

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

**Zur Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa*
bei pulmonaler Infektion bei Mukoviszidose
Regulation Typ-III-sezernierter Exoenzyme durch
Quorum Sensing, RpoS und MucA**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maximilian Jörg Roeder

aus

Gräfelfing

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. U. Wintergerst

1. Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. G. Längst
2. Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Behr

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med Michael Hogardt

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2005

1 Einleitung	1
1.1 Mikrobiologie von <i>P. aeruginosa</i>	2
1.2 Die Bedeutung von <i>P. aeruginosa</i> als Krankheitserreger	3
1.3 Die wichtigsten Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i>	4
1.3.1 Proteinsekretion	4
1.3.1.1 Typ-I-Sekretion	6
1.3.1.2 Typ-II-Sekretion	7
1.3.1.3 Typ-III-Sekretion	8
1.3.1.4 Typ-IV-Sekretion	14
1.3.1.5 Typ-V-Sekretion	15
1.3.2 Sekretion von Nicht-Proteinen	16
1.3.2.1 Pigmente	16
1.3.2.2 Mukopolysaccharide und Biofilmbildung	16
1.4 Regulation von Pathogenitätsgenen	19
1.4.1 Regulation von Virulenzfaktoren durch Sigma- und Antisigmafaktoren	21
1.4.1.1 RpoS - der Sigmafaktor der stationären Phase	21
1.4.1.2 AlgU, MucA und die Konversion zum Mucoiden Phänotyp	21
1.4.2 Quorum Sensing	23
1.5 Reportertechnologie	29
1.6 Zielsetzung	33

2 Material und Methoden	36
2.1 Material	36
2.1.1 Geräte	36
2.1.2 Sonstige Materialien	37
2.1.3 Chemikalien	37
2.1.4 Kits	39
2.1.5 Elektrophorese-Marker	40
2.1.6 Synthetische Oligonukleide	40
2.1.7 Plasmide	41
2.1.8 Bakterienstämme	42
2.1.9 Enzyme	44
2.1.10 Antikörper und Antiseren	44
2.1.11 Medien und Agar	45
2.2 Methoden	47
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	47
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA	47
2.2.1.1.1 Schnellpräp von Plasmiden:	48
2.2.1.1.2 Mini-Plasmidpräparation:	48
2.2.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	49
2.2.1.2.1 Gesamtzellsat	49
2.2.1.2.2 Reaktionsansatz	50
2.2.1.2.3 Reaktionsansatz zur Herstellung von DIG-markierten Sonden	50
2.2.1.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	50

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA	51
2.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	52
2.2.1.5.1 Anfärbung der DNA-Banden	52
2.2.1.5.2 Extraktion	52
2.2.1.6 Klonierung von DNA-Fragmenten	52
2.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA	53
2.2.1.7.1 Herstellung kalzium-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	53
2.2.1.7.2 Transformation kompetenter Zellen	54
2.2.1.8 Elektroporation von Plasmid-DNA	55
2.2.1.8.1 Herstellung elektro-kompetenter Bakterien	55
2.2.1.8.2 Elektroporation kompetenter Zellen	55
2.2.1.9 Konjugation	56
2.2.1.10 Kolonie-Hybridisierung	57
2.2.1.10.1 Lyse der Kolonien und Fixierung:	57
2.2.1.10.2 Reinigung der Membranen von Residuen:	58
2.2.1.10.3 Hybridisierung:	58
2.2.1.10.4 Detektion:	58
2.2.1.11 Isolierung von RNA	59
2.2.1.12 Northernblot	60
2.2.1.13 Westernblot	60
2.2.1.13.1 Vorbereitung der Proben:	61
2.2.1.13.2 Denaturierende, diskontinuierliche SDS-Gel-Elektrophorese:	61
2.2.1.13.3 Coomassie-Färbung	62
2.2.1.13.4 Immunoblotting	63
2.2.2 Kulturtechniken für Bakterien und eukaryote Zellen	64
2.2.2.1 Vorkultur von <i>P. aeruginosa</i>	64

2.2.2.2 Stimulation der Exotoxinproduktion von <i>P. aeruginosa</i>	64
2.2.2.3 Substitutionsversuche mit Homoserinolactonen	65
2.2.2.4 Kultur von Biofilmen	65
2.2.2.5 Unterstützung der Ausprägung des mucoiden Phänotypes . . .	65
2.2.2.6 Zellkultur	66
2.2.2.7 Kokultur von <i>P. aeruginosa</i> mit HeLa-Zellen	66
2.2.2.7.1 Vorbereitung der HeLa-Zellen:	66
2.2.2.7.2 Zugabe der Bakterien:	66
2.2.3 Detektion der Expression	67
2.2.3.1 Fixierung und Färbung zur Mikroskopie	67
2.2.3.1.1 Phalloidin-TRITC-Färbung	67
2.2.3.1.2 Propidiumjodid-Färbung	67
2.2.3.1.3 Eindeckmittel	67
2.2.3.2 Konfokale Laser-Mikroskopie	67
2.2.3.3 Durchflußzytometrie	68
2.2.3.3.1 Vorbereitung der Proben:	68
2.2.3.3.2 Vorbereitung des Fluoreszenzdurchflußzytometers:	68
2.2.3.3.3 Messungen:	69
2.2.4 DNA-Sequenzen von <i>P. aeruginosa</i>	70
2.2.5 Statistische Auswertungsverfahren	70
3 Ergebnisse	71
3.1 <i>exoS'</i>-<i>gfp</i>-Expression im Biofilm	71
3.2 Messung der <i>exoS'</i>-<i>gfp</i>- und <i>exoU'</i>-<i>gfp</i>-Expression mittels Durchflußzytometrie unter künstlicher Stimulation . . .	72

3.2.1 <i>exoS'</i> - <i>gfp</i> -Expression	73
3.2.2 Expression von <i>exoU'</i> - <i>gfp</i>	76
3.2.3 Expression nach Substitution der Homoserinolactone ...	77
3.3 <i>exoS'</i> - <i>gfp</i> -Expression in <i>P. aeruginosa</i> im Kokultur- Versuch mit der humanen Zelllinie HeLa	82
3.4 Nachweis von <i>exoS</i> -mRNA und ExoS unter Stimulationsbedingungen	85
3.4.1 Vergleich der ExoS-Synthese im Western-Blot	85
3.4.2 Vergleich der <i>exoS</i> -mRNA mittels Northern-Blot	86
3.5 Mutagenese des <i>mucA</i> -Genes	87
3.5.1 Klonierung des <i>mucA</i> -Genes	90
3.5.2 Einführung einer Deletion in das klonierte <i>mucA</i> -Gen ...	90
3.5.3 Konjugation von pMR3 in <i>P. aeruginosa</i>	90
3.5.4 Komplementierung der <i>mucA</i> -Mutanten	92
3.5.5 Einfluß des Antisigmafaktors MucA auf die Expres- sion von <i>exoS</i>	93
4 Diskussion	95
4.1 Methodik	96
4.2 Quorum Sensing: Das <i>rhl</i> -System und Typ-III-Sekretion	98
4.3 RpoS und Typ-III-Sekretion	105

4.4 Konversion zum Mucoiden Phänotyp und Typ-III-Sekretion	108
4.5 Antimikrobielle Therapie mit Wirkung auf Quorum Sensing	110
5 Zusammenfassung	113
6 Anhang	115
6.1 Literaturverzeichnis	115
6.2 Abkürzungen	127
6.3 Danksagung	130
6.4 Lebenslauf	132

1 Einleitung

Mukoviszidose (Synonym: Cystische Fibrose - CF) ist die häufigste letale autosomal vererbte Krankheit der weißen Bevölkerung. Fast jeder 20. Nordeuropäer ist asymptomatischer, heterozygoter Träger einer von über 200 bekannten rezessiven Mutationen des Genes für den *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR), einen epithelialen Chloridtransporter. Bei Homozygoten kann dies zu einem funktionellen Defekt und damit zu einer Viskositätserhöhung der Sekrete der exokrinen Drüsen führen. Die dadurch verminderte mukoziliäre Clearance hat unter anderem eine chronischen Bronchitis mit Atelektasen und Bronchiektasien zur Folge. Sie prädisponiert zu bakteriellen Superinfektionen. (Murken *et al.*; 1996). Typisch ist die Folge der Erreger im Verlauf der Infektion. So leiden in der Altersgruppe unter vier Jahren 70% der Patienten unter Staphylokokken-Infektionen. Im Verlauf verschiebt sich das Erregerspektrum, so daß ab dem jungen Erwachsenenalter chronische Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Prävalenz von 80% vorherrschen. Die Antibiotikatherapie ist dann meist palliativ und Eradikationen sind selten. Im weiteren Verlauf wiederholen sich akute pulmonale Exacerbationen. Die zunehmende irreversible Schädigung des Lungengewebes führt schließlich nach Jahren zum Tod durch Lungenversagen (Govan *et al.*; 1996).

Die komplexe Pathogenese der chronischen pulmonalen Infektion durch *P. aeruginosa* ist noch nicht vollständig verstanden. Bei ihrer Erforschung wurde in neuerer Zeit eine Vielzahl von Mechanismen zur Etablierung der Infektion und Evasion der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr des Wirtes entdeckt. Hier spielt die Sekretion von Toxinen eine bedeutende Rolle. Wie zahlreiche gramnegative Bakterien besitzt *P. aeruginosa* mehrere Protein-Sekretionsysteme. Über das Typ-II-Sekretionssystem werden zum Beispiel Proteasen und Toxine in die

Umgebung des Bakteriums sezerniert. Das Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) ermöglicht dagegen über einen direkten Zell-Zell-Kontakt die Translokation von Exotoxinen in das Zytoplasma von Zellen des Wirtes. Darüber hinaus bildet *P. aeruginosa* Biofilme, in denen die Bakterien auf Oberflächen haften und durch eine Matrix aus Muko- polysaccharid geschützt sind. Bisher ist wenig über die Regulation des Typ-III-Sekretionssystems bekannt. Eine mit Biofilmbildung, Matrixproduktion und dem Typ-II-Sekretionssystem koordinierte Expression erscheint jedoch sinnvoll. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, den Einfluß von Regulationsmechanismen auf das TTSS von *P. aeruginosa* zu untersuchen

1.1 Mikrobiologie von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa zählt zu den Nonfermentern. Diese Bezeichnung umfaßt eine phylogenetisch sehr heterogene Gruppe von Bakterien, die zur γ -Subklasse der Proteobacteria gehört. Sie beschreibt gramnegative Stäbchenbakterien, die nicht ohne den Zusatz von Nitrat, Nitrit oder Arginin anaerob wachsen können und dann auch keine Kohlenhydrate fermentieren. In der Natur kommen Nonfermenter meist im Wasser und im Boden vor und sind mit wenigen Ausnahmen apathogen oder opportunistische Krankheitserreger. Der Begriff *Pseudomonas* („Falsches Urkörperchen“) wurde 1894 eingeführt und sollte alle geraden, stäbchenförmigen und polar begeißelten Bakterien zusammenfassen. Später folgten weitere Einschränkungen, so etwa auf gramnegative und nicht sporenbildende Bakterien, sowie obligate Aerobier. Nach phylogenetischen Reklassifizierungen insbesondere auf der Basis von Sequenzvergleichen der 16S rRNA umfaßt die Familie der *Pseudomonadaceae* heute sieben Gattungen, darunter das Genus *Pseudomonas*. Die Typspezies *P. aeruginosa* wurde 1862 erstmals beschrieben. Ihren Namen erhielt sie vom grünspanfarbigen (lat. *aerugo* = Grünspan) Belag auf infizierten Wunden. Dieser entsteht durch die Blaufärbung von Wundsekreten, durch wasserlösliche,

fluoreszierende Farbpigmente von *P. aeruginosa*, darunter unter anderem das Pyocyanin. Daher stammt auch die alte Bezeichnung *Bacterium pyocyaneum* (Bakterium des blauen Eiters). Ebenso charakteristisch ist der an Lindenblüten erinnernde Geruch, der durch die Bildung von o-Aminoacetophenon zustande kommt. Das optimale Wachstum findet bei 36 +/- 1°C statt (*Brandis et al.; 1994*).

1.2 Die Bedeutung von *P. aeruginosa* als

Krankheitserreger

Für den immunkompetenten Menschen hat *P. aeruginosa* selten Bedeutung als Krankheitserreger. Eine asymptomatische Besiedelung ist häufig. Die intakte Haut und die Schleimhäute als Barriere bieten zusammen mit der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr einen ausreichenden Schutz vor invasiven Infektionen. Die Minderung der Keimabwehr durch eine prädisponierende Grunderkrankung oder die Störung der Barrierefunktion der Haut und Schleimhäute ist eine Voraussetzung für eine Infektion. Deren Verlauf ist dann jedoch durch das Arsenal an bakteriellen Virulenzfaktoren, die intrinsische Resistenz gegen ein breites Spektrum der Antibiotika und die rasche Entwicklung neuer Resistenzen geprägt.

Außerhalb des Krankenhauses finden sich vor allem Infektionen länger bestehender Hautdefekte (z.B. *Ulcus cruris*) und die akute *Otitis externa*. Invasion über minimale cutane Verletzungen wie Injektionsstellen, besonders bei parenteralem Drogen-Abusus, können ein *Ecthyma gangraenosum*, ein bösartiges, scharf begrenztes Ulcus zur Folge haben. Häufig sind ebenfalls posttraumatische Augeninfektionen und Keratitiden bei Trägern von Kontaktlinsen. Bei hospitalisierten Personen prädisponieren Tuben, Kanülen und Katheter für Infektionen mit *P. aeruginosa*. Inhalation des Erregers kann zu nekrotisierenden Bronchitiden und

Pneumonien mit Neigung zur Generalisation führen. Harnwegsinfektionen finden sich auch häufig bei Trägern von Dauerkathetern und nach urologischen Operationen. Chronische Pyelonephritiden entstehen auf dem Boden von Variationen der Anatomie der Harnwege sowie bei rezidivierender Nephrolithiasis. Unter Antibiotikatherapie sind schwere Enterokolitiden mit wäßriger bis blutiger Diarrhoe, Dehydratation und Fieber beschrieben worden. Der Verlust der Barrierefunktion der Haut bei Verbrennungen führt bei Infektion der Brandwunden zu einem massiven Eindringen von *P. aeruginosa*. Ein Eintritt ins Gefäßsystem geht mit lebensgefährlichen Septikämien und Endokarditiden einher. Wie eingangs dargestellt, tritt bei Patienten mit Zystischer Fibrose regelhaft eine chronische Infektion der Lunge auf. Durch eine frühzeitige präventive Antibiotikabehandlung beim ersten Auftreten von *P. aeruginosa* kann eine Verbesserung der Überlebensdauer erreicht werden. Der Verlauf ist dennoch durch akute Exacerbationen gekennzeichnet und führt zu zunehmender Degeneration des Lungengewebes und schließlich zum Organversagen (*Brandis et al.; 1994*).

1.3 Die wichtigsten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt zahlreiche Virulenzfaktoren. Eine Rolle spielt hier unter anderem die Sekretion von Enzymen zur Modifikation des Extrazellulärraumes und von Toxinen, die Ausprägung eines Biofilmes auf Oberflächen und die Sekretion einer extrazellulären Matrix.

1.3.1 Proteinsekretion

Gramnegative Bakterien besitzen im Gegensatz zu grampositiven Bakterien eine doppelte Zellmembran. Proteinsekretion bedeutet hier also den Transport über die innere Membran, den periplasmatischen Raum und die äußere Membran. Im Periplasma steht kein ATP zur Verfügung, so daß die Sekretionssysteme die

Energie zur Translokation über die äußere Membran in anderer Form erhalten. Die korrekte Faltung der sezernierten Proteine beziehungsweise das Verhindern einer Faltung und Aktivierung von Enzymen im Periplasma erfordert teilweise die Anwesenheit eines Chaperones (*Thanassi et al.; 2000*).

Hierfür sind bis heute fünf verschiedene Klassen von Sekretionssystemen bekannt. Teilweise ermöglichen sie den gesamten Sekretionsvorgang über beide Membranen. Andere transportieren nur über die äußere Membran. Hier ist der *General Secretory Pathway* (GSP) der Ausgangspunkt. Die zwei Translocasen Sec und TAT translozieren Proteine unter Verbrauch von ATP in den periplasmatischen Raum. Der Unterschied zwischen den beiden Systemen ist, daß TAT Proteine in gefaltetem Zustand translozieren kann, während Sec Proteine in entfalteter Konformation transportiert. (Übersicht: Abbildung 1.1)

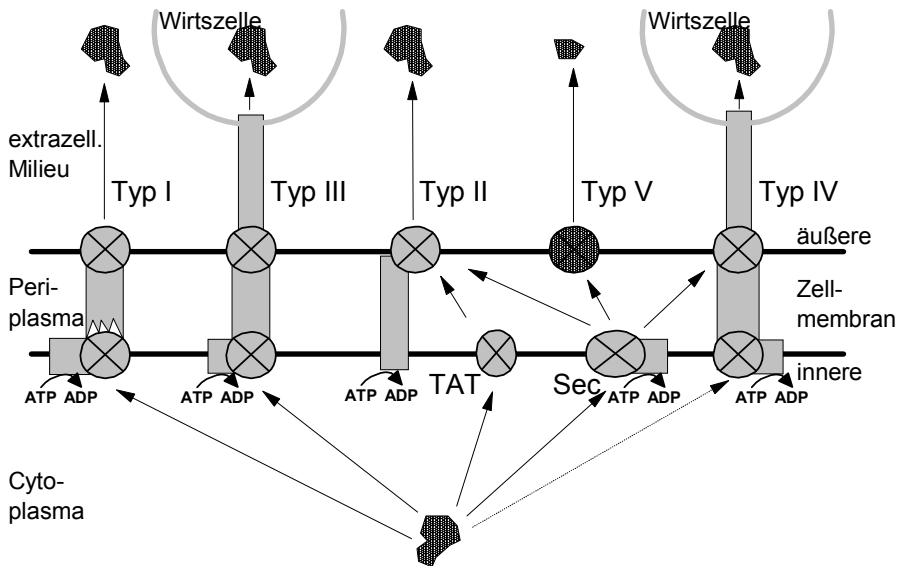


Abbildung 1.1: Bisher sind bei gramnegativen Bakterien 5 Klassen von Sekretionssystemen bekannt, die Proteine aus dem Cytoplasma des Bakterium in das extrazelluläre Milieu (Typ I, II und V sowie teilweise Typ IV) beziehungsweise in eukaryonte Wirtszellen (Typ III und IV) translozieren können. Die Typ-II- und Typ-V- sowie ein Teil der Typ-IV-Sekretionssysteme translozieren nur über die äußere Bakterienmembran. Hier ist die vorausgehende Bereitstellung des Substrates im Periplasma durch die Transportsysteme Sec und TAT notwendig. Bei der Typ-V-Sekretion bildet ein Teil des sezernierten Proteins selbst die Translokationspore in der äußeren Membran und spaltet das Substrat nach Translokation ab (Autotransporter).

1.3.1.1 Typ-I-Sekretion

Typ-I- oder ABC-Transporter dienen gramnegativen Bakterien zur Sekretion von Toxinen, Proteasen und Lipasen. Den Prototyp stellt der Transporter des α -Hämolytins HlyA von *E. coli* dar. Durch den ABC-Transporter werden Proteine direkt über beide Membranen ohne Zwischenaufenthalt und ohne Prozessierung im Periplasma sezerniert. Der Transporter besteht aus drei Proteinen. An der

zytoplasmatischen Seite der inneren Membran befindet sich eine ATP-bindenden Cassette (ABC). Die ABC erkennt für den Transporter spezifische carboxiterminale Sekretionssignale der Substrate. Das trimere Membran-Fusions-Protein (MFP) scheint, eventuell zusammen mit der ABC, die Pore in der inneren Membran zu bilden. Durch Bindung an das in der äußeren Membran als Pore verankerte, ebenfalls trimere Protein TolC bilden MFP und TolC zusammen einen Kanal im Periplasma. Unter Hydrolyse von ATP an der ABC wird dann das Substrat sezerniert. Anschließend bricht die Bindung zwischen den einzelnen Komponenten wieder ab (*Koronakis et al; 2000*). *P. aeruginosa* sezerniert auf diese Weise die Alkalische Protease AprA, die Lipase A und das Heme-Aquisition-Protein (HasA), das Eisen aus Häm und Hämoglobin aquiriert.

1.3.1.2 Typ-II-Sekretion

Typ-II-Transporter ermöglichen ebenfalls die Sekretion von Enzymen, die die umgebende Matrix verändern, und von Toxinen. Hierzu gehören das Enzym Pullulanase (PulA) von *Klebsiella oxytoca*, das Stärke hydrolysiert, und das Cholera-toxin von *Vibrio cholerae*. Der Ablauf der Typ-II-Sekretion ähnelt strukturell und funktionell der Biogenese von Typ-IV-Fimbrien. Untereinheiten des Typ-II-Sekretionsapparates bilden auch einen Pseudopilus. Die Substrate überqueren die innere Membran über das Sec- oder alternativ auch über das TAT-System, spalten im Periplasma das aminoterminalen Sekretionssignal ab, das sie für die Sekretion über die Innere Membran markiert, und falten sich. Deshalb wird der Typ-II-Sekretionsmechanismus auch als *Main Terminal Branch* (MTB) des Sec-abhängigen *General Secretion Pathway* bezeichnet. In der äußeren Membran ist ein so genanntes *Secretion* verankert. Dieses besteht aus 12 bis 16 Untereinheiten und bildet eine Pore in der äußeren Membran. Anteile des Sekretionsapparates sind auch an der inneren Membran verankert und die Bildung einer Struktur, die sich zwischen den

Membranen ausspannt ist wahrscheinlich. Diese könnte ATP an der inneren Membran hydrolysieren und die notwendige Energie zum aktiven Transport auf das *Secreton* übertragen, da im Periplasma kein ATP vorhanden ist. *P. aeruginosa* sezerniert mit seinem Typ-II-System Xcp die Mehrzahl der extrazellulären Proteine. Hierzu gehören unter anderem Lipasen, Elastasen, eine Alkalische Phosphatase, eine Phospholipase und das Exotoxin A.

1.3.1.3 Typ-III-Sekretion

Das so genannte Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) ermöglicht eine direkte Translokation von Toxinen über die innere und äußere bakterielle und die eukaryote Zellmembran in das Zytoplasma von Zellen des Wirtsorganismus. Es findet sich als Mikroinjektionsapparat für Effektorproteine bei EHEC, EPEC, Salmonellen, Shigellen (Cheng *et al.*; 2000) und Yersinien (Ruckdeschel *et al.*; 1996). Auch *P. aeruginosa* besitzt ein solches Sekretions-System.

Innerhalb der gramnegativen Bakterien sind etwa zwanzig verschiedene Proteine bekannt, die zum Sekretionsapparat gehören. Davon sind acht zwischen den verschiedenen Spezies hochkonserviert. Diese haben starke Homologien zu Proteinen aus den Basalkörpern der Flagellen, die die Komponenten der Flagelle sezernieren. Das spiegelt sich im Aufbau des TTSS wieder. Eine zylindrische Basis ähnlich dem Basalkörper der Flagelle verankert eine längliche, wie eine Injektionsnadel hohle Struktur in den Zellmembranen des Bakteriums. Zur Translokation dient eine Pore in der eukaryoten Zellmembran, die durch bakterielle Proteine gebildet wird. Neben den extrazellulären Strukturproteinen des Sekretionsapparates werden Effektor-Proteine, so genannte Exoenzyme oder Exotoxine, transportiert und transloziert. Bei *P. aeruginosa* sind bisher vier verschiedene bekannt:

ExoS und ExoT stimmen zu 75 % in der Aminosäure-Sequenz überein (*Krall et al.; 2000*) und haben zwei verschiedene enzymatische Aktivitäten. Der C-Terminus ist eine ADP-Ribosyltransferase, die das eukaryote Signalprotein Ras inaktiviert. Die Aktivität von ExoT als ADP-Ribosyltransferase beträgt aber lediglich 0,2 % im Vergleich zu ExoS (*Yahr et al.; 1996*). Der N-Terminus inaktiviert kleine GTP-bindende Proteine, wie RhoA, Rac1 und Cdc42 (*Ganesan et al.; 1998, Vincent et al.; 1999 und Olson et al.; 1999*). ExoS und ExoT inhibieren hierdurch die Signal-Transduktion der Wirtszelle und führen zu einer Zerstörung des Aktin-Zytoskelettes (*Pederson et al.; 1999*). Damit verhindern sie effektiv eine Phagozytose durch Wirtszellen (*Kazmierczak et al.; 2001*). Für die Hemmung von Rho durch andere bakterielle Toxine ist auch eine Störung der Wundheilung beschrieben worden. Dem entsprechend wurde auch bei ExoT eine herabgesetzte Regeneration von Lungenepithel in einem Modell nachgewiesen (*Geiser et al.; 2001*). Da Ras auch eine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung spielt, könnte auch diese durch ExoS gehemmt werden. Die Hemmung der Signaltransduktion hat einen zytotoxischen Effekt. ExoT tötet eukaryote Zellen aber in deutlich geringerem Maße ab als ExoS (*Sundin et al.; 2001*).

Die Lipase ExoU zerstört nach Translokation Wirtszellmembranen und führt dadurch zu Lyse und Nekrose (*Sato et al. 2003*). Stämme von *P. aeruginosa*, die ExoU exprimieren, besitzen eine deutlich niedrigere LD₅₀ im Maus-Modell als ExoU-negative Stämme (*Allewelt et al.; 2000*). Deletion von *exoT* und *exoU* bei zuvor hochpathogenen Stämmen verhindert eine systemische Entzündung und einen septischen Schock nach Instillation in die Lungen von Kaninchen (*Kurahashi et al.; 1999*).

ExoY ist eine Adenylatcyclase mit Homologie zu CyaA von *Bordetella pertussis* und EF von *Bacillus anthracis* und führt wie diese zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels in den eukaryonten Zellen (Yahr *et al.*; 1998). Die Folge sind unter anderem Ödembildung sowie Hemmung der Sauerstoffradikalbildung und Chemotaxis durch Makrophagen und Monozyten. Hierdurch dürfte auch die ExoU-unabhängige Lyse von Phagozyten vermittelt werden (Dacheux *et. al.*; 2000).

Welche Signale das TTSS aktivieren ist noch nicht abschließend geklärt. Die sezernierten Proteine scheinen zwei Sekretionssignale innerhalb der ersten 100 Aminosäuren am Amino-Terminus und eines in der 5'-Region ihrer mRNA zu besitzen. Chaperone verhindern eine Degradierung der noch nicht sezernierten Proteine im Zytoplasma der Bakterien und lagern die beiden Bausteine der Translokationspore, PopB und PopD vor der Sekretion aneinander (Böttner *et al.*; 2002). Abbildung 1.2 zeigt einen schematischen Aufbau des TTSS.

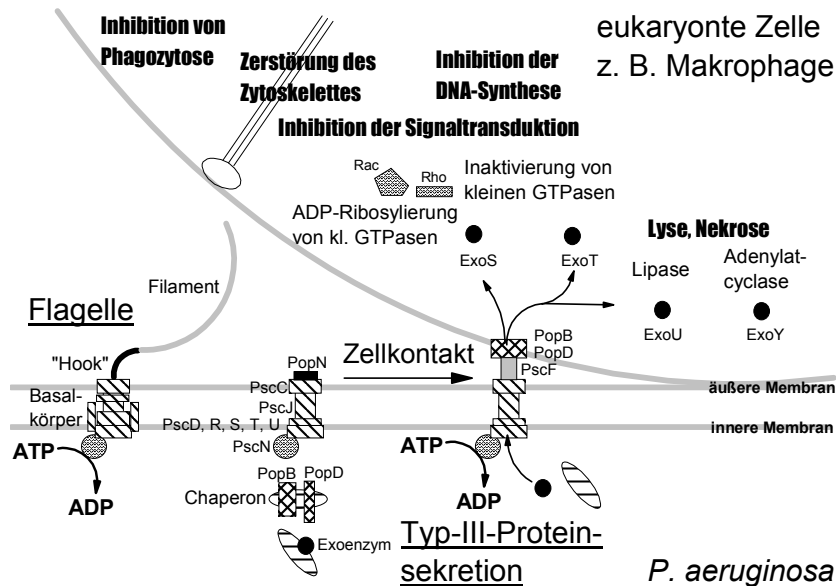


Abbildung 1.2: Typ-III-Sekretion: Der Sekretionsapparat ist aus mehreren Proteinen (Psc) zusammengesetzt und besitzt hohe Homologie zum Basalkörper von Flagellen, der seinerseits Strukturproteine der Flagelle sezerniert. Nach Dissoziation von PopN folgt die Sekretion der Bausteine der Nadel (PscF) und der Translokationspore in der Wirtszellmembran, PopB und PopD. Diese wurden zunächst durch ein Chaperon aneinander angelagert. Sie bilden auch die Pore in der eukaryonten Zellmembran. Anschließend erfolgt die Sekretion der Effektorproteine (schwarz) über die innere und äußere sowie die eukaryonten Zellmembran unter Hydrolyse von ATP. Die einzelnen Exoenzyme haben in der Wirtszelle unterschiedliche Aktivitäten und Funktionen.

Die Gene für das TTSS von *P. aeruginosa* befinden sich mit Ausnahme der Gene für die Effektor-Proteine in der 55 min Region des Chromosoms. Sie zeigen hohe Homologie zu den Genen des Yop-Regulons, dem TTSS der Yersinien, das auf dem Virulenz-Plasmid pYV liegt (Frank; 1997). Bei *P. aeruginosa* sind die Gene der Effektorproteine des TTSS über mehrere Stellen des Chromosoms verteilt. Zusammen mit den gemeinsam exprimierten Strukturproteinen des TTSS bilden

sie das so genannte ExoS-Regulon (Abbildung 1.3). Die Verteilung auf dem Chromosom des Typstamms von *P. aeruginosa*, PAO1, zeigt Abbildung 1.4. (Stover *et al.*; 2000)

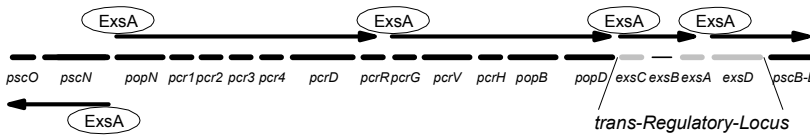


Abbildung 1.3: Das 1850kb große ExoS-Regulon besitzt mehrere Operons, das heißt gemeinsam transkribierte *Open Reading Frames* (Pfeile). Diese enthalten wiederum die Gene für die Strukturproteine des TTSS. Ihre Transkription ist ExsA-abhängig. Das Regulon enthält auch den *trans-Regulatory-Locus*. Hier befinden sich die Gene für die positiven Regulatoren der Expression des TTSS: ExsA und ExsC. *exsB* wird nicht transkribiert. ExsD wirkt als negativer Regulator, indem es ExsA bindet. Gekennzeichnet sind auch die Bindungsstellen für ExsA.

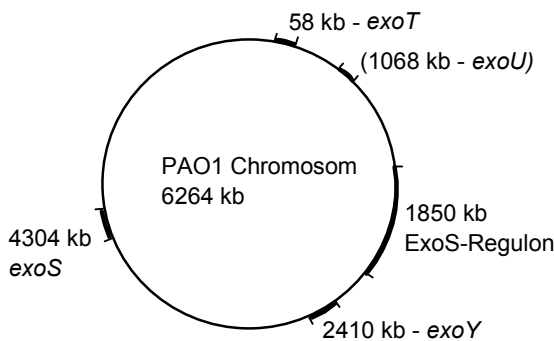


Abbildung 1.4: Typ-III-Sekretion: Lokalisation des Sekretionsapparates und der Effektorproteine auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* (PAO1). (*exoU* findet sich nicht beim Stamm PAO1.)

Die Transkription des ExoS-Regulons, einschließlich der Effektorproteine, wird durch den Exoenzyme-S-Trans-Regulatory-Locus reguliert. Dieser gehört

ebenfalls zum ExoS-Regulon und enthält unter anderem die Gene für die Transkriptionsaktivatoren ExsA und ExsC und für den Inhibitor ExsD. Operons sind Gruppen von Genen, die zusammen transkribiert werden. Alle Operons des ExoS-Regulon besitzen ein ExsA-Consensus-Element, das heißt eine Bindungsstelle für ExsA. Dieses liegt 51 oder 52 Basenpaare vor dem Startpunkt der Transkription und weist die Sequenz TNA AAA NA auf (Hovey *et al.*; 1995). ExsA besitzt hohe Homologie zu VirF von *Yersinia enterocolitica*, einem Transkriptionsaktivator aus der AraC-Familie (Frank *et al.*; 1991). Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von *exsA* führen verhindern eine Synthese von ExoS (Frank, *et al.*; 1994). ExsD wirkt als negativer Regulator, indem es ExsA bindet (McCaw *et al.*; 2002). ExsC wiederum stimuliert die Expression von ExsA durch Bindung von ExsD (Goranson *et al.*; 1997). Die Deletion von *exsC* führt zu einer bis zehnfach verminderten Produktion von ExoS (Frank *et al.*; 1991).

Zahlreiche Beobachtungen belegen, daß Typ-III-Sekretion bei Infektionen durch *P. aeruginosa* eine Rolle spielt. Im Tiermodell wurde gezeigt, daß die Gabe von IgG-Antikörpern gegen PcrV, einer Komponente des Translokationsapparates, zum Überleben einer sonst tödlichen Infektionsdosis führt (Shime *et al.*; 2001). Dort kann dies auch durch eine aktive Immunisierung gegen PcrV erreicht werden (Holder *et al.*; 2001-2). Bei Menschen mit Cystischer Fibrose finden sich im Fall einer pulmonalen Infektion Antikörper gegen Bestandteile des TTSS und gegen Exoenzyme im Serum (Moss *et al.*; 2001). Eine weitere Studie untersuchte über einhundert klinische Isolate von *P. aeruginosa* unterschiedlicher Herkunft. In allen Isolaten wurde ein Gen für ein Strukturprotein (PopB) und für mindestens ein Effektor-Protein (ExoT) nachgewiesen. Zusätzlich fanden sich in den meisten Isolaten darüber hinaus ein bis zwei weitere Gene für Exoenzyme (72 % *exoS*, 28 % *exoU*, 89 % *exoY*) (Feltman *et al.*; 2001). Die Virulenz von *P. aeruginosa* wird

beim Menschen durch den Besitz eines TTSS stark erhöht. So ist bei einer Pneumonie von beatmeten Patienten durch *P. aeruginosa* ein TTSS-positiver Phänotyp mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert. (Hauser *et al.*; 2002) Gleiches gilt für infizierte Brandwunden (Holder *et al.*; 2001-1). Das Risiko, an einer Infektion des tiefen Respirationstraktes oder an einer systemischen Infektion zu versterben, ist bei einem solchen Erregerstamm sechsfach erhöht. Insbesondere Erreger, die im Besitz der Gene für ExoU und ExoT zusammen sind, führen zu einer hohen Letalität (Burman *et al.*; 2001). Untersuchungen an Zellkulturen und Nagern ergaben, daß dieser Genotyp besonders ausgeprägte Schäden am Lungenepithel verursacht (Fleiszig *et al.*; 1997).

1.3.1.4 Typ-IV-Sekretion

Der Aufbau des Typ-IV-Proteintransporters ähnelt dem Membrananteil von Typ-IV-Pili. Dieser sezerniert Bausteine der Pili. Aber auch bakterielle Konjugationssysteme besitzen Homologien zu diesem System. Neben Proteinsekretion ermöglichen Typ-IV-Systeme wie das VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens* sogar die Übertragung von DNA, z. B. onkogener T-DNA auf Pflanzenzellen. Ähnlich wie bei der Typ-III-Sekretion werden dabei Substrate, wie zum Beispiel der T-DNA-Komplex, über einen Pilus direkt in die Wirtszelle transloziert. Andere Substrate, wie das Pertussistoxin PT von *Bordetella pertussis*, werden jedoch auch ohne Zellkontakt in den extrazellulären Raum sezerniert. Die typischerweise neun Untereinheiten des Typ-IV-Sekretionssystemes scheinen ähnlich wie bei den anderen Sekretionssystemen das Periplasma zu überspannen. Teile bilden wiederum eine Pore in der äußeren Membran. Während bei den Konjugationssystemen der DNA-Export in einem Schritt erfolgt, erfolgt die Typ-IV-Proteinsekretion in zwei Schritten. Dabei stellt bei einem Teil der Bakterienarten (z. B. *B. pertussis*) das Sec-System die Substrate im Periplasma bereit. Bei anderen

Bakterienarten (z. B. *A. tumefaciens*) besitzt wohl das Typ-IV-Transportsystem selbst die Möglichkeit, das Substrat über die innere Membran zu translozieren. Ein Typ-IV-Transporter oder die Sekretion von Virulenzfaktoren über ein Typ-IV-System ist bei *P. aeruginosa* aber bisher nicht bekannt.

1.3.1.5 Typ-V-Sekretion

Es gibt mehrere Untergruppen von Typ-V-Transportern. Ihr gemeinsames Charakteristikum ist, daß sie Proteine, die über den GSP in das Periplasma gelangt sind über eine Pore, die aus mehreren β -Faltblatt-Domänen besteht (*β -Barrel*) sezernieren. Die Substrate besitzen ein N-terminales Sekretionssignal für den GSP, das während des Exports ins Periplasma abgespalten wird.

Die Autotransporter der AT-1-Familie (Va-Transporter) besitzen daneben zwei weitere Domänen. Die Passenger-Domäne stellt das eigentliche sezernierte Protein dar. Die β -Domäne integriert sich in die äußere Membran, bildet die Transportpore und transportiert die Passenger-Domäne ohne weitere Energiezufuhr nach extrazellulär, worauf diese abgespalten wird. Bei der AT-2-Familie (Vc-Transporter) wird die Transportpore durch ein Oligomer aus den β -Domänen mehrerer Autotransporterproteine gebildet. Eine weitere Variante ist das *Two-Partner-System* (TPS oder Vb-Transporter). Hier werden die Passenger-Domäne und die β -Domäne als zwei einzelne Proteine ins Periplasma sezerniert. *P. aeruginosa* sezerniert über Typ-V-Transporter mehrere degradierende Enzyme (*Henderson et al.; 2004*).

1.3.2 Sekretion von Nicht-Proteinen

1.3.2.1 Pigmente

P. aeruginosa sezerniert mehrere Pigmente. Am bekanntesten und bisher am besten untersucht sind das Pyocyanin und das Pyoverdin.

Wie eingangs dargestellt stammt der ursprüngliche Name *Bacterium pyocyaneum*, vom blauen Pigment Pyocyanin. Es ist ein redoxaktives Phenazinderivat und kann sowohl das Wachstum anderer Bakterien inhibieren, als auch mit einer Vielzahl von Funktionen eukaryonter Zellen interferieren. Dazu gehören Zellatmung, Zilienschlag, epidermales Zellwachstum, Calciumhomöostase, Interleukin-2-Freisetzung und Immunglobulinsekretion durch B-Zellen (*Ran et al.; 2003*).

Das gelbgrüne Pyoverdin wird durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase aus Aminosäuren erzeugt. Es ist ein Siderophor, das heißt, es bindet dreiwertiges Eisen und vermittelt dessen Aufnahme als Ferrosiderophor in die Bakterienzelle (*Cornelis et al.; 2002*).

1.3.2.2 Mukopolysaccharide und Biofilmbildung

Polysaccharide sind hochpolymere Kohlenhydrate (Glycane). Bei dem Mukopolysaccharid Alginat handelt es sich um ein Uronsäurecopolymer aus β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronat. Die Anteile der beiden Uronsäuren variieren. Ebenso variiert die Länge der Polymere und damit ihre Molekülmasse. Die Uronsäuren sind Monosaccharide, die durch Oxidation des C-6 eine Carboxylgruppe erhalten haben und sind deshalb negativ geladen. Sie binden große Mengen Wasser und geladene Moleküle. O-acetyliertes Alginat ist die Hauptkomponente des von *P. aeruginosa* produzierten Mukus und bildet mit eingelagerten Kalziumionen ein hoch flexibles und elastisches Gel. Es dient als Matrix für die Bildung eines

Biofilmes. Die Zusammensetzung des Geles bestimmt die Durchlässigkeit für verschiedene Stoffe und schützt die eingebetteten Bakterien vor biologischen und chemischen antimikrobiellen Faktoren sowie vor Phagozytose (Evans *et al.*; 1973).

Bakterielle Biofilme sind organisierte und strukturierte Verbunde von Bakterien. Die Bildung eines Biofilmes beginnt mit der Anhaftung von vorher planktonisch wachsenden Bakterien an einer Oberfläche. Membranproteine ermöglichen aktive Bewegung (Flagelle) und Herstellung des Oberflächenkontaktes (Pili). Durch Vermehrung der nun sessilen Bakterien in der Ebene kommt es zur Entwicklung von Mikrokolonien. Diese wachsen dann auch in die Höhe. Durch Sekretion von Alginate entwickelt sich ein reifer Biofilm, in dem die Bakterien in palisadenartigen Kolonien angeordnet sind. Wasser und Nährstoffe gelangen durch ein Kanalsystem zu den einzelnen Mikrokolonien. In dieser Form haften Bakterien fest an Oberflächen und widerstehen Scherkräften (Abbildung 1.5) (Costerton *et al.*; 1999).

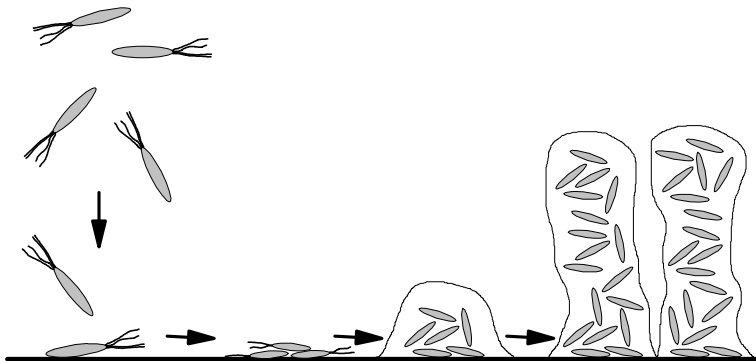


Abbildung 1.5: Entwicklung eines Biofilmes: Anheftung der Bakterien an eine Oberfläche - Bildung von Mikrokolonien und Synthese von Matrix - Differenzierung zum reifen Biofilm.

Die Bildung von Biofilmen ist nützlich, wo Bakterien in Symbiose, zum Beispiel mit Pflanzenwurzeln, leben. Es erleichtert Krankheitserregern wie *P. aeruginosa* aber auch ein Wachstum auf künstlichen Oberflächen. Dies betrifft auch Katheter, Implantate und medizinische Geräte. Biofilme von *P. aeruginosa* kommen aber auch auf organischen Oberflächen, etwa in der Lunge von Patienten mit CF, vor.

Alginate bietet Schutz vor Antikörpern, Komplement und Phagozyten des Wirts. Ebenso verschlechtert sich durch Biofilmbildung die Effektivität der antibiotischen Therapie, so daß eine Eradikation des Keimes aus der Lunge meist nicht mehr möglich ist. Die einzelnen Bakterien im Biofilm haben zwar gegenüber den planktonisch wachsenden eine vergleichbare Empfindlichkeit für Antibiotika, ein Biofilm im Ganzen ist jedoch meist unempfindlicher (*Spoering et al.; 2001*). Hierbei könnten verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen. Für die Mehrzahl der Antibiotika stellt Alginate keine physikalische Barriere dar. Sie können die Matrix des Biofilmes in ausreichender Konzentration durchdringen. Für Aminoglykoside ließ sich allerdings zeigen, daß der Biofilm eines mucoiden Stammes um ein Vielfaches resistenter ist als der eines non-mucoiden Stammes (*Hentzer et al.; 2001*) und dies an einer Hemmung der Diffusion durch die im Alginate enthaltenen Calciumionen liegt. (*Nichols et al.; 1988*). Daneben herrschen im Inneren des Biofilmes microaerophile bis anaerobe Bedingungen und der Stoffwechsel der Bakterien ist deutlich verlangsamt. Unter diesen Bedingungen erreicht man durch Antibiotikatherapie nur eine Reduktion der Keimzahl im Biofilm. Eine vollständige Abtötung wie in einer Flüssigkultur wird nicht erreicht (*Coquet et al.; 1998*). Während des chronischen Verlaufes der CF treten zusätzlich regelhaft Varianten von *P. aeruginosa* auf, die durch eine überschießende Produktion von Alginate gekennzeichnet sind. Damit ist die Unterdrückung der Biofilmbildung für die Behandlung von Patienten mit CF von Bedeutung.

1.4 Regulation von Pathogenitätsgenen

Nur ein kleiner Teil der Gene von Bakterien wird konstitutiv, das heißt in gleichbleibendem Maß exprimiert. Diese bezeichnet man auch als *House Keeping Genes*. Die Mehrzahl der Gene wird jedoch nicht ständig exprimiert sondern nur unter bestimmten Bedingungen und mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Hierdurch kann eine Anpassung an Umweltfaktoren, wie zum Beispiel die Umgebungstemperatur, erfolgen. Hierzu gibt es mehrere Mechanismen.

Transkription bedeutet die Erzeugung von Einzelstrang-RNA am Muster von Doppelstrang-DNA. Hierzu muß erst die bakterielle RNA-Polymerase aus ihren vier Untereinheiten zusammengesetzt werden. Dieses Tetramer stellt das *Core-Enzyme* dar. Durch Bindung an einen so genannten Sigmafaktor entsteht das funktionsfähige Holoenzym. Gene besitzen eine Regulatorische Einheit, die auch Promotorregion genannt wird und sich *upstream*, das heißt in Richtung der Transkription vor dem Startcodon, befindet. Sie wird nicht transkribiert. Das Holoenzym der RNA-Polymerase bindet nun in der -35 Region im Promotorbereich von Genen, die hier eine zum Sigmafaktor passende Basensequenz (Consensus-Sequenz) besitzen. Es kommt zur Bildung eines Komplexes aus Polymerase und DNA. Je nach Zustand des Bakteriums könne verschiedene Sigmafaktoren exprimiert werden. Dadurch ist es möglich Gruppen von Genen mit einem gemeinsamen Signal in der Promotorregion über den Wechsel des vorherrschenden Sigmafaktors zu aktivieren. So genannte Antisigmafaktoren binden Sigmafaktoren oder verhindern auf andere Weise die Bildung eines Komplexes mit der RNA-Polymerase. (Abbildung 1.6)

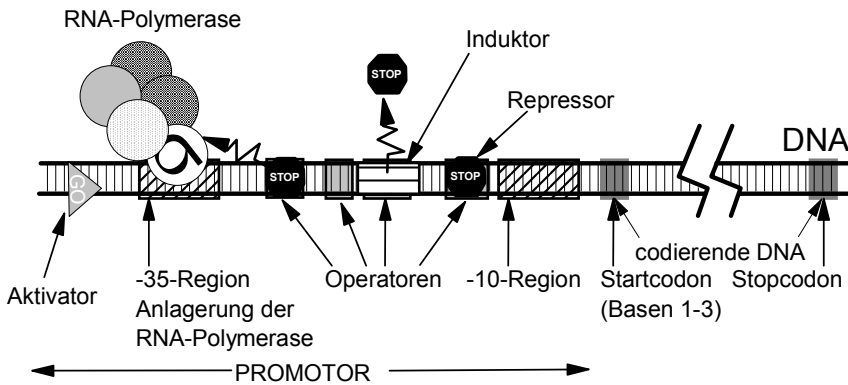


Abbildung 1.6: Aufbau eines Gens. Der codierende Teil, das heißt der Teil der DNA, der in RNA transkribiert wird, beginnt mit dem Startcodon und endet mit einem Stopcodon. Ihm geht die so genannte Promotorregion voraus. Die RNA-Polymerase lagert sich hier bereits etwa 35 Basenpaare vor dem Startcodon an. Sie besteht aus dem Core-Enzym (2 α - und je eine β 1- und β 2-Untereinheit) und dem Sigmfaktor (σ). Sigmfaktoren sind austauschbare Proteine, die bestimmte Basensequenzen in der -35 und -10-Region erkennen und so die Transkription von Genen mit dieser Sequenz veranlassen. Im Bereich zwischen -35 und 1 liegen Bereiche der DNA, die als Operatoren bezeichnet werden. Sie können so genannte Repressoren (Stop) oder Aktivatoren (Go) binden, Proteine, die die Bindung der RNA-Polymerase hemmen oder fördern. Induktoren sind Proteine, die die Bindung von Repressoren verhindern können.

Operatoren sind DNA-Sequenzen in der Promotorregion von Genen. Sie können Proteine, die als Repressoren bezeichnet werden, binden und dadurch die Anlagerung der RNA-Polymerase an die DNA behindern. Hierdurch wird die Transkription negativ reguliert. Zum anderen können Proteine, die als Induktoren bezeichnet werden, die Bindung von Repressoren verhindern und die Transkription somit positiv regulieren. Proteine, die als Aktivatoren bezeichnet werden, binden oft noch weiter upstream an die DNA und fördern die Bindung der DNA-Polymerase und somit die Transkription. Hat die RNA-Polymerase das Startcodon erreicht, beginnt sie mit der Transkription der DNA in mRNA (Birge, 2000).

1.4.1 Regulation von Virulenzfaktoren durch Sigma- und Antisigmafaktoren

1.4.1.1 RpoS - der Sigmafaktor der stationären Phase

Der vorherrschende Sigmafaktor in *P. aeruginosa* in die stationäre Phase ist RpoS. Seine Expression steigt zu ihrem Beginn stark an (*Tanaka et al.; 1994*). Daneben kann die Expression von RpoS auch durch Kohlenhydratmangel ausgelöst werden. Stämme von *E. coli*, die das homologe Gen nicht besitzen, erzeugen außerdem kein Glycogen, sind thermolabiler und sensitiver gegenüber H₂O₂ und sterben während des Kohlenhydrat-Mangels schneller ab als der Wildtyp (*Lange et al.; 1991*). Eine RpoS-Mutante (SS24) exprimiert verstärkt Pyocyanin. Die Virulenzfaktoren Exotoxin A, Elastase und die Protease LasA werden von SS24 in geringerem Ausmaß gebildet (*Suh et al.; 1999*).

1.4.1.2 AlgU, MucA und die Konversion zum Mucoiden Phänotyp

Die Produktion von Alginat, dem Exopolysaccharid von *P. aeruginosa*, steht unter Regulation des *algU-mucABCD*-Gen-Clusters, das innerhalb der gramnegativen Bakterien mit wenigen Variationen konserviert ist. AlgU ist ein weiterer alternativer Sigmafaktor und das Ortholog zu σ^E von *E. coli*, das die Transkription von Genen als Antwort auf Streßbedingungen aktiviert. MucA ist an der Innenseite der Zellmembran über eine einzelne Transmembrandomäne in der Membran verankert. MucD und MucB befinden sich im periplasmatischen Raum. MucA wirkt als Antisigmafaktor von AlgU, indem es das Holenzym aus AlgU und der RNA-Polymerase an die Zellmembran bindet. Erhält das Bakterium über MucC ein Streßsignal überträgt MucB das Signal auf MucA. MucA gibt daraufhin den AlgU-RNA-Polymerase-Komplex frei. Dies führt zur Transkription unter anderem von Genen von Enzymen, die *P. aeruginosa* für die Produktion von Alginat aus

Fructose benötigt. Hierzu gehören die Phosphomannose-Isomerase AlgA, die Phosphomannoglucomutase AlgC und die GDP-Mannose-Dehydrogenase AlgD.

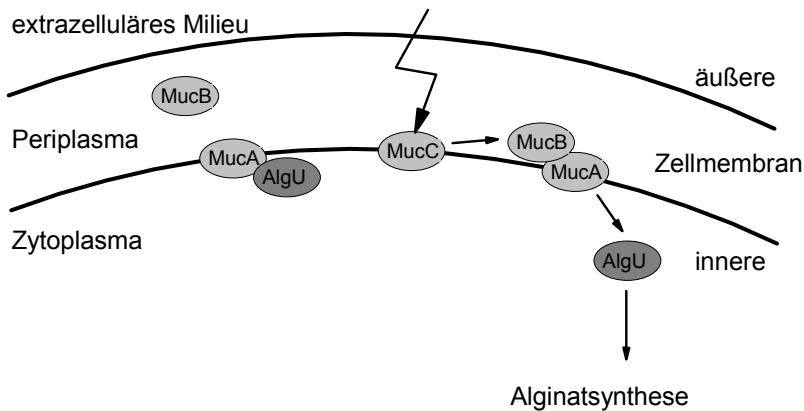


Abbildung 1.7: Regulation der Alginatsynthese in *P. aeruginosa*: Der Antisigmafaktor MucA ist an der inneren Zellmembran lokalisiert und bindet den Sigmafaktor AlgU. MucB befindet sich im periplasmatischen Raum. MucC fungiert als Sensor für Stressbedingungen wie hohe Temperaturen oder hohen Salzgehalt des extrazellulären Milieu und gibt ein Signal durch MucB an MucA weiter. Dies führt zur Redistribution von AlgU ins Zytoplasma und zur Aktivierung der Alginatbiosynthese.

Ein Defekt von *mucA* führt über eine erhöhte Redistribution von AlgU ins Zytoplasma zu einer Überproduktion von Alginat (Rowen *et al.*; 2000). Dieser Defekt kennzeichnet über 80% der Stämme von *P. aeruginosa* mit einem mucoiden Phänotyp. Diese können im Verlauf der chronischen pulmonalen Infektion bei CF ab einem gewissen Zeitpunkt regelhaft aus der Lunge isoliert werden. Bei den meisten dieser Isolate wird eine Mutation im circa 600 bp großen *mucA*-Gen gefunden, die im Bereich zwischen dem 289. und 480. Basenpaar liegt. Hierbei handelt es sich mit annähernd gleicher Häufigkeit um Deletionen einzelner Basen, Insertionen oder Transitionen, durch die ein Stopcodon in diesem Bereich entsteht

(Boucher et al.; 1997). Durch oxidativen Streß kann diese Mutation auch *in vitro* ausgelöst werden. Ebenso konnte das Auftreten von mucoiden *P. aeruginosa* nach Behandlung eines Biofilmes eines zuvor nicht-mucoiden Stammes mit aktivierten neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Darüber hinaus führt die Mutation im *mucA*-Gen zu weiteren Veränderungen im exprimierten Proteinmuster, die bedeutsam für die Anpassung an die Umweltbedingungen in der Lunge bei CF sein könnten. Zum Beispiel wurde gezeigt, daß ein mucoider Stamm von *P. aeruginosa* weniger Elastase und alkalische Protease bildet (Mathee et al.; 1999). Das Auftreten von mucoiden Isolaten ist häufig mit der Chronifizierung der Infektion und einer klinischen Verschlechterung assoziiert.

1.4.2 Quorum Sensing

Interzelluläre Signale, die Zellmembranen passieren können, und Botenstoffe, die Signale zwischen einzelnen Organismen übertragen, sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet. Zum Beispiel regulieren Hormone Entwicklung, Differenzierung und Metabolismus der einzelnen Zellen eines Organismus. Doch auch Bakterien besitzen Signalmoleküle, die eine Kommunikation zwischen einzelnen Zellen ermöglichen. Dieser Mechanismus wurde Quorum Sensing (QS) genannt und bei *Vibrio fischeri* zuerst beschrieben, einem Bakterium, das in Symbiose mit Tiefseefischen lebt. Die Gene des *lux*-Operons von *V. fischeri*, die über QS gesteuert werden, ermöglichen Biolumineszenz. Bei anderen Bakterienarten werden neben Genen, die für das Leben in Symbiose mit höheren Organismen notwendig sind, auch Virulenzfaktoren gesteuert. Alle besitzen in ihrer Promotor-Region eine nach dem *lux*-Operon benannte *lux*-Box. Sie hat die Minimal-Sequenz NNCT-(N)₁₂-AGNN.

Als Botenstoffe dienen bei grampositiven Bakterien Peptide und bei gramnegativen alkylierte Homoserinolactone, aber auch andere Moleküle (*Bassler; 1999*). Die einzelnen Homoserinolactone der gramnegativen Bakterien variieren in der Länge und in den Seitenketten der Alkylkette. Sie werden auch Autoinducer genannt, da sie über QS auch ihre eigene Synthese stimulieren. Jede Bakterienzelle für sich produziert den Botenstoff mittels einer Autoinducer-Synthetase, einem Enzym der LuxI-Protein-Familie. Diese verbindet einen Alkylrest, der an ein Alkyl-Carrier-Protein gebundenen ist, unter Freisetzung des Carrier-Proteines mit S-Adenosylmethionin. Durch Abspaltung von 5-Methylthioadenosin wird das Alkyl-S-Adenosylmethionin lactonisiert. Abbildung 1.8 zeigt die Strukturformel der dabei entstehenden Alkylhomoserinolactone (AHL).

Autoinducer können die Zellmembran frei permeieren, so daß mit der Dichte der Bakterien ihre Konzentration extra- und intrazellulär gleichermaßen ansteigt. Der Begriff Quorum Sensing beschreibt, daß die Bakterien hierdurch ihre Populationsdichte bestimmen. Bei zunehmender intrazellulärer Konzentration bindet der Autoinducer an ein Regulator-Protein der LuxR-Familie. Der Komplex aus Regulator und Autoinducer fördert die Transkription des Regulators, der Autoinducer-Synthetase und der weiteren Zielgene (*Fuqua et al.; 1998*). Abbildung 1.10 verdeutlicht den selbstverstärkenden Regelkreis innerhalb eines Bakteriums und die Interaktion mit den anderen Bakterien der gleichen Art in der Umgebung, die ihrerseits wiederum Autoinducer produzieren.

P. aeruginosa besitzt zwei derartige QS-Systeme. Das *las*-System mit dem Autoinducer 3-Oxododecylhomoserinolacton (OdDHL) reguliert eine Elastase, das *rhl*-System mit dem Autoinducer Butyrylhomoserinolacton (BHL) eine Rhamnosyltransferase. Die Strukturformel der Autoinducer zeigt Abbildung 1.9.

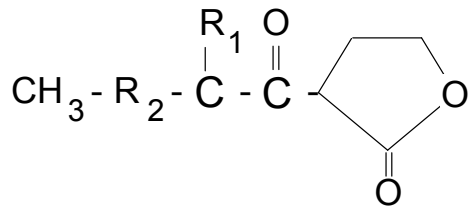


Abbildung 1.8: Strukturformel der Autoinducer, der Botenstoffe gramnegativer Bakterien (nach Parsek et al.; 2000)

R1: H, OH oder O

R2: $(\text{CH}_2)_{2-14}$ oder $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2$

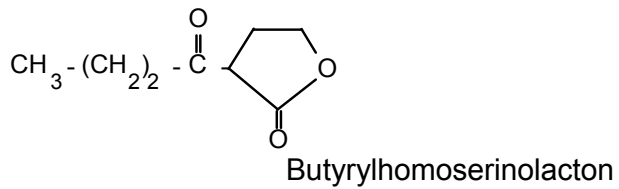
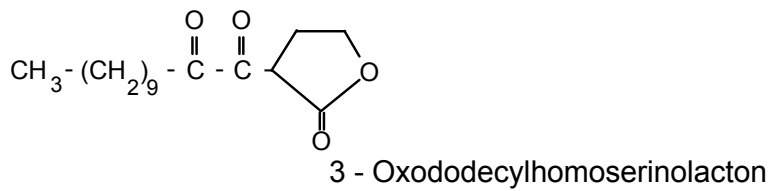


Abbildung 1.9: *P. aeruginosa* - Autoinducer: 3-Oxododecylhomoserinolacton oder OdDHL ist der Autoinducer des LasI/LasR-Systemes, Butyrylhomoserinolacton oder BHL der des RhII/RhIR-Systemes.

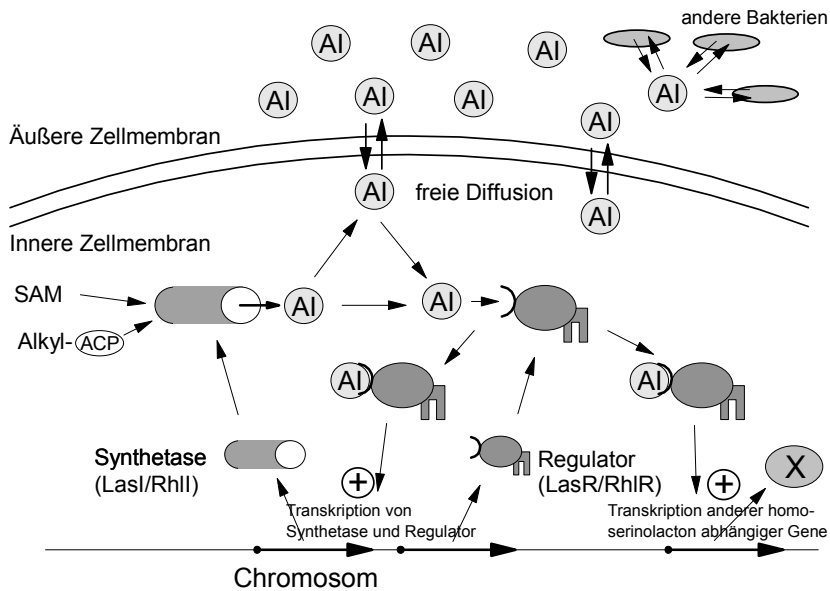


Abbildung 1.10: QS-Regelkreis: Die QS-Synthetase erzeugt aus S-Adenosylmethionin (SAM) und einem an ein Carrier-Protein (ACP) gebundenen Alkyl-Rest ein Alkylhomoserinolacton (AI). Dieses gelangt durch freie oder erleichterte Diffusion durch die Zellmembran. Innerhalb der Zelle bindet es an den Regulator. Dieser Komplex fördert die Transkription der Synthetase, des Regulators und weiterer Gene (X). Das Ausmaß ist dabei von der Konzentration des Alkylhomoserinolactones und damit von der Dichte der synthetisierenden Bakterien in der Umgebung abhängig. Somit stimuliert das Homoserinolacton seine eigene Synthese. Deshalb wird es auch Autoinducer (AI) genannt. In Klammern sind die korrespondierenden Enzyme von *P. aeruginosa* angegeben.

In *P. aeruginosa* erzeugen Bakterienpopulationen mit niedriger Wachstumsdichte mittels der Synthetase LasI eine basale Konzentration von OdDHL. Bei steigender Dichte bindet OdDHL an den Regulator LasR, und der Komplex aktiviert das *rhlR*-Gen und rückkoppelnd das *lasI*-Gen. RsaL inhibiert bei niedriger Stimulation des *las*-Systemes die Expression von *lasI*. Auf diese Weise wird bei niedrigen Populationsdichten die vorzeitige Aktivierung des *las*-Systems verhindert. Erst

wenn eine ausreichende Konzentration von OdDHL bei steigender Dichte die Gegenregulation von RsaL überwindet (De Kievit *et al.*; 1999), führt die Induktion von *lasI* durch LasR zu einer Selbstverstärkung des *las*-Systemes. Gleichzeitig aktiviert es dann das *rhl*-System und dieses verstärkt sich wiederum selbst. Sind die Systeme aktiv, werden andere Gene, die nicht an der Signalkette beteiligt sind und zum Beispiel Virulenzfaktoren kodieren, aktiviert (Parsek *et al.*; 2000).

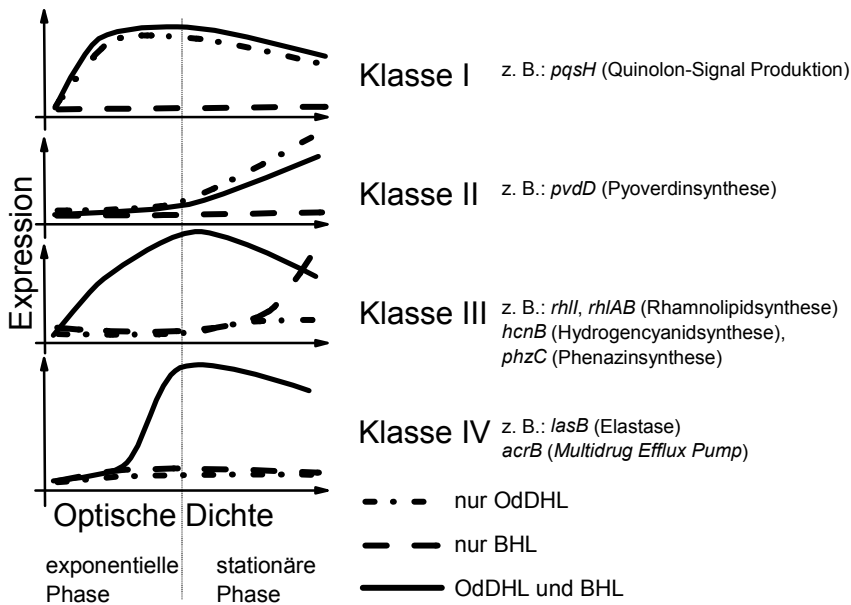


Abbildung 1.11: Gene von *P. aeruginosa*, die durch Quorum Sensing reguliert werden, lassen sich in vier Klassen einteilen. Die Klassen I und III werden bereits in der logarithmischen Phase verstärkt exprimiert, die Klassen II und IV erst in der stationären Phase. Die Klassen I und II werden durch OdDHL allein maximal stimuliert, die Klassen III und IV benötigen zusätzlich BHL. (nach Whiteley *et al.*; 1999).

Gene, die durch QS reguliert werden, finden sich über das gesamte Chromosom von *P. aeruginosa* verstreut. Nach ihrer Regulation kann man sie in verschiedene Klassen einteilen: Frühe Gene, die bereits in der exponentiellen Phase exprimiert werden (Klassen I und III), unterscheiden sich von späten Genen, die erst in der stationären Phase verstärkt transkribiert werden (Klassen II und IV). Auf der anderen Seite kann man Gene, die durch OdDHL alleine stimuliert werden können (Klassen I und II), von solchen unterscheiden, die für die höchste Induktion beide Autoinducer (OdDHL und BHL) benötigen (Klassen III und IV) (*Whiteley et al.; 1999*) (Abbildung 1.11).

Die Regulation von Genen durch QS und den σ -Faktor RpoS ist bei *P. aeruginosa* vernetzt. Dabei fördert das *rhl*-System die Expression von RpoS und führt so mit steigender Zelldichte zu einem höheren Spiegel von RpoS (*Latifi et al.; 1996*). Bei Defekten in den QS-Systemen wird RpoS am Beginn der stationären Phase aber auch unabhängig exprimiert. Andererseits scheint RpoS in der exponentiellen Phase *rhlI* zu reprimieren und möglicherweise auch andere BHL-abhängige Gene herabzuregulieren (*Whiteley et al.; 2000*).

Die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* wird durch Quorum Sensing gesteuert. Wie oben dargestellt gehören hierzu die Elastase und die Rhamnosyltransferase. Die Bedeutung von QS für die Virulenz von *P. aeruginosa* zeigt ein Versuch, bei dem ein Stamm mit einem Defekt im *lasR*-Gen mit dem Wildtypstamm verglichen wird. In neugeborenen BALB/cByJ-Mäusen verursacht der Wildtyp eine akute Pneumonie mit folgender Sepsis und Tod der Versuchstiere, während der Stamm mit dem Defekt die Lunge zwar besiedeln kann, aber keine Pneumonie oder Sepsis auszulösen vermag (*Tang et al.; 1996*).

Während der Differenzierung zum reifen Biofilm dient Kommunikation innerhalb der Bakterienpopulation über Quorum-Sensing zur Abstimmung der Genexpression. (Pratt *et al.*; 1999). Studien mit *lasI-gfp*- und *rhlI-gfp*-Genfusionen ergaben, daß die Expression von *lasI* vom Maximum am Beginn der Biofilm-Bildung stetig absinkt, während *rhlI* konstant weiter exprimiert wird (De Kievit *et al.*; 2001). Entsprechend wird dann viel BHL und wenig OdDHL gebildet. Dieses Verhältnis der Autoinducer zeigt sich auch in Sputen, die von Patienten mit CF gewonnen wurden und ist somit auch ein Hinweis darauf, daß *P. aeruginosa* in der Lunge von CF-Patienten in Form eines Biofilmes persistiert. (Singh *et al.*; 2000). Ein Großteil der Steuerung der Entwicklung zum reifen Biofilm ist bei *P. aeruginosa* von Quorum-Sensing abhängig. Eine *lasI*-Mutante adhärert und proliferiert ebenso wie der Wildtyp an glatten Oberflächen, wie zum Beispiel Glas. Der Biofilm, der von der Mutante erzeugt wird, besitzt jedoch nicht die typische Struktur aus Mikrokolonien, sondern wächst als kontinuierliche Schicht. Entsprechend erreicht diese aufgrund der schlechteren Versorgung im Inneren auch nur etwa 20% des vertikalen Durchmessers des Biofilmes des Wildtyps. Ebenso ist ein solcher unreifer Biofilm nicht beständig gegen SDS (0,2%). Diese Defizite können durch Substitution der Mutante mit dem fehlenden OdDHL ausgeglichen werden (Davies *et al.*; 1998). Eine Mutation im *lasI*-Gen oder im *rhlI*-Gen führt außerdem zu einer herabgesetzten Motilität. Letztere hat auch eine verminderte Bildung von Typ-IV-Pili und damit ein niedrigeres Adhäsions-Vermögen zur Folge (Glessner *et al.*; 1999).

1.5 Reportertechnologie

Neben dem direkten Nachweis von Proteinen über einen Western-Blot oder von mRNA über einen Northern-Blot ermöglichen es Reporter-Systeme Genexpression indirekt nachzuweisen und zu quantifizieren. Der Vorteil der Reportertechnologie

liegt dabei zum einen in einer Vereinfachung des Nachweises, zum anderen ermöglichen manche Reporter-Systeme auch einen Nachweis bei lebenden Bakterien und sogar in infizierten Versuchstieren. Als Reporter eignen sich Enzyme, die eine leicht meßbare Reaktion katalysieren (z. B. β -Galactosidase) oder Proteine, die nach Lichtanregung Fluoreszenzlicht emittieren (z. B. GFP). Tabelle 1.5.1 gibt eine Übersicht über gängige Reportersysteme.

Tabelle 1.5.1 Reprotersysteme

Reporter-protein	Repor-ter-gen	Ursprung	Substrat	Detektions-methode
Bakterielle Luziferase	<i>lux</i>	Lumineszierende Bakterien	Langkettige Aldehyde	Lumineszenz
Insekten-luziferase	<i>luc</i>	Leuchtkäfer, Glühwürmchen	Luziferin	Lumineszenz
β -Galakto-sidase	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	Galakto-pyranoside	Colorimetrie, Elektrochemie, Fluoreszenz, Chemilumineszenz
β -Glukuro-nidase	<i>uidA</i> (<i>gusA</i> , <i>gurA</i>)	<i>E. coli</i>	β -Glukoronide	Colorimetrie, Fluoreszenz, Lumineszenz
β -Lactamase	<i>bla</i>	<i>E. coli</i>	Lactamide	Colorimetrie
Alkalische Phosphatase	<i>phoA</i>	verschiedene	Phosphoylierte organische Verbindungen	Colorimetrie, Chemilumineszenz
Green flourescent protein (GFP)	<i>gfp</i>	<i>Aequorea victoria</i>	Nicht notwendig	Fluoreszenz

Das Gen, dessen Expression untersucht werden soll, wird hierzu entweder einschließlich seiner Shine-Dalgarno-Sequenz (Translationsfusion) oder nur mit der Promoterregion an das Reporter-gen ligiert (Transkriptionsfusion). Hierdurch wird das Reporter-gen unter der Kontrolle des Promotors des Genes exprimiert. Derartige Genfusionen können in das Genom des Bakteriums integriert werden oder von einem Plasmid exprimiert werden.

Wird ein Enzym verwendet, wie zum Beispiel *lacZ*, werden die Bakterienzellen zum Meßzeitpunkt gewonnen und lysiert. Das Lysat enthält dann eine bestimmte Menge an Reporterenzym. Die gesuchte Expressionsstärke kann dann über ein Versetzen des Lysates mit einem geeigneten Substrat und Bestimmung der Enzymaktivität gemessen werden. Im Fall der β -Galactosidase (Lactase) *LacZ* führt die Spaltung von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) zu einer Blaufärbung des Substrates.

Green-Fluorescent-Protein (GFP) wurde in der biolumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* entdeckt. Diese erzeugt Licht durch Energietransfer von dem Ca^{2+} -aktivierten Photoprotein Aequorin zu GFP. Nach Klonierung des Wildtyp-GFP-Genes (*wtGFP*) ist eine Expression durch prokaryontische und eukaryontische Zellen möglich, wodurch GFP als Reporter-Gen-System genutzt werden kann. Durch Exzitation mit blauem oder UV-Licht wird GFP zu hellgrüner Fluoreszenz angeregt, ohne daß weitere Cofaktoren von *A. victoria* notwendig sind. Ein Aufschluß der Zellen in denen GFP exprimiert wird oder die Zugabe eines Substrates ist somit für den Nachweis von GFP nicht notwendig. So kann die Expression von GFP bei lebenden Zellen oder auch nach Fixierung durch

Fluoreszenz-Mikroskopie, Fluoreszenz-Photometrie und Fluoreszenz-Zytometrie detektiert werden.

In den Laborexperimenten zu dieser Arbeit wurde das für Fluoreszenz-Zytometrie optimierte *gfpmut2*-Gen (Cormack *et al.*; 1996) verwendet, das durch Einführung von Mutationen gegenüber dem *wgfp*-Gen ein rot-verschobenes Exzitationsspektrum und eine 35-fache Fluoreszenz besitzt. Abbildung 1.12 zeigt die Konstrukte, Abbildung 1.13 die Karte des Vektors pKT248, der die Genfusionen trägt. Die verwendeten Fusionen mit dieser Länge der Sequenzen aus dem Genom von *P. aeruginosa* wurde gewählt, da sie sich in vorausgehenden Untersuchungen als Reporter-System geeignet erwiesen haben (Hornef *et. al.*; 2000).

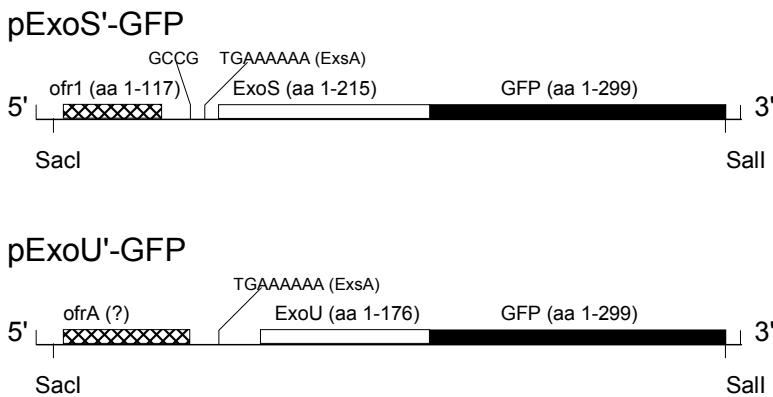


Abbildung 1.12: Die Reportergen-Konstrukte enthalten als Translationsfusion Promotor und N-terminale Anteile des jeweiligen Exoenzym-Genes (*exoS* bzw. *ExoU*) und in Frame das Gen für Green-Fluorescent-Protein (*gfp*).

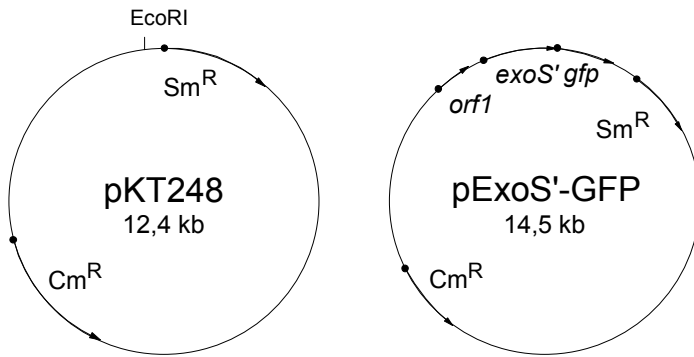


Abbildung 1.13: Die Vektoren pKT248 und pExoSgfp: Der Vektor pKT248 liegt in *P. aeruginosa* in geringer Kopienzahl vor und enthält je ein Resistenzgen gegen Chloramphenicol und Streptomycin. An der Schnittstelle des Restriktionsenzymes *EcoRI* wurden die in Abbildung 1.12 dargestellten Konstrukte eingefügt, hier *exoS'-gfp*.

1.6 Zielsetzung

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der bei prädisponierten Personen Infektionen mit schweren Verläufen verursachen kann. Besondere Bedeutung erlangt das Bakterium durch die regelhaft auftretende chronische pulmonale Infektion bei Mukoviszidosepatienten. Die Etablierung und die Chronifizierung der Infektion wird durch ein vielfältiges Arsenal an Virulenzfaktoren ermöglicht. Herausragende Bedeutung hat hier die Sekretion von Toxinen. Bei einem Großteil handelt es sich dabei um Proteine. Hierfür besitzen gramnegative Bakterien verschiedene Sekretionssysteme. Das Typ-III- Sekretionssystem ermöglicht so genannte Exoenzyme direkt über die Zellmembranen des Bakteriums in Zellen des Wirtes zu translozieren. Die Exoenzyme von *P. aeruginosa* können Phagozytose verhindern, stören die Regeneration von Gewebsdefekten und wirken zytotoxisch. Die Korrelation zwischen Expression von typ-III-sezernierten Exoenzymen und Virulenz des Erregers ist ebenfalls gut

belegt. Ihre Regulation ist jedoch bisher nicht abschließend geklärt. Neben der klassischen Genregulation über Sigmafaktoren besitzt *P. aeruginosa* zwei Quorum Sensing Systeme. Quorum Sensing ist ein Regulationssystem, bei dem die Bakterien die Konzentration eines Botenstoffes bestimmen, die mit der Dichte der Bakterien am jeweiligen Ort korreliert. Mit Anstieg des Botenstoffes wird dann ein Rezeptor aktiviert, der Genexpression steuert.

P. aeruginosa sezerniert besonders über das Typ-II-Sekretionssystem, degradierende Enzyme wie Proteasen, die auch den aufwendigen Typ-III-Sekretionsapparat beschädigen könnten. Für zahlreiche typ-II-sezernierte Faktoren ist eine positive Regulation durch Quorum Sensing bekannt. Eine koordinierte Expression des Typ-III-Sekretionssystems mit dem Typ-II-Sekretionssystem erscheint daher sinnvoll.

Darüber hinaus bildet *P. aeruginosa* Biofilme aus. Hier haften die Bakterien auf einer Oberfläche und sind in eine Matrix aus dem Exopolysaccharid Alginate eingebettet. Die Expression eines auf Zellkontakt angewiesenen Sekretionssystems erscheint im Biofilmstadium deshalb nicht sinnvoll. Auch die Biofilmbildung wird durch Quorum Sensing reguliert. Ein weiterer wichtiger positiver Regulator der Biofilmbildung ist der Sigmafaktor der stationären Phase RpoS. Für das Typ-III-Sekretionssystem läßt sich somit eine negative Regulation durch Quorum Sensing und RpoS erwarten.

Darüber hinaus treten im Verlauf der chronischen pulmonalen Infektion bei Mukoviszidose regelhaft mucoide Stämme auf, die Alginate überexprimieren. Dies ist mit einer klinischen Verschlechterung assoziiert. Die Konversion zum mucoiden Phänotyp wird meist durch einen Verlust des intakten Antisigmafaktors MucA

verursacht. Eine Auswirkung auf das Typ-III-Sekretionssystem ist bisher nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb zunächst die Expression des Typ-III-Sekretionssystems in einem Biofilm mit der Expression in planktonisch wachsenden Bakterien verglichen werden. Für die beiden Quorum-Sensing-Systeme von *P. aeruginosa* (*las*, *rhl*) und den Sigmafaktor der stationären Phase RpoS lagen entsprechende Defektmutanten vor. Ein Stamm mit konstitutiver Überexpression von Mucopolysaccharid sollte durch Einführung einer Mutation in das *mucA*-Gen erzeugt werden, und der Phänotyp durch Rekomblementierung mittels Transformation mit dem intakten *mucA*-Gen aus der PAO1-Genbank überprüft werden. Dann sollte untersucht werden, wie sich Defekte dieser Regulatoren auf die Expression von typ-III-sezernierten Exoenzymen auswirken.

Die Verwendung von translationellen Fusionen des N-terminalen Anteiles des jeweiligen Exoenzym-Gens mit Green-Fluorescent-Protein eignet sich als Reportergen für das Typ-III-Sekretionssystem. Hierdurch konnte bereits die Expression verschiedener Exotoxine *in vivo* dargestellt werden (*Hornef et al.; 2000*). Für die Beantwortung der Fragestellung sollte deshalb dieses Reportergensystem verwendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage:	Kern 430-33, Gottl. Kern & Sohn, Albstadt
CO ₂ -Inkubator:	Haereus BBD 6220, Kendro, Hanau
Durchflußzytometer (FACScan):	Coulter Epics XL-mcl II 3.0, Beckman-Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammern:	Modell B2, Owl Separation Systems, USA und Mini Protean II, BioRad, München
Elektroporations-Einheit:	Gene Pulser II, BioRad, München
Mikrobiologischer Brutschrank:	Haereus Function Line B20, Kendro, Hanau
Fluoreszenzmikroskop:	Leica DMRBE, Leica-Microsystems, Wetzlar
Konfokales Laser-Mikroskop:	Leica DMIRB, Leica-Microsystems, Wetzlar
Phasenkontrastmikroskop:	Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen
Neubauer Zählkammer:	Brand, Landshut
PH-Meter:	pH 330 Set 1, WTW, Weilheim
Pipetten:	Gilson International, Bad Camberg
Pointer:	Multipoint-Inoculator, MAST-Diagnostica, Reinfeld
Rotations-Hybridisierungsöfen:	Heraeus HeraHybrid, Kendro, Hanau
Schüttler:	Duomax 1030, Heidolph, Schwabach MS1 Minishaker, IKA Works Inc., USA
Schüttelinkubator:	Certomat HK und Certomat U, B. Braun Biotech Int., Melsungen
Software:	Lotus 1-2-3, Lotus Dev. Corp, USA SigmaPlot, SPSS Sience Software, Er kath

Spannungsquellen:	PowerPac 300, BioRad, München
Spektralphotometer:	Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilwerkbänke:	BDK S-1200, BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Thermocycler:	GeneAmp PCR 9700, Perkin Elmer, Wellesley, USA
Tischinkubatoren:	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
UV-Einheit:	Easy RH und UVT-20 M/W, Herolab, Wiesloch
Zentrifugen:	Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg Sorvall Super T2, Kendro, Hanau

2.1.2 Sonstige Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden soweit nicht gesondert angegeben von folgenden Firmen bezogen: Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark; Becton Dickinson, Heidelberg; Braun Melsungen; Eppendorf, Hamburg; Greiner, Nürtingen.

FlowSet-Beads	Beckman-Coulter, Krefeld
LabTekII Chamber-Slides 8-Well	Nalge Nunc, Roskilde, DK
Zeta-Probe	BioRad, München
Protran BA 83	Schleicher & Schüll, Dassel
Polypropylen für Selbstgeschnittene Objektträger	Greiner, München
Whatman 3 MM Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht näher bezeichnet, wurden Antibiotika und Chemikalien von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Carl Roth, Karlsruhe, Biomol, Hamburg und ICN Biochemicals, Aurora (USA) geliefert.

AF1	Citifluor, London, GB
Agarose für Elektrophorese	Carl Roth, Karlsruhe
Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Buthyryl-Homoserinolacton	Dr. L. Eberl, TU-München
Carbenicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Clenz	Beckman-Coulter, Krefeld
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DIG-EasyHyb	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG-UTP	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	Gibco BRL, Karlsruhe
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isoton II	Beckman-Coulter, Krefeld
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nitriloessigsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
10x PCR-Puffer	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Pen-Strep	Gibco BRL, Karlsruhe
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Propidium-Jodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Quecksilberdichlorid (HgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ultrapure Protogel	National Diagnostics, Atlanta, USA

Medien, komplexe Zusätze und Agar für die Kultur von Bakterien wurden, soweit nicht gesondert angegeben, von Difco Becton-Dickinson, Sparks (USA) bezogen.

BactoAgar	Difco Becton-Dickinson
Biotin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Histidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MacConkey Grundsubstanz	Oxoid, Basingstoke, GB
3-Oxododecanoyl-HSL	Dr. L. Eberl, TU-München
Butyryl-HSL	Dr. L. Eberl, TU-München
Pseudomonas Isolation Agar	Difco Becton-Dickinson
Tryptic Soy Broth	Difco Becton-Dickinson
Trypton	Difco Becton-Dickinson
Yeast Extract	Difco Becton-Dickinson

Folgende Zellkulturmedien und Zusätze wurden bei Gibco BRL, Karlsruhe bestellt: Fetales Kälber-Serum (FKS)

L-Glutamin 200 mM
RPMI Medium 1640

2.1.4 Kits

DIG Northern Starter Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
HighSpeed-Plasmid-Midi-Kit	Quiagen, Hilden
PCR-Purification-Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden

2.1.5 Elektrophorese-Marker

Prestained SDS-Page Standards, Low Range	BioRad, München
Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
RNA molecular weight marker I	Roche Diag., Mannheim

2.1.6 Synthetische Oligonukleide

Zur PCR wurden folgende synthetische Oligonukleide von Metabion, Martinsried bezogen und eingesetzt. Unterstrichen ist dabei die hybridisierende DNA-Sequenz, T_m bezeichnet deren Schmelztemperatur:

Tabelle 2.1.6.1 Synthetische Oligonukleide

Name	Sequenz (5'→3')	T_m (°C)
<i>fexoS</i>	<u>ACCCTGACACGATATCGCCACCGTGATGCA</u> <u>CGGAAGGA</u>	69
<i>fmucA</i>	<u>GATATCGCCACCGTGATGCA</u>	70,3
<i>fmucA-BamHI</i>	TTAAGGATCC <u>GATATCGCCACCGTGATGCA</u>	70,3
<i>fmucA-EcoRI</i>	TTAAGAATTC <u>GATATCGCCACCGTGATGCA</u>	70,3
<i>fmucAS</i>	<u>GCGCGAGTTCGAAGGTTTG</u>	69,7
<i>rexoS</i>	<u>CATACCTTGGTCGATCAGCT</u>	68,2
<i>rmucA</i>	<u>ACCCTCCCTAGCTTGAACG</u>	69,7
<i>rmucA-EcoRI</i>	ATATGAATTC <u>ACCCTCCCTAGCTTGAACG</u>	69,7
<i>rmucA-HindIII</i>	ATATAGCTT <u>ACCCTCCCTAGCTTGAACG</u>	69,7
<i>rmucAS</i>	<u>GCTGGGAGGGATCGAACTTG</u>	72,3

2.1.7 Plasmide

Tabelle 2.1.7.1 Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pBlueskriptIIKS+	plac Expressions-Vektor, Cb ^R	Stratagene
pRK2013	Helfer-Plasmid zur Mobilisation von selbst nicht mobilisierbaren Plasmiden, Km ^R	<i>Ditta et al.; 1980</i>
pEX18T	Klonierungsvektor für <i>P. aeruginosa</i> , Cb ^R , <i>sacB</i>	<i>Hoang T.</i>
pKT248	Klonierungsvektor für <i>P. aeruginosa</i> , Cm ^R , Sm ^R	<i>Schweizer et al.; 1995</i>
pExoS ² -GFP	pKT248/ <i>exoS</i> (Promotor + N-Terminus)/ <i>gfpmut2</i>	<i>Hornef, et al.; 2000</i>
pExoU ² -GFP	pKT248/ <i>exoU</i> (Promotor + N-Terminus)/ <i>gfpmut2</i>	<i>Hornef, et al.; 2000</i>
pKTgfp	pKT248/ <i>gfpmut2</i>	<i>Hornef, et al.; 2000</i>
pMR1	pBlueskriptIIKS+/ <i>mucA</i>	diese Arbeit
pMR2	pBlueskriptIIKS+/ <i>mucA</i> '	diese Arbeit
pMR3	pEX18T/ <i>mucA</i> '	diese Arbeit
pPA18G11	PAO1-Genbank, <i>mucA</i>	diese Arbeit
pPA19B5	PAO1-Genbank, <i>mucA</i>	diese Arbeit
pPA19D12	PAO1-Genbank, <i>mucA</i>	diese Arbeit

2.1.8 Bakterienstämme

Tabelle 2.1.8.1 Stämme von *E. coli*

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5a ⁺	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>deoR</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1 supE44</i>	institutseigener Stamm
HB101	F ⁻ Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>leuB6 supE44 ara-14</i> <i>galK2 lacY1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>) <i>rpsL20</i> (<i>Strr</i>) <i>xyl-5 mtl-1 recA13</i>	institutseigener Stamm
XL1 Blue	<i>endA1, recA1, hsdR17, gyrA96, thi-1,</i> <i>relA1, supE44, lac[F', proAB⁺, lac^f,</i> <i>lacZ</i> Δ <i>15</i> :: Tn10 (tetr)]	institutseigener Stamm
DH5a ⁺ [pMR1]	pBlueskriptIIKS ⁺ / <i>mucA</i>	diese Arbeit
DH5a ⁺ [pMR2]	pBlueskriptIIKS ⁺ / <i>mucA</i> '	diese Arbeit
DH5a ⁺ [pMR3]	pEX18T/ <i>mucA</i> '	diese Arbeit
HB101[pRK2013]	Helfer-Plasmid zur Mobilisation von selbst nicht mobilisierbaren Plasmiden, Km ^R	<i>Ditta et al.; 1980</i>
XL1 Blue[pPA18G11]	PAO1-Genbank, <i>mucA</i>	diese Arbeit
XL1 Blue[pPA19B5]	PAO1-Genbank, <i>mucA</i>	diese Arbeit
XL1 Blue[pPA19D12]	PAO1-Genbank, <i>mucA</i>	diese Arbeit

Tabelle 2.1.8.2 Stämme von *P. aeruginosa*

Stamm	Beschreibung	Referenz
PAO1	Wildtyp, prototroph	institutseigener Stamm
PAK	Wildtyp, prototroph	institutseigener Stamm
PDO100	PAO1 Δ <i>rhII</i> :Tn501-2 Hg ^R	<i>Brint et al.; 1995</i>
PDO111	PAO1 Δ <i>rhIR</i> :Tn501-2 Hg ^R	<i>Brint et al.; 1995</i>
PAO-JP1	PAO1 Δ <i>lasI</i> ::Tet ^R	<i>Pearson et al.; 1997</i>
PAO-JP2	PDO100 Δ <i>lasI</i> ::TetR	<i>Pearson et al.; 1997</i>
PAO-JP3	PDO111 Δ <i>lasR</i> ::TetR	<i>Pearson et al.; 1997</i>
SS24	PAO1 Δ <i>rhoS101</i> :: <i>aacCI</i> Cn ^R	<i>Suh et al. 1999</i>
PAM-1	PAO1 Δ <i>mucA</i> , mucoid	diese Arbeit
PAM-2	PAO1 Δ <i>mucA</i> , mucoid	diese Arbeit
PAM-3	PAO1 Δ <i>mucA</i> , mucoid	diese Arbeit
PKM-1	PAK Δ <i>mucA</i> , mucoid	diese Arbeit
PKM-2	PAK Δ <i>mucA</i> , mucoid	diese Arbeit
PKM-3	PAK Δ <i>mucA</i> , mucoid	diese Arbeit
PAO1[pExoS ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoS</i> ⁺ (Promotor + N-Terminus von <i>exoS</i>)/ <i>gfpmut2</i>	<i>Hornef et al.; 2000</i>
PAO1[pExoU ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoU</i> ⁺ (Promotor + N-Terminus von <i>exoU</i>)/ <i>gfpmut2</i>	<i>Hornef et al.; 2000</i>
PAO1[pKTgfp]	pKT248/ <i>gfpmut2</i>	<i>Hornef et al.; 2000</i>
PDO100[pExoS ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoS</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit
PDO100[pExoU ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoU</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit
PDO111[pExoS ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoS</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit
PAO-JP1[pExoS ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoS</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit

PAO-JP1[pExoU ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoU</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit
PAO-JP2[pExoS ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoS</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit
PAO-JP3[pExoS ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoS</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit
SS24[pExoS ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoS</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit
SS24[pExoU ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoU</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit
PAM-1[pExoS ⁺ -GFP]	pKT248/ <i>exoS</i> ⁺ / <i>gfpmut2</i>	diese Arbeit

2.1.9 Enzyme

AmpliTaq	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Bam HI	Gibco BRL, Karlsruhe
DNase I	Gibco BRL, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	Gibco BRL, Karlsruhe
Eco RI	Gibco BRL, Karlsruhe
Hind III	Gibco BRL, Karlsruhe
Lysozym	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nae I	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.10 Antikörper und Antiseren

Anti-Digoxigenin-AP	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-ExoS	A. M. Geiger, München
Anti-GFP	Clontech, Becton-Dickinson, Palo Alto,USA

2.1.11 Medien und Agar

Tabelle 2.1.11.1 Zellkulturmedium

RPMI 1640 Medium	500 ml
FKS	50 ml
L-Glutamin	5 ml
(Pen-Strep)	(5 ml)

Tabelle 2.1.11.2 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Trypton	10 g
Yeast Extrakt	5 g
NaCl	5 g
A. bidest.	ad 1 l, pH 7,5 mit NaOH

LB-Agar: 10 g Bacto-Agar pro 1 l LB-Medium

Einfriermedium: 20% Glycerin in LB-Medium

Tabelle 2.1.11.3 YT-Medium

Trypton	20 g
Yeast Extract	5 g
MgSO ₄	20 mM
KCl	10 mM
A. bidest.	ad 1 l, pH 7,6 mit NaOH

Tabelle 2.1.11.4 SOC-Medium

Trypton	2 g
Yeast Extract	1 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM
A. bidest.	ad 100 ml, pH 7,5 mit NaOH

Tabelle 2.1.11.5 Medium für elektrokompente Bakterien

Trypton	4 g
Yeast Extract	3,8 g
A. bidest.	ad 500 ml

Tabelle 2.1.11.6 Vogel-Bonner-Medium (VB-Medium)

MgSO ₄ • 7H ₂ O	200 mg
Zitronensäure	2 g
K ₂ HPO ₄	10 g
NaNH ₄ HPO ₄ • H ₂ O	3,5 g
Glucose	0,2% (w/v)
Biotin	100µM
Histidin	10µM
A. bidest.	ad 1 l

Tabelle 2.1.11.7 Exotoxin-Stimulationsmedium

TSB-Instant-Medium	30 g
Glycerin	1% (v/v)
Nitriloessigsäure	10 mM
Natriumglutamat	100 mM
A. bidest.	ad 1 l

Tabelle 2.1.11.8 Mucoid-Maintenance-Agar (MMA)

MacConkey-Instant-Agar	nach Vorschrift für 1 l
Glycerin	5% (v/v)
A. bidest.	ad 1 l

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Im alkalischen Milieu wird die Bakterienzellwand mit SDS aufgelöst und die gesamte DNA sowie die restlichen Bestandteile der Bakterienzelle denaturiert. Anschließend Neutralisation führt nur zur Renaturierung von kovalent geschlossener, zirkulärer Plasmid-DNA. Unlösliche chromosomale DNA, Proteine und Membranreste lassen sich durch Zentrifugieren abtrennen. Der Überstand wird mit Alkohol gefällt. Dadurch reduziert sich der Salzgehalt und durch Aufnehmen der DNA in einem kleineren Volumen können größere Konzentrationen an Plasmid-DNA erreicht werden. Zugabe von RNase A entfernt kontaminierende RNA. Ausschütteln mit Phenol entfernt noch vorhandene Proteinverunreinigungen. (*Birnboim et al.; 1979*)

2.2.1.1.1 Schnellpräp von Plasmiden:

Hierbei wird auf eine Abtrennung der chromosomalen DNA verzichtet. In der anschließenden Gelelektrophorese ist diese dann ebenfalls sichtbar, trennt sich aber durch ihre Größe von der Plasmid-DNA, so daß deren charakteristische Banden das Vorhandensein des Plasmides im jeweiligen Klon nachweisen. Eine Kolonie von der Agar-Platte wurde in 25µl Lysispuffer resuspendiert, 2,5µl Stoppmix zugegeben und 60min bei 68°C inkubiert und direkt für die Gelelektrophorese verwendet.

Tabelle 2.2.1.1.1: Lysispuffer

NaOH	50 mM
SDS	0,5% (w/v)
EDTA	5 mM

2.2.1.1.2 Mini-Plasmidpräparation:

Diese Methode wurde zur Isolation von Plasmiden aus kleineren Mengen (1-5ml) Kultur verwendet. Diese wurden durch zehninütiges Zentrifugieren bei 3000Upm sedimentiert. Das Pellet wurde in 100µl Lösung A resuspendiert und 5min auf Eis inkubiert, dann 200µl Lösung B zugegeben, vorsichtig gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 150µl Lösung C und erneuter fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde 10min bei Raumtemperatur und 12000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit einem Volumen Phenol extrahiert. Nach 5min Zentrifugieren bei 12000Upm wurde die wäßrige Phase abgenommen und mit 1/10 Volumen NaCl (5M) und 2,5 Volumen Äthanol abs. bei -20°C über Nacht, mindestens aber 10min präzipitiert. Anschließend wurde bei 4°C und 12000Upm 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 0,5ml Äthanol 70% gewaschen und nach dem Trocknen

in 20-50µl ddH₂O gelöst. RNA konnte durch Zugabe von 2µl RNase (20µg/ml) und Inkubation bei 37°C für 30min entfernt werden.

Tabelle 2.2.1.1.2 Lösung A

Glukose	0,9%
TrisHCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

Tabelle 2.2.1.1.3 Lösung B

NaOH	200 mM
SDS	1% (w/v)

Tabelle 2.2.1.1.4 Lösung C

Natriumacetat	3 M
Essigsäure	12% (v/v)

2.2.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Für die Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten wurde Plasmid-DNA oder eine Gesamtzellsat von Bakterien verwendet.

2.2.1.2.1 Gesamtzellsat

Eine dicke Öse des jeweiligen Bakterienstammes wurde in 1ml ddH₂O eingerieben und 10min bei 100°C aufgekocht, wodurch die Zellen aufgeschlossen werden und die DNA in Lösung geht. Anschließend wurden die Zellreste in der Zentrifuge 10min bei 10000UpM sedimentiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde dann direkt oder in Verdünnung für die PCR verwendet.

2.2.1.2.2 Reaktionsansatz

10µl von Plasmid-DNA-Lösung oder Gesamtzelllysate wurden in einem 100µl großen Reaktionsansatz eingesetzt. Außerdem enthielt dieser 2,5U Taq-Polymerase, 1/10 Volumen des mitgelieferten Puffers, je 0,2mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und je 1µM der beiden Primer. Im Thermocycler wurden dann nach einmaligem Erhitzen auf 94°C für 5min zur vollständigen Denaturierung der DNA-Doppelstränge 25 bis 30 Zyklen der folgenden drei Inkubationsschritte zur Amplifizierung durchgeführt:

- Denaturierung der DNA für 45s bei 94°C;
- Bindung der Primer bei entsprechender Schmelztemperatur für 45s;
- DNA-Polymerisierung bei 72°C für 45s;

Abschließend wurde für 7min eine Temperatur von 72°C zum abschließenden Polymerisationszyklus gehalten und dann auf 4°C abgekühlt. (*Saiki et al.; 1988*)

2.2.1.2.3 Reaktionsansatz zur Herstellung von DIG-markierten Sonden

Für Kolonieblot-Analysen und Northern-Blots wurden 10µl Plasmid-DNA in einem 100µl großen Reaktionsansatz eingesetzt. Dazu wurden 2,5U Taq-Polymerase, 1/10 Volumen des mitgelieferten Puffers, je 0,2mM dATP, dGTP und dCTP, sowie 0,13mM dTTP und 0,07mM DIG-markiertes UTP und je 1µM der beiden Primer zugegeben. Anschließend wurde wie oben inkubiert und die Sonden mit dem Quiagen PCR-Purifikation-Kit aufgereinigt.

2.2.1.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die Doppelstrang-DNA an spezifischen Stellen spalten. Diese sind durch bestimmte Basensequenzen, oft sog. Palindrome, definiert. Dabei können die beiden Einzelstränge an verschiedenen Stellen durchtrennt werden, so daß charakteristische Überhänge entstehen. Bei Spaltung von

ringförmiger Plasmid-DNA entsteht ein linearisierter Vektor, der anschließend mit entsprechenden Fragmenten ligiert werden kann. Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde mit den angeführten Restriktionsenzymen und vom Hersteller mitgelieferten Puffern durchgeführt. Soweit nicht anders vom Hersteller vorgeschrieben wurde ungefähr 1µg DNA in einem Volumen von 20µl mit 2-5U Restriktionsenzym über 2-3h bei 37°C inkubiert. Zur Klonierung wurde die DNA anschließend phenolisiert und gefällt.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA

Zum Auftrennen von DNA-Molekülen nach ihrer Größe im Elektrischen Feld wurden Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer verwendet. Je nach erwarteter Größe der DNA-Moleküle wurden dabei Konzentrationen von 0,5 bis 2,0% Agarose (w/v) verwendet. Dazu wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 50°C in das Bett einer Horizontal-Gelelektrophoresekammer gegossen. Die DNA-Lösung wurde vor Beladen des Gels 1:10 mit Stoppmix versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 1x TAE-Puffer als Laufpuffer bei Feldstärken von ca. 4-5V/cm. Zum Sichtbarmachen der DNA-Banden nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele anschließend in einem Ethidiumbromid Färbebad (Ethidiumbromid 1µg/ml in 1x TAE-Puffer) für 10min gefärbt und anschließend unter UV-Licht fotografiert.

Tabelle 2.2.1.4.1 10x TAE-Puffer pH 7,6

Tris	0,4 M
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

Tabelle 2.2.1.4.2 10x Stoppmix

Ficoll 400	20% (w/v)
SDS	1% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylen-Cyanol	0,25% (w/v)
EDTA pH 8,0	100 mM

2.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

2.2.1.5.1 Anfärbung der DNA-Banden

Zur Extraktion einzelner Banden aus Agarose-Gelen wurden diese nicht mit Ethidiumbromid sondern mit 0,02% Methylenblau in Aqua bidest. 15min angefärbt und anschließend 15min mit Aqua dest. entfärbt. Dadurch wurden die Banden bei Tageslicht als dunkelblaue Linien im Gel sichtbar und konnten ohne UV-Exposition und dadurch verursachte Degradation aufgesucht werden.

2.2.1.5.2 Extraktion

Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aus den ausgeschnittenen Gel-Stücken extrahiert.

2.2.1.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Durch Einbau von beliebigen DNA-Fragmenten in spezielle Plasmide, sogenannte Vektoren, können diese in *E. coli* vermehrt werden und auf andere Bakterienspezies übertragen werden. Die Vektoren enthalten Gene, die Resistenz gegenüber Antibiotika vermitteln und die mit übertragen werden. Nachdem Vektor und Fragment mit einem oder zwei Restriktionsenzymen gespalten wurden, werden sie

mittels einer Ligationsreaktion zusammengesetzt. Die rekombinanten Plasmide werden durch Transformation oder Elektroporation in spezielle kalzium-kompetente oder elektro-kompetente Bakterienstämme eingeführt. Die Suche nach „positiven Klonen“ kann anschließend anhand des Wachstumsvermögens auf antibiotikahaltigen Nährböden und anschließenden Nachweis der Plasmid-DNA durch Isolation derselben erfolgen. Zur Ligation wurden ca. 0,5µg Vektor-DNA und ca. 1µg DNA-Fragment mit 1/10 Volumen des Ansatzes 10x Ligase-Puffer und 1U T4-DNA-Ligase für 16h bei 14°C inkubiert. (*Maniatis et al.; 1989*)

2.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA

Plasmide wurde mit der modifizierten Methode nach Hanahan in *E. coli* transformiert (*Hanahan; 1983*). Dazu wurden zunächst so genannte kalzium-kompetente *E. coli*-Zellen hergestellt:

2.2.1.7.1 Herstellung kalzium-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zunächst wurde eine Vorkultur in YT-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit der Vorkultur wurde dann die Hauptkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft. Nach Inkubation bei 37°C und 250Upm konnte nach 2 Stunden die OD₆₀₀ überprüft werden. Nach Erreichen von Werten zwischen 0,4 und 0,5 wurde die Kultur weiterverarbeitet. Dazu wurde die Kultur eine halbe Stunde auf Eis gekühlt und anschließend bei 3000 Upm und 4°C 10min sedimentiert, das Sediment in 30ml TFB 1 pro 100ml Kultur resuspendiert. Die Suspension wurde 5min auf Eis gekühlt, dann erneut bei 3000Upm und 4°C 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 4ml TFB 2 pro 100ml Kultur resuspendiert. Hiervon wurden 200µl-Aliquots in Eppendorf-Cups in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Tabelle 2.2.1.7.1 TFB 1

Kaliumacetat	30 mM
MnCl ₂ · 4H ₂ O	50 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 mM
Glycerin	15%
	ad pH 5,8 mit Essigsäure

Tabelle 2.2.1.7.2 TFB 2

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

2.2.1.7.2 Transformation kompetenter Zellen

Zur Transformation wurde ein Aliquot 30min auf Eis aufgetaut, dann 1µl der Plasmid-DNA-Lösung aus einer Mini- oder Midi-Plasmidpräparation beziehungsweise 10µl eines Ligationsansatzes zugegeben und erneut 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Heatshock bei 42°C für exakt 90s. Anschließend wurden die Bakterien sofort wieder 5min auf Eis gelagert und danach 800µl SOC-Medium zugegeben und 45min bei 37°C und 300Upm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden zur Selektion Aliquots von 100µl auf entsprechenden Selektiv-Nährböden ausplattiert.

2.2.1.8 Elektroporation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA in *P. aeruginosa* einzubringen wurde Elektroporation verwendet. Dabei werden im Elektrischen Feld kurzzeitig Poren in der Zellmembran geschaffen, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann. Voraussetzung ist die spezielle Vorbehandlung der Bakterien:

2.2.1.8.1 Herstellung elektro-kompetenter Bakterien

Hierfür wurden mit 5ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes 500ml Medium für elektro-kompetente Bakterien angeimpft und 2 bis 2,5 Stunden bei 42°C und 250Upm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 30min auf Eis gekühlt, dann 10min bei 4000g und 4°C sedimentiert und in 200ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Nach Wiederholung dieses Schrittes wurde ein weiteres mal sedimentiert und anschließend in 10ml eiskaltem Glycerin 10% resuspendiert und schließlich nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 2ml eiskaltem Glycerin 10% resuspendiert. Danach wurde die Bakterien-Suspension in 200- μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.2.1.8.2 Elektroporation kompetenter Zellen

Für die Elektroporation wurden von einem elektrokompetenten Aliquot des jeweiligen Bakterienstammes 20 μ l über 30min auf Eis aufgetaut, mit 1 μ l der Plasmid-DNA-Lösung vermischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde bei 25mF, 2,5kV und 200W und einer elektrischen Feldstärke von 12,5kV/cm durchgeführt, was einer Zeitkonstante von ungefähr 4,5ms entspricht. Danach wurde die Küvette schnell herausgenommen und der Inhalt mit 1ml SOC-Medium versetzt. Anschließend wurde eine halbe Stunde bei 37°C und 200Upm inkubiert. Dann wurden 100- μ l-Aliquots auf Selektiv-Nährböden ausplattiert.

2.2.1.9 Konjugation

Fertilitätsplasmide (F-Plasmide) ermöglichen die Übertragung von Plasmiden mittels so genannter F-Pili zwischen einzelnen Exemplaren von Bakterien, auch über die Speziesgrenzen hinaus. Dieser Vorgang wird Konjugation genannt. Mobilisierbare Plasmide können ebenfalls so übertragen werden, besitzen aber nicht die notwendigen Gene für den Übertragungsapparat, so daß erst die zusätzliche Anwesenheit eines F-Plasmides deren Übertragung vermittelt. Zur Übertragung von mobilisierbaren Plasmiden für die Homologe Rekombination in *P. aeruginosa* wurden diese durch F-Plasmid vermittelte Konjugation von *E. coli* in *P. aeruginosa* übertragen. Dabei werden der Donorstamm, das heißt der Stamm von *E. coli*, der das zu übertragende Plasmid enthält, der Helferstamm, der Stamm von *E. coli* mit dem F-Plasmid, sowie der Akzeptor-Stamm von *P. aeruginosa* zusammen inkubiert. Dabei überträgt der Helferstamm zunächst sein F-Plasmid auf den Donorstamm. Dieser kann dann das mobilisierbare Plasmid auf den Akzeptorstamm übertragen. Es wurden jeweils 10ml LB-Medium mit je einer Kolonie des Donorstammes, des Helferstammes des Akzeptorstammes angeimpft. Als Helferstamm wurde *E. coli* HB101 pRK2013 verwendet. Nach Inkubation im Schüttler bei 37°C und 200Upm wurden am nächsten Tag je 2ml in Eppendorf-Cups gefüllt und 5min bei 6000Upm sedimentiert. Nach Resuspension in 1ml LB-Medium und erneutem Zentrifugieren und Resuspension in 0,5ml wurden jeweils 100µl von Helferstamm- und Donorstamm-Suspension in einem neuen Epicup gemischt und 30min bei 20°C ohne Schütteln inkubiert. Dann wurden 200µl der Akzeptorstamm-Suspension hinzugegeben und nach Vermischen je 50µl auf eine LB-Agar-Platte getropft. Nach 4-5 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurden die gewachsenen Bakterienrasen resuspendiert und anschließend auf Selektiv-Nährböden ausgebracht.

2.2.1.10 Kolonie-Hybridisierung

Die Kolonie-Hybridisierung erlaubt die parallele Suche nach bestimmten DNA-Sequenzen in einer großen Anzahl von Bakterienstämmen. Dazu werden diese direkt auf Nitrocellulose-Membranen kultiviert, die gewachsenen Kolonien dann lysiert und die DNA kovalent auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung mit einer digoxigenin-markierten Sonde ermöglicht dann die Identifizierung der diese Sequenz enthaltenden Stämme. Hier wurde die institutseigene PAO1 Genbank verwendet. Diese wurde erstellt, indem das Genom von PAO1 mit Restriktionsenzymen in kleine Abschnitte unterteilt worden war. Diese wurden in Vektoren kloniert und *E. coli* XL1-Blue damit transformiert. Die einzelnen Klone sind in 96-Well-Plates bei -70°C gelagert. Nitrozellulose-Membranen wurden auf LB-Nährböden aufgelegt, die 12µg/ml Tetracyclin enthielten. Zur Übertragung der Klone auf Nitrozellulosemembranen wurden mit Hilfe eines Pointers kleine Tröpfchen aus jedem Well nebeneinander auf die Membranen geimpft. Anschließend wurden diese bebrütet. Als Positivkontrolle wurde eine Kolonie von PAO1, als Negativkontrolle eine von *E. coli* XL1-Blue verwendet.

2.2.1.10.1 Lyse der Kolonien und Fixierung:

Die Membranen wurden von den Nährböden abgenommen und mit den gewachsenen Kolonien nach oben 3min auf mit 10% SDS getränktes Whatman 3 MM Papier gelegt. Anschließend wurden die Kolonien 5min mit Lysierungspuffer lysiert. Nach Zugabe von Neutralisierungspuffer und 4x SET für jeweils 5 min wurden die Membranen 1h luftgetrocknet und die DNA anschließend 2h im Hybridisierungssofen bei 80°C fixiert.

2.2.1.10.2 Reinigung der Membranen von Residuen:

Proteinresten wurden durch Inkubation bei 37°C mit 1 x SSC und 0,5% SDS sowie 0,5mg/ml Proteinase K entfernt. Dann noch sichtbare Reste wurden mit 2 x SSC und 0,1% SDS entfernt. Nach erneutem kurzen Waschen in 2 x SSC wurden die Membranen an der Luft getrocknet.

2.2.1.10.3 Hybridisierung:

Zur Prähybridisierung wurden die Membranen nach Zugabe von 20ml Hybridisierungslösung 1h bei 65°C inkubiert. Inzwischen wurden die DIG-UTP-markierten Sonden denaturiert, indem sie 10min aufgekocht wurden und anschließend sofort bis zur Verwendung auf Eis gekühlt wurden. Die Prähybridisierungslösung wurde entfernt und 5ml Hybridisierungslösung mit 5µl denaturierten Sonden zugegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 68°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen entnommen und zunächst zweimal 5min in 25ml 2 x SSC mit 0,1% SDS, dann zweimal 15min bei 68°C in 50ml 0,1 x SSC mit 0,1% SDS gewaschen. Dadurch wurde nicht hybridisierte Sonden-DNA entfernt.

2.2.1.10.4 Detektion:

Durch Bindung von DIG-Fab-Konjugaten an die hybridisierten Sonden und Reaktion mit CSPD wurden Filme belichtet, die Schwärzung des Filmes an einer Stelle wies die gesuchte DNA-Sequenz im entsprechenden Bakterienstamm nach. Zur Gewinnung des Plasmides wurde der Stamm aus der jeweiligen 96-Well-Plate auf LB-Agar ausgestrichen und das Plasmid präpariert.

Tabelle 2.2.1.10.1 Lysierungspuffer

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

Tabelle 2.2.1.10.2 Neutralisierungspuffer

TrisHCl pH 7,5	1 M
NaCl	1,5 M

Tabelle 2.2.1.10.3 20 x SET

NaCl	3 M
EDTA	20 mM
TrisHCl pH 7,8	0,4 M

Tabelle 2.2.1.10.4 20 x SSC

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M

Tabelle 2.2.1.10.5 Hybridisierungslösung

20 x SSC	25%
Natrium-N-laurylsarcosin	0,1% (w/v)
SDS	0,02% (w/v)
Blockierreagenz	1 %

2.2.1.11 Isolierung von RNA

Lösungen für die Arbeit mit RNA wurden soweit möglich mit 0,1% (v/v) Diäthylpyrocarbonat (DEPC) behandelt um RNAsen zu entfernen. Als Gefäße und Geräte wurden nach Möglichkeit nukleasefreie Einmalartikel verwendet. Zur

Isolation der RNA von gramnegativen Bakterien wird die Zellwand zuerst mit Lysozym und SDS abgebaut und lysiert. Dann werden zelluläre RNAsen mit Guanidinthiocyanat inaktiviert und die RNA kann zum Beispiel durch Affinitätschromatographie von den restlichen Bestandteilen der Bakterienzellen abgetrennt werden. Hierzu wurde der High Pure RNA Isolation Kit verwendet. Die Qualität der RNA wurde durch Versetzen mit 1/10 Volumen Stopmix und anschließende Elektrophorese in einem 1% Agarose-Gel und anschließendes Färben mit Ethidium-Bromid überprüft.

2.2.1.12 Northernblot

Durch Hybridisierung von elektrophoretisch aufgetrennter mRNA mit digoxigenin-markierten DNA- oder RNA-Sonden läßt sich mRNA spezifisch nachweisen. Gleichzeitig lassen sich die von verschiedenen Bakterienstämmen erzeugten Mengen qualitativ vergleichen. Die RNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde photometrisch bestimmt und auf einen gemeinsamen Wert durch verdünnen mit RNase-freiem Aqua dest. eingestellt. Die Proben und Sonden wurden dann entsprechend dem Protokoll des DIG Northern Starter Kit verwendet. Es wurde hierbei eine Formaldehyd-Gel-Elektrophorese durchgeführt und mittels Kapillar-Blot geblottet.

2.2.1.13 Westernblot

Einzelne Proteine aus der Gesamtproteinmasse der Bakterien können mittels Westernblot nachgewiesen und quantifiziert werden. Dazu werden die einzelne Proteine denaturiert, nach der Molekülmasse elektrophoretisch aufgetrennt und durch Bindung mit Erst- und Zweit-Antikörpern nachgewiesen. Der Erst-Antikörper erkennt dabei Epitope auf dem jeweiligen Protein, der Zweit-Antikörper die Fc-Region des Erst-Antikörpers. Der Zweit-Antikörper ist außerdem an das

Enzym Peroxidase gekoppelt, so daß die Zugabe von Nachweisreagenz eine Chemolumineszenzreaktion hervorruft. Damit könne Filme belichtet werden.

2.2.1.13.1 Vorbereitung der Proben:

Der SDS-Probenauftragspuffer dient zur Freisetzung der Proteine aus den Bakterienzellen. 1000µl wurden von einer Bakteriensuspension abgenommen und durch Zentrifugieren für 15min bei 4000Upm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 1ml A. bidest und 1ml SDS-Probenauftragspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 10min lang bei 100°C inkubiert und dann sofort auf Eis gekühlt.

Tabelle 2.2.1.13.1 2 x SDS-Probenauftragspuffer

SDS	3,6% (w/v)
b-Mercaptoethanol	36%% (v/v)
Glycerin	20% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

2.2.1.13.2 Denaturierende, diskontinuierliche SDS-Gel-Elektrophorese:

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurden zunächst Arcylamid, Tris-Puffer, A. bidest und SDS gemischt. Dann wurde die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und Ammonimpersulfat (APS) eingeleitet. Zuerst wurde das Trenngel in eine Vertikalgelkammer (10,5cm x 7,5cm x 1,0mm) bis zu 2/3 des Endvolumens gefüllt und mit n-Butanol überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach einstündiger Polymerisation wurde das Butanol entfernt, das Sammelgel hinzugegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach erneuter einstündiger Polymerisation wurde dieser entfernt und es erfolgte der Probenauftrag. Die Elektrophorese wurde in 1x Laufpuffer bei 30mA durchgeführt. Dabei werden die Proteine im Sammelgel durch das enthaltene SDS denaturiert. Außerdem enthält das

Sammelgel Chloridionen, die schneller im elektrischen Feld wandern als die Proteine. Der Puffer enthält dagegen Glycin-Ionen, die langsamer wandern. zwischen den Chlor- und Glycin-Ionen werden die Proteine im Trenngel, das engmaschiger ist als das Sammelgel, nach der Molekül-Größe aufgetrennt und die einzelnen Protein-Banden fokussiert.

Tabelle 2.2.1.13.2 Polyacrylamidgele (Trenngel, Sammelgel)

	Trenngel 12%	Sammelgel 3,9%
Acrylamid 30%	6,0 ml	650 µl
1,5 M TrisHCl pH 8,8	1,25 ml	-
0,5 M TrisHCl pH 6,8	-	1,25 ml
A. bidest.	7,5 ml	3,0 ml
SDS 10%	150 µl	50 µl
APS 10 %	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tabelle 2.2.1.13.4 10 x Laufpuffer

Glycin	14,4% (w/v)
Tris-Base	3% (w/v)
SDS	1% (w/v)

2.2.1.13.3 Coomassie-Färbung

Um die Qualität der Elektrophorese und zu überprüfen, wurden die Polyacrylamidgele mit Coomassie-Blue gefärbt. Dazu wurden sie unter leichtem Schütteln 10-30min in Färbelösung und anschließend für 6-12h in Entfärbelösung inkubiert.

Beim Färben wird zunächst das gesamte Gel gefärbt, beim Entfärben bleibt der Farbstoff nur an den Proteinbanden haften.

Tabelle 2.2.1.13.5 Coomassie-Färbung

	Färbelösung	Entfärbelösung
Coomassie-Blue R-250	0,125% (w/v)	-
Methanol	50% (v/v)	30% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)	10% (v/v)

2.2.1.13.4 Immunoblotting

Nach der Elektrophorese und Abtrennung des Sammelgeles wurden die Proteinbanden aus dem Trenngel auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Blot bestehend aus je einer Lage Filter-Papier, Trenngel und der Nitrocellulose-Membran wurde dazu in die Blot-Vorrichtung der Mini-Protean-II-Apperatur eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1x Laemmli-Puffer gefüllt und bei konstant 350mA 1,5 Stunden geblottet. Dann wurde die Nitrocellulose-Membran aus dem Aufbau genommen und die freien Membranareale mit 1% bovinem Serum-Albumin in TPBS (0,5% Tween 20 in PBS) bei Raumtemperatur geblockt. Nach 12h wurde dreimal mit TPBS gewaschen. Der Erst- und Zweit-Antikörper wurden in TPBS verdünnt und die Membran unter Schütteln bei Raumtemperatur zuerst 6 Stunden mit dem 1. und nach dreimaligem Waschen mit TPBS 2h mit dem 2. Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde der Blot mit Luminol-Lösung überschichtet. Die entstehende Chemilumineszenz ermöglicht Filmbelichtungen.

Tabelle 2.2.1.13.6 10 x Laemmli-Puffer

Tris	3% (w/v)
Glycin	14,7% (w/v)

2.2.2 Kulturtechniken für Bakterien und eukaryote Zellen

2.2.2.1 Vorkultur von *P. aeruginosa*

In Vogel-Bonner-Medium (*Vogel et al.; 1956*) exprimiert *P. aeruginosa* nur geringe Mengen an Exotoxinen (*Hornef et al.; 2000*). VB-Medium wurde deshalb verwendet, um eine ausreichende Menge von Bakterien mit niedriger Exotoxin-Expression als Ausgangspunkt für die weiteren Versuche zu gewinnen. 25ml Vogel-Bonner-Medium wurden dazu mit einer Kolonie des jeweiligen Stammes von *P. aeruginosa* angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200Upm inkubiert.

2.2.2.2 Stimulation der Exotoxinproduktion von *P. aeruginosa*

Das Exotoxin-Stimulationsmedium wurde eigentlich zur Stimulation der Exotoxin-A-Produktion verwendet (*Iglewski et al.; 1979*). Die Zugabe des Chelators Nitrilo-essigsäure vermindert die Konzentration an freien Kathionen. Dadurch stimuliert es *P. aeruginosa* auch zur Expression der typ-III-sezernierten Exoenzyme (*Nicas et al.; 1984*). Hierzu wurden 25ml einer Vorkultur in Vogel-Bonner-Medium durch Zentrifugieren bei 4300Upm für 10min sedimentiert und das Sediment nach Verwerfen des Überstandes in 2ml Stimulationsmedium aufgenommen. Durch Versetzen von frischem Stimulationsmedium mit dieser Suspension wurden eine Optische Dichte von 0,1 bei monochromatischem Licht von 600nm eingestellt und 25ml davon in 50ml fassende Kulturgefäße mit Schikanen gegeben. Damit sollten für die Messungen und Blots zu Beginn vergleichbare Anfangskeimzahlen erreicht werden. Dann wurde bei 37°C und 200Upm inkubiert.

2.2.2.3 Substitutionsversuche mit Homoserinolactonen

Um den Effekt der Zugabe von Homoserinolactonen auf die Exotoxin-Expression zu untersuchen wurden diese zu Kulturen der einzelnen Stämme von *P. aeruginosa* in der exponentiellen Wachstumsphase gegeben. Dafür wurden die einzelnen Stämme von *P. aeruginosa* in 25ml Stimulatinosmedium 3 Stunden bei 37°C und 200Upm inkubiert. Dann wurden die Kulturen sedimentiert und in 12,5ml frischem Stimulationsmedium resuspendiert. Mit den Stammlösungen der Homoserinolactone N-3-Oxododecanoyl- Homoserinolacton (OdDHL) und N-Buthyryl-Homoserinolacton (BHL) wurden eine 10µM Lösung von BHL und eine 4µM Lösung von OdDHL in Stimulationsmedium hergestellt. Anschließend wurden von den Bakteriensuspensionen und von den Homoserinolacton- Lösungen je 250µl in 1,5ml Eppendorf Cups vermischt und nun bei Konzentrationen von 5µM BHL und 4µM OdDHL bei 37°C und 200Upm weiter inkubiert.

2.2.2.4 Kultur von Biofilmen

Mit jeweiligem Stamm von *P. aeruginosa* wurde eine Suspension mit der Optischen Dichte von 0,1 in Stimulationsmedium hergestellt. Davon wurden 10ml in eine Kultur-Schale gegeben, in der sich Objektträger aus Polypropylen befanden. Diese wurden 24h bei 37°C inkubiert.

2.2.2.5 Unterstützung der Ausprägung des mucoiden Phänotypes

Der *Mucoid Maintenance Agar* verstärkt die Expression von Alginat und erleichtert so das Erkennen des mucoiden Phänotypes von *P. aeruginosa* (Evans et al.; 1973). Zunächst wurde 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die bewachsenen Nährboden für weitere 3 Tage bei Raumtemperatur beobachtet.

2.2.2.6 Zellkultur

HeLa-Zellen (ATCC CCL-2) wurden in Zellkulturmedium in 200-ml-Zellkultur-Flaschen bei 37°C unter 5% CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde nach Erreichen eines geschlossenen Monolayers die Hälfte der Zellen aus der Flasche mechanisch passagiert und in frischem Medium in eine neue 200-ml-Zellkultur-Flasche eingesät.

2.2.2.7 Kokultur von *P. aeruginosa* mit HeLa-Zellen

2.2.2.7.1 Vorbereitung der HeLa-Zellen:

Von dem HeLa-Zell-Monolayer wurde das Medium abgenommen und durch frisches Zellkultur-Medium mit Antibiotika ersetzt. Dann wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgeschabt und mit dem Medium entnommen. Durch Färbung einer Probe mit 0,4% Trypanblau-Lösung wurde die Dichte der lebenden Zellen in einer Zählkammer bestimmt und $2 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in 8-Well-LabTek-II-Chamber-Slides gegeben, um nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ ein geschlossenes Monolayer aus HeLa-Zellen auf dem Objektträger zu erhalten.

2.2.2.7.2 Zugabe der Bakterien:

25ml einer Vorkultur des jeweiligen *P. aeruginosa*-Stammes wurden bei 4000Upm 10min sedimentiert, der Überstand verworfen und in 5ml Zellkultur-Medium ohne Antibiotika aufgenommen und die OD₆₀₀ so eingestellt, daß die gewünschte Multiplicity of Infection (MOI) erreicht wurde. Dabei entspricht eine ODD₆₀₀ von 1,0 einer Dichte von $1 \cdot 10^9$ Bakterien/ml. Das Medium wurde von den HeLa-Zellen abgenommen und nach einfachem Waschen mit antibiotika-freiem Medium durch Zellkultur-Medium mit Bakterien ersetzt. Anschließend wurde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.3 Detektion der Expression

2.2.3.1 Fixierung und Färbung zur Mikroskopie

Bakterien und Zellen wurden durch Inkubation mit 3,7% Paraformaldehyd 10min lang fixiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen.

2.2.3.1.1 Phalloidin-TRITC-Färbung

Phalloidin bindet an das Actin-Zytoskelett von eukaryonten Zellen. Es wurde hier als Konjugat mit dem Fluoreszenz-Farbstoff TRITC verwendet, um HeLa-Zellen aus den Infektionsversuchen gegenzufärben. Hierzu wurde der Objektträger nach der Fixierung 15min mit einer 1:1000 Verdünnung des Farbstoffes in PBS überschichtet. Anschließend wurde dreimal für 5min mit PBS gewaschen.

2.2.3.1.2 Propidiumjodid-Färbung

Propidiumjodid färbt unspezifisch DNA an. Die Plexiglas-Objektträger aus den Biofilmversuchen wurden dazu nach Fixierung 1min mit 1µg/ml Propidiumjodid überschichtet und dann dreimal mit PBS gespült

2.2.3.1.3 Eindeckmittel

Die gefärbten Objektträger wurden mit AF1 eingedeckt, das den Fluoreszenz-Verlust während der Betrachtung vermindert.

2.2.3.2 Konfokale Laser-Mikroskopie

Die Konfokale Laser Mikroskopie ermöglicht die scharfe Abbildung von fluoreszierenden Pigmenten in Schichten. Durch mehrfaches scannen können hochauflösende Bilder mit hoher Schärfe oder dreidimensionale Bilder gewonnen werden.

Das verwendete Leica TCS Mikroskop ist mit einem Argon-Krypton-Laser ausgerüstet, der die gleichzeitige Aufnahme von zwei verschiedenen Fluorochromen ermöglicht. Die Bilder des Biofilmes und der Kokulturversuche von *P. aeruginosa* mit HeLa-Monolayern wurden wie folgend erzeugt. Standardobjektive mit Vergrößerungen von 40x, 63x und 100x wurden gewählt. Abbildungen der GFP-Fluoreszenz und des zweiten Fluorochromes (TRITC) wurden durch Multichannel-Aufnahmen übereinandergelegt. Falschfarbenbilder beziehungsweise Graustufen-Bilder des Grünfluoreszenz-Kanals wurden zur besseren Erkennbarkeit der Fluoreszenzintensität erzeugt. Die Mikrophotographien wurden ohne weitere Bearbeitung verwendet.

2.2.3.3 Durchflußzytometrie

Die Durchfluß-Zytometrie ermöglicht es, die Expression von GFP und damit die des Fusionsgenes in einzelnen Bakterienzellen zu messen. Es stellt die statistische Verteilung der Stärke der Expression in Histogrammen dar. Das verwendete Zytometer von Coulter exzitiert mit monochromatischem Laserlicht bei 488nm.

2.2.3.3.1 Vorbereitung der Proben:

Zur Messung von Bakterienkulturen im Zytometer wurden je nach Wachstumsdichte von der Kultur 0,5 bis 2,0ml abgenommen. Diese wurden zweimal in sterilfiltriertem 1x PBS gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde dann je nach Menge in 1,0 bis 5,0ml PBS aufgenommen

2.2.3.3.2 Vorbereitung des Fluoreszenzdurchflußzytometers:

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurde das Zytometer vor der Messung mit Flow-Set-Beads geeicht, so daß im FL1-Detektor für die Beads ein Wert für die mittlere Intensität der Fluoreszenz von 140 +/- 1 gemessen wurde.

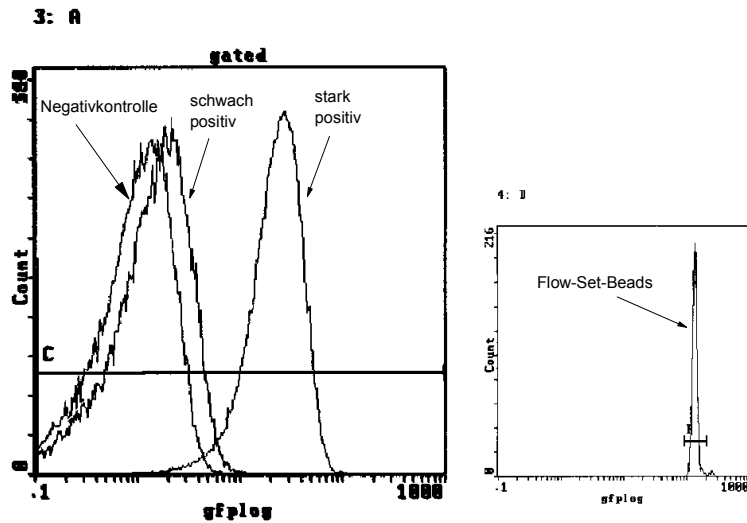


Abbildung 2.1: Im linken Histogramm sind verschiedene Bakterienpopulationen dargestellt. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch eingeteilt. Die Ordinate stellt die Anzahl der gemessenen Ereignisse (Bakterien) mit der jeweiligen Fluoreszenzstärke dar. Dabei ist die Fluoreszenzverteilung als Glockenkurve dargestellt. Zum Vergleich sind die Verteilungskurven einer Negativkontrolle (mittlere Fluoreszenzintensität um 1), eine schwach positive Probe (Fluoreszenzintensität um 2) und eine stark positive Probe (Fluoreszenzintensität etwa 15) dargestellt. Im rechten Histogramm ist die Fluoreszenzverteilung der zur Normierung dienenden Flow-Set-Beads mit einer Mittleren Intensität von etwa 140 abgebildet.

2.2.3.3 Messungen:

Die Bakterien wurden mit dem Sideward Scatter detektiert (*Russo-Marie et al.; 1993*). Größe und Granularität der Zellen sowie Fluoreszenz zwischen 525 und 550nm wurden ermittelt. Ein Gate nach den Kriterien Größe und Granularität wurde gesetzt, das die Bakterien aus der Flüssigkultur umfaßte. Dann wurde die

mittlere Intensität der Fluoreszenz der Population gemessen. Dazu wurden pro Messung 50000 Ereignisse erfaßt. Abbildung 2.1 zeigt Histogramme von Bakterienpopulationen mit verschiedener Expressionsstärke.

2.2.4 DNA-Sequenzen von *P. aeruginosa*

Sequenzen für die Konstruktion der Primer und alle übrigen benötigten DNA-Sequenzen wurden der Sequenz-Database GenBank® des National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA entnommen.

2.2.5 Statistische Auswertungsverfahren

Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen einzelnen Meßreihen aus den Durchflußzytometrie-Messungen zu ermitteln, wurde wie folgt vorgegangen: Die Meßwerte für die Fluoreszenz im FACS wurden für jeden Stamm erfaßt und die Mittelwerte gegen die Zeit beziehungsweise gegen die Optische Dichte aufgetragen. Dann wurden die Mittelwerte jeder Meßreihe mit den Mittelwerten jeder Meßreihe des Wildtypes durch einen paarweisen Student'schen t-Test für verbundene Stichproben mit Hilfe der Software Lotus 1-2-3 verglichen und der P-Wert für den Fehler 1. Art berechnet. Dabei wurde die Differenz von Werten mit einem $p < 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt.

3 Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluß von Biofilmbildung, Quorum Sensing, RpoS und Konversion zum mucoiden Phänotyp (*mucA*-Defekt) auf die Expression von Typ-III-sezernierten Exoenzymen von *P. aeruginosa* nachzuweisen. Verwendet wurden hierzu Stämme, die das Reporter-konstrukt *in trans* im Plasmid pExoS'-GFP, beziehungsweise pExoU'-GFP, enthalten. Diese Plasmide bestehen aus dem Vektor pKT248 mit einem Konstrukt aus Promotor und N-terminalem Anteil von *exoS*, beziehungsweise *exoU*, sowie *gfp*. ExoS und ExoS'-GFP werden in diesen Stämmen gleichermaßen exprimiert (Hornef et al. 2000). Zunächst wurde die ExoS-Expression von planktonisch wachsenden Bakterien und von Bakterien in einem Biofilm verglichen.

3.1 *exoS'*-*gfp*-Expression im Biofilm

Zur Darstellung der Expression von ExoS im Biofilm wurde der Stamm PAO1[pExoS'-GFP] auf Objektträgern aus Polypropylen über 18 Stunden kultiviert. Nach Färbung der Objektträger mit Propidiumjodid zeigte sich ein reifer Biofilm mit Mikrokolonien. (Abbildung 3.1A) Betrachtet man nun einen ungefärbten Biofilm, der unter identischen Bedingungen in der gleichen Kultur-Schale gewachsen war, durch das Fluoreszenzmikroskop, findet man kaum Grünfluoreszenz und somit annähernd keine *exoS'*-*gfp*-Expression (Abbildung 3.1B). Dagegen produzieren Bakterien aus dem Überstand reichlich ExoS'-GFP, was die Abbildung 3.1C deutlich zeigt. Im Gegensatz zu proliferierenden Bakterien ließ sich also im Biofilm keine ExoS-Synthese nachweisen.

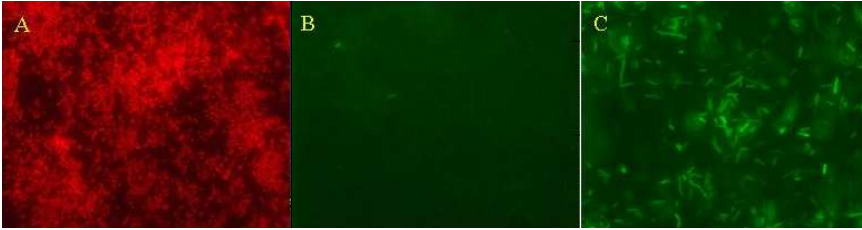


Abbildung 3.1: *exoS'*-gfp-Expression im Biofilm: A: Biofilm mit Propidium-Jodid gefärbt. B: Biofilm nativ im Fluoreszenzmikroskop. Hier zeigt sich kaum *exoS'*-gfp-Expression. C: Bakterien im Kulturüberstand produzieren im Vergleich dazu reichlich ExoS'-GFP.

3.2 Messung der *exoS'*-gfp- und *exoU'*-gfp-Expression mittels Durchflußzytometrie unter künstlicher Stimulation

Großen Anteil an der Genregulation beim Übergang vom planktonischen Wachstum zur stationären Phase oder zum Biofilm haben Quorum Sensing und der Sigma-Faktor der stationären Phase RpoS. Um einen Einfluß auf das Typ-III-Sekretionssystem zu untersuchen wurden Stämme von *P. aeruginosa* mit Mutationen im *rhl*-Quorum-Sensing-System, *las*-Quorum-Sensing-System und in *rpoS* mit dem Typstamm verglichen. Wenn dadurch die Expression typ-III-sezernerter Exotoxine herunterreguliert wird, sollte ein Defekt zu einem Anstieg von ExoS'-GFP führen.

Hierzu wurden die oben angeführten Stämme PAO1 (Wildtyp), PDO100 (*rhlI*), PAO-JP1 (*lasI*) und SS24 (*rpoS*) mit den Plasmiden pExoS'-GFP und pExoU'-GFP über zehn Stunden in Exotoxin-Stimulationsmedium (TSB mit Glycerin 1%, Nitriessigsäure 10mM und Natriumglutamat 100mM) kultiviert. Als Negativkontrolle

wurde der Stamm PAO1 mit dem Plasmid pKTGFP mitgeführt, die bei allen Messungen keine nennenswerte *gfp*-Expression zeigte. Alle zwei Stunden wurden Proben entnommen, die Optische Dichte im Photometer und die GFP-Fluoreszenz im Durchflußzytometer gemessen.

3.2.1 *exoS'*-*gfp*-Expression

Zusätzlich wurden hier noch die Doppelmutanten PAO-JP2 (*lasI*, *rhlI*) und PAO-JP3 (*lasR*, *rhlR*) verwendet, bei denen die beiden Autoinducer-Synthetasen (PAO-JP2), beziehungsweise die beiden Regulatoren (PAO-JP3) defekt sind. Auch diese enthielten hierzu das Plasmid pExoS'-GFP. Bei den Messungen vom Beginn der Wachstumsphase (OD₆₀₀ ~0,1) bis in die stationäre Phase hinein (OD₆₀₀ ~2,2) ergaben sich die in Tabelle 3.2.1 dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen aus je zwei unabhängigen Reihen.

Tabelle 3.2.1: Messung der ExoS'-GFP-Synthese bei Defekten im Quorum Sensing und in *rpoS* im Durchflußzytometer bei Kultur im Exotoxin-Stimulationsmedium: Mittelwerte und Standardabweichungen zweier Meßreihen, Graphische Auswertung in Abbildungen 3.2 und 3.3.

Kulturdauer	0h			2h			4h			6h			8h			10h		
Meßwert	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ
Stamm																		
PAO1 [p <i>gfp</i>]	0,10	0,49	0,00	0,10	0,60	0,01	1,16	0,58	0,00	1,72	0,61	0,05	2,06	0,61	0,02	2,31	0,65	0,01
PAO1 [pExoS'-GFP]	0,10	1,61	0,00	0,11	3,93	0,01	1,01	3,37	0,39	1,64	3,96	0,53	2,02	5,55	0,37	2,16	5,73	0,04
PDO100 [pExoS'-GFP]	0,10	3,36	0,00	0,53	2,99	0,37	1,54	4,55	0,49	1,94	7,93	0,14	2,13	9,89	0,41	2,25	9,81	0,70
PDO111 [pExoS'-GFP]	0,10	1,68	0,00	0,60	3,36	0,08	1,53	5,63	0,59	1,82	8,02	1,31	1,97	9,11	0,85	2,09	10,35	0,05
PAO-JP1 [pExoS'-GFP]	0,10	1,63	0,00	0,27	2,94	0,22	1,66	4,81	0,18	2,29	4,88	0,24	2,25	4,19	0,38	2,48	5,74	0,53
PAO-JP2 [pExoS'-GFP]	0,10	2,63	0,00	0,35	1,49	0,08	1,49	1,61	0,05	1,88	2,14	0,26	2,06	2,77	0,02	2,21	2,48	0,02
PAO-JP3 [pExoS'-GFP]	0,10	5,99	0,00	0,20	6,49	0,77	0,80	4,93	0,96	1,59	5,84	1,00	1,90	7,10	1,26	2,10	8,26	1,20
SS24 [pExoS'-GFP]	0,10	2,11	0,00	0,09	2,60	0,53	0,87	7,55	0,11	1,74	14,65	0,25	1,99	19,45	0,65	2,20	27,65	1,65
Mittlere OD gesamt	0,10			0,28			1,26			1,83			2,05			2,23		
σ	0,00			0,18			0,32			0,21			0,10			0,12		

Die Unterschiede in der *exoS'*-*gfp*-Expression zwischen Wildtyp und den Defektmutanten im Quorum Sensing beziehungsweise der *rpoS*-Mutante zeigen die

Abbildungen 3.2 und 3.3. Die Unterschiede zu PAO1 waren signifikant bei PDO100 ($p=0,0384$), PDO111 ($p=0,0456$), PAO-JP2 ($p=0,0308$) und PAO-JP3 ($p=0,0026$), nicht aber für PAO-JP1 ($p=0,9899$).

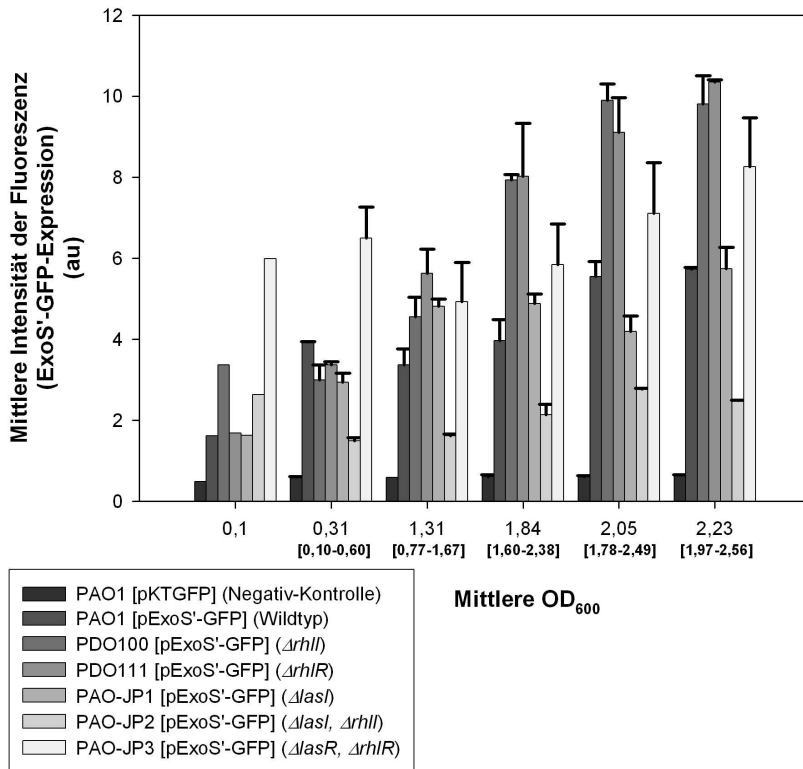


Abbildung 3.2: *exoS'*-gfp-Expression in PAO1 und verschiedenen Mutanten im Quorum Sensing. PDO100 (*rhII*) und PDO111 (*rhIR*) erzeugen signifikant mehr *ExoS'*-GFP als PAO1 (Wildtyp), ebenso PAO-JP3 (*rhIR, lasR*). PAO-JP2 (*rhII, lasI*) zeigt deutlich geringere Fluoreszenz. PAO-JP1 (*lasI*) unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. PAO1 [pKTGFP] zeigte als Negativkontrolle keine gfp-Expression.

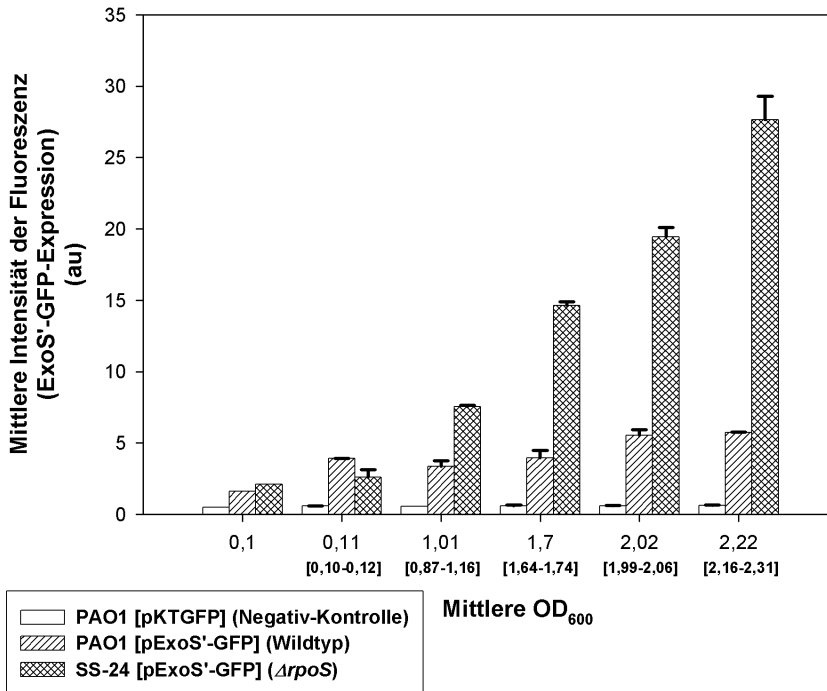


Abbildung 3.3: Der *rpoS*-Defekt bei SS24 führt zu deutlich stärkerer *exoS'*-*gfp*-Expression als beim Wildtyp. ($p=0,0702$).

Aus den Diagrammen zeigt sich, daß beim Wildtypstamm PAO1 die *exoS'*-*gfp*-Expression mit der Inkubationsdauer, beziehungsweise der Wachstumsdichte der Kultur, bis zur stationären Phase ($OD_{600}>2$) zunimmt. In gleichem Ausmaß steigt die *exoS'*-*gfp*-Expression der *lasI*-Mutante PAO-JP1 ohne signifikanten Unterschied dazu. Eine *lasI-rhlI*-Doppelmutante (PAO-JP2) zeigt hingegen keinen Anstieg, sondern exprimiert unabhängig von der Wachstumsdichte nur geringe

Mengen an ExoS'-GFP. Eine Mutation in *rhlI* (PDO100) oder in *rhlR* alleine (PDO111) sowie in *rhlR* in Verbindung mit einer Mutation im *lasR*-Gen (PAO-JP3) führt hingegen zu einer signifikant stärkeren *exoS'*-*gfp*-Expression als beim Wildtyp. Auch die *rpoS*-Mutante zeigt eine weit höhere Expression des *exoS*-Genes im Vergleich zum Wildtypstamm. Daraus läßt sich folgern, daß sowohl das *rhl*-System, als auch RpoS einen Einfluß auf die Expression von *exoS* ausüben.

3.2.2 Expression von *exoU'*-*gfp*

Um zu überprüfen, ob das *rhl*-System ebenso einen Einfluß auf die Expression von *exoU* hat, wurden der Wildtyp PAO1, die *rhlI*-Mutante PDO100 und die *lasI*-Mutante PAO-JP1 im Stimulationsmedium über zehn Stunden inkubiert. Hier wurden nach fünf und zehn Stunden Proben entnommen. Alle drei Stämme trugen hierbei das Plasmid pExoU'-GFP. Als Negativkontrolle wurde wiederum PAO1 [pKTGFP] mitgeführt. Diese zeigte keine Expression von GFP. Die Mittelwerte und Standardabweichungen zweier Meßreihen zeigt Tabelle 3.2.2. Abbildung 3.4 enthält das dazugehörige Histogramm.

Tabelle 3.2.2: Messung der *exoU'*-*gfp*-Expression bei Defekten im Quorum Sensing im Durchflußzytometer, graphische Darstellung in Abbildung 3.5.

Kulturdauer	0h			5h			10h		
	—	-		—	-		—	-	
Meßwert	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ
Stamm									
PAO1 pExoU'-GFP	0,10	1,20	0,00	1,77	5,08	0,11	2,47	1,48	0,06
PDO100 pExoU'-GFP	0,10	1,25	0,00	0,88	13,2 5	1,65	2,33	4,53	0,98
PAO-JP1 pExoU'-GFP	0,10	1,25	0,00	1,29	4,33	0,25	2,40	3,84	1,56
Mittlere OD ges.	0,10			1,31			2,40		
σ	0,00			0,37			0,06		

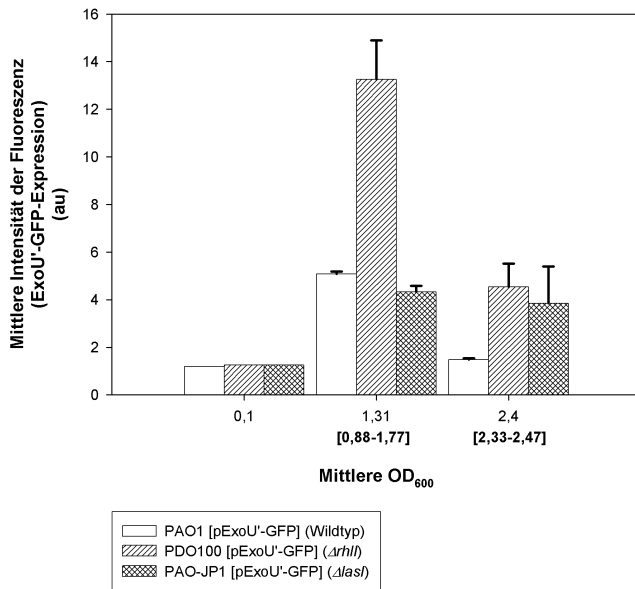


Abbildung 3.4 *exoU-gfp*-Expression und Quorum Sensing: PDO100 (*rhII*) exprimiert signifikant ($p=0,024$) mehr ExoU-GFP als PAO1 und PAO-JP1 (*lasI*). Die *exoU*-Expression aller drei Stämme nimmt in der exponentiellen Phase zu und fällt dann in der stationären Phase wieder ab. Eine Mutation im *lasI*-Gen führt wiederum zu keinem signifikanten Unterschieden. Eine Mutation im *rhII*-Gen führt dagegen auch hier zu signifikant höheren Expressions-Werten als beim Wildtyp ($p=0,024$). Dies bestätigt den negativ regulierenden Einfluß des *rhl*-Systemes auf die Expression der Exotoxine des Typ-III-Sekretionsapparates von *P. aeruginosa*.

3.2.3 Expression nach Substitution der Homoserinolactone

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Veränderungen durch die verminderte Produktion der Autoinducer zustande kommen, wurden diese zum Wildtyp und den Stämmen mit defekten Autoinducer-Synthetasen hinzugegeben. PAO1 als Wildtyp, PDO100 (*rhII*) und PAO-JP1 (*lasI*) mit dem Plasmid pExoS²-GFP sowie

PAO1 [pKTGFP] (NK) wurden zunächst drei Stunden in Stimulationsmedium inkubiert. Dann wurde die ExoS'-GFP-Synthese im Durchflußzytometer gemessen. Bei Zugabe der Homoserinolactone wurde erneut gemessen (0h), ebenso drei und sechs Stunden nach der Zugabe (Tabelle 3.2.3). Der Vergleich bestätigt zunächst die in den vorhergehenden Versuchen beobachtete Steigerung der ExoS'-GFP-Bildung in PDO100 gegenüber dem Wildtyp. Die Zugabe von BHL, führt bei allen Stämmen mit Ausnahme der Negativ-Kontrolle zu einer deutlichen Verminderung der *exoS'-gfp*-Expression nach drei Stunden. Diese ist bei PDO100 auch noch nach sechs Stunden sichtbar, bei PAO1 leicht vermindert, bei PAO-JP1 aufgehoben. Auffälligerweise führt auch die Zugabe von OdDHL zu einem leichten Rückgang von ExoS'-GFP. Vergleicht man nun die Werte nach drei und sechs Stunden nach Zugabe von BHL mit den Werten nach Zugabe von OdDHL zeigt sich lediglich bei PDO100 ein hochsignifikanter Unterschied im Sinne einer stärkeren Hemmung der Produktion von ExoS'-GFP durch BHL (Student'scher T-Test: $p=0,004$). Bei PAO1 und PAO-JP1 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Homoserinolaktone (PAO1: $p=0,38$; PAO-JP1 $p=0,29$). Abbildung 3.5 verdeutlicht die Auswirkungen der Substitution zum Zeitpunkt der stärksten Ausprägung der Unterschiede zwischen Kultur mit und ohne Autoinducer, drei Stunden nach Zugabe. Abbildung 3.6 zeigt die Situation weitere drei Stunden später. Hier besteht nur noch bei PDO100 (*rhlI*) ein deutlicher Unterschied zum Wildtyp.

Hieraus läßt sich schließen, daß das hinzugegebene BHL die fehlende Produktion bei PDO100 ersetzt und zu einer deutlichen Reduktion der ExoS'-GFP-Produktion führt. Möglicherweise wird die Hemmung der ExoS'-GFP-Produktion durch das *rhl*-System, das bei PAO1 und PAO-JP1 intakt ist, sowohl durch BHL als auch

durch OdDHL verstärkt. Die Reduktion der ExoS'-GFP-Produktion durch OdDHL bei PDO100 läßt aber auch einen unspezifischen Effekt vermuten.

Tabelle 3.2.3: Substitution der Autoinducer und Quorum Sensing, gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Meßreihen: Zum Zeitpunkt 0h wurden die Autoinducer BHL und OdDHL zugegeben. Abbildung 3.5 zeigt eine graphische Darstellung der Messung drei Stunden später, Abbildung 3.6 sechs Stunden später.

Kulturdauer	-3h		0h		3h		6h	
	F	σ	F	σ	F	σ	F	σ
Stamm								
PAO1 pgfp	0,79	0,00	0,77	0,03	0,76	0,00	0,65	0,01
PAO1 pgfp + BHL					0,78	0,01	0,66	0,00
PAO1 pgfp + OdDHL					0,82	0,06	0,66	0,00
PAO1 pExoS'-GFP	1,48	0,00	6,50	0,04	9,43	0,06	10,35	0,25
PAO1 pExoS'-GFP + BHL					6,85	0,14	8,55	0,07
PAO1 pExoS'-GFP+ OdDHL					6,65	0,05	9,35	0,15
PDO100 pExoS'-GFP	2,62	0,00	10,51	0,89	14,00	0,80	16,55	0,05
PDO100 pExoS'-GFP + BHL					10,65	0,55	7,69	0,32
PDO100 pExoS'-GFP + OdDHL					12,35	0,05	13,65	0,22
PAO-JP1 pExoS'-GFP	2,90	0,00	6,80	0,03	10,55	0,15	9,37	0,15
PAO-JP1 pExoS'-GFP + BHL					5,55	0,07	9,43	0,26
PAO-JP1 pExoS'-GFP + OdDHL					5,37	0,02	10,65	0,15

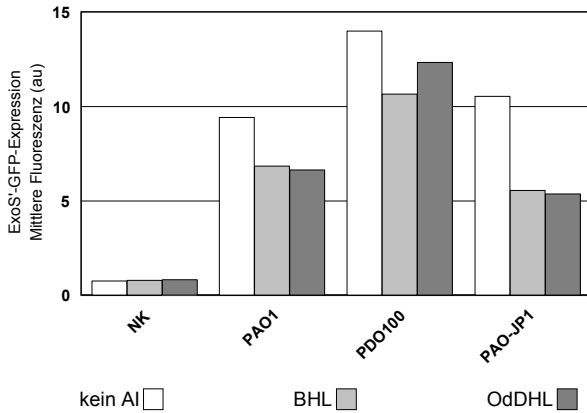


Abbildung 3.5 Messung drei Stunden nach Substitution der Autoinducer: Zu PAO1 (Wildtyp), PDO100 (*rhl*) und PAO-JP1 (*las*), jeweils mit dem Plasmid pExoS'-GFP wurden die Autoinducer BHL (*rhl*) und OdDHL (*las*) gegeben. Im Vergleich zu den Kulturen ohne Zugabe (kein AI) führt dies bei allen Stämmen zu einer deutlich geringeren ExoS'-GFP-Synthese. Der Unterschied zwischen Zugabe von BHL und OdDHL ist bei PDO100 am stärksten. Negativkontrolle: PAO1[pKTGFP]

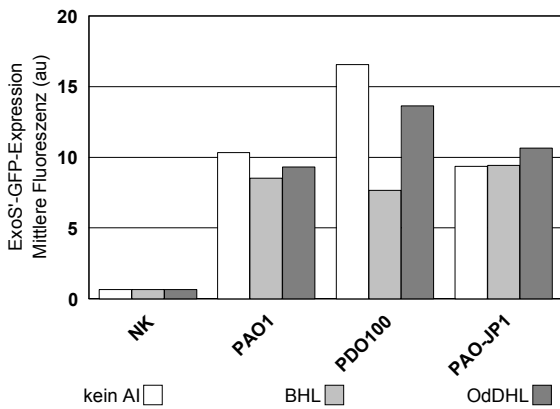


Abbildung 3.6 Messung sechs Stunden nach Substitution der Autoinducer. Der Effekt auf die Zugabe von BHL ist noch sichtbar, der auf die Zugabe von OdDHL fast aufgehoben.

Entsprechend wurde versucht, den Effekt der Zugabe der Autoinducer von *P. aeruginosa* auf die *rpoS*-Mutante SS24 zu bestimmen. (Tabelle 3.2.4, Abbildung 3.7) Auch hier zeigte sich eine verminderte *exoS'*-*gfp*-Expression nach Zugabe der beiden Autoinducer, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen BHL und OdDHL ($p=0,29$). Es war jedoch unter diesen Kulturbedingungen (Kultur in 1ml Epicups) nicht möglich, gleich hohe Expressionswerte wie bei größeren Kulturvolumina zu erzielen. Ein größeres Kulturvolumen war aufgrund der dann benötigten Mengen Autoinducer nicht möglich. Die Aussagekraft ist daher eingeschränkt.

Tabelle 3.2.4: Substitution der Autoinducer und RpoS

Kulturdauer	-3h		0h		3h		6h	
	– F	σ	– F	σ	– F	σ	– F	σ
Stamm								
PAO1 pExoS'-GFP	2,25	0,00	2,88	0,10	2,81	0,20	2,65	0,24
PAO1 pExoS'-GFP + BHL					2,61	0,27	2,11	0,03
PAO1 pExoS'-GFP + OdDHL					2,82	0,40	2,19	0,04
SS24 pExoS'-GFP	4,22	0,00	4,25	0,15	3,23	0,01	5,14	0,08
SS24 pExoS'-GFP + BHL					3,12	0,15	3,91	0,03
SS24 pExoS'-GFP + OdDHL					3,68	0,09	4,09	0,02

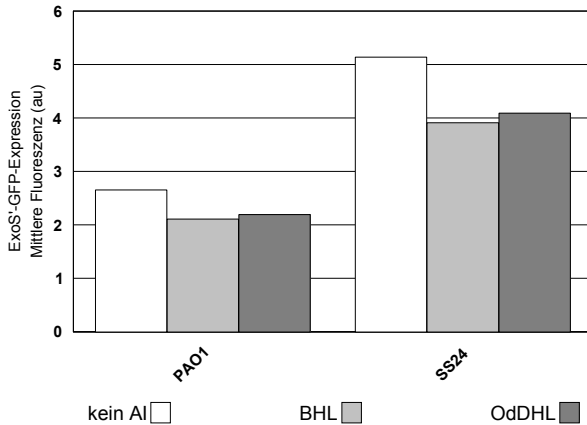


Abbildung 3.7 Messung sechs Stunden nach Substitution der Autoinducer. Auch bei SS24 (*rpoS*) ist eine verminderte Expression auf die Zugabe von BHL und OdDHL sichtbar. Die Aussagekraft ist jedoch eingeschränkt, da hier nicht entsprechend hohe Expressionswerte wie in größeren Kulturvolumina erreicht werden konnten.

3.3 *exoS'-gfp*-Expression in *P. aeruginosa* im Kokultiv-Versuch mit der humanen Zelllinie HeLa

Kontakt zu eukaryonten Zellen stellt wohl den physiologischen Stimulus für Typ-III-Sekretion dar. Die oben beobachteten Expressionsunterschiede wurden deshalb in einem Infektionsmodell in Kokultur mit humanen Zellen der Reihe HeLa verglichen. Die Bakterien enthielten dabei wiederum das Reporterplasmid pExoS'GFP. Die folgenden Bilder wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop nach zwölf Stunden Kultur mit einer MOI von 1:10 angefertigt. Das erste Bild jeder Reihe (Abbildung 3.8, Reihe A) ist eine Aufnahme der Rot-Grün-Fluoreszenz und zeigt rote, mit Phalloidin-TRITC gefärbte HeLa-Zellen und grüne, GFP produzierende Bakterien. Das zweite (Abbildung 3.8, Reihe B) stellt jeweils die

Intensität der Grün-Fluoreszenz der Bakterien im Falschfarbenbild (Clut) dar. Niedrige Intensität wird hierbei blau, ansteigende grün bis rot und hohe Intensität weiß dargestellt. Das letzte Bild jeder Reihe zeigt die Intensität der Grün-Fluoreszenz in Graustufen. (Abbildung 3.8, Reihe C). Starke Expression von *exoS* wird durch Kontakt mit den eukaryonten Zellen ausgelöst. So ist hier auch zu erkennen, daß Bakterien, die viel GFP produzieren, vor allem um die Zellen herum angeordnet sind. Ebenso zeigt sich, daß alle vier Stämme ExoS bilden.

Es gibt jedoch Unterschiede in der Intensität der Expression und in der Dichte der exprimierenden Bakterien. PDO100 (*rhlI*) und SS24 (*rpoS*) übertreffen beide PAO-JP1 (*lasI*) und den Wildtypstamm PAO1. Bei inaktiviertem *rhlI* (Stamm PDO100) kommt es also, wie zuvor schon gesehen, zu erhöhter Expression von *exoS'-gfp* im Vergleich zum Wildtyp. Gleiches gilt für ein defektes *rpoS*-Gen. Dagegen zeigt die *lasI*-Mutante eine ähnlich hohe *exoS'-gfp*-Expression wie der Wildtyp PAO1-Stamm.

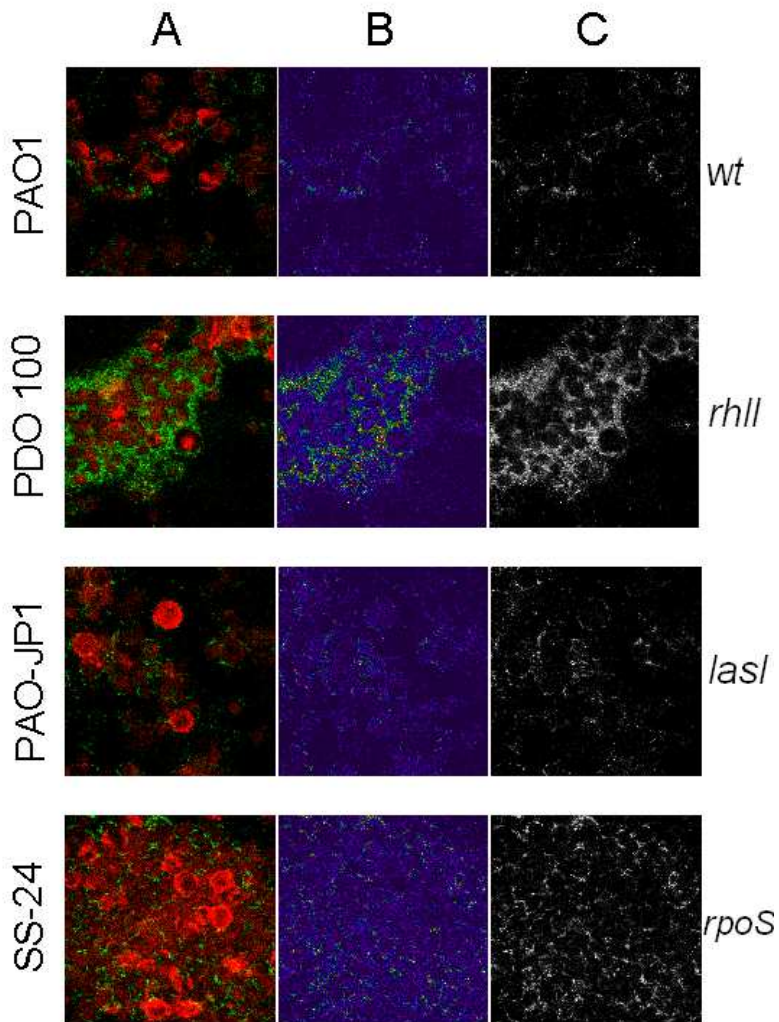


Abbildung 3.8: HeLa-Zellen und PAO1, PDO100 (*rhII*), PAO-JP1 (*lasI*) oder SS24 (*rpoS*) in Kokultur. A: Rot-Grün-Fluoreszenz (rot: HeLa-Zellen (Phalloidin-TRITC); grün: Bakterien mit ExoS'-GFP), B: ExoS'-GFP in Farbstufen (dunkelblau keine, grün starke Expression), C: ExoS'-GFP (Graustufen). PDO100 und SS24 bilden erheblich mehr ExoS'-GFP als PAO1 und PAO-JP1.

3.4 Nachweis von *exoS*-mRNA und ExoS unter Stimulationsbedingungen

Nun sollte auch überprüft werden, ob zum einen die Messung von ExoS²-GFP mit der Menge an tatsächlich exprimierten ExoS korreliert und zum anderen, ob die bisher gefundenen Regulationsmechanismen prä- oder posttranskriptionell eingreifen. Die Stämme PAO1, SS24 (*rpoS*), PDO100 (*rhlI*) und PAO-JP1 (*lasI*) wurden dafür über zehn Stunden in Stimulationsmedium zur ExoS-Produktion angeregt. Anschließend wurden Proben für Protein- und RNA-Präparationen genommen.

3.4.1 Vergleich der ExoS-Synthese im Western-Blot

Für die Proteinaufschlüsse wurden durch Überprüfung der OD₆₀₀ und entsprechende Verdünnung der Proben annähernd gleiche Bakterienzahlen von allen Stämmen verwendet. Abbildung 3.9-A stellt ein Acrylamidgel nach Coomassie-Färbung dar, bei dem je 10µl Proteinaufschluß eingesetzt wurden. Es zeigen sich vergleichbare Proteinmengen. Anschließend wurde mit diesem Gel ein Western-Blot mit einem Anti-ExoS-Antikörper durchgeführt. (Abbildung 3.9-B): Die Stämme PDO100 und SS24 zeigen den höchsten ExoS-Anteil an der Gesamtproteinmenge. Die *rhlI*- und die *rpoS*-Mutante erzeugen also, wie nach den Versuchen mit dem GFP-Reporter gezeigt, deutlich mehr ExoS als der Wildtyp und die *lasI*-Mutante. Der Vergleich zwischen Wildtyp und Wildtyp mit dem Plasmid pExoS²-GFP zeigt hingegen keinen größeren Unterschied im Protein-Expressionsmuster. Im Western-Blot sind hier ExoS und ExoS²-GFP als Doppelbande sichtbar. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen sind also übertragbar

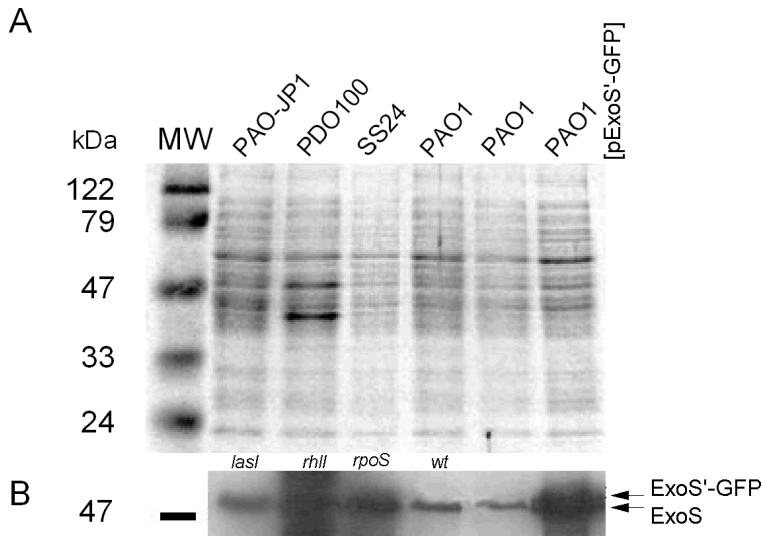


Abbildung 3.9: ExoS-Western-Blot:

A: Vergleich von je 10 μ l Proteinaufschluß nach Auftrennung im Polyacrylamid-SDS-Gel und Coomassie-Färbung - annähernd gleiche Gesamt-Protein-Mengen

B: Western-Blot mit Anti-ExoS-Antikörper. PDO100 (*rhII*) und SS24 (*rpoS*) erzeugen deutlich mehr ExoS als PAO1 (Wildtyp) oder PAO-JP1 (*lasI*). Das pExoS'-GFP-Plasmid verändert die *exoS*-Expression nur unwesentlich. ExoS'-GFP zeigt sich aufgrund höherer Molekülgröße als weitere Bande oberhalb von ExoS.

3.4.2 Vergleich der *exoS*-mRNA mittels Northern-Blot

Abbildung 3.10-A zeigt je 10 μ g Gesamt-RNA von jedem der oben erwähnten Stämme, die in einem 1%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Im Vergleich zeigen sich annähernd gleiche Mengen an aufgetrennter RNA. Von diesen Präparationen wurden erneut 5 μ g aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und dann die *exoS*-mRNA mittels einer spezifischen, DIG-UTP-markierten Sonde

detektiert (Abbildung 3.10-B). Der *exoS*-mRNA-Gehalt von PDO100, der *rhlI*-Mutante ist deutlich größer als der von PAO1. Ebenso ist der *exoS*-mRNA-Gehalt der *rpoS*-Mutante SS24 höher als der des Wildtyps. Die *lasI*-Mutante zeigt hier wenig mehr *exoS*-mRNA als der Wildtyp. Die Übereinstimmung zwischen Fluoreszenzmessungen, Western-Blot und Northern-Blot spricht für eine prätranskriptionelle Regulation durch das *rhl*-System und durch RpoS.

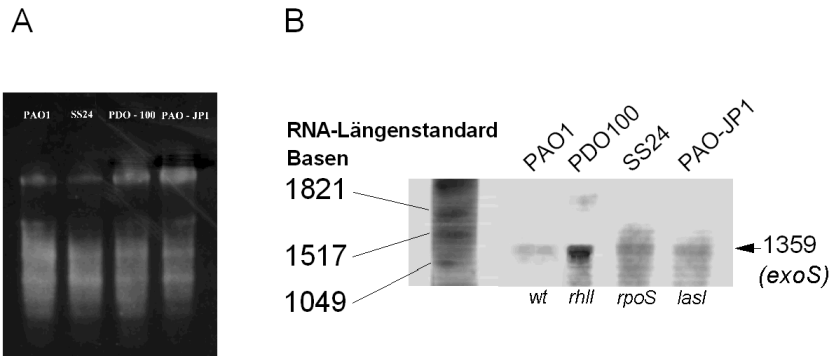


Abbildung 3.10: *exoS*-Northern-Blot:

A: Vergleich von je 10µg elektrophoretisch aufgetrennter und mit Ethidiumbromid gefärbter Gesamt-RNA zeigt annähernd gleiche Gesamt-RNA-Mengen.

B: Northern-Blot mit *exoS*-spezifischer, DIG-UTP-markierter Sonde. PDO100 (*rhlI*) und SS24 (*rpoS*) bilden deutlich mehr *exoS*-mRNA als PAO1 (Wildtyp) oder PAO-JP1 (*lasI*).

3.5 Mutagenese des *mucA*-Genes

AlgU reguliert als Sigmafaktor die Produktion von Alginat. Die Mutation seines Antisigmafaktors MucA führt zu einer Überproduktion des Exopolysaccharides von *P. aeruginosa*. Der Zeitpunkt der Erstisolation derartiger Stämme aus den

Atemwegen von Patienten mit Cystischer Fibrose ist mit der Chronifizierung der Infektion und einer klinischen Verschlechterung assoziiert. Gleichzeitig erscheint die Expression eines Typ-III-Sekretionsapparates bei einer Einbettung des Bakteriums in eine Matrix aus Alginat nicht sinnvoll. Es sollte deshalb untersucht werden, ob AlgU und MucA auch einen Einfluß auf die Expression des ExoS-Regulons haben. Hierzu wurde eine Mutation in das *mucA*-Gen von *P. aeruginosa* eingeführt und damit ein definierter Stamm mit mucoidem Phänotyp, das heißt mit einer konstitutiven Überexpression von Alginat erzeugt. Zuerst wurde das *mucA*-Gen kloniert, 105bp aus dem mittleren Bereich in frame deletiert und anschließend das defekte Gen *mucA'* durch doppelt homologe Rekombination im Austausch gegen das intakte Gen in das Chromosom von PAO1 und PAK integriert. (Übersicht Abbildung 3.11)

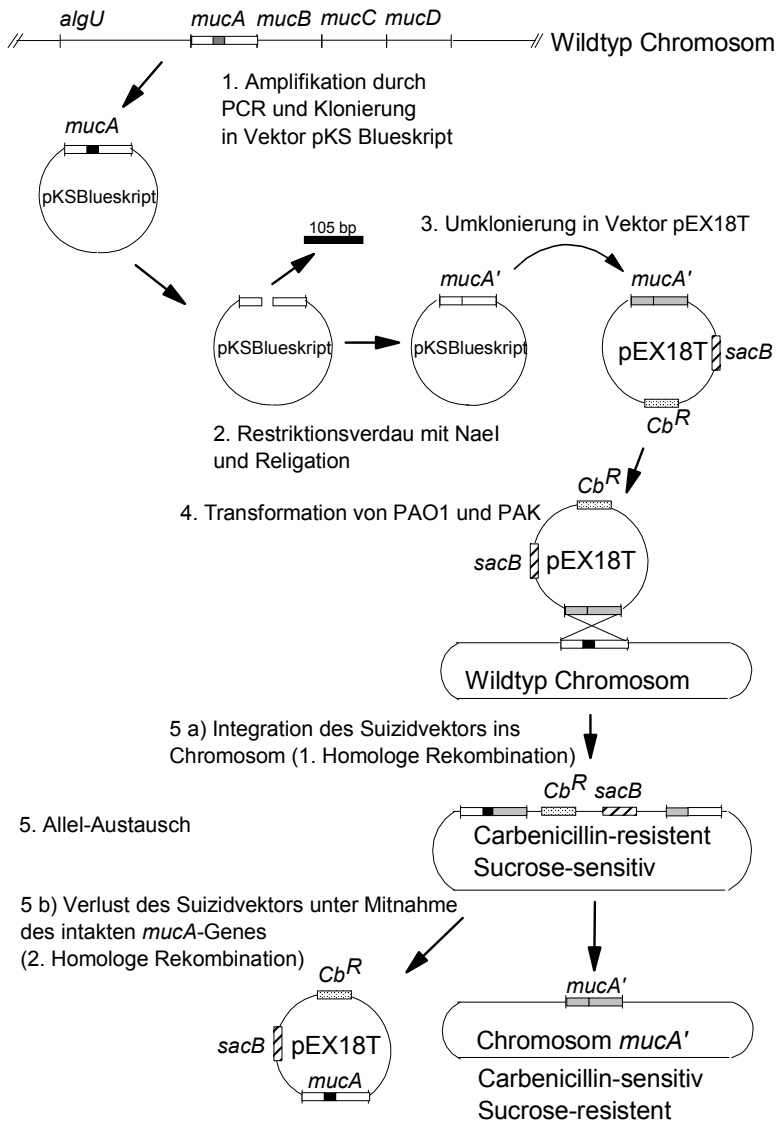


Abbildung 3.11: Mutagenese des *mucA*-Genes: *mucA* von PAO1 wurde mit PCR kloniert und 105 bp mittels Restriktionsverdau (*NaeI*) ausgeschnitten. Nach Transformation von PAO1 und PAK und doppelt homologer Rekombination enthalten die Mutanten das defekte *mucA'*.

3.5.1 Klonierung des *mucA*-Genes

Das *mucA*-Gen von *P. aeruginosa* PAO1 wurde mit den Primern *fmucA-BamHI* und *rmucA-HindIII* mittels PCR in den Vektor pBlueskriptKS II(+) kloniert. Mit dem dabei entstandenen Vektor pMR1 wurde dann *E. coli* DH5a' transformiert.

3.5.2 Einführung einer Deletion in das klonierte *mucA*-Gen

Nach Präparation und Restriktionsverdau von pMR1 mit dem Enzym NaeI wurden 105bp des Genes *mucA* zwischen den Basen 369 bis 474 herausgeschnitten. Die beiden Fragmente wurden über Agar-Gel-Elektrophorese getrennt und das größere, das Vektor und 5'- und 3'-Ende von *mucA* enthält, aufgereinigt und ligiert. Das Ligationsprodukt pMR2 enthält das deletierte Gen *mucA'*. Die Deletion von 35 Triplets wurde durch die Größendifferenz des PCR-Produktes zum Wildtyp überprüft. Das deletierte *mucA*-Gen (*mucA'*) wurde dann mit den Primern *fmucA-EcoRI* und *rmucA-EcoRI* amplifiziert. Über die EcoRI-Restriktions-Schnittstelle wurde dann das *mucA'*-Gen in den Suizidvektor pEX18T kloniert (Ergebnis: pMR3).

3.5.3 Konjugation von pMR3 in *P. aeruginosa*

Anschließend wurde der Suizidvektor pMR3 in die Stämme PAO1 und PAK konjugiert. Zur Überprüfung der ersten Homologen Rekombination und damit der Integration des Vektors in das Chromosom wurde auf Carbenicillin-Resistenz selektiert. Die resistenten Klone wurden zur Selektion auf die zweite Homologe Rekombination, das heißt den Verlust des Plasmides unter Mitnahme des intakten Genes *mucA* auf Sucrose-Agar ausplattiert. Da der Vektor das *sacB*-Gen von *Bacillus subtilis* enthält, können sich Bakterien, die den Vektor noch enthalten nicht auf Sucrose enthaltenden Nährböden vermehren. Die sucrose-resistenten

Klone wurden dann mit PCR mit den Primern *fmucA* und *rmucA* überprüft. Einige zeigten dabei ein kleineres PCR-Produkt als der Wildtyp, entsprechend dem kleineren defekten Gen *mucA'*. Abbildung 3.12 zeigt diesen Unterschied. Der mucoide Phänotyp wurde anschließend auf MM-Agar überprüft. (Abbildung 3.13)

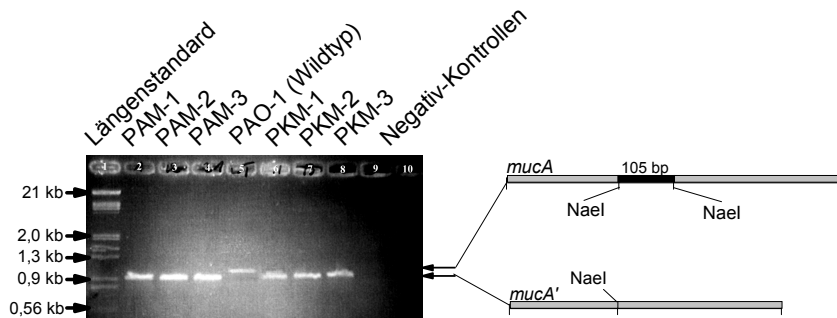


Abbildung 3.12: Im Vergleich zum *mucA* des Wildtypes zeigt sich beim *mucA'* der Mutanten (PAM-1 bis -3 und PKM-1 bis -3) die Größendifferenz von 105bp in der PCR.



Abbildung 3.13: Mucoider Phänotyp: Im linken oberen Drittel der MM-Agarplatte zeigt der Stamm mit deletiertem *mucA* eine Überproduktion von Mukopolysacchariden. Im unteren Drittel zum Vergleich der Wildtyp PAO1. Zwischen diesem und der mit *mucA* aus der PAO1-Genbank komplementierten Mutante im rechten oberen Drittel läßt sich kein Unterschied im Phänotyp ersehen.

3.5.4 Komplementierung der *mucA*-Mutanten

Um zu überprüfen, ob der neue, mucoiden Phänotyp auf die Deletion in *mucA* zurückzuführen ist, wurden die Mutanten mit dem intakten Wildtyp-Gen komplementiert. Hierzu wurde zunächst eine *P. aeruginosa* PAO1 Genbank in *E. coli* XL1-Blue durch Kolonie-Hybridisierung mit einer *mucA*-DNA-Sonde auf das Vorhandensein des *mucA*-Genes untersucht. Die Sonde wurde mit den Primern *fmucAS* und *rmucAS* und Digoxigenin-markiertem UTP erzeugt. Als Positivkontrolle wurde *P. aeruginosa* PAO1, als Negativkontrolle *E. coli* XL1-Blue mitgeführt. Die Klone PA18G11, PA19B5 und PA19D12 wurden aus der Bank isoliert und das Hybridisierungsergebnis mittels PCR bestätigt. Das Genbankplasmid von

PA18G11 wurde präpariert und in den Stamm PAM-1 elektroporiert. Die Mutante zeigte keinen mucoiden Phänotyp mehr und wurde somit erfolgreich rekomblementiert. (Abbildung 3.13)

3.5.5 Einfluß des Antisigmafaktors MucA auf die Expression von *exoS*

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung des *mucA*-Genes einen Einfluß auf die Expression von *exoS* hat, wurde der Wildtyp von PAO1 mit seiner *mucA*-Mutante PAM-1 beim Wachstum im Stimulationsmedium verglichen. Hierzu wurden Standardkulturen der beiden Stämme mit dem Plasmid pExoS'-gfp in Stimulationsmedium über zehn Stunden inkubiert und alle zwei Stunden im FACS die mittlere Fluoreszenz bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Messungen finden sich in Tabelle 3.5.1. Es zeigt sich, daß PAM-1 zunächst ähnliche Mengen an ExoS'-GFP erzeugt, wie der Wildtyp. Im Verlauf nimmt die ExoS'-GFP-Produktion bei PAM-1 exponentiell zu während bei PAO1 die Expression in der stationären Phase zunächst stagniert und dann wieder leicht abfällt. Dies ist auch im Histogramm in Abbildung 3.14 zu erkennen.

Tabelle 3.5.1: Vergleich von PAO1 und PAM-1: PAM-1 übertrifft die *exoS*-Expression von PAO1 in der stationären Phase.

Zeit	0h			2h			4h			6h			8h			10h		
	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ	OD	F	σ
Stamm																		
PAO1	0,10	2,25	0,00	0,43	3,95	0,41	2,13	8,53	1,58	2,35	12,90	1,10	2,50	14,10	2,00	2,47	9,58	0,17
PAM-1	0,10	1,52	0,00	0,27	2,80	0,01	1,83	6,36	0,16	2,27	12,85	0,55	2,47	19,15	0,25	2,57	24,55	2,25
Mittlere OD ges.	0,10			0,35			1,98			2,31			2,48			2,52		
σ	0,00			0,08			0,15			0,04			0,01			0,05		

Ein Effekt zeigt sich also erst in der stationären Phase. Dies ist wahrscheinlich mit dem Beginn der Expression von AlgU als alternativer Sigmafaktor bei Nährstoffmangel assoziiert. Eine Defekt von *mucA* führt demnach zu einer erhöhten Expression von Typ-III-sezernierten Exotoxinen unter ungünstigen Umweltbedingungen.

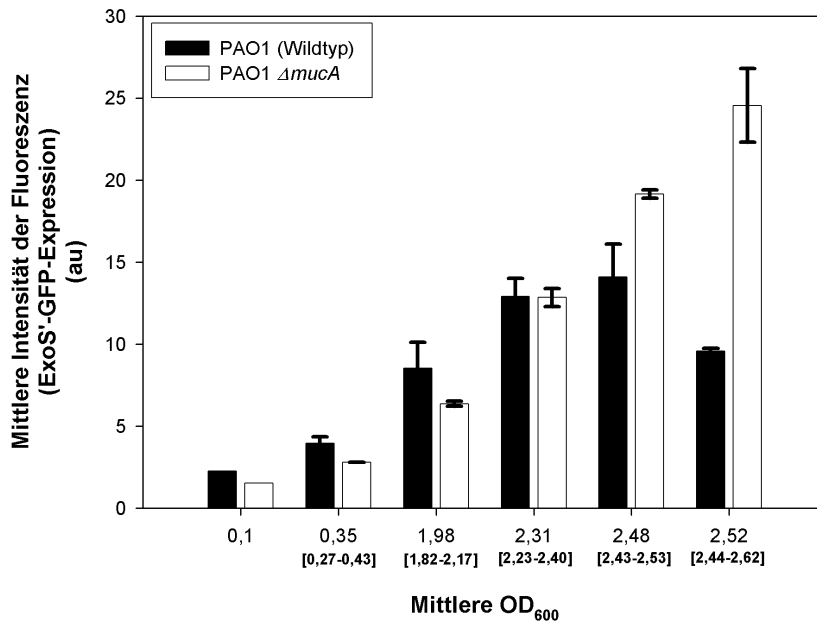


Abbildung 3.14: Vergleich der *exoS'-gfp*-Expression von Wildtyp (PAO1) und *mucA*-Mutante (PAM-1). PAM-1 bildet in der exponentiellen Phase mäßig weniger, in der stationären Phase deutlich mehr ExoS'-GFP.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von verschiedenen Regulationsmechanismen auf die Expression des Typ-III-Sekretionssystemes (ExoS-Regulon) von *Pseudomonas aeruginosa* untersucht werden. Bekannt ist, daß durch die beiden Quorum-Sensing-Systeme (*las*, *rhl*), RpoS und den Antisigmafaktor MucA andere Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel Biofilmbildung und Alginateproduktion, reguliert werden. Deshalb wurde ihre Wirkung auf die Expression typ-III-abhängiger Exotoxine (ExoS, ExoU) als Vertreter des ExoS-Regulon getestet.

Zur quantitativen Bestimmung der Expression der Exotoxine wurden translationelle Fusionen von *exoS* und *exoU* mit *gfp* verwendet. Bei Stimulation der Typ-III-Sekretion (Ca²⁺-Depletion) kommt es somit zur Koexpression von Fusionsproteinen (ExoS'-GFP, ExoU'-GFP). Dies ermöglicht mittels Fluoreszenzmessung die Expression von *exoS* und *exoU* auf der Ebene einzelner Bakterienzellen zu messen.

Beim Typstamm von *P. aeruginosa* (PAO1) zeigte sich auf diese Weise, daß Bakterien in einem Biofilm nur geringe Mengen ExoS exprimieren, während im Kulturüberstand darüber planktonisch wachsende Bakterien viel ExoS synthetisieren. Für die weiteren Experimente wurden Defektmutanten von *P. aeruginosa* im *las*- und *rhl*-Quorum-Sensing-System und in *rpoS* verwendet. Zusätzlich wurde durch homologe Rekombination eine Mutation in *mucA* erzeugt. Durch die Übertragung des Reporter-Systemes in diese Defektmutanten konnte ein reprimierender Einfluß durch das *rhl*-System, den Sigmafaktor der stationären Phase RpoS und den Antisigmafaktor MucA unter Stimulation gezeigt werden, während Mutationen im *las*-System keine signifikante Änderung der Expression von *exoS* und *exoU* verursachten. Die durch Fluoreszenzmessung erhobenen Daten für den

Wildtyp und für die Mutanten mit Defekt im *rhl*-System und in *rpoS* stimmten qualitativ mit der Menge von ExoS, die parallel im Western-Blot gemessen wurde, überein. Im Northern-Blot konnte gezeigt werden, daß die Menge an *exoS*-mRNA der jeweils nachgewiesenen Menge an Exotoxin ebenfalls entspricht. In Kokultur mit humanen Zellen (HeLa) war bei defektem *rhlI* und *rpoS* auch eine gesteigerte Expression von *exoS* zu sehen.

4.1 Methodik

Die Daten basieren auf der Messung der Fluoreszenz von GFP. Dieses wird in translationeller Fusion mit den Exotoxinen ExoS und ExoU in Abhängigkeit von deren Promotoren exprimiert. Im Verlauf des Wachstums korreliert die Menge an GFP-Fusionsprotein signifikant mit dem Fluoreszenzsignal und stellt somit ein valides Maß für die Exotoxinproduktion dar (*Hornef et al.; 2000*). Dabei sind jedoch Störfaktoren denkbar.

So erzeugt *P. aeruginosa* Chromophoren wie Pyocyanin und Pyoverdin, die die Fluoreszenzmessung von GFP verfälschen könnten. Zusätzlich werden diese von den einzelnen Defektmutanten in unterschiedlichem Ausmaß produziert. Um die Chromophoren zu entfernen und dadurch den Fehler so gering wie möglich zu halten, wurden die Bakterien vor der Fluoreszenzmessung mit PBS gewaschen. Dadurch wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse tatsächlich gesteigert.

Die Reporterfusionen befinden sich im Bakterium nicht auf dem Chromosom (*in cis*) sondern auf einem Low-Copy-Plasmid (*in trans*). Die Unterschiede in der Expression von GFP zwischen den einzelnen Stämmen könnten daher auch durch einen Gen-Dosis-Effekt durch eine unterschiedliche Anzahl von Plasmid-Kopien pro Bakterium verursacht werden. Ebenso könnte allein durch die Anwesenheit

des Plasmides die Expression beeinflusst werden. Von entscheidender Bedeutung ist also als erstes die Stabilität des verwendeten Plasmides mit dem Reporter gen. Der verwendete Vektor pKT248 liegt in etwa 15-20 Kopien pro Zelle vor. Trotz des Chloramphenicolresistenzgenes auf dem Plasmid war die Wachstumskurve bei Zugabe von Chloramphenicol mäßig verzögert. Während der Messungen wurde deshalb auf einen Selektionsdruck durch Zugabe von Chloramphenicol verzichtet, um die Proteinsynthese nicht zu hemmen. Deshalb könnte hier ein Verlust des Plasmides bei einem Teil der Bakterienpopulation auftreten und eine niedrigere Expression vorspielen. Bei den Voruntersuchungen zu dieser Arbeit konnte dies zeitweise beobachtet werden. Es führt im FACS zu einer zweigipfligen Fluoreszenz-Verteilung. Der erste Gipfel zeigt dabei keine Fluoreszenz und entspricht den Bakterien, die das Plasmid verloren haben. Daher mußte direkt vor den Versuchen eine Passage einer Einzelkolonie auf chloramphenicolhaltigem Agar zur Selektion auf das Reporterplasmid erfolgen. Hierdurch trat dieses Problem nicht mehr auf. Die ermittelten Werte für die Expression von *exoS'-gfp* wurden außerdem mit der Menge an Exotoxin-mRNA (Northern-Blot) und Exotoxin (Western-Blot) ohne Anwesenheit des Reporterplasmides verglichen. Hierbei zeigten sich mit allen drei Meßmethoden übereinstimmende Werte für die Expression von *exoS* im Vergleich zwischen PAO1 (Typstamm) und den Defektmutanten PDO-100 (*rhlI*), PAO-JP1 (*lasI*) und SS24 (*rpoS*). Auch die Anwesenheit des Kontrollplasmides ohne Promotor und Exotoxin führte zu keiner Änderung. Da gleiche Mengenverhältnisse bei der Fluoreszenzmessung von ExoS'-GFP und von ExoS im Westernblot und *exoS*-mRNA festgestellt wurden, läßt sich daraus auch deuten, daß die hier gezeigten Ergebnisse auf einer Regulation auf Transkriptionsebene beruhen.

Die Aktivierung des Typ-III-Sekretionssystemes *in vitro* durch das kalziumarme Stimulationsmedium stellt einen sehr starken Stimulus dar. Unter physiologischen

Bedingungen könnten daher größere oder kleinere Unterschiede in der Expression der Exotoxine bestehen als dabei beobachtet. Werden die Stämme SS24 (*rpoS*) und PDO100 (*rhlI*) von *P. aeruginosa* zusammen mit humanen Zellen kultiviert, zeigen sie eine stärkere ExoS'-GFP-Fluoreszenz als PAO1 (Typstamm) und PAO-JP1 (*lasI*). Da die Toxizität von *P. aeruginosa* in der Zellkultur mit der Virulenz von *P. aeruginosa* bei Infektionen der Lunge korreliert (Sawa *et al.*; 1998), kann man annehmen, daß ein Defekt oder eine niedrige Expression von RpoS beziehungsweise eine niedrige Aktivität des Rhl-Systemes ebenfalls eine höhere Virulenz zur Folge haben könnte.

4.2 Quorum Sensing: Das *rhl*-System und

Typ-III-Sekretion

P. aeruginosa besitzt zwei Quorum-Sensing-Systeme, das *las*-System und das *rhl*-System. Beide bestehen jeweils aus einer Autoinducer-Synthetase (LasI, RhlI), dem Autoinducer (OdDHL, BHL) und einem Regulatorprotein (LasR, RhlR). Eine Mutation in *rhlI* (PDO100) oder in *rhlR* (PDO111) hemmt die Autoinducerproduktion des *rhl*-Systemes. Ein solcher Defekt war mit einer signifikant stärkeren *exoS'*-*gfp*- und *exoU'*-*gfp*-Expression als bei PAO1 assoziiert. Dies gilt auch für eine Mutation in *rhlR* in Verbindung mit einer Mutation im *lasR*-Gen (PAO-JP3). Durch Substitution des zum *rhl*-System gehörenden Autoinducers (BHL) ließ sich die Hochregulation von *exoS* bei defektem Autoinducer-Synthetase-Gen *rhlI* aufheben. Auch im Kokulturrexperiment mit HeLa-Zellen exprimierte die *rhlI*-Mutante PDO100 deutlich mehr ExoS'-GFP als der Typstamm PAO1. Diese Daten lassen auf eine direkte oder indirekte Hemmung der Exotoxinproduktion durch das *rhl*-System schließen.

In der Hierarchie der Quorum-Sensing-Systeme von *P. aeruginosa* ist das *las*-System dem *rhl*-System übergeordnet. Dies läßt deshalb eine Induktion der *exoS'-gfp*-Expression auch bei einer Mutation im *las*-System erwarten (*lasI*/PAO-JP1). Es konnte jedoch keine signifikante Änderung gezeigt werden. Eine *lasI*- und *rhlI*-Doppelmutante (PAO-JP2) zeigte unerwartet sogar eine geringere Expression von ExoS'-GFP. Dies läßt sich am ehesten durch die komplexe gegenseitige Regulation der beiden Quorum-Sensing-Systeme untereinander und das Zusammenspiel mit zahlreichen anderen Regulatoren wie RpoS erklären. Ein Rückschluß auf die Hierarchie der beiden Systeme untereinander und im Hinblick auf ExoS kann daher aus den hier gewonnenen Ergebnissen nicht gezogen werden.

Die Sekretion einer weiteren Gruppe von Pathogenitätsfaktoren wird bei *P. aeruginosa* bekanntermaßen durch Quorum Sensing reguliert. Hierbei handelt es sich um das Exotoxin A und mehrere degradierende Enzyme wie Proteasen und Lipasen. Diese werden durch das Typ-II-Sekretionssystem Xcp sezerniert. Die Expression von Xcp und seiner Substrate wird jedoch durch Quorum Sensing stimuliert (*Gambello et al. 1993, Chapon-Herve et al. 1997*). Von den sezernierten Proteasen LasA und LasB ist denkbar, daß sie die äußeren membranständigen Anteile des Typ-III-Sekretionssystemes beschädigen könnten. Somit erscheint eine antagonistische Regulation des Typ-II- und des Typ-III-Sekretionssystemes sinnvoll.

Bei darmpathogenen *E. coli* konnte bereits eine Regulation des TTSS durch Quorum Sensing nachgewiesen werden. Das LuxS-Quorum-Sensing-System aktiviert in enterohämorrhagischen *E. coli* O157:H7 (EHEC), sowie in enteropathogenen *E. coli* O127:H6 (EPEC) mehrere Gene der Pathogenitätsinsel LEE. LEE steht dabei für Locus of Enterocyte Effacement und enthält Gene für ein Typ-III-Sekretionssystem, das Tir-Operon für den Translocated Intimin Rezeptor, der das

sezernierte Adhäsion Intimin bindet sowie die Gene für die sezernierten Esp-Proteine. Diese führen in den Wirtszellen zur Destruktion von Mikrovilli und zu einem Rearrangement des Zytoskelettes. Die Folge ist eine Läsion im intestinalen Epithel, die einem Sockel ähnelt und die Bakterien einzeln einhüllt. Außerdem enthält diese Region das Gen für den positiven Regulator der LEE-Gene *ler*. Per, dessen Gen sich auf dem EPEC Adherence Factor Plasmid befindet, gehört wie ExxA von *P. aeruginosa* zur AraC-Familie von Transkriptionsregulatoren und induziert *ler* und damit die Expression von LEE. Die Expression dieser Gene in *E. coli* steigt bis zu Beginn der stationären Phase an, um dann wieder abzufallen. Eine Mutation, die die Autoinducer-Synthetase LuxS funktionsunfähig macht, führt in EPEC und EHEC zu einer verminderten Expression der Gene des Typ-III-Sekretionssystems (*Sperandio et al.; 1999*). Somit induziert Quorum Sensing in EPEC und EHEC die Typ-III-Sekretion. Im Gegensatz wird in *P. aeruginosa*, wie oben gezeigt, das TTSS durch Quorum Sensing negativ reguliert. EPEC und EHEC bilden jedoch keine Biofilme oder Mikrokolonien, sondern ein Monolayer auf Epithelzellen von Schleimhäuten. Auch dürften die LEE-Operons ebenso durch Homoserinolaktone von anderen Darmbakterien aktiviert werden. Eine Aktivierung der Typ-III-sezernierten Exotoxine ist für die pathogenen *E. coli* somit wohl auch bei hoher Bakteriendichte von Nutzen. Hier unterscheiden sie sich aber von *P. aeruginosa* deutlich in ihrer Infektionsstrategie, was eine gegensätzliche Regulation sinnvoll erscheinen lässt.

Die Funktion der Exotoxine ExoS und ExoT besteht wahrscheinlich hauptsächlich darin, eine Phagozytose durch eukaryote Zellen zu inhibieren (*Cowell et al.; 2000*). Der invasive Stamm PAK kann auch durch nicht-professionelle Phagozyten, zum Beispiel HeLa-Zellen, aufgenommen werden. Eine ExoS/ExoT-Mutante von PAK wird in jeder Wachstumsphase deutlich phagozytiert. Vom

intakten Stamm werden in der exponentiellen Wachstumsphase aber sehr viel weniger Bakterien aufgenommen, als in der stationären Phase (*Ha, Jin; 2001*). Hieraus läßt sich schließen, daß ExoS und ExoT hauptsächlich während der exponentiellen Phase eine Phagozytose verhindern und in der stationären Phase herabreguliert sind. Dies wird durch die Daten dieser Arbeit auch vorhergesagt.

Auch andere Beobachtungen weisen darauf hin, daß in der späten exponentiellen und in der stationären Phase das ExoS-Regulon herabreguliert wird. So kommt es im Biofilm von *P. aeruginosa* zu einer 2,5-fachen Verminderung von ExsC, einem zentralen Regulator der Typ III Sekretion (*Whiteley et al.; 2001-1*). Bereits seit längerem ist bekannt, daß bei einer gezielten Deletion des *exsC*-Genes *exoS* um das zehnfache weniger exprimiert wird (*Frank et al.; 1991*). Demnach wird mit ExsC ein bedeutender positiver Regulator der Typ-III-Sekretion in der stationären Phase gehemmt. Entsprechend ließ sich hier bei der Kultur von PAO1 auf Objektträgern zeigen, daß Pseudomonaden in einem Biofilm nahezu kein ExoS erzeugen. Im Gegensatz dazu fand in planktonisch im Überstand darüber wachsenden Bakterien eine starke ExoS-Synthese statt. Für Bakterien, die als Biofilm wachsen, läßt sich aus der Expression des Typ-III-Sekretionsapparates kein zusätzlicher Vorteil erwarten, da die Bakterienzellen in den Mikrokolonien in Exopolysaccharid eingebettet sind und dadurch relativ gut vor Phagozytose geschützt sind.

Interessanterweise besitzen Basalkörper von Flagellen und die Typ-III-Sekretionsapparate ein hohes Maß an Homologie. Daher liegt eine gemeinsame Regulation nahe, wie sie auch in *E. coli* und *Salmonella* beschrieben worden ist. In *Salmonella* induziert ein Homolog von GacA von *P. aeruginosa* beide Apparate gleichsam (*Goodier et al.; 2000*). In *E. coli* wird der Flagellenapparat durch Quorum Sensing reguliert (*Sperandio et al.; 2002*). Für einige Flagellenproteine

von *P. aeruginosa* wurde bereits nachgewiesen, daß diese im Biofilm durch Quorum Sensing herabreguliert werden (*Whiteley et al.; 2001-1*). So könnte in *P. aeruginosa* eine koordinierte Regulation über Quorum Sensing die Expression von Flagellenkomponenten und typ-III-sezernierten Proteinen in der stationären Phase vermindern.

Die *rhlI*-Mutante (PDO-100) zeigt eine erhöhte Expression von *exoS*. Die Substitution mit BHL hebt diesen Effekt auf. Somit führt die Aktivierung des *rhl*-Systems wohl direkt oder indirekt zu einer Hemmung des TTSS. Die Zugabe von BHL zum Wildtypstamm (PAO1) und zur *lasI*-Mutante (PAO-JP2) führt ebenfalls zu einer Verminderung der *exoS'-gfp*-Expression. Da hier jeweils ein intaktes *rhl*-System vorhanden ist, könnte dieses durch das zusätzliche BHL verstärkt aktiviert werden. Auch die Zugabe von OdDHL führt jeweils zu einer Reduktion von *exoS'-gfp*. Ursächlich könnte bei PDO100 (*rhlI*) eine geringgradige Aktivierung von *rhlR* durch OdDHL sein und bei PAO1 und PAO-JP1 eine verstärkte Aktivierung des *rhl*-Systems durch das *las*-System. Jedoch zeigt sich bei PAO1 und PAO-JP1 kein signifikanter Unterschied zwischen der Zugabe von BHL und OdDHL. Hier könnte auch ein anderer Effekt vorliegen.

Sowohl die Mutationen des *rhlI*- (PDO100) als auch des *rhlR*-Genes (PDO111, PAO-JP3) führt zu einer Verminderung der BHL-Konzentration. Die daraus in den hier durchgeführten Versuchen resultierende verstärkte Expression des *exoS*- und *exoU*-Genes könnte somit durch die fehlende Inhibition durch RhlR verursacht werden. ExsD wirkt als negativer Regulator des TTSS von *P. aeruginosa* indem es den positiven Regulator des ExoS-Regulon, ExsA, bindet (*McCaw, et al. 2002*). Betrachtet man den Promotorbereich von ExsD, erkennt man an typischer Stelle eine *lux*-Box mit der typischen Sequenz NNCT-(N)₁₂-AGNN. Abbildung 4.1 zeigt

die Übereinstimmung mit anderen von Quorum Sensing abhängig exprimierten Genen. Hier wäre also eine Bindung eines Regulator-Proteins der Quorum-Sensing-Systeme möglich, die eine Aktivierung von *exsD* zur Folge hätte. Dies würde wiederum zu einer Verminderung von aktivem ExsA führen und somit zu einer Herabregulation des gesamten ExoS-Regulon. Somit erscheint eine Repression des ExoS-Regulon durch Quorum Sensing über Aktivierung von *exsD* plausibel (Abbildung 4.2). Auch die oben beschriebene 2,5-fache Verminderung von ExsC wäre hierdurch erklärbar, da *exsC* ExsA-abhängig transkribiert wird. Bei *exsD* sollte es sich hinsichtlich der Regulation durch Quorum Sensing um ein Klasse IV-Gen handeln, das erst in der stationären Phase verstärkt exprimiert wird und zur maximalen Induktion das *rhl*-System benötigt. Auffällig ist, daß wohl auch das *rhl*-System alleine in der Lage ist, die Expression von *exsD* zu induzieren, da eine *lasI*-Mutante (PAO-JP1) einen ähnlichen Phänotyp zeigt, wie der Wildtyp.

Promotor

Promotor				Startcodon	
NN	CT	NNNNNNNNNN	AG	NN	<i>lux-Box</i>
CG	CT	CGCGGCAGGGA	AG	GA	<i>exsD</i>
..	CT	ATCTCATTGGCT	AG	TT	<i>lasI</i>
..	CT	GAGAGGGCCC	AG	GA	<i>rhlI</i>
..	CT	GCGCGCTTGAC	AG	CG	<i>rhlR</i>
..	CT	AGCAAATGAGAT	AG	AT	<i>rsaL</i>
AC	CT	GCCCGAAGGGC	AG	GT	<i>qsc102</i>
CA	CT	GCCAGATCTGGC	AG	TT	<i>qsc117</i>
AC	CT	ACCAGATCTGT	AG	TT	<i>phzA</i>
AC	CT	GCCAGTCTGGC	AG	GT	<i>lasB</i>
AC	CT	ACCAGAATTGGC	AG	GG	<i>hcnA</i>
					CGAATGCCGGCTAAAAATAACTGACGTTTTTTGAAAGCCCGTAGCGGCTGCATG
					ATAAAAATTATGAAATTTGCATAAATCTTCAGCTTCCTATTTGGAGGAAGTGAAGATG
					GTATCAGGGTAGGGATGCCGCTTTTTTTCTCGCCGGCACGACACGGGGACTTGGTCATG
					TCATACCCCGGGCCAATTCTGCTGTGATGCATTTTATCGATCAGGGCTTACTGCAATG
					TTCGGTGAACCCGGACCCTTGCTAGGCTCGAAGAAAGTCCGAAAAGATCAGAGCAATG
					...
					...
					...
					...
					...
					...

Abbildung 4.1: *lux*-Box-Motiv im Promotorbereich von *exsD* im Vergleich zu anderen von Quorum Sensing abhängig exprimierten Genen. Das Motiv NNCTN₍₁₂₎AGNN stellte die Bindungsstelle für das aktive Regulatorprotein dar und findet sich bei *exsD* im erwarteten Bereich des Promotors. Dies zeigte der Vergleich mit dem Promotor von *lasI*, *rhlI*, *rhlR* und *rsaL* sowie mit der *lux*-Box von weiteren Genen.

Die niedrige Kalziumkonzentration im Stimulationsmedium stellt einen starken Reiz für die *exsC*-Expression dar. Durch eine größere Menge ExsC kann die

negative Regulation des TTSS durch ExsD aufgehoben werden (Dasgupta et al; 2004). Somit läßt sich auch der eher geringe Expressionsunterschied zwischen den Defektmutanten des *rhl*-Systemes und dem Wildtyp im Stimulationsmedium und der deutlichere Unterschied in der Kokultur mit HeLa-Zellen erklären.

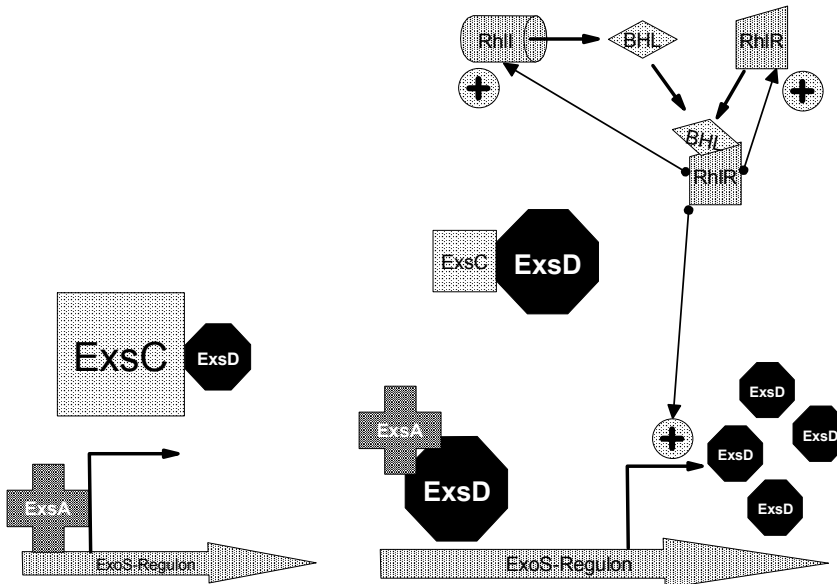


Abbildung 4.2: Möglicher Regulationsweg: Links: Ein Überschuß an ExsC bindet ExsD. Hierdurch wird eine Inhibition von ExsA durch ExsD verhindert, das ExoS-Regulon wird transkribiert. Rechts: Das aktive *rhl*-Quorum-Sensing-System mit dem Autoinducer BHL fördert die Transkription von ExsD. ExsD übertrifft schließlich ExsC. ExsD kann dann ExsA binden und damit die ExsA-abhängige Transkription des ExoS-Regulons vermindern. Eine Mutation im *rhl*-System (*rhlI*, *rhlR*) führt zu einer geringeren Expression von ExsD und somit zu einer Erhöhung der ExsA-Aktivität und vermehrter Expression der Gene des ExoS-Regulon.

Eine derartige Regulation des TTSS über Inhibition eines Transkriptionsaktivators (ExsA) fand sich bislang nur bei zwei weiteren Spezies (*Vibrio parahaemolyticus* und *Photobacterium luminescens*). Bei Enterobacteriaceen (*E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia*) ist ein analoger Mechanismus nicht nachzuweisen (Dasgupta et al.; 2004). Mit dem Fehlen dieses inhibierenden Zwischenschrittes ist auch die gegenläufige Regulation des TTSS durch Quorum Sensing bei *E. coli*, das heißt die Aktivierung des TTSS durch Quorum Sensing, vereinbar.

4.3 RpoS und Typ-III-Sekretion

Ein deutlicher Anstieg der Expression von ExoS wurde in dieser Arbeit auch bei einem Stamm mit Defekt im Sigmafaktor der stationären Phase (RpoS) beobachtet (SS24).

Auch in EPEC und EHEC werden Gene des LEE nicht nur durch Quorum Sensing sondern auch durch RpoS reguliert. Hier führt die Expression von *rpoS* jedoch ebenso wie die Aktivierung des Quorum Sensing Systemes zu einem Anstieg der Transkription des LEE (Sperandio et al.; 1999).

Im Gegensatz zu nährstoffreicheren Medien werden die Exotoxine bei Kultivierung in Minimalmedium (VB-Medium) kaum exprimiert. Ein Mangel an Nährstoffen führt bei *P. aeruginosa* durch Aktivierung des ribosomassoziierten Proteins RelA zu einem globalen Wechsel im Metabolismus und zum Eintritt in die stationäre Phase. RelA besitzt die Fähigkeit, sowohl die Expression von *rpoS* als auch die von *lasR* und *rhlR* zu steigern. Dadurch wird wiederum die Produktion der Autoinducer erhöht. (van Delden et al; 2001). Dies weist sowohl auf eine Regulation der Exotoxinproduktion durch Quorum Sensing, als auch durch den Sigmafaktor der stationären Phase RpoS hin. Es stellt sich daher die Frage, ob die

Verminderung der *exoS*-Expression durch das *rhl*-System auch über RpoS vermittelt wird oder ob das *rhl*-System und RpoS gemeinsam die Exotoxin-Expression gleich gerichtet regulieren. Zur Regulation untereinander wurden bisher unterschiedliche und teils widersprüchliche Beobachtungen gemacht. Einerseits wurde gezeigt, daß das *rhlI/rhlR*-System die Expression von *rpoS* verstärkt (Latifi et al.; 1996). Ungeklärt ist jedoch bislang, wie das *rhl*-System RpoS stimuliert. Möglicherweise inhibiert auf der anderen Seite RpoS zeitweise sogar Gene, die durch das *rhl*-System aktiviert werden. RpoS wird aber auch unabhängig vom *rhl*-System in der stationären Phase exprimiert. Auch aus den hier gewonnenen Ergebnissen kann kein sicherer Rückschluß auf die Hierarchie von *rhl*-System, RpoS und ExoS-Regulon gezogen werden.

Die Zugabe von BHL und OdDHL führt auch bei SS24 zu einer Verminderung der Produktion der Exotoxine wie bei PDO100 (*rhlI*) und PAO1. Aber auch hier besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Zugabe von BHL und OdDHL. Die Aussagekraft dieses Versuches ist jedoch eingeschränkt, da sich bei der Kultur von SS24 im verwendeten Kulturröhrchen weder eine entsprechend hohe Wachstumsdichte wie bei der Kultur in größeren Gefäßen erreichen ließ, noch vergleichbar hohe Expressionsunterschiede zwischen PAO1 und SS24 erreicht wurden. Unter dieser Einschränkung könnte diese Beobachtung dennoch dafür sprechen, daß das *rhl*-System auch unabhängig von RpoS die Exotoxinproduktion inhibieren kann und umgekehrt. Demnach wäre denkbar, daß sich beide Systeme verstärken, aber auch jedes für sich allein die Expression der Exotoxine herabregulieren kann.

Für eine voneinander unabhängige Wirkung auf das ExoS-Regulon spricht auch der oben beschriebene Umstand, daß der Inhibitor des TTSS, ExsD, durch Quorum

Sensing induziert werden könnte. Dagegen findet sich im Promotorbereich von ExsD keine RpoS-Consensus-Sequenz. RpoS scheint also keine direkte Wirkung auf die Expression von ExsD auszuüben. Dagegen spricht auch, daß im Stimulationsmedium, in dem die Wirkung von ExsD durch ExsC wie oben beschrieben abgeschwächt wird, eine starke Induktion des TTSS stattfindet. Weitere Hinweise auf einen möglichen Regulationsweg fanden sich nicht.

Die Deletion des *rpoS*-Genes des Stammes SS24 führt zu einer erhöhten Virulenz im Rattenmodell (*Suh et al.; 1999*). Diese Beobachtung wurde zunächst auf die verstärkte Expression des Toxins Pyocyanin zurückgeführt, da die vom Typ-II-Sekretionssystem sezernierten Virulenzfaktoren wie zum Beispiel Exotoxin A, Elastase und die Protease LasA von SS24 in geringerem Ausmaß gebildet werden. Das ExoS-Regulon dagegen wurde von diesen Autoren bisher nicht berücksichtigt. Ein Teil dieser Virulenzerrhöhung könnte nach unseren Beobachtungen aber auch durch die verstärkte Expression des TTSS verursacht werden.

Auffällig war, daß die Expression von ExoU bei defektem RpoS im Gegensatz zu ExoS nicht ansteigt. Dies könnte damit zusammenhängen, daß ExoS und ExoU nicht nach dem gleichen Mechanismus reguliert werden. Dies spricht somit ebenfalls dagegegen, daß die Regulation durch Quorum Sensing und durch RpoS einen gemeinsamen Mechanismus benutzt.

ExoS und ExoU werden natürlicherweise auch nicht in einem Stamm zusammenexprimiert. Ebenso unterscheiden sie sich auch deutlich in ihrer Funktion. Die Produktion von ExoS während der stationären Phase bei Wachstum in einem Biofilm sollte keinen Vorteil für *P. aeruginosa* bringen. Bei Nährstoffmangel könnten durch die Expression der Lipase ExoU jedoch neue Nährstoffquellen

erschlossen werden, dennoch wäre auch hierfür eine Translokation in die Wirtszellen unter direktem Kontakt notwendig.

4.4 Konversion zum Mucoiden Phänotyp und

Typ-III-Sekretion

Mittels Deletion von 35 Triplets aus dem *mucA*-Gen der Stämme PAO1 und PAK wurden definierte Stämme von *P. aeruginosa* mit mucoidem Phänotyp erzeugt. Mutationen, die zu einem Defekt des *mucA*-Genes führen, treten *in vivo* regelmäßig in der chronischen Lungeninfektion bei Cystischer Fibrose auf. Nach Einführung des Reporterplasmides pExoS'-GFP in beide *mucA*-defiziente Mutanten von PAO1 konnte gezeigt werden, daß dies hier in der stationären Phase ebenfalls zu einer Überexpression von *exoS'-gfp* im Vergleich zum Elternstamm PAO1 führt. In der exponentiellen Phase wird hingegen zunächst eine leichte Verminderung gegenüber PAO1 beobachtet. Die Expression nimmt dann aber exponentiell zu.

Als zugrundeliegender Mechanismus dieses Anstieges könnte man eine Behinderung der Sekretion der Exoenzyme oder eine vermehrte Bildung in der Bakterienzelle erwarten. So könnte die vermehrte Alginat-Bildung den Typ-III-Sekretionsapparat in seiner Funktion beeinträchtigen. Dagegen spricht, daß das Genfusionsprodukt aus *exoS*- und *gfp*-Gen bei allen Stämmen nicht sezerniert wird (Hornef *et al.*; 2000). Das heißt, die Ausgangskonzentration von ExoS'-GFP in der *mucA*-Mutante ist annähernd gleich hoch wie in PAO1. Ein Sekretionsstau von ExoS'-GFP könnte sich so dann eher in einer Hemmung der ExoS-Produktion durch die hohe intrazelluläre Konzentration äußern, nicht aber in einem weiteren Anstieg von GFP in der Bakterienzelle. Somit sprechen die Beobachtungen für eine vermehrte Bildung von ExoS bei einem MucA-Defekt.

AlgU ist ein alternativer Sigmafaktor. Dies macht einen Einfluß auf die Regulation anderer Gene neben dem Alginat-Synthese-Regulon wahrscheinlich. Tatsächlich konnte ein AlgU-abhängiger Promotor auch in Genen gefunden werden, die für die Antwort auf osmotischen und thermischen Streß bedeutsam sind, sowie in Genen der Eisenaufnahme und der Lipoproteinsynthese (*Firoved et al.; 2002*). Hinweise auf eine AlgU-Consensus-Sequenz im Bereich der Promotoren der positiven Regulatoren des TTSS, ExsA und ExsC, fanden sich nicht. Es könnte allerdings ein Antagonismus mit RpoS bestehen. Dennoch ergaben sich keine weiteren Hinweise auf einen möglichen Regulationsweg.

Die Inaktivierung von *algU* im Genom von *P. aeruginosa* führt zu einer erhöhten Virulenz im Mausmodell, obwohl auch andere Virulenzfaktoren neben Alginat, wie Elastase, die alkalische Metalloprotease AprA und die Cyanid-Synthase, AlgU-abhängig exprimiert werden (*Yu et al.; 1996*). Bei einem Defekt des zugehörigen Antisigmafaktors MucA sollte AlgU vermehrt ins Zytosol redistribuiert werden. Dadurch könnte man zunächst eine verminderte Virulenz in diesem Modell erwarten. Daneben wurde in einer Microarray- Analyse ein Stamm von *P. aeruginosa* untersucht, der die bei CF-Isolaten häufige Mutation *sup-2* besitzt und bei dem eine typische Mutation in *mucA* eingeführt worden war. Diese Kombination führt zu einer leichten Attenuierung des mucoiden Phänotypes. In der Genexpressionsanalyse zeigte sich hier aber auch eine Steigerung der Aktivität von RsaL um den Faktor 23 (*Firoved et al.; 2003*). RsaL hemmt aber LasI und dadurch die Expression der OdDHL-abhängigen Virulenzfaktoren. Auch dies läßt eine verminderte Virulenz erwarten. Ein Einfluß auf das *rhl*-System ist jedoch bislang nicht bekannt, auch wenn dadurch ein bedeutender Aktivator wegfällt (LasR-OdDHL). Bei Patienten mit Cystischer Fibrose beschleunigt sich jedoch die

Verschlechterung der Lungenfunktion ab dem Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens mucoider *P. aeruginosa* in der Lunge (Ballmann et al.; 1998).

Neben der Bildung von Biofilmen in der Lunge mit noch erhöhter mechanischer Resistenz, erschwerter Phagozytose und verminderter Wirksamkeit der antimikrobiellen Therapie, könnte also auch eine verstärkte Expression von typ-III-sezernierten Exoenzymen die beschriebene klinische Verschlechterung beim Auftreten des mucoiden Phänotypes mitverursachen.

4.5 Antimikrobielle Therapie mit Wirkung auf Quorum Sensing

Erste Hinweise auf das Wachstum von *P. aeruginosa* in Form von Biofilmen in den Lungen von Patienten mit Cystischer Fibrose stammen aus dem Jahr 1980. In dem bronchoskopisch und bei Sektionen gewonnenen Material fanden sich Mikrokolonien in extrazellulärer Matrix (Lam et al.; 1980). Seither erwies sich die Bildung von Biofilmen als Hauptproblem beim Versuch *P. aeruginosa* zu eradizieren. Das gilt besonders bei der chronischen Infektion der Lunge bei Patienten mit Cystischer Fibrose. Gleichzeitig wurden zunehmend Faktoren entdeckt, die den Aufbau und die Entwicklung von Biofilmen von *P. aeruginosa* regulieren.

Seit längerem ist beschrieben, daß die Lungenfunktion von CF-Patienten, die eine Dauertherapie mit Erythromycin (Fujii et al.; 1995) oder Azithromycin (Jaffé et al.; 1998) erhalten, im Verlauf deutlich besser ist, als die von solchen, die keine Makrolide erhalten. Ausreichende bakterizide oder bakteriostatische Wirkspiegel werden bei der Gabe von Makrolide im Hinblick auf *P. aeruginosa* nicht erreicht. Zunächst wurde deshalb der entzündungshemmende Effekt der Makrolide als

alleinige Ursache vermutet. Schließlich konnte aber nachgewiesen werden, daß diese die GDP-D-Mannose-Dehydrogenase hemmen. Diese ist das wichtigste Enzym in der bakteriellen Alginat-Synthese (Nagino, Kobayashi; 1997). Makrolide mit einem 14-gliedrigen Ringsystem können jedoch auch einen hemmenden Effekt auf die Produktion der Autoinducer ausüben (Tateda et al.; 2001) und die Keimzahl in der infizierten Lunge vermindern (Yanagihara et al.; 2002).

Wie eingangs beschrieben, stellt die Typ-III-Sekretion von Exotoxinen einen zentralen Virulenzmechanismus von *P. aeruginosa* dar. Das Vorhandensein von Genen für ein Typ-III-Sekretionssystem und entsprechende Exotoxine ist von prognostischem Wert. Da das *rhl*-System die Exotoxine so regulieren kann, daß diese nur dann exprimiert werden, wenn im Verlauf der Infektion kein Biofilm gebildet wird, würde man bei einer Hemmung eine Überexpression in der stationären Phase beziehungsweise im Biofilm erwarten.

Nimmt man eine dadurch erhöhte Virulenz an, müßten bei dem beobachteten positiven Effekt der Makrolide mit einem 14-gliedrigen Ringsystem die dadurch erreichte Verminderung anderer Virulenzfaktoren überwiegen. Möglich ist jedoch auch, daß durch die Deregulation direkte Nachteile für *P. aeruginosa* entstehen. So könnte die Expression von Exotoxinen bei fehlendem Sekretionsreiz innerhalb des Biofilmes einen nutzlosen Ressourcenverbrauch hervorrufen.

Auffällig ist die starke Exotoxinproduktion durch den mucoiden Stamm. Dies könnte ein weiteres Argument für die Notwendigkeit einer frühen aggressiven antimikrobiellen Therapie bei Besiedelung der Lunge von CF-Patienten durch *P. aeruginosa* sein, um das regelhafte Auftreten von mucoiden Isolaten hinauszuschieben. Da das Vorhandensein von Typ-III-Sekretionsapparat und Exotoxinen

mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (u. a. *Hauser et al.; 2002*), ist die Entwicklung von Medikamenten, die die Typ-III-Sekretion hemmen, als Ansatzpunkt für eine neue Therapieform denkbar.

5 Zusammenfassung

Pseudomonas aeruginosa ist ein bedeutender Erreger nosokomialer Infektionen. Besondere Bedeutung erlangt es im Krankheitsverlauf der Cystischen Fibrose. Hier und bei anderen Erkrankungen kann die Expression verschiedener Virulenzfaktoren zu schweren Verläufen führen. Ein Typ-III-Sekretions-positiver Phänotyp, das heißt der Besitz des ExoS-Regulons, ist dabei von prognostischem Wert hinsichtlich Gewebszerstörung, Krankheitsverlauf und Überleben. Bisher ist jedoch wenig über die Regulation des ExoS-Regulon bekannt. Sinnvoll erscheint eine gegensätzliche Expression mit dem Typ-II-Sekretionssystem, da hier zahlreiche degradierende Enzyme sezerniert werden, die auch den Typ-III-Sekretionsapparat beschädigen könnten, und mit der Biofilmbildung, da für Typ-III-Sekretion ein direkter Zellkontakt zur Wirtszelle notwendig ist. Bekannte Regulatoren von Biofilmbildung und Typ-II-Sekretion sind Quorum Sensing, der Sigmafaktor der Stationären Phase (RpoS) und der AlgU-Antisigmafaktor MucA für die Alginsynthese. In der vorliegenden Arbeit wurden daher ihre Auswirkungen auf die Typ-III-Sekretion untersucht. Hierbei zeigt sich unter Stimulationsbedingungen für Typ-III-Sekretion *in vitro* und durch Kokulturversuche mit humanen Zellen, daß *P. aeruginosa* in einem Biofilm nahezu kein ExoS exprimiert. Im Gegensatz dazu werden im Überstand dieser Kokultur größere Mengen an Exotoxin S durch planktonisch wachsende Bakterien erzeugt. Es ließ sich zeigen, daß das *rhl*-Quorum-Sensing-System von *P. aeruginosa* die Expression von ExoS und ExoU hemmen kann. Ebenso vermindert der Sigmafaktor der Stationären Phase RpoS die Expression von *exoS* ebenfalls stark. Die Mutation des AlgU-Antisigmafaktors MucA führt zu einem Anstieg von ExoS in der stationären Phase. Ein möglicher Regulationsweg durch Quorum Sensing besteht in der Aktivierung von ExsD, einem negativen Regulator des ExoS-Regulons. *exsD* besitzt in der Promotorregion eine Sequenz, die einer *lux*-Box, das heißt einer Bindungsstelle für die

Regulatorproteine (RhlR, LasR) des Quorum Sensing, entspricht. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Typ-III-sezernierten Exotoxine durch die oben genannten Faktoren reguliert werden können. Dadurch könnte die Expression des ExoS-Regulons im wesentlichen auf die exponentielle Phase beschränkt und in der stationären Phase und im Biofilm gehemmt werden. Zum anderen kann die verstärkte Expression von Typ-III-sezernierten Exotoxinen bei Mutation des *mucA*-Genes zur erhöhten Virulenz von mucoiden Isolaten von *P. aeruginosa in vivo* beitragen.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Allewelt, Coleman, Grout, Priebe, Pier;** 2000: Acquisition of Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU Cytotoxin Leads to Increased Bacterial Virulence in a Murine Model of Acute Pneumonia and Systemic Spread; *Infection and Immunity*, 68, S. 3998-4004
- Ballmann, Rabsch, von der Hardt;** 1998: Long Term follow up of changes in FEV1 and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis; *Thorax*, 53, S. 732-737
- Bassler;** 1999: How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing; *Current Opinion in Microbiology*, 2, S. 582-587
- Birge;** 2000: *Bacterial and Bacteriophage Genetics*, 4th Edition, S. 103ff
- Birnboim, Doly;** 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; *Nucleic Acids Research*, 7, S. 1513-1523
- Böttner, Bonas;** 2002: Port of entry - the type III secretion translocon; *Trends in Microbiology*, 10, S. 186-192
- Boucher, Mudd, Deretic;** 1997: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Characterization of *mucA*-Mutations in Clinical Isolates and Analysis of Clearance in a Mouse Model of Respiratory Infection, *Infection and Immunity*, 65, S. 3838-3846
- Brandis, Eggers, Köhler, Pulverer;** 1994: *Medizinische Mikrobiologie*, 7. Aufl., S. 467ff
- Brint, Ohman;** 1995: Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsiver LuxR-LuxI family; *J. Bacteriology*, 177, S. 7155-7163
- Burman, Savel, Racine, Swanson, Revadigar, Fujimoto, Sawa, Frank, Wiener-Kronish;** 2001: Type III Protein Secretion Is Associated with

Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections; Journal of Infectious Diseases, 183, S. 1767-1774

Cheng, Schneewind; 2000: Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods; Trends in Microbiology, 8, S. 214-220

Chapon-Herve, Akrim, Latifi, Williams, Lazdunski, Bally; 1997: Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*; Molecular Microbiology, 24, S. 1169-1178.

Chugani, Whiteley, Lee, Argenio, Manoil, Greenberg; 2001: QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 98, S. 2752-2757

Coquet, Junter, Jouenne; 1998: Resistance of artificial biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and tobramycin; Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 42, S. 755-760

Cormack, Valdivia, Falkow; 1996: FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP); Gene 173, S. 33-38

Cornelis, Matthijs; 2002: Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines; Environmental Microbiology, 4, S. 787-798

Costerton, Stewart, Greenberg; 1999: Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections; Science, 284, S. 1318-1322

Cowell, Chen, Frank, Vallis, Fleiszig; 2000: ExoT of Cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* Prevents Uptake by Corneal Epithelial Cells; Infection and Immunity, 68, S. 403-406

Dacheux, Toussaint, Richard, Brochier, Croize, Attree; 2000: *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates Induce Rapid, Type III Secretion - Dependent, but ExoU-Independent, Oncosis of Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils; Infection and Immunity, 68, S. 2916-2924

- Dasgupta, Lykken, Wolfgang, Yahr;** 2004: A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system; *Molecular Microbiology*, 53, S. 297-308
- Davies, Parsek, Pearson, Iglewski, Costerton, Greenberg;** 1998: The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm; *Science*, 280, S. 295-297
- De Kievit, Gillis, Marx, Brown, Iglewski;** 2001: Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns; *Applied and Environmental Microbiology*, 67, S. 1865-1873
- Ditta, Stanfield, Corbin, Helinski;** 1980: Broad host range DNA cloning system for gram - negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*; *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77, S. 7347-7351
- Evans, Linker;** 1973: Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*; *J. Bacteriology*, 116, S. 915-924
- Feltman, Schulert, Khan, Jain, Petersonn, Hauser;** 2001: Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*; *Microbiology*, 147, S. 2659-2669
- Firoved, Boucher, Deretic;** 2002: Global Genomic Analysis of AlgU (σ^F)-Dependent Promoters (Sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* an Implications for Inflammatory Processes in Cystic Fibrosis; *Journal of Bacteriology*, 284, S. 1057-1064
- Firoved, Deretic;** 2003: Microarray Analysis of Global Gene Expression in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*; *Journal of Bacteriology*, 185, S. 1071-1081
- Fleiszig, Wiener-Kronish, Miyazaki, Vallas, Mostov, Kanada, Sawa, Yen, Frank;** 1997: *Pseudomonas aeruginosa*-Mediated Cytotoxicity and Invasion Correlate with Distinct Genotypes at the Loci Encoding Exoenzyme S; *Infektion and Immunity*, 65, S. 579-586
- Frank;** 1997: MicroReview The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*; *Molecular Microbiology*, 26(4), S. 612-629

- Frank, Iglewski;** 1991: Cloning and sequence analysis of a trans-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*; Journal of Bacteriology, 173, S. 6460-6468
- Frank, Nair, Schweizer;** 1994: Construction and characterization of chromosomal insertional mutations of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S trans-regulatory locus, Infection and Immunity, 62, S. 554-563
- Fujii, Kadota, Kawakami, Iida, Shirai, Kaseda, Kawamoto, Kohno;** 1995: Long term effect of erythromycin therapy in patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection; Thorax, 50, S. 1246-1252
- Fuqua, Greenberg;** 1998: Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones; Current Opinion in Microbiology, 1, S. 183-189
- Gambello, Kaye, Iglewski;** 1993: LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression; Infection and Immunity, 61, S. 1180-1184
- Ganesan, Frank, Misra, Schmidt, Barbieri;** 1998: *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S ADP - ribosylates Ras at Multiple Sites; Journal of Biological Chemistry, 273, S. 7332-7337
- Geiser, Kazmierczak, Garrity - Ryan, Matthay, Engel;** 2001: *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair; Cellular Microbiology, 3, S. 223-236
- Glessner, Smith, Iglewski, Robinson;** 1999: Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* Quorum - Sensing Systems in Control of Twitching Motility; Journal of Bacteriology, 181, S. 1623-1629
- Goodier, Ahmer;** 2000: SirA Orthologs Affect both Motility and Virulence; Journal of Bacteriology, 183, S. 2249-2258
- Goranson, Hovey, Frank;** 1997: Functional Analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of Exoenzyme S Production by *Pseudomonas aeruginosa*; Journal of Bacteriology, 179, S. 1646-1654

- Govan, Deretic;** 1996: Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoic *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*; Microbiological Reviews, 60, S. 541-544
- Grobe, Wingender, Flemming;** 2001: Capability of mucoic *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water; International Journal of Hygiene and Environmental Health, 204, S. 139-142
- Ha, Jin;** 2001: Growth Phase-Dependent Invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and Its Survival within HeLa Cells; Infection and Immunity, 69, No. 7, S. 4398
- Hanahan;** 1983: Studies on transformation of *E. coli* with plasmids; J. Mol. Biol., S. 557-580
- Hauser, Cobb, Bodi, Mariscal, Valles, Engel, Rello;** 2002: Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*; Critical Care Medicine, 30, S. 521-528
- Henderson, Navarro-Garcia, Desvaux, Fernandez, Ala'Aldeen;** 2004: Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story; Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68, S. 692-744
- Hentzer, Teitzel, Balzer, Heydorn, Molin, Givskov, Parsek;** 2001: Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function; Journal of Bacteriology, 183, S. 5395-5401
- Holder, Neely, Frank;** 2001-1: Type III secretion/intoxication system important in virulence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in burns; Burns, 27, S. 129-130
- Holder, Neely, Frank;** 2001-2: PcrV Immunization Enhances Survival of Burned *Pseudomonas aeruginosa*-Infected Mice; Infection and Immunity, 69, S. 5908- 5910
- Hornef, Roggenkamp, Geiger, Hogardt, Jacobi, Heesemann;** 2000: Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A gfp-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis; Microbial Pathogenesis, S. 1-16

- Hovey, Frank;** 1995: Analyses of the DNA- Binding and Transcriptional Activation Properties of ExxA, the Transcriptional Activator of the *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S Regulon; Journal of Bacteriology, 177, S. 4427-4436
- Iglewski, Sadoff,** 1979: Toxin Inhibitors of Protein Synthesis: Produktion, Purifikation, and Assay of *Pseudomonas aeruginosa* Toxin A; Methods in Enzymology, 60, S. 780-793
- Iglewski, Sadoff, Bjorn, Maxwell;** 1978: *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 75, S. 3211-3215
- Jaffé, Francis, Rosenthal, Bush;** 1998: Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis; Lancet, 351, S. 420
- Kazmierczak, Jou, Mostov, Engel;** 2001: Rho GTPase activity modulates *Pseudomonas aeruginosa* internalisation by epithelial cells; Cellular Microbiology, 3, S. 85-98
- Koronakis, Sharff, Koronakis, Luisi, Hughes;** 2000: Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export; Nature, 405, S. 914-919
- Krall, Schmidt, Aktories, Barbieri;** 2000: *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Is a Rho GTPase-Activating Protein; Infection and Immunity, 68, S. 6066-6068
- Kurahashi, Kajikawa, Sawa, Ohara, Gropper, Frank, Martin, Wiener - Kronish;** 1999: Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia; Journal of Clinical Investigations, 104, S. 743-750
- Lam, Chan, Lam, Costerton;** 1980: Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis; Infection and Immunity, 28, S. 546-556
- Lange, Hengge - Aronis;** 1991: Identification of a central regulator of stationary - phase gene expression in *Escherichia coli*; Molecular Microbiology, 5, S. 49-59

- Latifi, Foglino, Tanaka, Williams, Lazdunski;** 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; *Molecular Microbiology*, 21, S. 1137-1146
- Maniatis, Fritsch, Sambrook;** 1989: *Molecular Cloning*; Editors: Nolan, Ford, Ferguson; 2nd ed.; Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Mathee, Ciofu, Sternberg, Lindum, Campbell, Jensen, Johnsen, Givskov, Ohman, Molin, Høiby, Kharazmi;**1999: Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung; *Microbiology*, 145, S. 1349-1357
- McCaw, Lykken, Singh, Yahr;** 2002: ExsD is a negative Regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon; *Molecular Microbiology*, 46, S. 1123-1133
- Moss, Ehrmanntraut, Banwart, Frank, Barbieri;** 2001: Sera from Adult Patients with Cystic Fibrosis Contain Antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* Type III Apparatus; *Infection and Immunity*, 69, S. 1185-1188
- Murken, Cleve;** 1996: *Humangenetik*, 6. Aufl., S. 105f
- Olson, Fraylick, McGuffie, Dolan, Yahr, Frank, Vincent;** 1999: Interruption of Multiple Cellular Processes in HT-29 Epithelial Cells by *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S; *Infection and Immunity*, 67, S. 2847-2854
- Nagino, Kobayashi;** 1997: Influence of macrolides on mucoid alginate biosynthetic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*; *Clinical Microbiology and Infectiology*, 3, S. 432-439
- Nicas, Iglewski;** 1984: Isolation and Characterization of Transposon-Induced Mutant *Pseudomonas aeruginosa* Deficient in Production of Exoenzyme S; *Infection and Immunity*, 45, S. 470-474
- Nichols, Dorrington, Slack, Walmsley;** 1988: Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 32, S. 518-523

- Parsek, Greenberg**; 2000: Acyl - homoserine lactone quorum sensing in Gram - negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97, S. 8789-8793
- Pearson, Pesci, Iglewski**; 1997: Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes; J. Bacteriology, 179, S. 5756-5767
- Pederson, Vallis, Aktories, Frank, Barbieri**; 1999: The amino - terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small - molecular - weight GTP - binding proteins; Molecular Microbiology, 32, S. 393-401
- Pratt, Kolter**; 1999: Genetic analyses of bacterial biofilm formation; Current Opinion in Microbiology, 2, S. 598-603
- Ran, Hasset, Lau**; 2003: Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 100, S. 14315-14320
- Rowen, Deretic**; 2000: Membrane - to - cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients; Molecular Microbiology, 36, S. 314-327
- Ruckdeschel, Roggenkamp, Schubert, Heesemann**, 1996: Differential Contribution of *Yersinia enterocolitica* Virulence Factors to Evasion of Microbicidal Action of Neutrophils; Infection and Immunity, 64, S. 724-733
- Russo-Marie, Roederer, Sager, Herzenberg, Kaiser**; 1993: β -Galactosidase activity in single differentiating bacterial cells; Proceedings of the National Academy of Science of the USA; 90, S. 8194-8198
- Saiki, Gelfand, Stoffel, Scharf, Higuchi, Horn, Mullis, Erlich**; 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase; Science, 239, S. 487-491
- Sato, Frank, Hillard, Feix, Pankhaniya, Moriyama, Finck-Barbancon, Buchaklian, Lei, Long, Wiener-Kronish, Sawa**; 2003: The mechanism of

action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU; EMBO 22, S. 2959-2969

Sauer, Camper, Ehrlich, Costerton, Davies; 2001: *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm, Journal of Bacteriology, 184, S. 1140-1154

Sawa, Ohara, Kurahashi, Twining, Frank, Doroques, Long, Gropper, Wiener-Kronish; 1998: In Vitro Cellular Toxicity Predicts *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in Lung Infections; Infection and Immunity, 66, S. 3242-3249

Schweizer, Hoang; 1995: An improved system for gene replacement and xylE fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*; Gene, No.158, S. 15-22

Shime, Sawa, Fujimoto, Faure, Allmond, Karaca, Swanson, Spack, Wiener-Kronish; 2001: Therapeutic administration of anti-PcrV F(ab')(2) in sepsis associated with *Pseudomonas aeruginosa*; Infection and Immunity, 69, S. 5908-5910

Singh, Schaefer, Parsek, Moninger, Welsh, Greenberg; 2000: Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms; Nature, 407, S. 762-764

Smith, Fedyk, Springer, Mukaida, Iglewski, Phipps; 2001: IL-8 Produktion in Human Lung Fibroblasts and Epithelial Cells Activated by the *Pseudomonas* Autoinducer N-3-Oxododecanoyl Homoserine Lactone Is Transcriptionally Regulated by NF- κ B and Activator Protein-2; Journal of Immunology, 167, S. 366-374

Spoering, Lewis; 2001: Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials; Journal of Bacteriology, 183, S. 6746-6751

Sperandio, Mellies, Nguyen, Shin, Kaper; 1999: Quorum Sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 96, S. 15196-15201

- Sperandio, Torres, Kaper;** 2002: Quorum Sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*; *Molecular Microbiology*, 43, S. 809-821
- Stover, Pham, Erwin, Mizoguchi, Warrenner, Hickey, Brinkman, Hufnagle, Kowalik, Lagrou, Garber, Goltry, Tolentino, Westbrook-Wadman, Yuan, Brody, Coulter, Folger, Kas, Larbig, Lim, Smith, Spencer, Wong, Wu, Paulsen, Reizer, Saier, Hancock, Lory, Olson;** 2000: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen; *Nature*, 406, S.959-964.
- Suh, Silo-Suh, Woods, Hassett, West, Ohmann;** 1999: Effect of *rpoS* Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*; *Journal of Bacteriology*, 181, S. 3890-3897
- Sundin, Henriksson, Hallberg, Forsberg, Frithz-Lindsten;** 2001: Exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* elicits cytotoxicity without interfering with Ras signal transduction; *Cellular Microbiology*, 3, S. 237-246
- Tanaka, Takahashi;** 1994: Cloning, analysis and expression of an *rpoS* homologue gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; *Gene*, 150, S. 81-85
- Tang, DiMango, Bryan, Gambello, Iglewski, Goldberg, Prince;** 1996: Contribution of Specific *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors to Pathogenesis of Pneumonia in a Neonatal Mouse Model of Infection; *Infection and Immunity*, 64, S. 37-43
- Tateda, Comte, Pechere, Köhler, Yamaguchi, van Delden;** 2001: Azithromycin Inhibits Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*; *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 45, S. 1930-1933
- Thanassi, Hultgren;** 2000: Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane; *Current Opinions in Cell Biology*, 12, S. 420-430
- van Delden, Comte, Bally;** 2001: Stringent Response Activates Quorum Sensing and Modulates Cell Density-Dependent Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*; *Journal of Bacteriology*, 183, S. 5376-5384

- Vincent, Fraylick, McGuffie, Olson;** 1999: ADP-ribosylation of oncogenic Ras proteins by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S *in vivo*; Molecular Microbiology, 32, S. 1054-1064
- Vogel, Bonner;** 1956: Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties; Journal of Biological Chemistry, 218, S. 97-106
- Whiteley, Banger, Bumgarner, Parsek, Teitzel, Cory, Greenberg;** 2001-1: Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms; Nature, 413, S. 860-864
- Whiteley, Greenberg;** 2001-2: Promotor Specificity Elements in *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing-Controlled Genes; Journal of Bacteriology, 183, S. 5529-5534
- Whiteley, Lee, Greenberg;** 1999: Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 96, S. 13904-13909
- Whiteley, Parsek, Greenberg;** 2000: Regulation of Quorum Sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*; Journal of Bacteriology, 182, S. 4356-4360
- Yahr, Barbieri, Frank;** 1996: Genetic Relationship between the 53 - and 49 - Kilodalton Forms of Exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*; Journal of Bacteriology, 178, S. 1412-1419
- Yahr, Vallis, Hancock, Barbieri, Frank;** 1998: ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95, S. 13899-13904
- Yanagihara, Tomono, Imamura, Kaneko, Kuroki, Sawai, Miyazaki, Hirakata, Mukae, Kadota, Kohno;** 2002: Effect of clarithromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model; Antimicrobial Chemotherapy, 49, S. 867-870
- Yim, Brems, Villarejo;** 1994: Molecular characterization of the promoter of the promoter of *osmY*, an *rpoS* - dependent gene; Journal of Bacteriology, 176, S. 100-107

Yu, Boucher, Hibler, Deretic; 1996: Virulence Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Lacking the Extreme-Stress Sigma Factor AlgU; *Infection and Immunity*, 64, S. 2774-2781

6.2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ABC	ATP-bindende Cassette
A. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
ACP	Alkyl-Carrier-Protein
ADP	Adenosindiphosphat
AHL	Alkylhomoserinolacton
AI	<i>Autoinducer</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
au	frei gewählte Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
BHL	Butyrylhomoserinolacton
bp	Basenpaar(e) (<i>Base pair(s)</i>)
cAMP	cyclisches AMP
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CF	Mukoviszidose (Zystische Fibrose - Cystic Fibrosis)
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
CTP	Cytosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scan</i> (Durchflußzytometrie)
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm/Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GFP	<i>Green-Fluorescating-Protein</i>

GTP	Guanosintriphosphat
GSP	<i>General Secretory Pathway</i>
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
lat	lateinisch
LB	Luria-Bertani
LD ₅₀	Letale Dosis 50%
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
M	molar
mA	Milliampere
mF	Millifarad
MFP	Membran-Fusions-Protein
µg	Mikrogramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	mikromolar
mM	millimolar
MMA	<i>Mucoid Maintenance Agar</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
ms	Millisekunde
MTB	<i>Main Terminal Branch</i>
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
OdDHL	Oxododecylhomoserinolacton
pH	physikalische Härte

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QS	Quorum Sensing
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
s	Sekunde
S	Sedimentationskonstante
σ	Standardabweichung
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem (<i>Type-Three-Secretion-System</i>)
U	Units (Enzym-Einheiten)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
VB-Medium	Vogel-Bonner Minimalmedium
W	Watt
w/v	Anteil Gewicht pro Volumen (<i>weight for volume</i>)
v/v	Volumenanteil (<i>volume for volume</i>)

Nucleoside

A	Adenosin
T	Thymidin
U	Uridin
C	Cytosin
G	Guanosin
N	beliebig

6.3 Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die Aufnahme ins Graduiertenkolleg Infektion und Immunität, die Bereitstellung des interessanten Themas und die zahlreichen Anregungen sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Bei Herrn Dr. Michael Hogardt bedanke ich mich für die stetige Betreuung bei dieser Arbeit, das Vertrauen in meine selbständige Arbeit, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ein gesundes Maß an Skepsis, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Leo Eberl vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München danke ich für die Überlassung der Homoserinolactone.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern des Max-von-Pettenkofer-Institutes für Hygiene und Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit und Ihre dauerhafte Hilfsbereitschaft danken. Besonders erwähnen möchte ich die Arbeitsgruppe Cystische Fibrose des MvP, die mich freundlich und offen in ihrer Mitte aufgenommen hat, die Angehörigen des Graduiertenkolleges Infektion und Immunität, die die Arbeit durch konstruktive Kritik und Denkanstöße begleitet haben und Frau Dr. Daniela Brem für die umfassende Einweisung am FACS-Gerät.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Nachsicht und ihr Verständnis während dieser Arbeit.

Meinen Eltern gilt besonderer Dank für ihre Unterstützung, durch die sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

6.4 Lebenslauf

Geburtsdaten: 08.03.1977 in Gräfelfing bei München

1983-1987 **Grundschule** an der St.-Martin-Str. in München

1987-1996 Mathematisch-naturwissenschaftliches Asam-**Gymnasium** in München

Juni 1996 **Abiturprüfung** in den Fächern Mathematik, Physik, Latein und
Wirtschafts- und Rechtslehre

1996-1997 **Grundwehrdienst** als Sanitätsoldat beim Sanitätslehrbataillon 851 und
beim Gemischten Lazarettregiment 12 in München

1997-2003 **Studium der Medizin** an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

April 1999 **Ärztliche Vorprüfung**

Okt. 1999 **Famulatur:** Internistisch-Rheumatologische Praxisgemeinschaft
Prof. Dr. med. Klaus Krüger, Dr. med. Günter Kellerer, Dr. med. Paul
Kellerer

April 2000 **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

Sept. 2000 **Famulatur:** Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie der LMU

März 2001 **Famulatur:** Medizinische Poliklinik Innenstadt der LMU

Okt. 2001 **Famulatur:** Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt der LMU

April 2002 **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

2002-2003 **Praktisches Jahr** an der Chirurgischen Klinik und der Medizinischen
Poliklinik Innenstadt und am Institut für Anästhesiologie Großhadern
(LMU)

Mai 2003 **Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

2003-2004 **Arzt im Praktikum** an der Medizinischen Poliklinik Innenstadt des
Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München

seit Okt.2004 **Approbation** und Beschäftigung als **Wissenschaftlicher Angestellter**