung zu NADH bzw. NADPH . Im oxidierten Zustand hat der Nicotinamidring ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Nach Reduktion des Nicotinamidrings absorbiert dieser das Licht bei 340 nm, so dass die Umsetzung zum reduzierten Molekül bei dieser Wellenlänge photometrisch gemessen werden kann. Die Enzymtests wurden mit geeigneten Verdünnungen an Zellextrakt, Isocitrat, Mangansulfat und NAD^+ bzw. NADP^+ durchgeführt (Abb. E.15.).

¹⁰ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

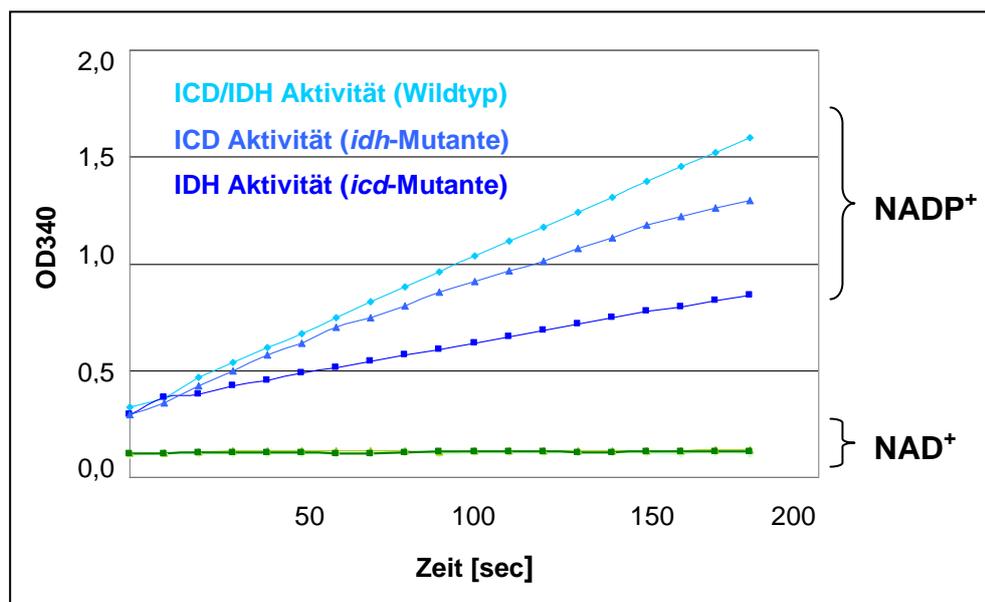


Abb. E.15. Kofaktor-Abhängigkeit der Isocitratdehydrogenasen von *P. aeruginosa* Zelllysaten

Blau: NADP⁺; grün: NAD⁺. Eingesetzte Stämme: PA14 (Wildtypstamm), Tn::icd (Transposoninsertionsmutante von *icd*), Tn::idh (Transposoninsertionsmutante von *idh*).

Getestet wurden die Stämme *P. aeruginosa* PA14 (Wildtypstamm), Tn::icd (*icd*-Transposonmutante) und Tn::idh (*idh*-Transposonmutante), die unter aeroben Bedingungen in 25 ml LB-Medium unter Standardbedingungen (37 °C, 200 Upm) angezogen wurden (siehe Kapitel D, 5.3.). Im Wildtypstamm ist die höchste Umsetzung von NADP⁺ zu NADPH zu beobachten (Abb. E.15., hellblaue Linie). Dies erklärt sich dadurch, dass im Wildtypstamm beide Enzyme aktiv sind, eine Unterscheidung zwischen ICD und IDH ist deshalb nicht möglich. Durch den Einsatz von Mutanten konnte die Aktivität des ICD- (*idh*-Transposonmutante) bzw. IDH-Enzyms (*icd*-Transposonmutante) getrennt dargestellt werden. Auffallend ist die deutlich höhere Aktivität der ICD unter den getesteten Bedingungen im Vergleich zur IDH (Abb. E.15., mittel- bzw. dunkelblaue Linien). Die Summe der Aktivitäten beider Mutanten bzw. der einzelnen Isocitratdehydrogenasen spiegeln in etwa die Gesamtaktivität beider Isocitratdehydrogenasen im Wildtypstamm PA14 wieder.

Unter Verwendung von NAD⁺ als Kofaktor ergab sich interessanterweise zu keinem Zeitpunkt und in keinem der untersuchten Stämme eine messbare Umsetzung zu NADH (Abb. E.15., grüne Markierungen). Somit ist die strikte NADP⁺-Abhängigkeit beider Isocitratdehydrogenase-Enzyme ICD und IDH in *P. aeruginosa* experimentell bewiesen.

3.4. Regulation der Isocitratdehydrogenasen

3.4.1. Wachstumsphasenabhängige Regulation

In *P. aeruginosa* werden viele Gene in Abhängigkeit der Zelldichte bzw. der Wachstumsphase exprimiert. Gerade für Enzyme des intermediären Metabolismus ist dies sinnvoll, um die generierte Energie effektiv nutzen zu können. Bisher ist in *P. aeruginosa* über beide Isocitratdehydrogenasen, insbesondere über die Regulation, wenig bekannt. Bei Vorhandensein zweier Isoenzyme könnte eine unterschiedliche Regulation der Gene als auch der Enzymaktivität einen Vorteil bringen. Um zunächst einen Überblick über die spezifische Aktivität beider Enzyme zu bekommen, wurde die Aktivität im Verlauf der Wachstumskurve unter aeroben (Abb. E.16.) und anaeroben (Abb. E.17.) Bedingungen von zwei Isocitratdehydrogenase-Mutanten bestimmt. Hierfür wurden die Stämme *P. aeruginosa* PA14 Tn::icd und Tn::idh in 25 ml LB-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen angezüchtet. Der Wachstumsverlauf wurde durch Messung der Bakterienkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm abgebildet. Die spezifische Enzymaktivität wurde ab der vierten Stunde nach Inokulation jede Stunde bestimmt (siehe Kapitel D, 5.3.).

Die Wachstumskurven beider Isocitratdehydrogenase-Mutanten sind unter aeroben Bedingungen (LB-Medium, 37 °C) nahezu identisch. Dies zeigt, dass sich beide Enzyme in ihrer metabolischen Funktion offenbar weitgehend komplementieren können, zumindest unter den gewählten Bedingungen. Interessanterweise verändert sich die spezifische Enzymaktivität des IDH-Proteins im Wachstumsverlauf kaum, die Aktivität scheint vielmehr im Bereich von 0,2 - 0,3 U/mg konstitutiv zu sein (Abb. E.16., grüne Säulen). Hingegen nimmt die Aktivität des ICD-Enzyms im Verlauf der Wachstumskurve kontinuierlich zu, bis es in der stationären Wachstumsphase ein Maximum von etwa $0,760 \pm 0,109$ U/mg Gesamtprotein erreicht (Abb. E.16., orange Säulen). Dies könnte für eine Regulation des ICD-Enzyms im Wachstumsverlauf sprechen, nicht aber für das IDH-Enzym, welches offensichtlich eher eine Grundaktivität der Zelle abdeckt. In der exponentiellen Wachstumsphase (4. und 5. Stunde nach Inokulation) fällt die Aktivität der ICD im Vergleich zur IDH geringer aus. In der frühen stationären Phase (6. Stunde nach Inokulation) ist die Aktivität beider Enzyme in etwa gleich, in der stationären Phase überwiegt die Aktivität des ICD-Enzyms. Womöglich könnte das IDH-Enzym die oxidative Verstoffwechslung in der exponentiellen Wachstumsphase übernehmen bzw. den Mehrbedarf abdecken, wohingegen das ICD-Enzym eher für die stationäre Phase wichtig zu sein scheint.

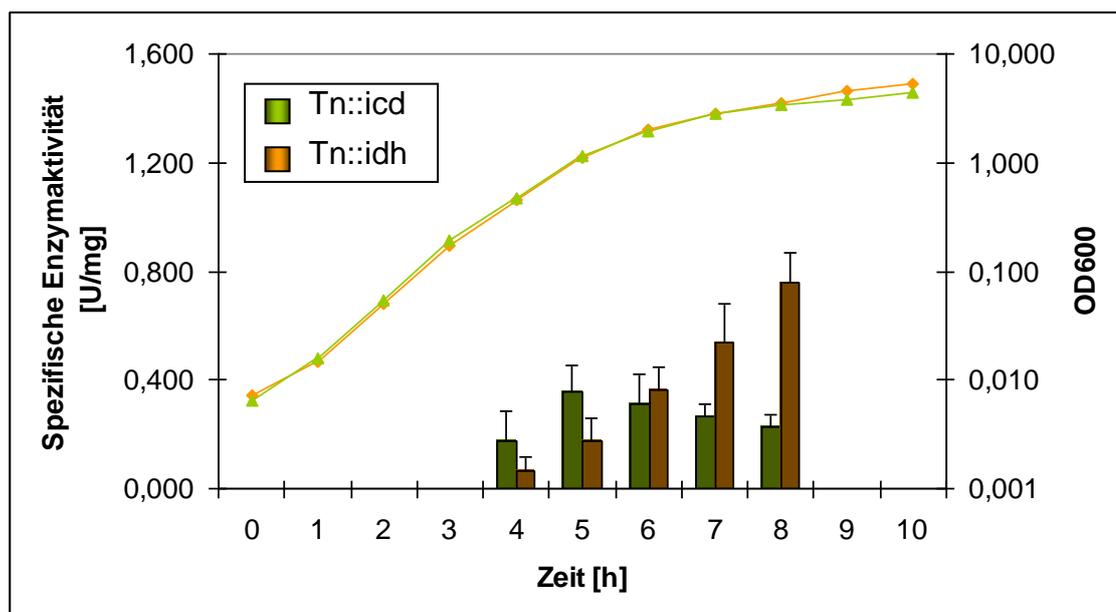


Abb. E.16. Spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase-Mutanten von *P. aeruginosa* PA14 im Verlauf der Wachstumskurve unter aeroben Bedingungen.

Tn::icd = IDH-Aktivität (grün); Tn::idh = ICD-Aktivität (orange) in LB-Medium (37 °C)
Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Isocitratdehydrogenase stellt einen wichtigen Verzweigungspunkt zwischen TCA- und Glyoxylatzyklus dar. In *E. coli* wird unter aeroben Bedingungen Acetyl-CoA über den TCA-Zyklus oxidiert. Unter anaeroben Bedingungen oder bei Wachstum mit Acetat wird Acetyl-CoA am Verzweigungspunkt des Isocitrats über den Glyoxylatzyklus metabolisiert. Bei *P. aeruginosa* wurde diese klassische Aufteilung bisher nicht eingehend untersucht und es ist unklar, ob eine ähnliche Regulation wie in *E. coli* vorliegt. In *E. coli* wird die Expression des *icd*-Gens durch die Regulatoren ArcA/B bzw. FNR gesteuert, welche dadurch auch die Aktivität der Isocitratdehydrogenase beeinflussen können. So zeigte sich in einer *arcA*-Mutante eine erhöhte Aktivität der Isocitratdehydrogenase unter anaeroben Bedingungen (Iuchi und Lin, 1988). Ob und wie stark sich die Enzymaktivitäten in *P. aeruginosa* unter Sauerstoffabschluss ändern, sollte durch Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten unter anaeroben Bedingungen im Verlauf der Wachstumskurve untersucht werden. Die Ergebnisse hieraus sind anschaulich in Abbildung E.17. dargestellt.

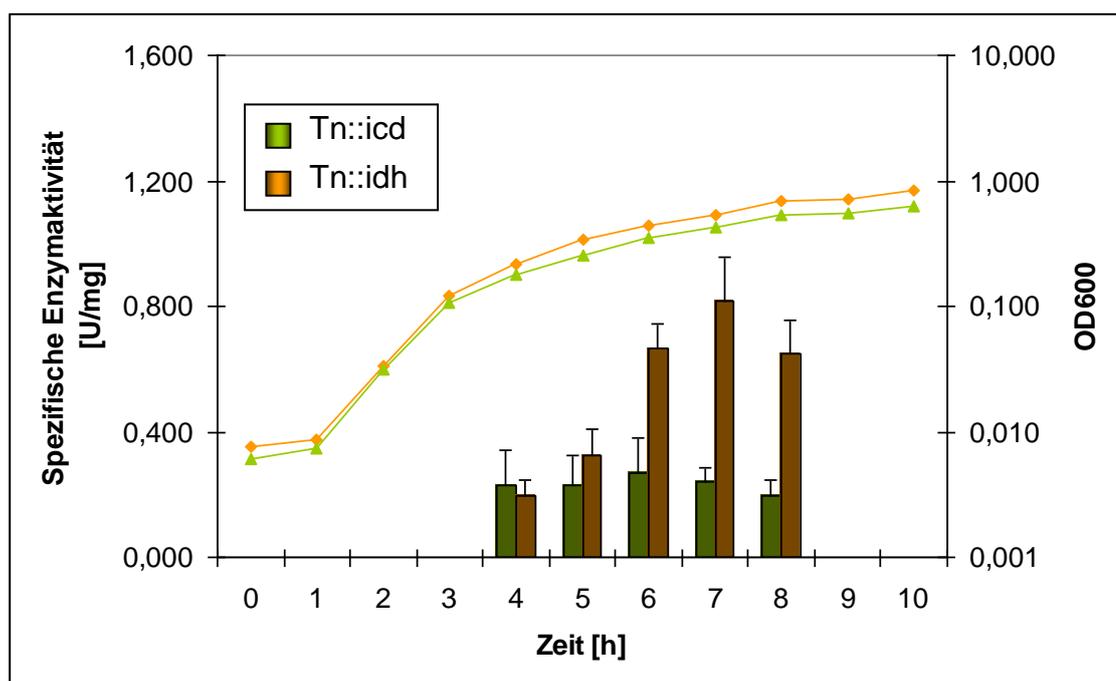


Abb. E.17. Spezifische Enzymaktivitäten der Isocitratdehydrogenase-Mutanten von *P. aeruginosa* PA14 im Verlauf der Wachstumskurve unter anaeroben Bedingungen

Unter anaeroben Bedingungen wurde 50 mM Nitrat zugesetzt. Tn::icd = IDH-Aktivität; Tn::idh = ICD-Aktivität in LB-Medium (37 °C). Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Auch unter anaeroben Bedingungen unterscheidet sich die Wachstumskurve beider Mutanten kaum. Wie zuvor unter aeroben Bedingungen zeigen die Daten eine deutliche Zunahme der ICD-Aktivität im Vergleich zur IDH-Aktivität in der stationären Phase (Abb. E.17., orange bzw. grüne Säulen). Die ICD-Enzymaktivität erreicht nach etwa sieben Stunden nach Inokulation ein Maximum von ca. $0,817 \pm 0,052$ U/mg. Dagegen ist die IDH-Aktivität gleichbleibend niedrig bei etwa $0,232 \pm 0,046$ U/mg Gesamtprotein. Insgesamt ist der Verlauf der Enzymaktivitäten unter aeroben und anaeroben Bedingungen relativ ähnlich. Jedoch scheint die Aktivität des ICD-Enzyms mit der stationären Wachstumsphase im Zusammenhang zu stehen. In *P. aeruginosa* reguliert der Sigmafaktor RpoS die stationäre Wachstumsphase. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität oder Expression der Isocitratdehydrogenase und dem RpoS-Protein bestehen.

3.4.2. RpoS-abhängige Regulation

Sigmafaktoren sind kleine bakterielle Proteine, die an RNA-Polymerasen gebunden sind und durch das Erkennen für sie spezifischer Promotoren die Transkription initiieren. Abhängig von Umweltfaktoren (z.B. Hitze, Nährstoffmangel, Stickstoffmangel, etc.) exprimiert *P. aeruginosa* verschiedene Sigmafaktoren und kann sich dadurch an veränderte Bedingungen anpassen, da verschiedene Sigmafaktoren unterschiedliche Promotorspezifitäten besitzen. RpoS (auch σ^S oder σ^{38} genannt) ist der Hauptfaktor in der stationären Wachstumsphase und ist durch die Modulation von RhIR und LasR auch in die Regulationskaskade des Quorum Sensing bei *P. aeruginosa* involviert (Latifi *et al.*, 1996). Darüber hinaus ist RpoS an der Sekretion von extrazellulären Virulenzfaktoren wie Alginate, Exotoxin A und S, Elastasen LasA und LasB beteiligt (Suh *et al.*, 1999; Sonnleitner *et al.*, 2003; Hogardt *et al.*, 2004). Jung und Kollegen (2006) konnten die RpoS-vermittelte Regulation der Isocitratdehydrogenase in *E. coli* zeigen. Die Expression des *icd*-Gens sowie die Enzymaktivität des ICD-Proteins in *E. coli* waren in der stationären Phase in einer *rpoS*-Mutante deutlich erhöht, d.h. es liegt eine negative Regulation der Transkription des *icd* Gens durch RpoS vor. In *P. aeruginosa* ist ein solcher Zusammenhang zwischen RpoS und der Isocitratdehydrogenase nicht bekannt, daher sollte hier eine mögliche Regulation durch RpoS untersucht werden. Eine RpoS Konsensussequenz von *P. aeruginosa* wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Schuster *et al.* 2004; Typas *et al.*, 2007; Irie *et al.*, 2010), sie besteht aus insgesamt acht Basen, wobei die erste Base entweder Thymin oder Guanin ist:

RpoS Konsensussequenz: KCTATACT (K = T/G)

Durch Sequenzvergleiche¹¹ des intergenischen Bereiches zwischen *icd* und *idh* (ATG *icd* bis ATG *idh*) mit dieser Konsensussequenz konnten zwei potentielle Bindestellen für RpoS nahe des *icd*-Gens bzw. des *idh*-Gens gezeigt werden (Abb. E.18.).

Die vorhergesagten Bindestellen des *icd*-Gens weisen eine hohe Übereinstimmung zur Konsensussequenz auf und liegen 50 Bp bzw. 90 Bp stromaufwärts des Startkodons des *icd*-Gens. Außerdem liegen beide Bindestellen auf dem minus-Strang der DNA, auf dem auch das Startkodon von *icd* liegt. Somit ist davon auszugehen, dass diese Bindestellen dem *icd*-Gen zuzuordnen sind.

¹¹ Die Vergleiche der Konsensussequenzen (TCTATACT bzw. GCTATACT) mit dem intergenischen Bereich von *icd/idh* (Plus- und Minus-Strang) wurden mit der Software DNA Star MegAlign (Clustal W Method) erstellt.

Die möglichen Bindestellen des *idh*-Gens sind 117 Bp und 131 Bp stromaufwärts des Startkodons lokalisiert. Beide putativen Bindestellen liegen auf dem Plus-Strang, auf dem auch das Startkodon von *idh* liegt. Damit könnten dies die RpoS-Bindestellen des *idh*-Gens sein.

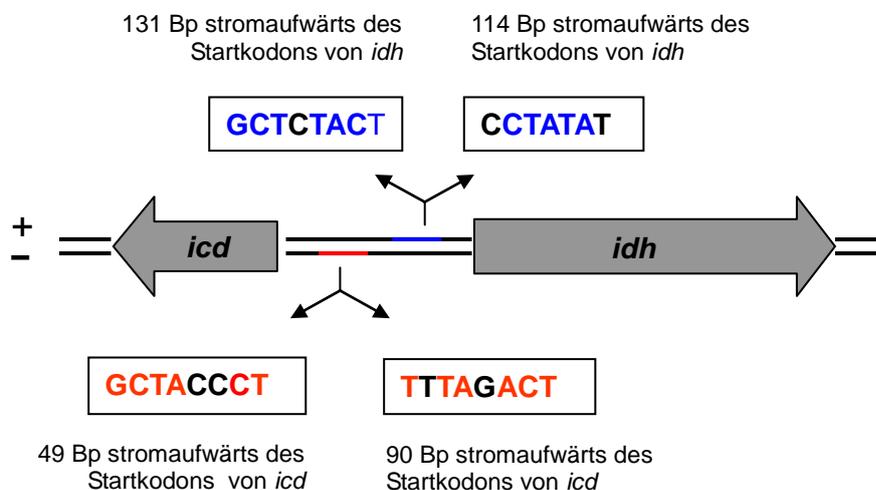


Abb. E.18. Vorhergesagte RpoS-Bindestellen zwischen den Startkodons der Gene *icd* / *idh*.

Dargestellt sind die Gene *icd* und *idh* aus *P. aeruginosa* PAO1 mit dem Bereich zwischen den Startkodons (358 Bp). In rot sind die passenden Basen der Konsensussequenz im Promotorbereich des *icd*-Gens dargestellt, in blau die Basen für das *idh*-Gen.

Um eine eventuelle RpoS-abhängige Regulation der Isocitratdehydrogenasen in *P. aeruginosa* experimentell zeigen zu können, sollte die Expression beider Isoenzyme in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase im Wildtyp und der *rpoS*-Mutante untersucht werden. In der exponentiellen Phase ist der Sigmafaktor RpoS nicht aktiv, daher würde die Expression der Gene gering ausfallen. In der stationären Phase wäre die Genexpression wie bei *E. coli* (Jung *et al.*, 2006) erhöht, sofern das RpoS-Protein auch bei den Promotorbereichen von *icd* und/oder *idh* bindet und die Transkription der Gene beeinflusst. Eine Unterscheidung der Expression beider Enzyme im Wildtypstamm PA14 bzw. der *rpoS*-Mutante ist durch die beiden unabhängigen Reporterplasmide *picdlacZ* bzw. *pidhlacZ* möglich. Der Zeitpunkt der Probenahme und die Höhe der optischen Dichte in der exponentiellen bzw. stationären Phase wurde in Vorexperimenten anhand einer Wachstumskurve bestimmt (Abb. E.19.).

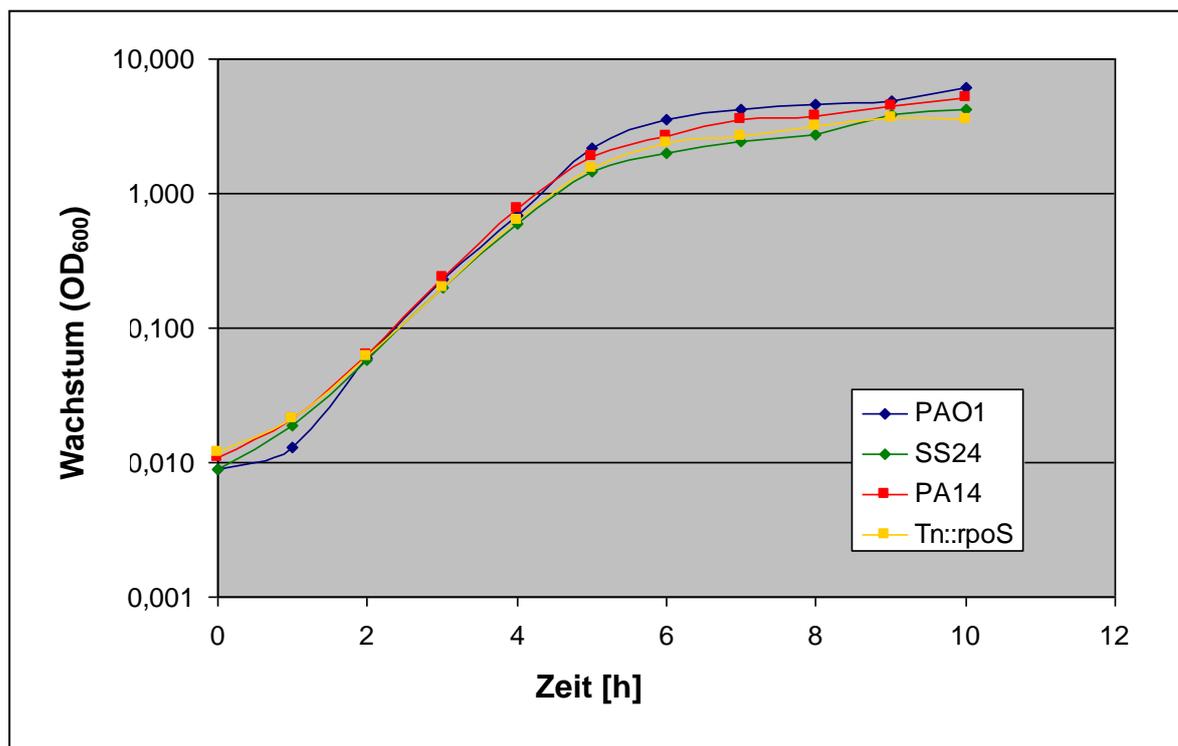


Abb. E.19. Wachstumskurven von *P. aeruginosa* unter aeroben Bedingungen.

PAO1: Wildtyp, PA14: Wildtyp, SS24: *rpoS*-Deletionsmutante von PAO1; Tn::*rpoS*: *rpoS*-Transposoninsertionsmutante von PA14. Aerobe Wachstumsbedingungen: 25 ml LB-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen, schüttelnd inkubiert, 37 °C.

Für Enzymmessungen in der exponentiellen Phase wurden die Proben bei ca. OD₆₀₀ 0,65 abgenommen. Für Proben der stationären Phase wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von etwa 4,3 (PAO1/PA14) bzw. 3,7 (SS24/Tn::*rpoS*) entnommen. Das Wachstumsverhalten aller vier Stämme ist nahezu identisch. Nach einer anfänglichen Verzögerungsphase (‘lag-Phase’) steigt das bakterielle Wachstum exponentiell an. Die stationäre Phase tritt ein, wenn die Bakterien einer Nährstofflimitierung ausgesetzt sind. Auffällig sind beide *rpoS*-Mutanten SS24 bzw. Tn::*rpoS*, deren Biomassen in der stationären Phase etwas unterhalb der der Wildtypstämme PAO1 und PA14 liegen.

Nach erfolgter Konjugation der Reporterplasmide *picdlacZ* und *pidhlcZ* in alle vier zu untersuchenden Stämme wurden Proben in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase entnommen und nach Protokoll die Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt. Alle Stämme wurden in 25 ml LB-Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter aeroben Bedingungen angezogen (37 °C, 200 Upm). Folgende Abbildung E.20. stellt die Promotoraktivitäten des *icd*- bzw. *idh*-Gens im Wildtyp PAO1 und der isogenen *rpoS*-Mutante SS24 dar.

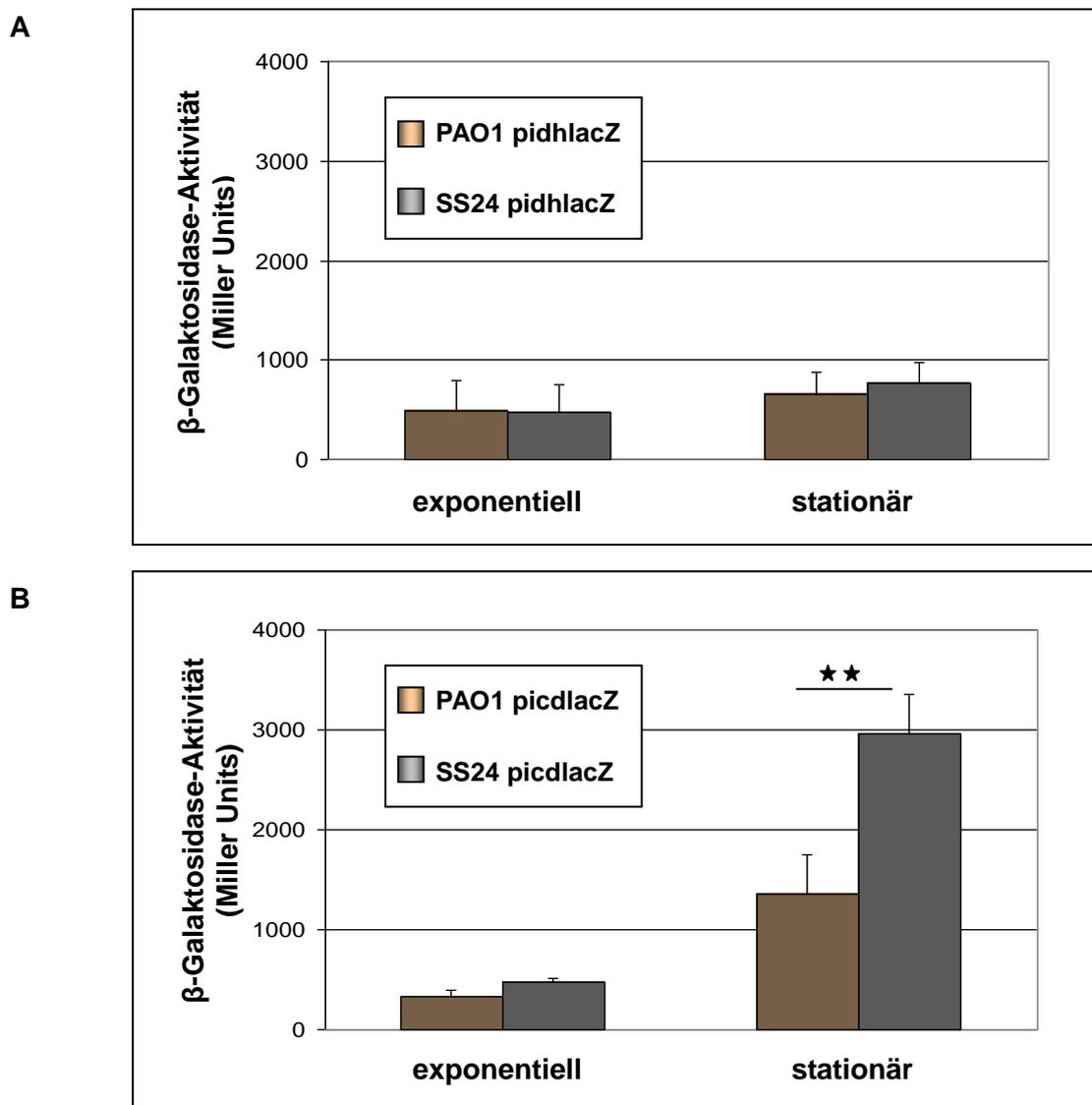


Abb. E.20. LacZ-Aktivität der *idh*- (A) und *icd*-Reporterfusionen (B) im Wildtyp PAO1 und in der isogenen *rpoS*-Mutante (SS24) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Die Stämme wurden unter aeroben Wachstumsbedingungen angezogen (LB-Medium, 37 °C, 200 Upm, schüttelnd). Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten. ** $p \leq 0,01$; die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

Die Expression der *idh-lacZ*-Reporteraktivität unterscheidet sich weder in der exponentiellen noch in der stationären Phase zwischen Wildtypstamm PAO1 und *rpoS*-Mutante SS24 (Abb. E.20., A). Offensichtlich wird das *idh*-Gen unter den gewählten Bedingungen durch RpoS nicht beeinflusst. Dagegen steigt die *icd-lacZ*-Reporteraktivität in der SS24-Mutante unter stationären Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp PAO1 signifikant an ($p \leq 0,01$) (Abb. E.20., B). In der exponentiellen Wachstumsphase dagegen ist die *icd-lacZ*-Reporteraktivität in beiden Stämmen nicht signifikant unterschiedlich. Diese Daten sprechen offensichtlich für eine negative

Regulation des *icd*-Gens durch das RpoS-Protein in der stationären Wachstumsphase.

Die RpoS-vermittelte Regulation der Isocitratdehydrogenase wurde nicht nur im Wildtypstamm PAO1 und der isogenen *rpoS*-Mutante SS24 untersucht, sondern auch im Wildtypstamm PA14 mit der isogenen *rpoS*-Mutante Tn::*rpoS*. Die Messung der Reporteraktivitäten der LacZ-Fusionsgene *icd* und *idh* wurden ebenfalls in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase durchgeführt. Das Ergebnis hieraus ist in Abbildung E.21. dargestellt.

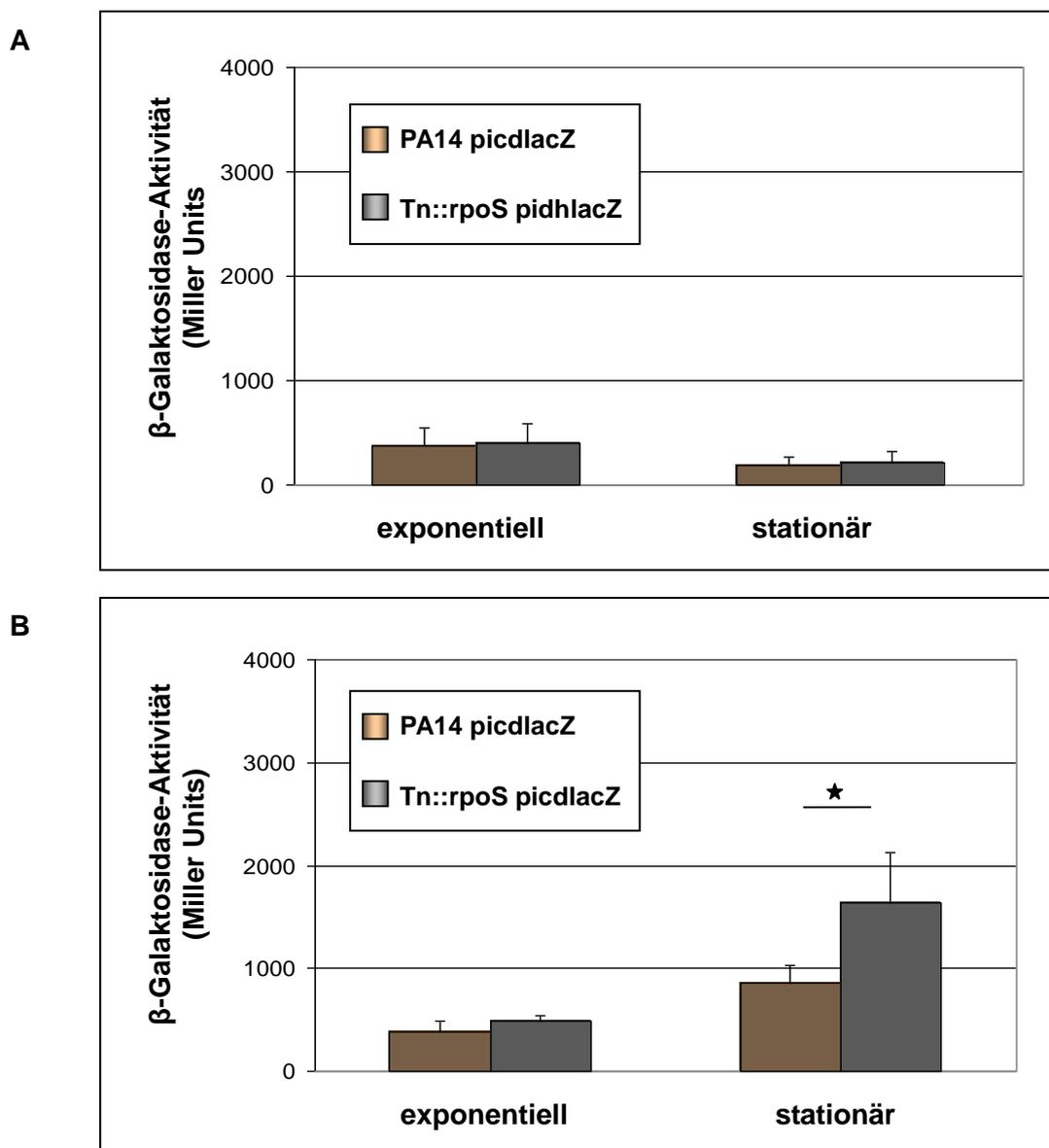


Abb. E.21. LacZ-Aktivität der *idh*- (A) und *icd*-Reporterfusionen (B) im Wildtyp PA14 und in der isogenen *rpoS*-Mutante (Tn::*rpoS*) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Die Stämme wurden unter aeroben Wachstumsbedingungen angezogen (LB-Medium, 37 °C, 200 Upm, schüttelnd). Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten. ★ $p \leq 0,05$; die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

Auch im Wildtypstamm PA14 und der isogenen *rpoS*-Mutante (Tn::*rpoS*) ist die Reporteraktivität des *idh*-Gens unter allen getesteten Bedingungen gleichbleibend niedrig (Abb. E.21., A). Somit lässt sich kein Einfluss von RpoS auf das *idh*-Gen feststellen. Im Gegensatz dazu erfolgt offensichtlich die Aktivierung des *icd*-Promotors direkt oder indirekt in der stationären Phase durch RpoS, da die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität in der *rpoS*-Mutante signifikant ansteigt (Abb. E.21., B). Das bedeutet, dass analog zu den PAO1/SS24-Stämmen auch im Wildtypstamm PA14 und der *rpoS*-Mutante Tn::*rpoS* das *icd*-Gen durch RpoS negativ reguliert wird. Eine erhöhte Transkription des *icd*-Gens in beiden *rpoS*-Mutanten muss nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Aktivität des ICD-Proteins führen und umgekehrt. Daher wurde die spezifische ICD-Enzymaktivität der Wildtypstämme PAO1 bzw. PA14 und den entsprechenden *rpoS*-Mutanten SS24 bzw. Tn::*rpoS* bestimmt (Abb. E.22. und E.23.). Eine Unterscheidung zwischen ICD- und IDH-Aktivität ist hierbei aber nicht möglich, da in allen untersuchten Stämmen/Mutanten die Gene *icd* und *idh* intakt sind und man somit von funktionellen ICD-/IDH-Enzymen ausgehen kann. Für die Enzymtests wurden die gleichen Wachstumsbedingungen (25 ml LB-Medium, 37 °C, 200 Upm, aerob) und Zeitpunkte der Zellernte (exponentiell/ stationär) wie für die Reportergerastudien von *icd* und *idh* verwendet, um eine Vergleichbarkeit zwischen Expression und spezifischer Enzymaktivität herstellen zu können.

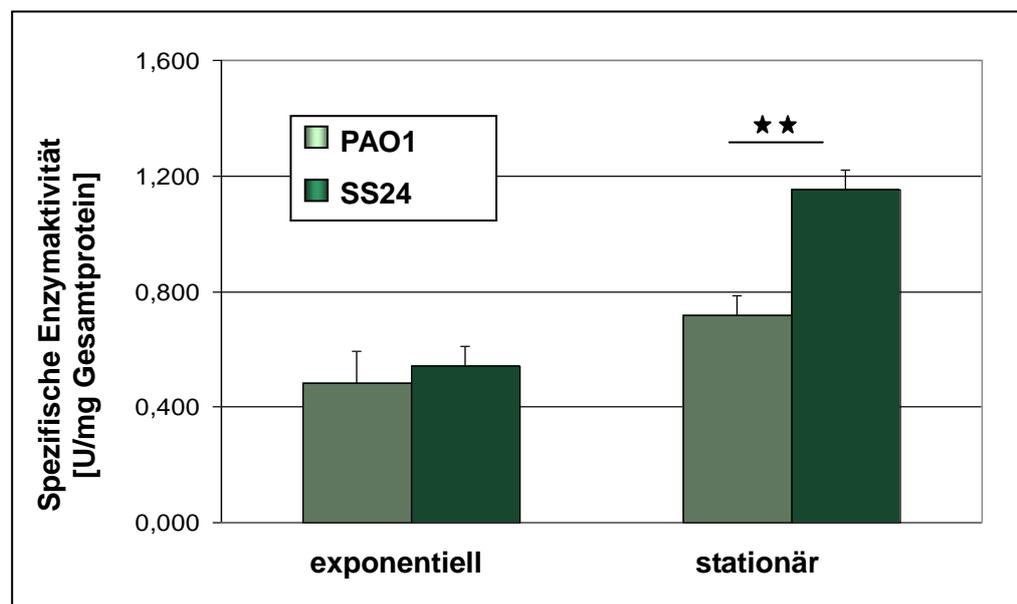


Abb. E.22. Spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenasen im Wildtyp PAO1 und in der isogenen *rpoS*-Mutante (SS24) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Die Stämme wurden unter aeroben Wachstumsbedingungen angezogen (LB-Medium, 37 °C, 200 Upm, schüttelnd). Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten. ★★ $p \leq 0,01$; die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

Unter exponentiellen Wachstumsbedingungen unterscheidet sich die spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase der Stämme PAO1 und SS24 nicht. Die Stämme weisen eine Aktivität von $0,483 \pm 0,109$ U/mg (PAO1) bzw. $0,543 \pm 0,067$ U/mg (SS24) auf, daher besteht kein signifikanter Unterschied zueinander. In der stationären Phase steigt die Aktivität im Wildtyp PAO1 leicht an (auf ca. $0,692 \pm 0,104$ U/mg), was im Vergleich zur exponentiellen Phase aber keinen signifikanten Unterschied darstellt. In der *rpoS*-Mutante ist die spezifische Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp deutlich höher. Die hier im Mittel gemessene Aktivität in der Mutante beträgt etwa $1,15 \pm 0,069$ U/mg Gesamtprotein (Methode siehe Kapitel D, 5.3.). Dieser Anstieg um etwa $2/3$ resultiert vermutlich aus dem erhöhten *icd*-Transkript in der stationären Phase. Das *idh*-Gen zeigte unter diesen Bedingungen keine verstärkte Expression (Abb. E.20., A). Somit wirkt sich vermutlich die RpoS-abhängige Regulation des *icd*-Gens auf die spezifische Enzymaktivität aus und lässt diese in der *rpoS*-Mutante unter stationären Bedingungen ansteigen.

Im Wildtypstamm PA14 und der zugehörigen isogenen *rpoS*-Mutante Tn::*rpoS* war die Expression des *icd*-Gens in der stationären Wachstumsphase ebenfalls signifikant erhöht (Abb. E.21., A). Daher wurde auch hier die spezifische Enzymaktivität unter den gleichen Bedingungen wie zuvor bestimmt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen erhöhtem *icd*-Transkript und erhöhter Isocitratdehydrogenase-Aktivität darstellen zu können (Abb. E.23.).

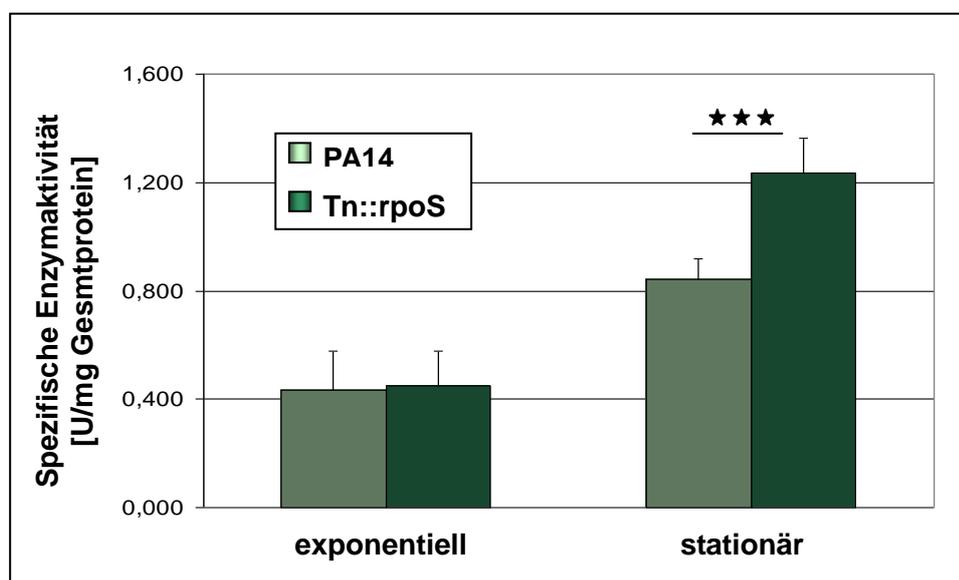


Abb. E.23. Spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenasen im Wildtyp PA14 und in der isogenen *rpoS*-Mutante (Tn::*rpoS*) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Die Stämme wurden unter aeroben Wachstumsbedingungen angezogen (LB-Medium, 37 °C, 200 Upm, schüttelnd). Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

*** $p \leq 0,001$; die Signifikanzwerte wurden mittels T-Test der Software „SigmaStat“ (Fa. Systat GmbH, Erkrath) ermittelt.

In der exponentiellen Wachstumsphase ist die spezifische Enzymaktivität zwischen dem Wildtypstamm PA14 und der *rpoS*-Mutante Tn::*rpoS* nahezu identisch, die Werte liegen bei etwa $0,433 \pm 0,144$ U/mg bzw. $0,450 \pm 0,128$ U/mg. Die Aktivität im Wildtypstamm PA14 steigt in der stationären Phase auf $0,842 \pm 0,077$ U/mg. Dieser Anstieg um ca. 94 % fällt höher aus als im Wildtypstamm PAO1 ($0,483 \pm 0,109$ U/mg auf $0,692 \pm 0,104$ U/mg, entspricht einem Anstieg um ca. 43 %). Offenbar wird die Enzymaktivität nicht nur durch RpoS alleine verursacht. Dennoch ist auch hier in der stationären Phase ein signifikanter Unterschied in der Enzymaktivität zwischen Wildtyp PA14 und *rpoS*-Mutante Tn::*rpoS* feststellbar ($p \leq 0,001$). Dies könnte auf eine regulatorische Aktivität von RpoS auf die Isocitratdehydrogenase hinweisen. Da in der *rpoS*-Mutante Tn::*rpoS* in Vorversuchen die Expression des *icd*-Gens im Vergleich zum *idh*-Gen unter stationären Bedingungen erhöht war (Abb. E.21.), kann der Anstieg der spezifischen Enzymaktivität vermutlich dem erhöhten Transkript von *icd* zugeordnet werden.

3.4.3. Posttranslationale Regulation

Die Isocitratdehydrogenase Kinase/Phosphatase (AceK bei *E. coli*) ist ein wichtiges Enzym der posttranslationalen Regulation der Isocitratdehydrogenase. In *E. coli* hat die AceK eine Kinase- und Phosphataseaktivität. AceK ist ein zytoplasmatisches Enzym, das den Serinrest der Isocitratdehydrogenase ICD an der Position 113 (Ser₁₁₃) phosphoryliert bzw. dephosphoryliert. Die Enzyme Isocitratdehydrogenase (ICD) und Isocitratlyase (ICL) in *E. coli* stehen im direkten Wettbewerb um ihr gemeinsames Substrat Isocitrat. In *E. coli* hat die ICD im Vergleich zur ICL eine viel höhere Affinität zu Isocitrat, dennoch ist der Kohlenstofffluss über die ICL (z.B. bei Wachstum mit Acetat) durch (i) hohe Substratkonzentrationen und (ii) durch die reversible Phosphorylierung der ICD sicher gestellt (Cozzzone und El-Mansi, 2005). Die Phosphorylierung der Isocitratdehydrogenase ist ATP-abhängig und hat die Inaktivierung des Enzyms zur Folge. Durch die AceK-vermittelte Dephosphorylierung wird die Isocitratdehydrogenase wieder aktiv (Abb. E.24.).

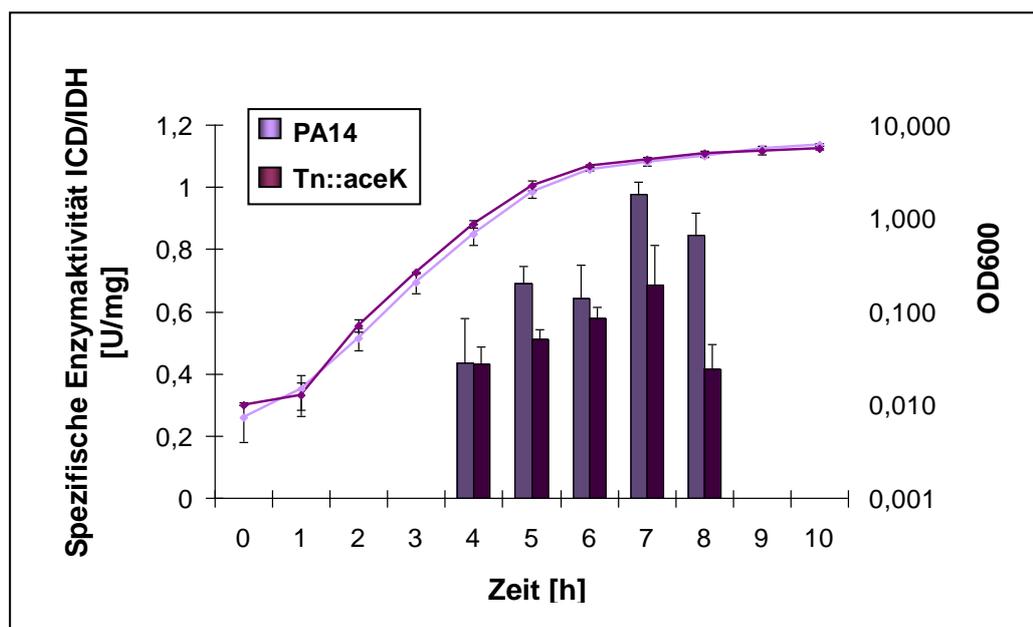


Abb. E.25. Spezifische ICD/IDH-Enzymaktivitäten des Wildtyps PA14 und der Mutante Tn::aceK im Verlauf der Wachstumskurve. Die Stämme wurden unter aeroben Wachstumsbedingungen angezogen (LB-Medium, 37 °C, 200 Upm, schüttelnd). Dargestellt sind die Mittelwerte von mind. drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung E.25. zeigt die spezifische Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase aus *P. aeruginosa* PA14 und der isogenen *aceK*-Mutante Tn::aceK im Verlauf der Wachstumskurve. Wie in voran gegangenen Ergebnissen gezeigt, steigt die Aktivität im Wildtyp zur stationären Phase hin signifikant an ($p \leq 0,001$). Im Gegensatz dazu ist die Enzymaktivität in der *aceK*-Mutante unter stationären Bedingungen reduziert, was offensichtlich an einem weniger deutlichen Anstieg während der exponentiellen Phase liegt, d.h. der Aktivitätsanstieg in der *aceK*-Mutante erreicht nicht die Aktivität des Wildtyps PA14. Die Gesamtaktivität ist in der Mutante in der stationären Phase ($0,415 \pm 0,080$ U/mg) signifikant niedriger im Vergleich zum Wildtyp ($0,845 \pm 0,073$ U/mg) ($p \leq 0,001$).

Offensichtlich beeinflusst die AceK die Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase, wobei in den Experimenten zwischen ICD und IDH nicht unterschieden werden kann, da sowohl der Wildtyp als auch die *aceK*-Mutante das *icd*- und *idh*-Gen tragen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Isocitratdehydrogenasen ICD von *E. coli* mit der ICD von *P. aeruginosa* zeigt, dass der Bereich in Nachbarschaft der Aminosäure Serin hoch konserviert ist (Abb. E.26.). In der ICD von *P. aeruginosa* findet sich die entsprechende Aminosäure Serin an Position 115. Sequenzvergleiche zwischen der ICD aus *E. coli* und der IDH aus *P. aeruginosa* erbrachten keine Erkenntnisse über eine ähnliche Position.

¹⁰⁸GGGIRSLNVAL₁₁₈ ICD von *E. coli*
¹¹⁰GGGIRSLNVAL₁₂₀ ICD von *P. aeruginosa* PAO1
¹¹⁰GGGIRSLNVAL₁₂₀ ICD von *P. aeruginosa* PA14

Abb. E.26. Vergleich der Aminosäuresequenz der Isocitratdehydrogenase ICD aus *E. coli* und ICD aus *P. aeruginosa* PAO1 und PA14

Die ICD aus *E. coli* und die ICD aus *P. aeruginosa* haben auf Proteinebene eine hohe Ähnlichkeit (79 %, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die IDH aus *P. aeruginosa* hat kaum Ähnlichkeiten zur ICD aus *E. coli*. Daher ist anzunehmen, dass das Substrat der AceK in *P. aeruginosa* das ICD-Protein ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Isocitratdehydrogenasen aus *P. aeruginosa* verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegen. Davon sind sowohl die *icd*- bzw. *idh*-Transkripte als auch die jeweilige Enzymaktivität betroffen. Beide Enzyme sind strikt NADP⁺-abhängig. Die Aktivität des ICD-Enzyms steigt unter aeroben wie anaeroben Bedingungen zur stationären Phase hin an, wohingegen das IDH-Enzym eher konstitutiv zu sein scheint. Das *icd*-Transkript ist im Gegensatz zum *idh*-Transkript in der stationären Phase vom Sigmafaktor RpoS negativ reguliert, sowohl im *P. aeruginosa* Stamm PAO1 als auch im Stamm PA14. Offensichtlich werden diese Daten durch einen Anstieg der Gesamtaktivität in zwei *rpoS*-Mutanten in der stationären Phase bestätigt. Schließlich zeigte sich auch eine posttranslationale Regulation der Isocitratdehydrogenase durch die AceK-Kinase/Phosphatase. Wie bei *E. coli* weist das ICD-Enzym von *P. aeruginosa* einen hoch konservierten Bereich um die Position der Aminosäure Serin auf. Das ICD-Enzym weist zudem eine hohe Ähnlichkeit zur ICD von *E. coli* auf. Für das IDH-Enzym konnte weder ein entsprechender Bereich um Serin113 identifiziert, noch eine Ähnlichkeit mit dem ICD-Enzym von *E. coli* festgestellt werden.

4. Flussanalyse des Kohlenstoffmetabolismus in *P. aeruginosa*

Durch die Methode des sogenannten 'Isotopologue Profiling' ist es möglich, ausgehend von einem isotopmarkierten (z.B. ^{13}C) Substrat, die Biosynthesewege und den Kohlenstofffluss einer Zelle quantitativ zu untersuchen (Schatschneider *et al.*, 2011; Eylert *et al.*, 2010). Das Verfahren beruht auf der Fütterung von vollständig markierten Kohlenstoffquellen an lebende, Stoffwechsel-aktive Organismen. In der Regel werden die Organismen nach ausreichend langer Zeit, d.h. wenn ein metabolisches Isotopengleichgewicht erreicht ist, geerntet und daraus Stoffwechselprodukte isoliert und analysiert. Häufig werden hierzu Aminosäuren aus Proteinhydrolysaten herangezogen und mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) und/oder NMR-Spektroskopie (NMR: engl. 'nuclear magnetic resonance') untersucht. Während die NMR-Spektroskopie positionsgenau die Isotopverteilungen (z.B. in Aminosäuren) und damit die Isotopologenzusammensetzung zeigt, kann die GC/MS bei hoher Empfindlichkeit die Gesamtanreicherung und das Verhältnis von Isotopomeren (Moleküle mit einer bestimmten Anzahl an ^{13}C -Atomen) bestimmen (Eisenreich *et al.*, 2010). Aus diesen Daten können anschließend die Verwendung der eingesetzten markierten Vorstufen als Kohlenstoffsubstrate überprüft werden, deren differentieller Einbau in die untersuchten Metabolite, die Biosynthesewege der untersuchten Metabolite, sowie die metabolische Vorgeschichte der jeweils verwendeten Bausteine. Im Falle der Aminosäuren sind diese Bausteine (z.B. Acetyl-CoA, Pyruvat, PEP, Oxalacetat) gleichzeitig Produkte, Edukte und Intermediate des zentralen Kohlenstoffwechsels. Somit ergibt sich die Möglichkeit, aus Daten von Aminosäuren weitreichende Aussagen über die relativen Flüsse in den zentralen Stoffwechselwegen (u.a. Glykolyse, Glukoneogenese, Pentosephosphatweg, TCA-Zyklus) zu machen.

In Gesamtsicht können dadurch die benutzten Wege im metabolischen Netzwerk des untersuchten Organismus unter den jeweiligen Bedingungen abgeleitet werden. Für die Untersuchung der Lebensweise von pathogenen Bakterien unter komplexen medizinisch relevanten Bedingungen wurde das Verfahren bereits erfolgreich eingesetzt (Eylert *et al.*, 2008, 2010; Härtel *et al.*, 2012). Im Falle von *P. aeruginosa* lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Untersuchungen zu den Stoffflüssen unter komplexen Bedingungen vor. Als Modell für medizinisch relevante Bedingungen erschien das ASM als geeignet und wurde daher für ^{13}C -Experimente entsprechend modifiziert. Aus Empfindlichkeitsgründen benötigt man für die nachfolgende NMR-Spektroskopie pro Ansatz bis zu 5 Gramm Feuchtwicht an inaktivierten Bakterien. Diese Limitierung kann sich bei der Verwendung eines komplexen und kostenintensiven Mediums wie dem ASM nachteilig auswirken, da je nach Fragestellung größere Volumina an Medium notwendig sind.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen GC/MS- bzw. NMR-Analysen fanden in Kooperation mit PD Dr. Wolfgang Eisenreich und Dr. Eva Eylert am Isotopolog-Zentrum, Abteilung Biochemie der Technischen Universität München statt.

In einem Pilotexperiment wurde als 'proof of principle' des experimentellen Ansatzes zunächst der Basismetabolismus von *P. aeruginosa* PAO1 bzw. PA14 unter Verwendung einer vollmarkierten Aminosäure-Mischung bzw. einer vollmarkierten Lipidmischung untersucht (siehe nachfolgende Kapitel 4.1. und 4.2.). Alle Experimente wurden in ASM durchgeführt, da aufgrund der besonderen Zusammensetzung des Mediums die Bedingungen der CF-Lunge simuliert werden sollten. Darüber hinaus sollte bei den *P. aeruginosa* Wildtypen PAO1 und PA14 der Metabolismus unter aeroben und anaeroben Bedingungen verglichen werden, da anaerobe Verhältnisse den Stoffwechsel stark beeinflussen können. Möglicherweise werden ANR-abhängige Stoffwechselwege aktiviert oder der Glyoxylat-Zyklus gegenüber dem TCA-Zyklus bevorzugt (siehe nachfolgendes Kapitel 4.3.).

Neben dem Basismetabolismus von *P. aeruginosa* wurde die metabolische Adaptation von klinischen Isolaten von Mukoviszidose-Patienten untersucht. Analog zu Microarray- und Proteom-Analysen wurden der Non-Mutatorstamm M1 und der Mutatorstamm M26 miteinander verglichen, um die Anpassung des Mutatorstammes direkt auf Ebene des Metabolismus darstellen zu können (siehe nachfolgendes Kapitel 4.4.).

Vor der Durchführung der Versuche mit isotopmarkierten Substraten in ASM mussten einige experimentelle Detailfragen geklärt werden, wie z.B. die Art und Konzentration der zugesetzten Isotope, die Methode der Bakterieninaktivierung, u.a. Angesichts der Zusammensetzung des ASM aus Aminosäuren (25 mg/ml), Muzin (5 mg/ml), Lipiden (0,5 %), DNA (2,7 mg/ml) und Serumproteinen (1 %) bzw. der kommerziellen Verfügbarkeit von ^{13}C -Substraten wurden eine [U- ^{13}C]-markierte Lipid- sowie Aminosäuremischung als Supplemente zum ASM untersucht. Folgende Punkte wurden für die Etablierung der Methode im Vorfeld der Experimente abgeklärt:

(1) Löslichkeit

Hierfür musste zunächst die Löslichkeit beider Substrate (^{13}C -Fettsäure- bzw. ^{13}C -Aminosäuremischung) in ASM untersucht werden. Die [U- ^{13}C]-Aminosäure (AS)-Mischung bestand aus einem wasserlöslichen Pulver, mit welchem das ASM ohne Probleme substituiert werden konnte (Methode siehe Kapitel D, 7.1.). Die [U- ^{13}C]-Lipidmischung bestand laut Hersteller aus 53,24 % Palmitinsäure, 28,20 % Ölsäure, 9,15 % Palmitoleinsäure und 6 % Linolsäure (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.; Andover, MA, USA). Die [U- ^{13}C]-Lipidmischung wurde unter Zusatz von Aceton gelöst und dem ASM beigemischt, wodurch eine Emulsion entstand (Methode siehe Kapitel D, 7.2.). Für die

Lösung wurde 1 % Aceton bezogen auf das Gesamtvolumen des Mediums genutzt. Durch Wachstumsversuche in ASM +/- 1% Aceton konnte sicher gestellt werden, dass das Lösungsmittel keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Wildtyps und der Patientenisolat hatte.

(2) Konzentration

Darüber hinaus stellte sich die Frage, in welchen Konzentrationen sowohl die AS-Mischung als auch die Lipidmischung im ASM für eine ausreichende Detektion benötigt werden. Die [U-¹³C]-Lipidmischung wurde dem ASM als Ersatz für die Egg Yolk Emulsion zugeführt. Das ASM wurde mit 0,5 % Egg Yolk Emulsion substituiert, dies entspricht 5 ml auf einen Liter ASM. Laut Herstellerangaben besteht die Egg Yolk Emulsion aus 30 % reinem Egg Yolk und 70 % steriler Saline (<http://www.sigmaaldrich.com/germany.html>), so dass der reine Lipidanteil der Egg Yolk Emulsion ca. 1,5 ml/L ASM entsprach. Eine genaue Angabe der Konzentration von Lipiden im Egg Yolk (Phosphatidylcholine) ist nicht möglich, da hierfür vom Hersteller kein Molekulargewicht angegeben werden konnte. Für ein erstes Experiment wurde 1 g/L der [U-¹³C]-Lipidmischung an Stelle der Egg Yolk Emulsion eingesetzt. Hierbei zeigte sich eine Übermarkierung der untersuchten Aminosäuren. Dies bedeutet, dass alle C-Atome der Aminosäuren ¹³C-Atome sind, dadurch kann man kein Muster erkennen und keine Rückschlüsse auf die Biosynthese ziehen. Daher wurde der Anteil der markierten Lipidmischung auf 0,1 g/L reduziert, die restlichen 0,9 g/L wurden mit unmarkierten Fettsäuren aufgefüllt, die in Art und Zusammensetzung der [U-¹³C]-Lipidmischung entsprachen (siehe auch Kapitel D, 7.1. bzw. 7.2.). Die Reduktion des Isotops auf 0,1 g/L führte zu einer verbesserten Markierungssignatur (d.h. der Anteil an vollmarkierten Aminosäuren lag unter 1 %) und wurde daher für alle folgenden Experimente übernommen.

Die [U-¹³C]-AS-Mischung wurde zusätzlich zu den im ASM vorhandenen 20 Aminosäuren zugesetzt. Jede freie Aminosäure ist im ASM mit je 0,25 mg/ml enthalten, so dass insgesamt eine AS-Konzentration von 5 mg/ml im ASM existiert. Aufgrund der Erfahrungen beim Vorexperiment zur Konzentrationsbestimmung der Lipidmischung wurde die [U-¹³C]-AS-Mischung in einer Konzentration von 0,5 mg/ml dem Medium beigemischt, was somit 1/10 der AS-Konzentration von 5 mg/ml im ASM entsprach.

(3) Inaktivierung

Vor Messung der Isotopologmuster und -verteilung am Isotopolog-Zentrum der TU München wurde eine komplette Inaktivierung der Zellen durchgeführt. Zunächst war unklar, welche Art der Inaktivierung die komplette Abtötung der Bakterien sicher stellen konnte. Einerseits könnten sich z.B. bei einer Abtötung durch Paraformaldehyd (PFA) Inhaltsstoffe des

Plastikgefäßes (z.B. Phtalate) herauslösen und die Messung beeinflussen. Andererseits musste die Zelle als Kompartiment erhalten bleiben, da das gesamte Zellprotein für die Messung der Aminosäuren erhalten bleiben musste. Dies schloss beispielsweise eine Inaktivierung durch Ultraschall aus. Es wurden zwei unterschiedliche Arten der Inaktivierung gewählt, die die Bakterien sicher abtöten und gleichzeitig das Zellprotein erhalten konnten: (i) Autoklavieren der Sedimente bei 134 °C für 20 min und (ii) Resuspendierung und Inkubation des Pellets mit 4 % PFA bei 4 °C über Nacht. Es stellte sich heraus, dass es zwischen den beiden gewählten Arten der Inaktivierung keinen nennenswerten Unterschied bei der Isotopologanalyse gab (Abb. E.27.). Für alle folgenden Experimente wurde das Abtöten der Bakterien durch PFA bevorzugt, da diese Methode technisch einfacher und zeitlich flexibler einsetzbar war als die Inaktivierung durch Autoklavieren.

4.1. ¹³C-Markierungsmuster bei Wachstum mit Aminosäure-Mischung

Für die ersten Versuche wurde eine universell ¹³C-markierte Aminosäure-Mischung als Substrat verwendet, d.h. dem Basismedium (ASM) wurde neben den 20 vorhandenen Aminosäuren (5 mg/ml) zusätzlich vollmarkierte Aminosäuren (0,5 mg/ml) zugesetzt. Die [U-¹³C]-Aminosäuremischung enthält insgesamt 19 Aminosäuren in unterschiedlicher Konzentration. Alanin beispielsweise liegt mit 14 Mol% viel höher konzentriert vor als Tyrosin mit 0,8 Mol%. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten [U-¹³C]-Aminosäure-Mischung kann aus Tabelle E.5. entnommen werden.

Tab. E.5. Zusammensetzung der verwendeten [U-¹³C]-Aminosäure-Mischung

Aminosäure	Molprozent [%]	Aminosäure	Molprozent [%]
Asn / Asp	10,2	Ile	5,8
Thr	6,2	Leu	9,6
Ser	4,4	Tyr	0,8
Gln / Glu	10,1	Phe	4,4
Pro	4,7	His	0,9
Gly	10,8	Lys	3,9
Ala	14,0	Trp	0,0
Val	8,1	Arg	2,9
Met	2,7	Cys	0,4

Die Bakterien wurden in insgesamt einem Liter ASM je Experiment aerob unter Standardbedingungen (Erlenmeyerkolben mit Schikanen, 37 °C, 200 Upm) bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase angezogen und durch Zentrifugation bei 4 °C geerntet. Anschließend wurde die Zellen im Sauren hydrolysiert, die entstandene Aminosäuren silyliert und mittels GC/MS analysiert (siehe auch Methodenteil D, Punkt 7.3).

In diesem Verfahren können nicht alle Aminosäuren dargestellt werden, da (i) aufgrund der Probenvorbereitung (saure Hydrolyse) einige Aminosäuren zerfallen (Trp, Gln, Asn, Cys) und (ii) basische Aminosäuren (Histidin, Arginin, Lysin) weitere N-Funktionalitäten enthalten, welche ebenfalls silyliert werden können. Die so entstehenden höher silylierten Produkte können unter den gegebenen Bedingungen in der GC nicht eluiert werden. Von den 20 bekannten proteinogenen Aminosäuren können i.d.R. Alanin (Ala), Aspartat (Asp), Glutamat (Glu), Glycin (Gly), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Lysin (Lys), Phenylalanin (Phe), Prolin (Pro), Serin (Ser), Threonin (Thr) und Valin (Val) mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden (Sauer, 2006). In einer ersten vergleichenden Analyse wurden die Isotopologmuster von Bakterienzellen nach Inaktivierung durch PFA bzw. Autoklavieren verglichen. Abbildung E.27. zeigt das Ergebnis aus dieser Analyse.

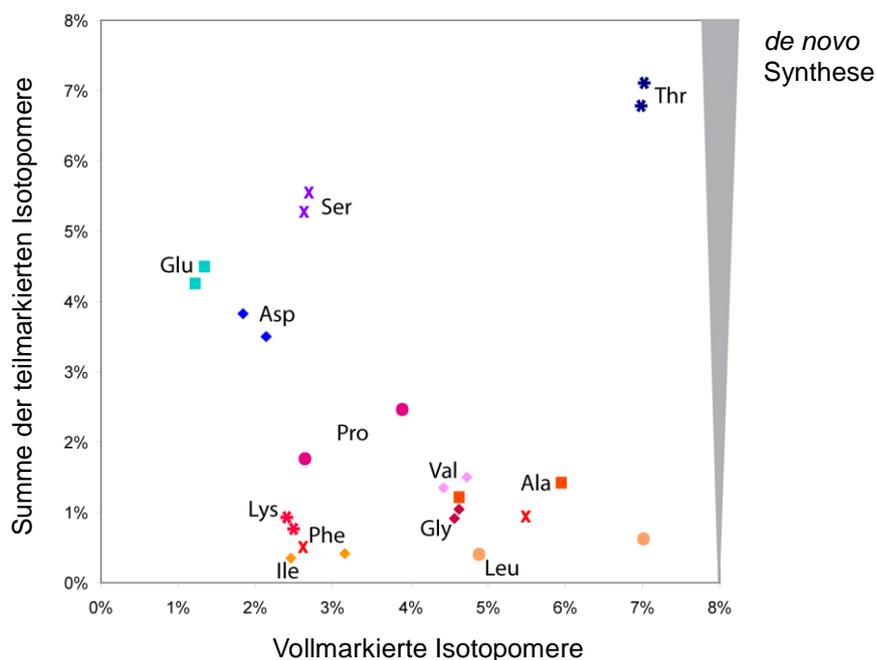


Abb. E.27. Anteil der Teilmarkierung bei Wachstum mit [U-¹³C]- Aminosäuren

Als signifikant gilt eine Markierung ab einem Wert von 0,5 % oder darüber. Die Grafik zeigt die Gegenüberstellung aller partiell markierten zu vollmarkierten Aminosäuren aus *P. aeruginosa* PAO1. Jeder Aminosäure sind zwei gleiche Farben/Zeichen zugeordnet worden, eine für die Inaktivierung durch PFA, die andere für die Inaktivierung durch Autoklavieren.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Methode der Inaktivierung gibt. Sowohl die Inaktivierung der Bakterien durch Autoklavieren als auch die Inaktivierung durch Inkubation mit 4 % PFA üN zeigten einen ähnlich hohen Anteil der gesamten Markierung (= Teil- + Vollmarkierung). Die Gesamtmarkierung ist mit 3,56 % bzw. 2,79 % beim Isoleucin am geringsten, beim Threonin mit 13,76 % bzw. 14,13 % am höchsten (Tab. E.6.).

Tab. E.6. Verteilung der Markierung von Aminosäure-Derivaten

AS-Derivat	Unmarkiert [%]		Teilmarkiert [%]		Vollmarkiert [%]		Gesamtmarkiert [%]	
	PFA	Autoklaviert	PFA	Autoklaviert	PFA	Autoklaviert	PFA	Autoklaviert
Ala-260	94,15	92,64	1,22	1,41	4,63	5,95	5,85	7,36
Asp-418	94,33	94,36	3,83	3,50	1,83	2,14	5,66	5,64
Glu-432	94,15	94,53	4,50	4,26	1,35	1,21	5,85	5,47
Gly-246	94,34	94,52	1,04	0,92	4,62	4,57	5,66	5,49
Ile-200	96,44	97,20	0,40	0,34	3,16	2,45	3,56	2,79
Leu-200	92,35	94,71	0,64	0,40	7,01	4,90	7,65	5,30
Lys-431	96,75	96,67	0,76	0,93	2,48	2,39	3,24	3,32
Phe-336	93,58	96,87	0,93	0,51	5,48	2,62	6,41	3,13
Pro-286	93,63	95,61	2,48	1,76	3,89	2,63	6,37	4,39
Ser-290	92,12	91,75	5,26	5,55	2,62	2,70	7,88	8,25
Thr-404	86,24	85,86	6,78	7,10	6,98	7,03	13,76	14,13
Val-288	94,22	93,78	1,36	1,49	4,43	4,72	5,79	6,21

Tabelle E.6. zeigt die Verteilung der Markierung von Aminosäuren, die zum einen aus der Probe „PFA“ und zum anderen aus der Probe „Autoklavieren“ stammen. Der größte Anteil besteht aus unmarkierten Aminosäuren (85,86 % - 97,20 %, Tab. E.6.), d.h. über diese Aminosäuren kann keine Aussage bezüglich ihrer Biosynthese getroffen werden.

Der Nachweis von vollmarkierten Aminosäuren (1,21 % - 7,03 %, Tab. E.6.) zeigt, dass die Aminosäuren aus dem Medium aufgenommen und direkt in Moleküle/Proteine eingebaut werden. Das bedeutet, dass eine Vollmarkierung nicht für einen Abbau und anschließende *de novo* Synthese bzw. eine Metabolisierung der Aminosäuren steht.

Der Anteil an teilmarkierten Aminosäuren (0,34 % - 7,10 % Tab. E.6.) spiegelt die Metabolisierung der aufgenommenen Aminosäuren wieder und ist somit für unsere Fragestellung interessant. Der detektierte Anteil an teilmarkierten Aminosäuren konnte nur durch Um- bzw. Einbau in neue Moleküle entstanden sein, d.h. die Teilmarkierungen (m+1, m+2, m+3, usw.) stellen also eine *de novo* Synthese der entsprechenden Aminosäuren dar. Es konnte eine *de novo* Synthese für die Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Thr und Val festgestellt werden (der Anteil an teilmarkierten AS betrug $\geq 0,5$ %, Tab. E.6.). Obwohl das ASM

reich an Aminosäuren (5 mg/ml), DNA (67,5 mg/ml) und Proteinen (Albumin 125 mg/ml, Muzin 20 mg/ml, FBS 1/100 (v/v)) ist, nimmt *P. aeruginosa* offensichtlich Aminosäuren auf und metabolisiert diese, um sie als Energiequelle und Bausteine nutzen zu können.

4.2. ¹³C-Markierungsmuster bei Wachstum mit Fettsäuren

Neben der Verwendung einer ¹³C-markierten Aminosäure-Mischung wurde ein weiteres ¹³C-markiertes Substrat genutzt, um den Basismetabolismus von *P. aeruginosa* zu untersuchen. In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl Aminosäure-Mischung als auch die Algenlipidmischung gut aufgenommen und verstoffwechselt werden. Die Verwendung der Aminosäure-Mischung hatte allerdings den Nachteil, dass der Anteil an vollmarkierten Aminosäuren unerwartet hoch war. Unter Verwendung des Algenlipids konnte die Vollmarkierung auf ein geringes Niveau gebracht werden ($\leq 0,27\%$, Tab. H.2. bzw. H.3.), so dass alle folgenden Experimente mit der ¹³C-markierten Algenlipidmischung durchgeführt wurden. Zudem ist bei Verwendung der Lipidmischung eine bessere Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Stoffeingang und Stoffausgang gegeben.

Das Algenlipid besteht aus insgesamt vier Fettsäuren: Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Ölsäure und Linolsäure (Certificate of analysis, Cambridge Isotope Laboratories, Inc; Andover, MA, USA), die jeweils voll markiert sind, d.h. jedes C-Atom ist ein ¹³C-Atom. Die Fettsäuren werden durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut, welches dann zu Intermediaten wie beispielsweise Oxalacetat oder Malat oxidiert wird. Bei Wachstum mit Fettsäuren oder Acetat ist das Bakterium gezwungen, den Kohlenstofffluss am Verzweigungspunkt des Isocitrats über den Glyoxylat-Zyklus zu leiten, um genügend Metabolite für den intermediären Stoffwechsel aufbauen zu können. Diese Intermediate dienen als Vorstufe für andere Biosynthesen, z.B. entsteht Glutamat aus α -Ketoglutarat. Damit die Kontinuität des Zyklus durch diese Entnahmen nicht unterbrochen wird, existieren o.g. Auffüllreaktionen (anaplerotische Reaktionen).

Durch die Verwendung von Fettsäuren in einer wässrigen Lösung (ASM) musste zunächst ein experimentelles System entwickelt werden, um die Fettsäuren durch Micellenbildung in eine wässrige Lösung zu bringen. Die [U-¹³C]-Algenlipidmischung wurde in Aceton gelöst und dem ASM zugegeben (Acetonanteil 1 %). Das sonst im ASM enthaltene Egg Yolk als Lipidquelle wurde durch eine analoge Konzentration von 1 g/L an vollmarkiertem Algenlipid ersetzt. Die ersten Experimente zeigten, dass mit dem ¹³C-markierten Algenlipid eine sehr hohe Anreicherung in der Zelle erreicht werden kann und dass die Supplementierung des Mediums generell möglich ist. Dies deutet auch auf eine gute zugängliche Kohlenstoffquelle der Fettsäuren für das Wachstum von *P. aeruginosa* hin. Eine Infektion des Respirationstraktes mit

P. aeruginosa führt zu schweren Entzündungen des Gewebes mit Zellnekrosen und Freisetzung von Lipiden. Die freigesetzten Lipide dienen *P. aeruginosa* als C-Quelle und zur Energiegewinnung (β -Oxidation).

Aufgrund der zuvor erreichten hohen Anreicherung wurde die Konzentration des Isotops auf 0,1 g/L gesenkt, die restlichen 0,9 g/L wurden mit den o.g. unmarkierten Fettsäuren aufgefüllt, welche durch Zugabe von 1 % Brij™58 [w/v] gelöst wurden.

Als erstes wurden beide Wildtypstämme (PAO1 und PA14) von *P. aeruginosa* unter aeroben Bedingungen in jeweils 1 L modifiziertem ASM bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase angezüchtet und abgeerntet. Mittels GC/MS-Technologie wurde anschließend aus dem Bakteriensediment das Isotopologmuster von Aminosäuren bestimmt (Abb. E.28., Rohdaten siehe Anhang, Tab. H.2.).

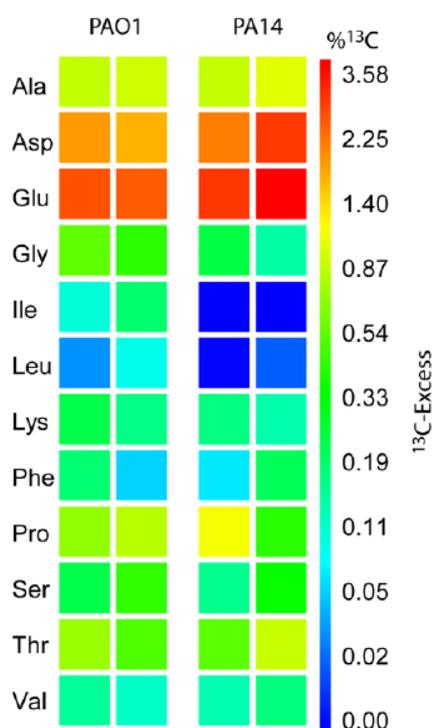


Abb. E.28. ¹³C-Anreicherung pro Aminosäure in *P. aeruginosa* unter aeroben Bedingungen.

Dargestellt sind je zwei unabhängige Experimente für die Stämme PAO1 und PA14. Der Farbcode gibt die ¹³C-Anreicherung in der entsprechenden Aminosäure wieder. Rot bedeutet eine hohe ¹³C-Anreicherung im Molekül, blau zeigt eine unmarkierte Aminosäure an. Ab einem Wert von 0,5 % gilt die Anreicherung als signifikant. Die Rohdaten zur Berechnung des Farbcodes sind in Tabelle H.2. (Anhang) aufgeführt.

Prinzipiell lässt sich sagen, dass der gewählte experimentelle Aufbau plausible und reproduzierbare Ergebnisse liefern kann. Unter Einsatz von vollmarkiertem Algenlipid konnte eine *de novo* Synthese von Ala, Asp, Glu, Pro und Thr für beide Wildtypstämme detektiert werden. Die Entstehung von m+2-Isotopologen kann durch eine entsprechende Markierung des Acetyl-CoAs und dessen Folgeprodukte erklärt werden. m+1-Isotope müssen dagegen über $^{13}\text{C}_1$ -Vorstufen (z.B. $^{13}\text{CO}_2$, $^{13}\text{C}_1$ -THF-Derivate) entstehen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass sich bei Verwendung des Algenlipids beide Wildtypstämme (PAO1 / PA14) im Isotopologmuster der untersuchten Aminosäuren ähneln, d.h. der Einbau von ^{13}C -Atomen in die untersuchten Aminosäuren unterscheidet sich zwischen beiden Wildtypstämmen nicht signifikant. Geringfügige Abweichungen im ^{13}C -Einbau zwischen PAO1 und PA14 kommen dennoch vor. Das m+1-Isotopolog von Aspartat ist im PA14-Wildtypstamm im Vergleich zum PAO1-Wildtypstamm um 1,4 % erhöht (PAO1: 2,47 %; PA14: 3,87 %; Durchschnittswerte errechnet aus Tab. H.2.). Daneben sind die m+1- bzw. m+2-Isotopologe von Glutamat im PAO1 Wildtypstamm um 1,03 % (m+1) und 1,59 % (m+2) im Vergleich zum PA14-Stamm erniedrigt (Durchschnittswerte errechnet aus Tab. H.2.). Die übrigen Unterschiede in den Isotopologmustern sind im Rahmen der Messtoleranz unbedeutend gering.

Für eine genaue Analyse der Stoffwechselwege von *P. aeruginosa* mittels NMR-Spektroskopie wurde exemplarisch der Wildtypstamm PAO1 verwendet, da nach den Ergebnissen der GC/MS-Analyse davon aus zu gehen ist, dass beide Wildtypstämme sich ähnlich verhalten. Dadurch besteht die Möglichkeit einer Rückverfolgung der Markierung bis zum Acetyl-CoA. Durch die entsprechende Markierung der Aminosäuren kann der Stoffwechselweg analysiert werden, auf dem die Aminosäuren entstanden sind. Dies wiederum lässt Rückschlüsse zwischen dem Stoffwechselweg und dem Substrat bzw. der Wachstumsbedingung zu. Abbildung E.29. zeigt das Ergebnis der NMR-Studien mit *P. aeruginosa* PAO1, der unter aeroben Standardbedingungen (37 °C, 200 Upm, Erlenmeyerkolben mit Schikanen) angezchtet und abgeerntet worden war, und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen für die Stoffwechselwege.

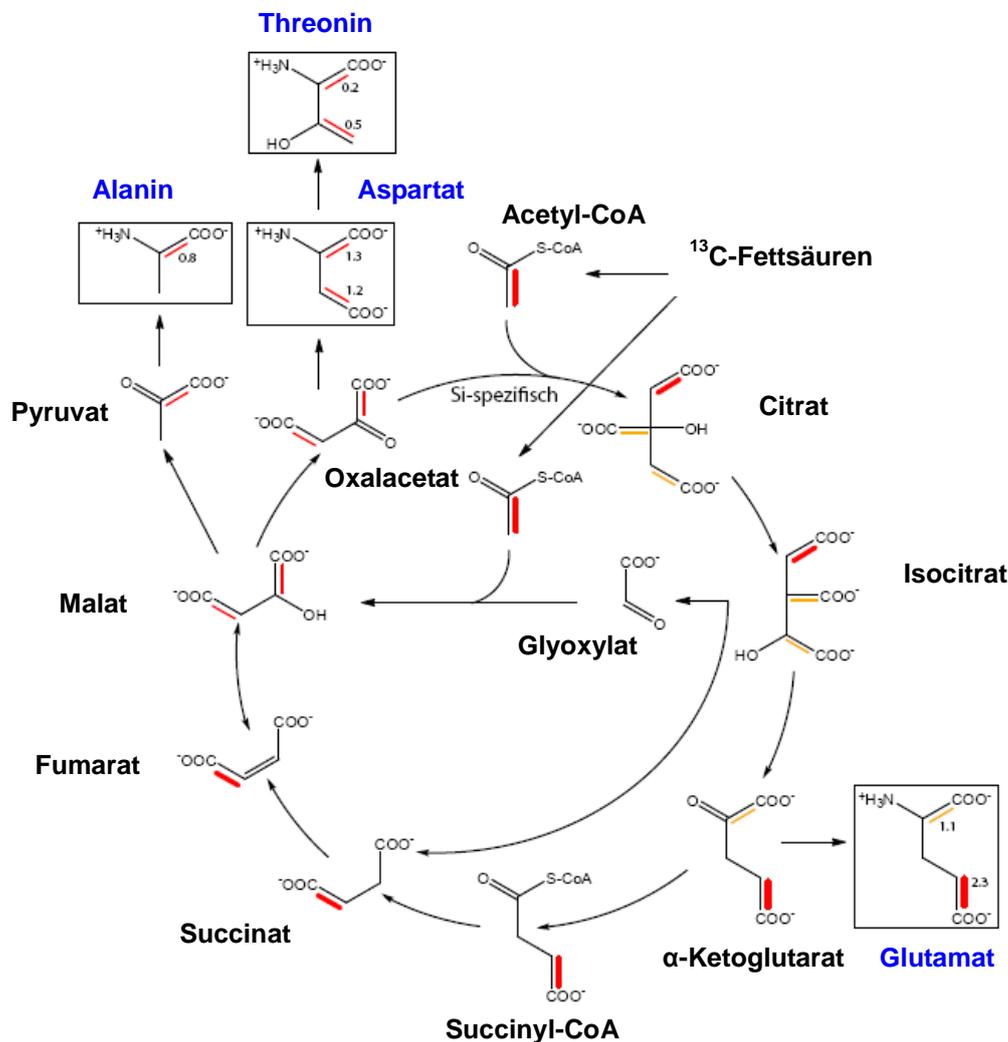


Abb. E.29. Citratzyklus von *P. aeruginosa* PAO1 bei Wachstum mit Fettsäuren

Die rote Markierung gibt die Position der ^{13}C -Atome im ersten Durchlauf des TCA-Zyklus wieder, die gelbe Markierung zeigt die Position im zweiten Durchlauf.

Lipide und Fettsäuren werden in *P. aeruginosa* über eine Ligase (FadD; E.C. 6.2.1.3.) aufgenommen, welche unter ATP- mit Koenzym A zu Thioestern für die anschließende β -Oxidation umgewandelt werden (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:6.2.1.3). Das aus der β -Oxidation entstehende Acetyl-CoA wird in den TCA-Zyklus eingespeist und metabolisiert. Acetyl-CoA dient zusammen mit Oxalacetat der Citratsynthese als Substrat. Das Enzym weist in *P. aeruginosa* eine Si-spezifische Stereochemie auf. Die C1-C2-Markierung des Acetyl-CoAs spiegelt sich in der C1-C2-Position beim Citrat und Isocitrat wieder. Durch die Umsetzung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat durch die Isocitratdehydrogenase entsteht NADPH

und CO₂. Die Markierung im α-Ketoglutarat (C4-C5) resultiert aus der Position des Isotops im Isocitrat (C1-C2). Glutamat kann durch zwei Reaktionen aus α-Ketoglutarat entstehen: (i) Reduktiver Einbau eines Ammoniumions durch die Glutamatdehydrogenase (GDH) (ii) Entstehung von Glutamat aus Glutamin und α-Ketoglutarat, katalysiert durch das Enzym Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT), auch als Glutamat-Synthase bekannt. Sowohl die Glutamatdehydrogenase (PA3068, PA4588) als auch die Glutamat-Synthase (PA5035; PA5036) kommen in *P. aeruginosa* PAO1 vor (<http://www.pseudomonas.com>). Die ¹³C-Markierung von α-Ketoglutarat (C4-C5) konnte im Glutamat an der Stelle C4-C5 detektiert werden. Bei der Generierung von Succinat (C4-Körper) verlässt ein C-Atom in Form von CO₂ den Zyklus, so dass sich das Isotop am C3-C4 des Succinats befindet. Da Succinat eine innere Spiegelebene hat, verteilt sich die Markierung im Malat auf C3-C4 oder C1-C2, d.h. es kann nicht genau bestimmt werden, ob ein C3-C4-Isotopolog oder ein C1-C2-Isotopolog des Malats vorliegt. Aus Malat kann Pyruvat mit einer Markierung am C1-C2 generiert werden (*'malic enzyme'*). Die [1,2-¹³C₂]-Markierung des Pyruvats zeigt sich schließlich im [1,2-¹³C₂]-markierten Alanin wieder. Ausgehend vom Pyruvat entstehen auch die Aminosäuren Valin und Leucin (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00290.html>). Aus Pyruvat kann über Oxalacetat 3-Phosphoglycerat synthetisiert werden, welches als Vorstufe der Aminosäuren Serin, Cystein und Glycin dient. Ausgehend vom C3-C4- oder C1-C2-markierten Malat entsteht Oxalacetat, welches ebenso entweder am C3-C4 oder am C1-C2 markiert ist. Aus den vorliegenden Ergebnissen sollte Aspartat aus Oxalacetat entstanden sein, da das Aspartat ebenso wie Oxalacetat entweder als [1,2-¹³C₂]- oder als [3,4-¹³C₂]-Isotopolog vorlag. Darüber hinaus entstehen aus Oxalacetat auch die Aminosäuren Lysin, Threonin und Isoleucin.

Neben den detektierten Isotopologmustern der Aminosäuren aus NMR-Analysen waren zusätzliche Signale aufgefallen, die schließlich dem Nukleosid Cytidin zugeordnet wurden. Dies konnte durch einen Vergleich der Resonanzenergien mit einer Referenzprobe bestätigt werden. Die Detektion von Cytidin war überraschend, da Nukleoside normalerweise in der Probenaufbereitung (saure Hydrolyse) zerfallen. Interessanterweise waren nur ¹³C-Signale von Cytidin vorhanden, Thymin, Adenosin und Guanosin konnten nicht detektiert werden. Abbildung E.30. zeigt das gemessene ¹³C-NMR-Spektrum von Cytidin aus *P. aeruginosa* PAO1.

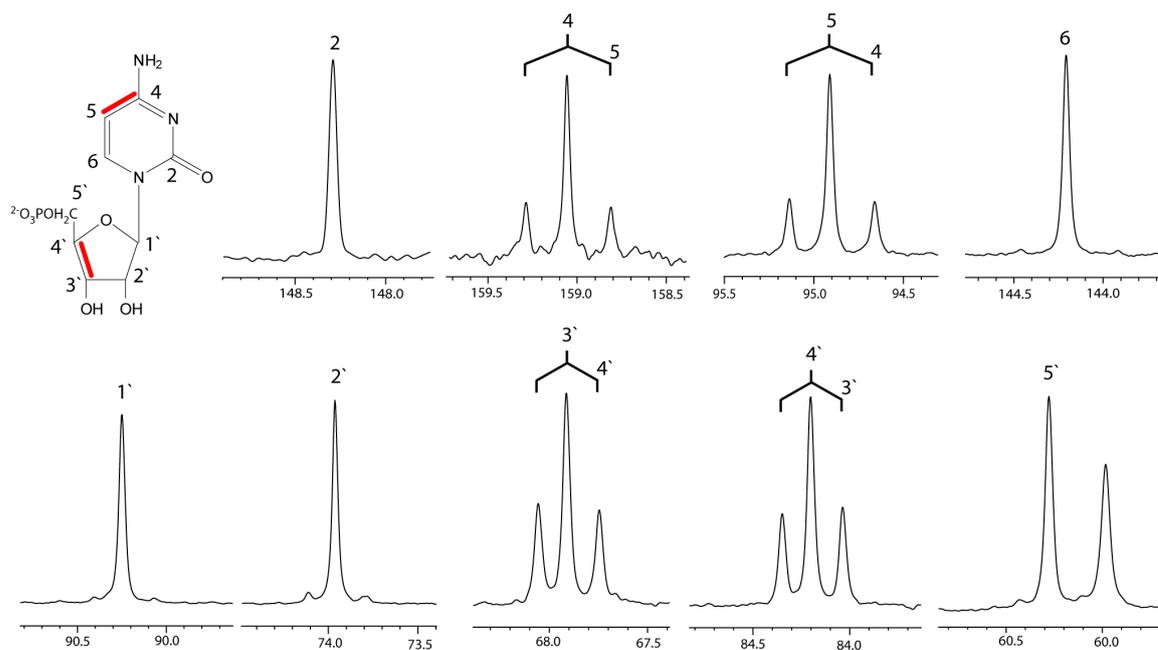


Abb. E.30. ^{13}C -NMR-Spektrum von Cytidin

Die in der Strukturformel rot markierten C-Atome spiegeln die Position der Isotope wieder. Die obere Zeile zeigt die NMR-Signale des Pyrimidinrings, die untere Zeile stellt die Signale der Ribose dar. Die Ziffern über den Signalen geben das entsprechende C-Atom im Molekül wieder. Grafik durch Dr. Eva Eylert, Abt. Biochemie, TU München überlassen.

In der oberen Zeile der Abbildung E.30. sind die NMR-Signale des Pyrimidinrings abgebildet. Aufgrund der Satellitensignale von C4 und C5, die durch ^{13}C - ^{13}C Kopplung zustande kommen, kann ein $[4,5\text{-}^{13}\text{C}2]$ -Isotopolog identifiziert werden. Eine ^{13}C -Kopplung konnte ebenfalls für C3' und C4' im Ribosering und somit ein $[3',4'\text{-}^{13}\text{C}2]$ -Cytidin detektiert werden. Diese NMR-Daten stellen die Grundlage für die folgenden Ableitungen der Synthesewege des Cytidins in *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. E.31.).

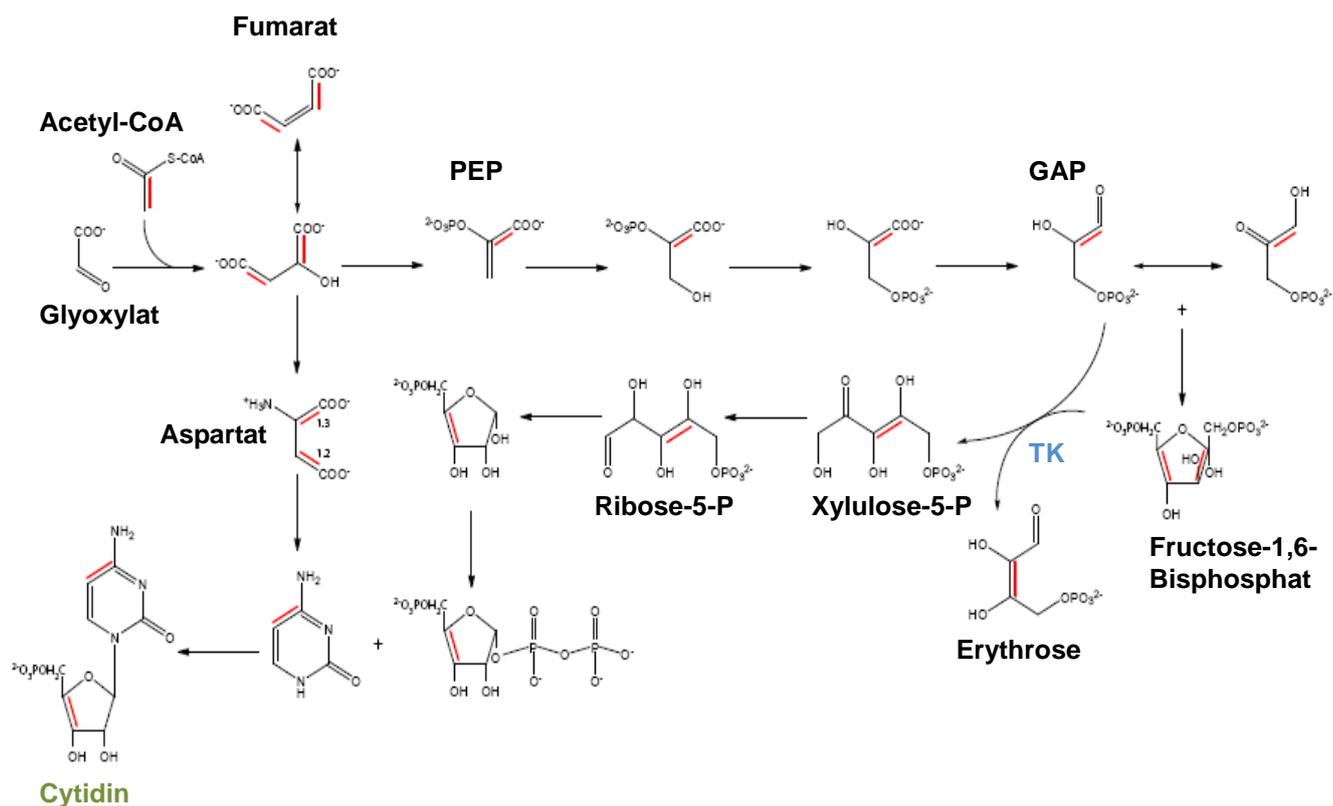


Abb. E.31. Cytidin-Biosyntheseweg in *P. aeruginosa* PAO1

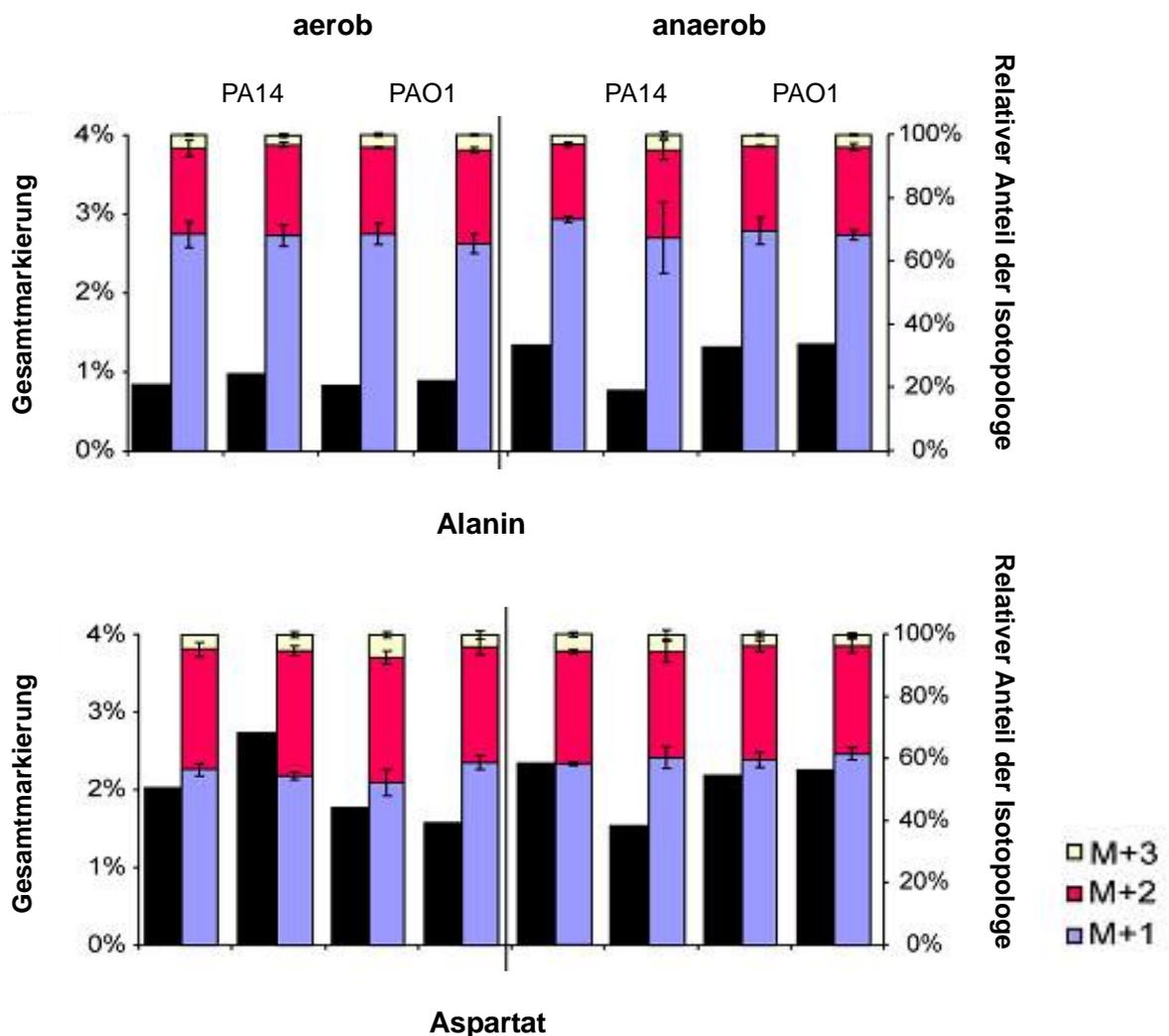
Die rote Markierung gibt die Position der ¹³C-Atome wieder. Der Pyrimidinring entsteht aus Aspartat, die Ribose über den Pentose-Phosphat-Weg. PEP = Phosphoenolpyruvat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, TK = Transketolase-Reaktion.

Ausgehend vom Fumarat bzw. Acetyl-CoA/Glyoxylat entsteht zunächst Malat. Die Bildung des Pyrimidinrings erfolgt über Aspartat aus Oxalacetat. Die Synthese der Ribose erfolgt durch den Pentose-Phosphat-Weg: das [1,2-¹³C₂]-Isotopolog des Glycerinaldehyd-3-Phosphats (GAP, C₃-Körper) entsteht vermutlich aus einer C₄-Vorstufe. Durch Reaktion der Transketolase (TK) wird ein C₂-Körper von der [2,3-¹³C₂]- bzw. [4,5-¹³C₂]-markierten Fructose abgespalten. Zusammen mit dem markierten GAP bildet der C₂-Körper die [3,4-¹³C₂]- bzw. [2-¹³C₂]-Xylulose-5-P. Die [1,2-¹³C₂]-Markierung des GAP ist in der Erythrose wieder zu finden. Schließlich bildet Ribose-5-P zusammen mit dem Pyrimidinring das Nucleosid Cytidin.

Insgesamt konnte durch die NMR-Analysen nicht nur der Aminosäurestoffwechsel detailliert abgebildet werden, sondern auch der Aufbau von Zuckern über den Pentose-Phosphat-Weg eindeutig belegt werden.

4.3. ^{13}C -Markierungsmuster unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Bei *E. coli* erfolgt eine klassische Aufteilung des Kohlenstoffflusses unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen. Während der TCA-Zyklus unter Sauerstoffanwesenheit die Energie- und NAD(P)H-Versorgung aufrecht erhält, wird Acetyl-CoA bei Sauerstoffmangel oder Wachstum mit Acetat/Fettsäuren über den Glyoxylat-Zyklus zu Succinat und Glyoxylat umgesetzt und der TCA-Zyklus kommt zum Erliegen. Es ist bekannt, dass *P. aeruginosa* in der nahezu anaeroben Umgebung in der CF-Lunge in Biofilm-assoziierten Makrokolonien persistiert und dort bevorzugt Lipide als Energiequelle benutzt, die durch absterbende Granulozyten in großen Mengen freigesetzt werden. Daher war zu überprüfen, ob mittels der Methode des 'Isotopologue profilings' ein Unterschied zwischen aeroben Bedingungen (= Abbau über TCA-Zyklus) und anaeroben Bedingungen (= Abbau über Glyoxylat-Zyklus) abgebildet werden kann. Hierfür wurden die Wildtypstämme PAO1 und PA14 unter Sauerstoffan- bzw. -abwesenheit angezogen und abgeerntet (vgl. Kapitel D, 7.2.). Abbildung E.32. zeigt die Isotopologverteilung (m+1, m+2, m+3) und die Gesamtmarkierung von Alanin, Aspartat und Glutamat unter aeroben und anaeroben Bedingungen der Wildtypstämme PAO1 und PA 14.



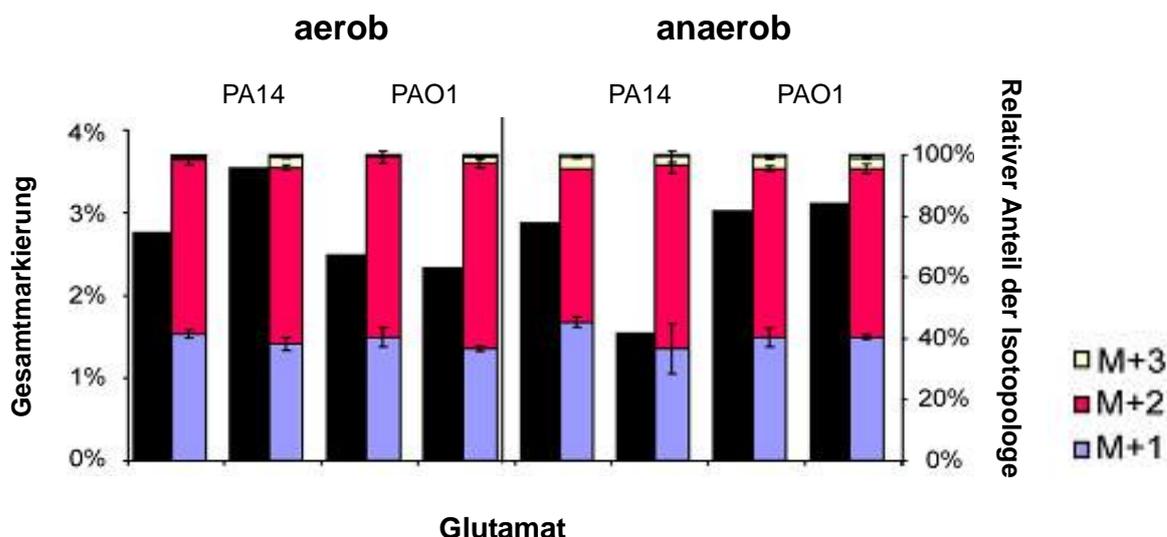


Abb. E.32. Isotopologverteilung unter aeroben und anaeroben Bedingungen von *P. aeruginosa* PAO1 und PA14.

In schwarz ist die Gesamtmarkierung (= Teil- und Vollmarkierung) dargestellt, in blau, rot bzw. weiß der relative Anteil der jeweiligen Isotope (m+1, m+2, m+3). Auf die Darstellung aller anderen Aminosäuren wurde verzichtet, da es keinen relevanten Unterschied zwischen den Bedingungen bzw. zwischen den Stämmen gab. Von jedem Stamm wurde mindestens ein Replikat angefertigt.

In Abbildung E.32. ist die Gesamtmarkierung auf der linken Skala und als schwarze Balken dargestellt, die rechte Skala bezeichnet den relativen Anteil der Isotopologen dazu. Beispielsweise bedeuten 4 % der linken Skala 4 % ^{13}C -Überschuss (d.h. 4 % ^{13}C -Atome und 96 % ^{12}C -Atome im gesamten Molekül), wobei in diesen 4 % alle vorkommenden Isotopologe im Überschuss zur natürlichen Anreicherung enthalten sind. Im Gegensatz dazu bedeuten z.B. 40 % M+1 (blauer Balken) der rechten Skala, dass 40 % der Gesamtmarkierung das Isotopolog mit einem ^{13}C -Atom tragen.

Der Unterschied zwischen den Bedingungen „aerob“ und „anaerob“ fällt geringer aus, als der Unterschied zwischen den biologischen Replikaten. Das bedeutet, dass es zwischen aerob und anaerob keinen signifikanten Unterschied gibt. Vielmehr sind die Ergebnisse aus beiden Bedingungen als ähnlich einzustufen. Zudem ist erwartungsgemäß zwischen den beiden Wildtypstämmen kein größerer Unterschied in der Isotopologverteilung als auch in der Gesamtmarkierung zu erkennen. Die Genome beider Wildtypstämmen weisen zueinander eine hohe Homologie auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie sich in ihren Genprodukten bzw. in ihrem Metabolismus sehr ähneln. Damit lässt sich erklären, dass die Stämme untereinander keine nennenswerten Unterschiede aufweisen.

4.4. ¹³C- Markierungsmuster der Patientenisolat M1 und M26

Nach erfolgreicher Etablierung des 'Isotopologue Profiling' für *P. aeruginosa* wurden im Rahmen dieser Arbeit neben den Wildtypstämmen PAO1 und PA14 auch die Aminosäuremuster zweier Patientenisolat untersucht. Der Vergleich Non-Mutator (M1) vs. Mutator (M26) sollte Aufschlüsse über die metabolische Anpassung des Mutatorstammes im Kontext der Mukoviszidose geben. Transkriptomdaten der späten Patientenisolat zeigten eine signifikante Erhöhung von Genexpressionen, die dem intermediären Stoffwechsel zugeordnet werden konnten (Hoboth *et al.*, 2009). Demnach lässt sich eine Anpassung des Metabolismus der Mutatorstämme an das heterogene Habitat der CF-Lunge vermuten. Um eine solche Anpassung des Mutatorstammes M26 nicht nur auf transkriptioneller Ebene abzubilden, sollten mittels des 'Isotopologue Profiling' Unterschiede im Aminosäuremuster identifiziert werden. Hierfür wurden beide Patientenisolat in jeweils einem Liter ASM mit 0,1 g/L vollmarkiertem Algenlipid unter Standardbedingungen angezchtet und abgeerntet. Diese Proben wurden einer GC/MS-Analyse unterzogen. Durch den Vergleich des Stoffwechsels des deutlich adaptierten Mutatorstammes M26 und des Non-Mutatorstammes M1 sollten evtl. vorhandene Unterschiede im Aminosäuremetabolismus aufgezeigt werden.

Verglichen wurde die gemittelte Gesamtmarkierung von Aminosäuren der beiden Patientenisolat, d.h. alle vorhandenen Isotope werden mit der Anzahl der im Molekül vorkommenden ¹³C-Atome multipliziert und anschließend addiert [(m+1)·1 + (m+2)·2 + (m+3)·3, usw.]. Die Summe wird durch die Anzahl der vorkommenden Isotope geteilt. Die Rechenformel sowie ein Beispiel für die Aminosäure Alanin aus dem Non-Mutatorstamm M1 sind nachfolgend dargestellt.

$$\text{Gemittelte Gesamtmarkierung} = \frac{[(m+1) \cdot 1 + (m+2) \cdot 2 + (m+3) \cdot 3]}{3}$$

Derivat	Isotope	Markierung	Gemittelte Gesamtmarkierung
Ala-260	{YYY}1	0,0123614	0,0123614 · 1 = 0,0123614
	{YYY}2	0,0057396	0,0057396 · 2 = 0,0114792
	{111}	0,0008821	0,0008821 · 3 = 0,0026463
			0,0264869 : 3 = 0,0088
			(entspricht 0,88 %)

Tabelle E.7. / E.8. bzw. Abbildung E.33. zeigt das Ergebnis der gemittelten Gesamtmarkierung der Patientenisolat M1 bzw. M26 aus GC/MS-Experimenten.

Tab. E.7. Gemittelte Gesamtmarkierung des Patientenisolats M1

AS-Derivat	Isotopolog	M1		M1 Wdh.	
		Markierung	Gemittelte Gesamtmarkierung	Markierung	Gemittelte Gesamtmarkierung
Ala-260	{YYY}1	0,0123614	0,88 %	0,0141120	0,99 %
	{YYY}2	0,0057396		0,0062491	
	{111}	0,0008821		0,0010235	
Asp-418	{YYYY}1	0,0290476	1,95 %	0,0320982	2,04 %
	{YYYY}2	0,0217085		0,0221475	
	{YYYY}3	0,0017778		0,0017585	
	{1111}	0,0000529		0,0000000	
Glu-432	{YYYYY}1	0,0274386	2,28 %	0,0296215	2,75 %
	{YYYYY}2	0,0379394		0,0489753	
	{YYYYY}3	0,0027910		0,0022279	
	{YYYYY}4	0,0005604		0,0006338	
	{11111}	0,0000237		0,0001854	
Gly-246	{YY}1	0,0025770	0,40 %	0,0040702	0,49 %
	{11}	0,0026845		0,0028678	
Ile-200	{XYYYYY}1	0,0000000	0,06 %	0,0000000	0,18 %
	{XYYYYY}2	0,0004783		0,0001644	
	{XYYYYY}3	0,0000000		0,0000263	
	{XYYYYY}4	0,0000000		0,0000000	
	{X11111}	0,0003958		0,0017146	
Leu-274	{XYYYYY}1	0,0023499	0,08 %	0,0022853	0,05 %
	{XYYYYY}2	0,0007026		0,0000000	
	{XYYYYY}3	0,0000316		0,0000000	
	{XYYYYY}4	0,0000000		0,0000000	
	{X11111}	0,0000787		0,0000003	
Lys-431	{YYYYYY}1	0,0001803	0,26 %	0,0000000	0,14 %
	{YYYYYY}2	0,0005402		0,0000000	
	{YYYYYY}3	0,0041924		0,0027558	
	{YYYYYY}4	0,0000000		0,0000000	
	{YYYYYY}5	0,0000000		0,0000000	
	{111111}	0,0002994		0,0000000	
Phe-336	{YYYYYYYY}1	0,0000000	0,32 %	0,0000000	0,06 %
	{YYYYYYYY}2	0,0007916		0,0000000	
	{YYYYYYYY}3	0,0010562		0,0000000	
	{YYYYYYYY}4	0,0014628		0,0012735	
	{YYYYYYYY}5	0,0014794		0,0000000	
	{YYYYYYYY}6	0,0000000		0,0000000	
	{YYYYYYYY}7	0,0012530		0,0000000	
	{YYYYYYYY}8	0,0000000		0,0000000	
	{11111111}	0,0002271		0,0000000	
Pro-286	{YYYYY}1	0,0000000	1,14 %	0,0000000	0,83 %
	{YYYYY}2	0,0003493		0,0000000	
	{YYYYY}3	0,0025465		0,0021878	
	{YYYYY}4	0,0114102		0,0087714	
	{11111}	0,0005764		0,0000000	
Ser-390	{YYY}1	0,0136739	0,70 %	0,0074652	0,55 %
	{YYY}2	0,0027024		0,0017744	
	{111}	0,0006369		0,0018360	

Thr-404	{YYYY}1	0,0017075	0,84 %	0,0100318	0,58 %
	{YYYY}2	0,0160214		0,0065658	
	{YYYY}3	0,0000000		0,0000000	
	{1111}	0,0000000		0,0000000	
Val-288	{YYYYY}1	0,0047882	0,16 %	0,0040710	0,10 %
	{YYYYY}2	0,0009080		0,0003293	
	{YYYYY}3	0,0000466		0,0000245	
	{YYYYY}4	0,0002529		0,0000268	
	{11111}	0,0000272		0,0000000	

Tab. E.8. Gemittelte Gesamtmarkierung des Patientenisolats M26

AS-Derivat	Isotopolog	M26		M26 Wdh.	
		Markierung	Gemittelte Gesamtmarkierung	Markierung	Gemittelte Gesamtmarkierung
Ala-260	{YYY}1	0,0174214	1,24 %	0,0168173	1,20 %
	{YYY}2	0,0087746		0,0080494	
	{111}	0,0007582		0,0010210	
Asp-418	{YYYY}1	0,0140428	1,26 %	0,0205106	1,32 %
	{YYYY}2	0,0138489		0,0141845	
	{YYYY}3	0,0029428		0,0013205	
	{1111}	0,0000000		0,0000000	
Glu-432	{YYYYY}1	0,0223695	2,12 %	0,0199318	2,14 %
	{YYYYY}2	0,0408723		0,0398183	
	{YYYYY}3	0,0000000		0,0014344	
	{YYYYY}4	0,0000695		0,0005288	
	{11111}	0,0003506		0,0002105	
Gly-246	{YY}1	0,0055446	0,92 %	0,0067064	0,94 %
	{11}	0,0064111		0,0060373	
Ile-200	{XYYYYY}1	0,0000000	0,08 %	0,0000000	0,14 %
	{XYYYYY}2	0,0000000		0,0001597	
	{XYYYYY}3	0,0000002		0,0000000	
	{XYYYYY}4	0,0000000		0,0000000	
	{X11111}	0,0008394		0,0013205	
Leu-274	{XYYYYY}1	0,0040942	0,12 %	0,0043108	0,10 %
	{XYYYYY}2	0,0008803		0,0004340	
	{XYYYYY}3	0,0000148		0,0000000	
	{XYYYYY}4	0,0000000		0,0000000	
	{X11111}	0,0000068		0,0000004	
Lys-431	{YYYYYY}1	0,0001816	0,24 %	0,0000000	0,14 %
	{YYYYYY}2	0,0036935		0,0000000	
	{YYYYYY}3	0,0023642		0,0027611	
	{YYYYYY}4	0,0000000		0,0000000	
	{YYYYYY}5	0,0000000		0,0000000	
	{111111}	0,0000000		0,0000000	
Phe-336	{YYYYYYYYY}1	0,0218794	0,30 %	0,0023409	0,09 %
	{YYYYYYYYY}2	0,0000000		0,0000000	
	{YYYYYYYYY}3	0,0000000		0,0000000	
	{YYYYYYYYY}4	0,0013201		0,0014052	
	{YYYYYYYYY}5	0,0000000		0,0000000	
	{YYYYYYYYY}6	0,0000000		0,0000000	

	{YYYYYYYYY}7	0,0000000		0,0000000	
	{YYYYYYYYY}8	0,0000000		0,0000000	
	{111111111}	0,0000000		0,0000000	
Pro-286	{YYYYY}1	0,0004864	0,81 %	0,0017187	1,21 %
	{YYYYY}2	0,0007833		0,0004729	
	{YYYYY}3	0,0023435		0,0025637	
	{YYYYY}4	0,0078364		0,0124905	
	{11111}	0,0000000		0,0000000	
Ser-390	{YYY}1	0,0014853	0,44 %	0,0142073	1,09 %
	{YYY}2	0,0003471		0,0062021	
	{111}	0,0036531		0,0020583	
Thr-404	{YYYY}1	0,0307378	1,29 %	0,0164742	1,03 %
	{YYYY}2	0,0104620		0,0123846	
	{YYYY}3	0,0000000		0,0000000	
	{1111}	0,0000000		0,0000000	
Val-288	{YYYYY}1	0,0003316	0,01 %	0,0009454	0,04 %
	{YYYYY}2	0,0000700		0,0001230	
	{YYYYY}3	0,0000457		0,0001054	
	{YYYYY}4	0,0000217		0,0000835	
	{11111}	0,0000035		0,0000000	

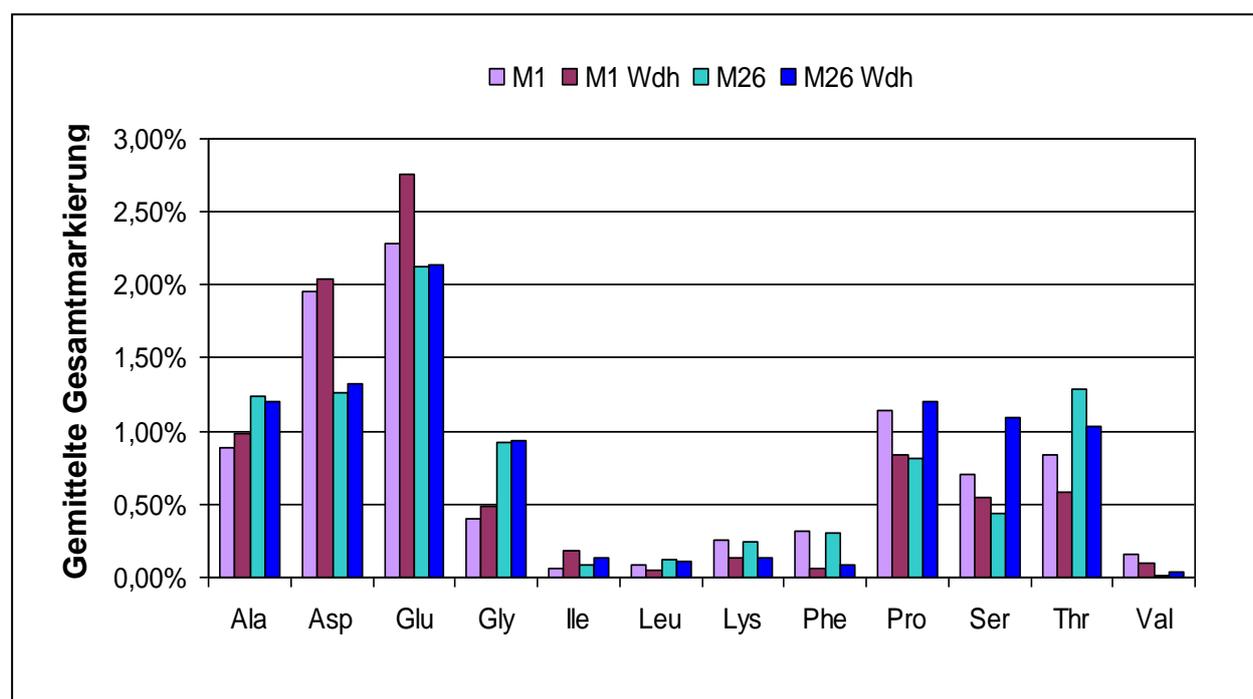


Abb. E.33. Gemittelte Gesamtmarkierung der CF-Patientenisolate M1 und M26

In rot ist der Non-Mutatorstamm M1 (frühes Isolat) dargestellt, in blau der Mutatorstamm M26 (spätes Isolat). Von jedem Stamm wurde mindestens ein Replikat erstellt.

In beiden Patientenisolaten werden die Aminosäuren Ile, Leu, Lys, Phe und Val in nur geringem Maße neu synthetisiert, die gemittelte Gesamtmarkierung liegt hier zwischen 0,01 – 0,32 % (Tab. E.7./E.8.). Signifikante Unterschiede waren hier nicht erkennbar, die Schwankungen innerhalb eines Isolats waren z.T. größer als zwischen Mutator- und Non-Mutatorstamm (z.B. Lys, Phe, Leu, Abb. E.33). Dagegen werden die Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser und Thr deutlich stärker synthetisiert, bis zum Maximum von 2,75 % beim Glutamat (Non-Mutatorstamm M1, Tab. E.7.).

Beim Vergleich beider Stämme zeigte sich eine Erhöhung der Alanin- und Glycinsynthese im Mutatorstamm M26. Im Durchschnitt war die Alaninsynthese um ca. 30 %, die Glycinsynthese um ca. 109 % gegenüber dem Non-Mutatorstamm M1 erhöht. Dagegen war im Mutatorstamm M26 die Synthese von Aspartat im Vergleich zum Non-Mutatorstamm M1 um etwa 35 % erniedrigt. Auffallend war auch, dass die Neusynthese von Glutamat in beiden Stämmen die höchste Syntheserate aller Aminosäuren aufwies (2,28 % bzw. 2,75 % bei M1, 2,12 % bzw. 2,14 % bei M26), einen deutlichen Unterschied gab es aber bei der Glutamatsynthese zwischen beiden Patientenisolaten nicht.

Insgesamt zeigen die Daten, dass sich der Aminosäurestoffwechsel zwischen Mutator- und Non-Mutatorstamm in einigen Punkten signifikant unterscheiden. Dies deutet auf eine Anpassung des Stoffwechsels des Mutatorstammes an das heterogene Habitat der CF-Lunge hin.

F. Diskussion

1. Sauerstoffabhängige Regulation metabolischer Gene von *P. aeruginosa*

Anhand von Transkriptom- und Proteomdaten konnte gezeigt werden, dass Mutatorstämme von *P. aeruginosa* während der Selektion in der chronisch-infizierten CF-Lunge zahlreiche phäno- und genotypische Veränderungen durchlaufen. Diese weitreichenden Veränderungen in der Physiologie von *P. aeruginosa* werden allgemein als Habitatanpassung an die besonderen Bedingungen der CF-Lunge interpretiert (Hogardt und Heesemann, 2010). Das bessere Verständnis der Adaptationsmechanismen und der resultierenden pulmonalen Persistenz von *P. aeruginosa* ist für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur antibiotischen Therapie und zur Prävention der chronischen Lungeninfektion bei CF von entscheidender Bedeutung und zentrales Thema dieser Doktorarbeit.

Interessanterweise ist die Anpassung an die CF-Lunge mit der Veränderung der Expression zahlreicher metabolischer Gene von *P. aeruginosa* betroffen (Hoboth *et al.*, 2009). So sind in Mutatorstämmen des Endstadiums der Lungeninfektion verschiedene Gene für Enzyme des TCA-Zyklus, des Glyoxylat-Zyklus sowie des Lipid- und Aminosäurestoffwechsels verstärkt exprimiert. Dies deutet auf eine breite metabolische Adaptation von *P. aeruginosa* an die besonderen Nährstoffbedingungen des CF-Mucus hin. Die in der CF-Lunge vorherrschenden Bedingungen sind das Resultat der polymikrobiellen Infektion, der chronischen Entzündung und fortschreitenden Gewebedestruktion. Diese Bedingungen sind durch die Dynamik dieser Prozesse wahrscheinlich sehr heterogen und einem stetigen Wechsel unterworfen. Mit Hilfe des artifiziellen Sputummediums (ASM) können die metabolischen Bedingungen der CF-Lunge *in vitro* zumindest teilweise simuliert werden, was zu einem besseren Verständnis der phäno- und genotypischen Habitatanpassung von *P. aeruginosa* beiträgt. Sriramulu und Kollegen (2005) konnten zeigen, dass *P. aeruginosa* in ASM in Biofilm-ähnlichen Makrokolonien wächst und ähnliche Expressionsprofile bzw. Quorum-Sensing-Aktivität wie bei CF-Isolaten zeigt. Sputum von CF-Patienten enthält reichlich Mucin, Lipide, Proteine, Aminosäuren und DNA. Mucin ist ein wesentlicher Bestandteil der 'airway surface liquid' (ASL) und wird von speziellen Zellen des Lungenepithels produziert. Die ASL kleidet als dünne Schicht das Lungenepithel aus und trägt wesentlich zur Funktionalität der mukoziliären Reinigung bei. In Atemwegssekreten von CF-Patienten ist die ASL aufgrund des defizienten CFTR-Kanals eingedickt und hoch viskos, so dass ein effektives Beseitigen von Fremdkörpern und Bakterien nicht mehr möglich ist. Durch den fortschreitenden Zerfall des Lungengewebes bei CF-Patienten entstehen weitere

Nährstoffquellen wie Proteine und Aminosäuren. Zusätzlich werden die in entzündliche Bereiche eingewanderten neutrophilen Granulozyten zerstört (Nekrose, Pyroptose), was zu einer Freisetzung von DNA und Lipiden führt. Diese stehen *P. aeruginosa* ebenfalls als Energiequelle zur Verfügung.

Neben der Nährstoffzusammensetzung des CF-Mucus spielt die Verfügbarkeit von Sauerstoff in der Lunge im Rahmen der metabolischen Anpassung von *P. aeruginosa* eine wesentliche Rolle. *In vivo* Messungen mittels einer Sauerstoffelektrode zeigten einen Sauerstoffgradienten bis hin zu anaeroben Bedingungen in der Tiefe des eingedickten CF-Mucus (Worlitzsch *et al.*, 2002). In Übereinstimmung hierzu steht die Selektion anaerober Markergene in Mutatorstämmen (z.B. *ccpR*, *azu*, *oprF*, *anr*, u.a.; Hoboth *et al.*, 2009). Ein wesentlicher Faktor bei der Regulation von Genen, die unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden, ist der Transkriptionsfaktor ANR (engl. '*anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction*'). In voran gegangenen RT-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass ANR in späten Mutatorstämmen signifikant hoch reguliert ist (Hoboth *et al.*, 2009), so dass die Anpassung der ANR-Expression die verstärkte Transkription sauerstoffabhängiger metabolischer Gene direkt oder indirekt erklären könnte.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 13 Gene, welche zuvor in späten Mutatorstämmen als verstärkt exprimiert beschrieben wurden, auf Ihre ANR-Abhängigkeit hin untersucht. Für die Analysen wurden dabei v.a. solche Gene ausgewählt, die an wichtigen metabolischen Schnittstellen im bakteriellen Stoffwechsel lokalisiert sind (TCA-Zyklus, Atmungskette, Transkriptionsfaktoren, Nitrataufnahme). Alle Experimente wurden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, um die mögliche sauerstoffabhängige Expression der Gene beschreiben zu können. Dabei sollte mittels LacZ-Reportergenkonstrukten die Genexpression unter den genannten Bedingungen untersucht werden.

Exemplarische Sauerstoffmessungen von *P. aeruginosa* PAO1 *picdlacZ* zeigten, dass unter anaeroben Wachstumsbedingungen die Sauerstoffkonzentration innerhalb der ersten zwei Stunden auf < 0,03 % (Messgrenze) abnahm. Unter aeroben Wachstumsbedingungen fiel die Sauerstoffkonzentration während der exponentiellen Wachstumsphase auf < 0,03 % ab, stieg aber in der stationären Wachstumsphase wieder auf die Ausgangskonzentration von ca. 18 % an. Vermutlich ist die initiale Abnahme der Sauerstoffkonzentration auf den starken Verbrauch während des exponentiellen Wachstums der Bakterien zurückzuführen, bei gleichzeitig geringerer Diffusion von Sauerstoff ins Medium und trotz starken Schüttelns bei 200 Upm. Erst bei Erreichen der stationären Phase stagniert das bakterielle Wachstum und somit der Sauerstoffverbrauch, so dass die Sauerstoffkonzentration im Medium wieder auf das Ausgangsniveau ansteigen kann und dann konstant bleibt. Die Probenahme der LacZ-Experimente erfolgte daher 17 Stunden nach Inokulation und somit unter aeroben

Bedingungen, wobei die Bakterien kurzzeitig auch anaeroben Bedingungen ausgesetzt waren. Die Reporteraktivität stellt eine Querschnittsmessung bzw. einen Mittelwert dar, da das gebildete Reportergenkonstrukt über mehrere Stunden stabil ist und in der Zelle akkumuliert. Das im pMP220-Plasmid eingesetzte *lacZ*-Gen entstammt dem Genom von *E. coli* (Spaink *et al.*, 1987). Es ist davon auszugehen, dass der kurzfristige Sauerstoffmangel während der aeroben Wachstumsexperimente nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Reporteraktivität hat. Der Vergleich von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen sollte geeignet sein, die sauerstoffabhängige Genexpression zu untersuchen. Dies belegen die Ergebnisse der LacZ-Reporterfusionen mit den Genen *azu* (redoxaktives Protein Azurin) bzw. *ccpR* (Peroxidase). Bei beiden Genen wurde bereits die verstärkte Expression unter Hypoxie/Anoxie experimentell beschrieben (Vijgenboom *et al.*, 1997; Fülöp *et al.*, 1993) und beide Gene eignen sich deshalb als Positivkontrollen.

Die durchgeführten Untersuchungen mit dem Reportergen *lacZ* zeigten in LB-Medium unter Sauerstoffabschluss eine signifikante Hochregulierung der Gene *azu*, *cbb₃-1* bzw. *cbb₃-2* (Cytochrom Oxidasen), *ccpR*, *icd* bzw. *idh* (Isoenzyme der Isocitratdehydrogenase) und *oprF* ('outer membrane protein F'), was eine sauerstoffabhängige Genexpression belegt und auf eine ANR-abhängige Regulation hindeutet. In ASM bestätigte sich die verstärkte Expression der genannten Gene, wobei unter anaeroben Bedingungen zusätzlich die Gene *himD* (β -Untereinheit des 'Integration host factor') und *nuoA* (NADH-Dehydrogenase) stärker exprimiert waren. Dies könnte darauf zurück zu führen sein, dass beide Gene in LB-Medium eine kaum messbare Transkription zeigen (Abb. E.3.), während in ASM aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung des Mediums eine stärkere Expression und damit die sauerstoffabhängige Expression beider Gene erst nachweisbar ist (Abb. E.4.).

Im Folgenden werden alle in dieser Arbeit untersuchten und im späten Mutatorstamm signifikant hoch regulierten Gene einzeln diskutiert.

- (1) ***accB***: Das Gen kodiert für ein Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP), das als Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase benötigt wird. Dieses Enzym spielt in der Synthese von Fettsäuren eine große Rolle. Im ersten Schritt der Fettsäuresynthese überträgt das Enzym unter ATP-Verbrauch eine Carboxylgruppe auf Acetyl-CoA, wodurch Malonyl-CoA entsteht. Eukaryotische sowie prokaryotische Zellen, mit Ausnahme der Archea-Bakterien, besitzen diese Art der Carboxylase (Cronan und Waldrop, 2002), was die zentrale Bedeutung dieses Enzyms für den bakteriellen Fettsäuremetabolismus unterstreicht. Im *P. aeruginosa* Genom sind diese vier Gene an unterschiedlichen Stellen lokalisiert (*accA*: PA3639; *accB*: PA4847; *accC*: PA4848; *accD*: PA3112; <http://www.pseudomonas.com>). Die Synthese von Lipiden ist für die

Generierung von Membranen essentiell. Im Promotorbereich des *accB*-Gens wurde eine putative ANR-Bindestelle identifiziert (siehe Tab. E.1.), jedoch konnte in Promotorgenstudien unter anaeroben Bedingungen keine verstärkte Expression festgestellt werden, so dass offenbar keine sauerstoffabhängige und vermutlich auch keine ANR-abhängige Regulation des *accB*-Gens vorliegt. Dies steht im Einklang mit einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Trunk und Kollegen (2010). Durch vergleichende Transkriptomanalysen wurde das ANR- bzw. DNR-Regulon in *P. aeruginosa* PAO1 identifiziert. Demnach sind insgesamt 197 Gene des PAO1 Genoms unter anaeroben Bedingungen reprimiert, darunter auch *accB*.

- (2) **atuA**: Dieses Gen gehört dem *atuABCDEFGH*-Gencluster an (*atu* = 'acyclic terpene utilization'), welches für den Abbau von azyklischen Monoterpenen benötigt wird. Die Fähigkeit azyklische Monoterpene wie z.B. Citronellol als Kohlenstoffquelle für die Energiegewinnung zu verwenden, ist auf wenige *Pseudomonas*-Spezies beschränkt, darunter auch *P. aeruginosa* (Cantwell *et al.*, 1978). Die genaue Funktion des von *atuA* kodierten Proteins ist bisher unklar, obwohl die Proteine aller anderen *atu*-Gene (B-H) bereits mit putativen Funktionen annotiert werden konnten (Förster-Fromme und Jendrossek, 2010). Es wird spekuliert, dass *AtuA* womöglich eine HHG-CoA-Lyase (3-Hydroxy-iso-hexenylglutaryl-CoA: Acetat-Lyase) darstellt, ein Enzym, das beim Abbau von Citronellol benötigt wird. Alternativ könnte es sich bei *AtuA* auch um ein Transportprotein handeln (Förster-Fromme und Jendrossek, 2010). Eine verstärkte Expression von *atuA* unter anaeroben Bedingungen konnte nicht gezeigt werden, so dass auch hier offenbar keine sauerstoffabhängige Expression vorliegt.
- (3) **azu**: Das redox-aktive Protein Azurin gehört der Cupredoxin-Familie an. Die Expression des Gens wird durch Sauerstoffabwesenheit und durch den Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase induziert (Vijgenboom *et al.*, 1997). Es wurden zwei aktive Promotoren (P1 und P2) stromaufwärts des Startkodons identifiziert, die vom Sigmafaktor σ^S reguliert werden. Zusätzlich wird der Promotor P2 auch unter anaeroben Bedingungen von ANR reguliert (Vijgenboom *et al.*, 1997). Außerdem konnte ein ANR-Bindemotiv ca. 70 Bp vor dem Startkodon identifiziert werden (Tab. E.1. bzw. Trunk *et al.*, 2010). Wie zu erwarten war, ist die Expression von *azu* unter anaeroben Bedingungen signifikant erhöht (siehe Abbildungen E.2. bzw. E.3.). Das Ergebnis des *azu*-Gens, das in dieser Arbeit als Positivkontrolle mitgeführt wurde, zeigt die Eignung des verwendeten experimentellen Ansatzes zum Nachweis anaerober Genexpression.

- (4) ***cbb₃-1* bzw. *cbb₃-2***: Die Gene PA1552-1554 und PA1555-1557 kodieren für zwei Cytochrom *cbb₃* Oxidasen. Insgesamt besitzt *P. aeruginosa* fünf terminale Oxidasen, wovon zwei (C1O, *bo₃*-Oxidase) Quinon und drei (*aa₃*-Oxidase, *cbb₃*-Oxidasen) Cytochrom c als Substrat nutzen. In *P. aeruginosa* existieren zwei Operons, die jeweils für eine Oxidase vom *cbb₃*-Typ in je vier Untereinheiten kodieren (Abb. F.1.):

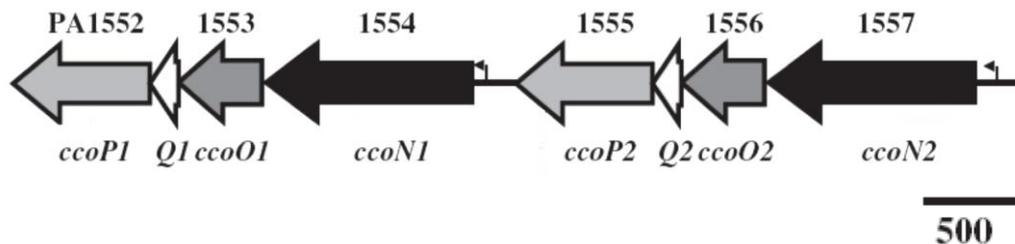


Abb. F.1. *cbb₃*-Oxidase-Operons in *P. aeruginosa*

ccoP1/2, *Q1/2*, *ccoO1/2* bzw. *ccoN1/2* bezeichnen die jeweiligen Untereinheiten der *cbb₃*-Oxidasen (aus Comolli und Donohue, 2004).

Die *cbb₃*-Oxidasen gehören der Häm-Kupfer-Superfamilie an und sind für die Energiekonservierung unter sauerstoffarmen Bedingungen verantwortlich. Jedoch konnten Comolli und Kollegen (2004) Unterschiede in beiden *cbb₃*-Oxidasen bezüglich ihrer Abhängigkeit von Sauerstoff zeigen. Demnach besitzt die *cbb₃-1*-Oxidase eine wichtige metabolische Funktion unter hohen Sauerstoffkonzentrationen, wohingegen die *cbb₃-2*-Oxidase unter mikro-aeroben bis anaeroben Bedingungen die bedeutendere Rolle spielt. Trunk und Kollegen (2010) konnten durch Transkriptomanalysen ein ANR-Motiv 135 Bp vor dem Translationsstart des PA1557 Gens feststellen. Darüber hinaus war das Gen PA1557 unter anaeroben Wachstumsbedingungen stärker exprimiert und ANR-abhängig induziert. PA1554 (*cbb₃-1*) war dagegen unter anaeroben Bedingungen reprimiert (Trunk *et al.*, 2010). Unter Verwendung von ASM zeigte sich, dass unter anaeroben Bedingungen sowohl die Expression der *cbb₃-1*-Oxidase als auch der *cbb₃-2* Oxidase signifikant erhöht ist. Die Expression der *cbb₃-2* Oxidase-Reporterfusion (2352 ± 456 Miller Units, Abb. E.4.) ist unter anaeroben Bedingungen jedoch etwa doppelt so hoch wie die der *cbb₃-1* Oxidase (1236 ± 290 Miller Units, Abb. E.4.). Dies unterstreicht die Rolle der *cbb₃-2* Oxidase bei Sauerstoffmangel. Somit ist die *cbb₃-1* Oxidase anscheinend für hohe Sauerstoffkonzentrationen und die *cbb₃-2* Oxidase für geringe Sauerstoffkonzentrationen von Bedeutung. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von Comolli und Donohue (2004).

- (5) **ccpR**: Die Cytochrom c_{551} Peroxidase CcpR katalysiert die Oxidation von Typ-c-Cytochromen und Azurin und enthält zwei Häm-Moleküle, die für die Aktivität des Enzyms essentiell sind (Ellfolk *et al.*, 1991). Außerdem ist die Peroxidase ein Enzym, welches bei geringen Sauerstoffkonzentrationen exprimiert wird (Fülöp *et al.*, 1993). Eine vorhergesagte ANR-Box im Promotorbereich des *ccpR* Gens liegt 68 Bp vor dem Translationsstart, diese konnte erst kürzlich auch experimentell durch Transkriptomanalysen nachgewiesen werden (Trunk *et al.*, 2010). Ferner gehört *ccpR* ebenso wie das *azu* Gen und die *cbb₃-2* Oxidase zu den anaerob induzierbaren Genen (Trunk *et al.*, 2010). Messungen der LacZ-Aktivität von *ccpR*-Reporterfusionen zeigten erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung der Expression von *ccpR* unter anaeroben Wachstumsbedingungen. Sowohl das *azu*-Gen als auch das *ccpR*-Gen bestätigen somit die Funktionalität der vergleichenden aeroben/anaeroben Reporterstudien, auch wenn unter aeroben Bedingungen der Reporterstamm kurzzeitig einem Sauerstoffmangel ausgesetzt war. Deshalb eignet sich *ccpR* wie auch *azu* als Positivkontrolle in den Reporterstudien.
- (6) **coxB**: Die aa_3 -Oxidase (Cytochrom c Oxidase) aus *P. aeruginosa* PAO1 besteht aus drei Untereinheiten (*coxA*, *coxB* und *coIII*; <http://www.pseudomonas.com>). Oxidasen vom aa_3 -Typ besitzen für gewöhnlich eine geringe Sauerstoffaffinität und spielen bei einigen Bakterienspezies (*Bacillus subtilis*, *Rhodobacter sphaeroide*, *Bradyrhizobium japonicum*) eine wichtige Rolle unter hohen Sauerstoffkonzentrationen (Winstedt und von Wachenfeldt, 2000; Flory und Donohue, 1997; Gabel und Maier, 1993). Im Gegensatz dazu konnten Kawakami und Kollegen (2010) die geringe Expression der *cox*-Gene unter 20 % Sauerstoffkonzentration in *P. aeruginosa* zeigen (35 ± 4 Miller Units, OD_{600} 0,2). In der spät-stationären Phase (12 h) zeigte sich bei Kawakami und Kollegen nur eine geringe Steigerung der Promotoraktivität (394 ± 14 Miller Units), die in etwa vergleichbar mit der in dieser Arbeit erhaltenen *coxB*-Aktivität nach 17 Stunden ist (298 ± 145 Miller Units). Der *cox*-Promotor in *P. aeruginosa* wird offenbar eher durch die Zelldichte in der stationären Phase und den damit zusammenhängenden Nahrungsmangel hoch reguliert, weniger durch die Sauerstoffkonzentration (Kawakami *et al.*, 2010).
- (7) **himD**: Dieses Gen kodiert für die β -Untereinheit des 'Integration host factor', ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch an Promotoren bindet und eine starke Biegung der DNA verursacht (Yang und Nash, 1989). Beispielsweise ist *himD* als Regulationsprotein in der Alginatsynthese von Bedeutung und spielt eine wesentliche Rolle bei der Transkription von *algD*. Dieses Gen kodiert für die GDP-Mannose-Dehydrogenase,

welche die unidirektionale Oxidation von GDP-Mannose zu GDP-Mannuronsäure katalysiert (Delic-Attree *et al.*, 1995), was für die Alginatsynthese von essentieller Bedeutung ist. An die CF-Lunge adaptierte Mutatorstämme zeigen eine signifikante Alginat-Überproduktion, was zu einem mukoiden Phänotyp und der damit verbundenen schlechten Prognose für CF-Patienten führt (Hogardt und Heesemann, 2010). Somit spielt der *'Integration host factor'* eine bedeutende indirekte Rolle bei der Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge. In Expressionsstudien unter anaeroben Bedingungen zeigte der *himD*-Reporterstamm eine signifikante Expressionssteigerung gegenüber der aeroben Bedingung (Abb. E.4.). Da *P. aeruginosa* in der CF-Lunge unter mikro-aeroben bis anaeroben Bedingungen persistiert, ist die Erhöhung der *himD*-Expression unter Sauerstoffmangel nicht überraschend.

- (8) ***icd / idh***: Das Reporterergebnis zu den Isocitratdehydrogenase Isoenzymen von *P. aeruginosa* wird im Kapitel F.3. „Regulation der Isocitratdehydrogenasen ICD und IDH aus *P. aeruginosa*“ ausführlich diskutiert.
- (9) ***lpdG***: In *P. aeruginosa* PAO1 existieren insgesamt drei Lipoamiddehydrogenasen: LpdV (PA2250), LpdG (PA1587) und Lpd3 (PA4829). LpdG ist ein Teil (E3) des α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplexes (KGDH), der α -Ketoglutarat in Succinyl-CoA umwandelt (Palmer *et al.*, 1991). KGDH besteht aus drei Enzymen: α -Ketoglutaratdehydrogenase (E1), Dihydrolipoyl-Transacetylase (E1) und Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (= LpdG, E3). Durch die Oxidation von α -Ketoglutarat wird NAD^+ zu NADH reduziert, welches in der Detoxifikation von *'reactive oxygen species'* (ROS) außerordentlich wichtig ist (Mailloux *et al.*, 2009). In der sauerstoffarmen Umgebung des Mukus, in dem *P. aeruginosa* Kolonien persistieren (Sriramulu *et al.*, 2005), spielt die ROS-Generierung durch aerobe Atmung keine so große Rolle, jedoch setzen einwandernde neutrophile Granulozyten größere Mengen an ROS frei, um *P. aeruginosa* zu bekämpfen. Deshalb ist die ausreichende Generierung von Reduktionsäquivalenten auch unter sauerstoffarmen Bedingungen in der CF-Lunge für *P. aeruginosa* von Vorteil.

Für die Reporterfusion mit *lpdG* konnte keine signifikante Erhöhung der Expression unter anaeroben Bedingungen gezeigt werden, so dass offenbar davon ausgegangen werden muss, dass Sauerstoff keine gewichtige Rolle in der Regulation des *lpdG*-Gens spielt. Dies steht im Einklang mit Transkriptomanalysen, die eine Reduktion der *lpdG*-Expression unter anaeroben Wachstumsbedingungen aufzeigten (Trunk *et al.*, 2010).

- (10) **nuoA:** Das *nuoA*-Gen kodiert für die A-Kette des NADH I Komplexes, der in *P. aeruginosa* PAO1 aus insgesamt 13 Genen besteht (*nuoA-N*). Daneben existiert ein weiteres Gen, das für die NADH-Dehydrogenase II kodiert (*ndh*, PA4538) (<http://www.pseudomonas.com>). In *E. coli* unterscheiden sich beide Enzyme (NDH-I und NDH-II) durch ihre Substratspezifität, ihre Sensitivität gegenüber Inhibitoren und ihrer Fähigkeit, eine funktionsfähige Protonenpumpe aufzubauen (Matsushita *et al.*, 1987). Das NDH-II Enzym enthält FAD als prosthetische Gruppe und baut keine Protonenpumpe auf, d.h. das NDH-II Enzym ist keine NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase (Friedrich, 1998). Das NDH-I Enzym ist dem mitochondrialen Komplex I homolog und wird daher auch als Komplex I bezeichnet. Es ist ein Enzym mit mehreren Untereinheiten, Prokaryoten haben in der Regel 14 Untereinheiten, die von 13 Genen kodiert werden. Neben dem Aufbau einer Protonenpumpe ist die NADH-Dehydrogenase für die Reduzierung von Reduktionsäquivalenten verantwortlich, um den NAD⁺-Pool wieder auf zu füllen (Friedrich, 1998). Die Reporter-gen-Experimente zeigten in ASM unter Sauerstoffmangel eine deutliche Zunahme der Expression des *nuoA*-Gens (Abb. E.4.). Dies könnte für den späten Mutatorstamm nützlich sein, um den restlichen zur Verfügung stehenden Sauerstoff in den Nischen der CF-Lunge optimal ausnutzen zu können. Dagegen zeigen Transkriptomanalysen, dass die Gene *nuoF*, *nuoM* und *nuoK* unter anaeroben Wachstumsbedingungen reprimiert werden (Trunk *et al.*, 2010).
- (11) **oprF:** Das OprF-Protein ist als Porin für Aufnahme von Nitrat bzw. Nitrit in die Zelle zuständig (Hassett *et al.*, 2002) und damit für das anaerobe Wachstum mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor von großer Bedeutung. Yoon und Kollegen (2002) konnten zeigen, dass eine *oprF*-Mutante unter Sauerstoffabschluss nur schlecht wuchs, die Mutante besaß keine detektierbare Nitrit-Reduktase-Aktivität. Trotzdem ist die genaue Funktion von OprF noch ungeklärt. Neben der erwähnten Permease-Aktivität könnte OprF das bakterielle Peptidoglykan stabilisieren (Hassett *et al.*, 2002). Ein Fehlen von OprF hat offensichtlich eine schwächere Zellwand zur Folge, was Wachstumsexperimente mit *oprF*-Mutanten in salzhaltiger Umgebung zeigten (Rawling *et al.*, 1998). Die Erhöhung der *oprF*-Reporterexpression unter sauerstoffarmen Bedingungen (Abb. E.3. und E.4.) könnte im Einklang mit der Permease-Aktivität des Proteins stehen. Denn die Verfügung von Sauerstoff im mikro-aeroben Mukus der CF-Lunge ist gering, so dass eine Erhöhung von OprF zu einer effizienteren Nutzung von Nitrat/Nitrit bzw. der Denitrifikation führen könnte.

2. ANR-abhängige Regulation metabolischer Gene von *P. aeruginosa*

Neben der Adaptation an das spezielle Habitat der CF-Lunge bzw. an die dort vorherrschenden Nährstoffbedingungen spielt die Anpassung von *P. aeruginosa* an Sauerstoff eine große Rolle. Obwohl die Lunge infolge der ständigen Ventilation ein sauerstoffreiches Habitat zu sein scheint, herrschen in der CF-Lunge an Grenzflächen und hinter verschlossenen Bronchioli mikro-aerobe bis anaerobe Bedingungen. In den CF-Mukus eingewanderte Bakterien verbrauchen den Sauerstoff sehr schnell, so dass im mit Bakterien angereicherten Mukus (sog. 'mucus plugs') ein ausgeprägter Sauerstoff-gradient entsteht (Worlitzsch *et al.*, 2002). Ein weiteres Indiz für Sauerstoff-restriktive Bedingungen in der CF-Lunge ist der Nachweis einer hohen Keimlast an obligat anaeroben Bakterien aus dem Mukus, welche nur unter strikt anaeroben Verhältnissen wachsen können (Worlitzsch *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* ist an Sauerstoffmangel sehr gut angepasst. Experimentelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass *P. aeruginosa* sogar mikro-aerobe Nischen bevorzugt. So zeigte das Bakterium unter 1% Sauerstoff im Chemostat ein besseres Wachstum als unter 50 % Sauerstoff (Sabra *et al.*, 2002). Unter mikro-aeroben bzw. anaeroben Bedingungen muss *P. aeruginosa* als alternativen Elektronenakzeptor Nitrat nutzen, welches schrittweise zu molekularem Stickstoff reduziert wird (Denitrifikation) (Zumft, 1997; 2002). Die Gene hierfür werden vom ANR-Protein (ANR = 'anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction') kontrolliert. In *P. aeruginosa* stellt das Protein ANR einen globalen Transkriptionsfaktor dar, welcher die Expression von Genen des mikro-aeroben bzw. anaeroben Stoffwechsels positiv reguliert. In voran gegangenen RT-PCR-Studien konnte eine deutliche Erhöhung der Expression des *anr*-Gens in späten Mutatorstämmen festgestellt werden (Hoboth *et al.*, 2009). Dies unterstützt zusätzlich die anaerobe Anpassung des Bakteriums an den Sauerstoffmangel im CF-Mukus.

Das ANR-Protein ist ein Homodimer mit einer molekularen Masse von etwa 54,2 kDa (2 x 27,1 kDa). Unter Sauerstoffanwesenheit zerfällt es in zwei Monomere und wird somit inaktiv. Erst unter Sauerstoffabschluss entsteht ein Eisenschwefelcluster, für dessen Bildung vier Cysteinreste am N-terminalen Ende des Proteins wichtig sind. Um als Transkriptionsfaktor aktiv zu sein, ist eine Dimerisierung des Proteins nötig, die nur unter Sauerstoffabschluss erfolgen kann.

ANR besitzt zu FNR von *E. coli* Ähnlichkeiten auf DNA- (68 %; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bzw. auf Proteinebene (53 %; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Für ANR konnte bereits 2003 eine Konsensussequenz veröffentlicht werden (Münch *et al.*, 2003), die sich aus Bindemotiven von Genen ableitet, die experimentell bestätigt direkt von ANR reguliert werden. Das Bindemotiv besteht aus 14 Nukleotiden, wobei die Basen der zweiten (Thymin), der dritten (Guanin), der zwölften (Cytidin) und der dreizehnten (Adenin) Stelle am wichtigsten

für die Bindung von ANR an die DNA sind (Trunk *et al.*, 2010).

Wie bereits unter Kapitel E.1. beschrieben wurde, zeigten in dieser Arbeit sieben (*azu*, *cbb₃-1*, *cbb₃-2*, *ccpR*, *icd*, *idh*, *oprF*) bzw. neun (*azu*, *cbb₃-1*, *cbb₃-2*, *ccpR*, *himD*, *icd*, *idh*, *oprF*, *nuoA*) der insgesamt 13 untersuchten Gene eine signifikant erhöhte Expression unter anaeroben Bedingungen (LB-Medium bzw. ASM). Darüber hinaus konnte für alle 13 Gene eine potenzielle ANR-Bindestelle im Promotor identifiziert werden (Tab. E.1.), so dass im Weiteren durch Band Shift Experimente abgeklärt werden sollte, ob die genannten Gene tatsächlich direkt von ANR reguliert werden oder über einen anderen Mechanismus einer Sauerstoff-abhängigen Regulation unterliegen. Hierfür war der Einsatz von rekombinantem ANR-Protein nötig. Die Durchführung der Band Shift Experimente konnte aerob (Laborwerkbank) oder anaerob (Anaerobenwerkbank der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten, Goethestraße 70, 80336 München) durchgeführt werden. Wegen dem geringeren technischen Aufwand wurden die Experimente aerob durchgeführt, wobei die Funktionalität des ANR-Proteins unter diesen Bedingungen sicher gestellt werden musste.

Bei *E. coli* konnte durch eine gezielte Mutation (D154A) gezeigt werden, dass das FNR-Protein eine erhöhte Aktivität, eine vermehrte Dimerisierung des Proteins und eine 40- bis 250-fach erhöhte Affinität zum Bindemotiv unter aeroben Bedingungen aufweist (Ziegelhoffer und Kiley, 1995). Aufgrund dieser Tatsache wurde 2008 von Ugidos und Kollegen das ANR-Protein von *P. putida* in entsprechender Weise mutagenisiert und das resultierende Protein (D149A) unter sauerstoffhaltigen Bedingungen erfolgreich in DNase I Footprinting Assays eingesetzt. Daher wurde in dieser Arbeit ähnlich verfahren: durch eine gezielte Mutation des ANR-Proteins von *P. aeruginosa* PAO1 (D149A) sollte eine ausreichende Stabilität und Funktionalität gegeben sein, um in Band Shift Experimenten unter aeroben Bedingungen eine Bindung an den Promotor und damit eine ANR-abhängige Regulation der oben genannten Gene festzustellen.

Für die Produktion von rekombinanten ANR-Molekülen wurden zwei Plasmide eingesetzt, die jeweils einen sog. 6x-Histag am C- bzw. N-terminalen Ende des Proteins einfügen und mit dessen Hilfe das Protein aufgereinigt werden konnte. Daraus entstanden zwei Varianten des ANR-Proteins, eine mit C-terminalem Histag, die andere mit einem N-terminalen Histag. Beide Varianten wurden anschließend mutagenisiert, um die sauerstoffstabile Variante des Proteins zu erhalten. In den sich anschließenden Band Shift Experimenten wurden jeweils alle vier Formen des ANR-Proteins eingesetzt. Keine der rekombinanten ANR-Formen führte jedoch zu einem nachweisbaren Shift im Polyacrylamidgel, auch unter den unterschiedlichsten Versuchsbedingungen (Protein- und Sondenkonzentration, Reaktionstemperatur und -dauer, Salzkonzentration, etc.). Als Positivkontrolle wurde eine *azu*-Sonde mitgeführt, aber auch hier ließ sich kein funktioneller Band Shift nachweisen, lediglich die Positivkontrolle des Probenkits zeigte einen Band Shift. Dies spricht für eine korrekte methodische Umsetzung des Versuchsaufbaus.

ANR- wie FNR-Protein ähneln sich aufgrund der Homologie im Aufbau. Das FNR-Protein besitzt am N-terminalen Ende vier Cysteinreste, die für die Inkorporation von Eisen und damit für die Funktionalität des Proteins essentiell sind. Am C-terminalen Ende befindet sich die DNA-bindende Domäne mit einem Helix-turn-Helix-Motiv (Lazazzera *et al.*, 1993; Abb. F.2.).

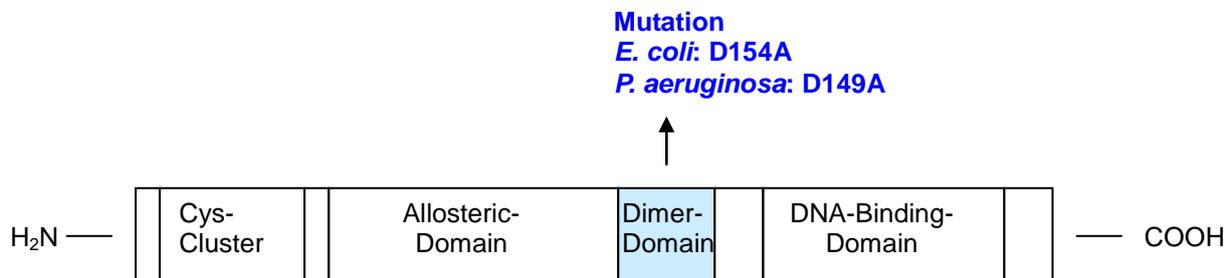


Abb. F.2. Aufbau des FNR-Proteins in *E. coli*

In Blau dargestellt ist die Mutation des FNR- / ANR-Proteins im Bereich der Dimer-Domäne (nach Lazazzera *et al.*, 1993).

Denkbar ist, dass vor allem der 6x-Histag im rekombinanten Protein dessen Funktionalität stören könnte. Histags im N-terminalen sowie im C-terminalen Bereich könnten (i) die Bildung des [4Fe-4S]-Clusters behindern oder (ii) die Bindung an die DNA inhibieren. Im ersten Fall würde kein funktionelles ANR-Protein entstehen können, somit wäre der Nachweis der Bindung an die entsprechende DNA-Sonde nicht möglich. Im zweiten Fall entsteht zwar ein funktionelles Protein, welches aber möglicherweise durch den Histag an der DNA-Bindung gehindert wird. Auch in diesem Fall wäre eine Protein-DNA-Interaktion nicht nachweisbar. Möglicherweise könnte das Abtrennen des Histags vom Protein durch eine spezifische Protease-Schnittstelle ein positives Ergebnis in den Band Shift Experimenten darstellen. Darüber hinaus wäre es vorstellbar, dass die Konformation des ANR-Proteins möglicherweise verändert war, da die Konformation eines Proteins von mehreren Faktoren abhängig ist (pH-Wert, Temperatur, isoelektrischer Punkt, etc.). Dies könnte die Funktionalität des ANR-Proteins erheblich beeinflussen. Außerdem konnte das Verhältnis WT-ANR zu D149A-ANR bei der Mutagenese nicht bestimmt werden. Möglich wäre, dass trotz Mutagenese zu wenig D149A-ANR gebildet wurde und diese geringe Menge für eine Protein-DNA-Interaktion nicht ausreicht.

Da die Band Shift Experimente kein zufriedenstellendes Ergebnis brachten, sollte durch eine Überproduktion von ANR in den zu untersuchenden Reporterstämmen (*P. aeruginosa* PAO1 pazulacZ / pcbb₃-1lacZ / pcbb₃-2lacZ / pccpRlacZ / phimDlacZ / picdlacZ / pidhlacZ / pnuoAlacZ / poprFlacZ) geklärt werden, ob die Regulation der Gene *azu*, *cbb₃-2*, *ccpR* und *icd* dem ANR-Protein unterliegen (Abb. E.9. bzw. E.10.). Auch ohne Überproduktion von ANR zeigten die genannten Reporterkonstrukte eine Promotoraktivität unter aeroben Bedingungen, was dafür

spricht, dass auch andere Regulationsmechanismen unter den gewählten Bedingungen aktiv sind bzw. dass die Aktivität aufgrund der kurzen anaeroben Verhältnisse in der exponentiellen Phase zurück zu führen ist. Da aber die Promotoraktivität bei Überproduktion von ANR signifikant höher ausfällt, kann von einer ANR-abhängigen Regulation gesprochen werden. Jedoch konnte aufgrund der experimentellen Anordnung nicht gezeigt werden, dass ANR direkt an der Promotorregion der Gene *azu*, *cbb₃-2*, *ccpR* und *icd* bindet.

Bei *E. coli* wurde bereits 1987 durch Spiro und Guest die negative Autoregulation des FNR-Proteins unter anaeroben Bedingungen beschrieben. Da sich das FNR- und ANR-Protein ähneln, könnte eine Autoregulation des ANR-Proteins die Messungen der Promotoraktivität der untersuchten metabolischen Gene beeinflussen. Um dies zu überprüfen, wurde der *anr*-Promotor in das promotorlose lacZ-Reporterplasmid pMP220 kloniert und in den Wildtypstamm PAO1 und in die isogene *anr*-Mutante PAO6261 konjugiert. Zusätzlich wurde ein Überexpressionsplasmid mit dem *anr*-Gen als Insert in beide genannten Stämme transferiert. LacZ-Experimente zeigten, dass sowohl beim Wildtyp als auch bei der *anr*-Mutante eine Expression des *anr*-Promotors unter aeroben Bedingungen vorhanden war (PAO1: 1437 ± 202 Miller Units; PAO6261: 1527 ± 381 Miller Units; Abb. E.11.). Bei Überproduktion von ANR zeigte sich keine signifikante Erhöhung bzw. Erniedrigung der Promotoraktivität, was dafür spricht, dass unter aeroben Bedingungen das *anr*-Gen nicht vom eigenen Genprodukt beeinflusst ist. Offensichtlich liegt eine eher konstitutive Expression des *anr*-Gens unter Sauerstoffanwesenheit vor. Im Gegensatz hierzu war die Promotoraktivität unter anaeroben Bedingungen im Reporterstamm PAO1 panlacZ (2569 ± 166 Miller Units) im Vergleich zum Überexpressionsstamm PAO1 panlacZ + panr50 (3583 ± 449 Miller Units) signifikant erniedrigt (Abb. E.12.). Dies spricht für eine Autoregulation unter anaeroben Wachstumsbedingungen, jedoch im Vergleich zu *E. coli* liegt in *P. aeruginosa* offenbar eine positive Verstärkung der eigenen Genexpression vor. Dies wäre im Hinblick auf die mikro-aerobe bis anaerobe CF-Lunge nützlich: unter sauerstoffarmen Bedingungen werden die gebildeten ANR-Proteine durch Dimerisierung aktiviert und binden an den eigenen Promotor, was eine erhöhte Expression und damit eine erhöhte Produktion von aktivem ANR zu Folge hat. Dadurch kann *P. aeruginosa* die Expression von Genen für eine sauerstoffarme Lebensweise (z.B. Denitrifikationsgene) besonders stark aktivieren, was schließlich zu einer schnelleren Anpassung an diese Bedingungen führen könnte.

3. Regulation der Isocitratdehydrogenasen ICD und IDH von *P. aeruginosa*

Die Isocitratdehydrogenasen sind wichtige metabolische Enzyme, sie katalysieren die Umsetzung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat im TCA-Zyklus. Die Reaktion stellt den Verzweigungspunkt von TCA-Zyklus und Glyoxylat-Stoffwechselweg dar. Damit reguliert die Isocitratdehydrogenase als bedeutendes Schlüsselenzym den Kohlenstofffluss im intermediären Stoffwechsel (Hurley *et al.*, 1989; Maki *et al.*, 2006). Bei Bakterien existieren zwei unterschiedliche Enzymformen der Isocitratdehydrogenase, ein monomeres (IDH) und ein dimeres (ICD) Protein. Die meisten Bakterien besitzen nur eine Form der Isocitratdehydrogenase und nur wenige Spezies verfügen über beide Isoenzyme, darunter auch *P. aeruginosa*.

Die Gene *icd* und *idh*, die in *P. aeruginosa* für beide Formen der Isocitratdehydrogenase kodieren, sind bei Prokaryoten hoch konserviert. *Escherichia coli* (Burke *et al.*, 1974), *Helicobacter pylori* (Huang *et al.*, 2009) und *Bacillus subtilis* (Singh *et al.*, 2001) beispielsweise besitzen nur die dimere Form der Isocitratdehydrogenase, wohingegen z.B. *Corynebacterium glutamicum* (Eikmanns *et al.*, 1995), *Azotobacter vinelandii* (Sahara *et al.*, 2002) und *Vibrio parahaemolyticus* (Fukunaga *et al.*, 1992) nur ein Gen für die monomere Form im Genom tragen. Neben *P. aeruginosa* besitzen u.a. *Mycobacterium tuberculosis* (Sing und Gosh, 2006), *Ralstonia eutropha* (Wang *et al.*, 2003) sowie *Colwellia maris* bzw. *Colwellia psychrerythraea* (Ochiai *et al.*, 1979; Maki *et al.*, 2006) beide Formen der Isocitratdehydrogenase.

Generell kann die Isocitratdehydrogenase zwei Kofaktoren zur oxidativen Decarboxylierung von Isocitrat nutzen: NAD^+ (EC 1.1.1.41)¹² und NADP^+ (EC 1.1.1.42)¹². Alle Isocitratdehydrogenasen der o.g. Bakterienspezies nutzen ausschließlich NADP^+ als Kofaktor, mit Ausnahme von *R. eutropha*. Die Enzyme dieses Bakteriums nutzen sowohl NAD^+ als auch NADP^+ . Spezifische Enzymtests bei *P. aeruginosa* zeigten, dass beide Isocitratdehydrogenasen strikt NADP^+ -abhängig sind und mit NAD^+ als Kofaktor keinen Umsatz von NAD^+ zu NADH generieren können (Abb. E.15.). Dies steht somit im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Kofaktorabhängigkeit der meisten anderen Bakterienspezies. Darüber hinaus haben beispielsweise die Isoenzyme von *C. maris* unterschiedliche Funktionen: die monomere Form ist kaltadaptiert und extrem thermolabil bei Temperaturen über 25 °C, wohingegen die dimere Form mesophil ist (Ochiai *et al.*, 1979; 1984). In *R. eutropha* ist die dimere Form der Isocitratdehydrogenase durch Acetat induzierbar, die monomere Form scheint konstitutiv exprimiert zu sein (Wang *et al.*, 2003).

¹² <http://www.brenda-enzymes.org>

In *P. aeruginosa* ist die Expression beider Isoenzyme späten Mutatorstämmen im Vergleich zum Wildtyp PAO1 signifikant erhöht (Hoboth *et al.*, 2009), so dass die Isocitratdehydrogenase neben ihrer exponierten Stellung möglicherweise im zentralen Stoffwechsel auch eine wichtige Rolle bei der Anpassung von *P. aeruginosa* an die sauerstoffarme CF-Lunge spielen könnte. Zur Charakterisierung beider Isoenzyme in *P. aeruginosa* wurde deshalb zunächst untersucht, wie sich die Promotoren beider Gene (*icd* und *idh*; PA2623 bzw. PA2624) in *P. aeruginosa* PAO1 unter aeroben und anaeroben Bedingungen verhalten.

Der *icd*- bzw. *idh*-Promotor war unter sauerstoffarmen Bedingungen signifikant stärker aktiviert als unter aeroben Bedingungen (Abb. E.3. bzw. E.4.). Dies spricht für eine sauerstoffabhängige Expression beider Promotoren. In der Folge wurden daher beide Gene auf Ihre ANR-abhängige Regulation hin untersucht. Es zeigte sich, dass nur das *icd*-Gen ANR-abhängig reguliert ist. Das *idh*-Gen war zwar unter anaeroben Bedingungen stärker exprimiert als unter aeroben, jedoch konnte keine ANR-Abhängigkeit festgestellt werden. Neben ANR existieren noch weitere Transkriptionsfaktoren wie z.B. DNR oder IHF, die unter anaeroben Bedingungen aktiv sind und das *idh*-Gen aktivieren können. Damit wäre das *idh*-Gen anaerob stärker exprimiert, aber nicht von ANR abhängig.

Bei der Enzymaktivität der IDH zeigte sich, dass unter den untersuchten Versuchsbedingungen keine signifikante Veränderung der IDH-Aktivität festgestellt wurde. Die Aktivität scheint vielmehr konstitutiv zu sein. Dies könnte dafür sprechen, dass die IDH eine Minimalversorgung der Zelle übernimmt. Hingegen steigt die ICD-Aktivität im Verlauf der Wachstumskurve signifikant an und erreicht ein Maximum in der frühen stationären Phase. Somit könnte die ICD den Mehrbedarf der Zelle während des exponentiellen Wachstums unter aeroben und anaeroben Bedingungen abdecken. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass beide Enzyme die gleiche Reaktion katalysieren, jedoch unterschiedlich reguliert werden. Dies könnte für *P. aeruginosa* bei der Anpassung an das heterogene Habitat der CF-Lunge einen Vorteil bedeuten. Wenn von einem Enzym mit einer wichtigen katalytischen Funktion im zentralen Metabolismus zwei Isoenzyme mit unterschiedlicher Regulation der Expression vorhanden sind, kann *P. aeruginosa* sich möglicherweise schneller auf wechselnde Umweltbedingungen einstellen.

3.1. RpoS-abhängige Regulation

Neben der sauerstoffabhängigen Regulation der *icd*- bzw. *idh*-Gene wurde in dieser Arbeit auch mit eine mögliche RpoS-abhängige Regulation in *P. aeruginosa* untersucht. In *E. coli* kontrolliert der alternative Sigmafaktor RpoS die Expression von zahlreichen Genen, die für das Überleben

der Zelle in der stationären Wachstumsphase benötigt werden. Unter bestimmten Stressbedingungen (z.B. Nahrungsmangel, niedrige/hohe Temperaturen, saurer pH-Wert, etc.) und bei Erreichen der stationären Wachstumsphase steigt das RpoS-Level in der Bakterienzelle signifikant an (Becker et al., 2000), was zu einer verstärkten Expression RpoS-abhängiger Gene führt.

In *E. coli* sind neben der posttranslationalen Regulation der Isocitratdehydrogenase durch die AceK Kinase/Phosphatase noch andere Regulationsmechanismen bekannt: unter anaeroben Bedingungen wird das *icd*-Gen negativ durch das ArcA/B-System sowie durch den Transkriptionsfaktor FNR reguliert (Jung et al., 2006). Darüber hinaus wird das *icd*-Gen in *E. coli* positiv vom Katabolitrepresor- / -aktivatorprotein Cra reguliert (Prost et al., 1999). Microarray Analysen des Wildtypstamms *E. coli* K-12 MG1655 und einer isogenen *rpoS*-Mutante zeigten, dass insbesondere Gene des TCA-Zyklus, darunter auch das *icd*-Gen, herunter reguliert waren (Patten et al., 2004). Daraufhin konnten Jung und Kollegen (2006) auch experimentell die negative RpoS-abhängige Expression des *icd*-Gens in *E. coli* zeigen. Im *E. coli* K-12 Wildtypstamm QC2461 ist die Expression des *icd*-Gens in der exponentiellen Phase am höchsten und nahm zur stationären Phase hin ab. Dagegen ist die Expression des *icd*-Gens in der stationären Phase in einer isogenen *rpoS*-Mutante 4,8-fach höher als im Wildtypstamm, d.h. das *icd*-Gen in *E. coli* wird von RpoS in der stationären Phase negativ reguliert.

Diese Arbeit konnte experimentell zeigen, dass auch in *P. aeruginosa* die Expression des *icd*-Gens unter Kontrolle des Sigmafaktors RpoS steht. Eine entsprechende RpoS-Konsensussequenz wurde in *P. aeruginosa* bereits mehrfach beschrieben (Schuster et al. 2004; Typas et al., 2007; Irie et al., 2010). Sequenzvergleiche¹³ des intergenischen Bereichs der Gene *icd* bzw. *idh* mit der RpoS-Konsensussequenz ergaben, dass jedem Startkodon stromaufwärts zwei mögliche Bindestellen für RpoS vorangestellt sind (Abb. E.18.). Neben der RpoS-abhängigen *icd/idh*-Expression wurde auch die spezifische Aktivität beider Isoenzyme in *P. aeruginosa* und der isogenen *rpoS*-Mutante untersucht. Wie auch bei *E. coli* (Jung et al., 2006) zeigte sich hier ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität in der *rpoS*-Mutante in der stationären Wachstumsphase (Abb. E.22 bzw. E.23). Da aber bei *P. aeruginosa* in der *rpoS*-Mutante beide Isoenzyme aktiv sind, kann dieser Effekt keinem der beiden Enzyme direkt zugeschrieben werden. Jedoch lässt sich vermuten, dass der Anstieg der Aktivität auf das ICD-Enzym zurückgeführt werden kann, da in der *rpoS*-Mutante die Expression des *icd*-Gens, nicht jedoch des *idh*-Gens, signifikant höher war als im Wildtyp (Abb. E.20. bzw. E.21.).

¹³ Die Vergleiche der RpoS-Konsensussequenzen mit dem intergenischen Bereich von *icd/idh* wurden mit der Software „DNA Star MegAlign (Clustal W Method)“ erstellt.

RpoS ist ein alternativer Sigmafaktor, dessen Expression durch verschiedene Faktoren und Einflüsse wie z.B. Nährstoffmangel, Kälte- / Hitzeschock, saurer pH-Wert oder oxidativer Stress (Antibiotika, H₂O₂, etc.) induziert wird (Dong und Schellhorn, 2010). RpoS beeinflusst im Weiteren nicht nur Virulenzgene, sondern in besonderem Maße auch Gene des bakteriellen Metabolismus (Rahman *et al.*, 2006). Microarray Analysen einer *E. coli* rpoS-Mutante sowie RT-PCR-Experimente zeigten in der Studie von Rahman und Kollegen (2005), dass das *icd*-Gen aus *E. coli* in der stationären Phase deutlich herab reguliert wird. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* die Enzymaktivität des ICD-Enzyms während der exponentiellen Phase deutlich höher lag als in der stationären Phase. Dies unterstreicht die essentielle regulatorische Rolle von RpoS auf den TCA-Zyklus. Somit hat RpoS zum einen direkten Einfluss auf die Expression metabolischer Gene (Dong und Schellhorn, 2010). Zum anderen scheint RpoS durch die unterschiedliche regulatorische Funktion auf *icd/idh* auch auf Adaptationsmechanismen Einfluss zu nehmen.

3.2. Posttranslationale Regulation

Bakterien verstoffwechseln unter aeroben Bedingungen Glukose über drei alternative Wege: die Glykolyse, den Pentose-Phosphat-Weg oder den KDPG-Weg. Das daraus resultierende Acetyl-CoA wird anschließend über den TCA-Zyklus vollständig zu CO₂ reduziert, wobei Reduktionsäquivalente wie NADH, NADPH und FADH entstehen, welche in der Atmungskette die Elektronen zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser zur Verfügung stellen. Darüber hinaus stellt der TCA-Zyklus auch Intermediate für Biosynthesen (z.B. Aminosäurebiosynthese) bereit, um durch den Abfluss von Intermediaten entstandene Lücken im TCA-Zyklus wieder aufzufüllen. Bei Wachstum mit Acetat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle wird das entstehende Acetyl-CoA über den Glyoxylatzyklus metabolisiert, ebenso bei Wachstum z.B. auf Fettsäuren. Als wichtigste Enzyme des Glyoxylatzyklus fungieren die Isocitratlyase (ICL) sowie die Malatsynthase (MS), welche die enzymatische Umsetzung von Isocitrat zu Succinat bzw. Glyoxylat katalysieren. Durch diese Reaktion kann das Bakterium die oxidative Decarboxylierung von Acetyl-CoA und den damit verbundenen Verlust von Kohlenstoff durch CO₂ im TCA-Zyklus umgehen. Schlüsselstelle beider Zyklen ist die Isocitratdehydrogenase: bei *E. coli* reguliert sie am Verzweigungspunkt des Isocitrats den Metabolitenfluss durch den TCA- oder Glyoxylatzyklus (El-Mansi *et al.*, 2006). Bei Wachstum mit Acetat stehen somit die Isocitratdehydrogenase und die Isocitratlyase in Konkurrenz um ihr Substrat Isocitrat. Allerdings liegt die Affinität der Isocitratdehydrogenase bei *E. coli* im Vergleich zur Isocitratlyase um ein Vielfaches höher liegt (K_m-Werte ICD: 8 µM; ICL: 604 µM; Walsh und Koshland, 1984). Somit hätten die ICL und damit der Kohlenstofffluss durch den Glyoxylatzyklus einen deutlichen

Nachteil. Daher enthält die posttranslationale Regulation der ICD bei *E. coli* einen Schaltvorgang, bei dem die ICD durch (De-)Phosphorylierung am Serin 113 (in-)aktiviert wird (LaPorte und Koshland, 1982; Thorsness und Koshland, 1987; Hurley *et al.*, 1989, 1990). Dies geschieht in *E. coli* durch das Enzym Isocitratdehydrogenase Kinase/Phosphatase, welches durch das Gen *aceK* codiert wird. Dieses Gen bildet zusammen mit *aceA* (ICL) und *aceB* (MS) ein Operon (Cozzone und El-Mansi, 2005). In *P. aeruginosa* werden die ICD Kinase/Phosphatase ebenfalls durch das Gen *aceK* codiert, welches jedoch nicht mit *aceA* und *aceB* in einem Operon organisiert ist (<http://www.pseudomonas.com>).

Diese Arbeit untersuchte daher auch den möglichen Einfluss der Isocitratdehydrogenase Kinase/Phosphatase auf beide Isoenzyme in *P. aeruginosa* und damit auf die posttranslationale Regulation der Isocitratdehydrogenasen. Experimente zur Enzymaktivität des Wildtyps PA14 und einer isogenen *aceK*-Mutante zeigten, dass die Gesamtaktivität in der *aceK*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp in der stationären Phase deutlich geringer ist als in der exponentiellen Phase (Abb. E.25.). Die Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase in der *aceK*-Mutante konnte nicht einem bestimmten Enzym (ICD oder IDH) zugeordnet werden, da beide Enzyme in dem Stamm vorhanden sind.

Darüber hinaus zeigten Aminosäure-Sequenzvergleiche, dass die ICD aus *P. aeruginosa* eine hohe Ähnlichkeit zur ICD aus *E. coli* aufweist. Zudem konnte für das ICD Enzym wie in *E. coli* ein konservierter Bereich rund um die Aminosäure Serin an der Position 113 (*E. coli*) bzw. 115 (*P. aeruginosa*) identifiziert werden (Abb. E.26.). Für das IDH Enzym dagegen konnte kein Serin an einer ähnlichen Position gefunden werden. Somit ist es wahrscheinlicher, dass eine posttranslationale Regulation durch die Phosphorylierung des Serins nur beim ICD Enzym vorliegt, nicht jedoch beim IDH Enzym.

In *E. coli* ist die ICD aktiv, wenn das Enzym dephosphoryliert ist und umgekehrt. Somit könnte die geringere Enzymaktivität in der stationären Phase im *P. aeruginosa* Stamm Tn::*aceK* durch ein Ausbleiben der Dephosphorylierung des ICD Enzyms entstehen, da in diesem Stamm die ICD Kinase/Phosphatase AceK nicht vorhanden ist. Der Kohlenstofffluss müsste dann verstärkt über den Glyoxylatzyklus verlaufen, welcher aber im Gegensatz zum TCA-Zyklus weniger Energie in Form vom ATP generiert. Demnach könnte man ein schlechteres Wachstum für die *aceK*-Mutante vermuten, jedoch zeigte sich, dass die *aceK*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp gleich gut wächst (Abb. E.25.). Da in der *aceK*-Mutante sowohl die ICD als auch die IDH vorhanden ist, könnte der Energieverlust durch die konstitutive Aktivität der IDH ausgeglichen werden. Somit würde für die *aceK*-Mutante kein Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtypstamm entstehen.

Für zukünftige Experimente wäre es von Vorteil, wenn eine Doppelmutante vorliegen würde ($\Delta aceK/ icd$ bzw. $\Delta aceK/ idh$). Bei Wachstum mit Acetat oder Fettsäuren könnte somit eindeutig festgestellt werden, welches der beiden Enzyme der posttranslationalen Regulation durch die

Kinase/Phosphatase unterliegt. Stimmt die Vermutung, dass nur die ICD durch die AceK Kinase/Phosphatase reguliert wird und dass kein alternatives Enzym der Isocitratdehydrogenase in *P. aeruginosa* vorhanden ist, müsste eine *aceK/ldh*-Mutante schlechter wachsen als eine *aceK/icd*-Mutante, da bei der *aceK/ldh*-Mutante die ICD vermutlich unter diesen Bedingungen phosphoryliert wird und somit inaktiv wäre.

4. Metabolische Flussanalysen

Die Methode des 'Isotopologue profilings' beruht auf dem Einbau von stabilen (nicht-radioaktiven) ^{13}C -Isotopen in Stoffwechselprodukte (z.B. in Aminosäuren). Diese Methode verbindet den Einsatz der Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie, engl. 'nuclear magnetic resonance') und einer Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS). Bei der GC/MS-Analyse von Aminosäuren ist es möglich, die verschiedenen Isotopologe eines Moleküls zu unterscheiden und deren Häufigkeit anzugeben. Jedoch kann die Struktur eines Moleküls bzw. die genaue Position des Isotops im Molekül mit dieser Methode nicht wieder gegeben werden. Hierfür wird die NMR-Spektroskopie angewendet, welche die elektronische Umgebung einzelner Atome und deren Wechselwirkung mit Nachbaratomen untersuchen kann. So erhält man Informationen über die Position des Isotops, wodurch eine strukturelle Darstellung des Moleküls möglich ist. 'Isotopologue profiling' gibt einen sehr guten Aufschluss über wichtige metabolische Stoffwechsellösungen und -wege in Bakterien wieder.

In ersten Versuchen wurde das ASM mit universell markierten Aminosäuren substituiert, welche mit 0,5 mg/ml zusätzlich zu den im ASM vorhandenen Aminosäuren (5 mg/ml) zugegeben wurden. Wenn Aminosäuren in *P. aeruginosa* ausschließlich durch Aufnahme und Verstoffwechslung der freien Aminosäuren im ASM entstanden sind, würde sich ein Einbau von ^{13}C -markierten Atomen von etwa 10 % zeigen. Da dieser Wert aber nicht erreicht wurde, muss der verbleibende Teil aus anderen Substraten (vermutlich Lipide) stammen. Das ASM ist ein sehr reichhaltiges Medium, das neben den 20 freien Aminosäuren noch Muzin (Glykoprotein, 5 mg/ml), Glukose (0,8 mg/ml), Albumin (25 mg/ml), DNA (2,7 mg/ml), Egg Yolk (Lipidquelle, 0,5 %) und Serumproteine (1 %) enthält. Die freien Aminosäuren wurden gut von *P. aeruginosa* aufgenommen und verstoffwechselt, d.h. die Aminosäuren sind als Substrat gut nutzbar. Hierbei zeigte sich, dass das Bakterium die Aminosäuren nicht nur aufgenommen, sondern auch weiter metabolisiert und daraus wieder neue Aminosäuren synthetisiert hat. Da nur vollmarkierte Aminosäuren ins Medium gegeben wurden, müssen teilmarkierte Aminosäuren *de novo* synthetisiert worden sein. Der Aminosäurestoffwechsel scheint selbst bei Verfügbarkeit von zahlreichen Substraten wie im ASM immer noch bedeutsam für den Stoffwechsel von *P. aeruginosa* zu sein.

Um genauer zwischen Stoffeingang und -ausgang differenzieren zu können, wurde statt vollmarkierten Aminosäuren ein universell markiertes Algenlipid eingesetzt. Das Algenlipid enthielt vier Fettsäuren: 53,24 % Palmitinsäure, 28,20 % Ölsäure, 9,15 % Palmitoleinsäure und 6 % Linolsäure (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.; Andover, MA, USA). Dies hatte den Vorteil, evtl. zwischen dem Stofffluss des Glyoxylatzyklus und dem des TCA-Zyklus unterscheiden zu können. In *P. aeruginosa* sind alle nötigen Enzyme für den oxidativen Abbau von Fettsäuren vorhanden (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?pae00071). Die aktivierten Fettsäuren werden zunächst über β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut, welches dann in den Zyklus eingeschleust wird. Durch die Verwendung von vollmarkierten Fettsäuren (d.h. jedes C-Atom ist ein ^{13}C -Atom) entstehen vollmarkierte Acetyl-CoA-Moleküle. Bei der weiteren Oxidation des Acetyl-CoA-Moleküls entsteht zusammen mit Oxalacetat ein Molekül Citrat bzw. Isocitrat, welches dann an C1-C2 markiert vorliegt. Anschließend kann das Isocitrat entweder über den TCA-Zyklus oder den Glyoxylat-Shunt metabolisiert werden:

- (1) Bei der Metabolisierung über den TCA-Zyklus entsteht aus dem [1,2- $^{13}\text{C}2$]-Isotopolog des Isocitrats über [4,5- $^{13}\text{C}2$]- α -Ketoglutarat bzw. [3,4- $^{13}\text{C}2$]-Succinyl-CoA /-Succinat ein C3-C4-markiertes Fumarat (Abb. E.29.). Im nächsten Schritt wird Fumarat durch die Fumarat-Hydratase [EC 4.2.1.2.; *fumC1* (PA4470), *fumC2* (PA4333)] hydrolysiert, wodurch Malat entsteht. Diese Reaktion im TCA-Zyklus ist reversibel, daher kann sich die Markierung beim Malat von C3-C4 auf C1-C2 ändern, d.h. es liegt entweder ein [1,2- $^{13}\text{C}2$]- oder ein [3,4- $^{13}\text{C}2$]-Isotopolog des Malats vor.
- (2) Bei Metabolisierung über den Glyoxylatzyklus entsteht aus dem [1,2- $^{13}\text{C}2$]-Isotopolog des Isocitrats ein unmarkiertes Glyoxylat sowie ein [3,4- $^{13}\text{C}2$]-markiertes Succinat. Diese Reaktion wird durch die Isocitratlyase vermittelt. Das unmarkierte Glyoxylat (C2) bildet zusammen mit dem vollmarkiertem Acetyl-CoA (C2) ein [3,4- $^{13}\text{C}2$]-Malat, was durch die Malatsynthase umgesetzt wird. *P. aeruginosa* besitzt beide genannten Enzyme des Glyoxylatzyklus (*aceA*: Isocitratlyase, PA2634; *glcB*: Malatsynthase, PA0482; <http://www.pseudomonas.com>). Die Reaktion zwischen Malat und Fumarat ist reversibel, so dass das [3,4- $^{13}\text{C}2$]-markierte Malat sich auch als [1,2- $^{13}\text{C}2$]-Malat darstellen lässt.

Somit kann bei der Gabe von vollmarkierten Fettsäuren zwischen der Metabolisierung des Kohlenstoffs durch den TCA- bzw. Glyoxylatzyklus nicht differenziert werden. Jedoch wäre eine Unterscheidung beider Zyklen in *P. aeruginosa* durch (i) Verwendung einer Isocitratdehydrogenase Doppelmutante oder durch (ii) Einsatz eines [5- $^{13}\text{C}1$]-Isocitrats möglich. Sequenzanalysen zeigten, dass neben der ICD und IDH kein weiteres homologes Enzym in

P. aeruginosa existiert.

- (i) Um den TCA-Zyklus zu umgehen, wäre eine Doppelmutation bezüglich der Isocitratdehydrogenase Gene nötig. Durch Knockout des *icd*- und *idh*-Gens, welche beide für die Isocitratdehydrogenase in *P. aeruginosa* kodieren, wäre eine weitere Oxidation des Isocitrats über den TCA-Zyklus nicht mehr möglich. Der Kohlenstofffluss muss dann über den Glyoxylatzyklus laufen, womit eine Unterscheidung beider Zyklen bei Gabe von ^{13}C -markierten Fettsäuren gewährleistet wäre. Diese vorgeschlagene Untersuchung wird zurzeit von Herrn Dipl. Biol. Martin Arnold im Rahmen seiner Doktorarbeit am Max von Pettenkofer Institut (München) durchgeführt.
- (ii) Bei Gabe eines C5-markierten Isocitrats findet sich die Einfachmarkierung im Malat am C2 oder C3 wieder. Dies kommt dadurch zustande, dass das C5-markierte Isocitrat durch die Isocitratlyase in ein C2-markiertes Glyoxylat und in ein unmarkiertes Succinat gespalten wird. Das [2- ^{13}C]-markierte Glyoxylat bildet zusammen mit einem unmarkierten Acetyl-CoA ein [3- ^{13}C]-Isotopolog des Malats. Durch die reversible Reaktion der Fumarat-Hydratase entsteht so entweder ein C2- oder C3-markiertes Malat. Dieses Ergebnis würde man nur bei Ablauf des Glyoxylatzyklus erhalten. Bei Ablauf des TCA-Zyklus dagegen entsteht aus dem C5-markierten Isocitrat ein C1- oder C4-markiertes Malat. Somit wäre eine Unterscheidung des Kohlenstoffflusses über TCA- oder Glyoxylatzyklus möglich.

Neuere Untersuchungen von Erb und Kollegen (2009) zeigten einen alternativen anaplerotischen Weg zum Glyoxylatzyklus auf: zwei Acetyl-CoA Moleküle kondensieren zu Acetoacetyl-CoA, welches zu Crotonyl-CoA umgesetzt wird. In einem reduktiven Schritt wird Crotonyl-CoA carboxyliert, wodurch (2S)-Ethylmalonyl-CoA entsteht. Letzteres wird in mehreren Schritten zu Malat und Succinyl-CoA abgebaut, welche anschließend in den TCA-Zyklus fließen. Damit existiert in Bakterien neben TCA- und Glyoxylatzyklus ein alternativer Stoffwechselweg für die Auffüllung von Malat und Succinyl-CoA (Schink, 2009).

Die Ergebnisse aus dem Vergleich des Basismetabolismus von *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 zeigen auch, dass eine Supplementierung des ASM mit einem ^{13}C -markierten Algenlipid möglich ist. Es kann sogar eine hohe Anreicherung von ^{13}C -markiertem Algenlipid in der Zelle erreicht werden. Bei beiden Wildtypstämmen PAO1 und PA14 war kein signifikanter Unterschied im Metabolismus erkennbar. Das System lässt sich gut reproduzieren und kann damit auf die Fragestellung der Verstoffwechslung von markierten Lipiden angewendet werden. Hier ist es erstmalig gelungen, einen experimentellen Ansatz für die Betrachtung des Basismetabolismus

unter infektiönsähnlichen Bedingungen zu entwickeln.

Nachfolgende Abbildung F.3. zeigt zusammenfassend aus den Isotopologanalysen abgeleiteten den intermediären Stoffwechsel von *P. aeruginosa* PAO1 unter aeroben Bedingungen bei Wachstum mit Fettsäuren.

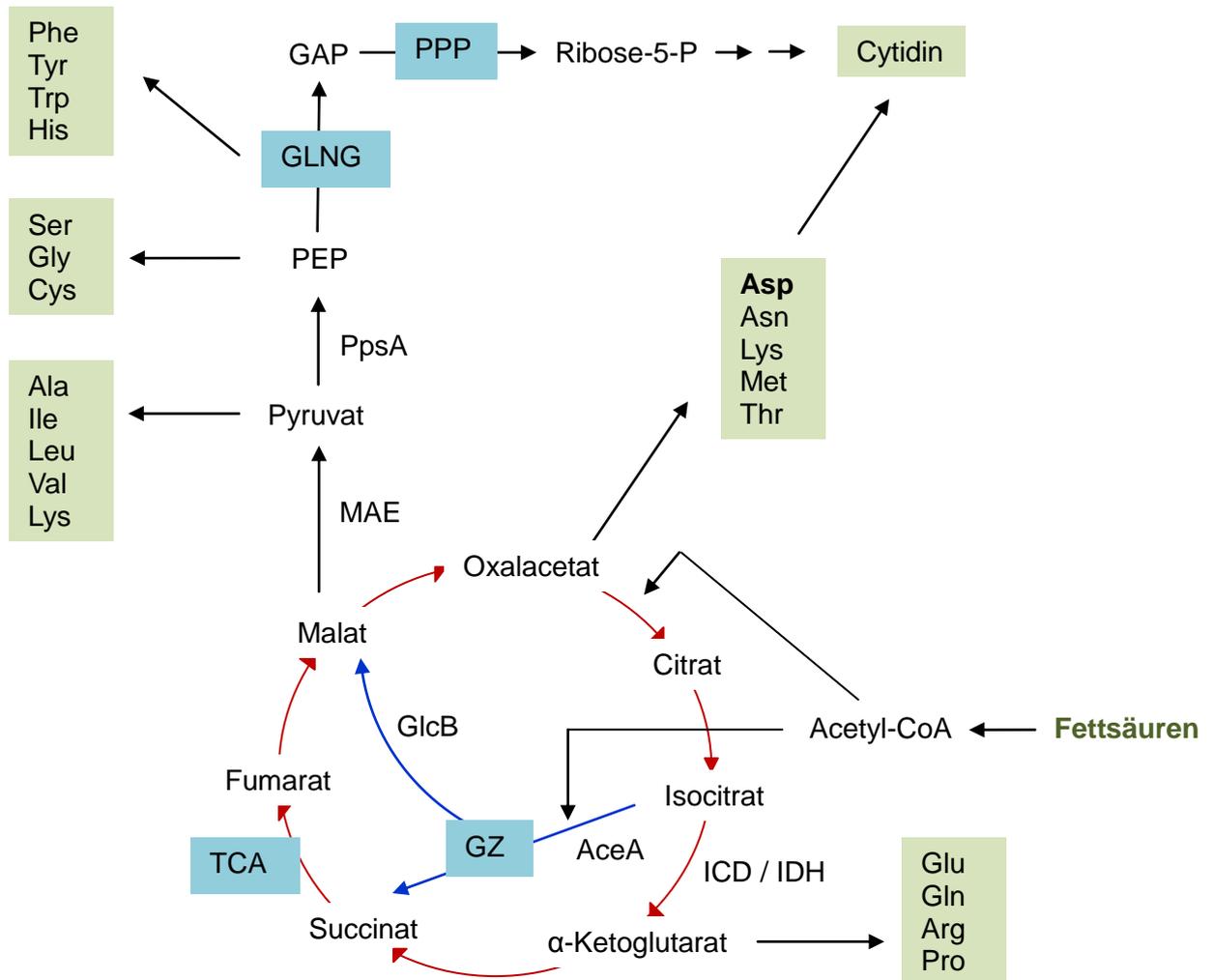


Abb. F.3. Intermediärer Metabolismus von *P. aeruginosa* PAO1

Dargestellt sind die wichtigsten Stoffwechselwege (blaue Boxen) bei Fütterung von Fettsäuren: Glyoxylatzyklus (GZ), Zitronensäurezyklus (TCA), Glukoneogenese (GLNG) und Pentose-Phosphat-Weg (PPP). Untersuchte Moleküle (Aminosäuren, Cytidin) sind in grünen Boxen gezeigt. PpsA: Phosphoenolpyruvat-Synthase, GlcB: Malatsynthase, AceA: Isocitratlyase, ICD / IDH: Isocitratdehydrogenase, PEP: Phosphoenolpyruvat, GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat. MAE: 'malic enzyme' (Katalyse von Malat zu Pyruvat).

Neben der Etablierung der Methode und der Untersuchung des zentralen Metabolismus sollte *P. aeruginosa* auch in Bezug auf aeroben und anaeroben Stoffwechsel untersucht werden. Die CF-Lunge stellt bezüglich der Sauerstoffverfügbarkeit ein sehr heterogenes Habitat dar. Bakterien die den verdickten Mukus besiedeln, verbrauchen den Sauerstoff sehr schnell, so dass ein Sauerstoffgradient entsteht (Worlitzsch *et al.*, 2002). *E. coli* beispielsweise metabolisiert Kohlenstoffverbindungen unter aeroben Bedingungen über den TCA-Zyklus, der im Vergleich zum Glyoxylatzyklus wesentlich mehr Energie erzeugt (TCA-Zyklus: vier Reduktionsäquivalente, ein ATP pro Acetyl-CoA; Glyoxylatzyklus: ein Reduktionsäquivalent pro Acetyl-CoA). Die ¹³C-Markierungsexperimente mit *P. aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen dagegen zeigten keinen Unterschied im Stoffwechsellmuster, d.h. die Aminosäuremuster der aeroben bzw. anaeroben Bedingung unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Ein Problem hierbei könnte die komplexe Versuchsdurchführung sein: da Fettsäuren in einer wässrigen Lösung verwendet wurden, bildeten sich kleine Tropfen (sog. Micellen), so dass keine richtige Lösung entstehen konnte. Somit könnte der größte Teil an markierten C-Atomen nicht richtig zugänglich für die Zellen gewesen sein. Dies könnte evtl. durch eine höhere Konzentration an Detergenz umgangen werden, jedoch wäre dann nicht sichergestellt gewesen, ob das Detergenz Einfluss auf die Bakterien und damit auf die Messung nimmt. Messungen mit 1 % Aceton im Medium ergab, dass diese Konzentration noch keinen Einfluss auf das Wachstum nimmt.

Die hohe Ähnlichkeit im Aminosäuremuster zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen könnte auch bedeuten, dass bei *P. aeruginosa* der TCA- und Glyoxylatzyklus parallel ablaufen, d.h. *P. aeruginosa* kann aeroben Stoffwechsel genauso gut betreiben wie anaeroben (gekoppelt mit der Denitrifikation). Die einzelnen Nischen der CF-Lunge können sehr unterschiedlich in Bezug auf Sauerstoff- und Nährstoffgehalt sein, daher wäre es für *P. aeruginosa* ein großer Vorteil, wenn er seinen Metabolismus entsprechend flexibel ausrichten kann. Damit könnte sich *P. aeruginosa* noch besser den gegebenen Umweltbedingungen anpassen und sich möglicherweise signifikante Wachstumsvorteile gegenüber anderen Bakterienarten in der CF-Lunge sichern.

In unserer Arbeitsgruppe standen mehrere Patientenisolats von *P. aeruginosa* zur Verfügung, so dass auch auf metabolischer Ebene ein Vergleich eines Wildtyp-ähnlichen Isolats (M1 = Non-Mutatorstamm) und eines lungenadaptierten Isolats (M26 = Mutatorstamm) durchgeführt werden sollte. Es ist bekannt, dass die Lunge von CF-Patienten ein eher sauerstoffarmes Umfeld darstellt und vermehrt Lipide als C-Quelle vorliegen (Worlitzsch *et al.*, 2002). Daher war die Annahme, dass ein an die CF-Lunge adaptierter *P. aeruginosa* Stamm zur Energiekonservierung vermutlich vermehrt den Glyoxylatzyklus nutzen muss. Um dies zu überprüfen wurde der Aminosäurestoffwechsel der Stämme M1 und M26 mittels GC/MS-

Analyse untersucht, um den Kohlenstofffluss in beiden Stämmen verfolgen zu können. Als Ergebnis zeigte sich, dass die analysierten GC/MS-Muster auf einen veränderten Aminosäurestoffwechsel des Mutatorstammes gegenüber dem Non-Mutatorstamm hindeuten. Alanin und Glycin waren im Vergleich beider Stämme im Mutatorstamm deutlich erhöht (um 30 % bzw. um 109 %). Die Biosynthesen von Alanin und Glycin laufen über den Malat-Pyruvat-Weg (durch sog. '*malic enzymes*'). Mehr Alanin und Glycin bedeuten, dass mehr Malat vorgelegen haben muss, welches aus dem Glyoxylatzyklus stammt. Gleichzeitig lag im Mutatorstamm M26 eine um ca. 35 % verringerte Synthese von Aspartat vor. Da Oxalacetat der Vorläufer für Aspartat ist, sollte eine verringerte Oxalacetatproduktion vorliegen, was zum verstärkten Abbau des Malats zu Pyruvat passen würde. Diese Ergebnisse sind zusammengenommen zumindest ein deutlicher Hinweis für den vermehrten Abbau von Acetyl-CoA über den Glyoxylatzyklus. Dies steht im Einklang mit der Ausgangshypothese. Alle anderen detektierten Aminosäuren zeigten dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen Mutator- und Non-Mutatorstamm.

G. LITERATURVERZEICHNIS

Accurso F.J., Rowe S.M., Durie P.R., Konstan M.W., Dunitz J., Hornick D.B., Sagel S.D., Boyle M.P., Uluer A.Z., Upadhyay D., Ramsey B.W., Freedman S.D., Dong Q., Ahmad A.M., Stone A.J., Olson E.R., Ordonez C.L., Clancy J.P., Campbell P.W., Ashlock M.A. (2008) Interim results of phase 2A study of VX-770 to evaluate safety, pharmacokinetics, and biomarkers of CFTR activity in cystic fibrosis subjects with G551D. *Pediatr. Pulmonol. Suppl.* 2008; 31:295.

Andrews S.C., Robinson A.K., Rodríguez-Quiñones F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2-3): 215–237.

Arai H., Igarashi Y., Kodama T. (1994) Structure and ANR-Dependent Transcription of the *nir* Genes for Denitrification from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 (7): 1286–1291.

Arai H., Kodama T., Igarashi Y. (1997) Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 25 (6): 1141–1148.

Arai H., Mizutani M., Igarashi Y. (2003) Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149: 29–36.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1987) *Current protocols in molecular biology* New York, USA: John Wiley and Sons.

Barbieri A.M., Sha Q., Bette-Bobillo P., Stahl P.D., Vidal M. (2001) ADP-ribosylation of Rab5 by ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* affects endocytosis. *Infect. Immun.* 69: 5329–5334.

Barth A.L., Woodford N., Pitt T.L. (1998) Complementation of methionine auxotrophs of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis. *Curr Microbiol.* 36 (4):190–195.

Becker G., Klauck E., Hengge-Aronis R. (2000) The response regulator RssB, a recognition factor for sigmaS proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti-sigmaS factor. *Mol Microbiol.* 35 (3): 657–666.

Becker K.A., Grassmé H., Zhang Y., Gulbins E. (2010) Ceramide in *Pseudomonas aeruginosa* infections and cystic fibrosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 26 (1): 57–66.

Becq Frédéric (2010) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators for Personalized Drug Treatment of Cystic Fibrosis - Progress to Date. *Drugs* 70 (3): 241–259.

Belcher C.N. und Vij N. (2010) Protein processing and inflammatory signalling in Cystic Fibrosis: challenges and therapeutic strategies. *Curr. Mol. Med.* 10 (1): 82–94.

Boland M.P., O'Neill L.A. (1998) Ceramide activates NFkappaB inducing the processing of p105. *J. Biol. Chem.* 273: 15494–15500.

Bonfield T.L., Konstan M.W., Burfeind P., Panuska J.R., Hilliard J.B., Berger M. (1995) Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13: 257–261.

Bonfield T.L., Konstan M.W., Berger M. (1999) Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 104 (1): 72–78.

- Boucher R.C. (2007) Airway surface dehydration in CF: pathogenesis and therapy. *Annu. Rev. Med.* 58: 157–170.
- Boyer H.W. und Roulland-Dussoix D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459–472.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Burke W.F., Johanson R.A., Reeves H.C. (1974) NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. II. Subunit structure. *Biochim Biophys Acta* 351:333–340
- Cantwell S.G., Lau E.P., Watt D.S., Fall R.R. (1978) Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 135 (2): 325–333.
- Carmeli Y., Troillet N., Eliopoulos G.M., Samore M.H. (1999) Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob. Agents Chemother* 43: 1379–1382.
- Chang Y.S., Klockgether J., Tümmler B. (2007) An intragenic deletion in pilQ leads to nonpiliation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol Lett.* 270 (2): 201–206.
- Chayabutra C. und Ju, L.K. (2000). Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 493–498.
- Ciofu O., Lee B., Johannesson M., Hermansen N.O., Meyer P. *et al.* (2008) Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. *Microbiology* 154: 103–113.
- Comolli J.C. und Donohue T.J. (2004) Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* cbb₃ cytochrome oxidases. *Mol. Microbiol.* 51 (4), 1193–1203.
- Cozzone A.J. und El-Mansi M. (2005) Control of Isocitrate Dehydrogenase catalytic activity by protein phosphorylation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9:132–146.
- Cronan J.E. Jr. und Waldrop G.L. (2002) Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog. Lipid Res.* 41 (5): 407–435.
- Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry Report (2010), www.cff.org.
- Davies J.C. and Bilton D. (2009) Bugs, Biofilms, and Resistance in Cystic Fibrosis. *Respir. Care* 54 (5): 628–640.
- Delic-Attree I., Toussaint B., Vignais P.M. (1995) Cloning and sequence analyses of the genes coding for the integration host factor (IHF) and HU proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 27; 154 (1): 61–64.
- Dodge J.A., Lewis P.A., Stanton M., Wilsher J. (2007) Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur. Respir. J.* 29:522–526.
- Döring G. und Ratjen F. (2005) Cystic fibrosis molecular cell biology. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Vol. 8, 2nd edn (Meyers RA, ed), 623–640.

- Döring G., Parameswaran I.G., Murphy T.F. (2011) Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Microbiol Rev.* 35 (1):124–146.
- Dong T., Schellhorn H.E. (2010) Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect Immun.* 78 (3): 887–897.
- Dubern J.F., Diggle S.P. (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst.* 4 (9): 882–888.
- Eikmanns B.J., Rittmann D., Sahm H. (1995) Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* *icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J Bacteriol.* 177 (3): 774–782.
- Eisenreich W., Dandekar T., Heesemann J., Goebel W. (2010) Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Microbiol.* 8 (6): 401–412.
- Ellfolk N., Rönnerberg M., Österlund K. (1991) Structural and functional features of *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1080 (1): 68–77.
- El-Mansi M., Cozzone A.J., Shiloach J., Eikmanns B.J. (2006) Control of carbon flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Apr;9(2):173–179.
- Erb T.J., Brecht V., Müller M., Fuchs G. Alber B.E. (2009) Carboxylation mechanism and stereochemistry of crotonyl-CoA carboxylase/reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 8871 – 8876.
- Eschbach M., Schreiber K., Trunk K., Buer J., Jahn D., Schober M. (2004) Longterm anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J. Bacteriol.* 186: 4596–4604.
- Eylert E., Schär J., Mertins S., Stoll R., Bacher A., Goebel W., Eisenreich W. (2008) Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol.* 69 (4): 1008–1017.
- Eylert E., Herrmann V., Jules M., Gillmaier N., Lautner M., Buchrieser C., Eisenreich W., Heuner K. (2010) Isotopologue profiling of *Legionella pneumophila*: role of serine and glucose as carbon substrates. *J Biol Chem.* 16; 285 (29): 22232–22243.
- Favero M.S., Carson L.A., Bond W.W., Petersen N.J. (1971) *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* 173: 836–838.
- Ferroni A., Guillemont D., Muomile K. *et al.*, (2009) Effect of mutator *P. aeruginosa* on antibiotic resistance acquisition and respiratory function in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 44: 820–825.
- Figurski D.H. und Helinski D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1648–1652.
- Filloux A., Hachani A., Bleves S. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154: 1570–1583.
- Flory J.E. und Donohue T.J. (1997) Transcriptional control of several aerobically induced cytochrome structural genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* 143: 3101–3110.

- Förster-Fromme K., Jendrossek D. (2010) Catabolism of citronellol and related acyclic terpenoids in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (3): 859–869.
- Foweraker J. (2009). Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br. Med. Bull.* 89: 93–110.
- Friedrich T. (1998) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 6; 1364 (2): 134–146.
- Fülöp V., Little R., Thompson A., Greenwood C., Hajdu J. (1993) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the di-haem cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 232, 1208–1210.
- Fukunaga N., Imagawa S., Sahara T., Ishii A., Suzuki M. (1992) Purification and characterization of monomeric isocitrate dehydrogenase with NADP⁺-specificity from *Vibrio parahaemolyticus* Y4. *J Biochem* 112: 849–855.
- Gabel C. und Maier R.J. (1993) Oxygen-dependent transcriptional regulation of cytochrome *aa3* in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 175: 128–132.
- Gallati S. (2003) Genetic of Cystic Fibrosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 24 (6): 629–638.
- Gill J.S., Windebank A.J (2000) Ceramide initiates NFκB-mediated caspase activation in neuronal apoptosis. *Neurobiol. Dis.* 7: 448–461.
- Govan JR, Deretic V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60 (3): 539–574.
- Grassmé H., Jendrossek V., Riehle A., von Kurthy G., Berger J, Schwartz H.,Weller M., Kolesnick R. und Gulbins E. (2003) Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat. Med.* 9: 322–330.
- Greenberg E.P. (1997) Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM news* 63: 371–377.
- Hajjar A.M., Ernst R.K., Tsai J.H., Wilson C.B., Miller S.I. (2002) Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* 3 (4): 354–359.
- Härtel T., Eylert E., Schulz C., Petruschka L., Gierok P., Grubmueller S., Lalk M., Eisenreich W., Hammerschmidt S. (2012) Characterization of the central carbon metabolism of *Streptococcus pneumoniae* by isotopologue profiling. *J Biol Chem.* 287 (6): 4260–4274.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (4): 557–580.
- Hassett D.J., Cuppoletti J., Trapnell B., Lyman S.V., Rowe J.J., Yoon S.S., Hilliard G.M., Parvatiyar K., Kamani M.C., Wozniak D.J., Hwang S.H., McDermott T.R., Ochsner U.A. (2002) Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5; 54 (11): 1425–1443.
- Hauser A.R. (2009) The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (9): 654–665.
- Häussler S., Tümmler B., Weissbrodt H., Rohde M., Steinmetz I. (1999) Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis.* 29 (3): 621–625.

- Hayashi N. R., Arai H., Kodama T., Igarashi Y. (1998) The *nirQ* gene, which is required for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa*, can activate the RubisCO from *Pseudomonas hydrothermophila*. *Biochim. Biophys. Acta* 1381: 347–350.
- Henke C. (2009) Adaptation von *Pseudomonas aeruginosa* an die Mukoviszidose Lunge: Charakterisierung des Dicarboxylat-Transporter-Operons PA0119–PA0121 (Dissertation der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt).
- Henrichfreise B., Wiegand I., Pfister W., Wiedemann B. (2007) Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from Germany and Correlation with Hypermutation. *Antimicrob. Agents Chemother* 51 (11): 4062–4070.
- Herrmann U., Dockter G., Lammert F. (2010) Cystic fibrosis-associated liver disease. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24 (5): 585–592.
- Hoboth C. (2007) Charakterisierung hypermutierender *Pseudomonas aeruginosa* Isolate von Patienten mit Zystischer Fibrose mittels Transkriptom- und Proteomanalyse (Dissertation der Technischen Universität München [Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt])
- Hoboth C., Hoffmann R., Eichner A., Henke C., Schmoldt S., Imhof A., Heesemann J., Hogardt M. (2009) Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 1; 200 (1): 118–130.
- Hogardt M., Roeder M., Schreff A.M., Eberl L., Heesemann J. (2004) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* 150: 843–851.
- Hogardt M., Schubert S., Adler K., Götzfried M., Heesemann J. (2006) Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 313–320.
- Hogardt M., Hoboth C., Schmoldt S., Henke C., Bader L., Heesemann J. (2007) Stage-Specific Adaptation of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Isolates during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.* 1; 195 (1): 70–80.
- Hogardt M., Heesemann J. (2010) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* 300 (8): 557–562.
- Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35 (4): 322–332.
- Huang D., Liu J., Shen G. (2009) Cloning, expression, and enzymatic characterization of isocitrate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. *Protein J.* 28 (9-10): 443–447.
- Hurley J.H., Thorsness P.E., Ramalingam V., Helmers N.H., Koshland D.E. Jr., Stroud R.M. (1989) Structure of a bacterial enzyme regulated by phosphorylation, isocitrate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (22): 8635–8639.
- Hurley J.H., Dean A.M., Sohl J.L., Koshland D.E. Jr., Stroud R.M. (1990) Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* 249: 1012–1016.

- Hutt D.M., Herman D., Rodrigues A.P., Noel S., Pilewski J.M., Matteson J., Hoch B., Kellner W., Kelly J.W., Schmidt A., Thomas P.J., Matsumura Y., Skach W.R., Gentzsch M., Riordan J.R., Sorscher E.J., Okiyonedo T., Yates J.R. 3rd, Lukacs G.L., Frizzell R.A., Manning G., Gottesfeld J.M., Balch W.E. (2010) Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis. *Nat. Chem. Biol.* 6 (1): 25–33.
- Irie Y., Starkey M., Edwards A.N., Wozniak D.J., Romeo T., Parsek M.R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol. Microbiol.* 78 (1): 158–172.
- Iuchi S. und Lin E.C.C. (1988) *arcA (dye)*, a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 85:1888–1892.
- Jung I.L., Kim S.K., Kim I.G. (2006) The RpoS-mediated regulation of isocitrate dehydrogenase gene expression in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 52 (1): 21–26.
- Karp C.L., Flick L.M., Park K.W., Softic S., Greer T.M., Keledjian R., Yang R., Uddin J., Guggino W.B., Atabani S.F., Belkaid Y., Xu Y., Whitsett J.A., Accurso F.J., Wills-Karp M., Petasis N.A. (2004) Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat. Immunol.* 5 (4): 388–392.
- Kawakami T., Kuroki M., Ishii M., Igarashi Y., Arai H. (2010) Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 12 (6): 1399–1412.
- Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073–1080.
- Khan T.Z., Wagener J.S., Bost T., Martinez J., Accurso F.J., Riches D.W. (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 151 (4): 1075–1082.
- Kovach M.E., Phillips R.W., Elzer P.H., Roop R.M. 2nd, Peterson K.M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16 (5): 800–802.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Latifi A., Foglino M., Tanaka K., Williams P., Lazdunski A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21: 1137–1146.
- LaPorte D.C., Koshland D.E. Jr. (1982) A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation of tricarboxylic acid cycle. *Nature* 300: 458–460.
- Lau G. W., Hassett D.J., Ran H., Kong F. (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* 10 (12): 599–606.
- Lazazzera B.A., Bates D.M., Kiley P.J. (1993) The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. *Genes Dev.* 7(10): 1993–2005.
- Lazazzera B.A., Beinert H., Khoroshilova N., Kennedy M.C., Kiley P.J. (1996) DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* 271: 2762–2768.

- Liberati N.T., Urbach J.M., Miyata S., Lee D.G., Drenkard E., Wu G., Villanueva J., Wie T., Ausubel F.M. (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 21; 103 (8): 2833–2838.
- Lubamba B., Lecourt H., Lebacqz J., Lebecque P., De Jonge H., Wallemacq P., Leal T. (2008) Preclinical evidence that sildenafil and vardenafil activate chloride transport in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1; 177 (5) :506–515.
- Lubamba B., Lebacqz J., Reyhler G., Marbaix E., Wallemacq P., Lebecque P., Leal T. (2011) Inhaled phosphodiesterase type 5 inhibitors restore chloride transport in cystic fibrosis mice. *Eur. Respir. J.* 37 (1): 72–78.
- Ma Q., Zhai Y., Schneider J.C., Ramseier T.M., Saier M.H. (2003) Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1; 1611 (1-2): 223–233.
- Machen T.E. (2006) Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291: C218–C230.
- Mailloux R.J., Singh R., Brewer G., Auger C., Lemire J., Appanna V.D. (2009) α -Ketoglutarate Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant α -Ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 191 (2): 3804–3810.
- Maki S., Yoneta M., Takada Y. (2006) Two isocitrate dehydrogenases from a psychrophilic bacterium, *Colwellia psychrerythraea*. *Extremophiles.* 2006 10 (3): 237-249.
- Matsukawa M. und Greenberg E.P. (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 186: 4449–4456.
- Matsushita K., Ohnishi T., Kaback, H. R. (1987) NADH-ubiquinone oxido-reductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry* 26: 7732–7737.
- Mena A., Smith E.E., Burns J.L., Speert D.P., Moskowitz S.M., Perez J.L., Oliver A. (2008) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J. Bacteriol.* 190 (24): 7910–7917.
- Miller J.H. (1972) Assay of β -galactosidase. In *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 319–353.
- Münch R., Hiller K., Barg H., Heldt D., Linz S., Wingender E., Jahn D. (2003) PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res.* 31: 266–269.
- 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. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1: 263–273.
- Ochiai T., Fukunaga N., Sasaki S. (1979) Purification and some properties of two NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases from an obligately psychrophilic marine bacterium, *Vibrio* sp., strain ABE-1. *J. Biochem.* 86: 377–384.
- Ochiai T., Fukunaga N., Sasaki S. (1984) Two structurally different NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases in an obligately psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30 (6): 479–487.
- Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blazquez J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251–1254.

- Oliver A., Baquero F., Blazquez J. (2002) The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol. Microbiol.* 43: 1641–1650.
- Oliver A. und Mena A. (2010) Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (7): 798–808.
- Palmer J.A., Hatter K., Sokatch J.R. (1991) Cloning and sequence analysis of the *Lpd-glc* structural gene of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 173 (10): 3109–3116.
- Palmer K.L., Aye L.M., Whiteley M. (2007) Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *J. Bacteriol.* 189 (22): 8079–8087. .
- Patten C.L., Kirchhof M.G., Schertzberg M.R., Morton R.A., Schellhorn H.E. (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics.* 272 (5): 580–591.
- Pederson K.J. und Barbieri J.T. (1998) Intracellular expression of the ADP ribosyltransferase domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 30: 751–759.
- Pesci E.C., Milbank J.B., Pearson J.P., McKnight S., Kende A.S., Greenberg E.P., und Iglewski B.H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11229–11234.
- Pier G.B., Grout M., Zaidi T.S. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci.* 94: 12088–12093.
- Prost J.F., Nègre D., Oudot C., Murakami K., Ishihama A., Cozzone A.J., Cortay J.C. (1999) Cra-dependent transcriptional activation of the *icd* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 181 (3): 893–898.
- Rahman M., Hasan M.R., Oba T., Shimizu K. (2006) Effect of *rpoS* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Biotechnol Bioeng.* 20; 94 (3): 585–595.
- Rahme L. G., Stevens E. J., Wolfort S. F., Shao J., Tompkins R. G., Ausubel F. M. (1995) Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals. *Science* 268, 1899–1902.
- Rawling E.G., Brinkmann F.S., Hancock R.E. (1998) Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J. Bacteriol.* 3556–3562.
- Reading N.C. und Sperandio V. (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 254: 1–11.
- Reinhardt D., Götz M., Kraemer R., Schöni M.H. (2001) Zystische Fibrose. Springer Verlag Berlin, 3. Auflage.
- Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.-L., Drumm M.L., Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L.-C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066–1073.

- Riordan J.R. (2008) CFTR function and prospects for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 701–726.
- Robert R., Carlile G.W., Pavel C., Liu N., Anjos S.M., Liao J., Luo Y., Zhang D., Thomas D.Y., Hanrahan J.W. (2008) Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol.* 73 (2):478–489.
- Rocha C.L., Coburn J., Rucks E.A., Olson J.C. (2003) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect. Immun.* 71: 5296–5305.
- Rodionov D.A., Dubchak I.L., Arkin A.P., Alm E.J., Gelfand, M.S. (2005) Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput. Biol.* 1: e55.
- Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L.-C., Collins F.S. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059–1065.
- Rosenfeld M., Gibson R.L., McNamara S., Emerson J., Burns J.L., Castile R., Hiatt P., McCoy K., Wilson C.B., Inglis A., Smith A., Martin T.R., Ramsey B.W. (2001) Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 32: 356–366.
- Rowe M.S., Miller S., Sorscher E.J. (2005) Mechanism of Disease: Cystic Fibrosis. *N Engl. J. Med.* 352 (19), 1992–2001.
- Rubenstein R.C., Egan M.E., Zeitlin P.L. (1997) *In vitro* pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J. Clin. Invest.* 15; 100 (10): 2457–2465.
- Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J. (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10 (6): 644–648.
- Sabra W., Kim E.J., Zeng A.P. (2002) Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiol.* 148: 3195–3202.
- Sadikot R. T., Blackwell T. S., Christman J. W., Prince, A. S. (2005) Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 (11): 1209–1223.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Sahara T., Takada Y., Takeuchi Y., Yamaoka N., Fukunaga N. (2002) Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding the monomeric isocitrate dehydrogenase of the nitrogen-fixing bacterium, *Azotobacter vinelandii*. *Biosci Biotech Biochem* 66:489–500.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2nd ed) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467.
- Sauer U. (2006) Metabolic networks in motion: ¹³C-based flux analysis. *Mol Syst Biol.* 2: 62.

- Sawers R.G. (1991) Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5 (6): 1469–1481.
- Schatschneider S., Vorhölter F.J., Rückert C., Becker A., Eisenreich W., Pühler A., Niehaus K. (2011) Genome-enabled determination of amino acid biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and identification of biosynthetic pathways for alanine, glycine, and isoleucine by ¹³C-isotopologue profiling. *Mol Genet Genomics.* 286 (3-4): 247–259.
- Schink B. (2009) An alternative to the glyoxylate shunt. *Mol Microbiol.* 73 (6): 975-977.
- Schreiber K., Krieger R., Benkert B., Eschbach M., Arai H., Schobert M., Jahn D. (2007) The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J. Bacteriol.* 189(11): 4310–4314.
- Schuster M., Hawkins A.C., Harwood C.S., Greenberg E.P. (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* 51 (4), 973–985.
- Schuster M. und Greenberg E.P. (2006) A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 73–81.
- Singh S.K., Matsuno K., LaPorte D.C., Banaszak L.J. (2001) Crystal structure of *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase at 1.55 Å. Insights into the nature of substrate specificity exhibited by *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. *J Biol Chem.* 13; 276 (28): 26154–26163.
- Singh V.K., Ghosh I. (2006) Kinetic modeling of tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass in *Mycobacterium tuberculosis*, and its application to assessment of drug targets. *Theor Biol Med Model.* 3;3:27.
- Sikkens E.C.M, Cahen D.L., Kuipers E.J., Bruno M.J. (2010) Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24 (3): 337–347.
- Sloane P.A., Rowe S.M. (2010) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 16 (6): 591–597.
- Sonnleitner E., Hagens S., Rosenau F., Wilhelm S., Habel A., Jager K.E., Blasi U. (2003) Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb. Pathog.* 35: 217–228.
- Spaink H.P., Okker R.J.H., Wijffelman C.A., Pees E., Lugtenberg B.J. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Molecular Biology* Vol. 9 (1): 27–39.
- Spiro S. und Guest J.R. (1987) Regulation and Over-expression of the *fnr* Gene of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 133, 3279–3288.
- Sriramulu D.D., Lunsdorf H., Lam J.S., Römling U. (2005) Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* 54: 667–676.
- Stewart V. und Bledsoe P.J. (2003) Synthetic *lac* operator substitutions for studying the nitrate- and nitrite-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 185: 2104–2111.

- Suh S.J., Silo-Suh L., Woods D.E., Hassett D.J., West S.E., Ohman D.E. (1999) Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181: 3890–3897.
- Suzuki M., Sahara T., Tsuruha J., Takada Y., Fukunaga N. (1995) Differential expression in *Escherichia coli* of the *Vibrio* sp. strain ABE-1 *icdI* and *icdII* genes encoding structurally different isocitrate dehydrogenase isozymes. J Bacteriol. 177 (8): 2138–2142.
- Teichgräber V., Ulrich M., Endlich N., Riethmuller J., Wilker B., De Oliveira-Munding C.C., van Heeckeren A.M., Barr M.L., von Kürthy G., Schmid K.W., Weller M., Tümmler B., Lang F., Grassmé H., Döring G., Gulbins E. (2008) Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. Nat Med 14: 382–391.
- Thorsness P.E., Koshland D.E. Jr. (1987) Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate. J Biol Chem 262: 10422–10425.
- Treharne K.J., Crawford R.M., Mehta A. (2006) CFTR, chloride concentration and cell volume: could mammalian protein histidine phosphorylation play a latent role? Exp. Physiol. 91 (1): 131–139.
- Trunk K., Benkert B., Quäck N., Münch R., Scheer M., Garbe J., Jänsch L., Trost M., Wehland J., Buer J., Jahn M., Schobert M., Jahn D. (2010) Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. Environmental Microbiology 12 (6), 1719–1733.
- Tümmler B. und Kiewitz C. (1999) Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. Mol. Med. Today 5: 351–358.
- Typas A., Becker G., Hengge R. (2007) The molecular basis of selective promoter activation by the sigma S subunit of RNA polymerase. Mol. Microbiol. 63: 1296–1306.
- Ugidos A., Morales G., Rial E., Williams H.D., Rojo F. (2008) The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. Environ. Microbiol. 10 (7): 1690–1702.
- Van Alst N.E., Sherrill L.A., Iglewski B.H., Haidaris C.G. (2009) Compensatory periplasmic nitrate reductase activity supports anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the absence of membrane nitrate reductase. Can. J. Microbiol. 55 (10): 1133–1144.
- Varughese K.I. (2002) Molecular recognition of bacterial phosphorelay proteins. Curr. Opin. Microbiol. 5: 142–148.
- Venturi V. (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. FEMS Microbiol. Rev. 30 (2): 274–291.
- Verhaeghe C., Delbecq K., de Leval L., Oury C., Bours V. (2007) Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. J Cyst. Fibros. 6 (4): 304–308.
- Vijgenboom E., Busch J.E., Canters G.W. (1997) *In vivo* studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that *azu* expression is under control of *rpoS* and ANR. Microbiology 143 (Pt 9): 2853–2863.
- Wagner V.E. und Iglewski B.H. (2008) *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. Clin. Rev. Allergy Immunol. 35 (3): 124–134.

- Waine D.J., Honeybourne D., Smith E.G., Whitehouse J.L., Dowson C.G. (2008) Association between hypermutator phenotype, clinical variables, mucoid phenotype, and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3491–3493.
- Walsh K., Koshland D.E. Jr. (1984) Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles. The tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. *J Biol Chem.* 259 (15): 9646-9654.
- Wang Z.X., Brämer C., Steinbüchel A. (2003) Two phenotypically compensating isocitrate dehydrogenases in *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol Lett* 227: 9–16.
- Williams H.D., Zlosnik J.E., Ryall B. (2007) Oxygen, Cyanide and Energy Generation in the Cystic Fibrosis Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv. Microb. Physiol.* 52: 1–71.
- Williams P. und Cámara M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 12 (2): 182–191.
- Winstedt L. und von Wachenfeldt C. (2000) Terminal oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: one quinol oxidase, cytochrome *aa3* or cytochrome *bd*, is required for aerobic growth. *J Bacteriol* 182: 6557–6564.
- Winteler H.V. und Haas D. (1996) The homologous regulators Anr of *Pseudomonas aeruginosa* and Fnr of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. *Microbiol.* 142: 685 –693.
- Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K.C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas J.R., Randell S., Boucher R.C., Döring G. (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* 109 (3): 317–325.
- Worlitzsch D., Rintelen C., Böhm K., Wollschläger B., Merkel N., Borneff-Lipp M., Döring G. (2009) Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 454–460.
- Yang C.C., Nash H.A. (1989) The interaction of *E. coli* IHF protein with its specific binding sites. *Cell* 57, 869–880.
- Ye R.W., Haas D., Ka J.O., Krishnapillai V., Zimmermann A., Baird C., Tiedje J.M. (1995) Anaerobic Activation of the Entire Denitrification Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Requires Anr, an Analog of Fnr. *J. Bacteriol.* 177 (12): 3606–3609.
- Yoon S.S., Hennigan R.F., Hilliard G.M., Ochsner U.A., Parvatiyar M.C., Kamani H., Allen H., DeKievit T., Gardner P.R., Schwab U., Rowe J.J., Iglewski B.H., McDermott T.R., Mason R.P., Wozniak D.J., Hancock R.E., Parsek M.R., Noah T., Boucher R.C., Hassett D.J. (2002) Development and persistence of anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: relevance to pathogenesis and therapy of cystic fibrosis lung disease. *Dev. Cell* 3, 593–603.
- Yoon S.S., Karabulut A.C., Lipscomb J.D., Hennigan R.F., Lyman S.V., Groce S.L., *et al.* (2007) Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration. *EMBO J.* 26: 3662–3672.
- Yu H., Zeidan Y.H., Wu B.X., Jenkins R.W., Flotte T.R., Hannun Y.A., Virella-Lowell I. (2009) Defective acid sphingomyelinase pathway with *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 41: 367–375.

Ziegelhoffer E.C., Kiley P.J. (1995) *In vitro* analysis of a constitutively active mutant form of the *Escherichia coli* global transcription factor FNR. J. Mol. Biol. 27; 245 (4): 351–336.

Zumft W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol Mol Biol Rev. 61 (4): 533–616.

Zumft W.G. (2002) Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4 (3): 277–286.

H. ANHANG

1. Isotopolog-Rohdaten

Tab. H.1. Isotopologverteilung in *P. aeruginosa* PAO1 unter aeroben Bedingungen (Aminosäure-Mischung)

Wachstum mit ^{13}C -markierter Aminosäure-Mischung, Zellen wurden durch 4 % PFA bzw. durch Autoklavieren inaktiviert.

AS-Derivat	Isotopologe *	4 % PFA	Autoklavieren
Ala-260	{000}	94,15% ± 0,14%	92,64% ± 0,02%
	{YYY}1	0,81% ± 0,10%	0,92% ± 0,03%
	{YYY}2	0,41% ± 0,04%	0,49% ± 0,01%
	{111}	4,63% ± 0,01%	5,95% ± 0,02%
Asp-418	{0000}	94,33% ± 0,16%	94,36% ± 0,10%
	{YYYY}1	2,15% ± 0,12%	1,86% ± 0,10%
	{YYYY}2	1,06% ± 0,08%	1,00% ± 0,07%
	{YYYY}3	0,63% ± 0,03%	0,64% ± 0,01%
Glu-432	{1111}	1,83% ± 0,00%	2,14% ± 0,02%
	{00000}	94,15% ± 0,18%	94,53% ± 0,25%
	{YYYYY}1	2,29% ± 0,12%	2,20% ± 0,20%
	{YYYYY}2	1,33% ± 0,08%	1,19% ± 0,09%
	{YYYYY}3	0,79% ± 0,01%	0,79% ± 0,04%
Gly-246	{YYYYY}4	0,09% ± 0,00%	0,07% ± 0,01%
	{11111}	1,35% ± 0,00%	1,21% ± 0,01%
	{00}	94,34% ± 0,04%	94,52% ± 0,10%
	{YY}1	1,04% ± 0,02%	0,92% ± 0,06%
Ile-200	{11}	4,62% ± 0,04%	4,57% ± 0,05%
	{X00000}	96,44% ± 0,03%	97,20% ± 0,00%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Leu-200	{XYYYYY}2	0,12% ± 0,01%	0,11% ± 0,01%
	{XYYYYY}3	0,10% ± 0,01%	0,09% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,19% ± 0,00%	0,15% ± 0,01%
	{X11111}	3,16% ± 0,03%	2,45% ± 0,00%
	{X00000}	92,35% ± 0,02%	94,71% ± 0,01%
Lys-431	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}2	0,19% ± 0,01%	0,10% ± 0,01%
	{XYYYYY}3	0,06% ± 0,00%	0,04% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,40% ± 0,00%	0,26% ± 0,00%
	{X11111}	7,01% ± 0,02%	4,90% ± 0,01%
Lys-431	{000000}	96,75% ± 0,23%	96,67% ± 0,19%
	{YYYYYY}1	0,42% ± 0,27%	0,67% ± 0,13%
	{YYYYYY}2	0,09% ± 0,07%	0,11% ± 0,04%
	{YYYYYY}3	0,06% ± 0,11%	0,03% ± 0,05%
	{YYYYYY}4	0,08% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}5	0,10% ± 0,09%	0,12% ± 0,06%
	{111111}	2,48% ± 0,11%	2,39% ± 0,06%

AS-Derivat	Isotopologe *	4 % PFA	Autoklavieren
Phe-336	{000000000}	93,58% ± 0,17%	96,87% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYY}2	0,39% ± 0,05%	0,31% ± 0,06%
	{YYYYYYYYYY}3	0,09% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYY}5	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYY}8	0,44% ± 0,02%	0,19% ± 0,00%
Pro-286	{111111111}	5,48% ± 0,12%	2,62% ± 0,03%
	{00000}	93,63% ± 0,06%	95,61% ± 0,20%
	{YYYYY}1	0,62% ± 0,07%	0,21% ± 0,10%
	{YYYYY}2	0,81% ± 0,08%	0,61% ± 0,02%
	{YYYYY}3	0,04% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
Ser-390	{YYYYY}4	1,01% ± 0,08%	0,93% ± 0,12%
	{11111}	3,89% ± 0,02%	2,63% ± 0,02%
	{000}	92,12% ± 0,05%	91,75% ± 0,08%
	{YYY}1	3,08% ± 0,05%	3,32% ± 0,10%
Thr-404	{YYY}2	2,18% ± 0,02%	2,23% ± 0,05%
	{111}	2,62% ± 0,03%	2,70% ± 0,02%
	{0000}	86,24% ± 0,09%	85,86% ± 0,06%
	{YYYY}1	4,81% ± 0,09%	5,06% ± 0,04%
Val-288	{YYYY}2	1,88% ± 0,07%	1,90% ± 0,02%
	{YYYY}3	0,08% ± 0,08%	0,15% ± 0,02%
	{1111}	6,98% ± 0,05%	7,03% ± 0,04%
	{00000}	94,22% ± 0,11%	93,78% ± 0,19%
	{YYYYY}1	0,45% ± 0,07%	0,54% ± 0,14%
	{YYYYY}2	0,36% ± 0,07%	0,37% ± 0,02%
	{YYYYY}3	0,15% ± 0,02%	0,16% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,40% ± 0,00%	0,42% ± 0,00%
	{11111}	4,43% ± 0,01%	4,72% ± 0,04%

Tab. H.2. Isotopologverteilung in *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 unter aeroben Bedingungen (Algenlipid)

Wachstum mit ¹³C-markiertem Algenlipid, Zellen wurden durch 4 % PFA üN inaktiviert.

AS-Derivat	Isotopologe*	PAO1 (1)	PAO1 (2)	PA14 (1)	PA14 (2)
Ala-260	{000}	98,16 % ± 0,06 %	98,08 % ± 0,08 %	97,83 % ± 0,05 %	97,78 % ± 0,05 %
	{YYY}1	1,26 % ± 0,06 %	1,26 % ± 0,06 %	1,48 % ± 0,07 %	1,54 % ± 0,06 %
	{YYY}2	0,51 % ± 0,01 %	0,57 % ± 0,02 %	0,62 % ± 0,02 %	0,56 % ± 0,03 %
	{111}	0,07 % ± 0,01 %	0,09 % ± 0,01 %	0,07 % ± 0,01 %	0,12 % ± 0,00 %
Asp-418	{0000}	95,44 % ± 0,24 %	95,67 % ± 0,07 %	92,74 % ± 0,04 %	93,25 % ± 0,04 %
	{YYYY}1	2,39 % ± 0,19 %	2,55 % ± 0,09 %	3,97 % ± 0,09 %	3,77 % ± 0,03 %
	{YYYY}2	1,83 % ± 0,09 %	1,62 % ± 0,12 %	2,92 % ± 0,12 %	2,69 % ± 0,05 %
	{YYYY}3	0,34 % ± 0,04 %	0,17 % ± 0,05 %	0,38 % ± 0,06 %	0,29 % ± 0,03 %
Glu-432	{1111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{00000}	92,34 % ± 0,38 %	92,95 % ± 0,14 %	89,29 % ± 0,15 %	90,03 % ± 0,22 %
	{YYYY}1	3,09 % ± 0,25 %	2,58 % ± 0,07 %	4,07 % ± 0,23 %	3,66 % ± 0,21 %
	{YYYY}2	4,52 % ± 0,16 %	4,28 % ± 0,11 %	6,20 % ± 0,08 %	5,77 % ± 0,07 %
Gly-246	{YYYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,12 % ± 0,03 %	0,34 % ± 0,04 %	0,41 % ± 0,01 %
	{YYYY}4	0,01 % ± 0,01 %	0,05 % ± 0,00 %	0,08 % ± 0,01 %	0,13 % ± 0,01 %
	{11111}	0,04 % ± 0,01 %	0,02 % ± 0,00 %	0,02 % ± 0,01 %	0,01 % ± 0,01 %
	{00}	99,23 % ± 0,04 %	99,44 % ± 0,05 %	99,76 % ± 0,08 %	99,31 % ± 0,05 %
Ile-274	{YY}1	0,50 % ± 0,04 %	0,30 % ± 0,05 %	0,20 % ± 0,06 %	0,59 % ± 0,05 %
	{11}	0,27 % ± 0,00 %	0,25 % ± 0,01 %	0,04 % ± 0,02 %	0,10 % ± 0,00 %
	{X00000}	99,89 % ± 0,04 %	99,80 % ± 0,09 %	100,00 % ± 0,00 %	99,97 % ± 0,04 %
	{YYYYY}1	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
Leu-274	{YYYYY}2	0,02 % ± 0,03 %	0,02 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %	0,03 % ± 0,04 %
	{YYYYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{X11111}	0,09 % ± 0,02 %	0,17 % ± 0,08 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
Lys-431	{X00000}	99,88 % ± 0,12 %	99,63 % ± 0,04 %	99,96 % ± 0,04 %	99,96 % ± 0,02 %
	{YYYYY}1	0,09 % ± 0,10 %	0,30 % ± 0,08 %	0,01 % ± 0,02 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYYY}2	0,02 % ± 0,03 %	0,07 % ± 0,05 %	0,02 % ± 0,03 %	0,02 % ± 0,02 %
	{YYYYY}3	0,00 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,01 %	0,01 % ± 0,02 %
Lys-431	{YYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{X11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{000000}	99,35 % ± 0,18 %	99,67 % ± 0,02 %	99,73 % ± 0,06 %	99,55 % ± 0,14 %
	{YYYYY}1	0,19 % ± 0,33 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,07 % ± 0,12 %
	{YYYYY}2	0,23 % ± 0,19 %	0,00 % ± 0,00 %	0,02 % ± 0,04 %	0,00 % ± 0,00 %
{YYYYY}3	0,23 % ± 0,03 %	0,32 % ± 0,02 %	0,24 % ± 0,07 %	0,38 % ± 0,06 %	
{YYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	
{YYYYY}5	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	
{111111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	

AS-Derivat	Isotopologe*	PAO1 (1)	PAO1 (2)	PA14 (1)	PA14 (2)
Phe-336	{000000000}	98,74 % ± 0,30 %	99,87% ± 0,00%	98,68 % ± 0,27 %	99,26% ± 0,25%
	{YYYYYYYYY}1	1,14 % ± 0,31 %	0,00% ± 0,00%	1,17 % ± 0,24 %	0,55% ± 0,17%
	{YYYYYYYYY}2	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYYY}4	0,12 % ± 0,01 %	0,13% ± 0,00%	0,10 % ± 0,01 %	0,07% ± 0,04%
	{YYYYYYYYY}5	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,04 % ± 0,02 %	0,06% ± 0,05%
	{YYYYYYYYY}6	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYYY}7	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,01 % ± 0,01 %	0,03% ± 0,06%
Pro-286	{YYYYYYYYY}8	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,01% ± 0,02%
	{111111111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%
	{00000}	99,13 % ± 0,15 %	98,95% ± 0,16%	99,19 % ± 0,21 %	99,64% ± 0,15%
	{YYYYY}1	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,37 % ± 0,14 %	0,02% ± 0,04%
	{YYYYY}2	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	0,16 % ± 0,03 %	0,23% ± 0,01%	0,12 % ± 0,02 %	0,19% ± 0,03%
	{YYYYY}4	0,71 % ± 0,12 %	0,82% ± 0,16%	0,32 % ± 0,06 %	0,14% ± 0,12%
	{11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,01% ± 0,01%
Ser-390	{000}	99,73 % ± 0,11 %	99,22% ± 0,01%	99,64 % ± 0,04 %	99,84% ± 0,02%
	{YYY}1	0,08 % ± 0,13 %	0,50% ± 0,06%	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%
	{YYY}2	0,00 % ± 0,00 %	0,07% ± 0,05%	0,05 % ± 0,05 %	0,00% ± 0,00%
	{111}	0,19 % ± 0,02 %	0,21% ± 0,01%	0,30 % ± 0,02 %	0,16% ± 0,02%
	{0000}	97,51 % ± 0,41 %	98,56% ± 0,02%	96,62 % ± 0,32 %	98,15% ± 0,18%
	{YYY}1	2,23 % ± 0,63 %	0,95% ± 0,07%	3,38 % ± 0,32 %	1,75% ± 0,08%
Thr-404	{YYY}2	0,27 % ± 0,23 %	0,49% ± 0,09%	0,00 % ± 0,00 %	0,10% ± 0,10%
	{YYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%
	{00000}	99,37 % ± 0,10 %	99,57% ± 0,08%	99,34 % ± 0,16 %	99,47% ± 0,20%
	{YYYYY}1	0,54 % ± 0,11 %	0,36% ± 0,06%	0,53 % ± 0,16 %	0,46% ± 0,20%
	{YYYYY}2	0,09 % ± 0,02 %	0,05% ± 0,04%	0,08 % ± 0,07 %	0,07% ± 0,01%
Val-288	{YYYYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,01% ± 0,01%	0,04 % ± 0,04 %	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,02% ± 0,00%	0,01 % ± 0,01 %	0,01% ± 0,01%
	{11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%

Tab. H.3. Isotopologverteilung in *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 unter anaeroben Bedingungen (Algenlipid)

Wachstum mit ¹³C-markiertem Algenlipid, Zellen wurden durch 4 % PFA üN inaktiviert.

AS-Derivat	Isotopologe*	PAO1 (1)	PAO1 (2)	PA14 (1)	PA14 (2)
Ala-260	{000}	97,03 % ± 0,12 %	96,99 % ± 0,04 %	98,32 % ± 0,23 %	97,95 % ± 0,07 %
	{YYY}1	2,07 % ± 0,13 %	2,05 % ± 0,05 %	1,13 % ± 0,19 %	1,43 % ± 0,08 %
	{YYY}2	0,80 % ± 0,01 %	0,84 % ± 0,03 %	0,47 % ± 0,05 %	0,53 % ± 0,02 %
	{111}	0,10 % ± 0,01 %	0,12 % ± 0,01 %	0,08 % ± 0,02 %	0,09 % ± 0,01 %
Asp-418	{0000}	93,93 % ± 0,12 %	93,64 % ± 0,09 %	95,76 % ± 0,16 %	95,48 % ± 0,03 %
	{YYYY}1	3,63 % ± 0,15 %	3,93 % ± 0,12 %	2,56 % ± 0,15 %	2,72 % ± 0,05 %
	{YYYY}2	2,21 % ± 0,11 %	2,21 % ± 0,14 %	1,44 % ± 0,14 %	1,61 % ± 0,04 %
	{YYYY}3	0,23 % ± 0,06 %	0,22 % ± 0,04 %	0,24 % ± 0,07 %	0,19 % ± 0,00 %
Glu-432	{1111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{00000}	90,72 % ± 0,32 %	90,41 % ± 0,17 %	95,41 % ± 0,44 %	94,13 % ± 0,17 %
	{YYYYY}1	3,73 % ± 0,28 %	3,87 % ± 0,08 %	1,68 % ± 0,37 %	2,25 % ± 0,19 %
	{YYYYY}2	5,13 % ± 0,08 %	5,29 % ± 0,16 %	2,75 % ± 0,13 %	3,35 % ± 0,03 %
Gly-246	{YYYYY}3	0,33 % ± 0,06 %	0,32 % ± 0,03 %	0,13 % ± 0,08 %	0,23 % ± 0,05 %
	{YYYYY}4	0,08 % ± 0,01 %	0,10 % ± 0,02 %	0,01 % ± 0,01 %	0,05 % ± 0,02 %
	{11111}	0,01 % ± 0,01 %	0,02 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %
	{00}	99,70 % ± 0,17 %	99,76 % ± 0,22 %	99,95 % ± 0,04 %	99,49 % ± 0,09 %
Ile-274	{YY}1	0,25 % ± 0,12 %	0,19 % ± 0,17 %	0,05 % ± 0,04 %	0,48 % ± 0,07 %
	{11}	0,06 % ± 0,05 %	0,05 % ± 0,05 %	0,00 % ± 0,00 %	0,03 % ± 0,02 %
	{X00000}	99,90 % ± 0,02 %	99,87 % ± 0,03 %	100,00 % ± 0,00 %	99,88 % ± 0,04 %
	{XYYYYY}1	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
Leu-274	{XYYYYY}2	0,10 % ± 0,02 %	0,13 % ± 0,03 %	0,00 % ± 0,00 %	0,11 % ± 0,03 %
	{XYYYYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{XYYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{X11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,01 %
Lys-431	{X00000}	99,94 % ± 0,11 %	100,00 % ± 0,00 %	99,99 % ± 0,02 %	99,98 % ± 0,01 %
	{XYYYYY}1	0,05 % ± 0,08 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{XYYYYY}2	0,01 % ± 0,02 %	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %
	{XYYYYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,01 %
Lys-431	{XYYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{X11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,01 %
	{000000}	98,20 % ± 0,82 %	98,27 % ± 0,91 %	98,69 % ± 1,69 %	99,53 % ± 0,05 %
	{YYYYYY}1	1,04 % ± 0,68 %	0,97 % ± 0,82 %	0,04 % ± 0,06 %	0,19 % ± 0,20 %
	{YYYYYY}2	0,49 % ± 0,18 %	0,50 % ± 0,26 %	0,86 % ± 1,48 %	0,01 % ± 0,02 %
{YYYYYY}3	0,26 % ± 0,04 %	0,26 % ± 0,15 %	0,19 % ± 0,16 %	0,27 % ± 0,17 %	
{YYYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	
{YYYYYY}5	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,17 % ± 0,29 %	0,00 % ± 0,00 %	
{111111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,06 % ± 0,11 %	0,00 % ± 0,00 %	

AS-Derivat	Isotopologe*	PAO1 (1)	PAO1 (2)	PA14 (1)	PA14 (2)
Phe-336	{000000000}	99,45 % ± 0,59 %	99,80 % ± 0,13 %	98,43 % ± 0,37 %	99,11 % ± 0,20 %
	{YYYYYYYYY}1	0,36 % ± 0,62 %	0,07 % ± 0,12 %	1,33 % ± 0,55 %	0,63 % ± 0,21 %
	{YYYYYYYYY}2	0,07 % ± 0,12 %	0,02 % ± 0,03 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYYYYYYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,01 %
	{YYYYYYYYY}4	0,13 % ± 0,03 %	0,11 % ± 0,03 %	0,13 % ± 0,06 %	0,15 % ± 0,02 %
	{YYYYYYYYY}5	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,01 %	0,10 % ± 0,14 %	0,04 % ± 0,06 %
	{YYYYYYYYY}6	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,00 %
	{YYYYYYYYY}7	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,03 % ± 0,04 %
Pro-286	{YYYYYYYYY}8	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,02 % ± 0,04 %
	{111111111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{00000}	99,21 % ± 0,25 %	99,22 % ± 0,35 %	98,62 % ± 0,36 %	99,58 % ± 0,14 %
	{YYYYY}1	0,29 % ± 0,12 %	0,24 % ± 0,17 %	0,02 % ± 0,03 %	0,04 % ± 0,07 %
	{YYYYY}2	0,01 % ± 0,02 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYYY}3	0,17 % ± 0,02 %	0,23 % ± 0,01 %	0,10 % ± 0,07 %	0,15 % ± 0,03 %
	{YYYYY}4	0,32 % ± 0,30 %	0,30 % ± 0,20 %	1,26 % ± 0,30 %	0,22 % ± 0,13 %
	{11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,02 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
Ser-390	{000}	99,45 % ± 0,16 %	99,40 % ± 0,22 %	99,76 % ± 0,16 %	99,86 % ± 0,01 %
	{YYY}1	0,15 % ± 0,16 %	0,19 % ± 0,21 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYY}2	0,18 % ± 0,03 %	0,24 % ± 0,14 %	0,03 % ± 0,05 %	0,00 % ± 0,00 %
	{111}	0,22 % ± 0,03 %	0,17 % ± 0,03 %	0,22 % ± 0,12 %	0,14 % ± 0,01 %
	{0000}	98,68 % ± 1,39 %	97,54 % ± 0,12 %	97,04 % ± 0,31 %	98,06 % ± 0,37 %
	{YYY}1	1,11 % ± 1,26 %	2,11 % ± 0,30 %	2,96 % ± 0,31 %	1,75 % ± 0,36 %
Thr-404	{YYY}2	0,21 % ± 0,18 %	0,35 % ± 0,17 %	0,00 % ± 0,00 %	0,20 % ± 0,04 %
	{YYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{00000}	99,48 % ± 0,05 %	99,54 % ± 0,17 %	99,97 % ± 0,02 %	99,75 % ± 0,06 %
	{YYY}1	0,45 % ± 0,05 %	0,39 % ± 0,19 %	0,00 % ± 0,00 %	0,21 % ± 0,09 %
	{YYY}2	0,05 % ± 0,02 %	0,04 % ± 0,03 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
Val-288	{YYY}3	0,02 % ± 0,02 %	0,02 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,01 %	0,02 % ± 0,02 %
	{1111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,01 % ± 0,02 %	0,02 % ± 0,02 %

Tab. H.4. Isotopologverteilung in *P. aeruginosa* Patientenisolat M1 und M26

Wachstum mit ^{13}C -markiertem Algenlipid unter aeroben Bedingungen, Zellen wurden durch 4 % PFA ün inaktiviert.

AS-Derivat	Isotopologe*	M1 (1)	M1 (2)	M26 (1)	M26 (2)
Ala-260	{000}	98,10 % ± 0,11 %	97,86 % ± 0,08 %	97,30 % ± 0,03 %	97,41 % ± 0,11 %
	{YYY}1	1,24 % ± 0,08 %	1,41 % ± 0,07 %	1,74 % ± 0,02 %	1,68 % ± 0,07 %
	{YY}2	0,57 % ± 0,04 %	0,62 % ± 0,02 %	0,88 % ± 0,01 %	0,80 % ± 0,04 %
	{111}	0,09 % ± 0,03 %	0,10 % ± 0,01 %	0,08 % ± 0,01 %	0,10 % ± 0,01 %
Asp-418	{0000}	94,74 % ± 0,03 %	94,40 % ± 0,19 %	96,92 % ± 0,38 %	96,40 % ± 0,10 %
	{YYY}1	2,90 % ± 0,04 %	3,21 % ± 0,14 %	1,40 % ± 0,24 %	2,05 % ± 0,06 %
	{YY}2	2,17 % ± 0,08 %	2,21 % ± 0,08 %	1,38 % ± 0,19 %	1,42 % ± 0,04 %
	{YY}3	0,18 % ± 0,05 %	0,18 % ± 0,02 %	0,29 % ± 0,02 %	0,13 % ± 0,01 %
Glu-432	{1111}	0,01 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{00000}	93,12 % ± 0,22 %	91,84 % ± 0,08 %	93,63 % ± 0,18 %	93,81 % ± 0,42 %
	{YYY}1	2,74 % ± 0,15 %	2,96 % ± 0,15 %	2,24 % ± 0,19 %	1,99 % ± 0,18 %
	{YY}2	3,79 % ± 0,10 %	4,90 % ± 0,12 %	4,09 % ± 0,02 %	3,98 % ± 0,26 %
Gly-246	{YYY}3	0,28 % ± 0,03 %	0,22 % ± 0,03 %	0,00 % ± 0,00 %	0,14 % ± 0,03 %
	{YYY}4	0,06 % ± 0,05 %	0,06 % ± 0,02 %	0,01 % ± 0,01 %	0,05 % ± 0,01 %
	{11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,02 % ± 0,01 %	0,04 % ± 0,00 %	0,02 % ± 0,00 %
	{00}	99,47 % ± 0,09 %	99,31 % ± 0,03 %	98,80 % ± 0,09 %	98,73 % ± 0,04 %
Ile-274	{YY}1	0,26 % ± 0,08 %	0,41 % ± 0,02 %	0,55 % ± 0,07 %	0,67 % ± 0,04 %
	{11}	0,27 % ± 0,01 %	0,29 % ± 0,02 %	0,64 % ± 0,02 %	0,60 % ± 0,01 %
	{X00000}	99,91 % ± 0,03 %	99,81 % ± 0,16 %	99,92 % ± 0,01 %	99,85 % ± 0,01 %
	{XYYYY}1	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
Leu-274	{XYYYY}2	0,05 % ± 0,02 %	0,02 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %	0,02 % ± 0,01 %
	{XYYYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{XYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{X11111}	0,04 % ± 0,01 %	0,17 % ± 0,15 %	0,08 % ± 0,01 %	0,13 % ± 0,02 %
Lys-431	{X00000}	99,68 % ± 0,08 %	99,77 % ± 0,08 %	99,50 % ± 0,04 %	99,53 % ± 0,21 %
	{XYYYY}1	0,23 % ± 0,09 %	0,23 % ± 0,08 %	0,41 % ± 0,02 %	0,43 % ± 0,14 %
	{XYYYY}2	0,07 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,09 % ± 0,02 %	0,04 % ± 0,08 %
	{XYYYY}3	0,00 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{XYYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{X11111}	0,01 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{000000}	99,48 % ± 0,48 %	99,72 % ± 0,03 %	99,38 % ± 0,09 %	99,72 % ± 0,03 %
	{YYYY}1	0,02 % ± 0,03 %	0,00 % ± 0,00 %	0,02 % ± 0,03 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYY}2	0,05 % ± 0,09 %	0,00 % ± 0,00 %	0,37 % ± 0,06 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYY}3	0,42 % ± 0,39 %	0,28 % ± 0,03 %	0,24 % ± 0,01 %	0,28 % ± 0,03 %
	{YYYY}4	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYY}5	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %
	{111111}	0,03 % ± 0,05 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %

AS-Derivat	Isotopologe*	M1 (1)	M1 (2)	M26 (1)	M26 (2)
Phe-336	{000000000}	99,37 % ± 0,25 %	99,87 % ± 0,01 %	97,68% ± 0,36%	99,63 % ± 0,21 %
	{YYYYYYYYY}1	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	2,19% ± 0,35%	0,23 % ± 0,21 %
	{YYYYYYYYY}2	0,08 % ± 0,09 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYYYYYYY}3	0,11 % ± 0,18 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYYYYYYY}4	0,15 % ± 0,20 %	0,13 % ± 0,01 %	0,13% ± 0,01%	0,14 % ± 0,00 %
	{YYYYYYYYY}5	0,15 % ± 0,17 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYYYYYYY}6	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
	{YYYYYYYYY}7	0,13 % ± 0,12 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
Pro-286	{YYYYYYYYY}8	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
	{111111111}	0,02 % ± 0,04 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
	{00000}	98,51 % ± 0,63 %	98,90 % ± 0,05 %	98,86% ± 0,22%	98,28 % ± 0,18 %
	{YYYYY}1	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,05% ± 0,08%	0,17 % ± 0,11 %
	{YYYYY}2	0,03 % ± 0,06 %	0,00 % ± 0,00 %	0,08% ± 0,14%	0,05 % ± 0,05 %
	{YYYYY}3	0,25 % ± 0,06 %	0,22 % ± 0,02 %	0,23% ± 0,02%	0,26 % ± 0,02 %
	{YYYYY}4	1,14 % ± 0,67 %	0,88 % ± 0,07 %	0,78% ± 0,19%	1,25 % ± 0,14 %
	{11111}	0,06 % ± 0,10 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
Ser-390	{000}	98,30 % ± 0,81 %	98,89 % ± 0,23 %	99,45% ± 0,17%	97,75 % ± 0,08 %
	{YYY}1	1,37 % ± 0,67 %	0,75 % ± 0,27 %	0,15% ± 0,15%	1,42 % ± 0,10 %
	{YYY}2	0,27 % ± 0,22 %	0,18 % ± 0,02 %	0,03% ± 0,06%	0,62 % ± 0,05 %
	{111}	0,06 % ± 0,03 %	0,18 % ± 0,03 %	0,37% ± 0,04%	0,21 % ± 0,01 %
	{0000}	98,23 % ± 0,66 %	98,34 % ± 0,31 %	95,88% ± 0,71%	97,11 % ± 0,20 %
	{YYY}1	0,17 % ± 0,30 %	1,00 % ± 0,42 %	3,07% ± 0,90%	1,65 % ± 0,33 %
	{YYY}2	1,60 % ± 0,41 %	0,66 % ± 0,11 %	1,05% ± 0,19%	1,24 % ± 0,15 %
	{YYY}3	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
Thr-404	{1111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
	{00000}	99,40 % ± 0,03 %	99,55 % ± 0,07 %	99,95% ± 0,04%	99,87 % ± 0,10 %
	{YYYYY}1	0,48 % ± 0,10 %	0,41 % ± 0,10 %	0,03% ± 0,02%	0,09 % ± 0,10 %
	{YYYYY}2	0,09 % ± 0,08 %	0,03 % ± 0,05 %	0,01% ± 0,01%	0,01 % ± 0,02 %
	{YYYYY}3	0,00 % ± 0,01 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,01%	0,01 % ± 0,01 %
	{YYYYY}4	0,03 % ± 0,04 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,01 % ± 0,01 %
	{11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,01 % ± 0,01 %
	{11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %
Val-288	{11111}	0,00 % ± 0,00 %	0,00 % ± 0,00 %	0,00% ± 0,00%	0,00 % ± 0,00 %

*** Alle Isotopologe sind als binärer Code dargestellt:**

- Die Anzahl der Zeichen und/oder Zahlen in der geschweiften Klammer gibt an, wie viele C-Atome sich im betreffenden Aminosäure-Derivat befinden (Bsp.: {000}, {XYY} oder {011} bedeutet, das Derivat besteht aus jeweils drei C-Atomen, {1111}, {XYYY} oder {0YYY} bedeutet, das Derivat besteht aus jeweils vier C-Atomen. etc. Die erste Ziffer bzw. der erste Buchstabe steht für das erste C-Atom, die zweite Ziffer bzw. der zweite Buchstabe für das zweite C-Atom, etc.)
- Die „0“ steht für ein ^{12}C (unmarkiert), die „1“ steht für ein ^{13}C (markiert) und „X“ steht für ^{12}C oder ^{13}C (unbekannt).
- Der Buchstabe „Y“ steht für ^{12}C oder ^{13}C , hier gibt die Zahl außerhalb der Klammer die Anzahl an ^{13}C -Atomen im Molekül an, wobei aber die Position der markierten C-Atome nicht bekannt (Bsp.: {0YY}1 = ein C-Atom von insgesamt drei C-Atomen ist ein ^{13}C -Atom, entweder das C-2 oder das C-3, das erste C-Atom ist unmarkiert). Diese Isotopologe bezeichnet man auch als m+1 (im Molekül ist ein ^{13}C vorhanden), m+2, m+3, usw. (m = Masse des Fragments).
- Definition „Isotopologe“: Moleküle einer Art, die sich nur durch die isotopische Zusammensetzung untereinander unterscheiden (Bsp.: [1- ^{13}C] Laktat, [2- ^{13}C] Laktat, [1,2- ^{13}C] Laktat, etc.)
- Definition „Isotopomere“: eine Population von Isotopologen

2. Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Eichner A., Eylert E., Andrä P., Eisenreich W., Hogardt M. Isotopologue profiling of *Pseudomonas aeruginosa* under infection-like conditions. In Vorbereitung.

Eichner A., Günther N., Heesemann J., Hogardt M. Characterization and Regulation of Isocitrate dehydrogenase Isoenzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. In Vorbereitung.

Günther N., Eichner A., Arnold M., Götzfried M., Schobert M., Heesemann J., Hogardt M. The small heat shock protein IbpA and its role during adaptation to the cystic fibrosis lung. In Vorbereitung.

Hoboth C., Hoffmann R., Eichner A., Henke C., Schmoltdt S., Imhof A., Heesemann J., Hogardt M. (2009) Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 200(1): 118-130.

Tagungsbeiträge

Eichner A., Eylert E., Günther N., Götzfried M., Schobert M., Heesemann J., Eisenreich W., Hogardt M. (2010) Poster: Metabolism of adapted *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from chronic CF lung disease; 62. Jahrestagung der DGHM in Hannover, 28. – 31. März 2010

Eichner A., Günther N., Götzfried M., Heesemann J., Hogardt M. (2009) Poster: Metabolic marker genes of *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle in micro-aerobic CF mucus; 61. Jahrestagung der DGHM in Göttingen, 20. – 23. September 2009

Auszeichnung mit dem 2. Posterpreis

Eichner A., Günther N., Götzfried M., Heesemann J., Hogardt M. (2009) Vortrag und Poster: Metabolic marker genes of *Pseudomonas aeruginosa* adaptation during cystic fibrosis lung infection; 3rd European CF Young Investigator Meeting in Lille, Frankreich, 25. – 28. August 2009

Eichner A., Henke C., Günther N., Götzfried M., Heesemann J., Hogardt M. (2008) Vortrag: Metabolic marker genes of *Pseudomonas aeruginosa* adaptation to the CF lung. 60. Jahrestagung der DGHM in Dresden, 21. – 24. September 2008

3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir in den vergangenen Jahren zur Seite standen und mich unterstützt haben:

- bei Herrn Prof. Dr. Dirk Schüler für die Übernahme des Erstgutachtens und für die Bereitschaft, meine Arbeit vor der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München zu vertreten.
- bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- bei Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit, diese Arbeit am Max von Pettenkofer Institut in München durchzuführen und für die interessanten und guten Ratschläge und Tipps.
- bei Herrn PD Dr. med. Michael Hogardt für die Betreuung dieser Arbeit und für die interessanten Diskussionen nicht nur um *Pseudomonas aeruginosa*. Vielen Dank auch für die Möglichkeit der Teilnahme an mehreren Kongressen.
- bei Herrn PD Dr. rer. nat. Wolfgang Eisenreich und Dr. Eva Eylert für die exzellente Zusammenarbeit bei der Etablierung des 'Isotopologie Profiling' in unserem Labor und für die spannenden Diskussionen rund um die Isotopologie.

Ein ganz lieber Dank geht an alle ehemaligen Kolleginnen und Kollegen am MVP: Nicole, Moni, Martin, Benjamin, Sabine, Alexandra, Iclal, Katharina, Christine, Rike, Christiane, Giuseppe, Felix, Dominik und Sören. Danke für schöne Mittagessen, lustige Bowling-Abende, feucht-fröhliche Weihnachtsfeiern und für alle nützlichen Tipps und Tricks rund ums Labor!

Mein allergrößter Dank gilt meinen lieben Eltern: ich danke Euch für die immer währende Unterstützung, ihr seid die Besten!