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

Molekulare Charakterisierung der Isocitratdehydrogenase von *P. aeruginosa* und deren Bedeutung im Rahmen der metabolischen Adaptation an die Mukoviszidose-Lunge

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Martin Arnold

aus Wiesbaden

2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer:.....Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Zweitgutachter:.....Prof. Dr. Heinrich Jung

Dekan:.....Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Isocitratdehydrogenasen Icd und Idh von *P. aeruginosa* für Metabolismus, Virulenz und Stresstoleranz, insbesondere im Hinblick auf die Anpassung dieses Erregers an die Bedingungen der chronisch-infizierten CF-Lunge, untersucht. Des Weiteren wurde die Lungenadaptation von *P. aeruginosa* bei CF umfassender durch eine vergleichende Genomsequenzierung am Beispiel zweier isogener CF-Isolate, Non-Mutator-Stamm M1 (Früh-Isolat) und Mutator-Stamm M25 (Spät-Isolat), charakterisiert.

Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit konstruierte Isocitratdehydrogenase-Doppelmutante (IDH-Doppelmutante; PA14Δ*icd*Δ*idh*) infolge der Inaktivierung beider in *P. aeruginosa* vorkommenden IDH-Isoenzyme einen signifikanten Wachstumsdefekt aufweist. Die zum Vergleich ebenfalls konstruierte Malatdehydrogenase-Mutante (Mdh-Mutante; PA14 *mdh*::Gm) zeigte dagegen keinerlei Veränderungen im Wachstum. Das reduzierte Wachstumsverhalten der IDH-Doppelmutante war aerob und anaerob in LB-Medium und in ASM (artifizielles Sputum-Medium) zu beobachten. Wie zu erwarten, wurde bei PA14Δ*icd*Δ*idh* keine Isocitratdehydrogenase-Aktivität sowohl mittels Enzymtest als auch mittels der hierfür etablierten BN-PAGE (*Blue-Native*-PAGE) festgestellt. Phänotypische bzw. metabolische *Microarrays* (Biolog-System) wurden durchgeführt, um die Fähigkeit von Bakterien zur Verwertung verschiedener Substrate zu bestimmen. Dabei verhielt sich die Mdh-Mutante wie *P. aeruginosa* PA14, während die IDH-Doppelmutante dagegen nur in der Lage war, α-Ketoglutarat oder die Aminosäuren Histidin, Glutamat, Glutamin und Prolin zu verwerten. Bei Wachstum auf Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen als Supplement konnten diese Ergebnisse exakt bestätigt werden. Die Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm verhielt sich wie der Ausgangsstamm PA14, wohingegen die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nur mit α-Ketoglutarat oder den Aminosäuren Glutamat, Arginin oder Ornithin als Zusatz wachsen konnte. Wie die zur Zellvermehrung benötigte Energie bzw. die hierzu ebenfalls notwendigen Stoffwechsel-Intermediate in der IDH-Doppelmutante gebildet werden, bleibt vorerst unklar. Hierzu begonnene Isotopolog-Experimente müssen noch reproduziert und final ausgewertet werden.

Anhand von *P. aeruginosa* GeneChips wurden schließlich die Transkriptome von PA14, den beiden Einzelmutanten der Isocitratdehydrogenase PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn sowie der IDH-Doppelmutante verglichen. Dabei war zu erkennen, dass sich die beiden IDH-Einzelmutanten unter den getesteten Bedingungen (LB-Medium, aerob, 37 °C) kaum in ihrer Genexpression unterschieden. Vergleicht man die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit PA14, sind in der Mutante insgesamt 85 Gene stärker und 362 Gene schwächer exprimiert (Signifikanzkriterien: ≥ 2-fache Genexpressions-veränderung, p-Wert ≤ 0,05). Die meisten dieser Gene entfallen auf die funktionellen Gruppen „Aminosäurenbiosynthese und Stoffwechsel“ (n = 25), „Kohlenstoff-Katabolismus“ (n = 18), „Hypothetische, unklassizifierte, unbekannte Proteine“ (n = 88), „Putative Enzyme“ (n = 16), „Transkriptionale Regulatoren“ (n = 27) sowie „Transport von kleineren Molekülen“ (n = 66).

Da in der Literatur für einige pathogene Bakterien eine Verbindung von Metabolismus und Virulenz beschrieben ist, wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster für verschiedene Virulenzfaktoren von PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm mit dem Ausgangsstamm PA14 verglichen. Dabei zeigte allein PA14Δ*icd*Δ*idh* einen deutlichen Defekt bei allen drei Motilitätsformen *Swimming*, *Twitching* und *Swarming*. Des Weiteren scheint durch die Inaktivierung von Icd und Idh das Typ II-Sekretionssystem (Xcp) betroffen zu sein, da bei PA14Δ*icd*Δ*idh* weder eine relevante Elastase- noch Gesamt-Protease-Aktivität nachweisbar war. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Transkriptomanalyse, die eine deutliche Reduktion einiger Transkripte des Typ II-Sekretionssystems (z. B. mehrere *xcp*-Gene) ergab. Während PA14Δ*icd*Δ*idh* keine signifikanten Unterschiede in der Biofilm-Bildung aufwies, erschien die Pyocyanin-Produktion im Vergleich zu PA14 und PA14 *mdh*::Gm gesteigert. Um einen phänotypischen Vergleich mit lungenadaptierten CF-Isolaten zu ermöglichen, wurden einige der zuvor genannten Versuche auch mit den Stämmen M1 und M25 durchgeführt (s. auch Hoboth *et al.*, 2009).
Darüber hinaus haben einige Studien gezeigt, dass NADPH zur Abwehr gegen oxidativen Stress beiträgt. Da bei einer Inaktivierung der Isocitratdehydrogenase weniger NADPH entstehen müsste, war es denkbar, dass die IDH-Doppelmutante empfindlicher gegenüber oxidativem Stress ist. Entgegen dieser Annahme zeigte PA14Δ*icd*Δ*idh* jedoch eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Superoxidradikalbildner Paraquat und gegen bestimmte Antibiotika wie Piperacillin und Ceftazidim. Zur Klärung dieses Zusammenhangs wurden in dieser Arbeit mögliche Faktoren einer gesteigerten Resistenz untersucht (z. B. intrazelluläre Konzentrationen von NAD(P)H). Eine höhere ß-Laktamase-Aktivität, eine veränderte Lipopolysaccharid (LPS)-Biosynthese sowie eine verminderte Expression von Poringenen in der IDH-Doppelmutante könnten zu einer erhöhten Resistenz beitragen.
Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die Genome von M1 (Isolat der frühen Infektion) und M25 (Isolat der späten Infektion) sequenziert und verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass sich beide Draft-Genome bis auf zwei größere Bereiche kaum in ihrer Genanordnung und -ausstattung unterscheiden. Für beide Isolate wurde eine SNP- (*single nucleotide polymorphism*) und Indel-(Insertion/Deletion)-Analyse durchgeführt, bei der insgesamt 881 SNPs, 34 Insertionen und 113 Deletionen in M25 verglichen zu M1 festgestellt werden konnten. Ein SNP wurde bei M25 im Isocitratdehydrogenasegen *icd* (C683T) entdeckt. Verglichen mit dem Wildtyp PAO1 und PA14 von *P. aeruginosa*, zeigten auch weitere 16 CF-Isolate SNPs in *icd* und *idh*. Einige dieser SNPs haben sogar einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Isocitratdehydrogenase, auf Virulenzfaktoren oder führen zu einer erhöhten Paraquat-Resistenz. Stämme mit einer inaktiven oder verminderten IDH-Enzym-Aktivität scheinen somit im Rahmen der Anpassung von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge selektioniert zu werden.
Zusammenfassend konnte über die Isocitratdehydrogenase von *P. aeruginosa* in dieser Arbeit die Bedeutung metabolischer Funktionen für die bakterielle Virulenz und Stresstoleranz bestätigt werden. Diese Ergebnisse zeigen, welches therapeutische Potential metabolische Gene/Enzyme in (pathogenen) Bakterien haben. Infolge ihrer Rolle für die Virulenz stellt die Isocitratdehydrogenase einen geeigneten Angriffspunkt für die Therapie von Infektionen durch *P. aeruginosa* dar.

2 Summary

In this work the importance of the isocitrate dehydrogenases Icd and Idh of *P. aeruginosa* for metabolism, virulence and stress tolerance was investigated, especially with respect to the adaptation of this pathogen to chronically-infected CF lung conditions. Furthermore, the lung adaptation of *P. aeruginosa* in CF was extensively characterized by a comparative genome sequencing using the example of two isogenic CF isolates, non-mutator strain M1 (early-stage isolate) and mutator strain M25 (late-stage isolate).

Thereby it was shown that isocitrate dehydrogenase double mutant (IDH-double mutant; PA14Δ*icd*Δ*idh*) constructed in this work exhibits a significant growth defect due to the inactivation of both IDH-isoenzymes existing in *P. aeruginosa*. In contrast, the malate dehydrogenase mutant (Mdh-mutant; PA14 *mdh*::Gm), constructed for the purpose of comparison, showed no changes in its growth. The reduced growth behaviour of the IDH-double mutant was observed under aerobic and anaerobic conditions in LB medium and in ASM (artificial sputum medium). As expected, no isocitrate dehydrogenase activity was measured for PA14Δ*icd*Δ*idh* in enzyme assay as well as in the specially established BN-PAGE (*Blue*-*Native*-PAGE) assay. Phenotypic respectively metabolic microarrays (Biolog system) were conducted to determine the ability of bacteria to utilize a broad spectrum of substrates. This revealed that the Mdh-mutant behaved like PA14 of *P. aeruginosa*, whereas the IDH-double mutant PA14Δ*icd*Δ*idh* was only able to utilize α-ketoglutarate or the amino acids histidine, glutamate, glutamine and proline. These results could be confirmed using growth experiments on minimal medium supplemented with different carbon sources. The Mdh-mutant PA14 *mdh*::Gm behaved like PA14, whereas the IDH-double mutant PA14Δ*icd*Δ*idh* was only able to grow with α-ketoglutarate, glutamate, arginine or ornithine in the medium. It is not yet known how the IDH-double mutant PA14Δ*icd*Δ*idh* acquires the energy needed for cell proliferation or how required metabolic intermediates are produced. Isotopologue experiments already started for this reason have to be reproduced and evaluated finally.

Lastly, the transcriptome of PA14, both single mutants of the isocitrate dehydrogenase PA14 *icd*::Tn and PA14 *idh*::Tn and the IDH-double mutant were compared by means of *P. aeruginosa* gene chips. This demonstrated that both IDH-single mutants did not show any remarkable differences in their gene expressions under the tested conditions (LB medium, aerobic, 37 °C). Comparing the IDH-double mutant PA14Δ*icd*Δ*idh* with PA14, in total 85 genes were upregulated and 362 genes were downregulated in the mutant (significance criteria: ≥ 2-fold gene expressions alteration, p-value ≤ 0,05). Most of these genes account for the functional groups "amino acid biosynthesis and metabolism" (n = 25), "carbon catabolism" (n = 18), "hypothetical, unclassified, unknown proteins" (n = 88), "putative enzymes" (n = 16), "transcriptional regulators" (n = 27) and "transport of small molecules" (n = 66).

Since a link between metabolism and virulence is described in the literature for several pathogenic bacteria, also expression patterns of different virulence factors of the IDH-double mutant

PA14Δ*icd*Δ*idh* and the Mdh-mutant PA14 *mdh*::Gm were compared with PA14. Only PA14Δ*icd*Δ*idh* showed a significant defect for all three motility patterns swimming, twitching and swarming. Furthermore, it seems that the type II-secretion system (Xcp) is affected by the inactivation of Icd and Idh, the IDH-double mutant shows no verifiable activity of elastase or whole-protease. This result was confirmed by transcriptomic analysis, which showed significant reductions of several transcripts of the type II-secretion system (e. g. several *xcp* genes). While the IDH-double mutant PA14Δ*icd*Δ*idh* shows no significant differences in its biofilm production, the pyocyanin production seems to be increased in comparison with PA14 and PA14 *mdh*::Gm. Some of the previously mentioned experiments were performed with the strains M1 and M25 to enable a phenotypic comparison with lung-adapted CF-isolates (see also Hoboth *et al.*, 2009).

Several studies have shown that NADPH contributes to the defence against oxidative stress. As the inactivation of the isocitrate dehydrogenase may lead to a reduced production of NADPH, it seems conceivable that the IDH-double mutant exhibit a higher sensitivity to oxidative stress. Contrary to this assumption the IDH-double mutant PA14Δ*icd*Δ*idh* showed an increased resistance against superoxide radical producer paraquat and against defined antibiotics like piperacillin and ceftazidime. To investigate this phenomenon, other possible factors contributing to the increased resistance were investigated (e. g. intracellular concentration of NAD(P)H). A higher ß-lactamase activity, an altered lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis as well as a reduced expression of porin genes in the IDH-double mutant could contribute to an increased resistance.

Additionally, the genomes of the CF isolates M1 (early-stage isolate) and M25 (late-stage isolate) were sequenced and compared in this work. Thereby it was established that both draft genomes show almost no differences in their gene arrangements and equipments apart from two major regions. For both isolates a SNP- (single nucleotide polymorphism) and an Indel- (insertion/deletion) analysis were performed, where in total 881 SNPs, 34 insertions and 113 deletions were discovered in M25 as compared to M1. A SNP was detected in the isocitrate dehydrogenase gene *icd* (C683T) in M25. Compared with PAO1 and PA14 of *P. aeruginosa*, further 16 CF-isolates showed SNPs in *icd* and *idh* as well. Some of these SNPs play a role in the enzymatic activity of the isocitrate dehydrogenase, virulence factors or lead to an increased paraquat resistance. Strains with an inactivated or reduced IDH enzyme activity appear to be selected within the scope of adaptation of *P. aeruginosa* to the CF lung.

Summarizing the results of this work on the isocitrate dehydrogenase of *P. aeruginosa*, the significance of metabolic functions for bacterial virulence and stress tolerance can be confirmed. These results further show the therapeutical potential of metabolic genes/enzymes in (pathogenic) bacteria. Due to its role in virulence, the isocitrate dehydrogenase offers a suitable target for therapy of infections caused by *P. aeruginosa*.

3 Einleitung

3.1 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose (lat. mucus = Schleim; viscidus = zäh, klebrig) oder Zystische Fibrose (*cystic fibrosis*; CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbbare Krankheit aufgrund von Mutationen im *CFTR*-Gen (*cystic fibrosis conductance regulator*). Nach Erstbeschreibung der Erkrankung in den 30-iger Jahren des 20. Jahrhunderts (Fanconi *et al.*, 1936;Andersen, 1938) konnte Ende der 80-iger Jahre das für die Krankheit verantwortliche Gen auf dem Chromosom 7 (Lokus 7q31.2) entdeckt, kloniert und sequenziert werden (Kerem *et al.*, 1989;Riordan *et al.*, 1989;Rommens *et al.*, 1989). *CFTR* kodiert für einen zyklischen AMP-regulierten Chloridionenkanal, der den Elektrolyttransport an der apikalen Oberfläche von exokrinen Drüsen des Körpers beeinflusst. Funktionelle Mutationen im Gen führen meist zu einer Störung in der Proteinfaltung, dem Proteintransport oder zu einem vollständigen Ausfall von CFTR (Lee, 2009;Folkesson *et al.*, 2012). Obwohl es sich bei der CF um eine Multiorganerkrankung handelt und die Folgen des Gendefekts in den jeweiligen Organsystemen vielfältig sind, steht die Beteiligung des Respirationstraktes im Vordergrund. In den Atemwegen ist die verstärkte Schleimbildung das Leitsymptom (Lyczak *et al.*, 2002;Yoon and Hassett, 2004;Schobert and Jahn, 2010). Das hochvisköse Sekret in den Bronchien fördert die Kolonisierung mit opportunistischen pathogenen Erregern, die letztendlich eine chronische Lungenentzündung in den unteren Atemwegen verursachen (Boucher, 2004;Ramsey and Wozniak, 2005). Mehr als 90 % der CF-Patienten sterben an einer Lungeninsuffizienz infolge einer chronisch verlaufenden Lungenentzündung mit einem CF-spezifischen Erregerspektrum (Gershman *et al.*, 2006). Neben der Lungenbeteiligung zeigen CF-Patienten unter anderem eine exokrine Pankreasinsuffizienz, Galleninsuffizienz, erhöhte Elektrolyte im Schweiß sowie eine reduzierte Fertilität v. a. bei männlichen Patienten (98 %) (Davis, 1985;Ratjen and Döring, 2003;Gershman *et al.*, 2006). Zusätzlich führt eine CFTR-Mutation zu einer Beeinträchtigung von verschiedenen Komponenten des angeborenen Immunsystems, z. B. die „mukoziliäre Clearance“ (Döring and Gulbins, 2009).

In der Bundesrepublik Deutschland sind ca. 8000 Menschen an Mukoviszidose erkrankt und, mehr als 4 Millionen Menschen sind gesunde (heterozygote) Genträger (www.muko.info; www.mukoviszidose.de). Die Mukoviszidose kommt nahezu im gleichen Verhältnis bei Männern und Frauen vor (Demko *et al.*, 1995). Bei einer Inzidenz von 1 zu 2500 Geburten (abhängig vom ethnischen Ursprung) zählt die Mukoviszidose zu der häufigsten autosomal-rezessiv vererbbaren Stoffwechselerkrankung in der kaukasischen Bevölkerung (Palomaki *et al.*, 2004;Folkesson *et al.*, 2012). Trotz stetig verbesserter Behandlungsmethoden ist derzeit eine Heilung von CF-Patienten noch nicht möglich, weshalb der symptomatischen Therapie sowie der Prävention einer Lungeninfektion die zentrale Bedeutung zukommt (Lyczak *et al.*, 2002;Anderson, 2010). Inzwischen liegt die in den

letzten Jahrzehnten steigende mittlere Lebenserwartung bei etwa 37 Jahren (Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2011).

3.1.1 Das *CFTR*-Gen

Das *CFTR*-Gen besteht aus 27 Exons und umfasst 250 kb, wobei das Transkript für ein aus 1480 Aminosäuren bestehendes Transmembranglykoprotein kodiert (Boucher, 2004;Nissim-Rafinia *et al.*, 2006). Das zu der Familie der ABC-Transporter gehörende CFTR besteht aus zwei strukturell identischen Komponenten, wovon jede eine Transmembrandomäne (TMD) und eine Nukleotidbindedomäne (NBD) enthält. Beide Komponenten werden durch eine Regulatordomäne (R) verbunden, welche zahlreiche Phosphorylierungsstellen besitzt (Rowe *et al.*, 2005;MacDonald *et al.*, 2007). Sowohl die Phosphorylierung dieser Stellen durch die Proteinkinase A, welche durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert wird, als auch die Hydrolyse von ATP durch die NBDs sind essentiell für eine Aktivierung des CFTRs (Lyczak *et al.*, 2002;Nissim-Rafinia *et al.*, 2006). Je nach Zell- und Epitheltyp können durch Ein- oder Ausstrom Chloridionen durch den CFTR resorbiert oder sezerniert werden (Sheppard and Welsh, 1999;Lewarchik *et al.*, 2008).
Eine zweite Funktion des CFTR ist die Regulation von anderen Ionenkanälen der Cytoplasmamembran der Zellen, wie von Chlorid- (ORCC; (Jovov *et al.*, 1995)), Natrium- (ENaC; (Kunzelmann *et al.*, 1997)) und Kaliumkanälen (ROMK2; (Cahill *et al.*, 2000)) und dem Na^+/HCO_3 (NBC-1; (Shumaker *et al.*, 1999)) Austauscher. Weiterhin hat das CFTR einen Effekt auf die Wasserdurchlässigkeit (Aquaporin, AQP3; (Schreiber *et al.*, 1999)), den ATP-Transport und die Schleimsekretion (Nissim-Rafinia *et al.*, 2006;MacDonald *et al.*, 2007;Riordan, 2008).
Eine dritte diskutierte Funktion von CFTR ist die Bindung und Internalisierung von Bakterien. Lipopolysaccharid (LPS) von Bakterien wird durch CFTR erkannt und gebunden, sodass es zu einer anschließenden Endozytose des Kanals durch die Zelle kommt (MacDonald *et al.*, 2007). So kommt es auch zu einer Bindung von *Salmonella typhi* an synthetische Peptide, die exprimierte Domänen des menschlichen CFTRs entsprechen (Mimikry) (Pier *et al.*, 1998).
Im Allgemeinen korreliert die Schwere des Krankheitsverlaufs mit dem Gendefekt im *CFTR*-Gen, verursacht durch unterschiedliche Mutationen, wie *missense*, *nonsense*, *frame-shift*, Spleiß-Varianten und Kodondeletionen *in-frame* (Lyczak *et al.*, 2002). Insgesamt können CFTR-Mutationen in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt werden, abhängig von der Veränderung der CFTR-Produktion und Funktion innerhalb der Zelle (Abbildung 3.1). Defekte im *CFTR*-Gen werden verursacht durch eine fehlende (Klasse I) oder eine teilweise defekte (Klasse V) Biosynthese aufgrund von Promotor- oder Spleißabnormalitäten, eine unzureichende Proteinreifung mit anschließender Degradierung (Klasse II), eine fehlende Regulation (Klasse III), eine reduzierte Chloridionen-Weiterleitung (Klasse IV) oder durch eine Instabilität des CFTR-Proteins an der Zelloberfläche (Klasse VI) (Rowe *et al.*, 2005;Anderson, 2010). Ungefähr 70 % der CF-Patienten tragen die weltweit häufigste Mutation

ΔF508 (Klasse II), bei der es sich um eine Deletion des Phenylalaninkodons an der Position 508 im *CFTR*-Gen handelt. Die Folge ist die Synthese eines fehlgefalteten Proteins, das meist kurz nach der Synthese degradiert wird, bevor es seine Funktion an der Cytoplasmamembran übernehmen kann. Somit kommt es zu einer erheblichen Reduktion von CFTR in der Cytoplasmamembran (Ward *et al.*, 1995;Nissim-Rafinia *et al.*, 2006;MacDonald *et al.*, 2007;Valle and Vij, 2012).

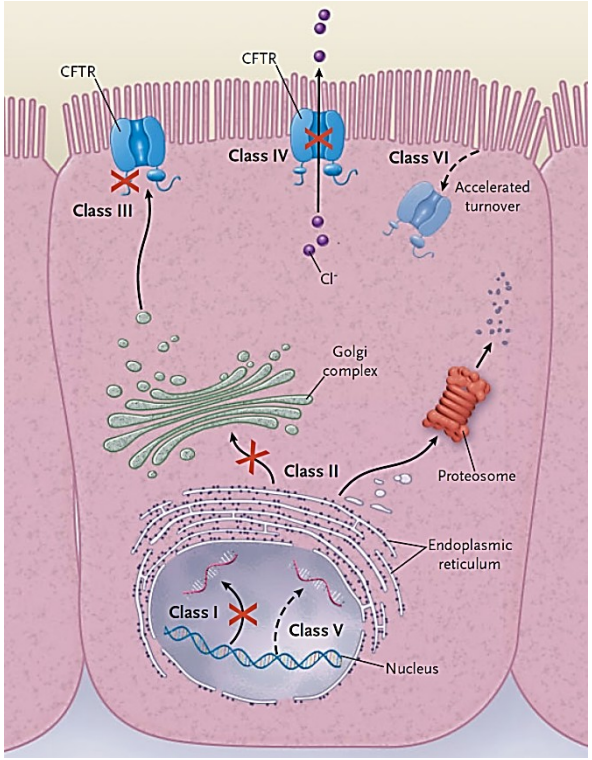


Abbildung 3.1 CFTR-Mutationsklassen
Eine abwesende Synthese (Klasse I), defekte Proteinreifung (Klasse II), ungeordnete Regulation (Klasse III), defekte Chloridionen-Weiterleitung (Klasse IV), reduzierte Synthese (Klasse V) oder instabiles Protein an der Zelloberfläche (Klasse VI) können die Ursache für einen Defekt im *CFTR*-Gen sein. (aus (Rowe *et al.*, 2005)); (Reproduced with permission from Rowe *et al.*, 2005, Copyright Massachusetts Medical Society)

3.1.2 Pathophysiologie der Mukoviszidose

An CF erkrankte Patienten besitzen zwei defekte Kopien des *CFTR*-Gens und sind ausschließlich homozygot. Heterozygote Patienten sind dagegen gesund und Mutationsträger, da sie ein intaktes und ein defektes *CFTR*-Gen besitzen. Durch die Verminderung der CFTR-Aktivität kommt es zu einer Störung des Ionentransports bei allen exokrinen Drüsen. Besonders manifestieren sich diese Störungen im Respirations- und Gastrointestinaltrakt (Gershman *et al.*, 2006). Mutierte CFTR-Proteine besitzen eine veränderte Leitfähigkeit, ein veränderten Transport, Reifung oder Stabilität, sodass es zu einer gesteigerten Aktivität des epithelialen ENaC-Kanals kommt. Diese gesteigerte Resorption von Natrium bewirkt einen ungehinderten und beschleunigten Einstrom von Wasser in die Zelle. Dies hat zur Folge, dass es zu einer Abnahme des *airway surface liquid* (ASL) kommt, einem Flüssigkeitsfilm auf der apikalen Epitheloberfläche. Die im Epithel liegenden Becherzellen sondern im großen Maße Schleim zur apikalen Oberfläche ab, der aber aufgrund des Wassermangels eindickt, wodurch die Aktivität der respiratorischen Ziliarzellen zum Erliegen kommt (Hassett *et al.*, 2002;Boucher, 2007b). Neben der Schleimbildung und der Unterbrechung der „mukoziliären Clearance“ treten rezidivierende

Entzündungen und eine Kolonisierung von Bakterien, Viren und Pilzen auf (Anderson, 2010;Lipuma, 2010). Die fortschreitende chronische Infektion und Entzündungsreaktion führt zu einer progredienten Gewebszerstörung sowie Bronchiektasen und Atelektasen mit Verlegung der Atemwege; ein Prozess der letztlich zu einer fortschreitenden Einschränkung der Lungenfunktion bis hin zum Lungenversagen führt (Anderson, 2010).

Bei gesunden Menschen gelangt der Schweiß vom Azinus der Schweißdrüse zur Oberfläche der Haut, wobei die Epithelzellen des Schweißkanals NaCl resorbieren und hypotonischer Schweiß entsteht. Als Folge des CFTR-Defekts ist der Schweißkanal bei CF-Patienten für Cl^--Ionen impermeabel, NaCl bleibt in der Sekretion zurück und der Schweiß ist salzig (Lyczak *et al.*, 2002;Rowe *et al.*, 2005). Chloridkonzentrationen im Schweiß von mehr als 60 mmol/l sind charakteristisch für Mukoviszidose (Ratjen and Döring, 2003).

Das Fehlen der Aktivität von CFTR hat auch Auswirkungen auf andere Organe. Ungefähr 90 % der CF-Patienten weisen eine exokrine Pankreasinsuffizienz auf, bei der es zu Appetitlosigkeit, Übelkeit/Erbrechen sowie zu einer verstärkten Mangelernährung kommen kann (Ratjen and Döring, 2003). Die ungenügende Freisetzung von Verdauungsenzymen des exokrinen Pankreas im Dünndarm führt zu Gewebszerstörung und Fibrose sowie einer reduzierten Aufnahme von Fetten und fettlöslichen Vitaminen (A, D, E und K), wodurch es zu einer Steatorrhoe kommen kann (Ratjen and Döring, 2003;Gershman *et al.*, 2006). Assoziiert mit der Zerstörung des Pankreas haben Patienten (in der Regel > 20 Jahren) eine verstärkte Inzidenz für Diabetes mellitus (Couce *et al.*, 1996;Lyczak *et al.*, 2002). Mit Hilfe einer *pancreatic enzyme replacement therapy* (PERT-Therapie) kann letzteres kompensiert werden (Sikkens *et al.*, 2010).

CFTR wird in den Zellen des Gallengangs gebildet, sodass ein Drittel der Patienten abnormale Leberenzyme aufweisen (Ratjen and Döring, 2003). Bei der Autopsie von CF-Patienten wurde bei 25 % eine Leberbeeinträchtigung und biliäre Zirrhose festgestellt (Gershman *et al.*, 2006). Außerdem kann es im frühen Kindesalter oder bei Mangelernährung zu einer Fettleber (Steatosis hepatis) kommen (Dodge and Turck, 2006). Eine kleine, schlecht arbeitende Gallenblase ist bei mehr als 30 % bei CF-Patienten vorhanden, Gallensteine bei mehr als 10 % (Ratjen and Döring, 2003;Gershman *et al.*, 2006).

3.1.3 Abwehrmechanismen in der CF-Lunge

Bei CF lassen sich auch ohne den Nachweis einer bakteriellen oder viralen Infektion Anzeichen für eine Entzündung in den CF-Atemwegen finden, z. B. begründet durch ein verstärktes Vorkommen von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), durch überhöhte Konzentrationen des Interleukins-8 (IL-8) sowie freie Proteasen (Khan *et al.*, 1995;Tirouvanziam *et al.*, 2000;Verhaeghe *et al.*, 2007;Al Alam *et al.*, 2010). Kommt es zu einer Infektion mit Bakterien, so binden immunstimulierende *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie beispielsweise

Zellwandkomponenten, LPS, Flagellen und DNA, an Rezeptoren der Lungenepithelzellen, sog. Toll-like-Rezeptoren (TLR). Durch diese Bindung kommt es zu einer raschen Aktivierung von Signalkaskaden des angeborenen Immunsystems. Transkriptionsregulatoren, z. B. NF-κ-B oder Interferon 3 (IF-3), aktivieren die Synthese weiterer Gene z. B. für verschiedene Interleukine (IL) oder *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Bei verschiedenen *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass ein defektes CFTR (ΔF508) zu einer konstitutiven Aktivierung von NF-κ-B führt (Weber *et al.*, 2001;Vij *et al.*, 2009). Weitere Studien zeigten, dass es bei CF-Epithelzellen zu einer verstärkten Ausbildung von TLR-2 und TLR-5 kam, während die Expression von TLR-4 vermindert war (Muir *et al.*, 2004;Greene *et al.*, 2005;John *et al.*, 2010).

Eine andere Komponente des angeborenen Immunsystems ist die permanent aktive „mukoziliäre Clearance“, welche die menschlichen Atemwege schützt. Bei CF-Patienten kommt diese protektive Funktion durch den viskösen Schleim teilweise oder sogar komplett zum Erliegen, sodass sich Bakterien in der zähen Schleimschicht der Epithelzellen etablieren können (Worlitzsch *et al.*, 2002;Boucher, 2007a). Ein weiterer prädisponierender Faktor für die Kolonisierung durch Bakterien besteht darin, dass die von den submukosalen Drüsen oder Epithelzellen gebildeten bakteriolytischen Enzyme und sog. *cationic antimicrobial (poly)peptides* (CAMPs), z. B. ß-Defensine (Selsted and Ouellette, 2005), nicht ausreichend in die Mukusschicht sekretiert werden können (Verkman *et al.*, 2003;Joo *et al.*, 2004). Des Weiteren werden aufgrund des dehydratisierten Mukus eine Migration und das Abtöten von Bakterien durch rekrutierte PMN erschwert (Matsui *et al.*, 2005).

Epithelzellen nutzen den CFTR als Rezeptor zur Internalisierung von Bakterien, um diese über Endozytose aufzunehmen und schließlich aus den Atemwegen zu entfernen. Die Bindung erfolgt über die Interaktion zwischen *outer core* des LPSs der Bakterien und exponierten Domänen des CFTR. Experimente mit infizierten Mäusen zeigten, dass eine inhibierte CFTR-vermittelte Endozytose zu einer höheren Anzahl an Bakterien in der Lunge führt (Pier, 2000).

Die Kolonisierung der Atemwege durch Bakterien führt zu einer kontinuierlichen Entzündungsantwort, worauf ein Einstrom von PMN folgt sowie eine Aktivierung von Makrophagen, Eosinophilen, Monozyten und Lymphozyten (Rahman, 2003). Ein wesentlicher Teil der Entzündungsreaktion ist die Bildung von freien Radikalen (z. B. O_2^-, H_2O_2, HOCl und NO), wie *reactive oxygen species* (ROS) und *reactive nitrogen species* (RNS) durch Immunzellen (Ntimbane *et al.*, 2009). ROS bzw. RNS sind äußerst reaktiv, denn sie reagieren mit wichtigen zellulären Komponenten (Lipide, Proteine, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate), was zu einer Kettenreaktion führen kann, bei der neue Radikale oder Nebenprodukte gebildet werden (Halliwell, 1994). Die Freisetzung von ROS führt auch zu der Aktivierung der Produktion proinflammatorischer Zytokine IL-6 bzw. IL-8, sodass es zu einer Rekrutierung von weiteren Immunzellen kommt (Bartling and Drumm, 2009;Bérubé *et al.*, 2010). Eine defekte Autophagie und eine reduzierte CFTR-Produktion konnte ebenso durch ROS festgestellt werden (Cantin *et al.*, 2006;Luciani *et al.*, 2010). Unter normalen Bedingungen ist das intakte CFTR entscheidend für eine Regulation der NF-κ-B-Aktivität (Boncoeur *et al.*, 2008).

Respiratorische Epithelzellen sind zum einen hohen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und zum anderen haben sie den ersten Kontakt zu ROS in der Lunge, die aufgrund von Entzündungen, inhalierten Xenobiotika und durch den körpereigenen Metabolismus entstehen. Um sich dagegen zu schützen, verfügen Zellen über verschiedene nichtenzymatische und enzymatische Antioxidationsmechanismen. Antioxidantien sind Substanzen, die die Oxidation eines Substrates beträchtlich verzögern, inhibieren oder entfernen (Gutteridge and Halliwell, 2010). Eine nichtenzymatische Abwehr beinhaltet bestimmte Vitamine und kleinere Komponenten wie Thiole. Den wesentlichen Anteil der enzymatischen Abwehr bilden die Superoxiddismutase (SOD), Katalase (KAT) und Glutathionperoxidase (GPX) (Wright *et al.*, 1994;Halliwell and Cross, 1994;Halliwell and Whiteman, 2004;Rada and Leto, 2008;Rottner *et al.*, 2011). Oxidativer Stress ist vorhanden, wenn ein Überschuss an freien Radikalen (pro-Oxidantien) gegenüber der antioxidativen Wirtabwehr besteht, was zur Schädigung oder zum Tod der(s) Zelle/Gewebes führen kann (Halliwell, 1994;Kelly, 2003). CF-Patienten sind besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress, ausgelöst durch eine konstitutive und körperfremde aktivierte Entzündung, weil die Produktion von Oxidantien übermäßig hoch ist und die antioxidativen Abwehrmechanismen vermindert sind (Wood *et al.*, 2005;Cohen, 2012).
Für *in vitro*-Experimente wird Paraquat (Synonym Methylviologen) als ROS- bzw. Superoxidradikal-bildner eingesetzt (Bus and Gibson, 1984;Schulte and Michel, 2006;Gil *et al.*, 2007). Die Toxizität von Paraquat beruht auf zwei verschiedenen Effekten: Durch das unter Sauerstoff gebildete Superoxidradikal kann es zur Bildung weiterer toxischer ROS kommen, wie H_2O_2 und $OH^{\cdot}$, und/oder es kommt zur Oxidation z. B. von NADPH, das für viele wichtige biologische Prozesse notwendig ist (Bus and Gibson, 1984;Suntres, 2002). Paraquat kann bei Menschen und Ratten akute Lungenverletzungen verursachen, die im schlimmsten Falle zum Tod führen (Smith, 1986;Xiangdong *et al.*, 2011).

3.1.4 Kolonisierung der CF-Lunge durch pathogene Erreger

Der Respirationstrakt besteht aus den oberen und den unteren Atemwegen, die sehr unterschiedliche Habitate für Atemwegserreger darstellen. Die oberen Atemwege mit dem konduktiven Bronchialsystem dienen der Luftleitung und der Bildung des Atemwegsmukus. Hier sind günstige Bedingungen für eine bakterielle Kolonisierung vorhanden. Dieser Bereich kann unterschiedliche Mengen an Antibiotika, Nährstoffe und Sauerstoff enthalten. Erreger sind in diesem Bereich osmotischem und oxidativem Stress ausgesetzt. Das in den unteren Atemwegen gelegene respiratorische Bronichalsystem besteht aus Bronchiolen und Alveolen, die für Erreger nur unter bestimmten Bedingungen zugänglich sind. Eine Besiedlung mit Bakterien ist mit einer substantiellen Lungenzerstörung verbunden (Høiby, 2011;Folkesson *et al.*, 2012).
Eine dehydratisierte visköse Mukusschicht und ein damit verbundener Verlust der Clearance ermöglicht eine chronische Kolonisierung mit Erregern in der Lunge (Boucher, 2007b). Das Sputum von CF-Patienten stellt eine optimale Nährstoffgrundlage für Bakterien dar (Ohman and Chakrabarty,

1982;Schobert and Jahn, 2010). Aminosäuren als wichtige Kohlenstoffquelle, Proteine, Muzin, Lipide und hochmolekulare DNA sind reichlich vorhanden (Sriramulu *et al.*, 2005;Landry *et al.*, 2006;Hoboth *et al.*, 2009;Fung *et al.*, 2010). Daneben enthält der CF-Mukus inflammatorische Substanzen (z. B. Antikörper, antimikrobielle Peptide, tote Wirtszellen, Serumkomponenten), Bakterien und deren Produkte (Palmer *et al.*, 2005). Die Diffusion von Sauerstoff ist aufgrund des viskösen CF-Mukus in den Atemwegen stark gestört, sodass der Mukus für mikroaerophile und anaerobe Bakterien günstige Wachstumsbedingungen aufweist. Zusätzlich wird der Sauerstoff durch das Bronchialepithel, Neutrophile und kolonisierende Bakterien verbraucht (Yoon and Hassett, 2004).

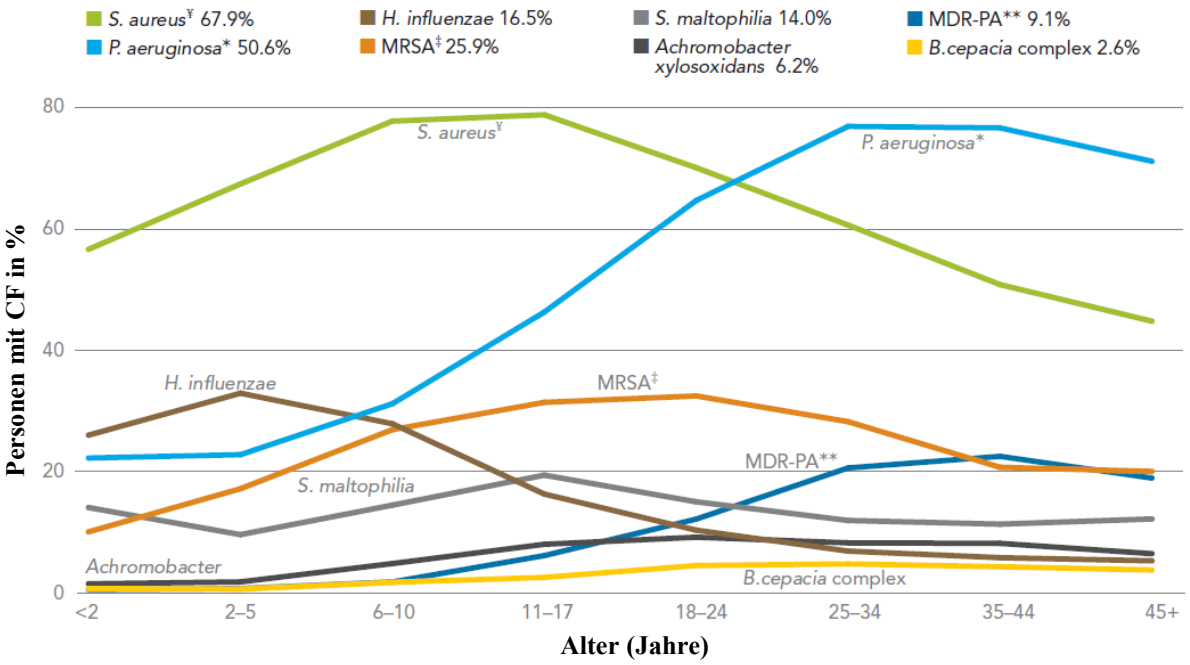


Abbildung 3.2 Altersabhängige bakterielle Besiedlung der CF-Lunge
* einschließlich Patienten mit MDR-PA; ** multidrug-resistenter *P. aeruginosa* (MDR-PA); ¥ einschließlich Patienten mit MRSA; ‡ Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA)
(Abbildung modifiziert nach Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2011)

CF-Patienten besitzen aufgrund ihrer mikrobiellen Flora in den Atemwegen ein komplexes und diverses Milieu, in dem zu 90 % mindestens einer der folgenden typischen Erreger vorkommt: *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Burkholderia cepacia* (Gershman *et al.*, 2006;Harrison, 2007). Eine polymikrobielle Infektion durch „echte“ pathogene Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* (Smith *et al.*, 1984), durch Pilze (Haase *et al.*, 1991) oder Viren (van Ewijk *et al.*, 2005) ist selten. Wie 16S rRNA-Sequenzierungen zeigten, dürfte das wahre Erregerspektrum weitaus größer sein, da viele Erreger nicht kultivierbar sind (Maughan *et al.*, 2012;Lynch and Bruce, 2013). Während die CF-Lunge von Neugeborenen zunächst steril ist (Boucher, 2007a), wird sie später häufig durch *S. aureus*, *H. influenzae* oder *P. aeruginosa* besiedelt (Abbildung 3.2). Durch die häufige Gabe von Antibiotika kommt es mit der Zeit zur Bildung von multiresistenten Varianten von *P. aeruginosa*. Zusätzlich stellen häufig nosokomial erworbene

Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme (MRSA) ein großes Problem dar (Conway *et al.*, 2003;Goss and Muhlebach, 2011). Bei der altersabhängigen Besiedlung durch Bakterien setzt sich im Erwachsenenalter *P. aeruginosa* als dominierender Keim durch. Er erreicht innerhalb des Atemwegssekretion eine sehr hohe Dichte von 10^8 bis 10^{10} Bakterien/ml (KBE/ml) (Palmer *et al.*, 2005).

3.1.5 Therapiemöglichkeiten der Mukoviszidose

Die Therapie der CF beruht auf verschiedenen symptomatischen Therapieformen, denn eine kausale Therapie, d. h. die Korrektur des Gendefekts, ist derzeit nicht möglich (Ratjen and Döring, 2003). Einen hohen Stellenwert nimmt die Inhalation von schleimlösenden- (z. B. DNase oder hypertone Salzlösungen (Fuchs *et al.*, 1994;Elkins *et al.*, 2006)), Bronchien-erweiternden- (z. B. Salbutamol oder Mannitol; (Ziebach *et al.*, 2001;Wills, 2007)), antiinflammatorischen Substanzen ein (z. B. Corticosteroide; (Balfour-Lynn and Welch, 2012)). Eine der wichtigsten Behandlungsformen ist die orale, intravenöse (systemische) oder inhalative (lokale) Gabe von Einzelantibiotika oder Antibiotikakombinationen. (Taccetti *et al.*, 2008). Die Wahl, Dauer und Frequenz der Therapie hängen von der Schwere der Infektion ab. Zur oralen Behandlung wird z. B. Ciprofloxacin eingenommen, während z. B. Tobramycin oder Aztreonam geeignete Antibiotika zur Inhalation sind (Schölmerich *et al.*, 2005;Anderson, 2010;Bals *et al.*, 2011). Die intravenöse Behandlung erfolgt z. B. mit Ciprofloxacin, *Pseudomonas*-wirksamen ß-Laktam-Antibiotika (Piperacillin, Ceftazidim, Meropenem, Aztreonam) oder Aminoglykosiden (z. B. Tobramycin) bei Exazerbationen. Einen weiteren hohen Stellenwert hat die Atemphysiotherapie zur Sekretolyse (McKoy *et al.*, 2012).

Einen kausalen Ansatz stellt die Gentherapie dar, bei der unter anderem versucht wird, die CFTR-Funktion durch Transfektion von Zellen mit Wildtyp (WT)-*CFTR*-Genen durch sog. Potentiatoren wiederherzustellen oder durch sog. Korrektoren auszugleichen (Flotte and Laube, 2001;Hirche *et al.*, 2005). Dabei kommen virale Vektoren und kationische Lipide zum Einsatz (Knowles *et al.*, 1995;Alton *et al.*, 1999), jedoch im Körper gebildete Antikörper reduzieren die Effizienz der Vektoren, wohingegen die Lipide nicht spezifisch genug für CFTR-exprimierende Zellen sind (Zabner *et al.*, 1996;Griesenbach *et al.*, 2002;Moss *et al.*, 2007). Alternativ fungieren vielversprechende Substanzen wie Phenylbutyrat, CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin) und Genistin als Chaperone (McCarty *et al.*, 2002;Andersson *et al.*, 2003), UTP (Uridintriphosphat) als Aktivator für Chlorid-Sekretion (Knowles *et al.*, 1991), Amilorid als Inhibitor für Natriumresorption (Knowles *et al.*, 1990) sowie VX-809 als potentieller Korrektor (van Goor *et al.*, 2011) oder VX-770 als Potentiator (Accurso *et al.*, 2010).

Wenn alle anderen Therapien nicht mehr wirken, bleibt als letzter Ausweg die Lungentransplantation (LTX). Die Überlebenschance nach einer LTX liegt nach 3 Jahren bei ungefähr 60 % (Liou *et al.*, 2007;Diso *et al.*, 2013).

3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, ein etwa 0,5 - 0,8 µm x 1,5 - 3,0 µm großes, polar monotrich begeißeltes Gram-negatives Stäbchenbakterium, wurde erstmals 1882 von Gessard beschrieben (Pirnay *et al.*, 2009). Aufgrund der charakteristischen Pigmentierung infolge der Produktion des blau-grünen Farbstoffes Pyocyanin wurde das Bakterium zunächst als *Bacillus pyocyaneus*, *Bacterium aeruginosum* (lat. aerugo = Grünspan) oder auch „Bacterium des grünen oder blauen Eiters" bezeichnet (Krannhals, 1893;Späth, 2009). Um die Jahrhundertwende konnten erstmalig infektiöse Eigenschaften des Erregers beschrieben werden (Krannhals, 1893;Kossel, 1894). Die Gattung *Pseudomonas* (griech. pseudo = falsch und monas = Einheit) wurde erstmalig 1894 von Walter Migula eingeführt. Mit Hilfe von 16S rRNA-Analysen wurde das aerobe Bakterium den γ-Proteobakterien zugeordnet (Anzai *et al.*, 2000).
P. aeruginosa zeigt aufgrund seiner Verbreitung in Erdboden, Wasser, Pflanzen und Tieren eine ubiquitäre Lebensweise (Rahme *et al.*, 1997;Wiehlmann *et al.*, 2007). Waschbecken, Toiletten, Duschen sowie Waschlotionen, Nahrungsmittel und sogar manche Desinfektionsmittel können mit diesem Feuchtkeim kontaminiert sein (Chitkara and Feierabend, 1981;Steinmetz, 2012). *P. aeruginosa* ist ein opportunistischer Erreger und Verursacher verschiedener akuter und chronischer (nosokomialer) Infektionen v. a. bei abwehrgeschwächten (z. B. AIDS-Patienten) oder intubierten künstlich beatmeten Patienten (Bielecki *et al.*, 2008). Das Erkrankungsspektrum reicht von Wundinfektionen, Septikämien (beispielsweise nach großflächigen Verbrennungen), Harnwegs- und Atemwegsinfektionen bis hin zur eitrigen Keratitis des Auges (Lyczak *et al.*, 2000).
Die Morphologie von *P. aeruginosa*-Kolonien kann sehr variabel sein (klein, rau, mukoid oder ausgefranst), wobei je nach Medium ein metallischer Glanz auffällt. Aufgrund der Bildung des Geruchstoffes o-Aminoacetophenon besitzt *P. aeruginosa* einen süß aromatischen, lindenblütenartigen typischen Geruch (Mann, 1966;Cox and Parker, 1979).
Das im Vergleich zu anderen Bakterien (z. B. *E. coli* ca. 4,6 Mbp) verhältnismäßig große *P. aeruginosa* Genom von 5,5 – 7 Mbp besitzt ein GC-Gehalt von etwa 66 % (Blattner *et al.*, 1997;Klockgether *et al.*, 2011). Inzwischen sind die Genomsequenzen mehrerer *P. aeruginosa*-Stämme (z. B. PAO1 und PA14) verfügbar (Winsor *et al.*, 2011).

3.2.1 Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt eine Vielzahl extrazellulärer und zellassoziierter Virulenzfaktoren, die eine wichtige Rolle für die Pathogenität des Bakteriums spielen, z. B. im Rahmen der Kolonisierung und Invasion des Wirtsgewebes sowie bei der Persistenz im Wirt (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011). Der Immunstatus des Wirts sowie das vorliegende Nährstoffangebot entscheiden, ob es zur akuten oder chronischen Infektion kommt (Sadikot *et al.*, 2005).

Viele extrazelluläre Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* werden über verschiedene Sekretionssysteme in das umliegende Medium sekretiert, unter anderem eine Vielzahl von Proteasen, Exoproteinen, Hämolysinen sowie auch Wasserstoffcyanid (HCN), ein Sekundärmetabolit. Zu den bekanntesten Vertretern der Proteasen gehören die Zink-abhängige Elastase LasB, die alkalische Protease AprA und die Protease IV. Neben Elastin hydrolisiert die Elastase auch Kollagen, Hämoglobin, Fibrin, Interferon γ, Immunoglobuline und Komplementfaktoren (Morihara *et al.*, 1965;Schultz and Miller, 1974;Heck *et al.*, 1986;Horvat *et al.*, 1989;Peters and Galloway, 1990). Durch den Abbau des Elastins, ein Strukturprotein des Lungengewebes und der Blutgefäße, kann es zu Schädigungen der Lunge und Gefäße mit Blutungen kommen (Komori *et al.*, 2001;Alcorn and Wright, 2004). Auch die alkalische Protease AprA ist in der Lage, Wirtsproteine (z. B. Komplementfaktoren und Zytokine) zu degradieren. Durch die Fähigkeit monomeres Flagellin durch AprA abzubauen, könnte es zur reduzierten TLR-5-Aktivierung kommen (Bardoel *et al.*, 2011;Laarman *et al.*, 2012). Die Serin-Protease IV hydrolysiert wichtige Wirtsproteine wie Fibrinogen, Lungenoberflächenproteine, Plasminogen, Immunoglobin und Bestandteile des Komplementsystems (Engel *et al.*, 1998;Malloy *et al.*, 2005) und ist von besonderer Bedeutung bei der Keratitis des Auges (Caballero *et al.*, 2004).

Ähnlich wie beim Diphtherie-Toxin beruht die Toxizität des unter Eisenmangel gebildeten Exotoxins A (Exo A) von *P. aeruginosa* auf einer Hemmung der Proteinbiosynthese infolge einer Ribosylierung des Elongationsfaktor 2 (Iglewski and Kabat, 1975;Bjorn *et al.*, 1979). Während das Exotoxin A über das Typ II-Sekretionssystem (T2SS) ins extrazelluläre Milieu sekretiert wird, werden je nach Pseudomonas-Art vier weitere Toxine ExoS, ExoT, ExoU und ExoY über das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) direkt in den Wirt injiziert (Durand *et al.*, 2003;Filloux, 2011). ExoS und ExoT sind bifunktionale Effektorenzyme, die einerseits eine GTPase-aktivierende Funktion (N-terminal) für Rho-GTPasen (GAP-Funktion) und andererseits eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität (C-terminal) besitzen. ExoS und ExoT führen unter anderem zu einer Schädigung des Aktin-Zytoskeletts und Inhibierung der DNA-Synthese in der Wirtszelle (Hauser, 2009). ExoU ist eine (Patatin-ähnliche) Phospholipase A2 mit breiter Substratspezifität, die zu einer aggressiven Gewebsschädigung und exzessiven Entzündung führt. Stämme, die das Toxin ExoU bilden, sind besonders virulent (Sato *et al.*, 2003;Shaver and Hauser, 2004). ExoY, eine Adenylatzyklase, ist verantwortlich für eine Anhäufung von zyklischem AMP (cAMP) in der Wirtszelle (Yahr *et al.*, 1998). Alle vier Effektorproteine benötigen Kofaktoren der Wirtszelle für ihre Aktivität (Bleves *et al.*, 2010).

Sowohl die hitzelabile Phospholipase C (PlcH) als auch das hitzestabile Glykolipid Rhamnolipid gehören zu den bekanntesten Faktoren mit Hämolyseaktivität von *P. aeruginosa* (Songer, 1997;Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Beide Faktoren zerstören Zellmembranen und den alveolären Surfactant (Zulianello *et al.*, 2006;Wargo *et al.*, 2011). Rhamnolipide zeigen zusätzlich antimikrobielle Eigenschaften gegenüber Gram-positiven und -negativen Bakterien (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

Die Produktion des Pyocyanins ist Quorum Sensing (QS)-abhängig und wird ab der spätlogarithmischen Phase beim Wachstum gebildet (Diggle *et al.*, 2003). Studien haben gezeigt, dass das

Pyocyanin Auswirkungen auf Säuger-Zellen hat: Inhibierung der Zellatmung, der ziliaren Funktion, des epidermalen Zellwachstums, der Prostacyclinfreisetzung, der Katalase sowie Unterbrechung der Calcium-Homöostase (Wilson *et al.*, 1987;Kamath *et al.*, 1995;Denning *et al.*, 1998;O'Malley *et al.*, 2003). Darüber hinaus induziert Pyocyanin die Apoptose bei Neutrophilen und moduliert den Glutathionredoxzyklus in Lungenepithel- und endothelialen Zellen (Muller, 2002;Usher *et al.*, 2002). Zusätzlich beruht die Toxizität des Pyocyanins auf der Bildung von Superoxidionen (Reszka *et al.*, 2004). Die antimikrobiellen Eigenschaften des Pyocyanins helfen *P. aeruginosa*, sich gegen andere Mikroben in der Lunge durchzusetzen (Ran *et al.*, 2003). Weitere Pigmentfarbstoffe wie das grüngelbe Pyoverdin, das rötliche Pyorubin oder das bräunliche Pyomelanin können durch das Bakterium produziert werden (Daly *et al.*, 1984). Bei Pyoverdin und Pyochelin handelt es sich um Siderophore, die in die Umgebung sezerniert werden, Eisen mit hoher Affinität komplexieren und dann über Rezeptoren wieder aufnehmen (Meyer *et al.*, 1996;Marshall *et al.*, 2009).

Die HCN-Freisetzung wird unter sauerstoffarmen Bedingungen begünstigt und führt zu einer toxischen Verschlechterung der Lungenfunktion (Blumer and Haas, 2000;Ryall *et al.*, 2008).

Die Bildung von Exopolysaccharid (EPS), Flagellen und LPS gehören zu den wichtigsten zellassoziierten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*. Ungefähr 84 % aller EPS überproduzierenden CF-Isolate sind auf eine Mutation im *mucA*-Gen zurückzuführen. MucA ist ein Repressor des Alginat-Biosynthese-Transkriptionsregulators AlgT(U) (Boucher *et al.*, 1997). Alginat ist ein Polymer aus ß-D-Mannuronsäure und α-L-Guluronsäure, das ß-1,4-glykosidisch miteinander verbunden ist (Evans and Linker, 1973). Das Polymer schützt *P. aeruginosa* vor Antibiotika (Govan and Deretic, 1996), Opsonierung (Pier *et al.*, 2001) und bietet eine erhöhte Resistenz gegenüber Phagozytose (Leid *et al.*, 2005). Des Weiteren schützt Alginat die Bakterienzelle vor ROS, hyperosmolarem Stress, Dehydratisieren und Nährstoffbegrenzung (Wallace *et al.*, 1994;Mathee *et al.*, 1999).

Ein weiterer entscheidender Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* ist die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung. Biofilme stellen Gemeinschaften sessiler Bakterien dar (10 – 20 %), eingebettet in einer polymeren Matrix. Diese besteht aus Polysacchariden, DNA, sekretierten Proteinen und Zelldetritus (Høiby *et al.*, 2001;Matsukawa and Greenberg, 2004;Mann and Wozniak, 2012). *P. aeruginosa* kann Biofilme sowohl auf abiotischen als auch biotischen Oberflächen bilden, z. B. Zähnen, Knochen, Organen, Arterien/Venen, Ventilen, Haut, Wunden sowie Kathetern und Prothesen (Hassett *et al.*, 2002;Anderson *et al.*, 2008;Høiby *et al.*, 2010). Biofilm-Bildung schützt die Bakterien gegenüber Antibiotika und antimikrobiellen Wirtsubstanzen (Aaron *et al.*, 2002), Phagozyten und Antikörpern (Donlan and Costerton, 2002), osmotischem und oxidativem Stress (Le Magrex-Debar *et al.*, 2000;Jesaitis *et al.*, 2003) sowie gegen UV-Strahlung, Metall-Toxizität und Säuren (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Darüber hinaus zeigen biofilmbildende Bakterien auch ein deutlich verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu planktonischen Zellen (Donlan and Costerton, 2002).

Die Biofilm-Bildung kann in fünf sequentielle Phasen eingeteilt werden: Nicht-mukoide bewegliche und planktonische Stämme (I) **kolonisieren reversibel/irreversibel** zuerst eine Oberfläche, woran

meist die Flagelle und/oder **Typ IV-Pili** beteiligt sind (II). Danach können sich unter anderem durch die Produktion von EPS (Alginat) und der Kommunikation mittels Quorum Sensing (QS) **Mikrokolonien** bilden (III). Virulenzfaktoren wie Flagellen werden herunterreguliert. Die anschließende **Biofilmreifung** (IV) ist verbunden mit fortschreitenden dreidimensionalen dicken Biofilmen (mund- bzw. pilzförmig), die mit winzigen Wasserkanälen durchzogen sind, die Nährstoffe und Sauerstoff hinein- und Abfallstoffe heraustransportieren. Des Weiteren entstehen Sauerstoffgradienten bei diesem heterogenen Milieu, bei dem die höchste Konzentration an der Oberfläche und die niedrigste oder keine im Inneren des Biofilms aufzufinden ist. Durch mechanische Störungen oder durch das Erreichen von neuen Nischen kann es zum Verlassen von einzelnen Bakterien oder Bakteriengruppen kommen (**Biofilmdesintegration**) (V) (Elder *et al.*, 1995;Stoodley *et al.*, 1999;Høiby *et al.*, 2001;Hassett *et al.*, 2002;Sauer *et al.*, 2002;Ramsey and Wozniak, 2005). *P. aeruginosa* persistiert in Makrokolonien im CF-Mukus und nicht auf der Oberfläche des Bronichalepithels (Worlitzsch *et al.*, 2002).

Für die Motilität benötigt *P. aeruginosa* eine Flagelle, um nicht nur in einer Umgebung zu den Nährstoffquellen zu gelangen, sondern auch, um sich an die Oberflächenzellen des Wirtes anzuheften (Montie *et al.*, 1982;Wei *et al.*, 2011b). Das Flagellin, der Baustein der Flagelle, wird durch TLR-5 auf der Oberfläche der Wirtszelle erkannt, wodurch eine Immunantwort im Wirt ausgelöst wird (Zhang *et al.*, 2005). Indirekt beeinflusst die Flagelle auch die Biofilmentwicklung (Klausen *et al.*, 2003) und Bakteriophagenanheftung (Schade *et al.*, 1967). Wahrscheinlich werden verschiedene Habitate verschiedene Motilitätsformen favorisieren (Fux *et al.*, 2005). So besitzt *P. aeruginosa* neben der Flagelle noch retraktierbare polare Typ IV-Pili, die dem Bakterium erlauben, sich auf festen organischen und anorganischen Oberflächen mittels *Twitching* fortzubewegen (Mattick, 2002). Durch das Schwärmen, eine Pili-Flagellenkombination verknüpft mit einer Produktion weiterer Faktoren wie Rhamnolipid, kann *P. aeruginosa* sich auf halbfesten Oberflächen bewegen. Dieses Gruppenverhalten wird durch QS reguliert, sodass für die Initiierung eine bestimmte Zellzahl (Quorum) benötigt wird (van Alst *et al.*, 2007). Durch das Rotieren der Flagelle im oder gegen den Uhrzeigersinn in einer wässrigen Umgebung ist *P. aeruginosa* fähig zu schwimmen (Armitage and Evans, 1983).

Das LPS von *P. aeruginosa* bindet an Rezeptoren des Wirtes (TLR-4), was eine proinflammatorische Immunantwort im Wirt auslöst. Das LPS kann in drei größere Bereiche unterteilt werden: das Lipid A, die sog. *core*-Region und die O-spezifischen Polysaccharidseitenketten (King *et al.*, 2009). Modifikationen beim Lipid A (Endotoxin) und der O-spezifischen Polysaccharidseitenkette beeinträchtigen die Immunreaktionen des Wirtes (Ernst *et al.*, 1999;Lam *et al.*, 2011).

3.2.2 Kommunikation von *P. aeruginosa* mittels Quorum Sensing

Die Zell-Zell-Kommunikation bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien erfolgt über frei diffundierende Botenstoffe sog. Autoinduktoren und wird als Quorum Sensing (QS) bezeichnet. Wird der Botenstoff von Bakterien ausgeschieden und sind nur wenige Bakterien an einem Ort, so hat der diffundierbare Signalstoff aufgrund der niedrigeren Konzentration keinen Einfluss auf sie. Die Signalmoleküle werden erst ab einer kritischen Konzentration von den Bakterienzellen wahrgenommen, bzw. wenn eine bestimmte Bakteriendichte vorhanden ist (Wagner *et al.*, 2006). Die erhöhte Konzentration des Signalmoleküls führt nun zur Aktivierung der eigenen Botenstoff-Produktion sowie zur Expression zahlreicher Gene. Durch das QS sind Bakterien in der Lage, koordiniert z. B. neue Umweltbereiche zu erschließen bzw. bessere Nährstoffe zu finden. Sie können ebenfalls über das QS ihren Lebensstil kollektiv an neue Bedingungen anpassen und durch eine kooperative Produktion von Virulenzfaktoren die Abwehrmechanismen des Wirtes überstehen (de Kievit and Iglewski, 2000).

Insgesamt sind drei verschiedene QS-Systeme in *P. aeruginosa* bekannt: Die beiden vorrangigen Las- und Rhl-Systeme sowie das Pqs-System (McKnight *et al.*, 2000) (Abbildung 3.3). Wie Transkriptionsanalysen zeigten, werden über 300 Gene durch die Las- und Rhl-Systeme reguliert, beim Pqs-System sind es weit über 100 Gene (Schuster *et al.*, 2003;Déziel *et al.*, 2005). Jedes System ist aus einem Transkriptionsregulatorprotein LasR, RhlR oder PqsR und einem zugehörigen Autoinduktionssignalmolekül aufgebaut. Das N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlakton (3O-C_{12}-HSL) wird produziert durch LasI im Las-System, N-Butanoyl-Homoserinlakton (C_4-HSL) durch RhlI im Rhl-System und 2-Heptyl-3-Hydroxy-4-Quinolon (PQS) und andere Klassen von Alkylquinolone durch PqsABCD sowie PqsH im Pqs-System (Wilder *et al.*, 2011). Sobald eine hohe Zellpopulation erreicht ist, bilden der Induktor und der jeweilige verwandte Regulator einen Komplex und aktivieren zusammen die Gentranskription (Wagner *et al.*, 2006). Über die QS-Systeme wird die Produktion von Virulenzfaktoren wie Elastase, Alkalische Protease, Exotoxin A, Exoenzyme, Xcp-Sekretion, Pyocyanin, Pyoverdin, Biofilm (Initiation und Reifung), Cyanid, Chitinase, Rhamnolipid und Lektin reguliert (Whiteley *et al.*, 1999;Heydorn *et al.*, 2002;Hogardt *et al.*, 2004;Schaber *et al.*, 2007;Dubern and Diggle, 2008;Williams and Camara, 2009;Tashiro *et al.*, 2013). Der Ausfall eines oder mehrerer QS-Systeme kann in *P. aeruginosa* einen Virulenzdefekt auszulösen (Schaber *et al.*, 2004). Interessanterweise kann es in den CF-Atemwegen während des Wachstums von *P. aeruginosa* unter reichen Nährstoffbedingungen zu *lasR*-Mutanten kommen (D'Argenio *et al.*, 2007).

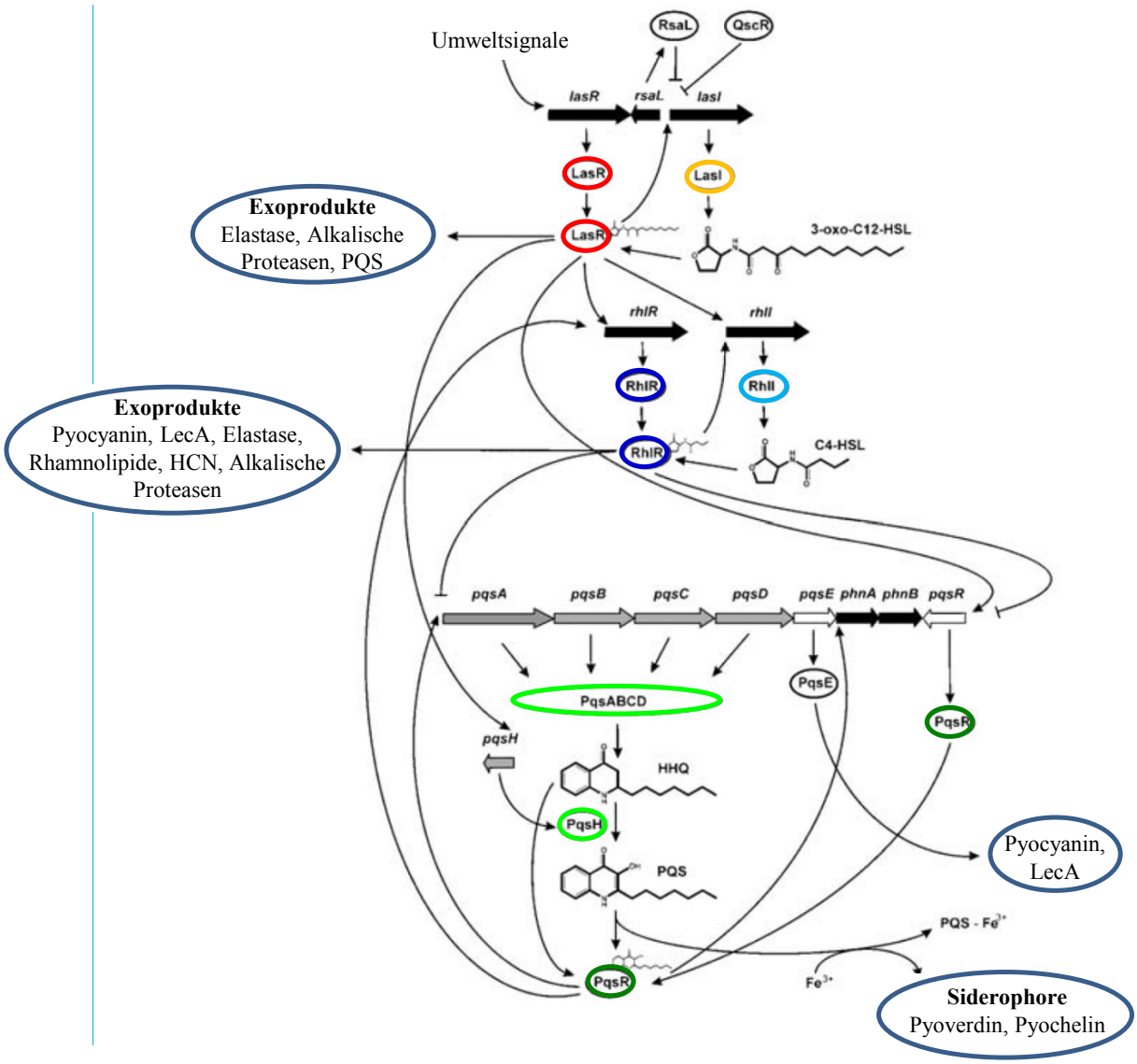


Abbildung 3.3 Quorum Sensing (QS)-Systeme in *P. aeruginosa*
Dargestellt sind die Operons der QS-Systeme (Las, Rhl und Pqs) aus *P. aeruginosa* durch ihre Genprodukte und ihre regulatorischen Netzwerke. LasR (Rot), RhlR (Dunkelblau), PqsR (Dunkelgrün): Regulatoren des jeweiligen QS-Systems; LasI (Orange), RhlI (Hellblau), PqsABCDH (Hellgrün): Induktoren des jeweiligen QS-Systems. (Abbildung modifiziert nach (Dubern and Diggle, 2008)); (Adapted from Dubern and Diggle, 2008 with permission from The Royal Society of Chemistry)

3.2.3 Metabolismus von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa zeigt eine bemerkenswerte metabolische Vielseitigkeit und ist z. B. in der Lage, sich in einem breiten Temperaturbereich zwischen 9 °C und 42 °C zu vermehren, wobei die optimale Wachstumstemperatur bei ca. 37 °C liegt (Stanislavsky and Lam, 1997;Termine and Michel, 2009). Zur Energiegewinnung nutzt *P. aeruginosa* hauptsächlich einen oxidativen Energiestoffwechsel, bei dem Sauerstoff als Elektronenakzeptor fungiert. So wird ca. 2/3 der Glukose bei *P. aeruginosa* über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut, die übrigen ca. 1/3 über den Pentosephosphatweg. Es konnte kein vollständiger Glykolyseweg nachgewiesen werden. *P. aeruginosa* kann organische Säuren verwerten und Kohlenhydrate durch Glukoneogenese synthetisieren (Ng and Dawes, 1973). Des

Weiteren ist *P. aeruginosa* in der Lage, eine Vielzahl weiterer Substanzen wie Carbonsäuren, kleine aromatische Verbindungen, Aminosäuren und deren Derivate zu verwerten (Tamber *et al.*, 2006). Eine Assimilation von azyklischen Monoterpenen durch *P. aeruginosa* konnte ebenfalls gezeigt werden (Cantwell *et al.*, 1978). Sogar Xenobiotika wie n-Alkane oder (halogenisierte) aromatische Kohlenwasserstoffe ermöglichen ein Wachstum von *P. aeruginosa* (Hickey and Focht, 1990;Marìn *et al.*, 2003). Selbst kleine Spuren von organischen Verbindungen in destilliertem Wasser ermöglichen *P. aeruginosa* die Vermehrung (Favero *et al.*, 1971).

Den Citratzyklus nutzt *P. aeruginosa*, um Abbauprodukte von Zuckern, Proteinen und Fettsäuren zu metabolisieren und Energie über die Bildung von Reduktionsäquivalenten NADH bzw. FADH oder GTP zu gewinnen. Hierbei entsteht über die Atmungskette ATP. Zum anderen stellt der Citratzyklus wichtige biosynthetische Intermediate für die Glukoneogenese bereit (z. B. Succinat und Citrat; (Ng and Dawes, 1973)), die vor anderen Kohlenhydraten (z. B. Glukose) bevorzugt verwertet werden, was auch als „reverse“ Diauxie bezeichnet wird (Ng and Dawes, 1973;Wolff *et al.*, 1991). Der Glyoxylatweg, ein „Kurzschluss“ des Citratzyklus, ist ein anaplerotischer Stoffwechselweg, der das Wachstum mit alleinigem C_2-Körper wie Acetyl-CoA erlaubt, da er die CO_2-generierenden Schritte des vollständigen Citratzyklus umgeht.

Interessanterweise liegen viele Enzyme des Citratzyklus in zwei oder mehr Isoenzymen in *P. aeruginosa* vor, wie eine Genomsequenzierung gezeigt hat (Abbildung 3.4) (Winsor *et al.*, 2011). Die Isocitratdehydrogenase stellt ein Schlüsselenzym des Citratzyklus dar, weil sie 1) die enzymatische Reaktion von Isocitrat zu α–Ketoglutarat katalysiert, 2) den Abbau von Substraten zwischen Citratzyklus und Glyoxylatweg steuert und 3) durch die Produktion von NADPH einen Beitrag zur Energiegewinnung leistet. Im Vergleich zu den meisten Bakterienarten wie *E. coli* besitzt *P. aeruginosa* zwei Gene (*icd* und *idh*), die für eine Isocitratdehydrogenase kodieren. Lediglich ein paar Ausnahmen wie *Ralstonia eutropha*, *Colwellia psychrerythraea* oder *M. tuberculosis* besitzen ebenfalls zwei Isoenzyme (Banerjee *et al.*, 2005;Maki *et al.*, 2006). Wie gezeigt werden konnte, sind beide Isoenzyme Icd und Idh von *P. aeruginosa* strikt $NADP^+$-abhängig (Eichner, 2012). Des Weiteren wird unter aeroben und anaeroben Bedingungen die Idh konstitutiv exprimiert, während die Icd zur stationären Phase hin ihr Expressionsmaximum erreicht. Ebenso konnte auf transkriptionaler Ebene eine RpoS-abhängige Regulation des *icd*-Gens bestätigt werden, jedoch nicht für das *idh*-Gen (Eichner, 2012). Posttranslational wird in *E. coli* die dimere Isocitratdehydrogenase IcdA durch Phosphorylierung (ATP-abhängig)/Dephosphorylierung an der Position 113 (Ser113) mit Hilfe der Isocitratdehydrogenase Kinase/Phosphatase AceK reguliert. Je nach Phosphorylierungsstatus der IcdA wird entweder der Citratzyklus (nicht phosphoryliert; aktiv) oder der Glyoxylatweg (phosphoryliert; inaktiv) begünstigt (Thorsness and Koshland, 1987;Hurley *et al.*, 1990;Cozzone and El-Mansi, 2005). In *P. aeruginosa* ist über die Regulation beider Isocitratdehydrogenasen wenig bekannt. Eine hohe Ähnlichkeit der Proteinsequenz (ca. 79 %) beim Vergleich der IcdA aus *E. coli* mit der dimeren Icd aus *P. aeruginosa* sowie der hoch konservierte Bereich um die Aminosäuren Ser113 (*E. coli*) und

Ser115 (*P. aeruginosa*) lassen jedoch eine ähnliche Regulation vermuten. Über die Regulation der monomeren Idh aus *P. aeruginosa* ist nichts bekannt.

Neben vier weiteren Malat-verwertenden Enzymen besitzt *P. aeruginosa* ein Gen (*mdh*), das für eine Malatdehydrogenase Mdh kodiert, welche die Konversion von Malat zu Oxalacetat unter der Freisetzung von NADH katalysiert (Kretzschmar *et al.*, 2002;Rakhimova *et al.*, 2008). Wie mehrere Studien zeigen, spielt die Mdh, wie auch die Isocitratdehydrogenase, eine wichtige Rolle für antioxidative Abwehrmechanismen der Bakterienzelle (van der Rest *et al.*, 2000;Shi *et al.*, 2009).

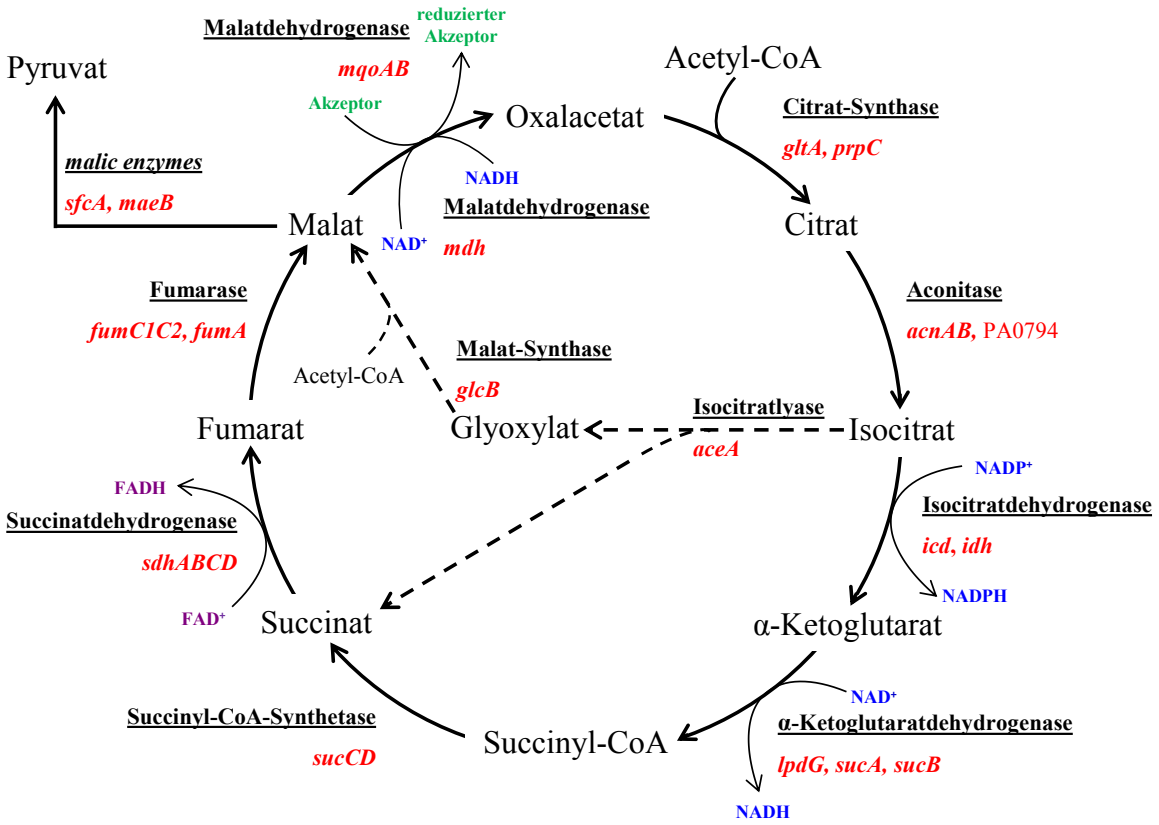


Abbildung 3.4 Citratzyklus und Glyoxylatweg von *P. aeruginosa*
Dargestellt ist der Citratzyklus und der Glyoxylatweg (gestrichelte Pfeile) von *P. aeruginosa*, einschließlich der Enzyme (Unterstrichen) und den dazugehörigen Gennamen bzw. PA-Nummer (Rot). (eigene Darstellung nach www.pseudomonas.com)

P. aeruginosa ist auch in der Lage, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen und Energie zu gewinnen. Bei fehlendem Sauerstoff kann *P. aeruginosa* die Atmungskette unter Nutzung von Nitrat oder Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor nutzen (anaerobe Atmung) (van Alst *et al.*, 2007). Ist weder Sauerstoff noch Nitrat oder Nitrit vorhanden, so kann das Bakterium durch Argininfermentation ATP gewinnen, wobei Arginin unter der Bildung von ATP zu Ornithin umgewandelt wird (van der Wauven *et al.*, 1984). Als Alternative dazu dient die Pyruvatfermentation, bei der Acetat und Laktat aus Pyruvat entsteht (Redox-Reaktion). Mit der Pyruvatfermentation kann *P. aeruginosa* bei Abwesenheit von alternativen Elektronenakzeptoren und Arginin bis zu 18 Tage überleben, jedoch sich nicht vermehren (Eschbach *et al.*, 2004). Insgesamt scheint *P. aeruginosa* ein mikroaerophiles Milieu zu bevorzugen (Sabra *et al.*, 2002).

3.2.4 Verbindung zwischen Virulenz und Metabolismus

Um in den nährstoffreichen dynamischen Umgebungen des Wirtes wachsen und sich replizieren zu können, benötigen pathogene Bakterien wie *P. aeruginosa* zur Energiegewinnung spezifische Kohlen- und Stickstoffquellen. Erschwert wird eine Besiedlung des Wirtes auch durch dessen Immunabwehrreaktionen und zum Teil durch die bereits optimal adaptierten Bakterien der Normalflora (Hibbing *et al.*, 2010). Da die Nährstoffversorgung des Wirtes sehr unterschiedlich ausgeprägt ist, sind pathogene Bakterien auf geeignete Strategien angewiesen, sich mit C-Quellen zu versorgen (Casadevall and Pirofski, 2000). So verwenden sie häufig „metabolische Sensoren", mit denen sie Veränderungen von Nährstoffkonzentrationen in den verschiedenen Habitaten wahrnehmen und sowohl ihren Metabolismus als auch ihre Virulenz regulieren/anpassen können (Somerville and Proctor, 2009). Für ein optimales Wachstum benötigen Bakterien 10^{-6} M freies Eisen (Fe^{3+}), jedoch liegt dieses im Säugerorganismus im Durchschnitt wegen des Transferrins und Lactoferrins bei 10^{-18} M vor (Foster and Spector, 1995). Dieser relative Eisenmangel wird von den Bakterien wahrgenommen, und die Produktion von Siderophoren und Virulenzfaktoren wird aktiviert (Skaar, 2010;Troxell and Hassan, 2013). Des Weiteren werden durch die Kohlenstoffkatabolitrepression in Antwort auf die Versorgung mit Kohlenstoffquellen verschiedene Virulenzmechanismen aktiviert (Poncet *et al.*, 2009;Le Bouguénec and Schouler, 2011). Eine Veränderung des bakteriellen Stoffwechsels, z. B. im Ruhezustand (Dormanz), führt zu einer veränderten Aufnahme von Antibiotika (Martinez and Rojo, 2011). Bei der sog. *stringent response* werden bei Aminosäuren- und Fettsäurenmangel mittels (p)ppGpp weitere Virulenzfaktoren aktiviert (Dalebroux *et al.*, 2010).

Mit Hilfe von Virulenzfaktoren sind pathogene Bakterien in der Lage, neue Nischen zu besiedeln, jedoch benötigen sie auch die entsprechende metabolische Genausstattung, um die dort vorhandenen Nährstoffe für sich nutzen zu können (Somerville and Proctor, 2009). Im Laufe der Evolution haben viele Bakterien hierfür ihre metabolischen Gene (und evtl. weitere Virulenzgene) durch genetische Elemente wie Pathogenitätsinseln erworben (Schmidt and Hensel, 2004). Obwohl manche metabolischen Gene habitatsspezifisch und somit unterschiedlich wichtig für die Virulenz sind, scheinen sie in den Genomen von pathogenen Bakterien konserviert zu sein (Peng and Monack, 2010;Rohmer *et al.*, 2011).

Durch *loss of functions* und weitere Mutationen (z. B. Einzelbasensubstitutionen sog. SNPs (*single nucleotid polymorphism*)) sind pathogene Bakterien nicht nur in der Lage ihr Genom bezüglich ihrer Virulenz, sondern auch ihres Metabolismus weiter anzupassen, nachdem sie z. B. die Nischen des Wirtes einmal erfolgreich besiedelt haben (Charusanti *et al.*, 2010;Hogardt and Heesemann, 2010;Zdziarski *et al.*, 2010). LasR, ein Mitglied des QS-Systems, reguliert in *P. aeruginosa* eine Vielzahl von Virulenzfaktoren (Tang *et al.*, 1996;Juhas *et al.*, 2005). Der Verlust dieses Regulators führt bei den Mutanten zu einem verbesserten Wachstum mit vereinzelten Aminosäuren und einer gesteigerten Verwertung von Nitrat im Vergleich zum WT (D'Argenio *et al.*, 2007). Eine verminderte

Virulenz sowie ein angepasster Metabolismus von *P. aeruginosa*, z. B. in Form von Auxotrophien, scheinen nützlich für eine Anpassung an die CF-Lunge zu sein (Smith *et al.*, 2006).
Weitere Studien bestätigten, dass eine regulatorische Verbindung zwischen dem Metabolom und dem Virulom besteht (Rietsch and Mekalanos, 2006;Herbst *et al.*, 2009;Pohl *et al.*, 2009;Daddaoua *et al.*, 2012). Die Stoffwechselwege der Pathogene stellen somit gute potentielle und spezifische Ziele für eine antimikrobielle Therapie dar (Eisenreich *et al.*, 2010;Birkenstock *et al.*, 2012). Es muss jedoch erwähnt werden, dass die in den Studien erzielten Ergebnisse, abhängig von dem Infektionsmodell, der Art der Infektion und der Inokulationsroute sind (Rohmer *et al.*, 2011) und damit noch nicht verallgemeinert werden können.

3.3 Chronische respiratorische Infektion durch *P. aeruginosa* bei CF

3.3.1 Mutator- und Non-Mutator-Stämme

In der CF-Lunge ist *P. aeruginosa* verschiedenen Stressfaktoren wie der Immunabwehr, einem mikroaerophilen bis anaeroben Milieu und regelmäßigen Antibiotikatherapien ausgesetzt. Um dennoch dauerhaft unter diesen Bedingungen zu persistieren, muss sich der Erreger an die speziellen Umgebungsbedingungen der CF-Lunge anpassen, z. B. durch genotypische Veränderungen. In der Folge werden in der CF-Lunge vielfältige Phänotypen von *P. aeruginosa* selektioniert (Oliver *et al.*, 2000;Worlitzsch *et al.*, 2002;Hogardt *et al.*, 2006;Folkesson *et al.*, 2012). Eine bekannte Anpassung ist das Vorkommen von sog. Mutator-Stämmen, die einen oder mehrere Defekte in einem DNA-Reparatursystem oder einem *Proofreading*-System aufweisen (Miller, 1996). Das am häufigsten betroffene System ist das *methyl-directed mismatch-repair* (MMR)-System, bei dem die Reparaturgene *mutS*, *mutL*, *mutH* oder *uvrD* involviert sind. Eine Inaktivierung des MMR-Systems, z. B. aufgrund einer Mutation im *mutS*-Gen, führt bis zu einer 1000-fach erhöhten Mutationsfrequenz, da Replikationsfehler nicht mehr ausreichend repariert werden (Oliver *et al.*, 2000;Hogardt *et al.*, 2006). Treten Mutationen in essentiellen Genen auf, kann die mutierte Variante benachteiligt sein und sogar absterben. Manche Mutationen können jedoch positive Einflüsse auf die Physiologie des Erregers haben und zu einer gesteigerten Fitness führen (Taddei *et al.*, 1997;Giraud *et al.*, 2001).
Einen beachtlichen Anteil an Adaptation von Mutator-Stämmen haben SNPs in Genen, da diese letztendlich zu Struktur- oder Aktivitätsveränderungen von Proteinen führen können. Dabei kann es zu einem vollständigen Verlust (*loss of functions*) oder zu einer leichten Verminderung/Erhöhung der Genexpression bzw. Protein-Aktivität kommen. SNPs können überall im Genom vorkommen, jedoch scheint es im Genom sog. *Hot Spots* zu geben, d. h. gewisse bevorzugte Regionen in denen Mutationen häufiger vorkommen (Vignal *et al.*, 2002;Kisiela *et al.*, 2012). Des Weiteren können auch Insertionen und/oder Deletionen (Indels) auftreten, wodurch sich das Leseraster verschiebt. Vorzeitige neue oder inaktivierte Stop-Kodons können zu einer fehlerhaften Transkription führen.

Mutator-Stämme weisen eine höhere Neigung zu DNA-Rekombinationen auf als Non-Mutator-Stämme (Rayssiguier *et al.*, 1989). Ungefähr bis zu 60 % der isolierten Mutator-Stämme stammen aus CF-Patienten mit chronischen Infektionen; bei akuten Infektionen waren es weniger als 1 % (Ciofu *et al.*, 2005;Montanari *et al.*, 2007;Mena *et al.*, 2008). Im Verlauf der Krankheit kann es zu einer Koexistenz von Non-Mutator- und Mutator-Stämmen kommen. Ebenso können vereinzelt entstandene Mutator-Stämme wieder in Non-Mutator-Stämme revertieren (Darzins and Chakrabarty, 1984;Hogardt *et al.*, 2007). Unter den sich ständig ändernden Lebensbedingungen der CF-Lunge (zahlreiche unterschiedliche Habitate) haben Mutator-Stämme wahrscheinlich einen Selektionsvorteil, da sie aufgrund ihrer erhöhten Mutationsfrequenz schneller adaptive und damit vorteilhafte Mutationen generieren können (Taddei *et al.*, 1997;Hoboth *et al.*, 2009). Der Vorteil einer effektiveren Persistenz ist jedoch mit einem wichtigen biologischen Kostenfaktor verbunden, z. B. dem Verlust andere Habitate effektiv zu besiedeln zu können (Montanari *et al.*, 2007).
Ein besonderer Phänotyp selektionierter Varianten von *P. aeruginosa*, die sog. *small colony variants* (SCV), entstehen bei chronischen Infektionen z. B. unter Aminoglykosidbehandlung. *P. aeruginosa*-SCV bilden farblose, glatte oder raue, mukoide Morphotypen bzw. Kolonien mit sichtbarer Autolyse oder autoaggregiertem Verhalten (D'Argenio *et al.*, 2002;Worlitzsch *et al.*, 2002;Häussler, 2004;Hogardt *et al.*, 2007). SCVs zeigen nach 48 h Wachstum auf einem Agarmedium einen Koloniendurchmesser von nur 1 - 3 mm. Sie weisen im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1 eine erhöhte Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika, eine verstärkte Biofilm-Bildung, reduzierte Motilität und ein autoaggregatives Wachstumsverhalten auf (Häussler *et al.*, 1999;Starkey *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Eigenschaften werden sie auch als Persister-Zellen in der CF-Lunge angesehen, welche schwerer zu eradizieren sind (Wei *et al.*, 2011a).

3.3.2 Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge durch horizontalen Gentransfer

Neben der Adaptation durch Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen kann ebenso der Verlust, die Veränderung und der Erwerb von Genen eine entscheidende Rolle in der adaptiven Evolution von Bakterien wie *P. aeruginosa* spielen (Dobrindt *et al.*, 2004). Das bakterielle Genom besteht aus einem konserviertem Kerngenom, das bei *P. aeruginosa* ca. 90 % ausmacht, und einem variablen DNA-Anteil von ca. 10 % (Wolfgang *et al.*, 2003;Spencer *et al.*, 2003). Im Kerngenom sind meist essentielle Gene mit homogenem GC-Gehalt und Kodon-Gebrauch lokalisiert, die eine wichtige Rolle bei zellulären Funktionen spielen, z. B. Transkription/Translation und Metabolismus. So wurden durch einen PAO1-*Microarray*-Vergleich mit 18 verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen insgesamt 5183 PAO1-ORFs (93,4 %) in allen Stämmen gefunden und als Kerngenom der Spezies definiert (Wolfgang *et al.*, 2003). Der variable DNA-Bereich dagegen enthält klon-/stammesspezifische Geninseln und häufig keine Gene, die essentiell fürs Zellwachstum sind. Meist zeigt dieser Bereich einen unterschiedlichen GC-Gehalt und Kodon-Gebrauch auf, die dem Stamm unter bestimmten

Bedingungen (z. B. Umweltwechsel oder Eintritt in einen neuen Wirt) zusätzliche und häufig vorteilhafte Funktionen verleihen, z. B. Antibiotika-Resistenzen, Toxine oder andere Faktoren (Hacker and Carniel, 2001;Larbig *et al.*, 2002;Dobrindt *et al.*, 2004;Frost *et al.*, 2005;Thomas and Nielsen, 2005). Die meisten über horizontalen Gentransfer (HGT) entstehenden variablen DNA-Bereiche bestehen aus mobilen Elementen wie Plasmiden, genomischen Inseln und Bakteriophagen, aber auch Insertionssequenz-Elementen (IS-Elemente), Transposons und Integrons (Dobrindt *et al.*, 2004;Jackson *et al.*, 2011). Neben den Genomveränderungen im Kerngenom, trägt der HGT im variablen DNA-Bereich maßgeblich zur Genom-Evolution von *P. aeruginosa* bei (Kung *et al.*, 2010). So können sich verschiedene *P. aeruginosa* Isolate um bis zu 30 % in ihrer Genomgröße unterscheiden (Morales *et al.*, 2004).

Es gibt drei bekannte prokaryotische Mechanismen, wie DNA übertragen werden kann: Transformation, Konjugation und Transduktion. Transformation beinhaltet die Weitergabe von freier DNA zwischen verwandten Bakterien, die nur weitervererbt werden kann, sofern sie ins Genom integriert wird. Bei der Konjugation ist ein Zell-Zell-Kontakt notwendig, um Plasmide oder *integrated conjugative elements* (ICE) mit relevanten Transfergenen in den Rezipientenstamm zu übertragen. Der Gentransfer bei der Transduktion ist mit bestimmten Typen von Bakteriophagen verbunden (Roy, 1999;Thomas and Nielsen, 2005;Brigulla and Wackernagel, 2010). Im Gegensatz zur Konjugation und Transduktion ist nichts in der Literatur über natürliche Transformation bei *P. aeruginosa* bekannt (Kung *et al.*, 2010).

Plasmide tragen meist Resistenzgene gegenüber Antibiotika, Biosynthesegene für Substanzen, Pathogenitätsgene oder Gene, um neue Habitate besiedeln zu können (z. B. Fitnessgene). Sie besitzen die Fähigkeit sich autonom in der Wirtszelle zu replizieren. Plasmide kommen in allen Domänen des Lebens vor und können zwischen entfernt verwandten Organismen weitergegeben werden. Die im Wirt aufgenommenen Plasmide können dort verweilen oder direkt über homologe Rekombination ins Wirtsgenom integrieren (Frost *et al.*, 2005;Thomas and Nielsen, 2005;Sundin, 2007). Ebenso können sie Träger für mobile genetische Elemente wie Genominseln oder Integrons sein (Siguier *et al.*, 2006;Bohlin *et al.*, 2012). Große DNA-Bereiche (100 - 200 kbp) können über HGT mittels Plasmide transferiert werden (Groisman and Ochman, 1996;Sundin, 2007).

Da mittels genomischen Inseln 10 - > 100 kb DNA übertragen werden können, haben sie einen dramatischen Einfluss auf das Verhalten des Rezipienten. Die meisten Gene kodieren für Faktoren, die nützlich für das Überleben sind oder den Bakterien Vorteile bei deren Adaptionen verschaffen: z. B. Saccharoseaufnahme, Eisenaufnahme, Degradierung von phenolischen Komponenten, Antibiotika-Resistenzen, Gene zur Stickstofffixierung, Toxine oder auch Adhärenzfaktoren (Hacker and Carniel, 2001;Dobrindt *et al.*, 2004;Juhas *et al.*, 2009). Da die ersten entdeckten genomischen Inseln eine Vielzahl von Genen enthielten, die für Virulenzmechanismen kodierten, wurden sie auch als Pathogenitätsinseln benannt (Hacker and Kaper, 2000). Mittlerweile sind weitere Inseln wie Symbiose-, Fitness-, Metabolische- oder Resistenzinseln bekannt (Hentschel and Hacker, 2001). Die

zuerst in *P. aeruginosa* Isolaten gefundene Pathogenitätsinsel *P. aeruginosa gene island* - 1 (PAGI-1) inseriert nicht in ein tRNA-Gen, was eigentlich häufig der Integrationsort ist. Diese 49 kb große Geninsel kodiert neben mehreren Proteinen mit unbekannter Funktion für transkriptionale Regulatoren und Dehydrogenasen, die *P. aeruginosa* eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress verleihen (Liang *et al.*, 2001). Später wurde PAGI-2 und PAGI-3 in einem CF-Isolat bzw. Umweltisolat entdeckt (Larbig *et al.*, 2002). Das 104 kb große *integrative and conjugative element* (ICE) pKLC102 wurde erstmalig in *P. aeruginosa* Klon C detektiert (Klockgether *et al.*, 2004;Klockgether *et al.*, 2007). Diese mobilisierbare genomische Insel scheint eine Ausnahme unter den ICEs von *P. aeruginosa* darzustellen, da bis zu 30 episomale Kopien in *P. aeruginosa* vorkommen können (Klockgether *et al.*, 2007). Weitere genomische Inseln (GI) sind *P. aeruginosa* pathogenicity island-1 (PAPI-1) (108 kb) und PAPI-2 (11 kb), die zuerst im Stamm PA14 entdeckt wurden. Während PAPI-1 im Referenz-Stamm PAO1 nicht vorkommt, sind nur kleinere Fragmente von PAPI-2 in PAO1 vorhanden. Viele auf diesen GI liegenden Gene scheinen für die Pathogenität eine Rolle zu spielen, wie anhand eines Pflanzen- und Mausmodells gezeigt werden konnte (He *et al.*, 2004). Im Allgemeinen kodieren die meisten GIs für Phagen- und/oder Plasmid- Transfergene oder Integrasen (z. B. IS-Elemente) (Hacker *et al.*, 1997;Buchrieser *et al.*, 1998). Genomische Inseln werden häufig an einem Ende durch ein tRNA-Gen und am anderen Ende durch eine direkte wiederholende Sequenz flankiert durch die sie ins Genom (*Hot Spots*) des Empfängers integrieren (Gal-Mor and Finlay, 2006;Battle *et al.*, 2009). Sofern die Enden keine Punktmutationen erfahren sind die meisten Inseln instabil, sodass sie oft nur reversibel ins bakterielle Genom integriert werden (Rakin *et al.*, 2001;Klockgether *et al.*, 2004). Zu dem umliegenden Chromosom weisen genomische Inseln einen veränderten GC-Gehalt und Kodon-Gebrauch auf (Hacker and Carniel, 2001;Juhas *et al.*, 2009). Genomische Inseln können sowohl zu nah als auch fern verwandten Spezies weitergegeben werden (Müller *et al.*, 2003;Lesic and Carniel, 2005;Gaillard *et al.*, 2006).

Durch Transduktion kann ein Bakteriophage (z. B. P-Phage) mikrobielle Fremd-DNA an andere Bakterienarten weitergeben. Im transduzierten Bakterienstamm können entweder neue Phagenpartikel durch die Wirts-Protein-Maschinerie gebildet werden und es kommt zur Lyse der Zelle (lytischer Zyklus), oder das Phagengenom wird in das Bakteriengenom inseriert (Prophage; lysogener Zyklus). Bei letzterem wird bei jeder Genom-Replikation Phagen-DNA mitrepliziert. Unter bestimmten Situationen wie Stress können integrierte Phagengenome (Lysogenie) in den lytischen Zyklus übergehen (Frost *et al.*, 2005;Oppenheim *et al.*, 2005;Jackson *et al.*, 2011). In *P. aeruginosa* sind mehr als 60 verschiedene lysogene Phagen bekannt, wobei doppelsträngige DNA-Phagen die Mehrheit ausmachen (Kung *et al.*, 2010). Der größte Teil von *P. aeruginosa*-Isolaten werden in der Regel von mehr als einem Phage lysogenisiert (Holloway *et al.*, 1960). Zusätzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der Phage Pf4 die Bildung von SCV in *P. aeruginosa* vermittelt (Webb *et al.*, 2004). Aufgrund der Wirtsspezifität der Bakteriophagen ist der Gentransfer durch Transduktion in der Regel auf einen sehr engen Wirtsbereich beschränkt (Chen and Novick, 2009).

IS-Elemente bestehen aus einem Gen, das für eine ortsspezifische Rekombinase, die Transposase, kodiert und von kurzen terminalen gegenläufigen Sequenzen umgeben wird. Transposons sind IS-Elemente, die jedoch außer den Genen für die Transposition noch andere Gene tragen, z. B. Antibiotika-Resistenzgene. Wie anhand eines äußerst resistenten *P. aeruginosa*-Isolates gezeigt werden konnte, trägt das Transposon Tn*4401* eine ß-Laktamase (bla_{KPC-2}) (Naas *et al.*, 2008). Sowohl bei IS-Elementen als auch bei Transposons ist die Transposase für die Transposition zuständig (Insertion in andere Stellen des Genoms oder Plasmids). Falls ein IS-Element oder ein Transposon in ein Gen springt, so ist meistens der Transkriptionsverlust dieses Genes die Folge. Beide mobile Formen kommen normalerweise nur innerhalb eines Wirtsgenomes vor, jedoch können auch konjugative IS-Elemente und/oder Transposons das Wirtsgenom wechseln (Dobrindt *et al.*, 2004;Jackson *et al.*, 2011). Durch eine Genomveränderung und Reduktion von Genen spielen sowohl IS-Elemente als auch Transposons, die schätzungsweise 2 -5 % der bakteriellen genomischen DNA ausmachen, eine entscheidende Rolle in der Adaption von pathogenen Bakterien, wie *P. aeruginosa* (Kearney and Staskawicz, 1990;Landgraf *et al.*, 2006;Kung *et al.*, 2010;Song *et al.*, 2010).

Integrons sind in der Lage, DNA aus dem Chromosom oder Plasmid „einzufangen“, sich anschließend zu „verselbstständigen“ und die DNA in andere Bakterien zu übertragen. Sie bestehen aus einem ortsspezifischen Rekombinasegen (Integrase) *intI* mit eigenem Promotor und einer angrenzenden *attI*-Rekombinationsstelle. Über homologe Rekombination, bei der *attC* als spezifische Erkennungssequenz für den Einbau in die Rekombinationsstelle *attI* dient, katalysiert die Integrase die Integration und den Ausschnitt von spezifischen Genen, die als Genkassetten bezeichnet werden (Collis *et al.*, 2002;Mazel, 2006). Mobile Integrons werden in fünf verschiedene Klassen eingeteilt, die sich basierend durch die Sequenz der Integrase unterscheiden. Hauptsächlich gehören alle bis heute beschriebenen Integrons in *P. aeruginosa* bis auf eine Ausnahme (Klasse II) zu der Klasse I (Mazel, 2006;Xu *et al.*, 2009). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Integrons zur Entwicklung von *multidrug*-resistenten *P. aeruginosa* beitragen (Mesaros *et al.*, 2007). Über die SOS-Antwort wird die Expression sowohl der chromosomalen als auch mobilen Integrase reguliert, sodass Integrons ebenso eine wichtige Rolle beim HGT spielen (Guerin *et al.*, 2009).

Die in dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Genomanalyse eines Non-Mutators (Früh-Isolat M1) und eines Mutator-Stammes (Spät-Isolat M25) soll einen weiteren Aufschluss über die selektionierten und nischenspezifischen Adaptationen von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge geben. Die Charakterisierung des variablen Genoms ist essentiell für ein vollständiges Verständnis des ökologischen und pathogenen Potentials von *P. aeruginosa* (Kung *et al.*, 2010).

3.3.3 Phänotypische Anpassung von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge

Isolate von chronisch-infizierten CF-Patienten unterscheiden sich in der Regel deutlich vom Wildtyp-Elternstamm, der ursprünglich den Patienten infiziert hatte (Hogardt and Heesemann, 2010). Darüber

hinaus werden aufgrund der über Monate/Jahre hinweg im Zuge der Anpassung an die variablen Bedingungen der CF-Lunge aus einem Erstisolat mehrere und verschiedene Kolonie-Varianten selektioniert (Smith *et al.*, 2006;Mena *et al.*, 2008). Die Fitness der verschiedenen Stämme ist nicht zwingend gleich und ist abhängig von den adaptierten Mutationen und der Umwelt, in dem das Bakterium persistiert (Travis and Travis, 2002;Couce *et al.*, 2013). Trotz dieser phänotypischen Diversität kann ein Muster in der Anpassung beobachtet werden. Die typischsten Merkmale angepasster *P. aeruginosa*-Stämme sind eine Überproduktion von Alginat, der Verlust von QS und Motilität, eine erhöhte Antibiotika-Resistenz bzw. -toleranz, verlangsamtes Wachstum sowie Veränderungen der Zellhülle (Folkesson *et al.*, 2012).

Eine der bekanntesten vorkommenden Mutation betrifft das *mucA*-Gen, wodurch es in *P. aeruginosa* zu einer erhöhten Bildung von Schleim kommt, der hauptsächlich aus Alginat besteht (Mathee *et al.*, 1999;Bragonzi *et al.*, 2006). Es konnte unter *in vitro*-Bedingungen gezeigt werden, dass mukoide Mutanten sich meistens instabil verhalten (Pugashetti *et al.*, 1982). Durch eine Infektion mit bestimmten Phagen können auch mukoide *P. aeruginosa*-Stämme entstehen (Miller and Rubero, 1984). Sie stellen aufgrund von drei Aspekten ein großes Problem für CF-Patienten dar: 1) Der Alginatschleim bildet eine Barriere für Phagozyten, sodass diese Keime schlechter phagozytiert werden (Schwarzmann and Boring, 1971). 2) Zahlreiche mukoide Stämme sind resistenter gegenüber Antibiotika oder anderen Stressfaktoren als nicht-mukoide Stämme oder Revertanten (Govan and Fyfe, 1978;Wallace *et al.*, 1994). 3) Das Auftreten mukoider Stämme ist mit einer besseren Adhärenz an Epithelzellen als mit nicht-mukoiden assoziiert (Marcus and Baker, 1985). Ein weiteres häufig von Mutationen betroffenes Gen ist das *lasR*, das für den QS-Transkriptionsregulator LasR kodiert, welcher eine Vielzahl von Genen beeinflusst (Tang *et al.*, 1996;Juhas *et al.*, 2005). Einen selektiven Vorteil in der CF-Lunge besitzen offenbar Mutanten mit einem mutierten *lasR*-Gen oder auch *vfr*-Gen (beide Gene kodieren für ein QS-Regulator), weil hierüber gleich mehrere invasive Faktoren inaktiviert werden können (Nguyen and Singh, 2006). Zusätzlich zeigen diese Stämme einen Wachstumsvorteil in der Anwesenheit bestimmter Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Dies schließt auch die Nutzung von bestimmten Aminosäuren, z. B. Alanin oder Glutamin als Kohlenstoffquelle und z. B. Tyrosin und Tryptophan als Stickstoffquelle, ein (D'Argenio *et al.*, 2007).

Eine weitere Anpassung an die Lunge ist die Biofilm-Bildung, die häufig mit mukoiden Stämmen, einer erhöhten Antibiotika-Resistenz und mit einer QS-Defizienz bei chronischen *P. aeruginosa*-Infektionen in Verbindung gebracht werden (Moskowitz *et al.*, 2004;Luján *et al.*, 2011). Der Wechsel vom planktonischen zum sessilen Wachstum ist mit signifikanten Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression von *P. aeruginosa* verbunden, sodass im Laufe der Zeit multiple Stämme mit unterschiedlichen strukturellen und metabolischen Eigenschaften selektioniert werden (Sauer *et al.*, 2002;Sanchez *et al.*, 2013). So fördert die Sauerstoffeinschränkung zusätzlich die Persistenz von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge (Hogardt and Heesemann, 2012). Im Vergleich zu einer Vielzahl anderer pathogener Erreger besitzt *P. aeruginosa* eine sehr hohe natürliche (intrinsische) Antibiotika-

Resistenz, insbesondere gegenüber den meisten ß-Laktam-Antibiotika. Diese Resistenz kann durch eine veränderte Protein-, Lipid- und/oder LPS-Zusammensetzung der an sich schon schlechten Permeabilität der äußeren Membran gesteigert werden (Godfrey *et al.*, 1984;Tateda *et al.*, 1994). Mutationen sowie erworbene Resistenzplasmide können ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz beitragen (Oliver *et al.*, 2004). So sind Mehrfachresistenz-Effluxpumpensysteme (*mex*-Gene) und ihre Regulatoren häufig von Mutationen betroffen, mit der Folge einer erhöhten Genexpression, sodass z. B. Antibiotika vermehrt aus der Zelle herausgepumpt werden und es somit zu einer erhöhten Resistenz kommt. CF-Isolate, die Antibiotika aufgrund solcher Mutationen vermehrt aus ihrer Zelle pumpen, haben einen deutlichen selektiven Vorteil bei einer regelmäßigen Antibiotikabehandlung (Aires *et al.*, 1999;Muller *et al.*, 2011). Demgegenüber spielen Membranporine eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von hydrophilen Molekülen, z. B. ß-Laktam-Antibiotika. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in bestimmten Poringenen zu einer erhöhten Antibiotika-Resistenz führen (Livermore, 2001;Pagès *et al.*, 2008). Ein weiterer Resistenzmechanismus betrifft die induzierbare chromosomale ß-Laktamase AmpC von *P. aeruginosa***.** Durch Mutationen im *ampR*-Gen kommt es zu einer gesteigerten Expression von *ampC* (Derepression), resultierend mit einer gesteigerten Degradation Ampicillins und Pseudomonas-wirksamen Cephalosporinen wie Ceftazidim und Cefepim. Es konnte auch gezeigt werden, dass hypermutierende *E. coli*-Stämme ein vermehrtes Aufkommen von *extended-spectrum-beta-lactamases* (ESBL) aufweisen (Baquero *et al.*, 2005). Im Vergleich zu *E. coli* ist über hypermutable *P. aeruginosa*-Stämme bisher nicht bekannt, dass ß-Laktamasen durch zusätzliche Mutationen zu ESBLs mutieren und somit eine verstärkte Resistenz gegenüber Cephalosporinen ausüben (Driffield *et al.*, 2006). Sowohl die Hypermutabilität als auch der langandauernde und regelmäßige Antibiotikaeinsatz unterstützt bzw. selektioniert die Bildung von multiplen Resistenzen, sodass eine gezielte Antibiotikatherapie gerade gegen hypermutable Stämme mit dem Verlauf der Krankheit immer schwieriger wird (Oliver *et al.*, 2004;Maciá *et al.*, 2005).

Ein weiteres Problem in der Antibiotikatherapie der chronischen Lungeninfektion bei CF ist die Diskrepanz zwischen *in vitro*-Testung und der *in vivo*-Situation. Aufgrund der besonderen Zusammensetzung des CF-Mukus sind die im Labor ermittelten MHK-Werte nicht direkt auf die *in vivo*-Situation in der CF-Lunge übertragbar und wahrscheinlich häufiger auch unterschritten (Strandvik, 1988). Gerade subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika fördern die Resistenzentwicklung. Auch ist es kaum möglich, alle Faktoren (z. B. Immunsystem), die in der CF-Lunge auf die Erreger wie *P. aeruginosa* einwirken, im Labor zu berücksichtigen (Bergogne-Berezin, 1987).

Zu den häufig von adaptiven Mutationen betroffenen Virulenzfaktoren gehören die Gene der O-Antigen-Biosynthese, Typ III-Sekretion, *Twitching*-Motilität, Exotoxin A-Regulation, osmotischen Homöostase, Phenazin-Biosynthese oder der Eisenaquirierung über Siderophore (Smith *et al.*, 2006). In klassischen bzw. akuten Infektionsmodellen weisen adaptierte CF-Isolate mit diesen Phänotypen eine reduzierte Virulenz auf (Sato *et al.*, 1988;Tang *et al.*, 1996;Rakhimova *et al.*, 2008). Eine Hypothese ist, dass der Verlust von vielen Virulenzfaktoren den Bakterien dabei helfen könnte die

Abwehrmechanismen des Wirtes zu unterlaufen, weil viele invasive Faktoren sowie Liganden das Immunsystem aktivieren (Smith *et al.*, 2006).

Die chronische Anpassung an die CF-Lunge betrifft nicht nur Virulenzgene, sondern auch metabolische Gene von *P. aeruginosa*. CF-Isolate weisen häufig verschiedene Aminosäurenauxotrophien auf, z. B. gegen Methionin. Wie gezeigt werden konnte, bevorzugt *P. aeruginosa* Aminosäuren im CF-Sputum vor anderen Substanzen, z. B. Laktat oder Glukose, als Kohlenstoffquelle (Hogardt and Heesemann, 2010). Bei weiteren *in vitro*-Experimenten mit CF-Isolaten wurde beobachtet, dass chronische CF-Isolate eine veränderte Genexpression aufzeigen, v. a. metabolischer Gene, die wichtig für den Transport und die Verwertung von Nährstoffen sind (Hoboth *et al.*, 2009). Durch die Nutzung von Nitrat (NO_3^-)/Nitrit (NO_2^-) oder Arginin bzw. Pyruvat als Elektronenakzeptor kann *P. aeruginosa* in anaeroben (Mikro)-Habitaten überleben, jedoch mit einer geringeren Energiegewinnung als mit Sauerstoff. Für die Denitrifikation spielt das Außenmembranporin, die Permease OprF, für die Zufuhr von Nitrat/Nitrit sowie der anaerobe Regulator Anr eine wichtige Rolle (Hoboth *et al.*, 2009;Hogardt and Heesemann, 2010).

Zusammengefasst ist die chronische Anpassung (*adaptive radiation*) von *P. aeruginosa* und somit die Entwicklung von Non-Mutator-Stämmen zu Mutator-Stämmen gekennzeichnet durch den Verlust oder Verminderung vieler klassischer Virulenzfaktoren (*loss of function*-Mutationen) sowie durch eine metabolische Anpassung (Abbildung 3.5) (Rainey and Travisano, 1998;Ciofu *et al.*, 2010;Hogardt and Heesemann, 2010).

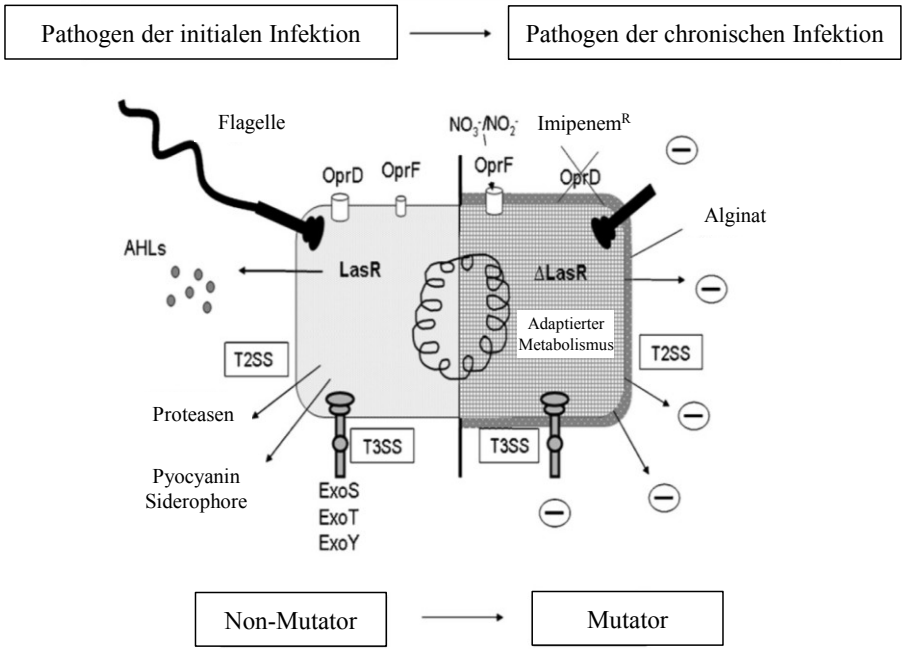


Abbildung 3.5 Chronische Anpassung von *P. aeruginosa* CF-Isolaten
Phänotypen eines *P. aeruginosa* Non-Mutator-Isolats der akuten Infektion (Links) bzw. eines im Rahmen der chronischen CF-Pneumonie adaptierten *P. aeruginosa* Mutator-Isolats (Rechts). AHL: N-Acetyl-Homoserinlakton; T2SS, T3SS: Typ II- bzw. Typ III-Sekretionssystem; ExoS, ExoT, ExoY: Exotoxine, T3SS-Substrate; $NO3^-$: Nitrat; $NO2^-$: Nitrit; OprF: Porin zur Nitrataufnahme; OprD: Porin für Imipenem; Imipenem^R: Imipenem-Resistenz; LasR: Quorum Sensing (QS)-Regulator. (Abbildung modifiziert nach (Hogardt and Heesemann, 2010))

3.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Grundlage und Ausgangspunkt dieser Arbeit sind die Dissertationsschriften von C. Hoboth und A. Eichner (Hoboth, 2007;Eichner, 2012). Hoboth konnte mittels vergleichender Transkriptom- und Proteomanalyse zeigen, dass *P. aeruginosa* Mutator-Stämme während der chronischen Infektion der CF-Lunge zahlreiche Änderungen ihrer Genexpression aufweisen, insbesondere in metabolischen Genen und Virulenzgenen. Auffallend war, dass bei Mutator-Stämmen der späten Lungeninfektion bis auf wenige Ausnahmen fast alle Gene des Citratzyklus verstärkt exprimiert waren. Von dieser Adaptation betroffen waren auch die beiden Isoenzyme der Isocitratdehydrogenase Icd (*icd*-Gen) und Idh (*idh*-Gen), welche eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel von *P. aeruginosa* einnehmen. Eichner beschäftigte sich in ihrer Dissertation mit der Regulation beider Gene anhand der Transposonmutanten (IDH-Einzelmutanten) von *P. aeruginosa* PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn. Sie konnte unter anderem zeigen, dass die Icd mit zunehmender Zelldichte stärker exprimiert wird, während die Idh eher ein konstitutives Expressionsmuster zeigte. Durch die Inaktivierung eines der beiden Enzyme entsteht jedoch kein Wachstumsdefekt, sodass anzunehmen ist, dass sich beide Isoenzyme hinsichtlich ihrer Funktion weitgehend komplementieren können.
Die Frage welche spezifische Funktion die Icd bzw. die Idh im Stoffwechsel von *P. aeruginosa* zukommt und was der Vorteil einer stärkeren Expression für das Überleben in der CF-Lunge sein könnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit durch eine weiterführende Charakterisierung beider Enzyme untersucht werden. Zusätzlich sollte neben der metabolischen Adaptation eine mögliche Verbindung zur Expression von Virulenzfaktoren näher überprüft werden. Darüber hinaus ist unklar, ob die Isocitratdehydrogenase, wie bereits in der Literatur beschrieben, auch eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung von Sauerstoffradikalen, sog. *reactive oxygen species* (ROS), einnimmt.

Ziel war es, zunächst die IDH-Doppelmutante *P. aeruginosa* PA14Δ*icd*Δ*idh* zu konstruieren und diese bezüglich ihres Phänotyps genauer mit Hilfe von Wachstumsversuchen, hinsichtlich der Expression von Virulenzfaktoren, mittels phänotypischen *Microarrays* und Transkriptomanalysen näher zu charakterisieren. Häufig wurden die Transposonmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn für Vergleiche herangezogen. Weiter sollte mittels Kohlenstoffflußanalysen anhand stabiler Isotopologe analysiert werden, über welche kompensatorischen Stoffwechselwege *P. aeruginosa* verfügt, da in der Doppelmutante der Citratzyklus komplett unterbrochen sein müsste. Ob eine verminderte intrazelluläre Konzentration an NAD(P)H zu einer verschlechterten antioxidativen Stressantwort führt, sollte in dieser Arbeit anhand der Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und der zusätzlich konstruierten Malatdehydrogenase-Mutante PA14 *mdh*::Gm überprüft werden. Diese Versuche und die durch Inaktivierung beider Isoenzyme entstandenen Defekte in der Physiologie von *P. aeruginosa* sollten Aufschluss darüber geben, wie die Isocitratdehydrogenase zur Lungenpersistenz bei CF beiträgt.

Neben den gezielten Untersuchungen zur Bedeutung der Isocitratdehydrogenasen wurde darüber hinaus in einem globalen Ansatz die Lungenadaptation von *P. aeruginosa* durch komparative Genomanalysen zweier sequentieller *P. aeruginosa* CF-Isolate analysiert. Hier handelte es sich um isogene Non-Mutator- (M1) und Mutator-Stämme (M25). Dabei waren die Gene von besonderem Interesse, die im Mutator-Stamm im Laufe der Krankheit durch horizontalen Gentransfer erworben wurden bzw. verloren gegangen sind oder solche Gene, die infolge von Basenaustauschen (SNPs), Insertionen, oder Deletionen mutiert sind. Mögliche Singletons, Genominseln oder andere mobile genetische Elemente sowie typische Mutationsmuster in bestimmten Genen könnten auf allgemeine Anpassungsmechanismen hinweisen. Ziel dieser Arbeit war somit die Kenntnis über die Ursachen und Wirkung der mutationsbedingten v. a. metabolischen Anpassung von *P. aeruginosa* an die chronisch-infizierte CF-Lunge zu verbessern und so einen Beitrag für die Entwicklung neuer Therapieformen bei CF zu leisten.

4 Material & Methoden

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, konstruierten Mutanten und *P. aeruginosa* CF-Isolate sind in den Tabellen 4.1 – 4.4 aufgeführt.

Tabelle 4.1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp; Bemerkung	Referenz
PAO1	Referenzstamm (Wildtyp; WT)	(Suh *et al.*, 1999)
PA14	Referenzstamm	(Rahme *et al.*, 1995); M. Schobert, Braunschweig
PA14 *icd*::Tn	*icd*::Tn (IDH-Einzelmutante); Gm^R *icd*-Transposon (MAR2xT7)-Insertionsmutante (≙ in Dissertation von A. Eichner Tn::*icd*)	(Liberati *et al.*, 2006); M. Schobert, Braunschweig; Dissertation A. Eichner
PA14 *idh*::Tn	*idh*::Tn (IDH-Einzelmutante); Gm^R *idh*-Transposon (MAR2xT7)-Insertionsmutante (≙ in Dissertation von A. Eichner Tn::*idh*)	(Liberati *et al.*, 2006); M. Schobert, Braunschweig; Dissertation A. Eichner
PAO1Δ*icd*Δ*idh*	Δ*icd*Δ*idh*::Gm (PAO1-IDH-Doppelmutante); Gm^R Promotor und Genbereiche von *icd* und *idh* deletiert	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh*	Δ*icd*Δ*idh*::Gm (IDH-Doppelmutante); Gm^R Promotor und Genbereiche von *icd* und *idh* deletiert	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (pBBR1MCS)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS (Kontrollstamm); Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit Leervektor pBBR1MCS	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*icd*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *icd*	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*idh*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *idh*	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*icd*/*idh*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *icd*/*idh*	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd E.coli*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*icd E. coli*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *icdA E. coli*	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd1*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*icd1*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *icd* C683T (≙ *icd1*), C683T → T228I	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh1*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*idh1*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *idh* G1347C (≙ *idh1*), G1347C → E449D	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh2*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*idh2*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *idh* T215C (≙ *idh2*), T215C → V72A	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh3*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*idh3*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *idh* G2182A (≙ *idh3*), G2182A → R728H	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh4*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pBBR1MCS-*idh4*; Gm^R, Cm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* komplementiert mit *idh* A2123G (≙ *idh4*), A2123G → K708R	diese Arbeit
PA14 (pBBR1MCS)	pBBR1MCS; Cm^R PA14 überexprimiert mit pBBR1MCS	diese Arbeit

PA14 (p*icd*/*idh*)	pBBR1MCS-*icd*/*idh*; Cm^R PA14 überexprimiert mit *icd*/*idh*	diese Arbeit
PA14 *icd*::Tn (p*idh*)	*icd*::Tn pBBR1MCS-*idh*; Gm^R, Cm^R PA14 *icd*::Tn überexprimiert mit *idh*	diese Arbeit
PA14 *icd*::Tn (p*idh3*)	*icd*::Tn pBBR1MCS-*idh3*; Gm^R, Cm^R PA14 *icd*::Tn überexprimiert mit *idh* G2182A (≙ *idh3*), G2182A → R728H	diese Arbeit
PA14 *idh*::Tn (p*icd*)	*idh*::Tn pBBR1MCS-*icd*; Gm^R, Cm^R PA14 *idh*::Tn überexprimiert mit *icd*	diese Arbeit
PA14 *idh*::Tn (p*icd1*)	*idh*::Tn pBBR1MCS-*icd1*; Gm^R, Cm^R PA14 *idh*::Tn überexprimiert mit *icd* C683T (≙ *icd1*), C683T → T228I	diese Arbeit
PAO1 *mdh*::Gm	PA1252::Gm (PAO1-Mdh-Mutante); Gm^R *mdh*-Insertionsmutante	diese Arbeit
PA14 *mdh*::Gm	PA14_48020::Gm (Mdh-Mutante); Gm^R *mdh*-Insertionsmutante	diese Arbeit
PA14 *mdh*::Tn	PA14_48020::Tn (Mdh-Mutante); Gm^R *mdh*-Transposon (MAR2xT7)-Insertionsmutante	(Liberati *et al.*, 2006); M. Schobert, Braunschweig
PA14 *sfcA*::Tn	PA14_19190::Tn; Gm^R *sfcA*-Transposon (MAR2xT7)-Insertionsmutante	(Liberati *et al.*, 2006); M. Schobert, Braunschweig
PA14 *mqoA*::Tn	PA14_19470::Tn; Gm^R *mqoA*-Transposon (MAR2xT7)-Insertionsmutante	(Liberati *et al.*, 2006); S. Häussler, Braunschweig
PA14 *mqoB*::Tn	PA14_61400::Tn; Gm^R *mqoB*-Transposon (MAR2xT7)-Insertionsmutante	(Liberati *et al.*, 2006); S. Häussler, Braunschweig
PA14 *maeB*::Tn*	PA14_66680::Tn; Gm^R *maeB*-Transposon (MAR2xT7)-Insertionsmutante	(Liberati *et al.*, 2006); S. Häussler, Braunschweig
PA14 (pHCE-*gfp*)	pHCE-*gfp*; Cb^R PA14 überexprimiert mit *gfp*	diese Arbeit
PA14Δ*icd*Δ*idh* (pHCE-*rfp*)	Δ*icd*Δ*idh*::Gm pHCE-*rfp*; Cb^R, Gm^R PA14Δ*icd*Δ*idh* überexprimiert mit *rfp*	diese Arbeit

Gm^R = Gentamicin-Resistenz, Cm^R = Chloramphenicol-Resistenz, Cb^R = Carbenicillin-Resistenz; * = Stamm wurde durch PCR als fehlerhaft eingestuft und nicht verwendet.

Tabelle 4.2 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *P. aeruginosa*-CF-Isolate

Stammbezeichnung	Genotyp; Bemerkung	Referenz
M1	Sequenzielles CF-Isolat von Patient M (isoliert im Jahr 1998)	(Hogardt *et al.*, 2007)
M25	Sequenzielles CF-Isolat von Patient M (isoliert im Jahr 2001)	(Hogardt *et al.*, 2007)
V43	Sequenzielles CF-Isolat von Patient V (isoliert im Jahr 2002)	(Hogardt *et al.*, 2007)
P24	Sequenzielles CF-Isolat von Patient P (isoliert im Jahr 2003)	(Hogardt *et al.*, 2007)
HM1	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM2	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM3	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM4	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM5	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM6	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM7	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM8	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM9	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM10	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM11	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM12	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM13	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)
HM14	CF-Isolat	(Hogardt *et al.*, 2006)

Seit 1997 wurde bei Patient M (männlich, geboren 1967) eine chronische Pneumonie mit einer Besiedlung mit *P. aeruginosa* dokumentiert. Kurz vor dem Tode im Jahre 2001 und einem Alter von 34 Jahren konnte zusätzlich eine Koinfektion mit *S. maltophilia* nachgewiesen werden. Frühere Daten waren nicht verfügbar. Hauptsächlich die Patientenisolate M1 (Non-Mutator) und M25 (Mutator) aber auch die Isolate V43, P24 und HM1 - 14 wurden in dieser Arbeit verwendet (Hogardt *et al.*, 2006;Hogardt *et al.*, 2007).

Tabelle 4.3 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp; Bemerkung	Referenz
E. coli DH5α	F^- *endA1 glnV*44 thi-1 *recA1 relA1 gyrA*96 *deoR nupG* Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, *hsdR*17(r_K^- m_K^+), λ–	(Hanahan, 1983)
E. coli HB101	F^-, *mcrB, mrr hsdS*20*(rB⁻ mB⁻) recA*13 *leuB*6 *ara*-14 *proA*2 *lacY*1 *galK*2 *xyl*-5, *mtl*-1 *rpsL*20(Sm^R), *glnV*44, λ-	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)
E. coli TOP10	F^-, *mcrA*, Δ(*mrr-hsd* RMS-*mcrBC*), φ80*lacZ,* ΔM15, Δ*lacX*74, *recA1*, *araD*139, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Sm^R), *endA1*, *nupG*	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 4.4 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *S. aureus*-Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp; Bemerkung	Referenz
S. aureus ATCC25923	Kontrollstamm (Cefinase negativ)	ATCC (American Type Culture Collection), Manassas (USA)
S. aureus ATCC29213	Kontrollstamm (Cefinase positiv)	ATCC (American Type Culture Collection), Manassas (USA)

4.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in den Tabellen 4.5 – 4.6 aufgelistet.

Tabelle 4.5 Übersicht über die in dieser Arbeit für Konstruktionen verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz	Geno-/Phänotyp	Größe	Referenz
pRK2013	Cb^R, Km^R	*tra*⁺, *mob*⁺, ColE1, *oriR*, Konjugationshelferplasmid	4,8 kb	(Figurski and Helinski, 1979)
pBBR1MCS	Cm^R	*rep, mob*, *mid-copy* (ca. 50 Kopien/Zelle)	4,7 kb	(Kovach *et al.*, 1994); M. Schobert, Braunschweig
pUCP20T	Cb^R	*E. coli–Pseudomonas shuttle vector*, ori1600 P_{lac}	3,9 kb	(West *et al.*, 1994)
pUCP30T	Gm^R	ColEI, *oriR*, *oriT*⁺, *lacZ*	4,3 kb	(Schweizer *et al.*, 1996)
pCR® 2.1-TOPO®	Cb^R, Km^R	*lacZ*α, pUC *ori*, f1 *ori*	3,9 kb	Invitrogen, Karlsruhe
pEX18Ap	Cb^R	*sacB*⁺, *lacZ*a, *oriT*⁺, pUC18 *ori*	5,8 kb	(Hoang *et al.*, 1998)
pHCE	Cb^R	(*high constitute expression*) Expressions-Promoter, ori, MCS, rrnBT1T2	3,7 kb	(Poo *et al.*, 2002)

Cb^R = Carbenicillin-Resistenz, Km^R = Kanamycin-Resistenz, Cm^R = Chloramphenicol-Resistenz, Gm^R = Gentamicin-Resistenz

Rekombinante Plasmide mit klonierter *P. aeruginosa* DNA zur Komplementation und Überexpression:

Tabelle 4.6 Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Größe [A]	Referenz
p*icd*	pBBR1MCS-*icd*; Cm^R Ligation des 1364 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (107 bp des nativen Promotorbereichs + 1257 bp des Gens *icd* aus PA14)	ca. 6,1 kb	diese Arbeit
p*idh*	pBBR1MCS-*idh*; Cm^R Ligation des 2333 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (107 bp des nativen Promotorbereichs + 2226 bp des Gens *idh* aus PA14)	ca. 7,0 kb	diese Arbeit
p*icd*/*idh*	pBBR1MCS-*icd*/*idh*; Cm^R Ligation des 3841 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (*icd*/*idh* inkl. kompletten nativen Promotorbereich aus PA14)	ca. 8,5 kb	diese Arbeit
p*icd E. coli*	pBBR1MCS-*icd E. coli*; Cm^R Ligation des 1370 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (119 bp des nativen Promotorbereichs + 1251 bp des Gens *icdA* aus DH5α)	ca. 6,1 kb	diese Arbeit
p*icd1*	pBBR1MCS-*icd1*; Cm^R Ligation des 1364 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (107 bp des nativen Promotorbereichs + 1257 bp des Gens *icd* aus M25)	ca. 6,1 kb	diese Arbeit
p*idh1*	pBBR1MCS-*idh1*; Cm^R Ligation des 2333 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (107 bp des nativen Promotorbereichs + 2226 bp des Gens *idh* aus M25)	ca. 7,0 kb	diese Arbeit
p*idh2*	pBBR1MCS-*idh2*; Cm^R Ligation des 2333 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (107 bp des nativen Promotorbereichs + 2226 bp des Gens *idh* aus V43)	ca. 7,0 kb	diese Arbeit
p*idh3*	pBBR1MCS-*idh3*; Cm^R Ligation des 2333 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (107 bp des nativen Promotorbereichs + 2226 bp des Gens *idh* aus P24)	ca. 7,0 kb	diese Arbeit
p*idh4*	pBBR1MCS-*idh4*; Cm^R Ligation des 2333 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (107 bp des nativen Promotorbereichs + 2226 bp des Gens *idh* aus HM7)	ca. 7,0 kb	diese Arbeit
p*mdh*	pBBR1MCS-*mdh*; Cm^R Ligation des 1119 bp Fragments über *Kpn*I/*Xba*I (114 bp des nativen Promotorbereichs + 1005 bp des Gens *mdh* aus PA14)	ca. 5,8 kb	diese Arbeit
pHCE-*gfp*	Ligation von *gfp* (714 bp) in pHCE (*high constitute expression*)	ca. 4,4 kb	AG Schubert
pHCE-*rfp*	Ligation von *rfp* (711 bp) in pHCE (*high constitute expression*)	ca. 4,4 kb	AG Schubert

Cm^R = Chloramphenicol-Resistenz, Cb^R = Carbenicillin-Resistenz, [A] = exakte Größe auf- bzw. abgerundet

4.1.3 Oligonukleotide

Die aufgelisteten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Fa. Metabion bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit dH_2O auf eine Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt. Die Primer wurden soweit nicht anders angegeben mit einer Konzentration von 10 pmol/µl verwendet.

Tabelle 4.7 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer)

Bez.	Zielgen in PAO1/PA14	T_A	RS	Sequenz (5´→ 3´) (Schnittstelle unterstrichen)
Amplifizierungsprimer				
MA2	PA2624/PA14_30180	57 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGATCAGGCCAGGCTGTCGA
MA4	Gm-Resistenzkassette	58 °C	*Asc*I	AAGGCTGGCGCGCCCTCCTTCGGTCCTCCGAT
MA5	PA2623/PA14_30190	62 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCCTACATCTTGGCAATCATCGCG
MA14	Gm-Resistenzkassette	56 °C	*Pfl*23II	TGATAACGTACGTGACATAAGCCTGTTCGGTT
MA28	PA1252/PA14_48020	60 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCGTGATCCGAATGACGCTGGA
MA29	PA1252/PA14_48020	63 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGATCACTCCAGCAACGCCAGCA
MA30	PA3471/PA14_19190	60 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCATGACCGAAACAGCCAAGCG

MA31	PA3471/PA14_19190	63 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGATCAGAACGAAGTCCGGCGGT
MA32	Gm-Resistenzkassette	56 °C	*Bsp*EI	TGATAATCCGGATGACATAAGCCTGTTCGGTT
MA33	Gm-Resistenzkassette	58 °C	*Bsp*EI	AAGGCTTCCGGACTCCTTCGGTCCTCCGAT
MA36	PA2623/PA14_30190	62 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGACTACATCTTGGCAATCATCGCG
MA39	*icdA E. coli* [a] (P08200)	52 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGATTACATGTTTTCGATGATCG
MA57	PA2623/PA14_30190>	63 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCGCTGATGCGCTCGCCTGTTT
MA58	<PA2624/PA14_30180	58 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCGCGGCATATCTCGATTTCGA
MA59	<*icdA E. coli* [a] (P08200)	50 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCACAAGCCAATTACAAATCAT
MA60	PA1252/PA14_48020>	63 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCTTTCGATGTGCTCGAGCCGG
MA61	PA3452/PA14_19470	44 °C	*Hind*III	TGATAAAAGCTTATGAAAAAAATCTTATTGAT
MA62	PA3452/PA14_19470	67 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGATCAGGCCTCCGGCTGTACCG
MA63	PA4640/PA14_61400	58 °C	*Hind*III	TGATAAAAGCTTATGGCGCAAAACGATCACGA
MA64	PA4640/PA14_61400	67 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGATCACTCGGCGTTGACCGGGG
MA65	PA5046/PA14_66680	56 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCATGTCCGATCTTAAAACCGC
MA66	PA5046/PA14_66680	58 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGATCAGCCGTTGAAGACTTCGT
Sequenzierungsprimer				
MA1	PA2623/PA14_30190	60 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCATGGGATACCAAAAGATCCAGG
MA3	Gm-Resistenzkassette	56 °C	*Bsm*I	TGATAAGAATGCTGACATAAGCCTGTTCGGTT
MA6	Gm-Resistenzkassette	67 °C	-	AAGGCTAGACATTCATCGCGCTTGCTGCCTT
MA7	Gm-Resistenzkassette	67 °C	-	TGATAATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTC
MA8	< PA2623/PA14_30190	74 °C	-	AAGGCTGGCCGAGGGCCGAGATGAGGACC
MA9	PA2624/PA14_30180>	77 °C	-	TGATAAGCCGGTGACGGCGCTCAGCTCGAC
MA10	Gm-Resistenzkassette	76 °C	-	GCTTCCCGGCCGCGGAGTTGTTCGG
MA11	Gm-Resistenzkassette	76 °C	-	GCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGG
MA12	< PA2623/PA14_30190	76 °C	-	GAGCCGCAGGCGACGCCCATCGAAG
MA13	PA2624/PA14_30180>	76 °C	-	GCGGCCCTGGTCCTCGACGATGGTC
MA15	PA2623/PA14_30190	76 °C	-	CCGGGGTGGTCAGCGGGCCCTTGAT
MA16	PA2624/PA14_30180	68 °C	-	GCTTGACCCAGTCGCGGATCGGCGC
MA19	PA2623/PA14_30190	69 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCCCATGTCCACGTCGCCGGGC
MA20	PA2624/PA14_30180	67 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGATGCCGCGGATCAGGCGTTCC
MA21	PA2623/PA14_30190	69 °C	*Bam*HI	TGATAAGGATCCCCATGTCCACGTCGCCGGGC
MA22	PA2624/PA14_30180	67 °C	*Bam*HI	AAGGCTGGATCCTGCCGCGGATCAGGCGTTCC
MA37	PA2624/PA14_30180	58 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCATGTCCATCCGCTCGAAGAT
MA38	*icd E. coli* [a] (P08200)	50 °C	*Kpn*I	TGATAAGGTACCATGGAAAGTAAAGTAGTTGT
MA40	<*lacZ* (pUCP20T)	60 °C	*Xba*I	AAGGCTTCTAGAGCAGTGAGCGCAACGCAATT
MA43	<PA1252/PA14_48020	63 °C	-	ATTGAGCACGCCTGGAAGCC
MA44	PA1252/PA14_48020>	63 °C	-	TTTCGATGTGCTCGAGCCGG
MA48	*lacZ* (pUCP20T)	69 °C	-	CGCCAGCTGGCGAAAGGGGG
MA49	Gm-Resistenzkassette	67 °C	-	CGCACATGTAGGCTCGGCCC
MA50	Gm-Resistenzkassette	67 °C	-	ACCGAACAACTCCGCGGCCG
MA51	PA2623/PA14_30190	67 °C	-	CGACGCCGATGCCATCACCC
MA52	PA2624/PA14_30180	67 °C	-	GGAGGAGCGAGTAGGTGGCG
MA53	PA1252/PA14_48020	67 °C	-	ACGGCTGCCCTCGTCGTAGG
MA54	PA1252/PA14_48020	67 °C	-	GGGCTGCCGCATCTGCTGGA
M13 for	Standard Sequenzierungs-Primer	67 °C	-	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	Standard Sequenzierungs-Primer	64 °C	-	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
fSacB1	*sacB*-Gen (pEX18AP)	58 °C	-	AATCATACCGAGAGCGCCG
rSacB2	*sacB*-Gen (pEX18AP)	58 °C	-	AGACAGCGACAAATTCGA

Bez. = Bezeichnung, T_A = Anlagerungstemperatur, RS = Restriktionsschnittstelle, *E. coli* [a] = *E. coli* DH5α, < = Oligonukleotid bindet stromabwärts des angegebenen Gens, > = Oligonukleotid bindet stromaufwärts des angegebenen Gens

4.1.4 DNA-Sonde für Southern Blot

Die in dieser Arbeit zur Erstellung der DNA-Sonde verwendeten Primer sind in Tab. 4.8 aufgelistet.

Tabelle 4.8 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Erstellung einer DNA-Sonde

Bez.	Zielgen in (pUCP30T)	T_A	RS	Sequenz (5´→ 3´)
MA49	Gm-Resistenzkassette	67°C	-	CGCACATGTAGGCTCGGCCC
MA50	Gm-Resistenzkassette	67°C	-	ACCGAACAACTCCGCGGCCG

Bez. = Bezeichnung, T_A = Anlagerungstemperatur, RS = Restriktionsschnittstelle

4.1.5 Geräte, Apparaturen und Zubehör

Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Apparaturen und Zubehör samt ihrem Hersteller:

Tabelle 4.9 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Anaerobentopf (Anaero Pack, Rectangular Jar)	Mitsubishi Gas Chemical Company, INC.
Anoxomat	Mart Microbiology B.V.
Autoklav	Thermo Fisher Scientific
Ceranheizplatte	Schott AG
Geldokumentationsanlage	
- Kamera und Software, UV- Transilluminator	Intas Science Imaging Instruments
- Drucker P93D	Mitsubishi Electric Corporation
Gelelektrophorese-Systeme, horizontal (DNA-Auftrennung)	
- Perfect Blue™ Mini L (12 x 14 cm)	peqlab Biotechnologie
-Gelelektrophorese-Systeme, vertikal (Protein-Auftrennung)	
- Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories
Gradientenmischer (Mini-Gradientenmixer)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Heizblock	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG
Heizofen	Heraus Instruments
Inkubatoren	
- Function Line, Typ B20	Heraeus Instruments
- Function Line, Typ T6	Heraeus Instruments
Indikatorstreifen (Anaer Indicator)	bioMérieux Deutschland GmbH
Inkubationsschüttler	
- Certomat®H	Sartorius AG
- Tischschüttler Certomat®U (Schüttler)	B. Braun Biotech International
- Multitron Standard (mit Kühlung)	Infors AG
Kanülen (0,4 mm x 19 mm)	Becton Dickinson GmbH
Kühl- und Gefrierschränke (Liebherr Premium)	Liebherr-International Deutschland GmbH
Laborgasbrenner (gasprofi 2SCS)	WLD-TEC
Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke	
- Sicherheitswerkbank Klasse II, Typ S1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik
- HERAsafe, Typ	Thermo Electron Corporation
Mikroskop (Aristoplan)	Leitz (Optik)
Mikrowellengerät	Samsung Electronics GmbH
Mikroplatten-Lesegerät	
- TriStar Multiplate-Reader LB 941	Berthold Technologies
- Sunrise™	Tecan Group Ltd.
Nylonmembran	Amersham Bioscience
Oxidationsmittel (GENbox anaer)	bioMérieux Deutschland GmbH
PCR-Thermocycler	
- GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
- Mastercycler EP Gradient S	Eppendorf AG
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GMBH + CO KG
Peristaltische Pumpe (Peristaltic Pump P-1)	Amersham Bioscience

pH-Messgerät (PB11)		Sartorius AG
Pipetten - Pipetus - Pipetman (P10, 20, 100, 200, 1000) - Research® pro, 8-Kanal, elektronisch (20-300 µL, 50-1000 µL)		 Hirschmann Laborgeräte Gilson, Inc. Eppendorf AG
Plattformschüttler (Duomax 1030)		Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Quarzküvetten		
Southern Blot-Apparatur (VacuGene XL Vacuum Blotting System)		Amersham Bioscience
Spannungsgeber (Power Pac 300)		Bio-Rad Laboratories
Spektralphotometer (Wellenlängenbereich 190 - 900 nm) (Ultrospec 3100 pro)		GE Healthcare
Thermo-Magnetrührer (RCT basic)		IKA®-Werke
Thermomixer (Thermomixer Compact)		Eppendorf AG
Tiefkühlanlage - 80 °C		Heraeus
UV-Crosslinker (UV Stratalinker 2400)		Stratagene
Ultraschall-Zellaufschluss (Branson Sonifier 250)		G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik
Vakkum-Konzentrator (DNA Speed Vac DNA 110)		Savant Instruments Inc.
Vakuumpumpe (ME2S)		Vacuubrand GmbH
Vortexer (Vortex-Genie-2)		Scientific Industries, Inc.
Waagen - Sartorius PT3100 - Kern PCB - Feinwaage Sartorius PB-11		 As Wägetechnik GmbH Kern & Sohn GmbH Sartorius AG
Zentrifugen	Rotor	
- Laborzentrifuge 1K15	12024	Sigma Laborzentrifugen GmbH
- Laborzentrifuge 3K30	19776	Sigma Laborzentrifugen GmbH
- Laborzentrifuge 5417 R	F45-30-11	Eppendorf AG
- Laborzentrifuge Sorvall®SuperT21	ST-H750	Thermo Electron Corporation
- Laborzentrifuge Megafuge 1.0 R	2704/6446	Heraeus
- Mikrozentrifuge Qualitron DW-41		Qualitron, Inc.
- Ultrazentrifuge Optima LE-80M	TI75	Beckman Coulter

4.1.6 Chemikalien/Substanzen

Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien/Substanzen samt ihrem Hersteller:

Tabelle 4.10 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien/Substanzen

Chemikalie/Substanz	Hersteller
Aceton (p.A.)	Merck KGaA
Acrylamid (37,5 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid)	Serva Electrophoresis GmbH
Agarose NEEO	Carl Roth GmbH & Co. KG
L-Alanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Albumin	Serva Electrophoresis GmbH
Algenlipid (^{13}C vollmarkiert)	EURISO-top GmbH
6-Aminocapronsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumchlorid	Merck KGaA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis GmbH
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Asparagin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Aspartat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bacillol	Bode Chemie GmbH
Bacto Agar	Becton Dickinson GmbH
Bacto Pepton	Becton Dickinson GmbH
Bacto Trypton	Becton Dickinson GmbH

Bacto Casamino Acids	Becton Dickinson GmbH
BCIP®/NBT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bis-Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
Blocking-Reagenz	Roche Deutschland Holding GmbH
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau	Merck KGaA
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-D-Galactopyranosid (X-Gal)	BTS Biotech Trade Service GmbH
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ciprofloxacin E-Test	bioMérieux Deutschland GmbH
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva Electrophoresis GmbH
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck KGaA
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DNA (von Fisch-Sperma)	Serva Electrophoresis GmbH
Diethylpyrocarbonat- (DEPC)-Wasser	Invitrogen Life Technologies GmbH
Digoxigenin-dUTP (DIG)	Roche Deutschland Holding GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Electrophoresis GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eisenchlorid ($FeCl_3$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)
Elastin-Kongorot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
‚*Egg Yolk*‘ (Eigelb)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH
Ethanol, vergällt	CLN GmbH
Ethanol, unvergällt, (absolut 98 % p. A.)	Merck KGaA
Ethidiumbromidlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fetales Kälberserum (FBS)	Invitrogen Life Technologies GmbH
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG
Formamid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Gentamicinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
D-(+)-Glukose	Carl Roth GmbH & Co. KG
D-Glukose-6-phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycerin	Merck KGaA
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hefeextrakt	MP Biomedicals Germany
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Histidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Isoamylalkohol	Merck KGaA
D_s-*threo*-Isocitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGaA
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumacetat ($C_2H_3KO_2$)	Merck KGaA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumphosphat (KPO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumsulfat (K_2SO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kanamycin Monosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Korsolex	Bode Chemie GmbH
Kristallviolett	Merck KGaA
N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Leucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Magnesiumchlorid Hexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Magnesiumsulfat Heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Malat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Maleinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Manganchlorid ($MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Mangansulfat ($MnSO_4$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Milchpulver	Ulzena EG
Menadion (Vitamin K)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Mercaptoethanol	Merck KGaA
Methanol (p.A.)	Merck KGaA
L-Methionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methylviologendichlorid (Paraquat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
MOPS Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG
Muzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)	Merck KGaA
Natriumcarbonat ($NaCO_3$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7$)	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
di-Natriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$)	Merck KGaA
Natrium Dihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Merck KGaA
Natriumhydroxid (NaOH)	Plätzchen Merck KGaA
NatriumHypochloritlösung (12 % Cl, NaClO in H_2O)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumnitrat ($NaNO_3$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
β-Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
β-Nikotinamidadenindinukleotidphosphat ($NADP^+$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Nitrocefin	Oxoid Deutschland GmbH
o-Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Phenazinmethosulfat (PMS)	Serva Electrophoresis GmbH
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG
PIA-Agar	Becton Dickinson GmbH
Polymyxin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Purpald	VWR, BDH Prolabo
R2A-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG
Rubidiumchlorid ($RbCl_2$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA
L-Serin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Skim Milk	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)
Silbernitrat ($AgNO_3$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sodiumdodecylsulfat (SDS) Ultrapure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Streptomycinsulfat	Serva Electrophoresis GmbH
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tetrazyklin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
L-Threonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trichloressigsäure (TCA), 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris	MP Biomedicals Germany
TRIzol® Reagenz	Invitrogen Life Technologies GmbH
Tween 20	Merck KGaA
Triton X-100	Merck KGaA
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Urea (Harnstoff)	Merck KGaA
L-Valin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

4.1.7 Kommerzielle Reagenziensätze (Kits)

Für bestimmte Zwecke wurden Reagenziensätze verwendet, die in alphabetischer Reihenfolge samt ihrem Hersteller aufgelistet sind:

Tabelle 4.11 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Reagenziensätze

Verwendungszweck/ Reagenziensatz	Hersteller
Aufreinigung von PCR-Produkten/ Wizard® SV Gel and PCR Clean-up Kit	Promega GmbH
Isolierung von Plasmid-DNA/ peqlabGOLD Plasmid Miniprep Kit I und II	peqlab Biotechnologie GmbH
NucleoBond® AX 100 Columns	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
DNeasy® Blood & Tissue (50)	Quiagen, Hilden
NAD^+/NADH Assay Kit (ab65348)	abcam®, Cambridge
$NADP^+$/NADPH Assay Kit (ab65349)	abcam®, Cambridge
19160 SOD Determination Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)

4.1.8 Nährmedien

Medien, Lösungen und Puffer wurden soweit nicht anders angegeben mit dH_2O angesetzt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Thermolabile Substanzen wurden gelöst und steril filtriert. Zur Verfestigung der Plattenmedien wurde dem jeweiligen Medium (außer PIA) vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bacto-Agar hinzugefügt.

Verwendete Nährmedien mit ihrer Zusammensetzung:

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

ASM	**1 l-Ansatz**	
D-Glukose (80 mg/ml)	10 ml	
Aminosäuren (20 x 25 mg/ml)	je 10 ml	(pro Aminosäure)
Harnstoff (Urea) (0,5 M)	1 ml	
Sputumpuffer (10x)	100 ml	

pH mit NaOH auf 6,9 einstellen, ad H_2O 495 ml und steril filtrieren (0,22 µm)

Folgende steril filtrierte Substanzen wurden hinzugefügt:

Albumin (125 mg/ml, pH 6,9)	200 ml
Muzin (20 mg/ml)*	250 ml
Fisch-Sperma-DNA (67,5 mg/ml, pH 6,9)	40 ml
Fetales Kälberserum (FBS HI)	10 ml
Eigelb (*Egg Yolk*)	5 ml

frisch angesetztes ASM wurde für maximal 4 Wochen bei 4 °C gelagert

Arbeitsprotokoll Muzin*:

- 20 g Muzin in 800 ml dest. H_2O lösen
- Lösung mit 5 M NaOH auf pH 6,9 einstellen, mit dH_2O auf 1 l auffüllen
- 1 h bei 80 °C erhitzen und üN bei 4 °C lagern
- 10 min bei 4300 Upm zentrifugieren (leichter Bodensatz wird verworfen)
- Überstand abnehmen und autoklavieren

Elastin-Kongorot-LB-Agarplatten
(Stapleton *et al.*, 1984)

LB-Medium	1x

Zugabe zum handwarmen autoklaviertem Medium in folgender Endkonzentration:

Elastin-Kongorot	0,1 % (w/v)

King´s-A-Medium
(modifiziert nach (King *et al.*, 1954))

Bactopepton	20 g
Glycerin	10 ml
$MgCl_2$	1,4 g
K_2SO_4	10 g

pH auf 7,2 einstellen und in 1 l dH_2O autoklavieren

Zugabe in entsprechender Endkonzentration:

$FeCl_3$ (steril filtriert)	100 µM

LB-Medium (*lysogeny broth*)
((Bertani, 1951) modifiziert nach (Miller, 1972))

Bacto-Trypton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l

mit HCl auf pH 7,0 einstellen und in 1 l dH_2O autoklavieren

M9-Minimalmedium

Na_2HPO_4	6 g/l
KH_2PO_4	3 g/l
NH_4Cl	1 g/l
NaCl	0,5 g/l

pH auf 7,4 einstellen und in 1 l dH_2O autoklavieren

$MgSO_4$ und eine C-Quelle (z. B. Zucker, Aminosäure) wurde dem Medium nach dem Autoklavieren entsprechend der gewünschten Endkonzentrationen zugesetzt:

$MgSO_4$	2 mM
C-Quelle	400 µM - 40 mM

Magermilch-Agar

dH_2O	900 ml

Dem handwarmen autoklaviertem Wasser-Agargemisch wurde folgende Substanz hinzugefügt:

Magermilchpulver	10 % (w/v)

Müller-Hinton-Agarplatten

Ausschließlich kommerziell erworbene Müller-Hinton-Platten (Fa. Oxoid) wurden in dieser Arbeit verwendet.

Pseudomonas-Isolationsagar (PIA)
(nach Herstellerangabe)

PIA	45 g
Glycerin	20 ml
in 1 l dH_2O autoklaviert	

***Reasoner's* 2 Agar (R2A)**
(nach Herstellerangabe)

R2A-Agar	18,1 g
in 1 l dH_2O autoklaviert	

***Swarming*-Agar**
(Linares *et al.*, 2010)

LB-Medium (0,5 % (w/v) Bacto-Agar)	1x
Dem handwarmen autoklaviertem Medium wurde folgende Substanz hinzugefügt:	
D-Glukose (steril filtriert)	5 g/l

***Swimming*-Agar**
(Linares *et al.*, 2010)

LB-Medium (0,3 % (w/v) Bacto-Agar)	1x

***Twitching*-Agar**
(Semmler *et al.*, 1999)

LB-Medium (1,0 % (w/v) Bacto-Agar)	1x
Dem handwarmen autoklaviertem Medium wurde folgende Substanz hinzugefügt:	
2,3,5-Tetraphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	0,05 %

4.1.9 Antibiotika

Die entsprechenden Antibiotikalösungen wurden steril filtriert und bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert. Bei Bedarf wurde die aufgetaute Antibiotikalösung in entsprechender Konzentration dem abgekühlten autoklavierten Medium (< 60 °C) zugesetzt.

Tabelle 4.12 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika inkl. Konzentrationen

Antibiotikum	*E. coli*	*P. aeruginosa*	Stammlösungen gelöst in
Ampicillin/Carbenicillin	100 µg/ml	500 µg/ml	50 mg/ml in dH_2O
Chloramphenicol	20 µg/ml	200 µg/ml	50 mg/ml in EtOH
Gentamicin	15 µg/ml	150 - 300 µg/ml	300 mg/ml in dH_2O
Kanamycin	25 µg/ml	-	10 mg/ml in dH_2O
Streptomycin	25 µg/ml	500 µg/ml	500 mg/ml in dH_2O
Tetrazyklin	15 µg/ml	150 µg/ml	50 mg/ml in EtOH

E-Tests

Die in dieser Arbeit verwendeten E-Teststreifen wurden von der Fa. Biomerieux bezogen.

4.1.10 Puffer

In dieser Arbeit wurden folgende Puffer verwendet:

M9-Puffer (10x)
(Sambrook *et al.*, 1989)

Na_2HPO_4	60 g/l
KH_2PO_4	30 g/l
NH_4Cl	10 g/l
NaCl	5 g/l

pH auf 7,4 eingestellt; in 1 l dH_2O autoklaviert

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

NaCl	80 g/l
KCl	2 g/l
$Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$	26,8 g/l
KH_2PO_4	2,4 g/l

mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt; in 1 l dH_2O autoklaviert

Sputumpuffer (10x)

NaCl	40,3 g/l
$CaCl_2$	3,3 g/l
HEPES	47,7 g/l

mit 5 M NaOH auf pH 6,9 eingestellt; in 1 l dH_2O autoklaviert

SSC-Puffer (20x)

NaCl	175,32 g/l
$C_6H_5Na_3O_7$	88.23 g/l

mit HCl auf pH 7,0 eingestellt; in 1 l dH_2O autoklaviert

TAE-Puffer (50x) (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

Tris	242 g/l
Eisessig	57,1 ml/l
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	37,2 g/l

pH auf 8,0 eingestellt; in 1 l dH_2O autoklaviert

TBE-Puffer (10x) (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

Tris	108 g/l
Borsäure	55 g/l
Na_2EDTA	7 g/l

pH auf 8,0 eingestellt; in 1 l dH_2O autoklaviert

4.1.11 Größenstandards

In dieser Arbeit wurden bei der Agarose- und Polyacyrlamid-Gelelektrophorese (PAGE) (beide von der Fa. Fermentas) sowie beim Southern Blot (Fa. Roche) Größenstandards verwendet.

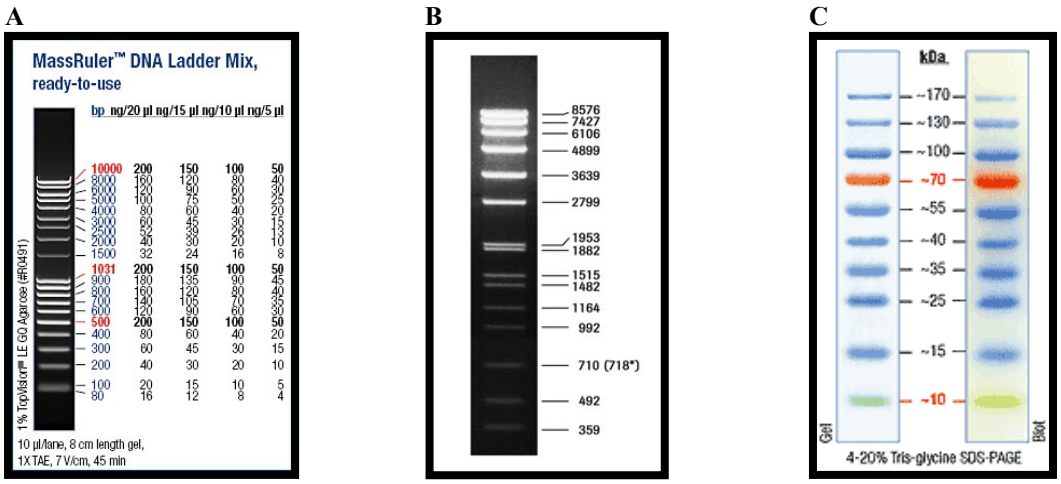


Abbildung 4.1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards
(A) DNA-Größenstandard im Agarosegel: Mass Ruler™ DNA-Ladder, Mix, ready-to-use (Fermentas) Verwendung bei der Agarose-Gelelektrophorese (4 µl); Darstellung in Basenpaaren bp. (B) DIG-DNA-Größenstandard im Agarosegel: DNA-Molecular-Weight Marker VII, DIG labeled (Roche) Verwendung bei der Agarose-Gelelektrophorese für Southern Blot (5 µl); Darstellung in Basenpaaren (bp). (C) Proteingrössenstandard im Polyacrylamidgel: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) Verwendung bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3 µl); Darstellung in Kilodalton (kDa).

4.1.12 Software

Folgende Computer-Software wurde zur Auswertung und Darstellung von Ergebnissen in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 4.13 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Software

Programm	Hersteller	Anwendung
Windows-Office	Microsoft	Text- und Datenverarbeitung; Statistik*
PyMOL	DeLano Scientific LLC, Schrödinger	3D-Grafiksoftware
Mauve	Universität Wisconsin–Madison	Vergleich von Genomsequenzen; (Darling *et al.*, 2004)
Seqman	Lasergene, DNASTAR	Analyse von Sequenzen
GenDB	Cebitec Bielefeld Universität	Genom Annotation Programm; (Meyer *et al.*, 2003)
Edgar	Cebitec Bielefeld Universität	Komparative Genomanalyse-Programm; (Blom *et al.*, 2009)
ClustalW2	EMBL-European Bioinformatics Institute, Cambridge	Alignment-Programm; (Larkin *et al.*, 2007)

* Signifikanzwerte wurden mittels T-Test (Excel) ermittelt (p-Werte ≤ 0,05; ≤ 0,01; ≤ 0,001)

4.2 Molekulargenetische Methoden

4.2.1 Aerobe/Anaerobe Anzucht von *P. aeruginosa*, *E. coli* und *S. aureus*

Zur Kultivierung auf festen oder in flüssigen Nährmedien mit oder ohne Antibiotikum wurde *P. aeruginosa*, *E. coli* und *S. aureus*, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Zur ausreichenden Belüftung wurden über-Nacht-(üN)-Kulturen bis 5 ml im Reagenzglas und Kulturen mit größeren Volumina (ab 10 ml) in Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert.
Für die anaerobe Anzucht von *P. aeruginosa* auf festen oder in flüssigen Nährmedien mit oder ohne Antibiotikum wurde Nitrat (Stammlösung: $NaNO_3$, 5 M) in einer Endkonzentration von 50 mM dem Medium zugegeben. Die Agarplatten wurden zusätzlich für ca. 30 min vor ihrer Verwendung mit Stickstoff begast. Die Inkubation in luftdichten Schottglasflaschen erfolgte bei 37 °C und 200 Upm oder in Anaerobiertöpfen. Der Sauerstoff wurde durch die Verwendung eines Anoxomaten entfernt. Die anaerobe Inkubation der Bakterien z. B. in Mikrotiterplatten (8 cm x 12 cm) erfolgte in größeren Anaerobierboxen, in denen zuvor ein Oxidationsmittel zugegeben wurde. Der anaerobe Zustand wurde durch einen Anaerobiose-Indikator-Teststreifen bestätigt.

4.2.2 Anlegung einer Glycerin-Kryokultur von Bakterienstämmen

Um Bakterien dauerhaft lagern zu können, wurden frische Vorabkulturen von bebrüteten LB-Agarplatten ggf. von Selektiv-Agarplatten in einem steril filtrierten (22 µm) Glycerin-LB-Gemisch (RT) suspendiert und anschließend bei – 80 °C aufbewahrt.

Gemisch	
LB-Medium	70 % (v/v)
Glycerin	30 % (v/v)

4.2.3 Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Flüssigkultur

Mit dem Spektralphotometer (Ultrospec 3100pro) wurde die Zelldichte einer Flüssigkultur durch Messung der Trübung bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen einen Vergleichswert (Leerwert) des jeweiligen Testmediums bestimmt. Wurde ein höherer OD-Wert als ca. 1,0 gemessen, so wurde die Kultur im jeweiligen Testmedium 1:10 verdünnt und erneut gemessen. Proben aus Messungen in ASM wurden aufgrund der Trübung des Mediums 1:10 in PBS-Puffer verdünnt.

4.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Spatelplattenverfahren

Bei dem Spatelplattenverfahren wurden mittels Drigalskispatel 100 µl einer unverdünnten bzw. einer von der Zelldichte abhängigen verdünnten Bakteriensuspension auf LB-Medium (ohne Antibiotikum)

ausplattiert. Die Lebendzellzahl wurde anhand der koloniebildenden Einheit (KBE/ml) und dem daraus gebildeten Mittelwert bestimmt. Dabei wurden die KBE/ml aus mindestens drei Verdünnungsstufen gemittelt.

4.2.5 Erstellen einer Wachstumskurve und Bestimmung der Generationszeit

Eine Wachstumskurve wurde mittels der OD_{600}-Messung erstellt. Ausgehend von dem Inokulum (OD_{600} 0,002) wurde die optische Dichte einer Bakterienkultur bestimmt, wobei die Messungen innerhalb der ersten 10 h Stunden stündlich sowie einmalig nach 24 h und 30 h erfolgten. Alle gemessenen OD_{600}-Werte wurden halb logarithmisch in einem Diagramm dargestellt.
Zur Berechnung der Generationszeit wurde die optische Dichte OD_{600} eines Bakterienstammes an zwei verschiedenen Messpunkten im exponentiellen Wachstum herangezogen. Die Generationszeit G wurde durch Messung der unten aufgeführten Formel bestimmt. Zur Berechnung wurden t1 = Zeitpunkt 1 in min, t2 = Zeitpunkt 2 in min, OD1 = OD_{600} zum Zeitpunkt t1 und OD2 = OD_{600} zum Zeitpunkt t2 benötigt.

$$G\ [\mathrm{min}] = \frac{\log 2 \cdot (t2 - t1)}{\log OD2 - \log OD1}$$

4.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden je nach isolierter und/oder benötigter Plasmidmenge die Kits der Fa. peqlab oder der Fa. Macherey und Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Das Kit der Fa. peqlab (GOLD Plasmid Miniprep Kit I) wurde meist zur Präparation von bis zu 15 bis 25 µg Plasmid-DNA verwendet, während das Kit der Fa. Machery und Nagel für eine größere Aufreinigung von 40 bis 75 µg Plasmid-DNA genutzt wurde. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei - 20 °C gelagert.

4.2.7 Isolierung chromosomaler DNA aus *P. aeruginosa*

Chromosomale DNA aus *P. aeruginosa* wurde mittels des Isolierungs-Kits DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) isoliert. Für die Sequenzierung der chromosomalen DNA aus den CF-Isolaten wurde eine sehr reine und hoch konzentrierte DNA benötigt. Für diese Anforderungen erfolgte die DNA-Extraktion deshalb nach der CTAB-Methode (modifiziert nach (Wilson, 2001)). Diese Methode basiert auf der Lyse der Bakterienzelle durch das ionische Detergenz CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) und der anschließenden DNA-Reinigung mittels Chloroform und der Präzipitation durch Isopropanol.

Arbeitsprotokoll:

- 50 ml LB-Hauptkultur 1:100 mit üN-Kultur animpfen und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 1,0 inkubieren
- 45 ml der Kultur bei 8000 Upm für 10 min zentrifugieren, Pellet mit 1x-PBS waschen und in 17 ml 1x-PBS resuspendieren
- Zugabe von 900 µl 10 %-iger SDS-Lösung (w/v) und 180 µl Proteinase K (10 mg/ml) [Endkonzentration 0,5 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K], mischen und üN bei 55 °C inkubieren
- Zugabe von 3 ml NaCl (5 M) und anschließend von 2,4 ml CTAB/NaCl-Lösung, gut mischen und bei 65 °C für 10 min inkubieren
- ein Volumenteil (ca. 23 ml) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben, sorgfältig mischen, für 2 - 3 min bei RT inkubieren und anschließend bei 8000 Upm für 15 min zentrifugieren
- die oben wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen, wobei die weiße Interphase zurückgelassen wird (Wiederholung dieses Schrittes ca. 5 – 6 x bis keine Interphase mehr sichtbar ist)
- Zugabe von 1 Volumenteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [25:(24:1)]; 10 min Inkubation bei RT und erneutes Zentrifugieren bei 8000 Upm
- Überstand in neues Gefäß überführen, 0,6 VT Isopropanol zugeben und Gefäß solange invertieren bis die ausgefallene DNA sichtbar wird
- DNA-Präzipitat mittels Glashaken (Pasteurpipettenspitze unter Flamme biegen) in neues Reaktionsgefäß mit 1 ml 70 %-igen Ethanol überführen
- Zentrifugation bei 14000 Upm für 5 min und Pellet bei RT trocknen lassen
- Zugabe von 200 µl TE-Puffer und vorsichtiges Lösen des Pellets
- 2 µl RNAse (10 mg/ml) zugeben und für 1 h bei 37 °C inkubieren
- 1 VT Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [25:(24:1)] zugeben, sorgfältig vortexen und 10 min bei 14000 Upm zentrifugieren
- Obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß (2 ml) überführen
- Zugabe von 0,5 VT Natriumacetat (3 M, pH 5,3) und 2,5 VT Ethanol abs.; sorgfältig vortexen und für 1 h bei - 20 °C fällen
- Zentrifugation bei 14000 Upm für 20 - 30 min; Überstand vorsichtig abnehmen
- Pellet vorsichtig mit 300 µl 70 %-igen Ethanol überschichten; 5 min bei 14000 Upm zentrifugieren; erneut Überstand abnehmen
- Pellet für 5 - 10 min trocknen lassen, anschließende Zugabe von 300 µl TE-Puffer
- sorgfältiges Lösen des Pellets üN bei 4 °C

TE-Puffer	Endkonzentration
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

mit HCl pH auf 7,5 einstellen und mit dH_2O auffüllen

CTAB/NaCl-Lösung	Endkonzentration
Puffer:	
NaCl	1,4 M
EDTA	20 mM
Tris	100 mM

mit HCl pH auf 8,0 einstellen und mit dH_2O ad 20 ml auffüllen, dann Zugabe von CTAB-Lösung (lösen im Puffer) zu einer Endkonzentration von 2 % (w/v)

4.2.8 Lagerung von Nukleinsäuren

Um Scherkräfte zu vermeiden, wurde die in dH_2O gelöste chromosomale DNA bei 4 °C gelagert. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Lagerung von Nukleinsäuren (z. B. Plasmid-DNA) bei - 20 °C.

4.2.9 Hitzedenaturierung bakterieller Gesamt-DNA

Für PCR-Versuche wurde die bakterielle Gesamt-DNA im Heizblock vorher hitzedenaturiert (Lyse der Bakterien).

Arbeitsprotokoll:

- von einer frisch bebrüteten Agarplatte mittels Impföse 2 - 3 Kolonien aufnehmen und in 500 µl 1x-PBS einreiben
- Kochen der Bakteriensuspension bei 100 °C für 10 min im Heizblock
- bei 10000 Upm für 10 min bei 4 °C zentrifugieren
- für die PCR werden 5 µl des Überstandes als *Template* eingesetzt

4.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(Mullis and Faloona, 1987;Saiki *et al.*, 1988)

Von Kary B. Mullis 1986 entwickelt und von Saiki *et al.* 1988 durch den Einsatz einer thermostabilen Polymerase weiterentwickelt, kann mit einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) DNA *in vitro* schnell und einfach exponentiell vervielfältigt werden. Bei optimalen Bedingungen können 2^n Kopien einer DNA bei n-Zyklen amplifiziert werden. Für *Screening*-Zwecke wurde die PCR mit dem BioRed Mix (Bioline) durchgeführt.

Standard PCR	**1 Ansatz**
PCR Puffer (10x)	5 µl
2 mM dNTP Mix	0,25 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	0,5 µl
DMSO (100 %)	2,5 µl
40 mM $MgSO_4$	2,5 µl
Gold-*Taq*-Polymerase (Roche)	0,25 µl
DNA-*Template* (10 - 500 ng)	5 µl
dH_2O	ad 50 µl

BioRed Mix PCR	**1 Ansatz**
2x BioRed Mix* (Bioline)	10 µl
50 mM $MgCl_2$	0,2 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	0,5 µl
DMSO (100 %)	0,6 µl
DNA-*Template* (10 - 500 ng)	5 µl
dH_2O	ad 25 µl

* enthält bereits *Taq*-Polymerase und dNTPs

PCR-Programm für Standard- und BioRed Mix-PCR

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 sek	32 Zyklen
Anlagerung	50 – 70 °C	30 sek	32 Zyklen
Elongation	72 °C	60 sek /1 kb	32 Zyklen
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Kühlung	8 °C	∞	

Aufgrund des Fehlens einer 3' → 5' -Exonuklease-Aktivität (*proof reading*-Aktivität) bei der *Taq*-Polymerase (Standard- und BioRed Mix-PCR) kommt es gelegentlich zu einem fehlerhaften Einbau von dNTPs (ca. 1/1000 bp). Deshalb wurde für Ampflikationen, die einen exakten Einbau benötigten (z. B. Klonierungen in Expressionsplasmiden), die Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (Fa. Finnzymes) verwendet und durch Sequenzierung überprüft.

Phusion-PCR	**1 Ansatz**
5x-Phusion HF Puffer	10 µl
2 mM dNTP Mix	5 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	2,5 µl
DMSO (100 %)	1,5 µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl
DNA-*Template* (10 - 500 ng)	5 µl
dH_2O	ad 50 µl

PCR-Programm für Phusion-PCR

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek	
Denaturierung	98 °C	10 sek	32 Zyklen
Anlagerung	50 – 70 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	15 - 30 sek /1 kb	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Kühlung	8 °C	∞	

4.2.11 Auftrennung von DNA nach Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA im Agarosegel erfolgte mit dem PerfectBlue Gelsystem Midi S (peqlab).

Arbeitsprotokoll:

- je nach gewünschter Porengröße wurde 0,5 - 2 % (w/v) Agarose-Lösung hergestellt
- für 1 %-iges Gel (Standard) Zugabe von 100 ml 1x-TAE-Puffer; Aufkochen in der Mikrowelle bis keine Agarosepartikel mehr zu sehen sind
- Agarosegel gießen und sofort einen Kamm in den Gelträger einsetzen
- Gel nach dem Erstarren in Apparatur installieren und Elektrophoresekammer mit 1x-TAE-Puffer befüllen, sodass das Gel mit Puffer bedeckt ist
- Kamm entfernen und Geltaschen mit Proben beladen
- Proben zuvor mit BPB-Ladepuffer im Verhältnis 1:6 (BPB-Puffer/Probe) mischen
- Gellauf bzw. Trennung bei 120 V für 60 min durchführen
- Färbung des Agarosegels in einer 1:10 verdünnten Ethidiumbromidlösung (4 µg/ml) für ca. 15 min; kurzes Waschen in Wasser
- durch fluoreszierenden und interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid wird die aufgetrennte DNA im Gel auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht
- angeschlossene Videodokumentationsanlage sowie Thermodrucker (INTAS P91D von Mitsubishi) ermöglicht das Fotografieren und das Drucken

6x-Bromphenolblau (BPB)-Ladepuffer

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

4.2.12 Aufreinigung von DNA

Wurden DNA-Fragmente in einem präparativen Gel aus einem Agarosegel isoliert bzw. mussten sie gereinigt werden, so wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-up-Kit nach Angaben des Herstellers Promega verwendet.

4.2.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA im UV-Bereich (OD_{260}) wurden Ultra-Mikro-Quarzküvetten mit einem Volumen von 10 bzw. 100 µl (Fa. Hellma) verwendet. Eine Extinktion (OD_{260}) von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml und bei RNA 40 µg/ml an Oligonukleotiden.

4.2.14 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die spezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Fa. Fermentas) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet sowie die empfohlenen Inkubationstemperaturen eingehalten. Die Inkubation wurde entweder üN oder innerhalb 1,5 - 3 h in der Regel bei 37 °C durchgeführt. Im Falle eines Doppelverdaus wurde ein Puffer verwendet, in denen beide Enzyme noch mindestens eine Enzym-Aktivität von 50 % aufweisen. Nach einem Restriktionsverdau wurde die DNA aufgereinigt. Der Verdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Folgende Restriktionsenzyme der Fa. Fermentas wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 4.14 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Puffer	Inkubationstemperatur
*Asc*I	5'...GG↓CGCGCC...3' 3'...CCGCGC↑GG...5'	Tango-Puffer	37°C
*Bam*HI	5'...GG↓ATCC...3' 3'...CCTA↑GG...5'	*Bam*HI-Puffer	37°C
*Bsp*EI	5'...T↓CCGGA...3' 3'...AGGCC↑T...5'	Tango-Puffer	55°C
*Eco*RI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	*Eco*RI-Puffer	37°C
*Fsp*I	5'...TGC↓GCA...3' 3'...ACG↑CGT...5'	Tango-Puffer	37°C
*Hind*III	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↑A...5'	R-Puffer	37°C
*Kpn*I	5'...GGTAC↓C...3' 3'...C↑CATGG...5'	*Kpn*I-Puffer	37°C
*Pfl23*II	5'...C↓GTACG...3' 3'...GCATG↑C...5'	Tango-Puffer	37°C
*Xba*I	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↑T...5'	Tango-Puffer	37°C

Reaktionsansatz	**1 Ansatz**
entsprechenden 10x-Puffer	2 µl
Restriktionsendonuklease	10 Units/µl
DNA-*Template* (ca. 0,2 µg)	x µl
dH_2O	ad 20 µl

Inkubation üN oder innerhalb 1,5 - 3 h im Temperaturoptimum.

4.2.15 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Um Religationen bei geschnittenen Plasmiden zu vermeiden, wurde gegebenenfalls die *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) dem Ansatz nach dem Verdau und vor der Ligation zugefügt. Dieses Enzym dephosphoryliert die endständigen 5'-Phosphatgruppen von Plasmiden bzw. Nukleinsäuren, sodass die Effizienz einer Religation vermindert wird.

Reaktionsansatz	**1 Ansatz**
CIAP-Puffer (10x)	10 µl
CIAP (0,1 U/µl)	2 µl
Plasmid 0,2 pmol	x µl

Ansatz wurde mit dH_2O auf 100 µl aufgefüllt und bei 37 °C für 30 min inkubiert.

4.2.16 Ligation von DNA-Fragmenten

In dieser Arbeit wurde für die Ligation von DNA-Fragmenten ausschließlich die T4-DNA-Ligase (Fermentas) verwendet. Mit Hilfe dieses Enzyms wurde doppelsträngige DNA unter ATP-Verbrauch über eine Phosphodiesterbindung mit dem geschnittenen Vektor verknüpft. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden meist im 3-fachen Überschuss (oder 6-fachen) gegenüber dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte entweder üN bei 16 °C oder für 2 - 3 h bei RT.

Ligationsansatz	**1 Ansatz**
Ligasepuffer (10x)	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
DNA-Insert (geschnitten)	x µl
Vektor (geschnitten)	y µl
dH_2O	ad 20 µl

Inkubation üN oder bei RT für 2 - 3 h.

4.2.17 Klonierung mit dem TOPO® TA Cloning® Kit

Zu Klonierungszwecken wurden DNA-Fragmente in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor kloniert. Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen.

4.2.18 Konstruktion einer *P. aeruginosa*-Deletionsmutante und -Insertionsmutante
(Hoang *et al.*, 1998)

Unter der Verwendung des Suizid-Vektors pEX18AP wurden gezielt chromosomale Genbereiche von *P. aeruginosa* deletiert bzw. inseriert und somit Gene inaktiviert. Zunächst wurde der zu untersuchende Bereich von *P. aeruginosa* (Sequenz aus www.pseudomonas.com) mittels PCR amplifiziert und über die angehängten Schnittstellen in den Vektor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) kloniert. Das Konstrukt wurde in *E. coli* DH5α transformiert, wobei die (Blau-Weiß)-Selektion unter Verwendung von (IPTG/X-Gal) und Ampicillin bzw. Carbenicillin erfolgte. Ein interner Genbereich wurde durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten und durch eine Gentamicin-Resistenzkassette (Gm^R) ersetzt, welche zuvor mit Hilfe des Matritzenvektors pUCP30T amplifiziert wurde. Bei der Konstruktion der Einzelmutante (Mdh-Mutante) wurde sofort die Resistenzkassette in das Gen inseriert (Insertion), wobei vorher kein Bereich deletiert wurde. Die Vorklonierungen für die Mdh-Einzelmutante wurden nicht wie bei der Deletionsmutante (IDH-Doppelmutante) im pCR®2.1-TOPO® durchgeführt, sondern im Vektor pUCP20T. Das TOPO- bzw. pUCP20T-Derivat mit dem durch eine Gentamicin-Kassette unterbrochenen Genbereich wurde in den pEX18AP Suizidvektor umkloniert. Danach erfolgte eine Transformation des neu konstruierten Suizidvektors in chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen. In einer anschließenden Konjugation wurde der modifizierte pEX18AP-Vektor von *E. coli* nach *P. aeruginosa* übertragen. *P. aeruginosa* wurde mittels PIA-Agar selektioniert, während *P. aeruginosa*-Mutanten über das Antibiotikum Gm^R (50 µg/ml) selektioniert wurden. Post-Rekombinanten wuchsen nur, wenn sie den Suizidvektor durch homologe Rekombination ins Genom integrierten; eine Replizierung in *P. aeruginosa* war nicht möglich (Abbildung 4.2). Eine erste homologe Rekombination erzeugt dabei noch nicht die gewünschte Insertion der Resistenzkassette in das Zielgen (Ausnahme sofortige doppelte homologe Rekombination). Der Suizidvektor trägt neben dem *bla*-Gen (verantwortlich für Ampicillin bzw. Carbenicillin-Resistenz) auch ein *sacB*-Gen, das für eine Levansaccharose kodiert. In vielen Gram-negativen Bakterien, wie auch *Pseudomonas*, kommt es in Anwesenheit von Saccharose zum Abbau dieses Zuckers durch die Levansaccharose, dessen Spaltprodukt Levan hochtoxisch wirkt (Jäger *et al.*, 1992). Potentielle Mutanten, die auf PIA-Gm^R Platten wuchsen, wurden bezüglich Ihrer Saccharosesensitivität überprüft. Mutanten, die nicht mehr auf LB-Medium supplementiert mit 5 %-Saccharose wuchsen, wurden weiter verwendet. Durch Ausplattieren dieser Mutanten auf LB-Medium-Gm^R supplementiert mit 5 %-iger Saccharose wurde eine zweite doppelte homologe Rekombination erzwungen. Es konnten nur Mutanten wachsen, die eine Resistenz gegenüber Gm^R aufwiesen und in der Lage waren auf Saccharose zu wachsen, da sie das *sacB*-Gen, das *bla*-Gen und den WT-Genbereich aus ihrem Chromosom entfernt hatten. Potentielle Mutanten, die nicht mehr mit Carbenicillin wachsen konnten, wurden genotypisch mittels PCR überprüft, bevor sie anschließend bei - 80 °C weggefroren wurden.

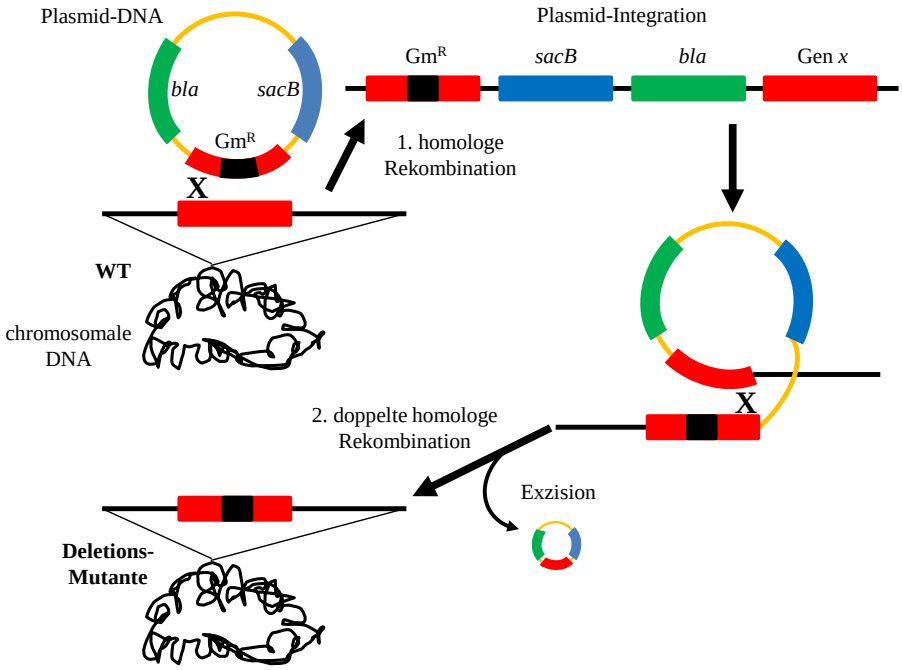


Abbildung 4.2 Strategieschema zur Konstruktion von *P. aeruginosa*-Mutanten
Nach der ersten homologen Rekombination (chromosomale Insertion des Suizidplasmids) werden durch negative Selektion (Zugabe von Saccharose) auf Verlust des Vektors und gleichzeitig durch positive Selektion auf Erhalt der Resistenzkassette selektioniert (doppelte homologe Rekombination).

4.2.19 DNA-Sequenzierung

Doppelsträngige DNA (PCR-Produkt) und Plasmid-DNA wurden entweder bei der Firma MWG Eurofins (Ebersberg) oder bei der Firma Agowa (Berlin) sequenziert.

4.2.20 Herstellung Ca^{2+}-kompetenter *E. colis* DH5α

Arbeitsprotokoll:

- LB-Hauptkultur 1:100 mittels üN-Kultur animpfen und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,4 – 0,5 inkubieren
- Kultur auf Eis für 10 min kühlen
- Überführung in sterilen Zentrifugenröhrchen (bei kleineren Mengen in Falcons), anschließendes Zentrifugieren bei 3000 Upm für 10 min bei 4 °C
- Zellen auf Eis sorgfältig in eiskaltem TFB 1 (30 ml/100 ml Ausgangskultur) resuspendieren
- Überführung in vorgekühlte Falcons; Zentrifugation bei 3000 Upm für 10 min bei 4 °C
- Zellen auf Eis sorgfältig in eiskaltem TFB 2 (4 ml/100 ml Ausgangskultur) resuspendieren
- je 200 µl der hergestellten kompetenten Zellen in vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettieren und in flüssigem Stickstoff einfrieren, anschließende Lagerung bei - 80 °C

TFB 1

K^+-Acetat	30 mM
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	50 mM
$RbCl_2$	100 mM
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	10 mM
Glycerin	15 %

pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt; Puffer steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

TFB2

MOPS (pH 7,0)	10 mM
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	75 mM
$RbCl_2$	10 mM
Glycerin	15 %

pH 7 mit Salzsäure eingestellt; Puffer steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

4.2.21 Transformation von (Plasmid)-DNA in Ca^{2+}-kompetenten *E. colis*

Für die Transformation in *E. coli* wurden in dieser Arbeit ausschließlich Ca^{2+}-kompetente *E. coli* DH5α-Zellen verwendet. Die Ausplattierung der Transformanten erfolgte auf LB-Selektivagarplatten.

Arbeitsprotokoll:

- Ca^{2+}-kompetente *E. coli* DH5α-Zellen nach - 80 °C Lagerung im Eis auftauen
- Zugabe von 0,5 µg Plasmid-DNA oder des gesamten Ligationsansatz (20 µl)
- Inkubation für 30 min auf Eis (Bindung der DNA an die Zellwand)
- Hitzeschock bei 42 °C im Thermomixer für ca. 90 sek (Aufnahme der DNA)
- 800 µl 37 °C-warmes LB-Medium zu gestressten Zellen dazugeben
- unter leichtem Schütteln (300 Upm) für 1 - 3 h im Thermomixer bei 37 °C inkubieren
- Transformanten auf LB-Selektivagarplatten ausplattieren und Inkubation üN bei 37 °C

4.2.22 Blau-Weiß-Selektion (α-Komplementation)

Nach der Transformation kann bei *E. coli*-Stämmen (z. B. DH5α), die ein funktionsfähiges *lac*-Operon besitzen, mit den Plasmiden der pBluescript-, pUC-, pEX- sowie pBBR1MCS-Reihe das Blau-Weiß-Selektionsverfahren angewendet werden.

Bei diesem Verfahren werden IPTG (Induktor) und X-Gal (Farbstoffvorläufer) dem Medium hinzugegeben. Das IPTG bindet den Repressor, sodass es zu einer Expression des *lacZ*-Gens kommt und die gebildete ß-Galaktosidase spaltet das X-Gal, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Transformanten mit einem intakten *lacZ*-Gen bilden somit blaue Kolonien. Dagegen kommt es bei einer Insertion im *lacZ*-Gen zu einem Defekt in der Enzymexpression, sodass weiße Kolonien wachsen.

IPTG-Lösung (100 mM)

- 283,3 mg IPTG in 10 ml dH_2O lösen und steril filtrieren (0,22 µm)
- 1 ml Aliquots bei - 20 °C wegfrieren

X-Gal-Lösung (2 % (w/v))

- 200 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal) in 10 ml N,N‘-Dimethylformamid lösen
- 1 ml Aliquots bei - 20 °C lichtgeschützt wegfrieren

Arbeitsprotokoll:

- kurz vor Ausplattierung je 40 µl der IPTG- und X-Gal-Lösung auf die Selektivagarplatte tropfen und mit Drigalskispatel verteilen
- Lösung in den Agar einziehen lassen; nach anschließender Ausplattierung der Transformanten erfolgt die Inkubation bei 37 °C üN

- bessere Farbentwicklung bzw. Differenzierung erfolgt, wenn die Platten nach der Inkubation bei 37 °C kühl im Kühlschrank gelagert werden

4.2.23 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation
(Figurski and Helinski, 1979)

Nichtkonjugative Plasmide wurden in dieser Arbeit über triparentale Konjugation in *P. aeruginosa* (Rezipient) übertragen. Da diese Plasmide nur einen *oriT*, jedoch keine *tra*-Gene besaßen, wurde *E. coli* Hb1c1 (Helferstamm) mit dessen Helferplasmid pRK2013 (trägt *tra*-Gene) zum Transfer benötigt. *E. coli* DH5α (Donor) trug das jeweils zu konjugierende Plasmid. Alle drei Stämme wurden miteinander vermischt und nach einer bestimmten Inkubationsphase wurden die Transkonjuganten auf *Pseudomonas*-Isolationsagar (PIA) mit entsprechendem Antibiotikum selektioniert.

Arbeitsprotokoll:
- jeweiligen Bakterienstämme in 5 ml LB-üN-Kultur (ggf. mit Antibiotikum) inkubieren
- Inkubation für Donor-Stamm (*E. coli* mit Donor-Plasmid) und Helfer-Stamm (*E. coli* mit Hb1c1 pRK2013) erfolgt bei 37 °C, für Rezipienten-Stamm (*P. aeruginosa*) bei 43 °C
- üN-Kultur bei 6000 Upm für 5 min pelletieren
- Pellet zur Entfernung der Antibiotika mit 1 ml LB-Medium suspendieren und erneut zentrifugieren
- Zellpellet in 200 µl LB-Medium resuspendieren
- 100 µl des Donor-Stammes und 100 µl des Helfer-Stammes werden miteinander gemischt und für 30 min bei RT ohne Erschütterungen inkubiert (Ausbildung der Konjugationsbrücke)
- nach Inkubationsphase vorsichtige Zugabe von 200 µl des Rezipienten-Stammes
- je 8 Tropfen mit einem Volumen von 50 µl auf vorgewärmte LB-Platten tropfen
- Inkubation bei 37 °C für ca. 4 - 6 h
- gewachsene Bakterien mit Impföse aufnehmen und in 1 ml 1x-PBS resuspendieren
- Verdünnungsreihe mit 1x-PBS angelegen und je 100 µl der Stufen 10^{-1} - 10^{-4} auf PIA-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattieren
- Inkubation bei 37 °C üN

4.2.24 Southern Blot
(Southern, 1975)

Mit dem Southern Blot wurde ein definiertes DNA-Fragment nach dem Transfer auf eine Nylonmembran transferiert, anschließend zu Einzelsträngen getrennt und mit Hilfe einer Digoxigenin (DIG) markierten Sonde aus einem Fragmentgemisch durch Hybridisierung nachgewiesen.
Dazu wurde genomische DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen fragmentiert, welche dann bei einer Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Eine Behandlung des Gels mit einer Salzsäure- und einer Natronlaugelösung bewirkte eine Depurinierung und Denaturierung der DNA. Mit Hilfe einer *Blotting*-Apparatur wurde die aufgetrennte ssDNA auf eine positiv geladene Nylonmembran überführt. Eine Digoxigenin-11-dUTP markierte Sonde hybridisierte spezifisch mit dem DNA-Fragment, deren Sequenz komplementär zur Sonde ist. Nach dem Abwaschen von unspezifisch gebundenen Sondenmolekülen erfolgte die Detektion der hybridisierten Sonden in einer Enzym-Immunreaktion durch einen DIG-spezifischen Antikörper. An dem Antikörper war eine

alkalische Phosphatase gekoppelt, die bei Zugabe der Substrate 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) eine chemische Reaktion katalysierte, wodurch es zu einem lilafarbenen Farbstoffniederschlag kam. Dadurch konnte das spez. Bandenfragment sichtbar gemacht und mit Hilfe eines DIG-Größenstandards bezüglich der Größe kontrolliert werden.

4.2.24.1 Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-11-dUTP markierten DNA-Sonde

Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde mit einem speziellen DIG-PCR-Mastermix mittels PCR amplifiziert, dessen dNTP-Mix unter anderem das Digoxigenin-11-dUTP (Roche) enthielt. Der spez. PCR-Mastermix enthielt:

DIG-PCR-Mastermix		**dNTP-Mix***	
PCR-Puffer	5 µl	dATP	1 mM
dNTP-Mix*	5 µl	dGTP	1 mM
DIG-11-dUTP	5 µl	dCTP	1 mM
Primer 1	0,5 µl	dTTP	0,65 mM
Primer 2	0,5 µl		
Taq-Polymerase	0,25 µl	DIG-11-dUTP	0,35 mM
DNA-*Template*	1,5 µl		
DMSO	2 µl		
dH_2O	30,25 µl		

Das dafür eingesetzte DNA-*Template* bestand aus durch Hitzepräparation aufgeschlossener chromosomaler DNA. Durch den Einbau des größeren Moleküls DIG im Vergleich zum dTTP konnte eine Bandenverschiebung des amplifizierten Fragmentes im Agarosegel bei der Überprüfung festgestellt werden. Die amplifizierten DIG-markierten DNA-Sonden wurden bei - 20 °C gelagert und vor jeder Verwendung hitzedenaturiert.

4.2.24.2 Restriktionsverdau chromosomaler DNA und anschließender Transfer auf Nylonmembran

(Peferoen *et al.*, 1982)

Isolierte chromosomale DNA wurde üN mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI oder *Fsp*I bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde in einem analytischem 1 %-igem Agarosegel überprüft. In einem weiteren präparativen 1 %-igem Agarosegel wurde die gesamte geschnittene chromosomale DNA für ca. 2,5 h bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Über ein Vakuum, das in einer Vakuumblot-Apparatur angelegt wurde, erfolgte die Übertragung der aufgetrennten DNA in einem Agarosegel auf eine Nylonmembran. Dafür wurde die mit 20x-SSC voräquilibrierte Nylonmembran luftblasenfrei auf die mit dH_2O angefeuchtete Saugunterlage der Vakuumblot-Apparatur gelegt. Der nicht mit der Membran bedeckte Bereich plus mindestens 1 cm von der Nylonmembran wurde mit einer Plastikmaske luftdicht abgedeckt. Das Agarosegel wurde so auf die Membran gelegt, dass das freie Maskenfenster ohne Luftblasen bedeckt wurde und dabei die Geltaschen außerhalb des Fensters lagen. In der unteren Kammer wurde ein konstanter Druck von

50 mbar angelegt. Über eine Zeitdauer von ca. 1 - 2 h wurde das oben freiliegende Agarosegel mit verschiedenen Lösungen (s.u.) überschichtet. Nach der Depurinierung und Denaturierung der DNA erfolgte der eigentliche Transfer auf die Nylonmembran durch die Überschichtung mit 20x-SSC. Im UV-*Crosslinker* (Prog. *Autocrosslinking*) wurden die DNA-Stränge durch UV-Licht (λ_{254}) mit der Membran quervernetzt.

Lösung	Zusammensetzung	Inkubationsdauer
Depurinisierungslösung[a]	0,25 N HCl	15 min
Denaturierungslösung[b]	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH	10 min
Neutralisierungslösung	1 M Tris-HCl, 2 M NaCl; pH 5,2	10 min
Transferlösung: 20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na_3-Citrat; pH 7,0	1 - 2 h

[a]: nach der Überschichtung mit der Depurinisierungslösung von blau zu gelb
[b]: nach Zugabe der Denaturierungslösung verfärbte sich das Gel von gelb zu blau

4.2.24.3 Hybridisierung mit DIG-markierter DNA-Sonde

Zunächst wurde die Nylonmembran in ein verschraubbares Glasröhrchen gegeben und 0,125 ml/cm^2 Prähybridisierungslösung dazugegeben. Nach ca. 30 minütiger Inkubation mit Prähybridisierungslösung (2,5 ml/100 cm^2) bei 63 °C in einem Hybridisierungsofen folgte die Inkubation mit Hybridisierungslösung (2,5 ml/100 cm^2), welche die hitzedenaturierte DIG-markierte DNA-Sonde (100 °C, 10 min) enthielt. Die Hybridisierung erfolgte 20 h bei 63 °C und anschließend wurde die Membran für 30 min mit der Waschlösung I (50 ml/100 cm^2) und dann mit der Waschlösung II (50 ml/100 cm^2) bei 60 °C gewaschen.

Prähybridisierungslösung

Blocking-Stammlösung	4 ml
N-Lauroylsarkosin (10 % [w/v])	40 µl
SDS (10 % [w/v])	80 µl
20x-SSC	10 ml
dH_2O	ad 40 ml

Blocking-Stammlösung

Blocking-Reagenz	10 g
DIG-Puffer I	ad 100 ml

Hybridisierungslösung = Prähybridisierungslösung + DIG-markierte DNA-Sonde

DIG-Puffer I

0,1 M Maleinsäure	11,6 g
0,15 M NaCl	8,7 g
NaOH	7 g
dH_2O	ad 1000 ml
	pH 7,5

Waschlösung I
1x-SSC
SDS 0,1 % [w/v]

Waschlösung II
0,5x-SSC
SDS 0,1 % [w/v]

4.2.24.4 DIG-Detektion

Soweit nicht anders angegeben wurden alle folgenden Schritte und unter ständigem Schütteln bei RT durchgeführt. Der Blot wurde zweimal für je 15 min in Puffer II geschwenkt, um unspezifische Bindungen abzudecken. Nach Entfernung von Puffer II und Zugabe von 20 ml des Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Antikörper (1:5000 in Puffer II verdünnt) folgte eine Inkubation für 30 min bevor der Blot zweimal für je 15 min in 20 ml Waschpuffer gewaschen wurde. Die Waschlösung wurde entfernt und in 20 ml Puffer III wurde der Blot für ca. 5 min äquilibriert. In der Zwischenzeit wurde eine BCIP/NBT-Tablette in 10 ml dH_2O gelöst. Die frisch angesetzte BCIP/NBT-Lösung wurde gleichmäßig über den Blot verteilt und die Inkubation bis zur Banden-Bildung erfolgte im Dunkeln ohne Schütteln. Das Reaktionsprinzip beruht auf Dephosphorylierung des Substrates BCIP durch die alkalische Phosphatase. Das entstehende Produkt wird weiter durch das Substrat NBT oxidiert, welches dadurch eine Farbveränderung von blau zu lila erfährt. Durch mehrmaliges Schwenken in dH_2O kann die Farbreaktion abgestoppt werden.

Puffer I
siehe Hybridisierung

Puffer II
1 % (w/v) Blockinglösung in Puffer I (frisch angesetzt)

Puffer III (pH 9,5)
Tris-HC 0,1 M
NaCl 0,1 M

Waschpuffer
Tween 20 0,3 % (v/v) in Puffer I

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Wachstum von *P. aeruginosa* auf supplementiertem Minimalmedium

Das Wachstum auf Minimalmedium (M9) wurde untersucht, welches mit einer einzigen C-Quelle supplementiert wurde. Dazu wurde jeweils 10 µl einer Bakteriensuspension (OD_{600} ca. 1,0) auf das entsprechende Medium getropft und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Entsprechendes Wachstum konnte nicht quantifiziert werden und wurde nur qualitativ beurteilt.

4.3.2 Biolog-*Microarrays*™ zur Identifizierung metabolischer Phänotypen
(Bochner *et al.*, 2001)

Durch Anwendung des Biolog-*Microarrays*™ (Biolog) können mehrere Stoffwechselsubstrate in einer Mikrotiterplatte gleichzeitig auf Metabolisierung getestet werden und so hunderte von Phänotypen *in vitro* identifiziert werden. Jeder Kavitätsboden einer Mikrotiterplatte ist mit einem unterschiedlichen Substrat in unterschiedlicher Konzentration (z. B. C-Quelle) durch den Hersteller vorbeschichtet (Beschichtungsmuster siehe 8.1.1/8.1.3). Die Verstoffwechselung eines Substrates hat zur Folge, dass

die in der Atmungskette gebildeten Elektronen ein oxidiertes Tetrazoliumsalz reduzieren und es somit zu einer violetten Farbstoffbildung kommt. Durch Messung des gebildeten Farbstoffes Formazan bei 590 nm kann daraus geschlossen werden, ob das zu untersuchende Bakterium in der Lage ist, bestimmte Substrate zu verwerten. Die in den Bakterien vorkommende Zellatmung verläuft unabhängig vom Wachstum. In dieser Arbeit wurden die Plattentypen PM1 und PM3 der Firma BIOLOG (Hayward, USA) verwendet.

Menadion-Stocklösung (100x)

- 5,52 mg Menadion in 10 ml dH_2O lösen und steril filtrieren (0,22 µm)
- Lagerung erfolgt lichtgeschützt bei - 20 °C

Arbeitsprotokoll:

- Ausstrich des Bakterienstammes (aus - 80 °C Stock) auf R2A-Agarplatte
- nach Inkubation bei 37 °C Überimpfung auf neue Platte und erneute Inkubation
- 15 ml Transmissionslösung I (pro Stamm)
  - 8 ml Volumen zum Einstellen der Transmission
  - 6 ml Volumen für Korrektur
  - 1 ml Volumen als Transmissions-Leerwert
- ein wenig des frisch gewachsenen Bakterienstammes in 800 µl Transmissionslösung I suspendieren, wobei eine Blasen-Bildung zu vermeiden ist
- Zentrifugation bei 4 °C für 10 min und 2500 Upm
- vorsichtige Abnahme und Verwerfung des Überstandes
- Suspendierung des Zellpellets in 200 µl Transmissionslösung, erneute Blasen-Bildung meiden
- Transmission mit Hilfe der Transmissionslösung I auf 42 % bringen
- durch Mischung mit der Farbstofflösung I wird die Transmissionskultur auf 85 % verdünnt
  - Farbstofflösung I 4,64 ml
    + Transmissionskultur (42 %) 1,16 ml
- Einstellung der Inokulationskultur
  - Farbstofflösung II 12 ml
    + Transmissionskultur 85 % 60 µl
- in ein Reservoir für Mehrkanalpipetten die Inokulationskultur füllen
- 100 µl Inokulationskultur mit Hilfe einer Mehrkanalpipette in jede Vertiefung pipettieren
- Verschließen der Biolog-Platte mit einer atmungsaktiven Folie
- Messen der OD_{590} im Multi-Plate Reader TriStar für 24 h bei 37 °C

Transmissionslösung I

dH_2O	2,5 ml
IF-0a	12,5 ml
Menadion (100x)	150 µl

Farbstofflösung I

dH_2O	1,16 ml
IF-0a	6,25 ml
Dye-Mix A	90µl

Farbstofflösung II

dH_2O	2,35 ml
IF-10a	12,5 ml
Dye-Mix A	150 µl

4.3.3 Transkriptomanalyse mit dem GeneChip® *Pseudomonas aeruginosa*

Der GeneChip® *Pseudomonas aeruginosa* von Affymetrix enthält Sonden für über 5500 ORFs und 18 tRNA-Gene vom PAO1 Stamm von *P. aeruginosa*. 199 Sonden korrespondieren zu 100 intergenische Sequenzen und Sonden für zuletzt 117 Gene, die in anderen Stämmen als PAO1 vorkommen. Zur Präparation der Proben (RNA-Extraktion; Grössenbestimmung und Verdau der RNA) für diesen Chip wurde die reverse Transkriptase und verschiedene Hexamere für die cDNA-Synthese (Synthese, Fällung und Aufreinigung von cDNA) verwendet, die die Gesamt-RNA in cDNA umschreiben. Nach der Fragmentierung der cDNA (Fragmentierung der cDNA; *Terminal Labeling*) hybridisieren die immobilisierten Nukleinsäuremoleküle mit den fluoreszenzmarkierten Zielmolekülen (*Targets*; Hybridisierung, Waschen und Anfärben). Ein Array-Scanner detektiert und quantifiziert die Nukleinsäure-Hybridisierungen (Detektion, Quantifikation und Statistik). Die Anzucht und weitere Behandlung für jeden zu untersuchenden Stamm erfolgte insgesamt unabhängig in Triplikaten.

4.3.3.1 RNA-Extraktion zur Transkriptomsanalyse

Arbeitsprotokoll:

- die zu untersuchenden Stämme in 25 ml LB-üN-Kultur animpfen und bei 37 °C inkubieren
- 3 x 50 ml LB-Hauptkultur jeweils mit entsprechendem Stamm bei OD_{600} von 0,02 animpfen
- Wachstum bei 37 °C und 200 Upm bis mid-logarithmische Wachstumsphase (OD_{600} ca. 1,0)
- für weitere Behandlung werden Proben auf Eis gehalten, sofern nichts anderes angegeben
- in Trizol-beständiges SS34 Röhrchen jeweils 35 ml Kultur füllen und anschließendes Zentrifugieren bei 8000 Upm und 4 °C für 10 min
- Überstand verwerfen; Pellet unter dem Abzug durch Vortexen in 25 ml Trizol vollständig resuspendieren und für 5 min bei RT inkubieren
- Zugabe von 5 ml Chloroform und 15 sek in der Hand schütteln, 3 min Inkubation bei RT
- Zentrifugation bei 12000 Upm, 15 min, 4 °C
- Überführung der wässrigen Phase in 2 x kleinen Falcons
- Präzipitation der RNA 1:1 mit ca. 6 - 7 ml Isopropanol, Inkubation für 10 min bei RT
- gefällte RNA für mind. 45 min bei 4300 Upm und 4 °C zentrifugieren
- Verwerfung des Überstandes und Waschen der RNA mit 1 ml 70 %-igem Ethanol
- RNA in 2 x 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilen und bei 14000 Upm für 5 min bei 4 °C zentrifugieren; Überstand anschließend verwerfen
- ca. 5 - 10 min Trocknen der RNA, umgekehrtes Reaktiongefäß auf ein sauberes Tuch stellen
- Lösen der RNA in 150 µl dH_2O; Inkubation bei 65 °C für 10 min
- 84 µl RNA, 6 µl DNase I (10 U/µl; Fa. Roche) und 10 µl Puffer mischen
- kurzes Zentrifugieren und Inkubation bei 37 °C für 20 min
- Zugabe von 1,6 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 (Endkonzentration 8 mM) und 10 minütige Inkubation bei 75 °C führt zum Stoppen der Reaktion (Aufbewahrung der Proben bei - 20 °C möglich)

4.3.3.2 Grössenbestimmung und Verdau der RNA

Arbeitsprotokoll:

- je nach Ausbeute RNA 1:20 oder 1:50 mit DEPC-Wasser verdünnen, Messen der Konzentration (Ratio sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen)
- RNA mit DEPC-Wasser auf Konzentration von 87 µg/µl einstellen

- 1 g Agarose mit 85 ml dH_2O in der Mikrowelle aufkochen, Abkühlung auf ca. 60 °C
- Zugabe von 5 ml Formaldehyd (37 %) und 10 ml MOPS (10x); Gel sofort unter Abzug gießen

Probenvorbereitung	
Formamid	5 µl
Formaldehyd	2 µl
5x-MOPS	2 µl
dH_2O	1 µl
RNA-Loading Dye (10x)	+ 1 µl
(RNA-Marker)	+ 1 µl

- Inkubation der Proben bei 70 °C für 10 min, anschließend sofort auf Eis
- Gellauf bei 100 V für 120 min; Laufpuffer: 1x-MOPS in DEPC-Wasser
- Färbung des Gels für 5 - 10 min (200 ml dH_2O + 20 µl Ethidiumbromid)
- Entfärbung des Gels für 2 h bei 4 °C in DEPC-Wasser im Dunkeln

4.3.3.3 Synthese, Fällung und Aufreinigung von cDNA für die Genexpressionsanalyse

Arbeitsprotokoll für die Erstellung von Spike Transcript (MEGAScript® T3 Kit; Applied Biosystems) nach Hersteller.

Arbeitsprotokoll (Synthese):

- Alle Schritte auf Eis pipettieren!

Mastermix I	**1 Ansatz**
Random Primer (75 ng/µl)	10 µl
Spike Transcript	2 µl
DEPC-Wasser	6,5 µl

- Mischen von 18,5 µl Mastermix I + 11,5 µl RNA (0,87 µg/µl); kurzes Zentrifugieren
- PCR-Block

Temperatur	Zeit
70 °C	10 min
25 °C	10 min
4 °C	∞

Mastermix II	**1 Ansatz**
5x-M-MLV Reaktionspuffer	12 µl
100 mM DTT	3 µl
10 mM dNTPs	3 µl
Superase In (20 U/µL)	1,5 µl
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus (200 U/µL)	7,5 µl
DEPC-Wasser	3 µl

- Mischung 30 µl des Mastermix II zu Mastermix I + RNA geben (insgesamt 60 µl), kurzes Zentrifugieren

PCR-Programm:

Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
37 °C	60 min
42 °C	60 min
70 °C	10 min
4 °C	∞

Arbeitsprotokoll (Fällung und Aufreinigung):

- Zugabe von 20 µl NaOH (1N), Inkubation bei 65 °C für 30 min
- Neutralisation durch Zugabe von 20 µl HCl (1N)
- mittels Wizard PCR CleanUp-System (Promega-Kit) erfolgt die Aufreinigung nach Protokoll des Herstellers (anschließende Lagerung bei - 20 °C möglich)
- Verdünnung der gemessenen cDNA 1:20 (optimale Ratio: 1,8)

4.3.3.4 Fragmentierung der cDNA mit Kontrolle

Arbeitsprotokoll:

- 2 - 4 µg der 1:20 verdünnten cDNA zur Fragmentierung einsetzen

Reaktionsansatz	**1 Ansatz**
Puffer	5 µl
cDNA (2 µg)	x µl
DNase (0,2 U/µl, Roche)	2 µl
DEPC Wasser	ad 50 µl

- Fragmentierung im Thermocycler

Temperatur	Zeit
37 °C	10 min
98 °C	10 min
4 °C	∞

Hinweis:

- ➢ frische DNase-Arbeitslösung (DNase Stocklösung 10 U/µl)
- ➢ bei jeder neuen DNase muss die Konzentration der DNase-Arbeitslösung erneut austitriert werden

Arbeitsprotokoll (Kontrolle):

- Reinigung der Glasplatten mit Seife und Ethanol
- Herstellung eines 15 %-igen Polyacrylamidgels

1 x PAA - Gel	
Acrylamid	3,75 ml
TBE (10x)	1 ml
DEPC-Wasser	5,25 ml
TEMED	16 µl
APS (10 %)	66 µl

- Probenbehandlung wie folgt pipettieren und anschließend kurz zentrifugieren:

Probe	Marker
5 µl cDNA	2 µl Gene Ruler 100 bp ladder
5 µl DEPC-Wasser	8 µl DEPC-Wasser
2 µl Loading Dye	2 µl Loading Dye

- Gellauf bei 100 V für 60 min; Laufpuffer: 1x-TBE
- Gel für ca. 30 min färben (30 ml 1x-TBE-Puffer + 3 µl SYBR-Green)
- erfolgreiche Fragmentierung, wenn cDNA Fragmente bei 50 - 200 bp liegen

4.3.3.5 Terminal Labeling mit Kontrolle

Arbeitsprotokoll für Labeling Kit (Fa. Enzo, insgesamt 25 Reaktionen) erfolgt nach Hersteller:

Reaktionsansatz	1 Ansatz
5x-Reaktions-Puffer	12 µl
$CoCl_2$ (10x)	6 µl
Biotin-ddUTP	1 µl
Terminal Transferase	2 µl
Fragmentierte cDNA (2 µg)	39 µl

- Inkubation im Thermocycler bei 37 °C für 60 min
- Reaktionsstopp durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0
- bis auf 5 µl (für Kontrolle des Labeling) restliche Probe bis zur Hybridisierung bei - 20 °C wegfrieren

Arbeitsprotokoll (Kontrolle):
- Herstellung 15 %-igen PAA-Gels (s. o.)
- 5 µl Probe mit 5 µl Neutravidinshift mischen, Inkubation bei RT für 5 min
- Zugabe von 2 µl Loading Dye und anschließendem Gellauf bei 100 V für 60 min
- Färbung des Gels mit SYBR Green für 30 min

4.3.3.6 Hybridisierung, Waschen und Anfärben

Das Hybridisieren, Waschen und Anfärben wurde durch die Kooperationspartner S. Weidner und O. Prazeres da Costa in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. D. Busch am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der TU München durchgeführt.

Hybridisierung	Waschprogramm	Probe Array Type
Protokoll Pae Genome Array (Affymetrix)	cDNA	HG-Focus

4.3.3.7 Genchip-Daten: Detektion, Quantifikation und Statistik

Die Detektion, Quantifikation und die statistischen Berechnungen wurden ebenfalls durch die Kooperationspartner Silvia Weidner und Olivia Prazeres da Costa in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. D. Busch (TU München) durchgeführt. Ihre Ergebnisse erfolgten in einer Excel-Tabelle, die anschließend weiter bearbeitet wurden.

Dazu wurden die bei den Transkriptomanalysen drei unabhängig voneinander gemessenen Signalintensitäten eines Stammes für z. B. Gen *y* logarithmiert (um kleinere Zahlen zu erhalten) und jeweils zu einem Mittelwert zusammengefasst. In diesem Mittelwert waren weitere methodische und technische Aspekte wie beispielsweise das „Hintergrundrauschen“ oder die Normalisierung bereits berücksichtigt. Um die Signalintensitäten zweier Stämme miteinander zu vergleichen, wurde zunächst der logarithmierte *Fold change* (logFC) bestimmt. Dieser wird wie folgt berechnet:

$$\text{logFC (Gen } y) = \frac{\log \text{PA14\_Signalintensität}}{\log \text{Mutante\_Signalintensität}} \quad \rightarrow \quad \log \text{FC (Gen } y) = \log \text{PA14\_S.} - \log \text{Mutante\_S.}$$

Der logFC zur Basis 2 (Potenz) ergibt anschließend den *Fold change* (FC):

$\text{FC (Gen } y) = 2^{\text{logFC (Gen } y)}$ (bei negativen logFCs das Vorzeichen umkehren)

Über den logFC-Wert (nicht FC-Wert) kann auf eine erhöhte oder erniedrigte Genexpression geschlossen werden. Ist der logFC-Wert positiv, so ist die Genexpression für Gen *y* bei PA14 verglichen zur Mutante x-fach erhöht bzw. in der Mutante gegenüber PA14 x-fach erniedrigt. Ist dagegen der logFC-Wert negativ, so ist die Genexpression für Gen *y* bei PA14 verglichen zur Mutante x-fach erniedrigt bzw. in der Mutante gegenüber PA14 x-fach erhöht.

4.3.4 Motilitäts-Versuche

4.3.4.1 Bestimmung der Schwärm-Motilität

(Linares *et al.*, 2005)

Arbeitsprotokoll:

- 2 µl einer Bakteriensuspension (OD_{600} 0,2) auf die Oberflächenmitte einer Schwärmplatte (0,5 % (w/v) Agar + 5 mg/ml Glukose) tropfen
- Inkubation bei 37 °C für 24 h
- Motilitätsdurchmesser in cm messen

4.3.4.2 Bestimmung der Schwimm-Motilität

(Linares *et al.*, 2005)

Arbeitsprotokoll:

- 2 µl einer Bakteriensuspension (OD_{600} 0,2) auf die Oberflächenmitte einer Schwimmplatte (0,3 % (w/v) Agar) tropfen
- Inkubation bei 37 °C für 24 h
- Motilitätsdurchmesser in cm messen

4.3.4.3 Bestimmung der *Twitching*-Motilität

(modifiziert nach (Semmler *et al.*, 1999))

Arbeitsprotokoll:

- frisch überimpfte Stämme mittels Stichöse durch den Agar auf den Boden der *Twitching*-Platte (1 % (w/v) Agar + 0,05 % 2,3,5-Tetraphenyltetrazoliumchlorid (TTC) geben
- Inkubation bei 37 °C
- Ringförmiges Wachstum auf dem Boden der Platte nach 24 h, 48 h und 72 h in cm bestimmen

4.3.5 Bestimmung der Elastase-Aktivität

(Stapleton *et al.*, 1984)

Anhand der Hydrolyse des Elastin-Kongorots im LB-Medium wurde die Elastase-Aktivität des zu untersuchenden Bakteriums bestimmt.

Elastin-Kongorot

- 0,1 % (w/v) Elastin-Kongorot ins handwarme LB-Medium gegeben und anschließend Platten gegossen

Arbeitsprotokoll:

- mit sterilen Pinzette ein steriles Filterplättchen auf die LB-Medium-Oberfläche legen
- üN-Kultur auf eine OD_{600} von ca. 1,0 einstellen
- 30 µl auf Filterplättchen tropfen und Platte bei 37 °C für 24 h inkubieren

4.3.6 Bestimmung der Gesamt-Protease-Aktivität

Der zu untersuchende Stamm wurde auf 10 %-igen Magermilchagar getropft, um die gesamt-proteolytische Aktivität aller in *P. aeruginosa* enthaltenden Proteasen (z. B. AprE, LasA, LasB und Protease IV) zu testen. An den Stellen im Agar an denen eine Proteolyse stattfand, bildete sich eine transparente Wachstumszone. Der Durchmesser dieser Zone wurde in cm bestimmt.

Arbeitsprotokoll:

- mit sterilen Pinzette ein steriles Filterplättchen auf die Magermilchagar-Oberfläche legen
- üN-Kultur auf eine OD_{600} von ca. 1,0 einstellen
- 30 µl auf Filterplättchen tropfen und Platte bei 37 °C für 24 h inkubieren

4.3.7 Bestimmung der relativen Pyocyanin-Produktion

(modifiziert nach (King *et al.*, 1954))

Um die Pyoverdin-Produktion zu unterdrücken und die Pyocyanin-Produktion zu stimulieren wurden die zu untersuchenden Stämme in King´s-A-Medium angezogen.

Arbeitsprotokoll:

- 5 ml King´s A und 100 µM $FeCl_3$ mit dem jeweiligen Stamm beimpfen, 37 °C üN
- Medium in Schikanekolben 1:1000 verdünnen, Wachstum bei 37 °C für 24 h bei 200 Upm
- OD_{600} des Stammes bestimmen
- 6 ml Medium bei 4000 Upm für 15 Min zentrifugieren

- 5 ml des Überstandes in ein frisches Tube pipettieren; Zugabe von 3 ml Chloroform
- kurz vortexen und anschließend bei 4000 Upm zentrifugieren
- untere Chloroformschicht in ein frisches Tube pipettieren; Zugabe von 1 ml 0,2 M HCl
- kurz vortexen und erneut zentrifugieren bei 4000 Upm
- obere Schicht 1:10 in 0,2 M HCl verdünnen und OD_{520} bestimmen (Verdünnung mit einbeziehen)

Die relative Pyocyanin-Produktion P_{rel} wurde wie folgt berechnet:

$$P_{rel} = \frac{OD520}{OD600}$$

4.3.8 Bestimmung der Biofilm-Bildung durch *P. aeruginosa*

Die relative Biofilm-Bildung wurde in dieser Arbeit errechnet, indem die gemessenen Biofilmwerte OD_{570} durch die gemessenen Wachstumswerten bei OD_{570} geteilt wurden.

Kristallviolettlösungen

- zunächst wurde 1 g Kristallviolett in 100 ml Methanol abs. gelöst (1 %-ige Lösung (w/v))
- 1:10 Verdünnung mit dH_2O (0,1 %-ige Lösung (v/v))

Arbeitsprotokoll:

- LB-üN-Kultur auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnen
- 10 µl dieser Kultur in 2 ml des zu untersuchenden Mediums pipettieren (1:200 Verdünnung)
- Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit jeweils 200 µl dieser verdünnten Suspension füllen
- sowohl die äußeren, als auch eine zusätzliche Vertiefung(en) auf der Platte mit dem reinen Medium befüllen, letzteres dient als Kontrolle
- Platte mit Deckel für 24 h bei 37 °C bebrütet
- in einer neuen Mikrotiterplatte die bewachsene Kultur 1:10 verdünnen und das Wachstum bei OD_{570} messen (Multiplate Reader Sunrise™ (Tecan Group Ltd.)
- Überstandsreste der bewachsene Kultur vorsichtig mit einer Pipette absaugen, ebenso die Überstände, die nur reines Medium enthalten (Leerwert für Biofilmmessung)
- Zugabe von jeweils 200 µl der 0,1 %-igen Kristallviolettlösung; 15 min Inkubation bei RT
- Kristallviolett wieder vorsichtig mit der Pipette entfernen
- Vertiefungen 3 x mit dH_2O waschen
- Zugabe jeweils von 200 µl Ethanol; 10 min Inkubation bei RT
- 20 µl des gelösten Biofilms in neuer Mikrotiterplatte 1:10 mit Ethanol abs. verdünnen
- Messung der Biofilm-Bildung bei OD_{570} Multiplate Reader Sunrise™ (Tecan Group Ltd.)
- Wachstumswerte und Biofilmwerte mit Verdünnungsfaktor multiplizieren
- relativer Biofilm = Biofilmwerte/Wachstumswerte

4.3.9 Eisen-, osmotischer und oxidativer Stress bei *P. aeruginosa*

Anhand der Größe des Hemmhofs in cm wurden unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber den verwendeten Substanzen gemessen.

Arbeitsprotokoll:

- zu untersuchende Bakterienkultur auf eine OD_{600} von ca. 1,0 einstellen
- 100 µl auf eine frische LB-Platte pipettieren und mit sterilem Wattestäbchen sorgfältig verteilen

- mit keimfreier Pinzette ein steriles Filterplättchen mittig auf die LB-Medium-Oberfläche der Platte legen und leicht andrücken
- je 30 µl der nachfolgenden Substanzen auf das Filterplättchen tropfen:

Substanz	**Konzentration**
Eisenchlorid ($FeCl_3$)	50 mM
Hypochlorit (NaClO)	500 mM
Natriumchlorid (NaCl)	5 M
Paraquat ($C_{12}H_{14}N_2$)	2 % (w/v)
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	10 % (v/v)

- nach kurzer Trocknungsphase Inkubation bei 37 °C für 24 h

4.3.10 Bestimmung der Überlebensrate von *P. aeruginosa* bei Zugabe von Paraquat

Werden Bakterien z. B. durch Chemikalien gestresst, so kann ihr Wachstum gehemmt werden oder sie sterben ab. Da bei einer OD_{600}-Messung nicht zwischen den beiden Zuständen unterschieden werden kann, wurden die Bakterien in diesem Experiment in einer Verdünnungsreihe verdünnt und ausplattiert (Spatelplattenverfahren 4.2.4). Anhand der gewachsenen Bakterien konnte ausgehend von der Startanzahl (Anzahl der Bakterien zum Zeitpunkt t = 0 entspricht 100 %) die prozentuale Überlebensrate berechnet werden.

Arbeitsprotokoll:

- 10 ml LB-Hauptkultur mit einer OD_{600} von 0,002 animpfen
- 100 µl entnehmen und mit Hilfe des Spatelplattenverfahrens ausplattieren
- Zugabe von Paraquat in die Hauptkultur (Endkonzentration 30 mM)
- Inkubation der Hauptkultur bei 37 °C und 200 Upm
- erneut 100 µl Entnahme und Ausplattieren nach 24 h, 48 h und 72 h
- Platten bei 37 °C üN inkubieren
- Auszählung der koloniebildenden Einheiten (KBE) und Berechnung der proz. Überlebensrate

Die prozentuale Überlebensrate Ü [in %] wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Ü [\%]} = \frac{100 \cdot \text{KBE/ml zum Zeitpunkt tx}}{\text{KBE/ml zum Zeitpunkt t0}}$$

4.3.11 Epsilometer-Test (E-Test)

(Baquero *et al.*, 1992)

Ein E-Test Streifen, der einen Antibiotika-Wirkstoffgradienten enthält, wird auf eine bebrütende Platte mit der zu untersuchende Bakterienkultur gelegt. Das Antibiotikum diffundiert mit der Zeit in das umliegende Medium und führt bei der Anwesenheit eines sensitiven Bakterienstammes zu einer ellipsoiden Hemmzone. An der Stelle, an der die Hemmzone den Teststreifen kreuzt, kann dort quantitativ die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Antibiotikums für das untersuchte Bakterium abgelesen werden.

Arbeitsprotokoll:

- ein wenig frische Bakterienkultur in 0,7 % NaCl lösen
- OD_{600} von ca. 1,0 einstellen
- 100µl der Bakteriensuspension auf kommerzielle Müller-Hinton Platte pipettieren und mit einem Wattestäbchen über die gesamte Platte verteilen
- E-Test Streifen mit einer desinfizierten Pinzette vorsichtig auf das Medium legen
- evtl. Luftbläschen vorsichtig durch leichtes Drücken entfernen ohne jedoch den Streifen zu bewegen
- Bebrütung der Platten bei 37 °C für ca. 24 h
- Ablesung der MHK

4.3.12 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Mit dem BD Phoenix™-Automaten der Fa. Becton Dickinson wurde automatisierend die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Antibiotika der NMIC-64-Platte (Gram Negative AST Only Panel; 448918) bei *P. aeruginosa* bestimmt. Mit diesem mikrobiologischem System ist es möglich, schnelle und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Experimente wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

4.3.13 Bestimmung der intr. NAD(H)- bzw. NADP(H)-Konzentration von *P. aeruginosa*

Der Abcam® NADH/NAD^+ Test (ab65348) bzw. der Abcam® $NADP^+$/NADPH Test (ab65349) ermöglicht die sensitive Detektion der intrazellulären Nukleotide NAD^+ und NADH bzw. $NADP^+$ und NADPH. Die hohe Empfindlichkeit des Tests wir durch das *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)-Prinzip erzielt. Die Messungen erfolgten in einem Plattenlesegerät bei OD_{450}. Eine Quantifizierung der Nukleotide erfolgte anhand einer Standardkurve des jeweiligen Nukleotids.

Arbeitsprotokoll:

- 10 ml LB-Hauptkultur mit einer OD_{600} von 0,02 animpfen, Inkubation bei 37 °C und 200 Upm
- bei OD_{600} von 1,0 (exponentielle Phase) 2 x 1 ml Kultur in Reaktionsgefäß überführen
- bei OD_{600} von 3,0 Kultur (stationäre Phase) auf 10^9 Zellen/ml (ca. OD_{600} 1,0) mit LB-Medium herunter verdünnen und je 2 x 1 ml in frisches Reaktionsgefäß überführen
- je 1 x 1 ml dient zur Bestimmung von NAD(P) und 1 x 1 ml von NAD(P)H
- die 4 x 1 ml Kulturen bei 10000 Upm für 5 min bei 4 °C zentrifugieren, Pellet mit eiskaltem 1 x PBS waschen und anschließend erneut zentrifugieren
- Überstand abnehmen und Pellet bei - 80 °C bis zur Verwendung wegfrieren
- Pellets in je 200 µl Extraktions-Puffer resuspendieren
- Zellaufschluss durch Schockgefrieren/Schnelles Auftauen (20 min auf Trockeneis und anschließend 10 min bei RT; Wiederholung)
- Proben kurz vortexen und bei 14000 Upm für 5 min bei 4 °C zentrifugieren
- Überstände in neues Reaktionsgefäß überführen

Detektion $NAD(P)^+$ + NAD(P)H
- je 50 µl Überstand aus OD_{600} von 1,0 und OD_{600} von 3,0

Detektion NAD(P)H
- je 200 µl Überstand aus OD_{600} von 1,0 und OD_{600} von 3,0 in neues Reaktionsgefäß überführen
- 60 °C für 30 min ($NAD(P)^+$ wird abgebaut)
- Proben auf Eis kühlen und kurz pelletieren

Detektion NAD(P)H (Standardkurve)
- verwendete NAD(P)H Konzentration in pmol/*well*: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150 und 200

- je 50 µl des Überstandes in ein *well* einer 96-Mikrotiterplatte pipettieren
- Zugabe von 100 µl Reaktionsmix (98 µl Puffer-Mix + 2 µl Enzym-Mix) in jedes *well*
- Inkubation der 96-Mikrotiterplatte bei RT (Umwandlung des $NAD(P)^+ \rightarrow NAD(P)H$)
- Zugabe von 10 µl Entwickler in jedes *well*
- Messung der Platte bei OD_{450} alle 15 min für max. 10 h
- Berechnung der Konzentrationen mit Hilfe der Standardkurve

Die Konzentrationen für NAD(P) und das Verhältnis von $NAD(P)^+$/NAD(P)H wurde wie folgt berechnet:

$$NAD(P)^+ = \text{Konzentration } (NAD(P)^+ + NAD(P)H) - \text{Konzentration } NAD(P)H$$

$$\text{Verhältnis von } NAD(P)^+/NAD(P)H = \frac{\text{Konzentration } (NAD(P)+ + NAD(P)H) - \text{Konzentration } NAD(P)H}{\text{Konzentration } NAD(P)H}$$

4.3.14 Isolierung von Lipopolysacchariden (LPS)

Um ein LPS-Profil von unterschiedlichen *P. aeruginosa*-Stämmen zu erstellen, wurde die Isolierung des LPSs nach (Kulesus *et al.*, 2008) durchgeführt.

Arbeitsprotokoll:
- üN-Kultur auf OD_{600} von ca. 1,0 einstellen
- 1 ml in Reaktionsgefäß überführen und bei 5000 Upm für 5 min bei 4 °C zentrifugieren
- Pellet in 250 µl dH_2O resuspendieren
- Zugabe von 250 µl Lysepuffer (1 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7), 10 mM EDTA)
- für 5 min im Thermoheizblock bei 100 °C
- Zugabe von Proteinase K (Endkonz. 1,5 mg/ml) und Inkubation bei 37 °C für 3 h
- nach Bedarf evtl. Quantifizierung mit Purpald-Reagenz (Lee and Tsai, 1999)
- Proben mit 4x-SDS-Auftragspuffer versetzen und 10 min bei 100 °C aufkochen
- ca. 5 - 10 µl Probe in Taschen eines 12,5 %-igen SDS-Gel auftragen
- Auftrennung bei 200 V für 1 h
- Silberfärbung (4.4.6)

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Mechanischer Zellaufschluss durch Ultraschall

Sofern nicht anders angegeben wurden Bakterienzellen mechanisch mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250) aufgeschlossen.

Arbeitsprotokoll:

- aufgrund evtl. Aerosol-Bildung Ultraschallgerät unter der Sterilbank verwenden
- vor Gebrauch die Sonotrode mit Desinfektionsmittel desinfizieren
- Einstellungen vornehmen (Branson Sonifier; Amplitude/*duty cycle*: 40 %;Ausgangsregler der Amplitude/*output control*: 3 - 4; 35 sek, 3 x Durchläufe)
- 2 - 3 mal die jeweilige Bakteriensuspension mit Ultraschall für 35 sek beschallen
- zwischen den einzelnen Beschallungen die Probe auf Eis lagern
- mit fortschreitender Behandlung klart die Bakteriensuspension auf
- durch anschließender Zentrifugation werden Zelltrümmer vom Zelllysat getrennt

4.4.2 Quantitative Proteinbestimmung (Bradford-Test)

(Bradford, 1976)

Mit dieser photometrischen Methode ist es möglich, Proteinkonzentrationen quantitativ zu bestimmen. In Anwesenheit von Proteinen kann der Farbstoff Coomassie- Brilliant-Blau G-250, welcher im sauren pH-Bereich als Anion vorliegt, mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen blaue Farbkomplexe bilden. Die zur Proteinkonzentration proportional gebildeten blauen Komplexe konnten bei einer OD_{595} gemessen werden. Anhand einer BSA-Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration einer unbekannten Proteinlösung quantitativ bestimmt werden. Die Werte für die Eichgerade wurden in drei unabhängigen Messungen ermittelt.

BSA-Stammlösung

- Lösen von 0,5 mg/ml in dH_2O

Arbeitsprotokoll (zur Herstellung des Bradford- bzw. Färbereagenz):

- Lösen von 20 mg Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in 25 ml Ethanol abs.
- Zugabe von 50 ml o-Phosphorsäure (85 %)
- ad 500 ml mit dH_2O
- Lösung mittels Faltenfilter filtrieren und im Dunkeln bei 4 °C lagern
- Pipettieren des Reaktionsansatzes (100 µl Proteinlösung + 900 µl Färbereagenz)
- für den Referenzwert 100 µl 1x-PBS oder dH_2O verwenden
- nach kurzem Vortexen der Küvetten erfolgt Inkubation für 5 min bei RT im Dunkeln
- Messung der OD_{595} gegen den Referenzwert
- Berechnung der Proteinkonzentration anhand der ermittelten Steigung m, welche mit der Eichgerade in Excel erstellt wird

4.4.3 Messung der IDH-Enzym-Aktivität

Für die Bestimmung der spezifischen Enzym-Aktivität der Isocitratdehydrogenase aus *P. aeruginosa* wurde die Bildung von NADPH bei 340 nm gemessen, welches bei der enzymatischen Reaktion gebildet wird. Die enzymatische Aktivität ist dabei proportional zu der pro Zeiteinheit gebildeten Menge an NADPH.

Arbeitsprotokoll:

- 25 ml LB-Hauptkultur mit einer OD_{600} von 0,01 animpfen
- Zellen bei 4 °C und 6000 Upm für 10 min abzentrifugieren
- Pellet 1 - 2 x in eiskaltem 1x-PBS Puffer waschen und in 2 - 3 ml H_2O dest. resuspendieren und üN bei - 80 °C einfrieren
- am Tag der Messung erfolgt der Zellaufschluss mit Ultraschall
- durch erneute Zentrifugation (4 °C, 6000 Upm, 10 min) wird der Überstand in Form als Zellextrakt gewonnen, der für die Messung verwendet wird

Reaktionsansatz (1 ml)	**1 Ansatz**
Tris-HCl, pH 7,5	0,1 M
$NADP^+$	0,66 mM
$MnSO_4$	1 mM
DS-(+)-threo-Isocitrat, Kaliumsalz	1 mM

- Reaktion mit 100 - 200 µl Zellextrakt starten
- Zunahme des neu gebildeten NADPHs bei OD_{340} jede 5 sek von insgesamt 2 min messen

Über das Lambert-Beer´sche Gesetz wurde die Konzentration C_{NADPH} wie folgt bestimmt:

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

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

Um die spezifische Enzym-Aktivität E_s zu bestimmen, musste vorher die Gesamtproteinmenge mit Hilfe des Bradford-Reagenz bestimmt werden. Ein Unit (U) entspricht 1 µmol umgesetztes Substrat pro Minute. E_S wurde wie folgt errechnet:

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

4.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden Proteine zunächst durch kurzzeitiges Aufkochen und durch das negativ geladene Detergenz *sodium dodecyl sulfate* (SDS) denaturiert. Das SDS bindet an die denaturierten Proteine und erzeugt so negative Proteinkomplexe, so dass die massenspezifische Ladung für alle Proteine etwa gleich ist. Dafür wurden Gele mit einer Polyacrylamid-Konzentration

von 10 %, 12,5 % oder 15 % gegossen. Als Apparatur diente das Mini-Protean 2 System der Fa. Biorad. Für die Größenbestimmung wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fa. Fermentas) benutzt.

Trenngel-Puffer, 4x-Tris-HCl pH 8,8 (1,5M)
- 91 g Tris in 200 ml dH_2O gelöst
- pH 8,8 mit HCl eingestellt
- ad 500 ml mit dH_2O
- steril filtriert (0,22 µm)
- Zugabe 2 g SDS

Sammelgel-Puffer, 4x-Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M)
- 30,25 g Tris in 200 ml dH_2O gelöst
- pH 6,8 mit HCl eingestellt
- ad 500 ml mit dH_2O
- steril filtriert (0,22 µm)
- Zugabe 2 g SDS

SDS-Lösung (10 %-ig)
10 %-ige SDS-Lösung mit dH_2O hergestellt (leicht erhitzen)

SDS-Laufpuffer (10x)

Tris	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
ad 2 Liter mit dH_2O	

SDS-Auftragspuffer	**Endkonzentration**
Tris-HCl, pH 6,8	0,25 M
Mercaptoethanol	0,4 M
SDS	8,0 % (w/v)
Bromphenolblau	0,4 % (w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
in dH_2O lösen	

Arbeitsprotokoll:
- Lösungen und Puffer zusammen pipettieren

	Trenngel (2 Gele) (10 x 8 cm, 1 mm)			**Sammelgel (2 Gele)** (10 x 8 cm, 1 mm)
Gelkonzentration	10 %	12,5 %	15 %	5 %
Acrylamid/Bis (37.5:1)	5 ml	6,25 ml	7,5 ml	1,3 ml
4x-Tris-HCl pH 8,8 (1,5M)	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml	-
4x-Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M)	-	-	-	1,9 ml
dH_2O (autoklaviert)	4,4 ml	3,1 ml	1,8 ml	4,4 ml
SDS-Lösung (10 %-ig)	150 µl	150 µl	150 µl	75 µl
APS-Lösung (10 %-ig)	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED (unverdünnt)	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

- gegossene Trenngele zügig mit Isopropanol überschichten und polymerisieren lassen
- Isopropanol entfernen und oberen Gelbereich mit Whatman-Papier trocknen
- Sammelgel gießen und Kamm einsetzen
- SDS-Gelelektrophoresekammer mit 1x-Laufpuffer befüllen
- polymerisierte Gele einsetzen und Kämme unter 1x-Laufpuffer entfernen
- nach Bedarf Taschen mit Spritze säubern
- 4x-SDS-Auftragspuffer zur Probe pipettieren, Aufkochen bei 100 °C für 10 min
- Beladen der Taschen mit Proben
- Gellauf bei 200 V für 1 h

4.4.5 Coomassie-Färbung bei Polyacrylamidgelen

Polyacrylamidgele wurden für 1 h oder üN in ca. 50 ml Coomassie-Färbelösung (G-250) geschüttelt und gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde verworfen und anschließend wurde das blau gefärbte Gel in Wasser oder in Entfärbelösung entfärbt, bis kontrastreiche Banden zu sehen waren.

Coomassie-Färbelösung	**Entfärbelösung**
0,125 % Coomassie-Brilliant-Blau G-250	40 % Ethanol abs.
50 % Methanol abs.	10 % Essigsäure
10 % Essigsäure	

4.4.6 Silberfärbung bei Polyacrylamidgelen

Für manche Protein- und LPS-Färbungen von Polyacrylamidgelen wurde die Silbernitratfärbung verwendet, da diese sensitiver als die Coomassiefärbung ist.

Arbeitsprotokoll:

- Gel üN oder 10 - 30 min mit Fixiererlösung überschichten
- 3 x 5 min in Waschlösung waschen
- Sensibilisierung für 30 min in Sensibilisierungslösung
- erneutes Waschen für 3 x 5 min
- Gel vorsichtig für 20 min mit Färbelösung (muss immer frisch neu angesetzt werden) bedecken
- kurzes Waschen für 2 x 30 sek mit dH_2O; Entfernung der Wasserreste durch kurzes Spülen mit Entwicklerlösung
- Bedeckung des Gels mit Entwicklerlösung für 1 - 20 min
- bei ausreichender Bandenintensität Entwickler abgießen und zügige Zugabe der Stoplösung
- Reaktion nach ca. 10 min abschließen oder wenn keine Blasen mehr aufsteigen
- abschließendes Waschen für 3 x 10 min in Waschlösung; Trocknen des Gels
- Scannen des Gels

Fixierer

Eisessig	30 ml
Ethanol (96 %)	125 ml
Formaldehyd (37 %)	125 µl
dH_2O	95 ml

Waschlösung

Ethanol (96 %)	100 ml
dH_2O	300 ml

Sensibilisierungslösung

Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	50 mg
dH_2O	250 ml

Färbelösung

Silbernitrat ($AgNO_3$)	200 mg
Formaldehyd (37 %)	66 µl
dH_2O	100 ml

Entwicklerlösung

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	15 g
Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	1 mg
Formaldehyd (37 %)	125 µl
dH_2O	250 ml

Stoplösung

Eisessig	30 ml
dH_2O	220 ml

Lagerung von allen Lösungen bei RT bis auf Färbelösung bei 4 °C.

4.4.7 Blue-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

(modifiziert nach (Schägger and Jagow, 1991))

Die Methode diente ursprünglich zur Isolierung von Membranproteinkomplexen aus Mitochondrien, wobei sie heutzutage für eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen genutzt wird, unter anderem für die Enzym-Aktivitätsfärbung im Gel. Durch die BN-PAGE kann eine höhere Auflösung bei der Proteintrennung erzielt werden als bei der Gel-Filtration oder der Saccharose Dichte-Zentrifugation. Aminocapronsäure ersetzt in der BN-PAGE, die sonst bei Gelelektrophoresen üblichen denaturierenden Detergenzien und Salze, sodass die Proteine nach der Trennung nativ bleiben. Der zusätzlich verwendete anionische blaue Farbstoff Coomassie Blue G-250 verleiht der Methode ihren Namen. Dabei spielt das Coomassie Blue eine wesentliche Rolle, da es an hydrophobe Proteinbereiche bindet und aufgrund seiner negativen Eigenladung Proteine zu Polyanionen konvertiert, wodurch Coomassie-Proteinkomplexe in der BN-PAGE zur Anode wandern. Darüber hinaus verhindert der anionische Ladungszustand die Proteinaggregation. Während der Elektrophorese bleiben die Proteine blau gefärbt, während überschüssiges Coomassie Blue in die Anodenkammer wandert, was die Proteinbandenerkennung erleichtert.

4.4.7.1 Herstellung von Gradientengele für die BN-PAGE

Gradientengel:

40 % Acrylamid/Bisacrylamid mix (32:1) (4 °C)	
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	85,33 ml
dH_2O	14,67 ml

3x-BN-Puffer (pH 7, 4 °C)

6-Aminocapronsäure	200 mM
Bistris	150 mM

Arbeitsprotokoll Gradientengel:

- Gele wie folgt zusammenpipettieren:

Trenngel (1 Gel)	**10 %-ig**	**18 %-ig**	**Sammelgel**	**ca. 3,5 %-ig**
Acrylamid (32:1)	958 µl	1,35 ml	Acrylamid (32:1)	250 µl
BN-Puffer (3x)	480 µl	1 ml	BN-Puffer (3x)	504 µl
H_2O	1,44 ml	-	H_2O	920 µl
70 %-iges Glycerin	-	650 µl	70 %-iges Glycerin	-
10 %-iges APS	24 µl	8,4 µl	10 %-iges APS	50 µl
Temed	2,4 µl	0,8 µl	Temed	5 µl

- je 2,85 ml des 13 %-igen (linke Säule) bzw. 19 %-igen (rechte Säule) flüssigen Trenngels zügig in die Säulen des Gradientenmischers geben
- mit Hilfe einer Peristaltikpumpe das Trenngel vorsichtig und blasenfrei gießen
- sofortige Überschichtung des Gels mit 1 ml Isopropanol
- nach Polymerisierung das verbliebene Isopropanol entfernen
- Gießen des Sammelgels und Setzung des Kammes
- nach erneuter Polymerisierung des Sammelgels den Kamm vorsichtig herausziehen
- gegossene Gele können in nass eingewickelte Papiertücher in einer Tüte für ein paar Tage bei 4 °C gelagert werden
- die Taschen vor der Verwendung mit einer Spritze oder Whatman-Papier säubern bzw. trocknen und freilegen

4.4.7.2 Herstellung des Rohextrakts für die BN-PAGE

Arbeitsprotokoll:

- 100 ml LB-Hauptkultur (evtl. mit Antibiotikum) mit einer OD_{600} von 0,1 animpfen und im Erlenmeyerkolben bei 37 °C schütteln
- Hauptkultur bis zur gewünschten OD_{600} bzw. Phase wachsen lassen
- Zentrifugation der Kultur (6000 Upm, 10 min, 4 °C)
- Pellet mit eiskaltem 1x-PBS waschen
- erneute Zentrifugation
- Pellet in 5 - 8 ml sterilem Zellaufbewahrungs-Puffer resuspendieren und bei – 80 °C üN bis zur Verwendung einfrieren
- Zellen bei RT auftauen
- Zellaufschluss mit Ultraschall durchführen
- Suspension mit Hilfe einer Ultrazentrifuge bei 38400 Upm, 1 h, 4 °C zentrifugieren
- Zellextrakt (Überstand) in frisches Falcon überführen und bei 4 °C lagern; möglichst zügig verwenden

Zellaufbewahrungs-Puffer (pH 7,4)

Tris-HCl	50 mM
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM

4.4.7.3 Elektrophorese bei der BN-PAGE

Arbeitsprotokoll:

- Elektrophorese bei 4 °C durchführen und Zellextrakt immer auf Eis stehen lassen
- Proteinkonzentration des Zellextrakts mit Hilfe des Bradford- Reagenz ermitteln
- pro Spur 50 - 200 µg/µl Zellextrakt verwenden, der vor der Auftragung noch mit ca. 3 µl BN-Laufpuffer versetzt wird

- Proteinprobe vorsichtig in die Tasche des Sammelgels auftragen
- in die vorgesehenen Kammern den Anodenpuffer und den mit Coomassie versetzten Kathodenpuffer A langsam füllen
- Gellauf bei 80 - 120V für ca. 5 h
- sobald die Lauffront ca. 2 cm vom Boden entfernt ist, den Kathodenpuffer A durch den Kathodenpuffer B ersetzen
- sobald die Coomassie-Lauffront unten aus dem Gel herausläuft den Gellauf beenden

BN-Laufpuffer (4 °C)

6-Aminocapronsäure	750 mM
Coomassie Serva Blue G 250	(5 % w/v)

Kathodenpuffer A (pH 7, 4 °C)

Tricin	50 mM
Bistris	15 mM
Coomassie Serva Blue G 250	(0,002 % w/v)

Kathodenpuffer B (pH 7, 4 °C)

Tricin	50 mM
Bistris	15 mM

Anodenpuffer (pH 7, 4 °C)

Bistris	50 mM

4.4.7.4 Enzym-Aktivitätsfärbung im Gel nach der BN-PAGE

(Bériault *et al.*, 2005)

Diese Technik ermöglicht eine Detektion von aufgetrennten Enzymen im Gel von z. B. NAD(P)H produzierenden Enzymen. Dabei werden die aufgetrennten nativen Proteine mit ihrem spezifischen Substrat bzw. Kofaktor und die für die Detektion wichtigen Indikatoren Phenazinmethosulfat (PMS) und Iodnitrotetrazoliumchlorid (INT) inkubiert (Abbildung 4.3). Beispiel Icd/Idh: Bei der enzymatischen Reaktion der Icd- oder Idh-Bande wird NAD(P)H gebildet. Die Elektronen des NAD(P)H werden über das PMS auf oxidiertes INT transferiert, sodass sich dort der Farbstoff Formazan bildet, dessen Menge proportional zur Enzym-Aktivität ist.

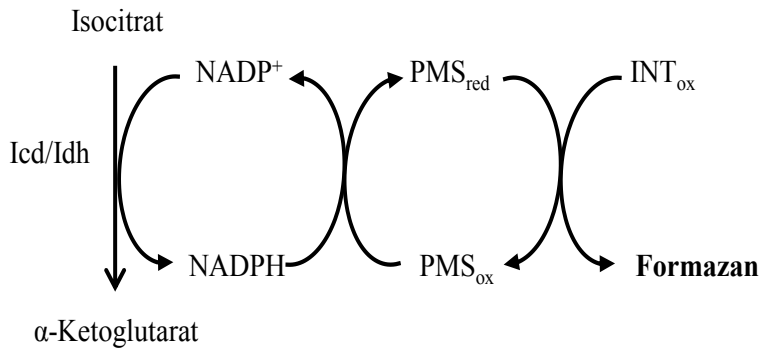


Abbildung 4.3 Schema des Elektrontransfers für die Gel-Aktivitätsfärbung bei der BN-PAGE am Beispiel der Isocitratdehydrogenase Icd/Idh
Bei der Umsetzung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat durch Icd/Idh wird das $NADP^+$ reduziert. Die Elektronen werden über PMS auf die oxidierte Form von INT transferiert, sodass der violette Farbstoff Formazan gebildet wird, der für das bloße Auge sichtbar ist.

Arbeitsprotokoll:

- direkt nach dem Gellauf das Gel für 10-15 min im Reaktionspuffer schwenken
- den Reaktionspuffer verwerfen und das Gel in den Enzymmischung geben
- Inkubation erfolgt bei 37 °C für ungefähr 30 - 60 min
- entwickelte Gele zuletzt einscannen

Reaktionspuffer (4 °C)

Tris-HCl (pH 7,0)	25 mM
$MnSO_4$	1 mM
$MgCl_2$	1 mM

Enzymmischung

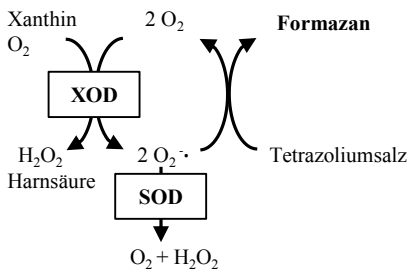
Tris-HCl	12,5 mM
$MnSO_4$	0,5 mM
$MgCl_2$ *	2,5 mM
$NADP^+$	0,25 mM
NAD^+ *	0,25 mM
INT	0,395 mM
PMS	0,325 mM
Isocitrat	10 mM
Glukose-6-P *	10 mM
Malat *	100 mM

* = für andere Enzyme außer IDH

4.4.8 Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität

Zum Nachweis der Superoxiddismutase (SOD) und deren Aktivität wurde das SOD Determination Kit (19160) der Fa. Fluka verwendet. Durch Verwendung der Xanthinoxidase (XOD) wird aus Xanthin unter anderem ein Superoxidanion ($O_2^{-}\cdot$) gebildet, das mit einem Tetrazoliumsalz (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-Phenyltetrazolium; WST-Lösung) reagiert (Abbildung 4.4). Durch diese Reaktion entsteht der Farbstoff Formazan, der photometrisch bei einer OD_{450} nachgewiesen werden kann. Das durch die XOD gebildete Superoxidradikal kann in Anwesenheit der Superoxiddismutase (SOD) abgefangen werden, wodurch es folglich zu einer Extinktionsabnahme bei der photometrischen Bestimmung des Farbstoffes Formazan kommt. Durch Verwendung der SOD aus Rinder-Erythrozyten (Fa. Sigma-Aldrich) mit den Konzentrationen 200, 100, 50, 20, 10, 5, 1, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001 U/ml konnte eine Inhibitions-Standardkurve erstellt werden.

Abbildung 4.4 Reaktionsprinzip zur Bestimmung der SOD-Aktivität
(modifiziert nach Protokoll des Herstellers Sigma-Aldrichs)



Arbeitsprotokoll nach Angaben des Herstellers durchgeführt:

- Proteinkonzentration des Rohextrakts eines Stammes mit 1x-PBS auf 1 µg/µl einstellen
- 20 µl Probe, Standard und Blank auf die Mikrotiterplatte pipettieren (dreifach Bestimmung)
- Zugabe von 200 µl WST-Lösung in jede Vertiefung
- fehlendes Volumen bei den Blanks mit dH_2O oder Verdünnungspuffer ausgleichen
- Starten der Reaktion durch Zugabe von 20 µl Enzymlösung

	Probe	**Blank 1**	**Blank 2**	**Blank 3**
Probenlösung	20 µl		20 µl	
dH_2O		20 µl		20 µl
WST-Lösung	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzymlösung	20 µl	20 µl		
Verdünnungspuffer			20 µl	20 µl

- kurzes Schütteln und Inkubation bei 37 °C für 20 min
- Messung der OD_{450} mit Multiplate Reader Sunrise™ (Tecan Group Ltd.)

Die SOD-Aktivität (Inhibitionsrate in %) wurde wie folgt berechnet:

$$SOD_{Akt} = \left\{\frac{(OD450\ Blank\ 1 - OD450\ Blank\ 3) - (OD450\ Probe - OD450\ Blank\ 2)}{(OD450\ Blank\ 1 - OD450\ Blank\ 3)}\right\} \cdot 100$$

4.4.9 Bestimmung der ß-Laktamase-Aktivität

(Nitrocefin-Assay, modifiziert nach (O'Callaghan *et al.*, 1972))

Mit dieser Methode wird das zu untersuchende Bakterium bezüglich seiner ß-Laktamase-Aktivität getestet. Es können mehrere ß-Laktamasen chromosomal und/oder plasmidal in *P. aeruginosa* vorhanden sein, sodass mit dieser Methode nicht die Aktivität jeder einzelnen ß-Laktamasen bestimmt, sondern nur in der Summe ermittelt werden konnte.

Das in dieser Methode eingesetzte Cephalosporin Nitrocefin als ß-Laktamase-Indikatorfarbstoff wird bei Vorhandensein von ß-Laktamasen durch eine hydrolytische Spaltung der Amidbindung im ß-Laktamring gespalten. Durch diese Spaltung erfolgt ein Farbumschlag von gelb zu rot, der bei OD_{485} photometrisch quantifiziert werden kann. Als Positiv- und Negativ-Kontrolle wurde der Bakterienstamm *S. aureus* ATCC29213 bzw. *S. aureus* ATCC25923 verwendet.

Nitrocefin-Stammlösung

- Lösen von 1 mg Nitrocefin in 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Zugabe von 1,9 ml Phosphatpuffer (0,1 M K-Phosphat, pH 7; 1 mM EDTA)
- Nitrocefin-Stocklösung aliquotieren und lichtgeschützt bis zur Verwendung bei - 20 °C lagern

Arbeitsprotokoll:

- 25 ml Hauptkultur mit einer OD_{600} von 0,02 animpfen; Inkubation bei 37 °C
- Kultur bei OD_{600} von ca. 1,0 für 10 min bei 4300 Upm abzentrifugieren
- Pellet in 4 ml 1x-PBS resuspendieren und üN bei - 80 °C wegfrieren
- zur Verwendung Zellen bei RT auftauen und durch Ultraschall aufschließen
- Zentrifugation des Gesamtlysats (6000 Upm, 4 °C, 15 min)
- Überführung des Überstandes in neues Falcon-Röhrchen; Lagerung auf Eis
- Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bradford-Reagenz
- Verdünnung des Proteinrohextrakts auf 1,0 mg/ml

- je 90 µl Gesamtprotein eines Stammes in Mikrotiterplatte vorlegen (Doppelbestimmung)
- Zugabe von 10 µl einer Nitrocefin-Stocklösung (500 µg/ml)
- sofortige kinetische Messung im Multiplate Reader TriStar durchführen (Berthold Technologies, Messung jede Minute für max. 60 min)

4.4.10 Bestimmung und Einfluss der AmpC-ß-Laktamase auf die Antibiotika-Resistenz

Zum Nachweis der AmpC-ß-Laktamase wurden die MASTDISCS™ ID AmpC und Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Detection Discs der Fa. Mast verwendet. Da *P. aeruginosa* keine Resistenz gegenüber Cefpodoxim zeigte, wurde statt des Testplättchens A ein Plättchen mit Piperacillin (30 µg) verwendet. Für die Plättchen B - D wurde jeweils ein Piperacillin-Plättchen dazugelegt.

Arbeitsprotokoll:

- frische Reinkultur des Testkeims in 0,7 %-iger NaCl-Lösung auf eine OD_{600} von 0,5 einstellen
- 100 µl auf kommerzielle Müller-Hinton Platte pipettieren und mit sterilem Wattestäbchen flächendeckend verteilen
- mit steriler Pinzette viermal Piperacillin-Testplättchen in geeignetem Abstand auf die beimpfte Platte legen
- jeweils ein Testplättchen B-D direkt neben ein Piperacillin-Testplättchen legen
- Inkubation bei 37 °C für 24 h

4.5 Isotopolog-Experimente zur Bestimmung des "metabolischen Kohlenstoffflusses"

Für die Isotopolog-Experimente wurde modifiziertes artifizielles Sputum-Medium (ASM) verwendet, das neben unmarkierte auch ^{13}C-markierte Fettsäuren enthielt (Herstellung modifiziertes ASM, 4.1.8). Die Anzucht und Ernte der Bakterienstämme erfolgte nach Protokoll (Bakterienanzucht, 4.2.1). Von unserem Kooperationspartner Herrn PD Dr. Wolfgang Eisenreich und seine Mitarbeiter am Isotopolog-Zentrum, Abteilung Biochemie der Technischen Universität München wurden die Bakterienproben weiter vorbereitet und alle Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)-Analysen in dieser Arbeit durchgeführt. Dadurch kann der Einbau von ^{13}C-markiertem Kohlenstoff in Bausteine bzw. Metabolite und letztendlich Biosynthesewege von Bakterien analysiert werden. Anzucht und Isotopolog-Versuche wurden je Stamm in Duplikaten durchgeführt.

4.5.1 Herstellung von ASM mit ^{13}C-markierten und unmarkierten Fettsäuren

Das für die Isotopolog-Experimente verwendete modifizierte ASM enthielt statt des Eigelbs ein Fettsäure-Gemisch (1 g/l), wobei je 1 g aus 900 mg unmarkierte Fettsäuren (Palmitinsäure 53,24 %, Palmitoleinsäure 9,15 %, Linolsäure 6 % und Ölsäure 28,2 %) und 100 mg ^{13}C-Isotop (vollmarkiertes

Algenlipid) bestand. Das verwendete vollmarkierte Algenlipid, das an jedem C-Atom ein ^{13}C-Isotop besaß, enthielt viele ungesättigte Fettsäuren.

Arbeitsprotokoll:
- entsprechende Fettsäuren abwiegen bzw. abmessen (steril)

unmarkierte Fettsäuren (900 mg)	100 ml Sputumpuffer (10x) für 1 Liter ASM	
Palmitinsäure	53, 24 %	479,16 mg
Palmitoleinsäure (98,5 %-ige Lösung) *	9,15 %	82,35 mg = 83,6 µl
Ölsäure	28,2 %	253,8 mg
Linolsäure	6 %	54 mg

* = µl-Angabe wurde aus entsprechender mg-Menge umgerechnet (M = 254,42 g/mol)

- Fettsäuren in 100 ml autoklaviertem Sputumpuffer (4.1.10 Puffer) geben
- autoklavierten Rührfisch hinzufügen und vorsichtig rühren
- Brij58-Pellets mit einer Endkonzentration von 1 % zur Fettsäure-Mischung geben und üN sorgfältig rühren lassen (milchige Trübung)
- am nächsten Tag 100 mg/l gekühltes Isotop (Algenlipid, 4 °C) steril abwiegen und in ca. 2 - 3 ml Aceton lösen
- sterile Zugabe des Isotops zum Fettsäuren-Sputumpuffergemisch und für weitere 5 - 10 min rühren lassen
- ASM nach Anleitung herstellen (4.1.8), jedoch frisches Eigelb (Sigma) weglassen
- Fettsäuren-Sputumpuffergemisch dem Medium zusetzen
- Sterilitätskontrollen durchführen

4.5.2 Bakterienanzucht in modifiziertem ASM für Isotopolog-Experimente

Die zu testenden Stämme wurden unter aeroben Bedingungen in je 1 Liter (2 x 500 ml oder 4 x 250 ml in 2 l- bzw. 1 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen) modifiziertem ASM bei 37 °C und 120 Upm angezogen.

Arbeitsprotokoll:
- Ansetzen von 25 ml ASM-üN-Kultur (enthält kein Isotop) im 100 ml Erlenmeyerkolben; Inokulation von frisch bewachsener Agarplatte
- Hauptkultur (OD_{600} 0,01) mit modifiziertem ASM (mit Isotop) mittels üN-Kultur animpfen
- Bakterienzellen bis zur späten logarithmischen Phasen wachsen lassen (ca. OD_{600} 3,0 für PA14 und IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*)
- Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation in Zentrifugenbechern (max. 500 ml) bei 4 °C, 4300 Upm für 15 min; Überstand verwerfen
- Waschschritt 1: Pellet in 300 ml kaltem PBS vorsichtig resuspendieren und erneut zentrifugieren bei 4 °C, 4300 Upm und für 15 min
- Waschschritt 2: Pellet in 200 ml kaltem PBS vorsichtig resuspendieren und erneut zentrifugieren bei 4 °C, 4300 Upm und für 15 min
- Waschschritt 3: Pellet in 100 ml kaltem PBS vorsichtig resuspendieren und erneut zentrifugieren bei 4 °C, 4300 Upm und für 15 min
- Waschritte evtl. so oft wiederholen bis der Überstand klar ist
- Bakterienpellets poolen, in 20 ml 4 %-igen PFA-Lösung (Paraformaldehyd) resuspendieren und üN bei 4 °C lagern

- am nächsten Tag abgetötete Zellen in Zentrifugenröhrchen überführen und bei 14000 Upm für mindestens 15 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen (PFA-Sonderabfall) und Kontrolle ausstreichen
- bis zur zeitnahen Übergabe bei - 20 °C aufbewahren
- Transport der Proben zum Kooperationspartner in Styroporbox und Eis

5 Ergebnisse

5.1 Bedeutung der Isocitrat- und Malatdehydrogenase von *P. aeruginosa*

Vergleichende Transkriptomanalysen von *P. aeruginosa* Non-Mutator- und Mutator-Stämmen haben gezeigt, dass nicht nur virulente und regulatorische Gene in Mutator-Stämmen, sondern auch metabolische Gene in ihrer Expression signifikant verändert waren (Hogardt *et al.*, 2007;Hoboth *et al.*, 2009). Bei allen Enzymen des Citratzyklus und des Glyoxylatwegs, außer der Fumarase und der Malatdehydrogenase, wurde eine signifikante Erhöhung der Genexpression festgestellt. Diese Veränderungen zweier wichtiger Stoffwechselwege deuten auf die besondere Bedeutung der metabolischen Adaptation von *P. aeruginosa* an die in der CF-Lunge vorherrschenden Bedingungen hin. Um beispielsweise in der dehydratisierten Lunge unter nährstoffreichen- und sauerstoffarmen Bedingungen zu überleben, scheint eine metabolische Genanpassung vorteilhaft für *P. aeruginosa* zu sein. In dieser Arbeit sollte anhand der Isocitratdehydrogenase des Citratzyklus die metabolische Anpassung von *P. aeruginosa* genauer untersucht werden. Die Isocitratdehydrogenase (IDH) ist ein entscheidendes Schlüsselenzym im Kohlenstoff-Metabolismus, da sie den Substratfluss zwischen Citratzyklus und Glyoxylatweg reguliert und somit für den Energiehaushalt der Zelle bedeutsam ist. Des Weiteren wird angenommen, dass die Isocitratdehydrogenase durch die Produktion des Reduktionsäquivalent NADPH eine wichtige Rolle in der Abwehr gegenüber Sauerstoffradikalen einnimmt, denn NADPH wird für die Funktion bzw. Regenerierung einiger enttoxifizierender Enzyme wie Glutathionreduktase benötigt (Singh *et al.*, 2008). Anhand eines vergleichbaren Wachstums zweier IDH-Einzelmutanten konnte gezeigt werden, dass die in *P. aeruginosa* vorkommenden Isoenzyme Icd (PA2623/PA14_30190) und Idh (PA2624/PA14_30180) sich offenbar in ihrer Funktion weitgehend gegenseitig kompensieren können (Eichner, 2012). Daher ist für eine weitere Charakterisierung der Funktion der Isocitratdehydrogenase in *P. aeruginosa* die Herstellung einer *icd*-/*idh*-Doppelmutante (PA14Δ*icd*Δ*idh*; nachfolgend als IDH-Doppelmutante bezeichnet) notwendig, in der der Citratzyklus vollständig unterbrochen sein sollte. Von der Malatdehydrogenase (Mdh; PA1252/PA14_48020), die bei der Reduktion von Malat ebenfalls ein Reduktionsäquivalent in Form von NADH bildet, wurde ebenfalls eine Mutante (PA14 *mdh*::Gm; nachfolgend als Mdh-Mutante bezeichnet) konstruiert. Mit der Mdh-Mutante sollte die Rolle der Isocitratdehydrogenase und die des Citratzyklus bzw. Glyoxylatwegs sowie der Reduktionsäquivalente untermauert werden. Das Hauptaugenmerk lag in dieser Arbeit jedoch auf den Isocitratdehydrogenasen.

5.1.1 Konstruktion der Isocitratdehydrogenase-(IDH)-Doppelmutante

Die Konstruktion der IDH-Doppelmutante wurde nach der Methode von Hoang *et al.*, 1998 durchgeführt. Zunächst wurden die beiden benachbarten Gene *icd* und *idh* mittels PCR (Primerpaar

MA5/MA2) amplifiziert (Abbildung 5.1), wobei hitzepräparierte Gesamt-DNA von *P. aeruginosa* PA14 oder PAO1 als Matrize diente. Das amplifizierte DNA-Fragment (3841 bp) wurde sequenziert, auf Mutationen hin überprüft und in den pCR® 2.1-TOPO®-Vektor kloniert. Über *Pfl*23II und *Asc*I wurde ein Fragment (2004 bp) aus dem Vektor herausgeschnitten. Die Schnittstellen waren dabei so gewählt, dass der gesamte Promotorbereich, der intergenische Bereich sowie die Anfangsbereiche beider Gene entfernt wurden (Deletion). In einer weiteren PCR wurde die Gentamicin-Resistenzkassette (Gm^R, 954 bp) mit den Primern MA14/MA4 amplifiziert, wobei der Vektor pUCP30T als Matrize diente. Über an beide Primern mitgeführten Restriktionsschnittstellen konnte das amplifizierte Gm^R-Fragment mit den Enzymen *Pfl*23II und *Asc*I verdaut werden. Anschließend wurde die Gm^R-Resistenzkassette in den Vektor pCR® 2.1-TOPO® mit Insert ligiert. Nach Amplifikation mit den Primern MA5/MA2 wurde das gesamte Fragment über die Schnittstellen *Kpn*I und *Xba*I in den Suizidvektor pEX18AP umkloniert. Der modifizierte Suizidvektor wurde in kompetente *E. coli* DH5α transformiert und positive Transformaten mittels Gentamicin selektioniert.

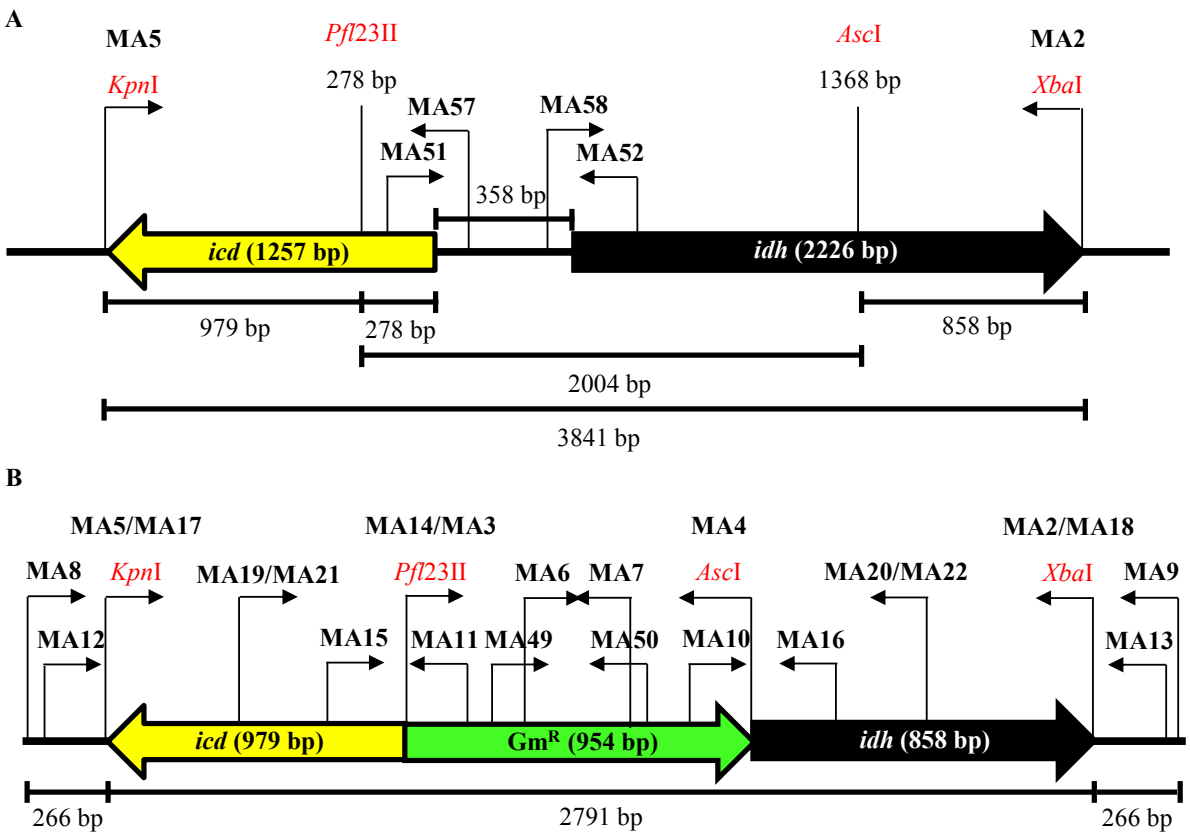


Abbildung 5.1 Konstruktion der IDH-Doppelmutante in *P. aeruginosa* PA14 und PAO1
Dargestellt sind die zur Konstruktion der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*/PAO1Δ*icd*Δ*idh* verwendeten Primer (MA5/MA2 und MA14/MA4) und Restriktionsschnittstellen (A) sowie der veränderte Genombereich der IDH-Doppelmutante mit inserierter Gentamicin-Resistenzkassette (B). Der Genombereich ist mit 2791 bp kleiner als der im Ausgangsstamm bzw. WT vorkommende mit 3841 bp. Alle übrigen Primer (siehe auch Tabelle 4.7) wurden für Sequenzierungszwecke verwendet. Die Darstellung der *P. aeruginosa*-Genombereiche ist nicht maßstabsgetreu.

Mit Hilfe eines *E. coli*-Helferstammes wurde die Plasmid-DNA vom Donor per *triparental mating* in den Rezipienten *P. aeruginosa* PA14 bzw. PAO1 konjugiert. Bei pEX18AP handelt es sich um einen Suizidvektor, der nur nach homologer Rekombination in das Chromosom von *Pseudomonas* replizieren kann, wobei erneut Gentamicin (50 µg/ml) als Selektionsmarker diente (s. a. Abbildung 4.2). Ursprünglich wurde die sonst übliche Gentamicin-Konzentration (150 µg/ml) für *P. aeruginosa* verwendet, jedoch konnte mit dieser Konzentration letztendlich keine IDH-Doppelmutante erfolgreich konstruiert werden. Ob eine gelungene Konstruktion von der Antibiotikakonzentration bei der Selektion abhängig ist, blieb unklar. Durch negative Selektion mit Saccharose wurden zunächst Konjuganten bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Saccharose geprüft. Sensitive Konjuganten wurden daraufhin auf LB-Platten + 5 % Saccharose mit Gentamicin ausplattiert. Durch Saccharose wurde auf die zweite homologe Rekombination und damit Exzision des pEX18AP-Restes samt einem genomischen DNA-Fragment des WTs bzw. des Ausgangsstammes selektioniert (negative Selektion gegen den Vektor), wobei die beiden inaktivierten Gene *icd* und *idh* im Chromosom verbleiben. Potentielle Deletionsmutanten wurden zunächst anhand ihrer Ampicillin-(Amp^R)/Carbenicillin($Carb^R$)-Resistenz (Resistenz durch pEX18AP) identifiziert; korrekte Mutanten waren erneut sensitiv. Zur Überprüfung der gewünschten Deletion im Genom wurden die Mutanten per PCR und Sequenzierung überprüft und bestätigt (Abbildung 5.2).

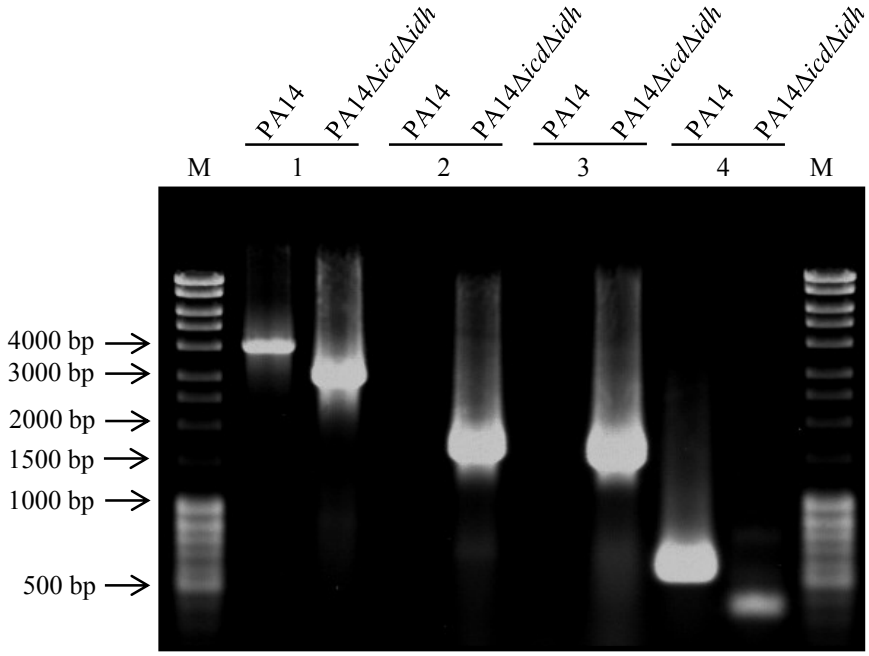


Abbildung 5.2 Überprüfung der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mittels PCR
Die IDH-Doppelmutante weist im Vergleich zu PA14 aufgrund einer Deletion und Insertion ein um ca. 1 kb kleineres PCR-Produkt auf (1). Bei Verwendung der Resistenzkassettenprimer MA7 und MA6 wird nur bei der IDH-Doppelmutante ein PCR-Produkt amplifiziert (2, 3). In (4) wurde ein Primerpaar MA51/MA52 im deletierten Bereich gewählt, um die Deletion in der Mutante zu verdeutlichen. Primerpaare: 1 = MA12/MA13, 2 = MA12/MA7, 3 = MA6/MA13, 4 = MA51/MA52 (identisches Ergebnis mit *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1-IDH-Doppelmutante PAO1Δ*icd*Δ*idh*)

5.1.2 Konstruktion der Malatdehydrogenase-Mdh-Mutante

Zur Konstruktion der Mdh-Mutanten PA14 *mdh*::Gm (PA14_48020) oder PAO1 *mdh*::Gm (PA1252) wurde ebenfalls das Prinzip der doppelten homologen Rekombination angewendet, wobei die Gm^R mittig in das *mdh*-Gen integriert wurde, ohne dass dabei zuvor Genbereiche entfernt wurden. Dazu wurde das Gen mit den Primern MA29/MA28 in einer PCR amplifiziert und zur Überprüfung sequenziert (Abbildung 5.3). Das resultierende Fragment und der Vektor pUCP20T (Cb^R) wurden mit *Xba*I/*Kpn*I verdaut. Mit den Primern MA33/MA32, welche beide die Schnittstelle *Bsp*EI enthielten, wurde die Gm^R aus dem Plasmid pUCP30T amplifiziert. Sowohl der Vektor mit Insert als auch die amplifizierte Resistenzkassette wurden anschließend mit *Bsp*EI verdaut, wodurch der Vektor mit Insert linearisiert wurde. Die Resistenzkassette wurde in die Schnittstelle ligiert. Eine anschließende Sequenzierung gab Aufschluss über die Richtung der inserierten Resistenzkassette Gm^R. Über *Xba*I/*Kpn*I wurde das durch Insertion der Gm^R inaktivierte Gen in pEX18AP umkloniert. Das weitere Selektionsvorgehen erfolgte wie bei zuvor beschriebener Konstruktion der IDH-Doppelmutante. Das Vorgehen zur Überprüfung der konstruierten Mutante per PCR ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

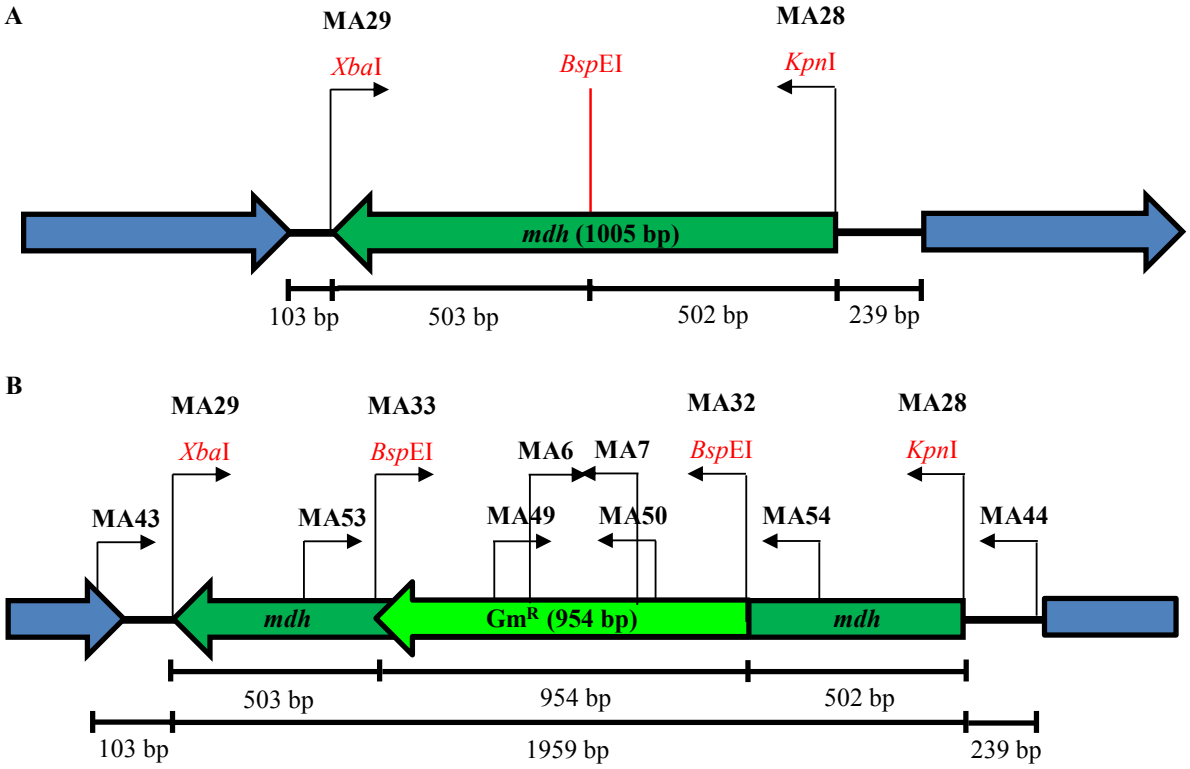


Abbildung 5.3 Konstruktion der Mdh-Mutante in *P. aeruginosa* PA14 und PAO1
Dargestellt sind die zur Konstruktion der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm/PAO1 *mdh*::Gm verwendeten Primer MA29/MA28 als auch Restriktionsschnittstellen (A) sowie der veränderte Genombereich der Mdh-Mutante inkl. der mittig inserierten Gentamicin-Resistenzkassette (B). Des Weiteren sind die zur Konstruktion benötigten Restriktionsschnittstellen als auch die Amplifizierungs- (MA33/MA32) und Sequenzierprimer eingezeichnet. Alle übrigen Primer (siehe auch Tabelle 4.7) wurden für Sequenzierungszwecke verwendet. Die Darstellung der *P. aeruginosa*-Genombereiche ist nicht maßstabsgetreu.

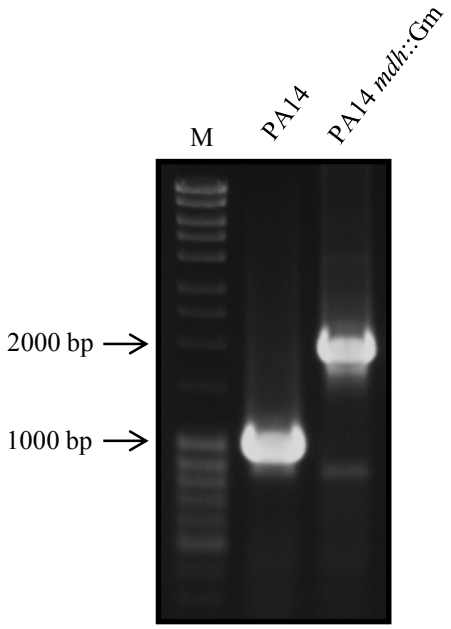


Abbildung 5.4 Überprüfung der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm mittels PCR
Für die Überprüfung der konstruierten Mdh-Mutante wurde das Primerpaar MA29/MA28 verwendet. Durch die Insertion der Gentamicin-Kassette Gm^R vergrößerte sich das amplifizierte PCR-Fragment um ca. 1 kb. Die weitere Überprüfung erfolgte mittels Sequenzierung des klonierten Bereichs (Primer/Daten nicht gezeigt). (identisches Ergebnis mit *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1-Mdh-Mutante PAO1 *mdh*::Gm)

5.1.3 Überprüfung der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm durch Southern Blot-Hybridisierung

Mittels PCR und Sequenzierung konnte für die IDH-Doppelmutante und Mdh-Mutante gezeigt werden, dass die Deletion bzw. Insertion an der gewünschten Position lokalisiert ist. Es kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Resistenzkassette oder der Vektor an anderer Stelle ins Chromosom integriert ist oder es zu DNA-Umlagerungen (beispielsweise Inversion) kam. Da bei der Konstruktion beider Mutanten immer eine Vielzahl an falsch-positiven Transkonjuganten selektioniert wurden, sollte die Richtigkeit der Konstruktionen auch durch einen Southern Blot nochmals bestätigt werden.

Für die Southern Blot-Hybridisierung wurde die genomische DNA beider Mutanten mit Restriktionsenzymen fragmentiert. Für die IDH-Doppelmutante wurde *Eco*RI und für die Mdh-Mutante *Fsp*I gewählt (Abbildung 5.5), wobei jeweils beide Stämme PA14 und PAO1 als Kontrolle dienten. Die Restriktionsschnittstellen waren so gewählt, dass sie je einmal im inaktiven Gen und einmal in einem benachbarten Gen nicht weit entfernt stromauf- oder stromabwärts der Deletion bzw. Insertion lagen. Zur Vereinfachung wurde als Sonde die Gentamicin-Resistenzkassette mit DIG-Markierung erstellt, da diese für beide Mutanten verwendbar war. Jedoch musste darauf geachtet werden, dass beim Restriktionsverdau die Resistenzkassette intakt bleibt. Eine exakte Insertion der Resistenzkassette in das Chromosom konnte dabei jeweils durch den Nachweis einer einzigen Bande in der erwarteten Größe von 2882 bp für die IDH-Doppelmutante und 2370 bp für die Mdh-Mutante bestätigt werden.

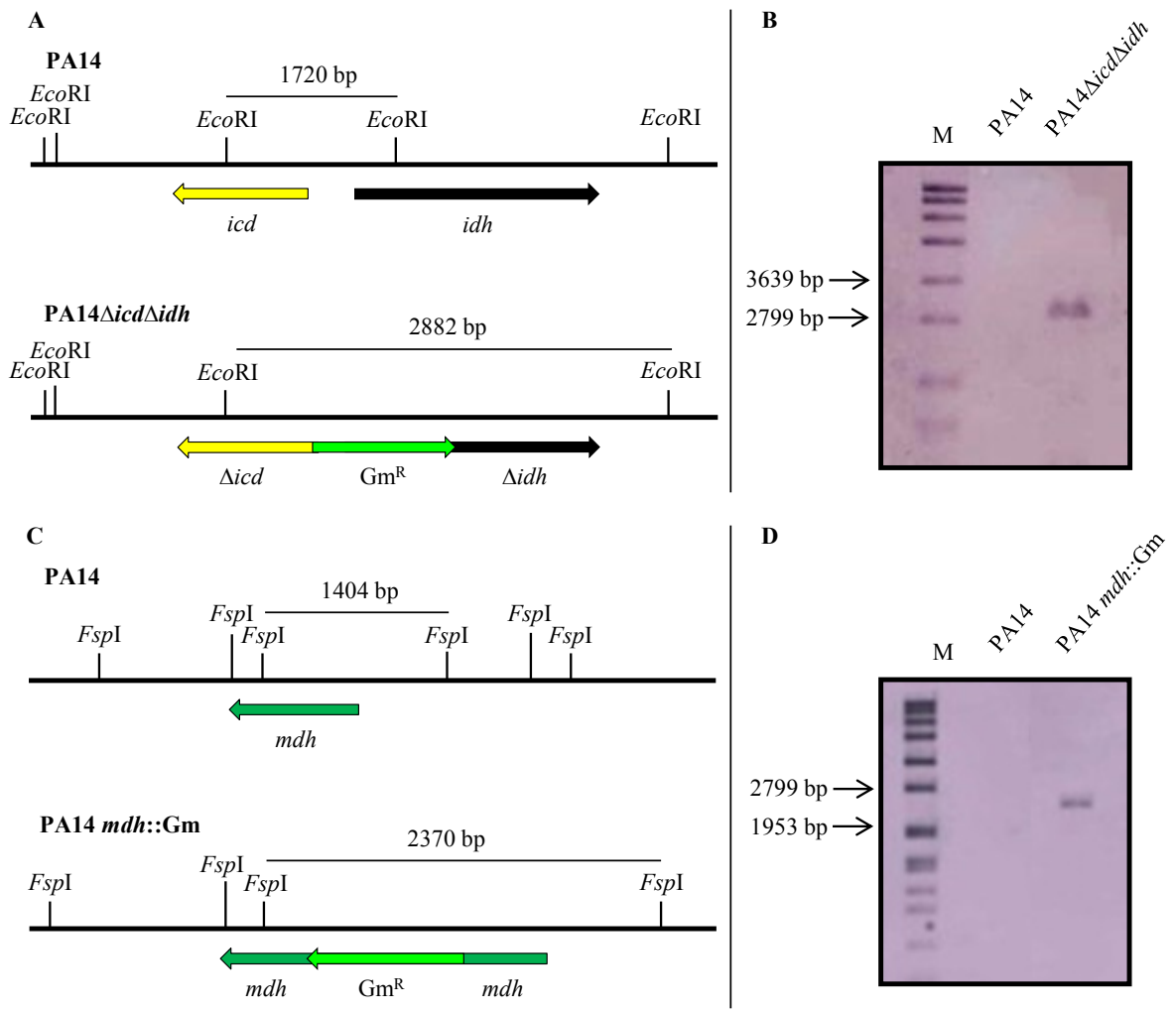


Abbildung 5.5 Southern Blot-Hybridisierung zur Überprüfung von PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm
(A) Der Ausschnitt zeigt oben für PA14 und unten für die konstruierte IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* den chromosomalen Genbereich von *icd* und *idh* inkl. der zur Fragmentierung der genomischen DNA verwendeten Restriktionsschnittstellen für *Eco*RI. (B) Da die Sonde innerhalb der Gentamicin-Resistenzkassette hybridisiert, konnte keine Bande bei PA14, sondern nur eine Bande bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* ermittelt werden. Die Größe des detektierten Fragments entsprach bei korrekter Insertion der aufgrund des *Eco*RI-Verdaus zu erwartenden Größe. (C) Der Ausschnitt zeigt oben für PA14 und unten für die konstruierte Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm den chromosomalen Genbereich von *mdh* inkl. der Restriktionsschnittstellen für *Fsp*I. (D) Es wurde ebenfalls die Sonde der Resistenzkassette verwendet, wobei keine Bande beim PA14 und nur eine Bande mit der zu erwarteten Größe von 2730 bp bei der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm beobachtet werden konnte. (identisches Ergebnis mit *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1Δ*icd*Δ*idh* bzw. PAO1 *mdh*::Gm)

5.2 Wachstumsversuche mit *P. aeruginosa* in Flüssigmedien

5.2.1 Aerobes Wachstum der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zuerst mikroskopisch die Morphologie von PA14 und der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* untersucht. Dazu wurden Überexpressionsvektoren, die entweder das Fluoreszenzgen *gfp* (für PA14) oder *rfp* (für PA14Δ*icd*Δ*idh*) enthielten, jeweils in einen Stamm

konjugiert. Unter dem Mikroskop konnten keine morphologischen Auffälligkeiten, z. B. Größe bzw. Länge, zwischen den Stämmen untereinander festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Ein auffällig verlangsamtes Wachstum der IDH-Doppelmutante wurde bereits direkt nach der erfolgreichen Konstruktion beobachtet. Zur detaillierten phänotypischen Charakterisierung der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* wurde zunächst das Wachstumsverhalten anhand von Wachstumskurven der IDH-Doppelmutante, des Ausgangsstammes PA14 bzw. des WT-Stammes PAO1 sowie der beiden bereits vorhandenen Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn (später jeweils auch als IDH-Einzelmutante bezeichnet) bestimmt. Für diese Experimente wurde neben LB-Medium auch das artifizielle Sputummedium (ASM) verwendet, das die Bedingungen in der CF-Lunge *in vitro* simulieren soll.

Aerob konnte in LB-Medium beobachtet werden, dass PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn kein vermindertes Wachstum im Vergleich zu PA14 bzw. PAO1 aufwies (Abbildung 5.6). Dies zeigt nochmals, dass sich beide Isoenzyme unter den gewählten Bedingungen in Bezug zu PA14 bzw. PAO1 in ihrer metabolischen Funktion zumindest weitgehend komplementieren können. Bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und PAO1Δ*icd*Δ*idh* war dagegen gegenüber den Stämmen PA14 und PAO1 ein deutlich verlangsamtes Wachstum zu erkennen. Dabei wurde kein Unterschied im Wachstumsverhalten der IDH-Doppelmutante von PA14 bzw. PAO1 beobachtet.

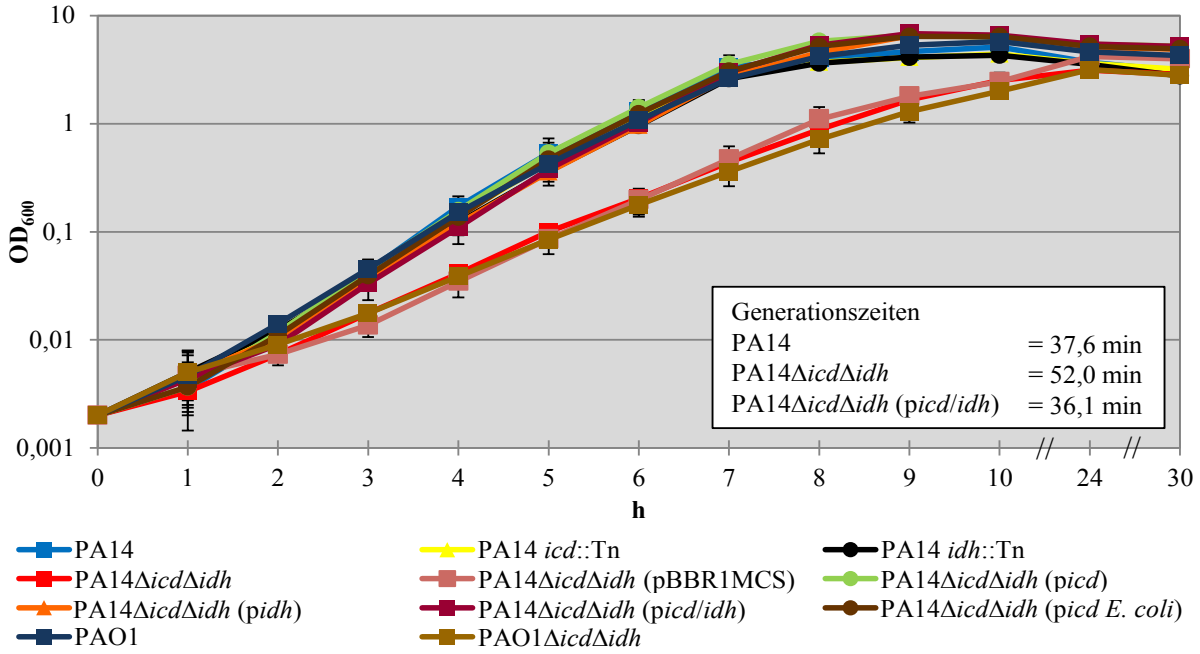


Abbildung 5.6 Aerobes Wachstum von PA14, PAO1 und Isocitratdehydrogenase-Mutanten
Dargestellt ist das aerobe Wachstum von *P. aeruginosa* in LB-Medium über einen Zeitraum von 30 h. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Um zu beweisen, dass der Wachstumsdefekt der IDH-Doppelmutante auf die Inaktivierung (*knock-out*) von *icd* und *idh* zurückzuführen ist, wurden Komplementationsexperimente angeschlossen. Für die Komplementation wurde jeweils der *Pseudomonas*-eigene Promotor (ca. 100 bp vor dem ATG-Genstart) und das jeweilige Gen in den *mid-copy*-Vektor pBBR1MCS (ca. 30 - 50 Kopien/Zelle)

kloniert und in die verschiedenen Mutanten konjugiert. So wurde jeweils sowohl mit dem Leervektor pBBR1MCS (Vektorkontrolle), mit den beiden Einzelgenen *icd* und *idh*, als auch gleichzeitig mit beiden Genen *icd* und *idh* komplementiert. Zusätzlich wurde ein Vektor mit dem klonierten Isocitratdehydrogenasegen aus *E. coli* DH5α verwendet. Für die Stämme PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) wurden zusätzlich die Generationszeiten bestimmt, die eine erfolgreiche Konstruktion der Mutanten nochmals bestätigten.

Die Komplementation mit dem Leervektor zeigte, dass dieser keinen Einfluss auf das Wachstum der IDH-Doppelmutante hatte (Abbildung 5.6). Dagegen ließ sich der Defekt im Wachstum der IDH-Doppelmutante alleine durch *icd* und *idh* sowie durch den beide Gene kodierenden Vektor vollständig komplementieren. Dies bestätigt wiederum, dass sich der Defekt durch Icd bzw. Idh ausgleichen lässt und sich damit beide Gene in ihrer metabolischen Funktion offensichtlich gegenseitig kompensieren können. Ebenso beweisen die errechneten Generationszeiten (PA14 37,6 min, PA14Δ*icd*Δ*idh* 52 min, PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) 36,1 min) eine erfolgreiche Komplementation. Selbst eine heterologe Komplementation mit der einzigen Isocitratdehydrogenase aus *E. coli* war möglich.

Im Weiteren wurden insbesondere zur einfacheren Durchführung der folgenden Experimente jeweils nur der Stamm PA14 und die isogen abgeleiteten Mutanten wie die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und die von PA14 bereits vorhandenen IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn verwendet. Der PAO1 WT-Stamm sowie die konstruierte PAO1-IDH-Doppelmutante PAO1Δ*icd*Δ*idh* wurden nur selektiv für bestimmte Vergleiche hinzugezogen.

Außer in LB-Medium wurde das aerobe Wachstum der *P. aeruginosa*-Stämme auch in ASM bestimmt, welches noch nährstoffreicher als LB-Medium ist. Es war zu klären, ob der in LB-Medium gemessene Wachstumsdefekt der IDH-Doppelmutante als Ausdruck eines defekten Citratzyklus auch in ASM eine Rolle spielt. Deswegen wurden zur weiteren allgemeinen Charakterisierung das Wachstum in ASM neben der IDH-Doppelmutante der Stamm PA14, die beiden IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn sowie die jeweiligen Komplementanten getestet.

Wie schon beim LB-Medium, zeigten die beiden IDH-Einzelmutanten in ASM keinen signifikanten Unterschied im Wachstum gegenüber dem Stamm PA14, wohingegen die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und die Leervektorkontrolle einen deutlichen Defekt aufwiesen (Abbildung 5.7). Dieser Wachstumsdefekt ließ sich durch alle verwendeten Komplementanten kompensieren. Demnach zeigt die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* selbst in dem nährstoffreichen ASM einen Defekt im Kohlenstoff- und Energiemetabolismus.

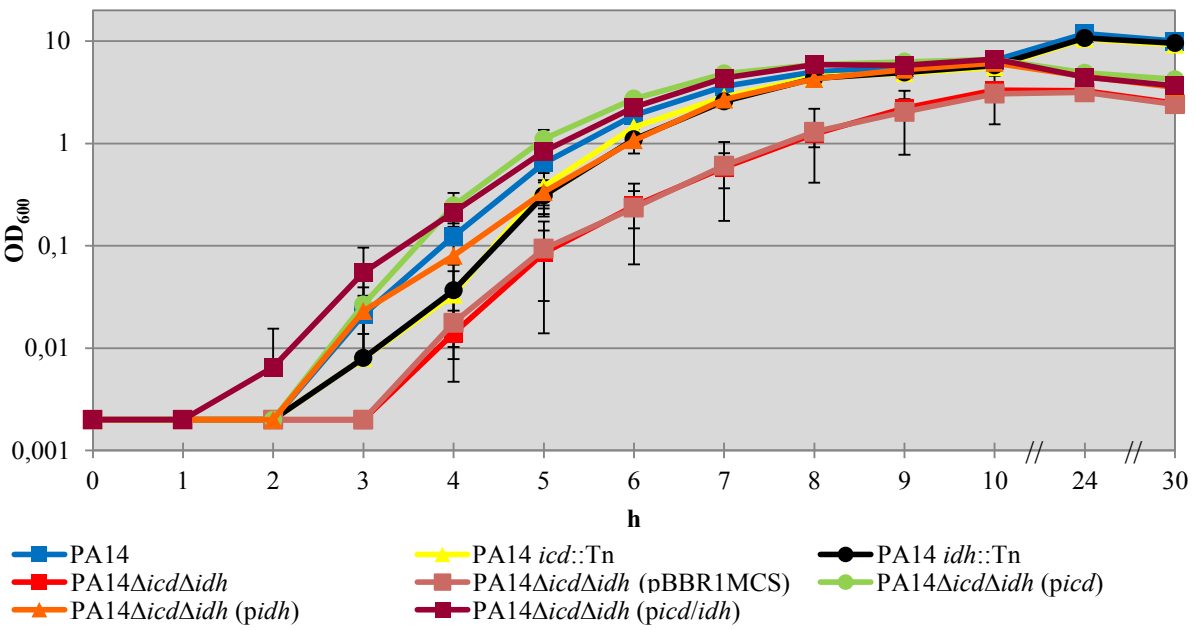


Abbildung 5.7 Aerobes Wachstum von PA14 und Isocitratdehydrogenase-Mutanten in ASM
Das Wachstum von PA14 und den Isocitratdehydrogenase-Mutanten im nährstoffreichen ASM wurde über einen Zeitraum von 30 h gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.2.2 Anaerobes Wachstum der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*

In der CF-Lunge kommt es durch die Retention von Wasser zu einem zähflüssigen Mukus mit Verlegung von Atemwegen zur Bildung von mikro- bzw. anaeroben Bereichen (Worlitzsch *et al.*, 2002). Verstärkt wird dieser Zustand durch den Sauerstoffverbrauch der vorhandenen Bakterien wie *P. aeruginosa*, aber auch durch die eingewanderten neutrophilen Granulozyten. Um den mikro- bzw. anaeroben Bereichen in der CF-Lunge experimentell noch ein wenig besser zu simulieren, wurde das Wachstumsverhalten von PA14 und der IDH-Mutanten in LB-Medium und ASM bei Zugabe von Nitrat (terminaler Elektronenakzeptor) unter Sauerstoffmangel gemessen.

Wie auch schon aerob in LB-Medium und ASM gezeigt werden konnte, besitzen die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und die Leervektorkontrolle ebenfalls ein Wachstumsdefekt unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium, der durch alle Komplementationsplasmide erfolgreich komplementiert werden konnte (Abbildung 5.8). Die Generationszeiten von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) waren schwierig zu ermitteln, da nur über einen kurzen Zeitraum ein exponentielles Wachstum bei den Stämmen beobachtet werden konnte. Die ungefähr gleich langen Generationszeiten der drei Stämme (Daten nicht gezeigt) spiegeln das Wachstum lediglich in der Anfangsphase wieder; anschließend flacht das Wachstum schnell ab, sodass insgesamt bei allen getesteten Stämmen keine höheren OD_{600}-Werte als ca. 3,0 gemessen wurden. Im Vergleich zur aeroben Wachstumskurve in LB-Medium wurde bei allen getesteten Stämmen unter anaeroben Bedingungen eine längere *lag*-Phase beobachtet, wobei das Wachstum der IDH-Doppelmutante und der Leervektorkontrolle im Vergleich zu den übrigen Stämmen um eine Stunde verspätet einsetzte.

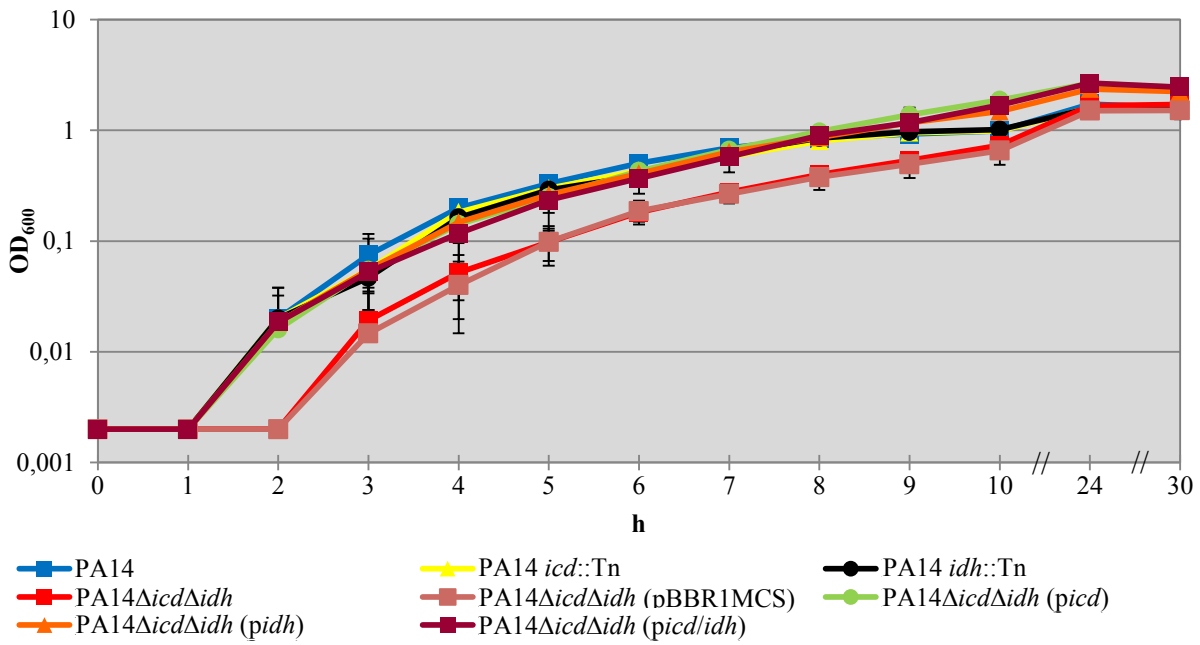


Abbildung 5.8 Anaerobes Wachstum von PA14 und Isocitratdehydrogenase-Mutanten
Über einen Zeitraum von 30 h wurde das anaerobe Wachstum in LB-Medium (25 ml Flaschen) von PA14 und Isocitratdehydrogenase-Mutanten gemessen. Die Messungen erfolgten unabhängig mindestens in Triplikaten.

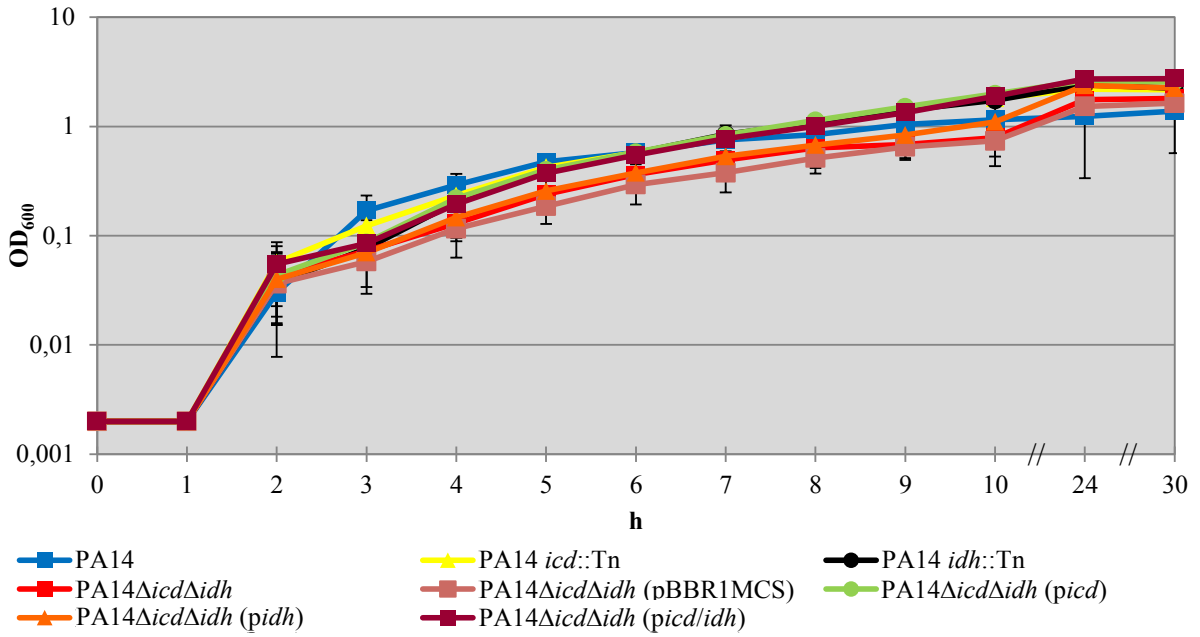


Abbildung 5.9 Anaerobes Wachstum von PA14 und Isocitratdehydrogenase-Mutanten in ASM
Das anaerobe Wachstum von PA14 und Isocitratdehydrogenase-Mutanten wurde in ASM (in 25ml Flaschen) über einen Zeitraum von 30 h gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Zusätzlich wurde das Wachstum in ASM unter anaeroben Bedingungen bei PA14 und den isogenen Isocitratdehydrogenasen-Mutanten bestimmt (Abbildung 5.9). Auch hier war bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und dem Kontrollstamm PA14Δ*icd*Δ*idh* (pBBR1MCS) ein Wachstumsdefekt feststellbar, jedoch war dieser nicht so ausgeprägt wie bei den zuvor gezeigten Wachstumskurven unter aeroben Bedingungen. Dies bedeutet, dass der unterbrochene Citratzyklus nur zum Teil zum Wachstumsdefekt der IDH-Doppelmutante beiträgt. Des Weiteren blieb unklar, warum

dieser Defekt nicht durch die Komplementante PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) vollständig komplementiert werden konnte. Interessanterweise konnte unter anaeroben Bedingungen in ASM eine kürzere lag-Phase beobachtet werden, als unter aeroben Bedingungen. Insgesamt wurden keine höheren OD_{600}-Werte als ca. 3,0 gemessen, wohingegen unter aeroben Bedingungen zum Teil OD_{600}-Werte von über 10,0 gemessen wurden.

5.2.3 Aerobes Wachstum der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm

Wie zuvor für die Isocitratdehydrogenase-Mutanten sollte auch die Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm zunächst durch die Bestimmung des Wachstums weiter phänotypisch charakterisiert werden. Unter Berücksichtigung der Sequenzdaten des Genoms und der Literatur kodieren in *P. aeruginosa* fünf verschiedene Gene für Malat-verwertende Enzyme (Abbildung 5.10) (Kretzschmar *et al.*, 2002;Rakhimova *et al.*, 2008): 1) Enzyme, die Malat zu Oxalacetat verwerten (*mdh*, *mqoA*, *mqoB*) und 2) Enzyme, die in einer kataplerotischen Reaktion Malat unter Abspaltung von CO_2 in Pyruvat konvertieren (*sfcA* und *maeB*). Das Wachstum der in dieser Arbeit konstruierten Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm wurde im Vergleich mit anderen Malat-verwertenden Einzelmutanten getestet. Eine Kontroll-PCR zeigte, dass das *maeB*-Gen in der PA14 *maeB*::Tn-Mutante nicht inaktiviert war, sodass diese Mutante in den folgenden Versuchen nicht berücksichtigt wurde. Zur einfacheren Durchführung der folgenden Experimente wurde lediglich die Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm und nicht die PAO1-Mdh-Mutante PAO1 *mdh*::Gm verwendet.

Sowohl die Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm und eine entsprechende Transposonmutante PA14 *mdh*::Tn als auch die Mutanten PA14 *mqoA*::Tn und PA14 *sfcA*::Tn zeigten kein Wachstumsdefekt (Abbildung 5.11). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da jeweils weitere Isoenzyme vorhanden waren. Wie aus der Literatur bereits bekannt (Rakhimova *et al.*, 2008), konnte bei PA14 *mqoB*::Tn ein Defizit im Wachstum festgestellt und bestätigt werden. Teilweise wurde in den folgenden Versuchen neben der konstruierten Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm auch die entsprechende Transposonmutante PA14 *mdh*::Tn verwendet.

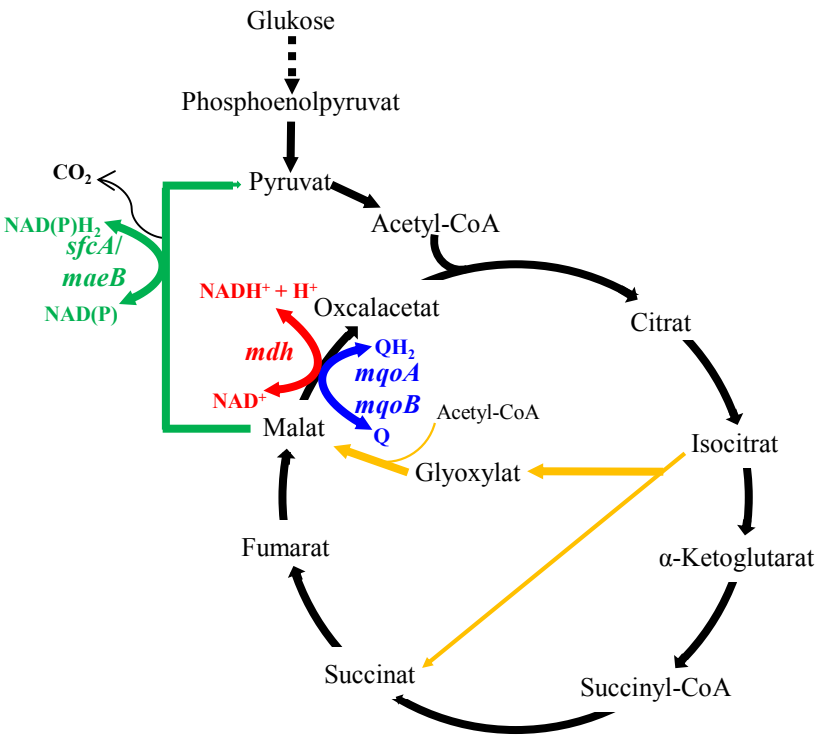


Abbildung 5.10 In *P. aeruginosa* vorkommende Malat-verwertende Enzyme
Drei von fünf verschiedenen Malat-verwertenden Enzymen katalysieren die Verwertung von Malat zu Oxalacetat, wobei die klassische Malatdehydrogenase Mdh (Rot) NAD^+ und MqoA oder MqoB (beide Blau) unterschiedliche Reduktionsäquivalente nutzen. Die Enzyme SfcA und MaeB (beide Grün) bilden in einer kataplerotischen Reaktion aus Malat Pyruvat (sog. *malic enzymes*).

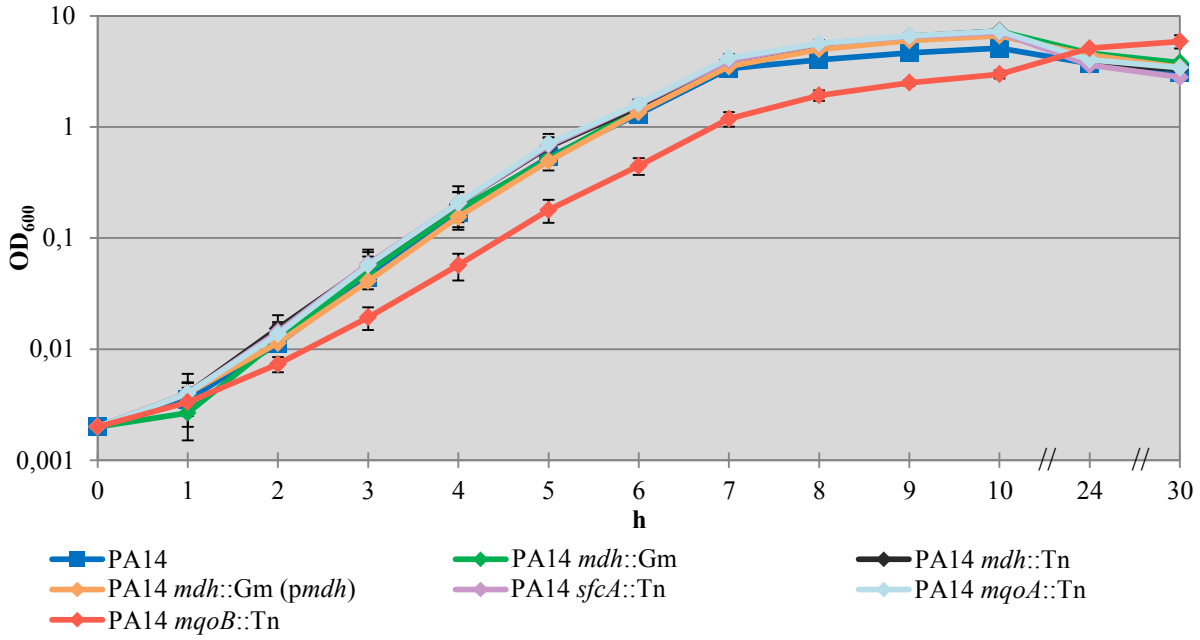


Abbildung 5.11 Aerobes Wachstum von PA14 und Malat-verwertenden Mutanten
Die Abbildung zeigt das aerobe Wachstum von PA14 und Malat verwertenden Mutanten in LB-Medium über insgesamt 30 h. Messungen wurden für jeden Stamm mindestens drei Mal unabhängig durchgeführt.

5.2.4 Aerobes Wachstum von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit vom pH-Wert

Auch der pH-Wert könnte als Stressfaktor einen Einfluss auf die Anpassung von *Pseudomonas* an die CF-Lunge haben. Wie in einer aktuellen Studie (Pezzulo *et al.*, 2012) an gentechnisch veränderten CF-Schweinen gezeigt werden konnte, weisen erkrankte Versuchstiere einen niedrigeren pH-Wert im *airway surface liquid* (ASL) auf und sind anfälliger gegenüber einer Infektion. Wurde der pH-Wert der Lungenoberfläche künstlich erhöht, so konnte eine Besserung durch gesteigerte Abwehrmechanismen der Lunge erreicht werden. Auch in CF-Patienten wurde im Vergleich zu gesunden Menschen ein verminderter pH-Wert von ca. 5,3 - 5,9 gemessen (Tate *et al.*, 2002). Es wurde deshalb das Wachstum in LB-Medium bei drei unterschiedlichen pH-Stufen (pH 5,2; 7,4 und 9,0) bestimmt.

Am besten konnte PA14 bei neutralem pH-Wert von 7,4 wachsen (Abbildung 5.12). Bei den anderen beiden pH-Werten konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Mdh-Mutante verhielt sich in diesem Experiment wie PA14. Wie schon vorher gezeigt, offenbarte die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* einen Wachstumsdefekt bei pH 7,4. Dieser Defekt war bei einem pH-Wert 9,0 im basischen Milieu leicht verstärkt. Ein noch deutlicherer Wachstumsdefekt konnte dagegen bei der IDH-Doppelmutante bei saurem pH von 5,2 festgestellt werden. Demnach hat der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von PA14Δ*icd*Δ*idh* im Gegensatz zu PA14 und PA14 *mdh*::Gm.

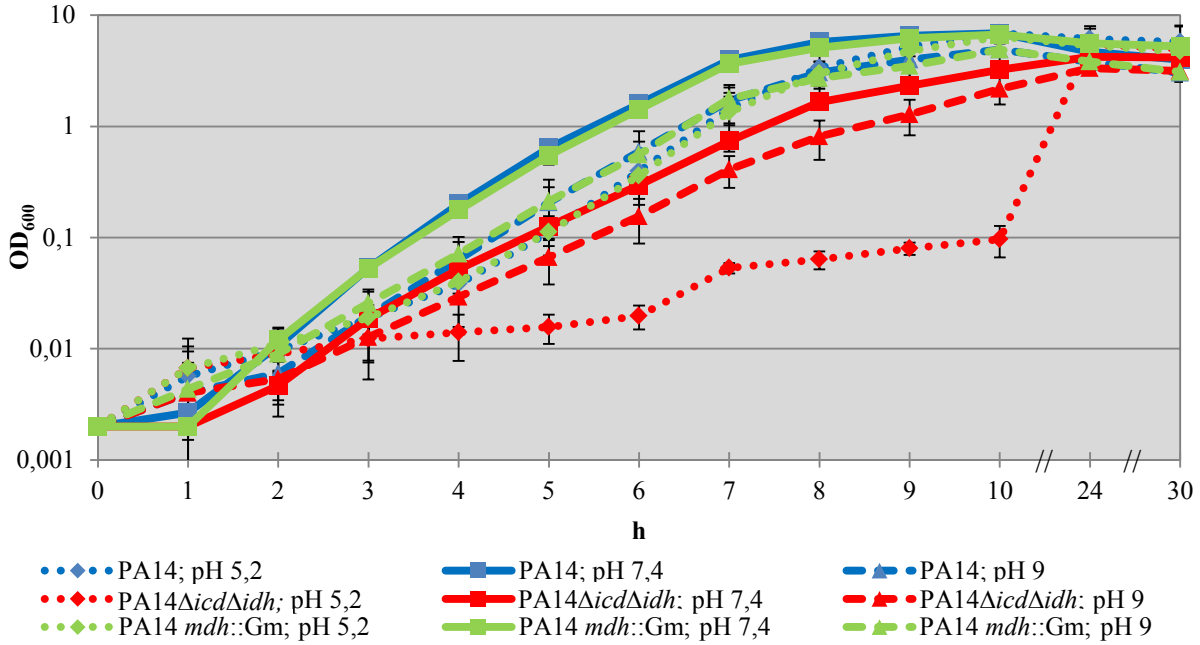


Abbildung 5.12 Wachstum von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm bei verschiedenem pH
Das Wachstum in LB-Medium bei verschiedenen pH-Werten (5,2; 7,4 und 9) wurde über insgesamt 30 h für drei Stämme PA14; PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.3 Überprüfungen der katalytischen IDH-Enzymfunktionalität

5.3.1 Bestimmung der Enzym-Aktivität der Isocitratdehydrogenase-Mutanten

Mit diesem Experiment sollte funktionell bestätigt werden, dass in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* die Gene *icd* und *idh* inaktiviert sind und die Mutante keine Enzym-Aktivität einer Isocitratdehydrogenase mehr aufweist. Auf einen entsprechenden Nachweis für die Malatdehydrogenase wurde verzichtet, da für einen Enzymtest die toxische Chemikalie Kaliumcyanid benötigt wird (Blockierung der Atmungskette).

In einer enzymatischen Reaktion katalysiert die Isocitratdehydrogenase die Decarboxylierung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat, wobei das oxidierte $NADP^+$ zu NADPH reduziert wird, was photometrisch durch Verschiebung des Absorptionsmaximums von 260 nm zu 340 nm bestimmt wird (Abbildung 5.13). Die Bakterienstämme PA14, beide IDH-Einzelmutanten, die IDH-Doppelmutante sowie die komplementierten Stämme wurden in der stationären Phase geerntet und anschließend wurden die Zellextrakte für die Enzym-Aktivitätsmessungen verwendet.

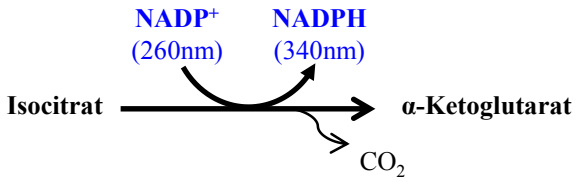


Abbildung 5.13 Enzymatische Reaktion der Isocitratdehydrogenase
Isocitrat wird durch die Isocitratdehydrogenase zu α-Ketoglutarat umgesetzt, wodurch zusätzlich NADPH und CO_2 entsteht. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von 260 nm zu 340 nm.

Bei der gemessenen Enzym-Aktivität des Ausgangsstammes PA14 kann nicht zwischen der Reaktion der Icd bzw. der Idh unterschieden werden, da in dem Stamm beide Isoenzyme aktiv sind (Abbildung 5.14). Die Einzelmutante PA14 *icd*::Tn, bei der nur noch die Idh aktiv ist, zeigt eine geringere Enzym-Aktivität als PA14 *idh*::Tn, bei der nur noch die Icd aktiv ist. Die Icd stellt somit die aktivere Isocitratdehydrogenase insbesondere in der stationären Phase dar, was bereits in der Dissertation von A. Eichner gezeigt werden konnte (Eichner, 2012). Die Werte der IDH-Einzelmutanten sind insofern plausibel, da beide Enzym-Aktivitäten in der Summe ungefähr der Aktivität des Stammes PA14 entsprechen. Wie zu erwarten, zeigt die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* keinerlei Enzym-Aktivität, wie auch die Vektorkontrolle (pBBR1MCS). Wurde die IDH-Doppelmutante mit dem *icd*-Gen komplementiert, so war fast das Zweifache der Enzym-Aktivität des Stammes PA14 messbar. Im Vergleich dazu ergab eine Komplementation mit dem *idh*-Gen wiederum eine reduzierte Aktivität. Die stärkste gemessene Enzym-Aktivität (1,82 U/mg +/- 0,13) konnte durch eine Überexpression mit beiden Isoenzymen erreicht werden. Interessanterweise war es auch möglich, die IDH-Doppelmutante mit dem *icd*-Gen aus *E. coli* zu komplementieren. Dabei wurde jedoch die insgesamt geringste Enzym-Aktivität von allen getesteten Komplementanten gemessen (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei der Komplementation ebenfalls um den gleichen Komplementationsvektor pBBR1MCS handelte,

muss dies auf eine veränderte Expression oder Spezifität des *icd*-Gens bzw. der Icd von *E. coli* in *P. aeruginosa* hindeuten. Obwohl für PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) eine ca. 8-fach höhere und für PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd E. coli*) eine ca. 3-fach geringere Enzym-Aktivität in Bezug auf PA14 gemessen wurden, verhielten sich beide Komplementanten hinsichtlich des Wachstums unter aeroben Bedingungen in LB-Medium interessanterweise wie PA14 (s. a. Abbildung 5.6).

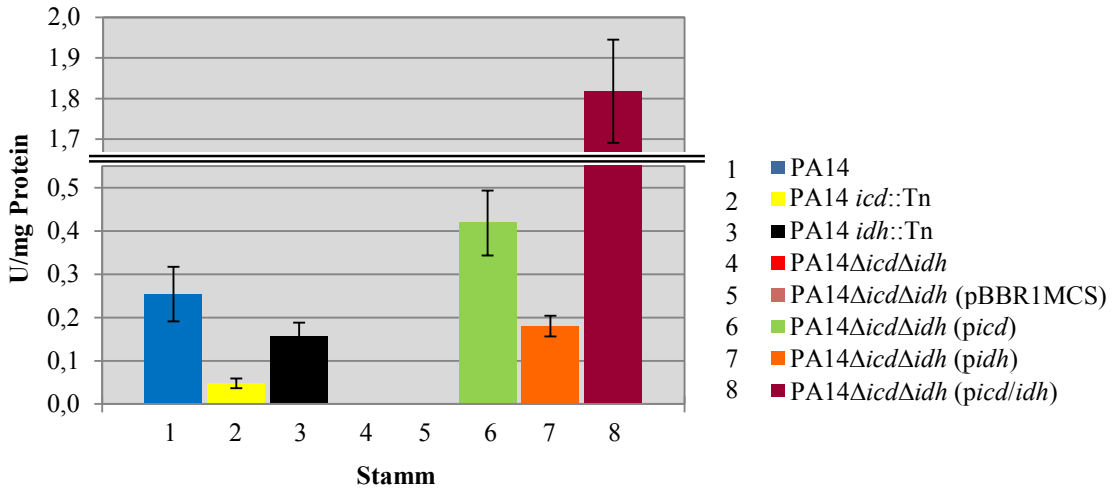


Abbildung 5.14 Bestimmung der IDH-Enzym-Aktivität von *P. aeruginosa*
Über das gebildete NADPH wurde indirekt die Enzym-Aktivität der Isocitratdehydrogenase bei den verschiedenen getesteten Stämmen in U/mg Protein gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Wert ≤ 0,001)

5.3.2 Überprüfung der IDH-Enzym-Aktivitäten im Gel nach BN-PAGE

Zur Unterscheidung der Icd-/Idh-Aktivität z. B. in PA14 oder in CF-Isolaten wurde in dieser Arbeit die Blue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) etabliert. Bei dieser Methode werden die Proteine und somit auch beide Isoenzyme der Isocitratdehydrogenase in einem nativen Gel entsprechend ihrer Größe getrennt und anschließend die Enzym-Aktivität sichtbar gemacht. Allerdings ist mit dieser Methode keine Quantifizierung, sondern nur eine visuelle semiquantitative Beurteilung möglich. Das Prinzip basiert wiederum auf der Reduktion von $NADP^+$ zu NADPH, wobei dann Elektronen vom NADPH über eine Reihe von Substraten letztendlich auf ein oxidiertes Tetrazoliumsalz übertragen werden und es durch Reduktion zur Bildung eines violetten Farbstoffes Formazan kommt. Anhand des PA14-Stammes und der beiden IDH-Einzelmutanten konnte wie schon bei Messung der Enzym-Aktivitäten bestätigt werden, dass die Icd die stärkere Enzym-Aktivität aufweist (Abbildung 5.15). Die Abbildung zeigt, dass PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn korrekterweise nur eine gefärbte Bande aufweisen, wohingegen die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und die Leervektorkontrolle PA14Δ*icd*Δ*idh* (pBBR1MCS) keine Enzym-Aktivitäten zeigen. Bei den komplementierten Stämmen war eine stärkere Farbumsetzung als beim PA14 und den beiden IDH-Einzelmutanten zu beobachten (vermutlich Gendosiseffekt). Inwieweit posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierungen) einen Einfluss auf die Isocitratdehydrogenase-Aktivitäten

der Icd und Idh in *P. aeruginosa* hatten, konnte weder bei der *in vitro*-IDH-Enzym-Aktivitätsbestimmung noch bei der BN-PAGE festgestellt werden. Die Mdh-Mutante samt Transposonmutante PA14 *mdh*::Tn verhielt sich wie PA14.

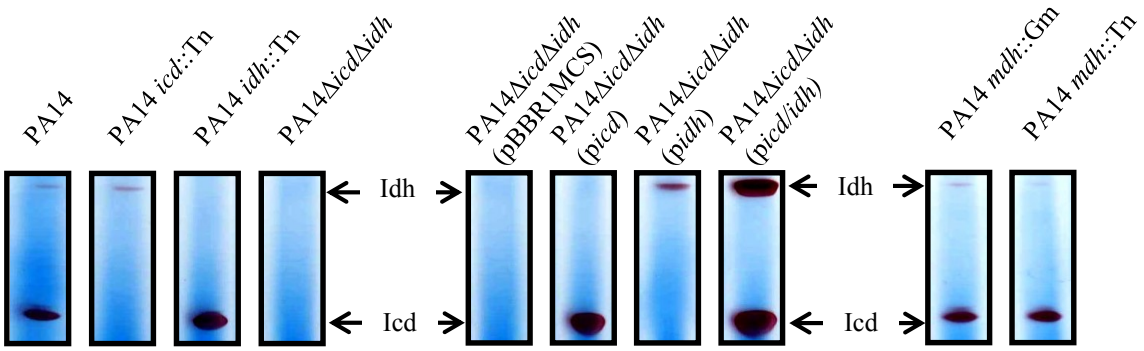


Abbildung 5.15 BN-PAGE zur Darstellung der Enzym-Aktivitäten von Icd und Idh aus *P. aeruginosa*
Nach Trennung beider Isoenzyme in einem nativen Polyacrylamidgel, kann unter anderem durch Zugabe von Isocitrat und $NADP^+$ die Enzym-Aktivitäten der IDH durch eine violette Färbung im Gel dargestellt werden. Die obere Bande stellt die monomere Idh (82 kDa) und die untere die dimere Icd (46 kDa) dar. Experimente wurden mindestens in Duplikaten durchgeführt.

Mittels der BN-PAGE war es nicht möglich den Verlust der Mdh-Enzym-Aktivität der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm darzustellen, da mehrere kaum sichtbare Banden sich nach der Inkubation mit Malat bildeten. Diese Banden könnten durch die noch vorhandenen Isoenzymen erklärt werden, die das Malat in einer anderen Enzymreaktion verwerten. Geeignete Bedingungen konnten bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nicht gefunden werden. Bei dieser *in vitro*-Methode konnten auch andere Substrate wie Glukose-6-Phosphat oder α-Ketoglutarat getestet werden (Daten nicht gezeigt), jedoch wurde das Hauptaugenmerk auf die Verwertung des Isocitrats gelegt.

5.4 Metabolische Analysen mit *P. aeruginosa*

5.4.1 Biolog-*Microarrays*™ von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass in Wachstumsversuchen in LB-Medium und ASM die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* einen Wachstumsdefekt aufweist. Um zu zeigen, welche Auswirkungen die Inaktivierung beider Isocitratdehydrogenasen auf den Stoffwechsel von *P. aeruginosa* hat, wurden Experimente mit phänotypischen *Microarrays*™ der Firma Biolog (Hayward CA, USA) durchgeführt. Mit dieser Methode (in dieser Arbeit auch kurz als „Biolog“ bezeichnet) lässt sich zeigen, welche Substrate von der IDH-Doppelmutante weiterhin verstoffwechselt werden können. Hierfür wurden die Array-Platten PM1 (Kohlenstoffquellen) und PM3 (Aminosäuren-/Stickstoffquellen) verwendet, die ein breites Spektrum an Substraten der zentralen Stoffwechselwege enthalten (genaue Zusammenstellung beider Platten siehe 8.1.1 und 8.1.3). Jeder Kavitätsboden enthält Minimalmedium mit einem jeweiligen zu testendem Substrat, was deshalb nicht mit LB-Medium oder ASM vergleichbar ist. Als Grundlage dieser Methode dient

wiederum die Reduktion eines Tetrazoliumsalzes und die anschließende Bildung des violetten Farbstoffes Formazan, dessen Entstehung bei OD_{590} gemessen wird. Die Farbstoff-Bildung ist direkt proportional zu der Anzahl an lebenden und stoffwechselaktiven (respirierenden) Zellen. In den Bakterien verläuft die nach Verstoffwechselung eines Substrates vorkommende Zellatmung unabhängig vom Wachstum. Das zur Inokulum-Lösung dazugegebene Menadion dient zur Inhibierung der Pyocyanin-Produktion von *P. aeruginosa*, da Pyocyanin sonst die kolorimetrischen Messungen beeinträchtigen würde. Zur einfacheren Interpretation wurden die gemessenen Werte anhand von Schwellenwerten in drei Kategorien eingeteilt, d. h. lag ein Wert bei $OD_{590} \geq 0{,}8$ wurde dies als eine starke, bei $OD_{590} \geq 0{,}2$ als eine mittelstarke und bei $OD_{590} < 0{,}2$ als schwache oder keine Verstoffwechselung gewertet. Durchgeführt wurden die Arrays mit den Stämmen PA14, der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm. In diesem Abschnitt wird nur eine Auswahl der Ergebnisse gezeigt, während die vollständigen Ergebnisse im Anhang (8.1.2/8.1.5) dargestellt sind.

Insgesamt waren wie auch schon in den Wachstumsexperimenten zwischen PA14 und Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm keine Unterschiede zu erkennen, was dafür spricht, dass der *knock-out* durch die verfügbaren Isoenzyme kompensiert wird. Es zeigte sich jedoch, dass die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* eine Vielzahl an Substraten nicht mehr verwerten konnte. Betrachtet man die Substrate der zentralen Stoffwechselwege, z. B. des Entner-Doudoroff-Wegs oder des Citratzyklus, so wird deutlich, dass die IDH-Doppelmutante nur noch in der Lage ist α-Ketoglutarat zu verwerten (Abbildung 5.16 A). Selbst bei der Messung weiterer Substrate aus dem Citratzyklus zeigte dieser Stamm schwache oder gar keine Signale. Interessanterweise bei Betrachtung der Verwertung von Aminosäuren (AS) konnte eine relative mittlere bis starke Verwertung bei Glutamat, Glutamin, Prolin und Histidin (nicht in Grafik gezeigt) beobachtet werden (Abbildung 5.16 B). Dies wurde auch bei der Verwertung von Aminosäure-Kombinationen gemessen (Abbildung 5.16 C). Verglichen mit PA14 und der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm zeigte die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* in der Regel eine bessere Verwertung der Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Prolin oder Histidin. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse beider Platten ist in Abbildung 5.17 dargestellt.

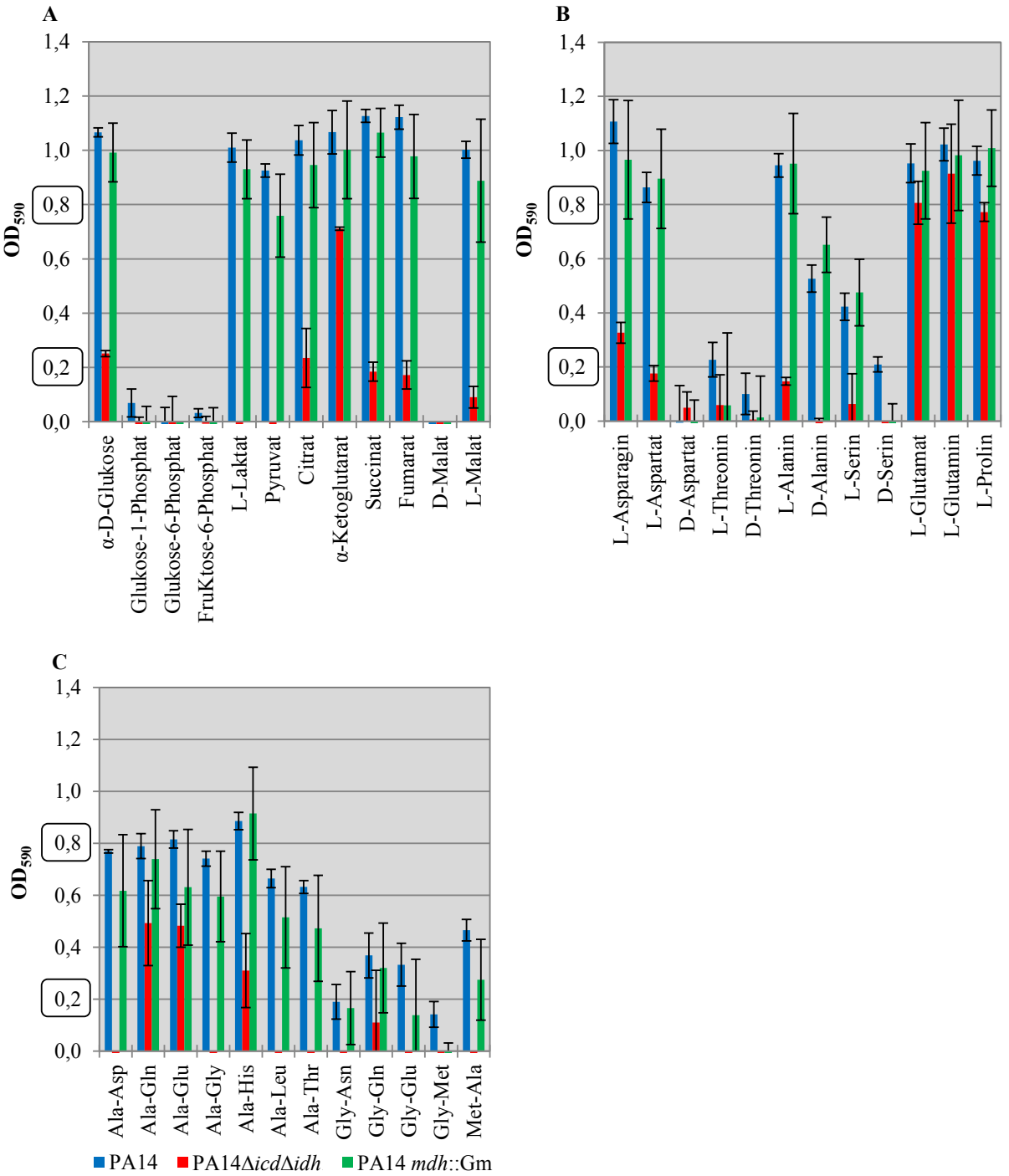


Abbildung 5.16 Auswahl an Biolog-Ergebnissen für PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm
Dargestellt ist nur eine Auswahl der untersuchten Substrate für (A); die Hauptstoffwechselwege Entner-Doudoroff-Weg und Citratzyklus (Platte PM1), (B) Aminosäuren (Platte PM1/PM3) und (C) von Aminosäurenkombinationen (Platte PM3). Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Platte PM1:

Schwellenwert	PA14	PA14Δ*icd*Δ*idh*	PA14 *mdh*::Gm
OD > 0,8 (stark)	19	2	24
OD ≥ 0,2 (mittel)	12	10	14
OD < 0,2 (kein/schwach)	54	83	57
Gesamtanzahl	95	95	95

Platte PM3:

Schwellenwert	PA14	PA14Δ*icd*Δ*idh*	PA14 *mdh*::Gm
OD > 0,8 (stark)	23	1	10
OD ≥ 0,2 (mittel)	43	12	51
OD < 0,2 (kein/schwach)	29	82	34
Gesamtanzahl	95	95	95

PM1 Platten

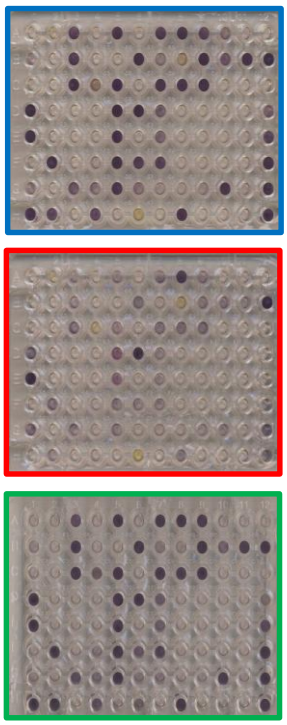


Abbildung 5.17 Zusammenfassung der Biolog-Ergebnisse für PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm
Gezeigt sind die Ergebnisse der Biolog-Platten PM1 und PM3. Die Anzahl der jeweiligen Substrate wurde anhand von Schwellenwerten in drei unterschiedliche Signalstärken eingeteilt. Rechts sind die Platten PM1 nach 24 h (Endpunktbestimmung) zu sehen (Blau = PA14, Rot = PA14Δ*icd*Δ*idh*, Grün = PA14 *mdh*::Gm). Die Platten PM3 (8.1.4) sind im Anhang dargestellt.

5.4.2 Wachstum von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm auf suppl. C-MM

Die Biolog-Experimente geben einen detaillierten Überblick über die Stoffwechseldefekte und erste Hinweise über die Substratverwertung der drei verwendeten Stämme. Dies sagt jedoch nichts darüber aus, ob die Mutanten auch in der Lage sind, bei Zugabe von Substraten zu wachsen. Um dies zu testen wurde PA14, die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* oder die Mdh-Mutante auf ein C-Minimalmedium (C-MM) M9 getropft, welches mit einer einzigen Kohlenstoff- bzw. Aminosäuren- bzw. Fettsäurequelle supplementiert wurde. Es konnte jedoch deutlich nach 24 h ausschließlich zwischen Wachstum und keinem Wachstum unterschieden werden.

Die Mdh-Mutante zeigte keinerlei Einschränkungen beim Wachstum mit verschiedenen C-Quellen (Abbildung 5.18). Bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* konnte dagegen ausschließlich nur ein Wachstum auf M9 bei Zugabe von α-Ketoglutarat verzeichnet werden. Bei der Zugabe von Aminosäuren bzw. der Fettsäure Palmitinsäure wuchs die IDH-Doppelmutante lediglich mit Glutamat, Arginin oder Ornithin supplementiertem Minimalmedium (Abbildung 5.19). Unter anaeroben Bedingungen (M9 + 50 mM Nitrat + Quelle) wurden exakt die gleichen Ergebnisse sowohl bei den Supplementierungen durch Kohlenstoff- als auch durch Aminosäurenquellen bzw. Fettsäure Palmitinsäure für alle drei getesteten Stämme beobachtet (Daten nicht gezeigt).

C-Quellen	Aerob		
	PA14	PA14Δ*icd*Δ*idh*	PA14 *mdh*::Gm
LB	+	+	+
Minimal-Medium (M9)	-	-	-
+ Glukose (40 mM)	+	-	+
+ Pyruvat (40 mM)	+	-	+
+ Laktat (40 mM)	+	-	+
+ Citrat (40 mM)	+	-	+
+ Isocitrat (40 mM)	+	-	+
+ α-Ketoglutarat (40 mM)	+	+	+
+ Succinat (40 mM)	+	-	+
+ Fumarat (40 mM)	+	-	+
+ Malat (40 mM)	+	-	+
+ Oxalacetat (20 mM)	+	-	+

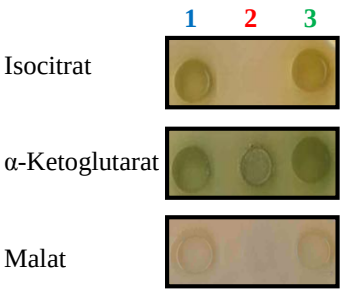


Abbildung 5.18 Wachstum auf C-MM mit verschiedenen C-Quellen
Verschiedene Substrate/Intermediate des Entner-Doudoroff-Wegs und des Citratzyklus wurden für die Supplementierung des M9-Mediums verwendet. Die jeweiligen Endkonzentrationen der verwendeten Substrate sind in Klammern angegeben. + symbolisiert Wachstum und – kein Wachstum. Auf der rechten Seite in der Abbildung ist beispielhaft das Wachstum der drei Stämme bei Zugabe von Isocitrat, α-Ketoglutarat und Malat in M9 zu sehen. Experimente wurden mindestens in Duplikaten durchgeführt.

Aminosäuren + Fettsäure	Aerob		
	PA14	PA14Δ*icd*Δ*idh*	PA14 *mdh*::Gm
+ Glutamat (40 mM)	+	+	+
+ Arginin (40 mM)	+	+	+
+ Ornithin (40 mM)	+	+	+
+ Lysin (40 mM)	+	-	+
+ Serin (40 mM)	+	-	+
+ Phenylalanin (40 mM)	+	-	+
+ Palmitinsäure (400 µM)	+	-	+

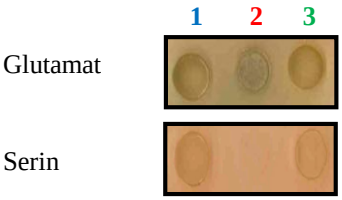


Abbildung 5.19 Wachstum auf C-MM mit verschiedenen Aminosäuren bzw. Palmitinsäure
Verschiedene Aminosäuren und Palmitinsäure wurden getestet. PA14 und die Mdh-Mutante sind in der Lage mit allen C-Quellen zu wachsen. Die jeweiligen Endkonzentrationen der verwendeten Substrate sind in Klammern angegeben. + symbolisiert Wachstum und – kein Wachstum. Auf der rechten Seite in der Abbildung ist beispielhaft das Wachstum der Stämme bei Zugabe von Glutamat und Serin in M9 dargestellt. Experimente wurden mindestens in Duplikaten durchgeführt.

5.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Biolog- und C-MM-Experimenten

Eine Zusammenfassung der Biolog-Experimente und der Wachstumsexperimente auf supplementiertem Minimalmedium (C-MM) sind für PA14, der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und der Mdh-Mutante in der Abbildung 5.20 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass sich die Mdh-Mutante mit Ausnahme von Tyrosin wie PA14 verhält (Biolog-Wert knapp unter < 0,4). Die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* dagegen kann nur bestimmte Substrate (Histidin, α-Ketoglutarat, Glutamat, Prolin, Glutamin, Arginin und Ornithin) für ihren Kohlenstoff- und Energiefluss metabolisieren. Es scheint, dass der Stoffwechselfluss mit Ausnahme von Histidin aus einer bestimmten Richtung erfolgt. Wie die IDH-Doppelmutante essentielle Aminosäuren oder andere

wichtige Vorläufer erlangt, ist bisher unklar. Inwieweit Aufnahmesysteme für z. B. Kohlenhydrate bzw. Transporter in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* reguliert bzw. ein- und abgeschaltet wurden, war ebenfalls nicht bekannt. Zur Darstellung des Kohlenstoffflusses der IDH-Doppelmutante wurden Isotopolog-Experimente und zur weiteren Charakterisierung noch Transkriptom-Experimente mittels *P. aeruginosa* spezifischen *Microarrays* durchgeführt.

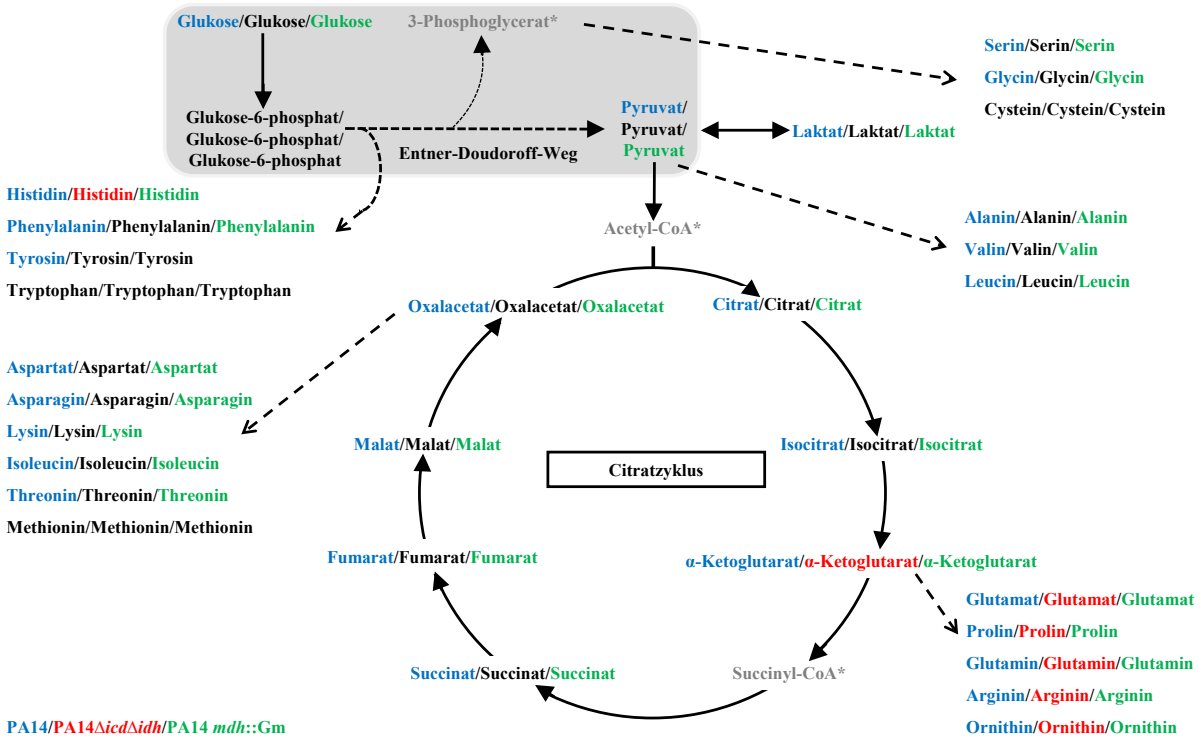


Abbildung 5.20 Verstoffwechselung (Biolog) und Wachstum (C-MM) von Substraten/Aminosäuren bei PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm
In dieser Abbildung sind die Ergebnisse der Biolog- und C-MM-Experimente zusammengefasst. Es wurden alle Substrate/Aminosäuren farbig markiert, sofern die Biolog-Werte $OD_{595} \geq 0{,}4$ und/oder eine Vermehrung bei den C-MM-Experimenten zu verzeichnen war. Dabei ist zu erkennen, dass PA14 fast alle getesteten Substrate verstoffwechseln und auf diesen wachsen kann (Blau); vergleichbar dazu verhält sich die Mdh-Mutante nahezu identisch (Grün). Dagegen kann die IDH-Doppelmutante nur bestimmte Substrate verstoffwechseln bzw. auf ihnen wachsen (Rot). Biolog-Wert $OD_{595} < 0{,}4$ und/oder kein Wachstum (Schwarz); Quelle weder bei Biolog- noch bei C-MM-Experimenten getestet (Grau).

5.4.4 Bestimmung des Kohlenstoffflusses von PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh* mittels *Isotopologue Profiling*

Zur weiteren Charakterisierung der IDH-Doppelmutante wurde in dieser Arbeit das sog. „*Isotopologue Profiling*“ unter Einsatz einer in modifiziertem ASM (enthält keine Eigelb-Fette) enthaltenen ^{13}C-Lipidmischung (vollmarkiertes Algenlipid) durchgeführt. Anhand des Einbaus von ^{13}C-markiertem Kohlenstoff in Bausteine und Metabolite können dann der Kohlenstofffluss bzw. Biosynthesewege beispielsweise von Bakterien analysiert werden (Eisenreich *et al.*, 2010;Eylert *et al.*, 2010;Härtel *et al.*, 2012;Tang *et al.*, 2012). Die dabei neu entstehenden Stoffwechselprodukte werden durch Zelllyse

freigesetzt und mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) und/oder *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie analysiert. Häufig werden für solche Analysen Aminosäuren aus Proteinhydrolysaten herangezogen, wie auch in dieser Arbeit. Bei hoher Empfindlichkeit kann mit GC/MS die Gesamtanreicherung und das Verhältnis von Isotopomeren (Moleküle mit gleicher Anzahl an Isotopen, jedoch an verschiedenen Stellen im Molekül lokalisiert) bestimmt werden. Dagegen kann mit der NMR-Spektroskopie positionsgenau die Verteilung und die Zusammensetzung von Isotopen z. B. in Aminosäuren gemessen werden (Zamboni *et al.*, 2009;Eisenreich *et al.*, 2010). Mit dem Wissen über den differentiellen Einbau der Isotope in Metabolite (z. B. Aminosäuren), kann letztendlich auf relative Kohlenstoffflüsse in den zentralen Stoffwechselwegen (u. a. Glykolyse, Glukoneogenese, Pentosephosphatweg und Citratzyklus) zurückgeschlossen werden.

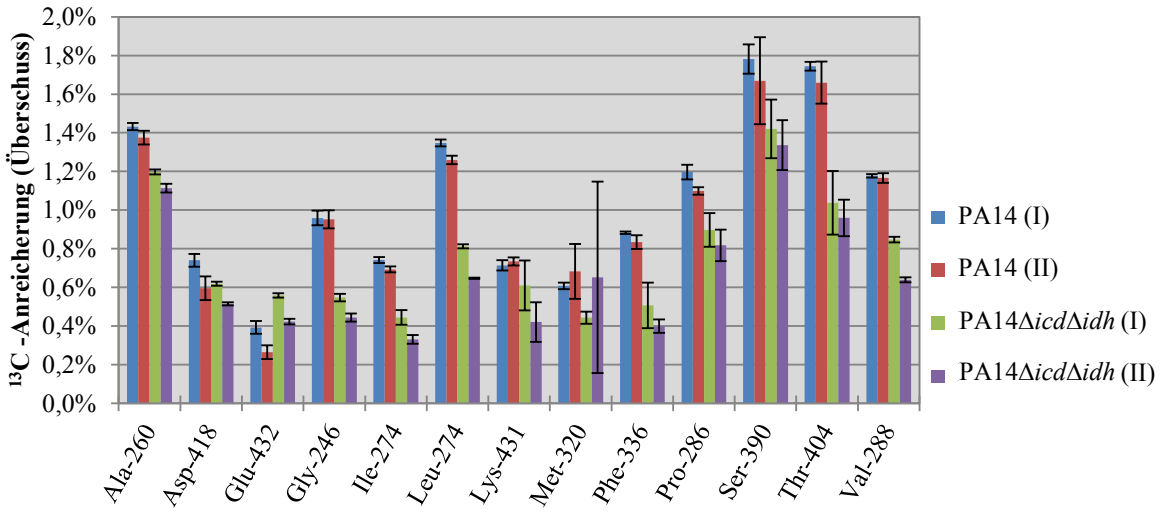


Abbildung 5.21 Absolute ^{13}C-Anreicherung von Aminosäuren bei PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh*
Dargestellt ist im Doppelansatz (I + II) die absolute ^{13}C-Anreicherung von verschiedenen Aminosäuren des Stammes PA14 und der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*. Durch die Zugabe und den anschließenden Abbau (ß-Oxidation) des vollmarkierten Algenlipids verteilt sich das Isotop über die verschiedenen Stoffwechselwege in der Zelle. Jede Probe wurde dreimal gemessen.

Mit Hilfe des „*Isotopologue Profilings*“ und des GC/MS wurden die Stämme PA14 und IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* zunächst untersucht und miteinander verglichen. Dafür wurden die *Pseudomonas*-Stämme in modifiziertem ASM angezogen und bei einer OD von ca. 3 geerntet. Anstelle des Eigelbs als Lipidquelle wurde dem Medium jedoch ^{13}C-vollmarkiertes Algenlipid zugegeben. Die absolute ^{13}C-Anreicherung bei verschiedenen Aminosäuren ist in Abbildung 5.21 dargestellt, wobei deutliche Unterschiede z. B. beim Glycin, Leucin oder Threonin gemessen wurden. Andere Aminosäuren (Tyr, His, Met) waren aufgrund einer geringen Intensität nicht zu detektieren, da sie schlecht derivatisierbar sind. Des Weiteren werden Tryptophan und Cystein durch die saure Hydrolyse bei der Durchführung der Methode zerstört. Die Aminosäuren Asparagin und Glutamin werden wiederum schnell zu Aspartat und Glutamat derivatisiert. In der Regel sind Anreicherungen unter 0,5 % nur bedingt aussagekräftig, da sie im Fehlerbereich der Messung/des Messgerätes liegen (schriftliche Mitteilung E. Kutzner). Insgesamt zeigten die Proben beider Stämme eine hohe Anzahl an

vollmarkierten Aminosäuren, was jedoch unüblich für diese Methode ist. Des Weiteren ist markiertes Glutamat bei beiden Stämmen nur gering angereichert, das normalerweise die Aminosäure mit der höchsten Anreicherung darstellt. Aufgrund dieser unklaren Ergebniskonstellation bzw. Widerspruchs zu Ergebnissen von A. Eichner (Eichner, 2012) wurden die Daten nicht weiter ausgewertet. Wahrscheinlich wären mit der NMR-Spektroskopie auswertbare Resultate mit den bereits hergestellten Proben möglich. Es wurde jedoch beschlossen das Experiment zu wiederholen, was jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde.

5.4.5 Transkriptomanalysen von PA14 und Isocitratdehydrogenase-Mutanten

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung der Icd in PA14 (PA14 *icd*::Tn) bzw. der Idh (PA14 *idh*::Tn) zu einer Verminderung der IDH-Enzym-Aktivität führte. Obwohl bei den Wachstumsversuchen kein Wachstumsdefekt bei den IDH-Einzelmutanten zu erkennen war, ist es denkbar, dass eine Inaktivierung entweder der *icd* oder der *idh* andere Folgen auf den Stoffwechsel bzw. die Physiologie von *P. aeruginosa* hat. Bisher ist über die spezifische Funktion bzw. über die Regulation der Isoenzyme in *P. aeruginosa* wenig bekannt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen Unterschiede in der Enzym-Aktivität und in Abhängigkeit der Dichte von Icd und Idh im Verlauf des Wachstums zu verzeichnen waren (Eichner, 2012). In dieser Arbeit sollte mit Transkriptomanalysen geklärt werden, ob nach Inaktivierung eines der beiden Isoenzymgene Unterschiede in der Gentranskription feststellbar sind bzw. welche Folgen die Inaktivierung der IDH-Aktivität in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* hat. Wie ebenfalls die vorherigen Versuche zeigten, hatte eine Inaktivierung der beiden Isocitratdehydrogenasen Icd bzw. Idh und somit eine Blockade des Citratzyklus weitreichende Folgen auf den gesamten Stoffwechsel in *P. aeruginosa*. Es ist zu erwarten, dass allein die Unterbrechung des Citratzyklus, von dem viele Biosynthesewege z. B. für Aminosäuren abgehen, zu externen Veränderungen der Genexpressionen führen. Diesbezüglich wurden Transkriptomanalysen anhand des Ausgangsstammes PA14, der beiden IDH-Einzelmutanten und der IDH-Doppelmutante durchgeführt, um weitere Daten über fehlende oder vorhandene Stoffwechselwege sowie über die Regulation metabolischer, aber auch anderer Genfunktionen zu erlangen.

Die Transkriptomanalysen wurden mit für *P. aeruginosa* spezifischen Genchips (Affymetrix, USA) durchgeführt, wobei die Stämme PA14 und IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* aber auch PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn miteinander verglichen wurden. Die Stämme wurden bei 37 °C in LB-Medium unter aeroben Bedingungen angezogen und in der exponentiellen Phase geerntet. Sie wurden dabei keinem Stress z. B. durch Antibiotika ausgesetzt. Das Transkriptom für PA14 *mdh*::Gm wurde aufgrund hoher Standardabweichungen bei den Replikaten nicht ausgewertet.

Bei nachfolgender Auswertung der Transkriptomdaten wurden ausschließlich Gene berücksichtigt, die mindestens eine 2-fache stärkere (↑) bzw. schwächere (↓) Genexpression zum jeweiligen

Vergleichsstamm aufwiesen und dabei gleichzeitig einen Signifikanzwert von p-Wert ≤ 0,05 besaßen. Die in ihrer Expression signifikant veränderten Gene wurden in funktionelle Gruppen (entsprechend *PseudoCAP Function Class,* (Winsor *et al.*, 2011)) zusammengefasst.

5.4.5.1 Transkriptomanalysenvergleich zwischen PA14 *icd*::Tn und PA14

Insgesamt zeigten 111 Gene eine signifikant veränderte Genexpression in PA14 *icd*::Tn als im PA14 auf, wobei 30 Gene stärker exprimiert und 81 schwächer exprimiert waren. Die stärker exprimierten Gene verteilen sich über alle Funktionsbereiche, während bei den schwächer exprimierten Genen die meisten Gene auf die funktionellen Gruppen „Transport für kleinere Moleküle“ (n = 31), „Hypothetische Gene“ (n = 13) und „Kohlenstoff-Katabolismus“ (n = 10) entfallen. Dies deutet auf Funktionsverluste v. a. in Stoffwechselwegen bzw. bei Aufnahme- und Transportsystemen hin. In Tabelle 5.1 sind nur Gene aufgelistet, die eine ≥ 10-fache veränderte Genexpression zeigten, da hier nicht auf alle 111 veränderten Gene im Einzelnen eingegangen werden kann. Die vollständigen Transkriptomdaten sind im Anhang (8.2) aufgeführt.

Tabelle 5.1 Vergleich der Transkriptome von PA14 *icd*::Tn und PA14
In dieser Tabelle sind alle Gene aufgelistet, die eine ≥ 10-fache veränderte Genexpression bei PA14 *icd*::Tn im Vergleich zu PA14 in den Transkriptomanalysen aufweisen.

Lokus *Tag*	Genname	Synonym	Produkt	-fach	just. p-Wert
Antibiotika-Resistenz und Empfindlichkeit					
PA4599 (PA14_60850)	*mexC*		*Resistance-Nodulation-Cell Division* (RND) multidrug Efflux-Membranfusionsprotein MexC-Vorläufer	14,81↑	0,0068
Kohlenstoff-Katabolismus					
PA2776 (PA14_28180)	*pauB3*	*ordL*	FAD-abhängige Oxidoreduktase	11,76↑	0,0033
Kohlenstoff-Katabolismus					
PA0795 (PA14_53950)	*prpC*		Citrat Synthase 2	11,78↓	0,0148
DNA Replikation, Rekombination, Modifikation und Reparatur					
PA5348 (PA14_70600)			mögliches DNA-Binde Protein	12,16↓	0,0459
Membranproteine					
PA3235 (PA14_22340)	*yjcH*		konserviertes hypothetisches Protein	35,37↓	0,0231
Transport von kleinen Molekülen					
PA3038 (PA14_24790)	*opdQ*		möglicher Porin	17,28↓	0,0148
PA3187 (PA14_23010)		*gltK*	mögliche ATP-Bindekomponente eines ABC-Transporters	14,80↓	<0,0001
PA3188 (PA14_23000)		*gltG*	mögliche Permease eines ABC-Zucker-Transporters	45,19↓	<0,0001
PA3189 (PA14_22990)		*gltF*	mögliche Permease eines ABC-Zucker-Transporters	17,71↓	<0,0001
PA3234 (PA14_22350)		*yjcG*	möglicher Natrium-Symporter	26,14↓	0,0225
PA5154 (PA14_68080)			mögliche Permease eines ABC-Zucker-Transporters	15,39↓	0,0148

Bei diesem Vergleich fällt auf, dass für das gesamte Operon PA3186 - PA3189 eine verminderte Genexpression gemessen wurde, wobei *gltG* mit 45,19-facher Verminderung insgesamt den höchsten Wert aufweist. Das Gen *oprB* (PA3186) aus dem *opr*-Operon wurde nicht in der Tabelle aufgelistet, da der Wert mit 8,04↓ unter der 10-fach Grenze liegt. OprB dient bei *P. aeruginosa* als Substrat-selektives Porin für eine Vielzahl von Zuckermolekülen, wie Glukose aber auch Mannitol, Glycerin und Fruktose (Wylie and Worobec, 1995). Dabei scheinen PA3187 - PA3189 die dazu gehörigen Komponenten des Zuckertransporters zu sein. Bei einem weiteren möglichen Porin *opdQ* (17,28↓) oder Transporter PA5154 (15,39↓) wurde ebenfalls eine verminderte Genexpression gemessen. Ein weiteres in seiner Genexpression reduziertes Operon PA3234 - PA3235 (26,14↓ bzw. 35,37↓) kodiert für ein weiteres Transportsystem.

Eine geringere Expression der Citrat-Synthase 2 (11,78↓) von insgesamt zwei Citrat-Synthasen in *P. aeruginosa* lässt vermuten, dass entweder der Citratzyklus nicht mehr im vollen Umfang benötigt wird oder die zweite Synthase GltA (*gltA*) die Funktion übernimmt. Aufgrund eines ungenügenden p-Wertes kann jedoch keine Aussage über *glt*A getroffen werden.

Die Gene *mexC* (14,81↑) und *pauB3* (11,76↑) zählen zu den wenigen Genen, die unter den gesetzten Auswertekriterien in der IDH-Einzelmutante PA14 *icd*::Tn stark erhöht sind. Während *mexC* ein Bestandteil des Efflux-Operons *mexC-mexD-oprJ* ist, kodiert *pauB3* für eine FAD-abhängige Oxidoreduktase (Winsor *et al.*, 2011).

Wie zu erwarten war, scheint PA14 *icd*::Tn insgesamt Regulationsdefekte zu besitzen, die wichtig für den C-Katabolismus, als auch für die Aufnahme und den Transport von Substraten bzw. Moleküle sind.

5.4.5.2 Transkriptomanalysenvergleich zwischen PA14 *idh*::Tn und PA14

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich beide IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn in ihrer metabolischen Funktion zumindest weitgehend komplementieren können. Es ist daher verwunderlich, dass bei PA14 *idh*::Tn verglichen mit PA14 nur 50 Gene eine signifikant veränderte Genexpression aufzeigen, während es bei PA14 *icd*::Tn über 100 Gene sind. Eine Ursache für die kleinere Anzahl an veränderten Genen bei PA14 *idh*::Gm könnte auf die p-Werte (> 0,05) zurückzuführen sein. Bei Nichtbeachtung des p-Wertes würde sich zu mindestens die Anzahl der veränderten Gene verglichen mit PA14 bei PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn auf 246 zu 230 belaufen. Von den insgesamt identifizierten 50 Genen bei PA14 *idh*::Tn, weisen 16 Gene gegenüber PA14 ein stärkere Genexpression auf und verteilen sich außerdem gleichmäßig über alle Funktionsbereiche. Bei den 34 schwächer exprimierten Genen entfällt die größte Anzahl (n = 14) auf die funktionelle Gruppe „Transport für kleinere Moleküle“. Auch bei der IDH-Einzelmutante PA14 *idh*::Tn kann also ebenfalls von Funktionsverlusten in einigen Stoffwechselwegen bzw. in Aufnahme- und Transportsystemen ausgegangen werden. Wie zuvor sind in Tabelle 5.2 nur Gene mit einer

≥ 10-fach veränderten Genexpression aufgelistet. Die vollständigen Transkriptomdaten sind im Anhang (8.2) aufgeführt.

Sowohl *pauB3*, als auch das Operon PA3186 - PA3189 zeigten bei PA14 *idh*::Tn, wie aber auch schon bei PA14 *icd*::Tn, eine signifikante Veränderung ihren Genexpressionen. Auch bei PA14 *idh*::Tn lag PA3186 mit 7,55↓ knapp unter der 10-fach Grenze. Bemerkenswerterweise korrelieren dabei meistens sogar die Werte und Verteilungen der verschiedenen Expressionen. Gene, wie *gabT2* (10,54↑), *yvgX* (11,32↑) und *lldP* (21,85↑), die jedoch nicht bei PA14 *icd*::Tn aufgelistet wurden oder auch umgekehrt, zeigten trotzdem ein ähnliches Expressionsverhalten. Dies liegt daran, dass sie entweder unter der in diesem Abschnitt gesetzten 10-fach Grenze liegen oder einen p-Wert > 0,05 aufweisen. Obwohl es sich bei der zur stationären Phase hin stärker exprimierten Icd um ein Dimer und bei der konstitutiv exprimierten Idh um ein Monomer handelt (Eichner, 2012), deutet vieles darauf hin, dass beide Isoenzyme sich insgesamt in ihrer Funktion kaum unterscheiden. Wie bereits bei PA14 *icd*::Tn zu sehen war, besitzt auch PA14 *idh*::Tn hauptsächlich Gendefekte, die wichtig für den C-Katabolismus, als auch für die Aufnahme und den Transport von Substraten bzw. Moleküle sind.

Tabelle 5.2 Vergleich der Transkriptome von PA14 *idh*::Tn und PA14
In dieser Tabelle sind alle Gene aufgelistet, die eine ≥ 10-fache veränderte Genexpression bei PA14 *idh*::Tn verglichen zu PA14 in den Transkriptomanalysen aufwiesen.

Lokus *Tag*	Genname	Synonym	Produkt	-fach	just. p Wert
Kohlenstoff-Katabolismus					
PA2776 (PA14_28180)	*pauB3*	*ordL*	FAD-abhängige Oxidoreduktase (Klasse 2)	14,81↑	0,0049
PA5313 (PA14_70160)	*gabT2*	*paaT*	Transaminase	10,54↑	0,0208
Transport von kleinen Molekülen					
PA3920 (PA14_13170)		*yvgX*	mögliche Metall-transportierende P-Typ ATPase	11,32↑	0,0009
PA4770 (PA14_63080)	*lldP*	*lctP*	L-Laktat Permease	21,85↑	0,0200
Transport von kleinen Molekülen					
PA3187 (PA14_23010)		*gltK*	mögliche ATP-Bindekomponente eines ABC-Transporters	15,56↓	<0,0001
PA3188 (PA14_23000)		*gltG*	mögliche Permease eines ABC-Zucker-Transporters	41,05↓	<0,0001
PA3189 (PA14_22990)		*gltF*	mögliche Permease eines ABC-Zucker-Transporters	16,65↓	<0,0001
PA3190 (PA14_22980)		*gltB*	mögliches Bindeproteinkomponente eines ABC-Zucker-Transporters	12,00↓	<0,0001

5.4.5.3 Transkriptomanalysenvergleich zwischen PA14 *idh*::Tn und PA14 *icd*::Tn

Um Unterschiede zwischen PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn zu erhalten, wurden beide Stämme untereinander verglichen. Bei den oben beschriebenen Standards wurden lediglich zwei veränderte Gene bei PA14 *idh*::Tn gefunden. Zu einem war das Gen *pchE* 2,16-fach stärker (Pyochelin-Biosynthese) und das Gen *trpB* 4,47-fach schwächer (Tryptophan-Synthese) in PA14 *idh*::Tn

exprimiert als bei PA14 *icd*::Tn (Tabelle 5.3). Diese geringe Anzahl an gefundenen Genen weist insbesonders darauf hin, dass sich beide Isoenzyme in ihren Funktionen und ihren Regulationen kaum unterscheiden.

Tabelle 5.3 Vergleich der Transkriptome von PA14 *idh*::Tn und PA14 *icd*::Tn
Bei einem Vergleich beider Isoenzyme waren nur zwei Gene in ihrer Expression in PA14 *idh*::Tn verändert verglichen mit PA14 *icd*::Tn.

Lokus *Tag*	Genname	Synonym	Produkt	-fach	just. p-Wert
Transport von kleinen Molekülen					
PA4226 (PA14_09270)	*pchE*		Dihydroaeruginonsäure-Synthetase	2,16↑	<0,0001
Aminosäurenbiosynthese und Metabolismus					
PA0036 (PA14_00450)	*trpB*		Tryptophan-Synthase Beta-Kette	4,47↓	<0,0001

5.4.5.4 Transkriptomanalysenvergleich zwischen PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, unterscheiden sich beide IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn in ihren Transkripten kaum voneinander. Ein weitaus größerer Effekt war jedoch bei dem Vergleich der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit PA14 zu erwarten, wenn beide Isoenzyme inaktiviert sind. Gene, die bereits beim Vergleich zwischen PA14 *icd*::Tn bzw. PA14 *idh*::Tn und PA14 in ihrer Genexpression verändert waren, sind in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* höchstwahrscheinlich auf den Verlust der Enzym-Aktivität der Isocitratdehydrogenase zurückzuführen. Die übrigen Gentranskripte weisen vermutlich Veränderungen aufgrund der Unterbrechung des Citratzyklus auf. Insgesamt wurden bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* 447 Gene stärker oder schwächer transkribiert (Abbildung 5.22). Die vollständigen Transkriptomdaten sind im Anhang (8.2) aufgeführt. Von insgesamt 85 stärker und 362 schwächer exprimierten Genen finden sich die meisten in den funktionellen Gruppen der „Aminosäurenbiosynthese und Stoffwechsel“ (n = 25), „Kohlenstoff-Katabolismus“ (n = 18), „Hypothetische, unklassizifierte, unbekannte Proteine“ (n = 88), „Putative Enzyme“ (n = 16), „Transkriptionale Regulatoren“ (n = 27) sowie „Transport von kleinen Molekülen“ (n = 66) wieder. Aufgrund der Inaktivierung der Isocitratdehydrogenasen, gefolgt von der Unterbrechung des Citratzyklus und den damit verbundenen Schäden für nachgeschaltete Stoffwechselfunktionen, war zu vermuten, dass weitaus mehr Gene schwächer exprimiert sind.

Neben zwei hypothetischen Genen PA0630 (12,66↑) und PA2433 (11,34↑) konnte nur für *cupA1* (27,39↑) und *ycaC* (17,56↑) eine stärkere Genexpression in der IDH-Doppelmutante verzeichnet werden (Tabelle 5.4). *cupA1*, welches ein Gen eines aus fünf Genen bestehendes Operon ist, scheint bei der Biofilm-Bildung involviert zu sein (Vallet *et al.*, 2001), wohingegen *ycaC* vermutlich für eine Hydrolase mit unbekannter Funktion kodiert (Colovos *et al.*, 1998).

Alle übrigen 10-fach veränderten Expressionen sind in der IDH-Doppelmutante vermindert. Ungefähr ein Drittel aller verminderten in Tabelle 5.4 aufgelisteten Gene fallen auf die funktionelle Gruppe „Transport von kleinen Molekülen“. Wie schon zuvor bei den IDH-Einzelmutanten beobachtet, kann ebenfalls eine schwächere Expression bei der IDH-Doppelmutante für das gesamte Operon PA3186 - PA3189 beobachtet werden. Dabei liegen die Transkriptionswerte der IDH-Doppelmutante im Rahmen der Werte beider IDH-Einzelmutanten und sind nicht addiert. Wie schon bei PA14 *icd*::Tn ist *yicG* (PA3234) schwächer exprimiert (24,26↓). Abgesehen von der Gruppe der Transportergene zeigt ein weiteres Operon bzw. Gencluster *pqsABCDE* und *pqsH* sowie *phnA* eine geringere Genexpression. Diese Gene spielen eine entscheidende Rolle in der PQS-Biosynthese (*Pseudomonas* Quinolon Signal) und nachgeschalteten Signalübertragung. Basierend auf der Verwendung von 2-Heptyl-3-hydroxy-4-Quinolon stellt das PQS-System neben dem *las* und dem *rhl*-System ein drittes QS-Signalsystem in *P. aeruginosa* dar (Gallagher *et al.*, 2002).

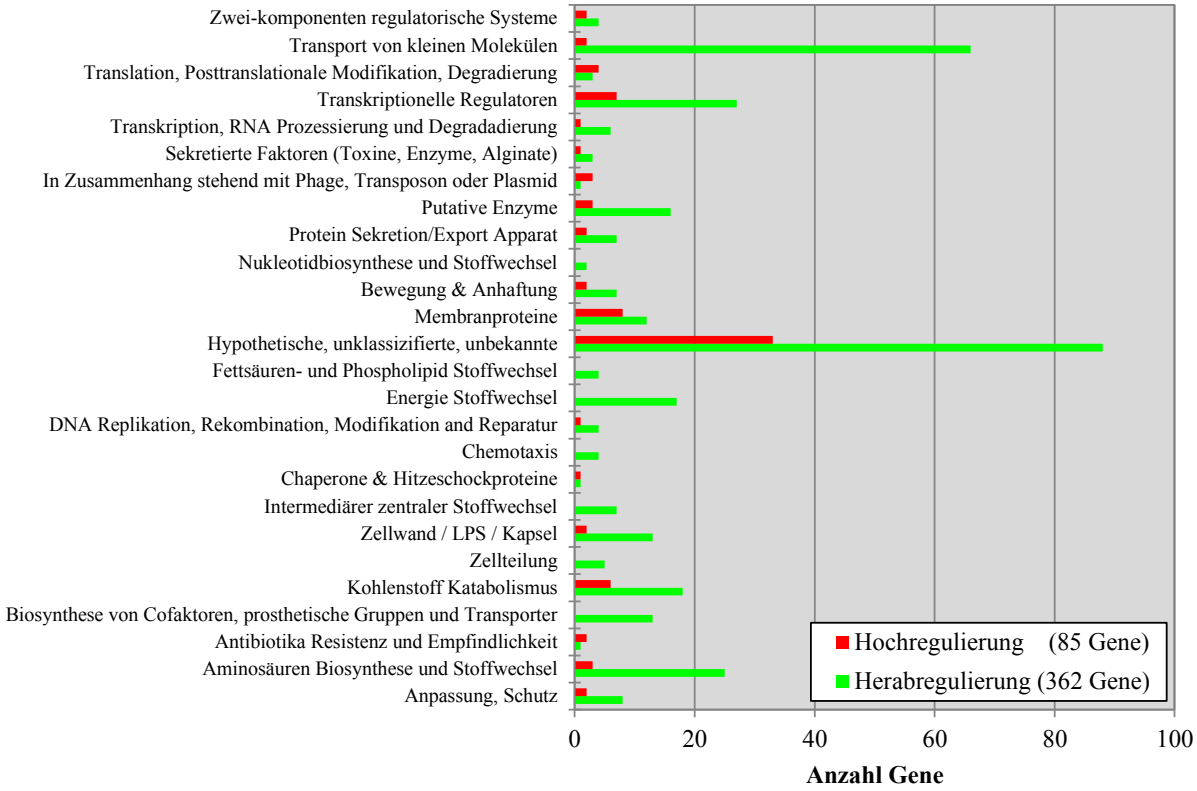


Abbildung 5.22 Differentielle Transkriptomswerte aus dem Vergleich von PA14Δ*icd*Δ*idh* mit PA14
Insgesamt waren 447 Gene in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* im Vergleich zu PA14 in der Genexpression verändert, wobei der größte Teil der Transkripte erniedrigt war. Die größten beeinflussten Gengruppen (*PseudoCAP*) waren „Aminosäurenbiosynthese und Stoffwechsel“ (n = 25), „Kohlenstoff-Katabolismus“ (n = 18), „Hypothetische, unklassizifierte, unbekannte Proteine“ (n = 88), „Putative Enzyme“ (n = 16), „Transkriptionale Regulatoren“ (n = 27) sowie „Transport von kleineren Molekülen“ (n = 66).

Ein weiteres Operon bestehend aus *maiA*, *fahA* und *hmgA* ist involviert beim Abbau der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, wobei das Zwischenprodukt durch die drei Gene zu Fumarat und dann Acetoacetat umgewandelt wird (Tabelle 5.4). Des Weiteren führt eine Unterbrechung im *hmgA*-Gen zu einer Überproduktion des braunen Farbpigmentes Pyomelanin (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2009).

Neben vier weiteren hypothetischen Genen (PA0979, PA3235, PA3904 und PA5509) wurde eine deutliche Genexpressionsverminderung für *acsA* (20,04↓) gemessen. Das Produkt AcsA fungiert in einem von zwei verschiedenen Wegen zur Bildung von Acetyl-CoA aus Acetat über das Zwischenprodukt Acetyl-AMP (Kretzschmar *et al.*, 2001).

Der höchste Expressionswert mit 101,95↓ war interessanterweise bei dem Gen *rsaL* zu verzeichnen, welches als negativer Regulator im QS-System fungiert. Das Schlüssel QS-Molekül N-3-oxo-dodecanoyl-Homoserinlakton ($3OC_{12}$-HSL), welches durch LasI (*lasI*) gebildet wird sowie der Transkriptionsregulator LasR (*lasR*), gehören zu den Hauptbestandteilen des QS in *P. aeruginosa*. Durch den Komplex LasR-$3OC_{12}$-HSL werden hunderte von Genen reguliert, einschließlich *lasI*, die in der Regel in ihrer Expression gesteigert werden. Der negative Regulator RsaL inhibiert dagegen die Bildung von LasI sowie die eigene Synthese (de Kievit *et al.*, 1999;Rampioni *et al.*, 2007;Rampioni *et al.*, 2009;Venturi *et al.*, 2011). Eine derart starke Expressionsverminderung im Transkriptom hat demnach zwangsläufig weitreichende Auswirkungen auf eine Vielzahl von Genen in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*.

Tabelle 5.4 Vergleich der Transkriptome von PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14
In dieser Tabelle sind alle Gene aufgelistet, die eine ≥ 10-fache veränderte Genexpression bei PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen mit PA14 in den Transkriptomanalysen aufweisen. Von allen aufgelisteten Genen zeigten bei der IDH-Doppelmutante im Gegensatz zu PA14 nur vier eine erhöhte Genexpression auf.

Lokus *Tag*	Genname	Synonym	Produkt	-fach	just. p-Wert
Hypothetische, unklassizifierte, unbekannte					
PA2433 (PA14_33160)			Hypothetisches Protein	11,34↑	0,0001
Bewegung und Anheftung					
PA2128 (PA14_37060)	*cupA1*		fimbriale Untereinheit CupA1	27,39↑	0,0345
Putatives Enzym					
PA1202 (PA14_48760)		*ycaC*	mögliche Hydrolase	17,56↑	0,0488
In Zusammenhang stehend mit Phage, Transposon oder Plasmid					
PA0630 (PA14_08180)			Hypothetisches Protein	12,66↑	0,0488
Adaptation und Schutz					
PA1001 (PA14_51360)	*phnA*		Anthranilat Synthase Komponente I	10,91↓	0,0189
Aminosäurenbiosynthese und Metabolismus					
PA0865 (PA14_53070)	*Hpd*		4-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase	27,31↓	0,0278
PA2247 (PA14_35530)	*bkdA1*		2-Oxoisovaleratdehydrogenase (Alpha-Untereinheit)	25,82↓	0,0231
PA2248 (PA14_35520)	*bkdA2*		2-Oxoisovaleratdehydrogenase (Beta-Untereinheit)	14,14↓	0,0205
Biosynthese von Kofaktoren, prosthetische Gruppen und Transporter					
PA0996 (PA14_51430)	*pqsA*		mögliche Coenzym-A Ligase	12,82↓	0,0035
PA0997 (PA14_51420)	*pqsB*		3-Oxoacyl-(Acyl-Trägerprotein) Synthase III	16,78↓	0,0040
PA0999 (PA14_51390)	*pqsD*		3-Oxoacyl-(Acyl-Trägerprotein) Synthase III	13,26↓	0,01

PA1000 (PA14_51380)	*pqsE*		Quinolon Signalantwort Protein	13,86↓	0,0039
PA2587 (PA14_30630)	*pqsH*		mögliche FAD-abhängige Monooxygenase	12,30↓	0,0029
Kohlenstoff-Katabolismus					
PA2007 (PA14_38550)	*maiA*		Maleylacetoacetatisomerase	13,01↓	0,0207
PA2008 (PA14_38530)	*fahA*		Fumarylacetoacetasehydrolase	22,47↓	0,0111
PA2009 (PA14_38510)	*hmgA*		Homogentisat 1,2-Dioxygenase	28,77↓	0,0027
Intermediärer zentraler Stoffwechsel					
PA0887 (PA14_52800)	*acsA*		Acetyl-Coenzyme A Synthetase	20,04↓	0,0303
PA2193 (PA14_36330)	*hcnA*		Wasserstoffcyanid Synthase HcnA	16,87↓	0,0001
Hypothetische, unklassizifierte, unbekannte					
PA3904 (PA14_13390)			hypothetisches Protein	23,62↓	<0,0001
PA5509 (PA14_72700)			hypothetisches Protein	10,62↓	0,0040
Membranproteine					
PA3235 (PA14_22340)		*yjcH*	konserviertes hypothetisches Protein	16,63↓	0,0212
In Zusammenhang stehend mit Phage, Transposon oder Plasmid					
PA0979 (PA14_51620)			konserviertes hypothetisches Protein	14,98↓	0,0485
Transkriptionale Regulatoren					
PA1431 (PA14_45950)	*rsaL*		regulatorisches Protein RsaL	101,95↓	0,0034
Transport von kleineren Molekülen					
PA0866 (PA14_53050)	*aroP2*		Aromatische Aminosäure-Transportprotein AroP2	13,73↓	0,0181
PA3038 (PA14_24790)		*opdQ*	mögliches Porin	15,96↓	0,0052
PA3186 (PA14_23030)	*oprB*		Glukose/Kohlenhydrat Außenmembran Porin OprB Vorläufer	10,54↓	0,0001
PA3187 (PA14_23010)		*gltK*	mögliche ATP-Bindekomponente eines ABC-Transporters	27,63↓	<0,0001
PA3188 (PA14_23000)		*gltG*	mögliche Permease eines ABC-Zucker-Transporters	47,05↓	<0,0001
PA3189 (PA14_22990)		*gltF*	mögliche Permease eines ABC-Zucker-Transporters	18,09↓	<0,0001
PA3190 (PA14_22980)		*gltB*	mögliches Bindeproteinkomponente eines ABC-Zucker- Transporters	13,38↓	<0,0001
PA3234 (PA14_22350)		*yjcG*	möglicher Natrium-Symporter	24,26↓	0,0071
PA5153 (PA14_68070)			Aminosäuren-ABC-Transporter periplasmatisches Bindeprotein (Lysin/Arginin/Ornithin/Histidin/Oktopin)	18,95↓	0,0033
PA5154 (PA14_68080)			mögliche Permease eines ABC-Transporters	16,97↓	0,0037

5.5 Charakterisierung der Expression von Virulenzfaktoren bei *P. aeruginosa*

Wie die Ergebnisse der Transkriptomanalysen zeigen, ist eine Vielzahl von Genen in der IDH-Doppelmutante im Vergleich zu PA14 in ihrer Genexpression verändert. Allein die veränderte Expression von *rsaL* (101,95↓) muss Auswirkungen auf eine große Anzahl von Genen und somit anderen Faktoren haben.

In einer Studie wurde in *P. aeruginosa* gezeigt, dass die Sensorkinase CbrA nicht nur an der Regulation des Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus beteiligt ist, sondern auch an verschiedenen Virulenzprozesse wie Biofilm-Bildung oder Antibiotika-Resistenz (Yeung *et al.*, 2011). Ebenso konnte in einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Hoboth *et al.*, 2009), dass neben einer Vielzahl metabolischer Faktoren auch zahlreiche Virulenzfaktoren in M25 (Spät-Isolat) verglichen zum M1 (Früh-Isolat) verändert waren. Es ist daher denkbar, dass die IDH-Doppelmutante und die Mdh-Mutante ebenfalls in ihrer Virulenz aufgrund der gesetzten Mutationen beeinflusst sind. Darum sollte nun die IDH-Doppelmutante sowie die Mdh-Mutante bezüglich ihrer Virulenzfaktoren (z. B. Motilität, Biofilm etc.) weiter charakterisiert werden.

5.5.1 Bakterielle Motilität von *P. aeruginosa*

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die Motilität von Gram-negativen Bakterien zur Virulenz von Bakterien beiträgt (Montie *et al.*, 1982;Josenhans and Suerbaum, 2002). Die Motilität ist wiederum eng mit der Chemotaxis verknüpft, da diese dem Bakterium ermöglicht, beispielsweise Nährstoffe zu detektieren, sich zu diesen zu bewegen und anschließend zu nutzen. Über diesen Mechanismus können Bakterien eine nährstoffreiche Nische kolonisieren (Josenhans and Suerbaum, 2002).

Die bekanntesten Bewegungsformen sind das Schwimmen (*Swimming*), das Schwärmen (*Swarming*) und das koordinierte „Zucken“ (*Twitching*). Während das Schwimmen und das Schwärmen von einer rotierenden Organelle (sog. Flagelle) abhängig sind, beruht das *Twitching* auf Aktin-basierte intrazelluläre Vorgänge, die auf Typ IV-Pili übertragen werden (Mattick, 2002).

5.5.1.1 Bestimmung der *Swimming*-Motilität von *P. aeruginosa*

Zwischen PA14 und beiden IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn konnte kein Unterschied im „Schwimmdurchmesser“ (je ca. 6 cm) nach 24 h festgestellt werden (Abbildung 5.23). Die hierfür notwendige Flagellenfunktion scheint durch die Inaktivierung eines der beiden Isoenzyme nicht beeinträchtigt zu sein. Dagegen konnte bei der IDH-Doppelmutante eine deutliche Reduzierung im „Schwimmdurchmesser“ (4,68 cm +/- 0,48) festgestellt werden. Außerdem war es möglich, den Schwimmdefekt der IDH-Doppelmutante mit allen Plasmiden (p*icd*, p*idh* und p*icd*/*idh*) außer dem Kontrollvektor (pBBR1MCS) bis auf Ausgangs-Niveau zu komplementieren. Im Vergleich zu den Isocitratdehydrogenase-Mutanten konnte eine leichte und ebenfalls komplementierbare Beeinträchtigung im Schwimmverhalten bei der Mdh-Mutante PA14*mdh*::Gm (ca. 5,5 cm +/- 0,17) beobachtet werden.

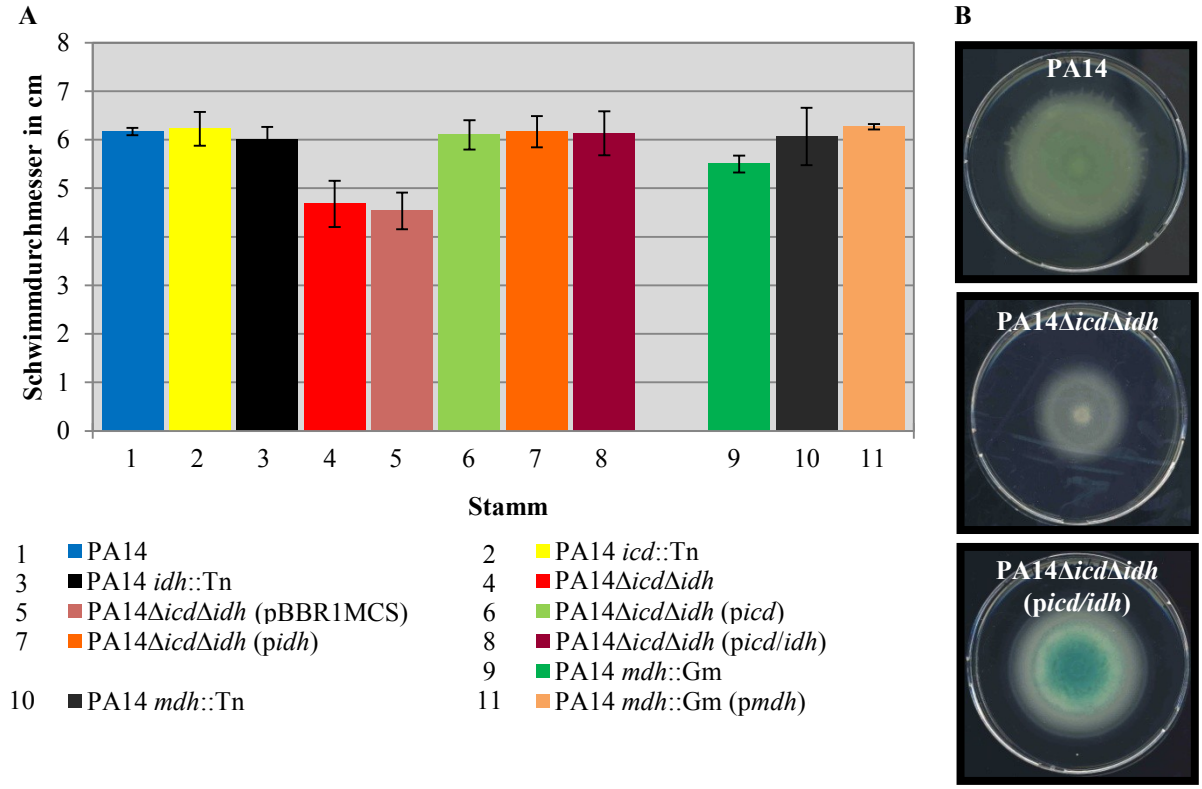


Abbildung 5.23 Bestimmung des Schwimmverhaltens von *P. aeruginosa*
(A) Durch Messung des Schwimmdurchmessers wurde das Schwimmverhalten der getesteten Stämme nach 24 h bestimmt. (B) In dieser Abbildung werden die Motilitätsplatten von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) nach 24 h Bebrütung gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Wert ≤ 0,001; PA14 zur Mdh-Mutante p-Wert ≤ 0,001)

5.5.1.2 Bestimmung der *Twitching*-Motilität von *P. aeruginosa*

Im Vergleich zu PA14, PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn zeigte die IDH-Doppelmutante bei der *Twitching*-Motilität wieder einen negativen Defekt in ihrer Motilität (Abbildung 5.24). Eine Komplementation konnte erfolgreich mit den Plasmiden (p*icd*, p*idh* und p*icd*/*idh*) durchgeführt

werden, wobei bei einer Überexpression mit *idh* das Ausgangs-Niveau erreicht wurde. Bei den anderen beiden komplementierten Stämmen wurde ein noch größerer *Twitching*-Motilitätsdurchmesser nach 72 h gemessen, wobei der größte Effekt bei der Komplementation mit p*icd*/*idh* (6,03 cm +/- 0,21) feststellbar war. Die Malatdehydrogenase-Mutanten PA14 *mdh*::Gm und PA14 *mdh*::Tn zeigten keinen Unterschied zu PA14.

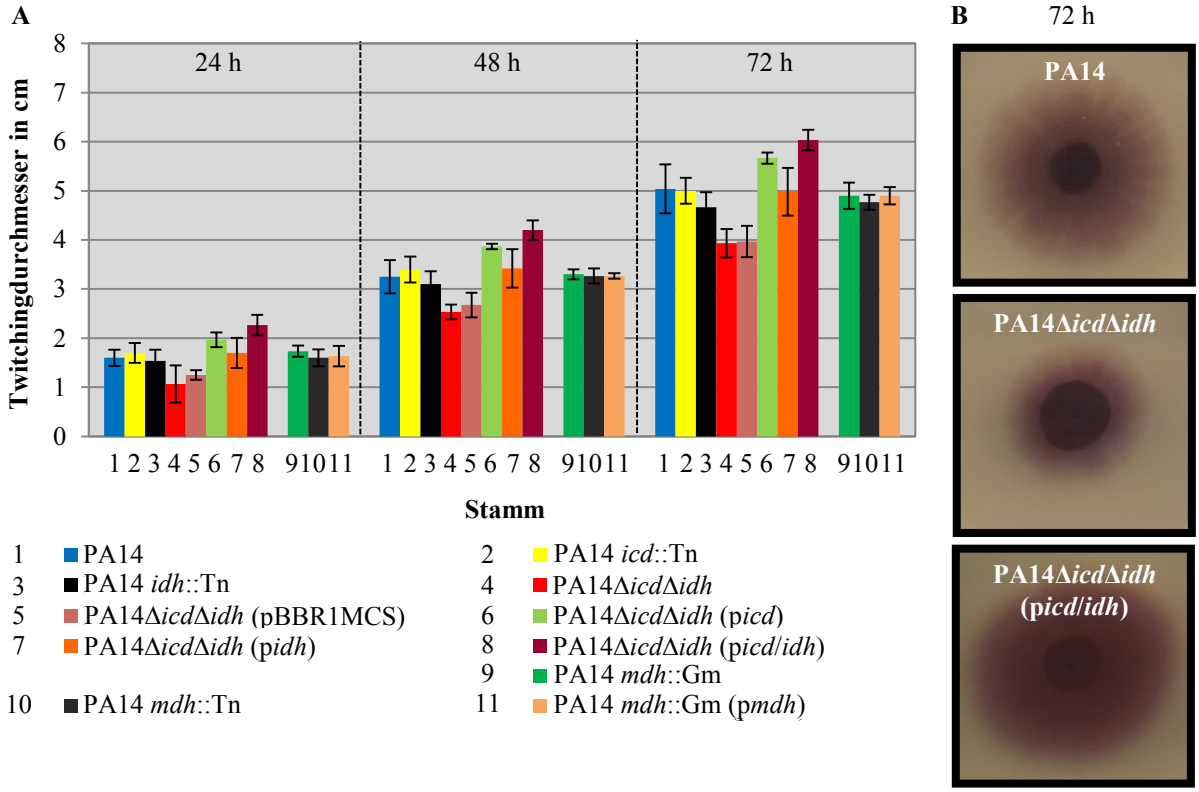


Abbildung 5.24 Bestimmung des *Twitching*-Verhaltens (Zonen) von *P. aeruginosa*
(A) Die Abbildung zeigt die *Twitching*-Zonen der getesteten Stämme nach 24 h, 48 h und 72 h, wobei die eindeutigsten Unterschiede nach 72 h zu erkennen sind. (B) Die Abbildung zeigt das *Twitching* von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) nach 72 h Inkubation. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Werte ≤ 0,05 (24 h), ≤ 0,05 (48 h), ≤ 0,05 (72 h))

5.5.1.3 Bestimmung der *Swarming*-Motilität von *P. aeruginosa*

Von allen drei getesteten Bewegungsformen zeigte die IDH-Doppelmutante den ausgeprägtesten Defekt beim Schwärmen (organisierte Motilität im Verband) (Abbildung 5.25). Während PA14, beide IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn sowie die Malatdehydrogenase-Mutanten PA14 *mdh*::Gm und PA14 *mdh*::Tn einen Schwärmdurchmesser von ca. 7,5 - 8 cm aufwiesen, betrug dieser bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* lediglich 1,00 +/- 0,17 cm. Unklar ist, warum dieser Defekt nicht ausreichend komplementiert werden konnte. Da bei allen Komplementanten ungefähr vergleichbare Durchmesser gemessen wurden, ist nicht von einem methodischen Problem bzw. Artefakt auszugehen. Da bei allen drei Motilitätsformen Defekte bei der IDH-Doppelmutante vorliegen und diese im Falle von *Swimming* und *Twitching* erfolgreich komplementiert werden

konnten, ist anzunehmen, dass es sich beim *Swarming* um einen komplexeren Defekt bzw. System und/oder eine komplexere Regulation handelt. Ebenso ist denkbar, dass das Expressionsniveau durch die erhöhte Kopienzahl des Komplementationsvektors pBBR1MCS eine Rolle beim *Swarming* spielt. Weitere Komplementationsvektoren wurden in dieser Arbeit nicht mehr getestet.

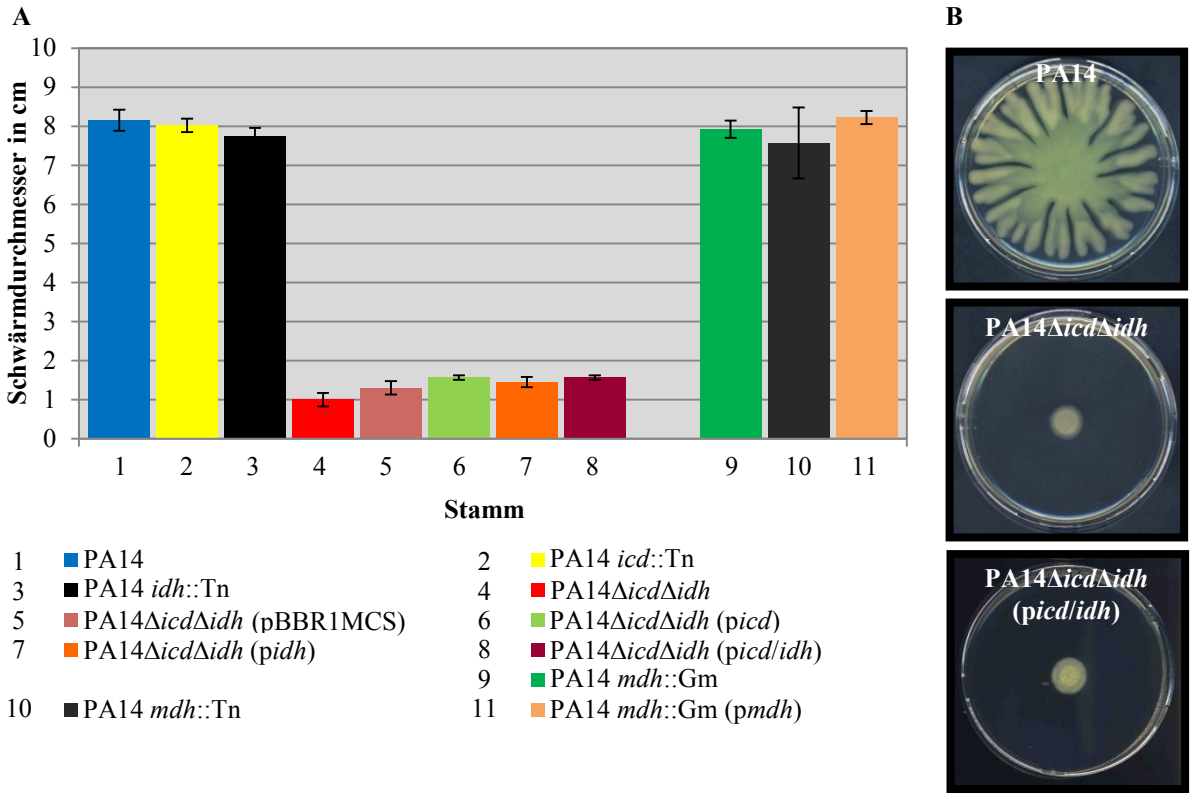


Abbildung 5.25 Bestimmung des Schwärmverhaltens von *P. aeruginosa*
(A) Durch Messung des Durchmessers wurde das Schwärmverhalten der getesteten Stämme nach 24 h bestimmt. (B) Die Abbildung zeigt die Schwärmplatten von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) nach 24 h Bebrütung. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Wert ≤ 0,001)

5.5.2 Bestimmung der relativen Biofilm-Bildung von *P. aeruginosa*

Planktonische und in Exopolysaccharid eingebettete Bakterien bzw. Mikrokolonien sind in der Lage, auf biotischen oder abiotischen Oberflächen sog. Biofilme zu bilden (Pratt and Kolter, 1999). Unter Anderem werden für die Adhäsion und der Mikrokolonie-Bildung Oberflächen-assoziierte-Faktoren wie die Flagelle oder die Typ IV-Pili benötigt (Head and Yu, 2004). Nachdem diese biofilmrelevanten Faktoren zuvor untersucht wurden, lag das Augenmerk nun auf der Biofilm-Bildung unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Wiederholt konnte jedoch im Vergleich bei allen getesteten Stämmen unter aeroben Bedingungen kein signifikanter Unterschied in der relativen Biofilm-Bildung in LB-Medium festgestellt werden (Abbildung 5.26). Es konnte gezeigt werden, dass PA14Δ*icd*Δ*idh* ungefähr noch in demselben Ausmaße Biofilm bildet wie PA14.

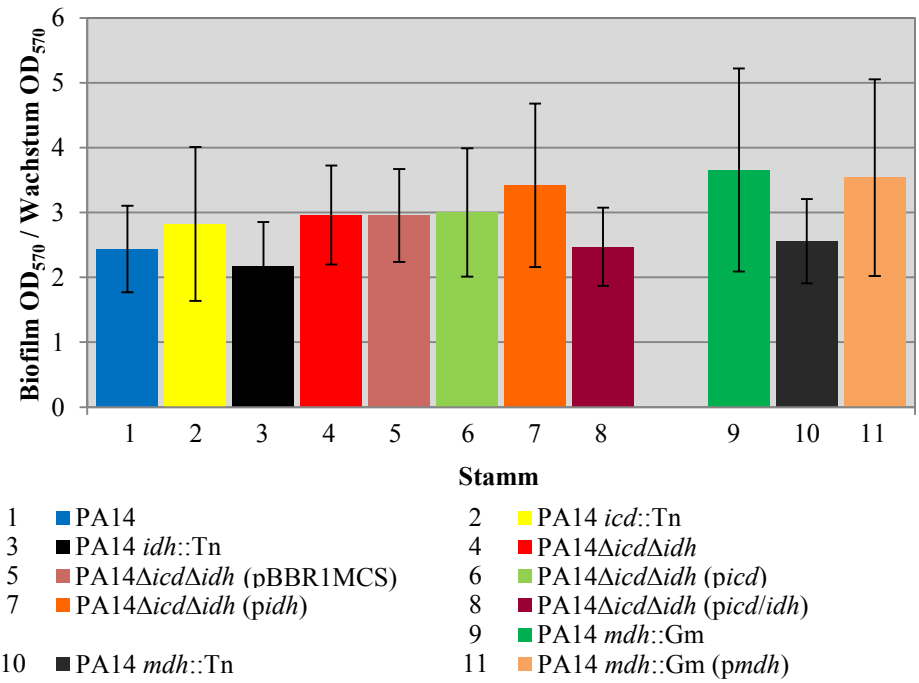


Abbildung 5.26 Bestimmung der relativen Biofilm-Bildung unter aeroben Bedingungen
Bei den getesteten Stämmen wurde die relative Biofilm-Bildung in LB-Medium nach 24 h bestimmt. Die Anfälligkeiten der Methode sind bekannt, insbesondere beim Waschen, und erklären die relativ großen Standardabweichungen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

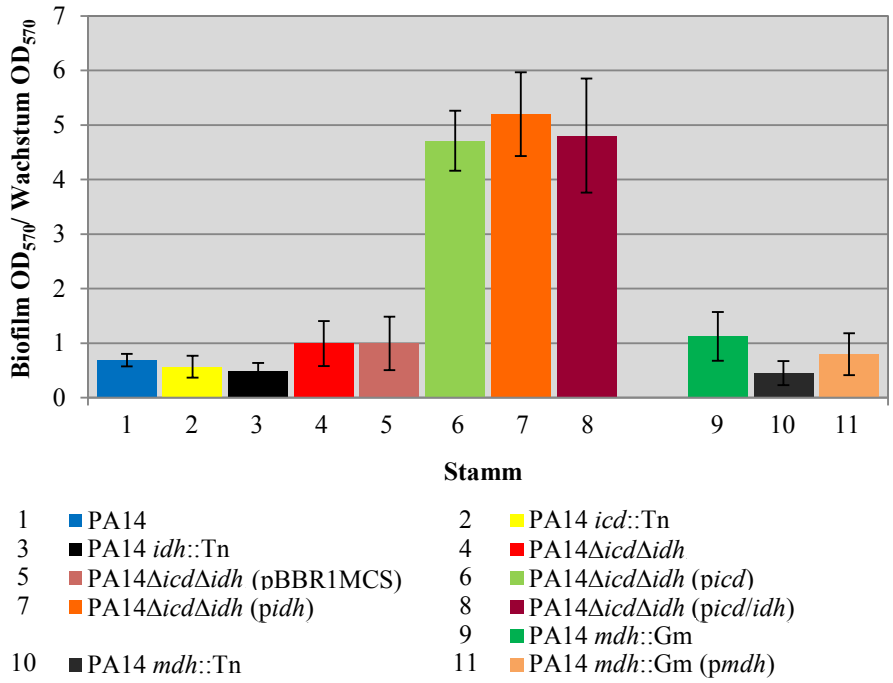


Abbildung 5.27 Bestimmung der relativen Biofilm-Bildung unter anaeroben Bedingungen
Die relative Biofilm-Bildung in LB-Medium unter anaeroben Bedingungen wurde für die getesteten Stämme nach 24 h bestimmt. Dabei zeigten besonders die komplementierten Stämme der IDH-Doppelmutante eine überdurchschnittlich hohe Biofilm-Bildung, die nicht erklärt werden konnte. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium wurden ähnliche Ergebnisse wie unter aeroben Bedingungen erzielt (Abbildung 5.27). Ein großer Unterschied lag jedoch bei den Komplementanten

der IDH-Doppelmutante, die eine deutlich stärkere relative Biofilm-Bildung aufwiesen (Ausnahme Leervektorkontrolle). Da die Komplementationen mit den Plasmiden (p*icd*, p*idh* und p*icd*/*idh*) entgegen der Erwartungen zu einer erhöhten Biofilm-Bildung führten, waren demnach die Komplementationen nicht erfolgreich. Vermutlich ist dies auf eine gesteigerte Kopienzahl des Komplementationsvektors pBBR1MCS und der jeweiligen darauf enthaltenen Gene zurückzuführen.
Des Weiteren konnte bei diesen Stämmen eine starke Gasentwicklung in Form von Blasen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich handelte es sich dabei um CO_2, welches als „Abfallprodukt" bei der Nutzung der verschiedenen verwendeten Stoffwechselwege anfiel, das jedoch in weiteren Versuchen bestätigt werden müsste.

5.5.3 Bestimmung der Elastase-Aktivität von *P. aeruginosa*

Ein weiterer Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* ist die Zn^{2+}-abhängige Metalloprotease LasB oder auch Elastase, die in eine QS-abhängigen Regulation über das Typ II-Sekretionssystem sekretiert wird. Es wurde gezeigt, dass das hoch toxische LasB ein breites Spektrum an verschiedenen Substraten degradiert, einschließlich Elastin, Fibrin, Immunoglobulin, Komplement-Faktoren und Zytokinen (Garner *et al.*, 2012).
Sowohl beim PA14 als auch bei den IDH-Einzelmutanten konnte ein deutlicher Abbau des unlöslichen Elastin-Kongorots beobachtet werden, während bei der IDH-Doppelmutante dies nicht der Fall war (Abbildung 5.28). Eine Komplementation der IDH-Doppelmutante war mit allen Plasmiden (p*icd*, p*idh* und p*icd*/*idh*) bis ca. zur Hälfte des Ausgangs-Niveaus möglich. Bei den Mdh-Mutanten PA14 *mdh*::Gm und PA14 *mdh*::Tn konnte keine Beeinflussung der Elastase-Aktivität festgestellt werden.
Untermauert werden die Ergebnisse durch die Daten der Transkriptomanalysen bei dem Vergleich der IDH-Doppelmutante mit PA14. In der Tabelle 5.5 sind die Gene der IDH-Doppelmutante mit Protein-Funktion, der x-fachen Genexpression und dem p-Wert aus dem Typ II-Sekretionssystem (Xcp) dargestellt. Alle Gene, die die Auswahlstandards (Genexpression ≥ 2 und p-Wert $\leq 0{,}05$) erfüllten, weisen eine verminderte Genexpression auf. Besonders für die Gene, die für Hauptkomponenten des Sekretionssystem II kodieren (*xcpP* 2,91↓, *xcpQ* 2,97↓, *xcpR* 2,61↓), konnte eine relativ starke Verminderung in ihren Genexpressionen beobachtet werden. Gerade das Elastasegen (*lasB*) selbst zeigt die zweitstärkste Verminderung (4,07↓) auf. Zusammengefasst scheint das Typ II-Sekretions-system (Xcp) in der IDH-Doppelmutante stark reduziert oder sogar komplett herunterreguliert ist.

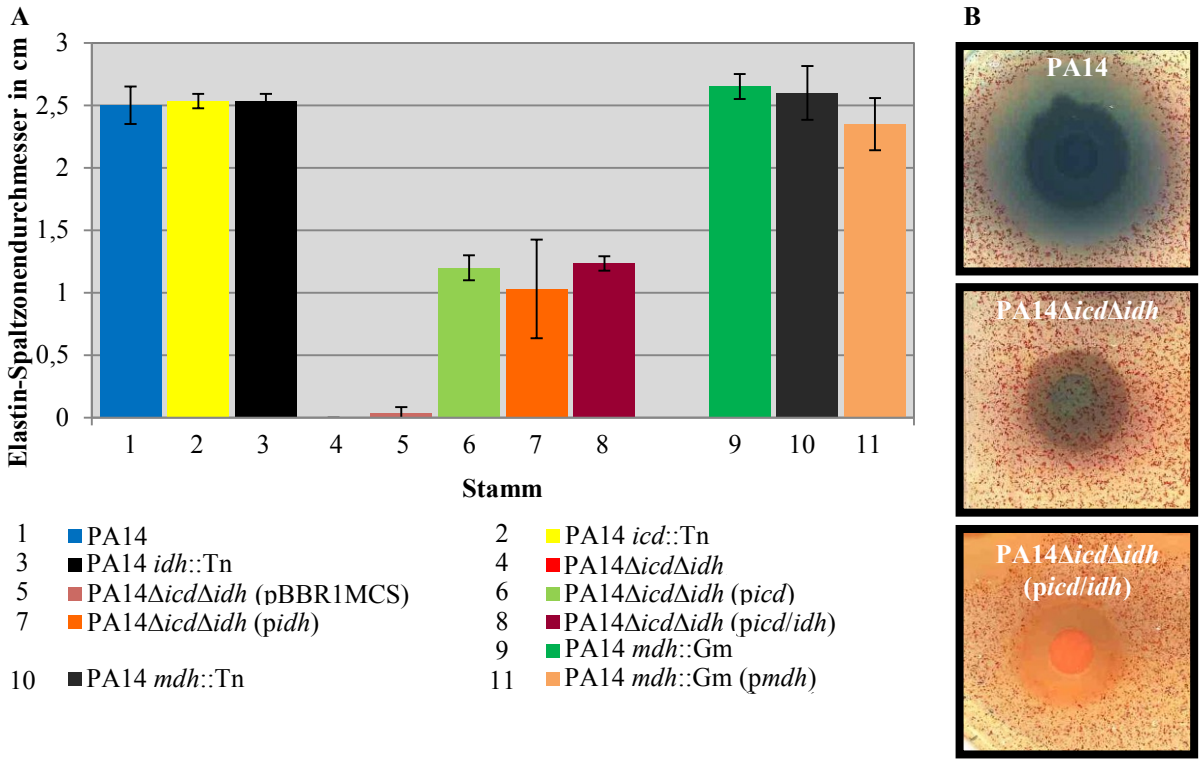


Abbildung 5.28 Bestimmung der Elastase von *P. aeruginosa* durch den Abbau des Elastin-Kongorots
(A) Durch den Abbau des unlöslichen Elastin-Kongorots im Medium konnte anhand des Hydrolysedurchmessers die Elastase-Aktivität nach 24 h vom jeweiligen getesteten Stamm bestimmt werden. (B) In dieser Abbildung sind die Elastin-Kongorotplatten von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) nach 24 h Bebrütung zu sehen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Wert ≤ 0,001)

Gen (PA-Nummer)	Protein-Funktion	-fach	just. p-Wert
xcpP (PA3104)	Sekretionssystem	2,91↓	0,0068
xcpQ (PA3105)	Außenmembrankanal	2,97↓	0,0003
xcpR (PA3103)	ATPase	2,61↓	0,0006
xcpT (PA3101)	Sekretionssystem	3,60↓	0,0009
xcpU (PA3100)	Sekretionssystem	1,27↓	0,0212
xcpV (PA3099)	Sekretionssystem	1,59↓	0,0279
cpbD (PA0852)	Chitin-Bindeprotein	3,91↓	0,0060
lasB (PA3724)	Protease–Elastase	4,27↓	0,0098
plcB (PA0026)	Phospholipase	4,07↓	< 0,0001
rbsC (PA1948)	Exotoxin A-ADP Ribosyltransferase	4,47↓	0,0006

Tabelle 5.5 Expressionsveränderungen für Gene des Typ II-Sekretionssystem von PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen zu PA14
In der Tabelle sind Expressionswerte der Gene von PA14Δ*icd*Δ*idh* aus der Transkriptomanalyse verglichen mit PA14 aufgelistet, dessen Produkte entweder Bestandteile des Typ II-Sekretionssystems (Xcp) sind oder ins Milieu sekretiert werden.

5.5.4 Bestimmung der Gesamt-Protease-Aktivität von *P. aeruginosa*

Neben der Elastase werden weitere Proteasen von *P. aeruginosa* in das umgebende Milieu sekretiert. Mit Hilfe eines Magermilchagars kann die Aktivität mehrerer Proteasen getestet werden. Die Mdh-Mutanten PA14 *mdh*::Gm und PA14 *mdh*::Tn zeigten keinen signifikanten Unterschied zu PA14. Sowohl die IDH-Doppelmutante als auch die Leervektorkontrolle zeigten minimale proteolytische Aktivität. Wie schon beim Elastase-Test zu sehen war, konnte auch hier aus nicht erklärlichen Gründen keine vollständige Komplementation erreicht werden. Die Proteolysezone der komplementierten Stämme lag relativ gleichverteilt bei ca. 0,3 - 0,4 cm (Abbildung 5.29).

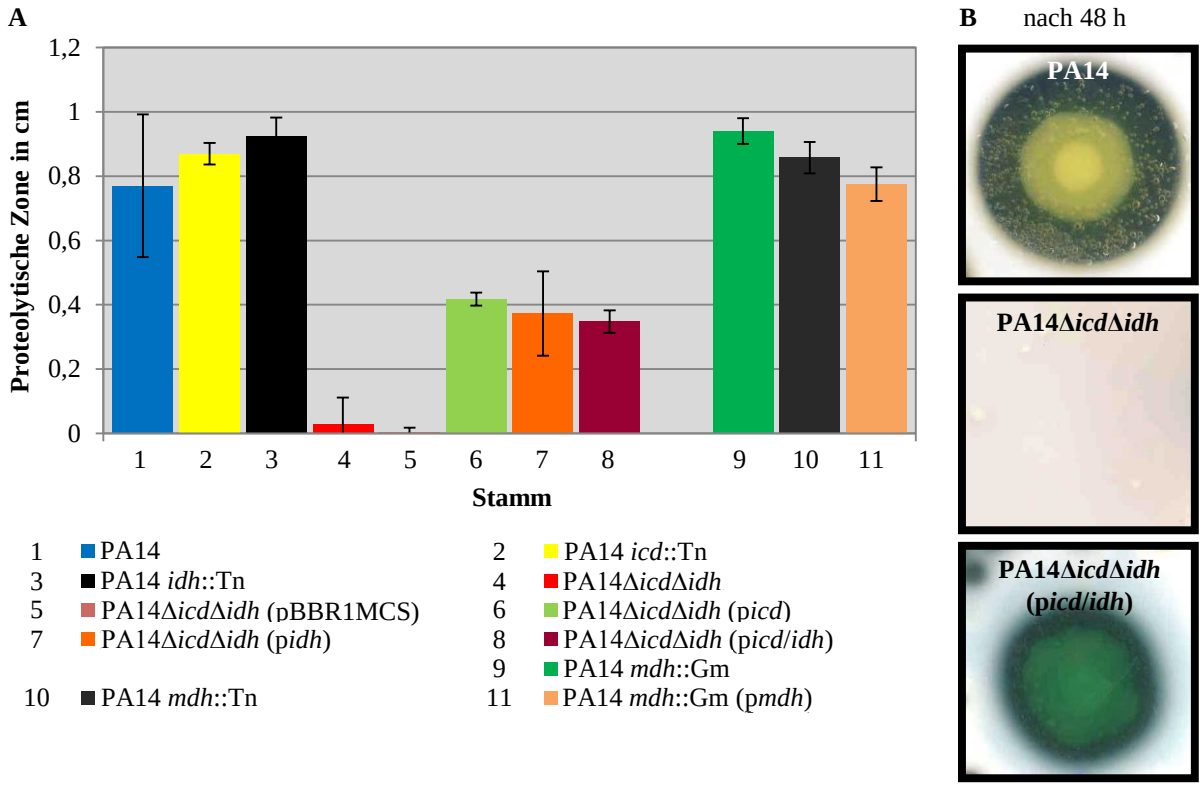


Abbildung 5.29 Bestimmung der Gesamt-Protease-Aktivität von *P. aeruginosa*
(A) Durch den Hydrolysedurchmesser im Magermilchagar konnte die Gesamt-Protease-Aktivität der getesteten Stämme nach 48 h bestimmt werden. (B) In dieser Abbildung sind die Agarplattenböden der jeweiligen hydrolysierten Magermilchzonen von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) nach 48 h Inkubation zu sehen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Wert ≤ 0,001)

5.5.5 Bestimmung der Pyocyanin-Produktion von *P. aeruginosa*

Das sekretierte Pigment Pyocyanin stellt einen weiteren Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* dar, dessen Produktion bezogen auf das Wachstum gemessen wurde. Im Vergleich zu PA14 wurde bei beiden IDH-Einzelmutanten eine leicht verminderte und bei der IDH-Doppelmutante um ca. den Faktor 2 stärkere Pyocyanin-Produktion gemessen. Die Vektorkontrolle lag mit seiner Produktion zwischen PA14 und der IDH-Doppelmutante. Unerwarteterweise zeigten alle Komplementanten eine starke

Pyocyanin-Produktion, wobei PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) den stärksten Wert aufwies, gefolgt von PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd/idh*) und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*) (Abbildung 5.30). Da einheitlich die Produktion des Pyocyanins in diesen Stämmen erfolgte, kann ein Artefakt weitgehend ausgeschlossen werden. Eine Überexpression der Isoenzyme im PA14-Stamm und beiden IDH-Einzelmutanten führten zu keiner erhöhten Pyocyanin-Produktion (Daten nicht gezeigt). Bei den Mdh-Mutanten PA14 *mdh*::Gm und PA14 *mdh*::Tn lag die relative Pyocyaninmenge ungefähr auf Ausgangs-Niveau des Stammes PA14.

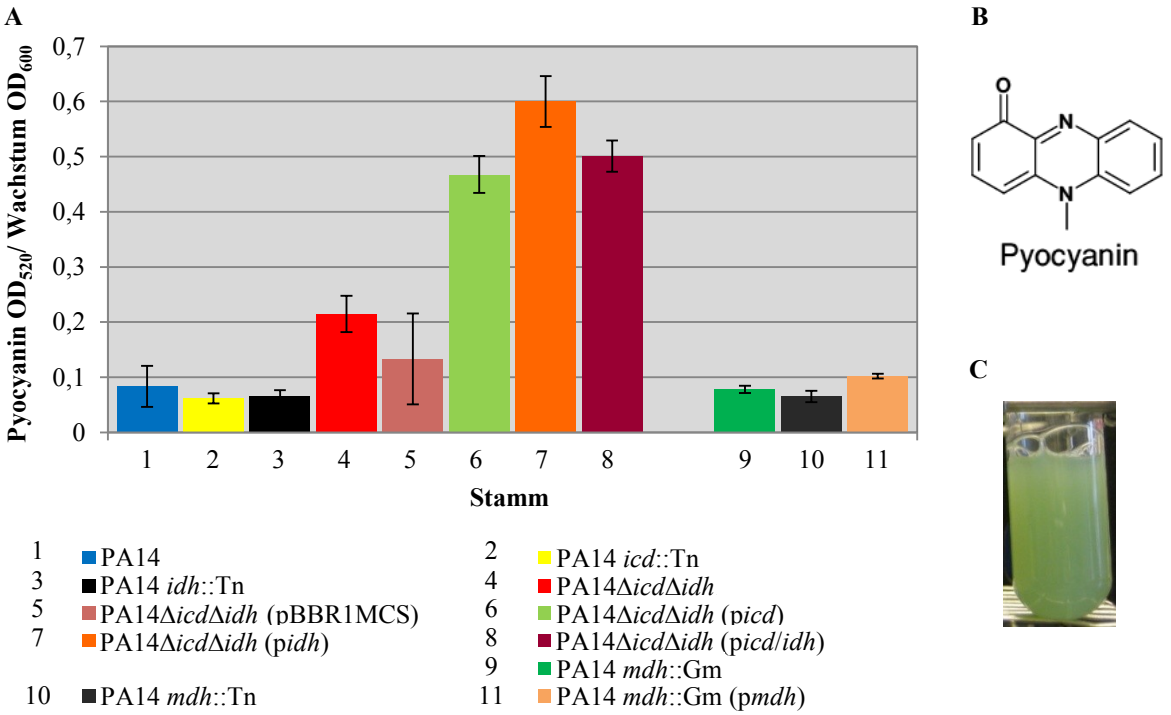


Abbildung 5.30 Bestimmung der Pyocyanin-Produktion von *P. aeruginosa*
(A) Die relative Pyocyanin-Produktion im King´s A-Medium wurde anhand des Quotienten aus OD_{520} des gebildeten Pyocyanins und OD_{600} der Bakteriensuspension gebildet. (B) Dargestellt ist die Strukturformel des Pyocyanins. (C) Dargestellt ist die typische Grünfärbung des Pyocyanins. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Wert ≤ 0,01)

5.6 Einfluss von oxidativen Stress auf *P. aeruginosa*

Als weitere wichtige Funktion der Isocitratdehydrogenase und Malatdehydrogenase wird der antioxidative Effekt der gebildeten Reduktionsäquivalente z. B. gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) diskutiert (van der Rest *et al.*, 2000;Singh *et al.*, 2008;Shi *et al.*, 2009). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm oxidativen Stressfaktoren ausgesetzt, z. B. durch Eisen (50 mM Eisenchlorid), das besonders durch die Fenton-Reaktion zu oxidativem Stress beiträgt. Zusätzlich wurden die Stämme osmotischem Stress ausgesetzt. Aufgrund des Verlustes der Isocitratdehydrogenase bzw. Malatdehydrogenase sollten eine vermeintliche erniedrigte Bildung von NAD(P)H und damit eine Empfindlichkeit gegenüber Radikalbildnern resultieren.

Allerdings konnte weder durch Natriumchlorid (NaCl), Eisenchlorid ($FeCl_3$), Natriumhypochlorit (NaClO) noch durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) eine erhöhte Empfindlichkeit unter den drei verwendeten Stämmen nachgewiesen werden. Ein deutlicher Unterschied wurde jedoch nach Zugabe von Paraquat (30 µl einer 2 %-igen Lösung) beobachtet. Entgegen der Erwartung, dass PA14Δ*icd*Δ*idh* aufgrund der Inaktivierung beider Isoenzyme weniger NADPH bilde, war die IDH-Doppelmutante jedoch nicht sensitiver, sondern sogar resistenter gegenüber Paraquat als die beiden Stämme PA14 und PA14 *mdh*::Gm (Abbildung 5.31). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden weitere Stämme mit Paraquat gestresst.

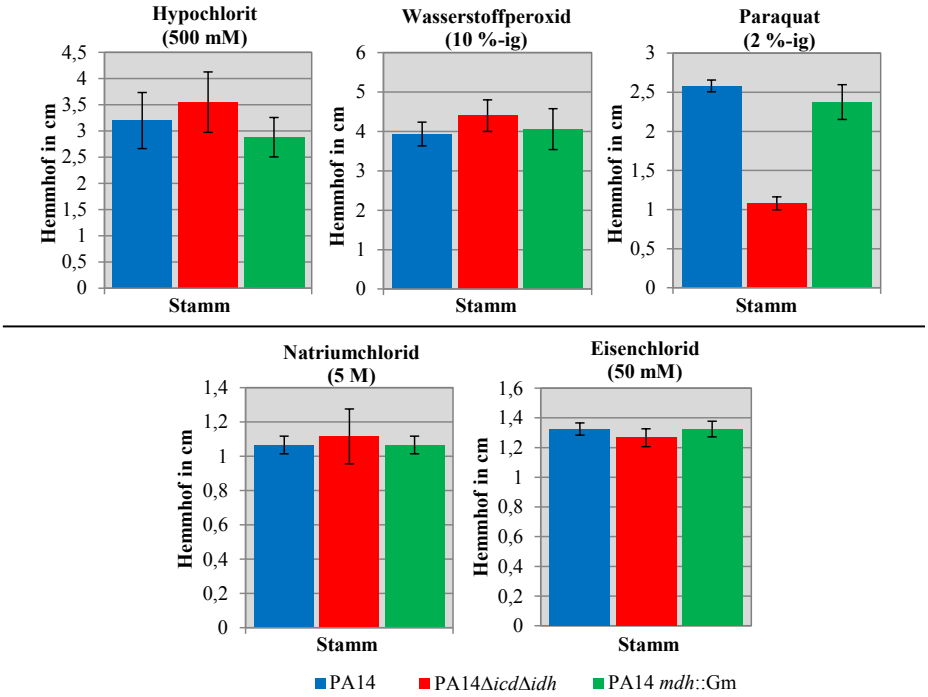


Abbildung 5.31 Einfluss verschiedener Stressfaktoren auf *P. aeruginosa*
PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm wurden mittels Agarplättchentest mit Hypochlorit, Wasserstoffperoxid, Paraquat, Natrium- und Eisenchlorid „gestresst". Bei Wachstumshemmung wurde anschließend der Durchmesser des entstandenen Hemmhofs in cm bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Wert ≤ 0,001 (Paraquat))

5.6.1 Bestimmung der Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber Paraquat

Insertionsinaktivierung der Gene für die Isoenzyme Icd in PA14 *icd*::Tn oder Idh in PA14*idh*::Tn (Hemmhofdurchmesser ca. 2,3 - 2,4 cm) resultiert in einer geringfügigen Steigerung der Paraquat-Resistenz verglichen zum Ausgangsstamm PA14 (Hemmhofdurchmesser 2,49 +/- 0,11 cm) (Abbildung 5.32). Dagegen war bei der IDH-Doppeldeletionsmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und Leervektorkontrolle eine deutliche Resistenzsteigerung nachweisbar (Hemmhofdurchmesser 1,14 +/- 0,12 cm). Eine Genkomplementation konnte erfolgreich durchgeführt werden, wobei PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) fast den Hemmhofdurchmesser des Ausgangstammes PA14 erreichte. Eine leichte Zunahme der

Hemmhofdurchmesser wurde dagegen bei PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*) und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) gemessen. Das korreliert mit der in dieser Arbeit gemessenen stärkeren Enzym-Aktivität der Icd. Zusammengefasst konnte eine verstärkte Resistenz gegenüber Paraquat bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* bestätigt und gleichzeitig gezeigt werden, dass Stämme mit monoinaktiviertem Isocitratdehydrogenasegen bzw. reduzierter Isocitratdehydrogenase-Aktivität einen Selektionsvorteil unter Paraquatstress zeigen. Bei Inaktivierung der Malatdehydrogenase konnte dagegen kein selektiver Wachstumsvorteil beobachtet werden.

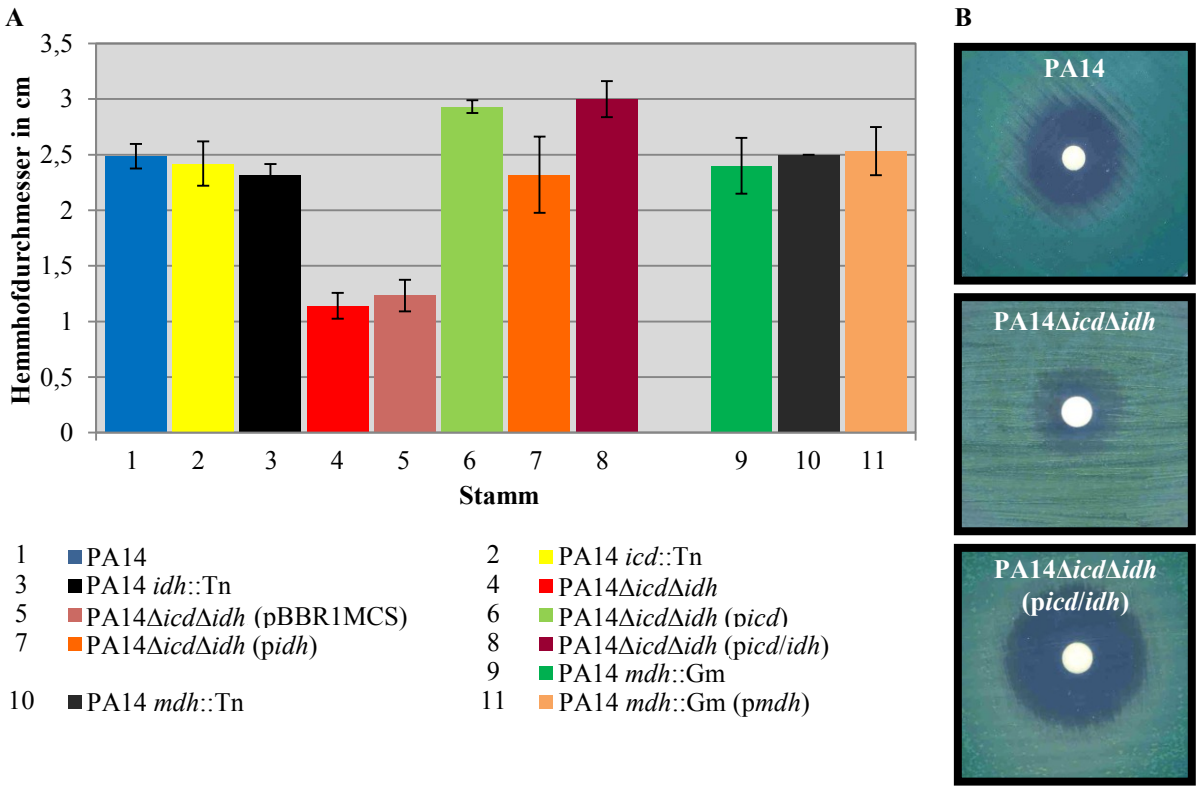


Abbildung 5.32 Bestimmung der Paraquat-Resistenz von *P. aeruginosa*
(A) Die ausplattierten Stämme wurden mit 30 µl einer 2 %-igen Paraquatlösung betropft und anschließend bei 37 °C für 24 h inkubiert. Der entstandene Hemmhofdurchmesser wurde in cm bestimmt. (B) Hemmhöfe auf LB-Platten von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) sind nach 24-stündiger Inkubation gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14 zur IDH-Doppelmutante p-Wert ≤ 0,001)

Auch in Flüssigkultur konnte eine ausgeprägte Resistenz der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und der Leervektorkontrolle gegenüber Paraquat im Vergleich zu PA14 beobachtet werden (Abbildung 5.33). Dieser Effekt konnte durch Genkomplementation bei PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) wieder kompensiert werden. Bei der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm war erneut keine Resistenzänderung im Vergleich zu PA14 erkennbar.

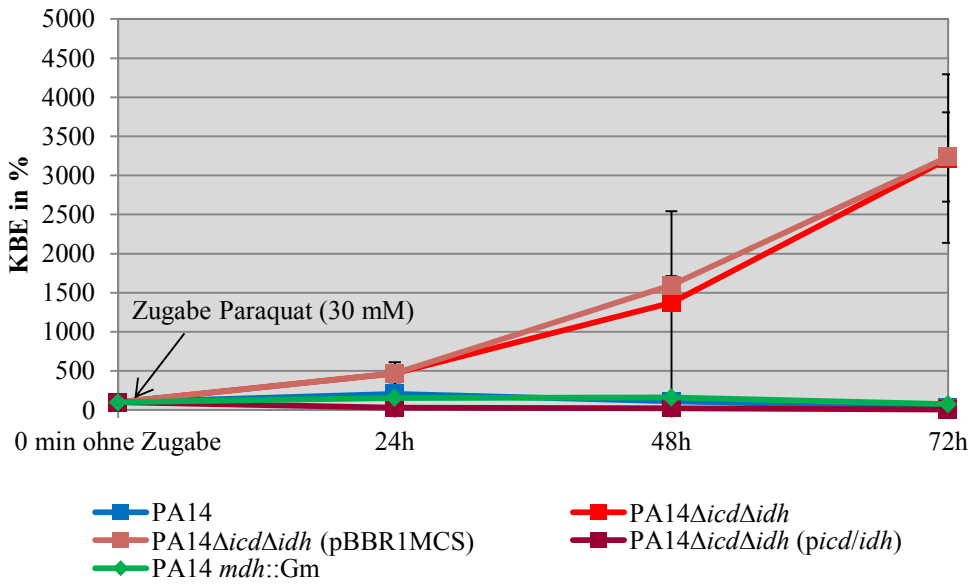


Abbildung 5.33 Bestimmung der Paraquat-Resistenz von *P. aeruginosa* in Flüssigkultur
Nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden jeweils 100 µl einer LB-Kultur (37 °C, aerob) in den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-5} ausplattiert. Die Keimzahl bei 0 h wurde als 100 % gewertet. Anschließend wurde Paraquat in einer Endkonzentration von 30 mM zur Kultur gegeben. Die Keimzahlen wurden nach 24 h, 48 h und 72 h in Prozent verglichen zum Ausgangswert bei 0 h bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.6.2 Mögliche Ursachen für eine erhöhte Paraquat-Resistenz von PA14Δ*icd*Δ*idh*

Für die erhöhte Resistenz der IDH-Doppelmutante gegenüber Paraquat im Vergleich zu PA14 gibt es verschiedene, plausible Ursachen, die möglicherweise auch zusammenwirken. In den folgenden Abschnitten werden diese verschiedenen möglichen Faktoren zunächst näher erläutert bevor dann die dazugehörigen Ergebnisse dargestellt werden.

1. Veränderte intrazelluläre NAD(H)- bzw. NADP(H)-Konzentration: In der Literatur wird eine hohe intrazelluläre Konzentration an reduzierten Reduktionsäquivalenten, z. B. NADH oder NADPH, als effektiver Abwehrmechanismus z. B. gegenüber Sauerstoffradikalen oder anderen Stressfaktoren beschrieben (Singh *et al.*, 2008). Des Weiteren deutet ein verändertes Verhältnis von NAD(H) bzw. NADP(H) auf einen veränderten Energiestoffwechsel in der Bakterienzelle hin (Singh *et al.*, 2007). So könnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Paraquat auf eine veränderte intrazelluläre Konzentration dieser Reduktionsäquivalente in *P. aeruginosa* zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu klären, ob der Verlust der enzymatischen Aktivität der Isocitratdehydrogenase und somit der Verlust der Bildung an NAD(P)H aus dieser Reaktion, Auswirkungen auf die intrazelluläre Konzentration an NAD(P)H hat.

2. Höhere Genexpression und Enzym-Aktivität der SOD, KAT, GPX und GSR: Alle Organismen, die in einer aeroben Umwelt leben und Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor nutzen, haben Strategien entwickelt, um sich gegen oxidativen Stress, z. B. durch in der Atmungskette gebildete Sauerstoffradikale, zu schützen. Hierzu gehören beispielsweise die Enzyme Katalasen (KAT),

Superoxiddismutasen (SOD), Glutathionperoxidasen (GPX) und Glutathionreduktasen (GSR). Anhand von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Paraquat zu einer erhöhten Aktivität der SOD führt (Hassan and Fridovich, 1977b). Deshalb wäre denkbar, dass z. B. eine höhere SOD-Aktivität bei der IDH-Doppelmutante verglichen mit PA14 nach einer Inkubation mit Paraquat in einer erhöhten Resistenz resultiert.

3. Einfluss von Nährstoffstress: Mit der sog. *stringent response*, einem regulatorischen System, sind Bakterien in der Lage sich an eine nährstoffarme Umgebung z. B. den Mangel an Aminosäuren oder Kohlenstoffquellen wahrzunehmen und sich daran anzupassen. Bei solch einer Stresssituation wird das Signalmolekül Guanosin-3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) durch die Enzyme RelA und SpoT gebildet und auch durch SpoT degradiert (Battesti and Bouveret, 2009;Vogt *et al.*, 2011). In der Regel ist die *stringent response* mit einer erhöhten Stressresistenz und einem verlangsamten Wachstum inkl. eines verminderten Stoffwechsels der Zelle verbunden. Anhand von *Bacillus subtilis* konnte in *Microarray*-Analysen gezeigt werden, dass unter anderem viele Gene der *stringent response* herunterreguliert waren, wenn die Bakterienzellen mit Disulfid (ausgelöst durch Thiol-Oxidans Diamid) gestresst wurden. Es ist bekannt, dass viele dieser Gene auch nach einer Behandlung mit Paraquat induziert werden (Leichert *et al.*, 2003). Deshalb könnte es sein, dass eventuell veränderte Expressionen der Gene der *stringent response* einen Einfluss auf die Paraquat-Resistenz haben.

4. Bedeutung von LPS: Das Gen *rmlA* wird in *P. aeruginosa* für die L-Rhamnose-Bildung benötigt, das wiederum eine Schlüsselkomponente des LPS darstellt (Blankenfeldt *et al.*, 2000). Anhand von Versuchen mit einer *rmlA*-Mutante wurde gezeigt, dass offenbar das LPS eine Barriere für *P. aeruginosa* darstellt, die die Zelle vor divalenten Metallen und Paraquat schützt (Rivera *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es bei einer *pgm*-Mutante von *Bordetella bronchiseptica* zu einem Verlust des O-Antigens beim LPS kommt. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Paraquat-Sensitivität in dieser Mutante auf den Verlust des O-Antigens zurückzuführen ist, da es vermutlich die Bakterienzelle durch seine hohe Ladung gegen Sauerstoffradikale schützt (West *et al.*, 2000). Es könnte deshalb sein, dass die Oberflächenstruktur der IDH-Doppelmutante aufgrund der gesetzten Mutationen so verändert wurde, z. B. durch eine veränderte oder fehlende Ladung, dass das Paraquat schlechter oder sogar gar nicht in die Bakterienzelle gelangen kann.

5. Einfluss von Porinen: Mit Hilfe von Porinen können wichtige Nährstoffe in eine Bakterienzelle gelangen, jedoch auch Antibiotika oder andere schädliche Substanzen. Durch Regulation der Porinexpression kann somit in einem gewissen Umfang die Ein- und Ausfuhr von Substraten geregelt werden. In der Literatur ist wenig über den genauen Aufnahmemechanismus von Paraquat bei *P. aeruginosa* bekannt. Wie jedoch in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium gezeigt werden konnte, scheinen die beiden Porine OmpD und OmpW eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegenüber Paraquat zu spielen (Santiviago *et al.*, 2002;Gil *et al.*, 2007;Gil *et al.*, 2009). Es wurden deshalb Poringene näher im Transkriptom untersucht.

6. Effluxpumpen als mögliche Ursache: Ein weitverbreiteter Mechanismus für Bakterien, sich gegen Antibiotika und anderen Substanzen zu schützen, sind Effluxpumpen, die toxische Stoffe aus dem Inneren der Bakterienzelle heraustransportieren. Mittels Transkriptomanalysen konnte gezeigt werden, dass es bei *P. aeruginosa* PAO1 Zellen, die Paraquat ausgesetzt wurden, es zu einer Hochregulierung des Operons *mexGHI-opmD* sowie der Gene PA2274 und PA3718 kam (Kobayashi and Tagawa, 2004;Palma *et al.*, 2005). Es wurde daher versucht in dieser Arbeit zu klären, inwieweit Effluxpumpengene mit zur Paraquat-Resistenz beitragen.

Überprüfung der möglichen Faktoren für eine erhöhte Paraquat-Resistenz bei PA14Δ*icd*Δ*idh*

Die möglichen Ursachen für eine erhöhte Paraquat-Resistenz in der IDH-Doppelmutante verglichen zu PA14 wurden oben erläutert. Im folgenden Abschnitt werden dazu die experimentellen und v. a. durch die Transkriptomdaten untersuchten Ergebnisse gezeigt.

1. Messung der intrazellulären NADH/NADPH-Konzentration: Es wurden sowohl die Konzentrationen von NAD^+ bzw. NADH als auch $NADP^+$ bzw. NADPH in *P. aeruginosa* PA14, in den IDH-Einzelmutanten, in der IDH-Doppelmutante und in der Mdh-Mutante bestimmt. Insgesamt enthielten alle getesteten Stämme bei Zellernte in der exponentielle Phase mehr oxidierte (NAD^+ und $NADP^+$) als reduzierte (NADH und NADPH) Reduktionsäquivalente (Abbildung 5.34). Für beide Nikotinamiddinukleotide konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden.

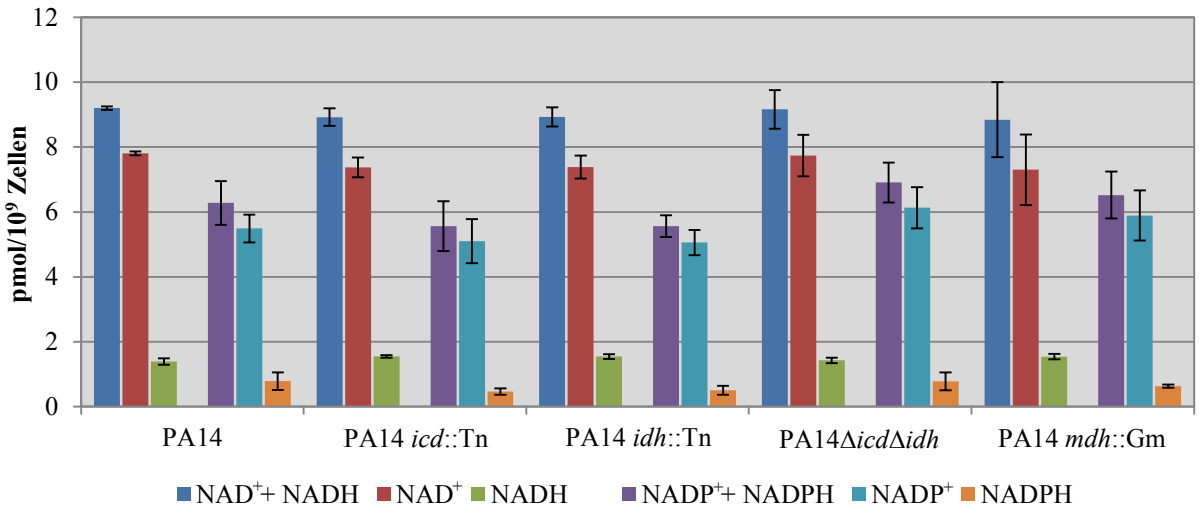


Abbildung 5.34 Bestimmung der cytosol. Konzentration von NAD(H) bzw. NADP(H) von *P. aeruginosa*
Von den in der exponentiellen Phase in LB-Medium geernteten Bakterienzellen wurden die Konzentrationen von NAD^+, NADH, $NADP^+$ und NADPH mittels eines antikörperbasierten Kits bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Auch die Quotienten aus NAD^+ zu NADH und $NADP^+$ zu NADPH zeigten keine gravierenden Unterschiede im Vergleich zu den getesteten Stämme (Zellen aus der exponentiellen Phase) untereinander (Abbildung 5.35). Während bei allen Stämmen die Konzentration an zellulärem NAD^+

4 - 6-fach höher lag als bei NADH, war bei $NADP^+$ eine ca. 7 - 11 fache Erhöhung gegenüber NADPH zu erkennen. Bei den Versuchen mit Bakterienzellen aus der stationären Phase konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Demnach hat ein Funktionsverlust der Icd/Idh bzw. Mdh im Vergleich zum Ausgangsstamm PA14 offenbar weder einen Effekt auf die intrazelluläre Konzentration der Nikotinamiddinukleotide noch auf das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Reduktionsäquivalent. Ein Einfluss von NAD^+/NADH oder $NADP^+$/NADPH auf die Paraquat-Resistenz konnte somit nicht nachgewiesen werden.

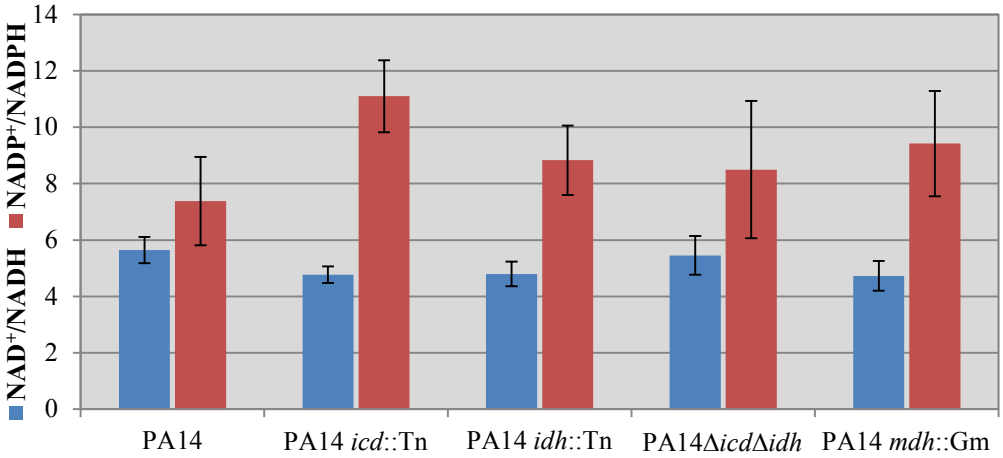


Abbildung 5.35 Verhältnisse von oxidierten zu reduzierten cytosolischen Reduktionsäquivalenten in *P. aeruginosa*
Aus den Konzentrationen der intrazellulären Reduktionsäquivalente wurden die Quotienten von NAD^+/NADH und $NADP^+$/NADPH bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

2. Untersuchung der Genexpression und Enzym-Aktivität von SOD, KAT, GPX und GSR: Für die Experimente wurden der Ausgangsstamm PA14, beide IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn, IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm verwendet. Mit Hilfe kommerzieller Nachweisverfahren wurde über die Inhibitionsrate indirekt die SOD-Aktivität bestimmt. Wenn keine SOD-Aktivität in einer Zellprobe vorhanden ist, so reagiert ein gebildetes Superoxidradikal mit einem Tetrazoliumsalz zu dem Farbstoff Formazan, der photometrisch gemessen werden kann. Dagegen enttoxifiziert bei einer vorhandenen Aktivität die SOD das Radikal und die Farbstoffentwicklung wird inhibiert. Je stärker also die Inhibition der Farbstoff-Bildung ist, desto stärker ist die SOD-Aktivität. Im Ausgangszustand (ohne Stressoren) zeigten alle getesteten Stämme sowohl in der exponentiellen Phase (OD_{600} = 1,0; OD1) als auch in der stationären Phase (OD_{600} = 3,0; OD3) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der SOD-Aktivität (Abbildung 5.36).

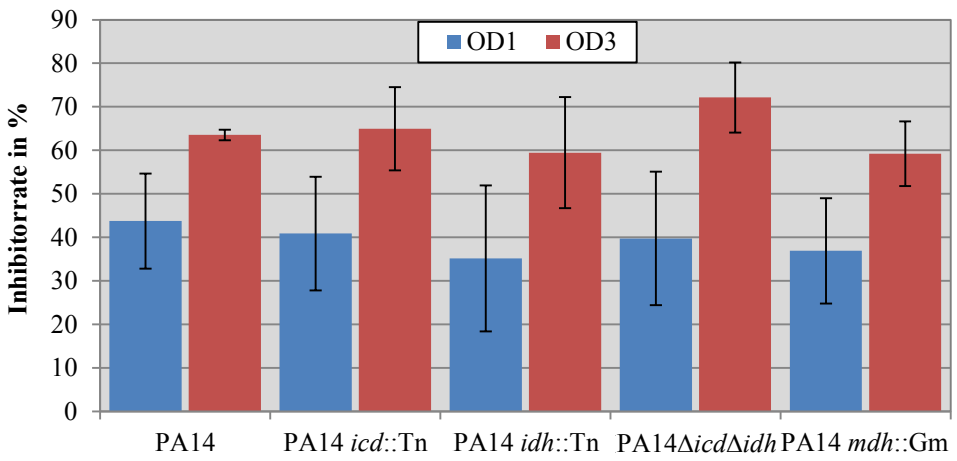


Abbildung 5.36 Bestimmung der SOD-Aktivität von *P. aeruginosa*
Dargestellt ist die Inhibitionsrate als indirektes Maß der SOD-Aktivität für die getesteten Stämmen aus der exponentiellen (OD1) und stationären (OD3) Phase. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Durch Zugabe von Paraquat konnte die Aktivität der SOD wahrscheinlich leicht induziert werden, jedoch kann aufgrund der hohen Standardabweichung lediglich eine Tendenz festgestellt werden (Abbildung 5.37). Während bei PA14 und der komplementierten IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) die SOD-Aktivität auf über 40 % Aktivität anstieg, blieb die Aktivität bei der IDH-Doppelmutante nahezu gleich. Insgesamt ist es schwierig, eine genaue Aussage bezüglich der SOD als mögliche Ursache für eine erhöhte Paraquat-Resistenz zu treffen, zumal auch die Transkriptomdaten keine Anhaltspunkte dafür geben (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst ist es nicht gelungen nachzuweisen, dass die SOD zur Paraquat-Resistenz beiträgt.

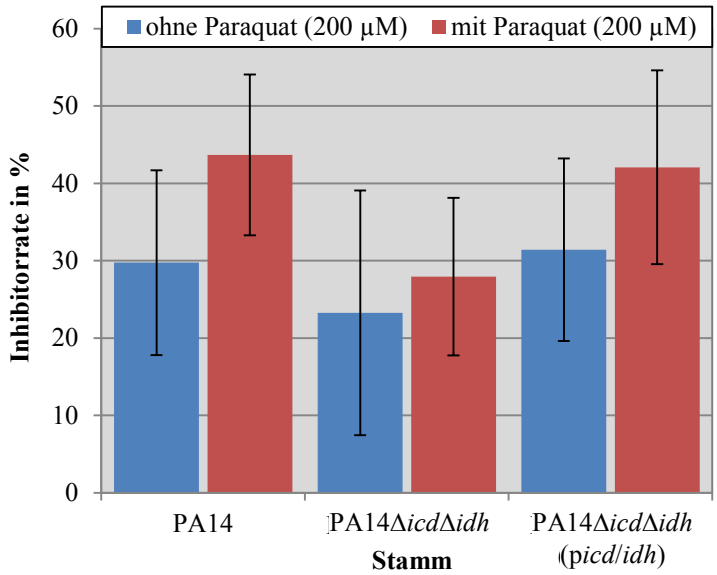


Abbildung 5.37 Induktion der SOD-Aktivität durch Paraquat bei *P. aeruginosa*
Durch Zugabe von Paraquat (Endkonzentration 200 µM) ins Medium wurde die SOD in den getesteten Stämmen induziert und indirekt die Aktivität bestimmt (Inhibitionsrate). Es wurden Bakterien aus der exponentiellen (OD1) und stationären (OD3) Phase getestet. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Superoxidradikale können durch SOD unter anderem zu H_2O_2 umgewandelt werden, das wiederum durch Katalasen oder durch Glutathionperoxidase/Glutathionreduktase weiter „enttoxifiziert“ werden kann. Für die in *P. aeruginosa* vorkommenden Katalasen (*katABEN*; PA4236, PA4613, PA2147,

PA2185) und (vermutlichen) Glutathionperoxidasen (PA0838, PA1287, PA2826) bzw. -reduktase (*gor*; PA2025) wurden in den Transkriptomdaten mit einer Ausnahme keine signifikanten Veränderungen in den Genexpressionen der IDH-Doppelmutante gegenüber PA14 festgestellt. Lediglich für PA1287 konnte eine leichte Verminderung der Genexpression (2,56↓) in der IDH-Doppelmutante verglichen zu PA14 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3. Einfluss der *stringent response*: Es stellte sich die Frage, ob bei der IDH-Doppelmutante aufgrund des langsamen Wachstums und der defizienten Aufnahme zahlreicher Kohlenstoffquellen die *stringent response* aktiviert wird und es hierdurch zu veränderten Virulenzeigenschaften und einer erhöhten Resistenz gegenüber Paraquat kommt. Diesbezüglich wurden die Gene *relA* und *spoT* mit Hilfe der *Microarray*-Daten genauer betrachtet (Tabelle 5.6). Es konnten keine Hinweise auf Transkriptionsunterschiede nachgewiesen werden (p-Werte > 0.05 außer Acht gelassen). Es ist nichts über eine posttranslationale Regulation bei RelA und SpoT in *P. aeruginosa* bekannt.

Tabelle 5.6 Verantwortliche Gene für Nährstoffstress bei *P. aeruginosa*
relA und *spoT* sind bei der *stringent response* beteiligt, jedoch zeigen beide Gene unabhängig der p-Werte keine auffälligen veränderten Genexpressionen in der IDH-Doppelmutante.

PA Nummer	Genname	Bezeichnung	-fach	just. p-Wert
PA0934 (PA14_52180)	*relA*	GTP-Pyrophosphokinase	1,42↑	0,1577
PA5338 (PA14_70470)	*spoT*	Guanosin-3',5'-bis(diphosphat) 3'-Pyrophosphohydrolase	1,78↓	0,2527

4. Analyse der LPS-Biosynthese: Um zu klären, ob das LPS einen Einfluss auf die Paraquat-Resistenz der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* hat, wurde das LPS-Profil unter anderem der Stämme PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm bestimmt. Die erstellten LPS-Profile nach SDS-PAGE der drei Stämme sind in der Abbildung 5.38 dargestellt. Weitere Stämme wie die Komplementanten sind im Anhang (8.3) aufgeführt. Zwischen den LPS-Profilen von PA14 und den beiden IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn waren keine Unterschiede erkennbar. Die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* wies dagegen viele zusätzliche Banden im Bereich von 34 - 55 kDa auf, die durch Komplementationen zum Teil kompensiert werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass PA14Δ*icd*Δ*idh* in der Synthese oder in der Modifikation des LPS durch die Inaktivierung von *icd*/*idh* beeinflusst ist. Bei den beiden Mdh-Mutanten PA14 *mdh*::Gm und PA14 *mdh*::Tn konnten keine Unterschiede zum PA14-Stamm festgestellt werden (siehe auch 8.3).

Bei Betrachtung der Transkriptomdaten (Tabelle 5.7) der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* im Vergleich zu PA14 fällt auf, dass die Transkripte einiger Gene Unterschiede zeigen, die wichtig für die LPS-Synthese sind. Mit Ausnahme von *cdrA* zeigen alle LPS-Gene eine verminderte Genexpression in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* im Vergleich zu PA14. Diese Genexpressionsveränderungen könnten im Zusammenhang mit den zusätzlichen Banden im LPS-Profil der IDH-Doppelmutante stehen. Möglicherweise wird bei der IDH-Doppelmutante durch eine unvollständige Polymerisierung kurzkettiges LPS gebildet oder langkettiges LPS wird während der

Synthese schlechter zur Außenmembran transportiert. Für das weiter oben erwähnte Gen *rml*A konnten keine auffälligen Veränderungen in den Transkriptomdaten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

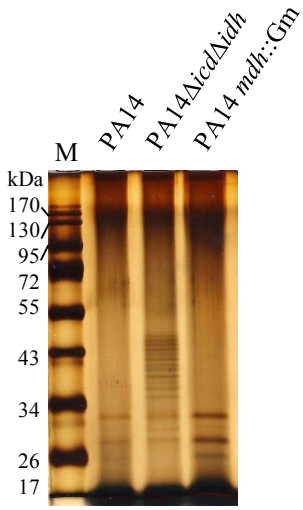


Abbildung 5.38 LPS-Profil von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm nach SDS-PAGE und Silbernitratfärbung
Die LPS-Profile von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm sind dargestellt. Die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* weist in dem Bereich 34 - 55 kDa zusätzliche Banden auf. Insgesamt wurde 5 µg Probe aufgetragen. Die LPS-Profile weiterer Stämme inkl. der Komplementanten sind im Anhang (8.3) zu sehen. Experimente wurden mindestens in Duplikaten durchgeführt.

Tabelle 5.7 In ihrer Genexpression veränderten LPS-Gene von PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen zu PA14
Bei einem Transkriptomvergleich der IDH-Doppelmutante mit PA14 kann beobachtet werden, dass eine Vielzahl von LPS-Genen in ihrer Expression verändert sind.

PA Nummer	Genname	Bezeichnung	-fach	just. p-Wert
PA5450 (PA14_71940)	*wzt*	ABC-Untereinheit von A-Band-LPS-Effluxtransporter	7,06↓	0,0245
PA5451 (PA14_71960)	*wzm*	Membranuntereinheit von A-Band-LPS-Effluxtransporter	4,54↓	0,0103
PA4625 (PA14_61200)	*cdrA*	Cyclische diguanylat-regulierter TPS partner A, CdrA	2,23↑	0,0256
PA4414 (PA14_57370)	*murD*	UDP-N-Acetylmuramoylalanin-D-Glutamat Ligase	2,19↓	0,0004
PA4416 (PA14_57390)	*murF*	UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelat-D-alanyl-D-alanyl Ligase	2,90↓	0,0037
PA4418 (PA14_57425)	*ftsI*	Zellteilungsprotein FtsI	2,80↓	0,0006
PA5012 (PA14_66250)	*waaF*	Heptosyltransferase II	2,08↓	0,0029
PA5164 (PA14_68210)	*rmlC*	dTDP-4-Dehydrorhamnose 3,5-Epimerase	3,02↓	0,0037
PA5448 (PA14_71920)	*wbpY*	Glykosyltransferase WbpY	4,03↓	0,0037

5. Einfluss von Porinen: Anhand der Transkriptomdaten von IDH-Doppelmutante und PA14 wird deutlich, dass unter den gesetzten Auswertekriterien (p-Wert ≤ 0,05) bis auf eine Ausnahme alle Transkripte der bekannten oder möglichen Außenmembranporine in der IDH-Doppelmutante herunterreguliert sind (Tabelle 5.8). Die Ausnahme betrifft das Gen *piuA*, das wiederum nur eine maximale ca. 2-fache Erhöhung gegenüber PA14 aufweist. Dies deutet insgesamt daraufhin, dass die Anzahl der Porine in der IDH-Doppelmutante verringert ist und es somit zu einer Verminderung der Aufnahme an verschiedenen Substanzen kommt.

Tabelle 5.8 Veränderte Poringentranskripte der IDH-Doppelmutante im Vergleich zu PA14
Bei einem Transkriptomvergleich der IDH-Doppelmutante mit PA14 sind bis auf das Gen *piuA* alle anderen Gene herunterreguliert.

Lokus *Tag*	Genname	Synonym	Produkt	-fach	just. p-Wert
Bekannte Außenmembranproteine					
PA4221 (PA14_09340)	*fptA*		Fe(III)-Pyochelin-Rezeptor	6,83↓	<0,0001
PA3186 (PA14_23030)	*oprB*		Glukose/Kohlenhydrat Porin OprB	10,54↓	0,0001
PA0958 (PA14_51880)	*oprD*		einfache Aminosäure, einfache Peptide und Imipenem Porin OprD	2,89↓	0,0213
PA1777 (PA14_41570)	*oprF*		Größeres und strukturelles Porin OprF	2,26↓	0,0311
PA3105 (PA14_23970)	*xcpQ*		Außenmembrankanal Protein Q	2,97↓	0,0004
PA3100 (PA14_24040)	*xcpU*		Außenmembrankanal Protein U	1,27↓	0,0212
Mögliche Außenmembranproteine					
PA2760 (PA14_28400)	*oprQ*		59 % ähnlich zu Porin OprD [*P. aeruginosa*]	4,04↓	0,0066
PA3038 (PA14_24790)	*opdQ*		65 % ähnlich zu PhaK Genprodukt [*P. putida*]	15,96↓	0,0052
PA1288 (PA14_47540)	*fadL*	*ompP1*	47 % ähnlich zu Fettsäurentransportprotein FadL [*E. coli*]	2,43↓	0,0339
PA4514 (PA14_58570)	*piuA*		49 % ähnlich zu putativen Rezeptor für Eisentransport [*E. coli*]	2,19↑	0,0088
PA1382 (nicht in PA14)	*xqhB*		52 % ähnlich zu S-Protein Sekretion D [*Aeromonas hydrophila*]	1,15↓	0,0119

6. Einfluss von Effluxpumpen: Die wichtigsten Effluxpumpensysteme von *P. aeruginosa* sind in der Tabelle 5.9 zusammengefasst, einschließlich der Transkriptions- und p-Werte der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* aus den *Microarray*-Analysen verglichen zu PA14. Bei den signifikanten Genexpressionen fällt auf, dass hauptsächlich Regulatoren im System der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* betroffen sind. Insgesamt konnten für sechs verschiedene Gene signifikante Expressionsveränderungen bestimmt werden. Bei Betrachtung der Genexpressionen von *mexR*, *nfxB* und *mexZ* scheint die Aktivität von Effluxpumpen in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* reduziert zu sein. Andererseits deuten die Expressionen der Gene *rhlR*, *mexL* und *mexX* auf eine vermehrte Expression von Effluxpumpen in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* hin. Insgesamt lassen diese Daten keine klare Aussage zum Beitrag der Effluxpumpen für die Paraquat-Resistenz der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* zu. Da einige Effluxpumpen-Systeme hoch- und andere herunterreguliert sind, können kompensatorische Effekte nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 5.9 Effluxpumpensysteme von *P. aeruginosa*
In dieser Tabelle sind die in *P. aeruginosa* vorkommenden Effluxpumpensysteme samt ihrer Regulatoren dargestellt. Neben dem Gennamen ist die PA-Nummer in Klammern sowie die Genexpressionsveränderung ↑ oder ↓ der IDH-Doppelmutante und der dazugehörige p-Wert angegeben, bezogen auf den PA14 Stamm. Genexpressionswerte ≥ 2 mit einem p-Wert ≤ 0,05 sind fett markiert.

Nr.	Effluxpumpensystem (Veränderung ↑ oder ↓ / p-Wert)				Regulatoren und (Funktion)	
1.	*mexA* (PA0425)	*mexB* (PA0426)		*oprM* (PA0427)	*mexR* (PA0424) (Repressor)	
	1,82↑ / 0,0097	1,19↑ / 0,7092		1,15↑ / 0,5371	**2,52↑ / 0,0069**	
2.	*mexC* (PA4599)	*mexD* (PA4598)		*oprJ* (PA4597)	*nfxB* (PA4600) (Repressor)	
	2,27↑ / 0,2398	1,05↑ / > 1		1,06↑ / 0,5252	**2,15↑ / 0,0369**	
3.	*mexE* (PA2493)	*mexF* (PA2494)		*oprN* (PA2495)	*mexS* (PA2491) (Repressor)	*mexT* (PA2492) (Aktivator)
	1,81↑ / 0,3702	1,64↑ / 0,3702		2,16↑ / 0,4971	1,80↓ / 0,082	1,19↓ / 0,388
4.	*mexG* (PA4205)	*mexH* (PA4206)	*mexI* (PA4207)	*opmD* (PA4208)	*lasR* (PA1430) (unbekannt)	*rhlR* (PA3477) (unbekannt)
	1,02↓ / >1	1,16↓ / 0,5548	1,01↑ / 0,7431	1,18↓ / 0,5793	1,27↓ / 0,3870	**5,76↓ / 0,0047**
5.	*mexJ* (PA3677)	*mexK* (PA3676)			*mexL* (PA3678) (Repressor)	
	1,05↓ / 0,8106	1,24↓ / 0,5299			2,31↓ / 0,0001	
6.	*mexX* (PA2019)	*mexY* (PA2018)		*oprM* (PA0427)	*mexZ* (PA2020) (Repressor)	
	7,26↑ / 0,0053	1,31↑ / 0,2070		1,15↑ / 0,5371	**2,74↑ / 0,0323**	
7.	*czrA* (PA2520)	*czrB* (PA2521)		*czrC* (PA2522)	*czrR* (PA2523) (Sensor)	*czrS* (PA2524) (Kinase)
	1,07↑ / 0,5097	1,30↑ / 0,3702		1,35↑ / 0,3702	1,11↑ / 0,5536	1,09↑ / 0,6318

5.6.3 Antibiotika-Resistenzverhalten von *P. aeruginosa*

Es wurde untersucht, ob die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und die Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm in ihren Resistenzen gegenüber Antibiotika im Vergleich zum Ausgangsstamm PA14 verändert sind.

Um zunächst einen Überblick über das Resistenzverhalten der IDH-Doppelmutante zu erhalten, wurden für die Stämme PA14Δ*icd*Δ*idh*, PA14 *mdh*::Gm und als Referenz PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) mit dem Automaten BD Phönix ein Standardantibiogram für Gram-negative Erreger erstellt, das eine Vielzahl verschiedener Antibiotikaklassen, wie Penicilline mit und ohne ß-Laktamase-Hemmer, Cephalosporine oder Aminoglykoside, einbezieht. Für jeden getesteten Stamm wurde als Ergebnis die minimale Hemmkonzentration (MHK) und deren Interpretation (sensibel, intermediär, resistent) angegeben.

Bei den Penicillinen konnte für Piperacillin bzw. Piperacillin/Tazobactam (Piperacillin plus ß-Laktamase-Hemmer) eine erhöhte MHK für die IDH-Doppelmutante im Vergleich zu PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) gemessen werden (Tabelle 5.10). Trotz Erhöhung der MHK ist der Stamm anhand der klinischen Grenzwerte weiterhin als sensibel zu beurteilen. Für die Cephalosporine

Cefepim und Ceftazidim wurde ebenfalls eine erhöhte Resistenz der IDH-Doppelmutante gemessen, die für beide Antibiotika durch Komplementierung kompensiert werden konnte. Das Resistenzverhalten der IDH-Doppelmutante gegenüber Cefepim wurde als intermediär eingestuft. Für Meropenem (Carbapenem) und für Aztreonam (Monobactam) wurde für die IDH-Doppelmutante eine leicht erhöhte MHK festgestellt (entspricht einem sensitiven bzw. intermediären Ergebnis). Sowohl für Levofloxacin als auch Moxifloxacin, aus der Klasse der Gyrasehemmer/-Chinolone, wurde jeweils eine leicht erhöhte MHK der IDH-Doppelmutante gemessen. Insgesamt zeigte die Mdh-Mutante dagegen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu PA14 (Daten nicht gezeigt). Einzige Ausnahme war das Gentamicin, dass sowohl bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*, der Komplementante PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) und der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm eine MHK-Veränderung verglichen zu PA14 zeigte, da bei allen Stämmen zu Klonierungszwecken eine Gentamicin-Resistenzkassette inseriert wurde.

Tabelle 5.10 Erstellung der MHK-Werte von *P. aeruginosa*
Ein Antibiogramm mittels BD Phönix wurde jeweils für PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) erstellt. Antibiotika mit veränderter MHK in der IDH-Doppelmutante im Vergleich zu PA14 und erfolgreicher Komplementation durch (p*icd*/*idh*), sind fett dargestellt. Interpretationen: sensibel (Grün), intermediär (Orange) und resistent (Rot).

Kommerzielle NMIC-64-Platte (Gram-negative)		**PA14**		**PA14Δ*icd*Δ*idh***		**PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*)**	
Antibiotikaklasse	**Antibiotikum**	**MHK [µg/ml]**	**Interp.**	**MHK [µg/ml]**	**Interp.**	**MHK [µg/ml]**	**Interp.**
Penicilline	Amoxicillin-Clavulansäure		R		R		R
	Ampicillin	>16	R	>16	R	>16	R
	Ampicillin-Sulbactam	>16/8	R	>16/8	R	>16/8	R
	Piperacillin	≤4	S	16	S	≤ 4	S
	Piperacillin-Sulbactam		S		S		S
	Piperacillin-Tazobactam	≤ 4/4	S	16\4	S	≤ 4/4	S
Cephalosporine	Cefazolin	> 16	R	> 16	R	> 16	R
	Cefepim	≤ 2	S	16	I	≤ 2	S
	Cefotaxim	> 32	R	> 32	R	32	R
	Ceftazidim	≤ 4	S	8	S	≤ 4	S
	Cefuroxim	> 16	R	> 16	R	> 16	R
Peneme	Imipenem	≤ 1	S	≤ 1	S	2	S
	Meropenem	≤ 1	S	2	S	≤ 1	S
Monobactame	**Aztreonam**	8	S	16	I	4	S
Epoxid	Fosfomycin	64	S	> 64	S	> 64	S
Gyrasehemmer / Chinolone	Ciprofloxacin	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S
	Levofloxacin	≤ 1	S	2	S	≤ 1	S
	Moxifloxacin	2	I	> 4	R	2	I
Tetracycline	Tetracyclin	> 8	R	> 8	R	> 8	R
Sulfonamide-Diaminopyrimidine	Cotrimoxazol	> 2/38	R	> 2/38	R	2/38	S
Aminoglykoside	Amikacin	≤ 16	S	≤ 16	S	≤ 16	S
	Gentamicin	≤ 2	S	> 8	R*	> 8	R*
	Netilmicin		S		R		R
	Tobramycin	≤ 2	S	≤ 2	S	≤ 2	S

* veränderte MHK aufgrund der Verwendung einer Gentamicin-Resistenzkassette (Gm^R) zur Konstruktion der Mutante

Zusammengefasst konnten bei der IDH-Doppelmutante v. a. für die ß-Laktam-Antibiotika Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Cefepim, Ceftazidim, Meropenem, und Aztreonam sowie die Chinolone Levofloxacin und Moxifloxacin erhöhte MHK-Werte festgestellt und die Veränderung durch Komplementierung kompensiert werden. Da mehrere Antibiotikaklassen betroffen sind, kann vermutet werden, dass eine Überlappung von unspezifischen Resistenzmechanismen besteht, verursacht z. B.

durch Veränderungen in Porinen und/oder Effluxpumpen. Da es sich bei den veränderten MHK-Werten ggf. auch um methodisch bedingte Schwankungen handeln könnte, wurden die Ergebnisse für ausgewählte Antibiotika im Epsilometer-Test (E-Test) nochmal überprüft.

5.6.4 Bestimmung der MHK von *P. aeruginosa* mittels Epsilometer-Test (E-Test)

Beim E-Test wurde die MHK von dem PA14-Stamm, der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und dessen Komplementante PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) für jeweils mindestens ein Antibiotikum einer größeren Antibiotikaklasse gewählt. Neben Piperacillin mit und ohne Tazobactam, Cefepim, Ceftazidim und Meropenem wurde Ciprofloxacin für die Klasse der Gyrasehemmer/Chinolone ausgewählt, da es besonders wegen seiner ausgeprägten Wirksamkeit bei der Antibiotikatherapie für CF-Patienten bekannt ist. Aus der Klasse der Aminoglykoside wurde die MHK von Tobramycin bestimmt, weil die IDH-Doppelmutante und die Komplementante aufgrund der eingeführten Antibiotikakassette eine Resistenz gegen das Aminoglykosid Gentamicin aufweisen. Aufgrund fehlender signifikanter Unterschiede beim Phoenix™ wurde die Mdh-Mutante nicht weiter getestet.
Insgesamt waren alle beim E-Test gemessenen MHK-Werte bis auf Piperacillin mit und ohne Tazobactam gleich oder niedriger als die mittels Phoenix™ gemessenen MHK-Werte (Tabelle 5.11). Mittels E-Test wurde zusätzlich für Ciprofloxacin und Tobramycin eine 2-fache bzw. 3-fache erhöhte MHK festgestellt. Für Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam und Cefepim konnte die erhöhte MHK der IDH-Doppelmutante bestätigt werden, was zeigt, dass die IDH-Doppelmutante resistenter gegenüber bestimmte Antibiotika als PA14 ist. In der Abbildung 5.39 sind die Hemmhöfe der getesteten Stämme für Piperacillin und Cefepim gezeigt.

Tabelle 5.11 Messung der MHK mittels E-Test für PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*)
Die MHK der Stämme PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) wurden mit Hilfe des E-Tests für spezielle Antibiotika bestimmt.

	MHK-Bestimmung [µg/ml]		
Antibiotikum	PA14	PA14Δ*icd*Δ*idh*	PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*)
Piperacillin	6	64	6
Piperacillin-Tazobactam	8	64	6
Cefepim	2	8	2
Ceftazidim	1,5	6	1,5
Meropenem	0,38	2	0,5
Ciprofloxacin	0,19	0,5	0,19
Tobramycin	1,5	2	1,5

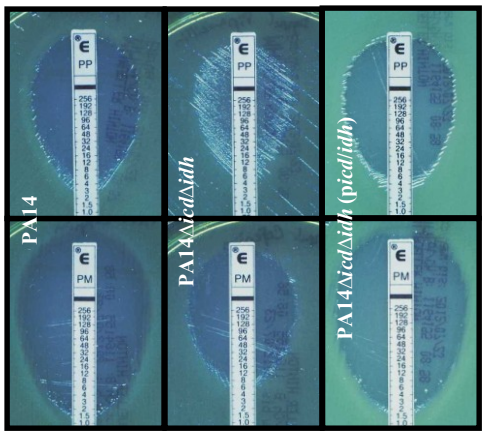


Abbildung 5.39 E-Tests für Piperacillin und Cefepim
Die E-Test-Platten der drei getesteten Stämme PA14, IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) sind für Piperacillin und Cefepim gezeigt.

5.6.5 Bestimmung der ß-Laktamase-Aktivität von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*)

Wie in den Experimenten unter 5.6.3 und 5.6.4 gezeigt werden konnte, weist die IDH-Doppelmutante im Vergleich zu PA14 höhere MHK-Werte für ß-Laktam-Antibiotika auf. Die MHK-Unterschiede konnten durch Komplementation mit p*icd*/*idh* kompensiert werden. Eine Erklärung für die erhöhte ß-Laktam-Resistenz könnte durch eine veränderte Aktivität der ß-Laktamase AmpC von *P. aeruginosa* begründet werden. Dazu sollten die Stämme auf ihre ß-Laktamase-Enzym-Aktivität hin mit Hilfe des sog. Nitrocefinase-Tests überprüft werden. Bei diesem Test wird das Substratanalogon Nitrocefin (Cephalosporin) verwendet, dessen Spaltung des ß-Laktamringes durch ß-Laktamasen mit einer Farbveränderung von gelb zu rot einhergeht. Die Mdh-Mutante wurde nicht weiter untersucht, da bei diesem Stamm keine signifikanten Unterschiede in den MHK-Werten feststellbar waren.
Für dieses Experiment wurden die Bakterienzellen zu einem in der exponentiellen Phase (OD_{600} = 1,0; OD1) und zum anderen in der stationären Phase (OD_{600} = 3,0; OD3) geerntet. Für die OD1-Stämme war zu beobachten, dass die IDH-Doppelmutante im zeitlichen Verlauf eine höhere ß-Laktamase-Aktivität als der Ausgangsstamm PA14 aufwies (Abbildung 5.40). Dieser Effekt konnte vollständig durch die Komplementante PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) kompensiert werden. Eine Sättigung der Substratumsetzung wurde beim PA14 und der Komplementante nach ca. 40 min und bei der IDH-Doppelmutante nach ca. 20 min erreicht. Für die drei Stämme aus der stationären Phase (OD3) konnte eine ähnliche Tendenz beobachtet werden, jedoch erfolgte eine schnellere Sättigung der Substratumsetzung für PA14 nach ca. 40 min, für die IDH-Doppelmutante nach ca. 10 min und für die Komplementante nach ca. 16 min (Abbildung 5.41). Die ß-Laktamase-Aktivität der IDH-Doppelmutante konnte durch die Komplementante PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) nur zum Teil kompensiert werden. Sowohl für die OD1 als auch OD3 Stämme liegen alle Messungen über der Positiv- (*S. aureus*, Nitrocefinase positiv) und Negativkontrolle (*S. aureus*, Nitrocefinase negativ). Zusammengefasst konnte sowohl für Zellen der IDH-Doppelmutante aus der exponentiellen und

stationären Phase eine höhere ß-Laktamasen-Aktivität als beim PA14-Stamm und der Komplementante PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*/*idh*) gemessen werden.

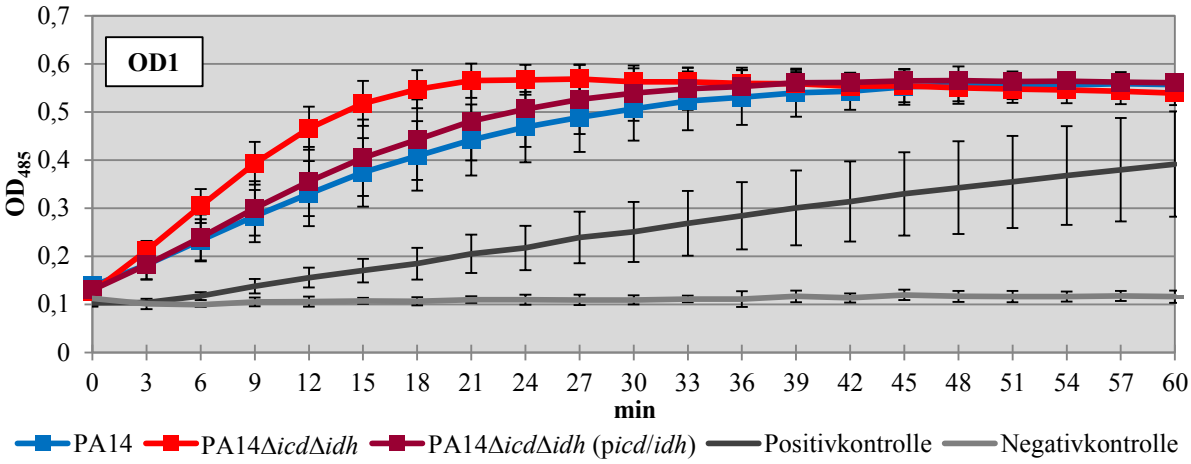


Abbildung 5.40 Bestimmung der ß-Laktamase-Aktivität von *P. aeruginosa* aus der exponentiellen Phase
Mit Hilfe des Nitrocefinase-Tests wurde die ß-Laktamase-Aktivität von *Pseudomonas*-Stämmen aus der exponentiellen Phase bestimmt. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten die Stämme *S. aureus* ATCC29213 (Cefinase-positiv) und *S. aureus* ATCC25923 (Cefinase-negativ). Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

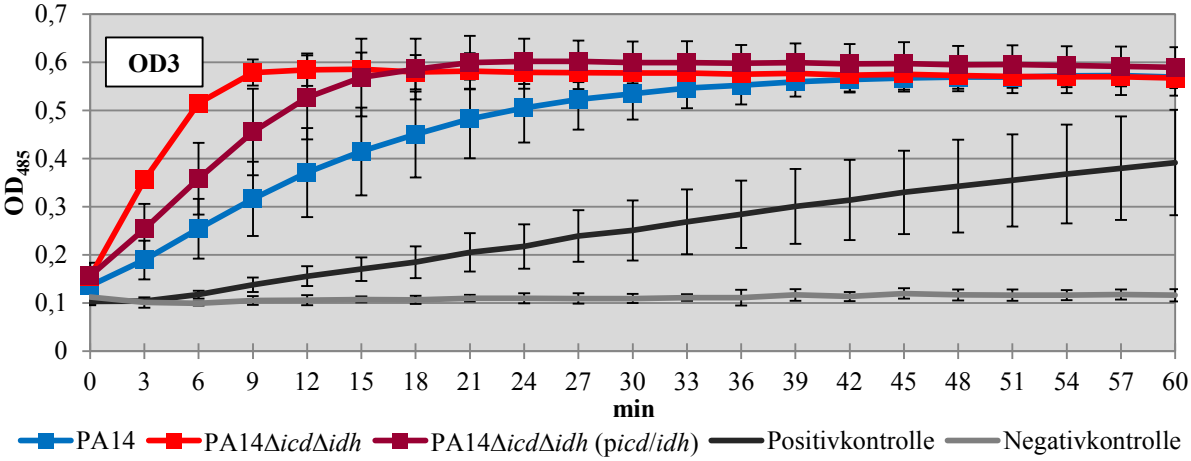


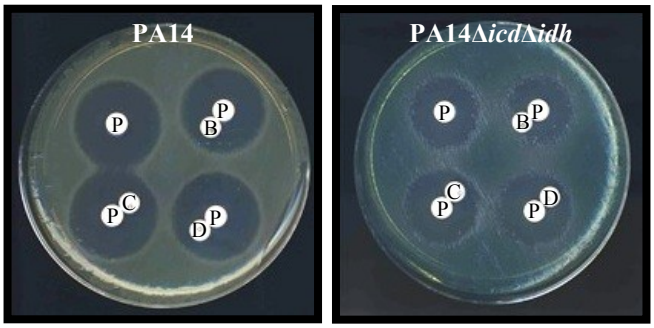
Abbildung 5.41 Bestimmung der ß-Laktamase-Aktivität von *P. aeruginosa* aus der stationären Phase
Mit Hilfe des Nitrocefinase-Tests wurde die ß-Laktamase-Aktivität von *Pseudomonas*-Stämmen aus der stationären Phase bestimmt. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten die Stämme *S. aureus* ATCC29213 (Cefinase-positiv) und *S. aureus* ATCC25923 (Cefinase-negativ). Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.6.6 Bestimmung der ß-Laktamase AmpC von PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh*

In den Experimenten zuvor konnte gezeigt werden, dass die IDH-Doppelmutante eine höhere ß-Laktamase-Aktivität aufweist als PA14. Da *P. aeruginosa* zwei ß-Laktamasen AmpC und PoxB besitzt (Kong *et al.*, 2005), kann nicht genau gesagt werden, wie groß der Einfluss der in *P. aeruginosa* natürlich vorkommenden ß-Laktamase AmpC war. Die Transkriptomdaten geben keinen Anhalt auf eine erhöhte AmpC-Aktivität in der IDH-Doppelmutante, jedoch muss erwähnt werden, dass die Bakterien für die Transkriptomanalysen nicht mit Antibiotika bei der Anzucht

induziert wurden. Zur eventuellen Klärung des Stellenwertes der AmpC wurde ein AmpC & ESBL Detection Set (MAST-Test) durchgeführt, wobei das Testen einer *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) aus versuchstechnischen Gründen mit durchgeführt wurde. Mit dem MAST-Test für *Enterobacteriaceae* können, unabhängig davon wie *amp*C-Gene kodiert oder exprimiert werden, plasmidische und intrinsisch dereprimierte, induzierbare oder hyperproduzierende AmpC ß-Laktamasen nachgewiesen werden (www.mast-diagnostica.com). Dabei wird ein AmpC-Stimulator, der die AmpC-Produktion fördert, mit ESBL- und AmpC-Inhibitoren kombiniert, die wiederum das aktive Zentrum des Enzyms blockieren. Da *P. aeruginosa* keine Resistenz gegenüber Cefpodoxim zeigte, wurde statt dem Testplättchen A (enthält Cefpodoxim) ein Plättchen mit Piperacillin (30 µg) verwendet. Für die Plättchen B - D wurde jeweils ein Piperacillin-Plättchen dazugelegt.

Obwohl bekannt war, dass der MAST-Test für *Enterobacteriaceae* und nicht für *P. aeruginosa* ausgelegt ist, wurde dieser Test jedoch aufgrund seiner leichten und schnellen Durchführung in einem Vorversuch mit *P. aeruginosa* getestet, um dabei erste Erkenntnisse über eine mögliche Inhibierung der ß-Laktamase AmpC zu erhalten. Wie die Abbildung 5.42 zeigt, konnte mit dem MAST-Test bei PA14 und der IDH-Doppelmutante keine AmpC (und ESBL) nachgewiesen werden. Ob die Konzentration der Borsäure auf dem Testplättchen zu gering war, um eine Inhibierung der ß-Laktamase AmpC zu bewirken, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr untersucht werden.



P = Piperacillin (30 µg)
B = ESBL-Inhibitor
C = AmpC-Inhibitor
D = ESBL-Inhibitor + AmpC-Inhibitor

Abbildung 5.42 Bestimmung der AmpC von PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh*
Der Einfluss der AmpC beider Stämme wurde im MAST-Test bestimmt. Ein Testplättchen mit Piperacillin (30 µg) ersetzte das Testplättchen A mit Cefpodoxim aus dem MAST-Test-Kit und wurde zusätzlich zu den Plättchen B - D dazugelegt.

5.7 Charakterisierung der CF-Isolate M1 mit M25

Durch die Charakterisierungen der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*, beider IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Gm und PA14 *idh*::Gm sowie der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm konnten wichtige Zusammenhänge zwischen Metabolismus, Virulenz und Resistenz gegenüber dem redoxaktiven Paraquat und verschiedener Antibiotika nachgewiesen werden. Im Weiteren stellte sich die Frage, welche Schlussfolgerungen diese Erkenntnisse im Hinblick auf die Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge zulassen. Der Verlust von Virulenzeigenschaften und eine erhöhte Resistenz, wie bei der IDH-Doppelmutante festgestellt, gehören zu den typischen Eigenschaften späterer Lungen-adaptierter CF-Isolate. Um die Phänotypen der Mutanten und der CF-Isolate besser vergleichen zu können, wurde das Früh-Isolat M1 und das Spät-Isolat M25 in den weiteren Versuchen näher charakterisiert. Zum Teil wurden PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh* für Vergleiche herangezogen. Teilweise vorher vollzogene Versuche, wie Bestimmungen von Virulenzfaktoren (Schwärmen, Elastase, Pyocyanin), sind bereits in Hoboth *et al.*, 2009 beschrieben und wurden in dieser Arbeit bestätigt.

5.7.1 Wachstumsversuche mit den CF-Isolaten M1 und M25 in Flüssigmedien

5.7.1.1 Aerobes Wachstum von M1 und M25

Bei dem Vergleich des Wachstums unter aeroben Bedingungen in LB-Medium ist erkennbar, dass der Non-Mutator M1 sich ähnlich zu PA14 verhält, während der Mutator M25 einen Wachstumsdefekt ähnlich wie die IDH-Doppelmutante aufweist (Abbildung 5.43). Während die Generationszeiten für PA14 37,6 min und beim M1 37,8 min betrugen, konnten stark verlängerte Generationszeiten bei PA14Δ*icd*Δ*idh* und bei M25 (52,0 min bzw. 45,2 min) festgestellt werden.

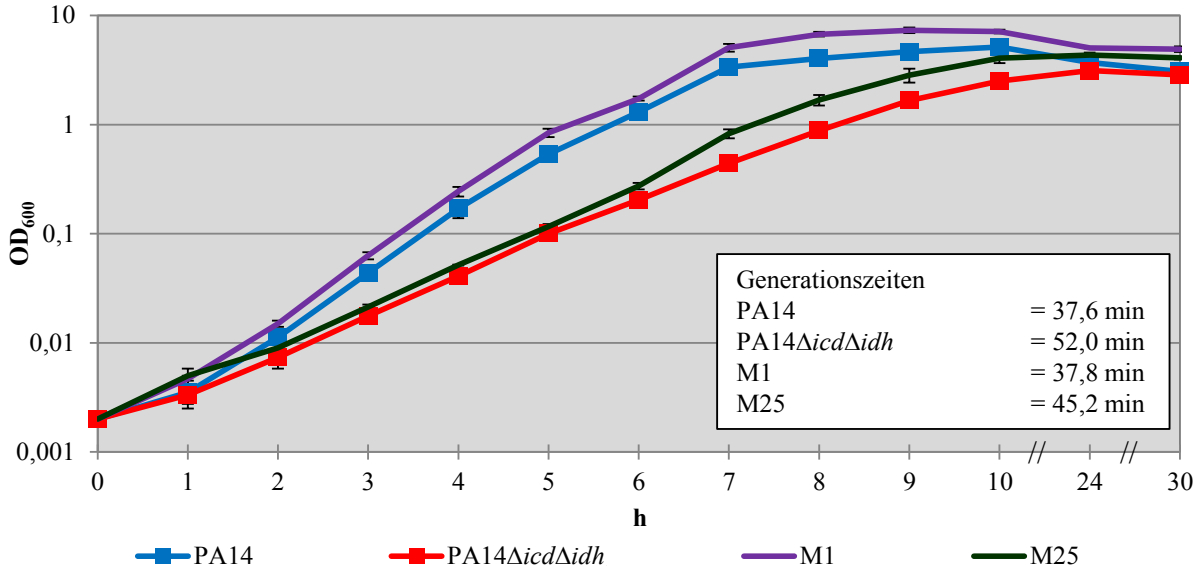


Abbildung 5.43 Aerobe Wachstumskurven von M1 und M25
Das aerobe Wachstum der CF-Isolate M1 und M25 wurde über einen Zeitraum von 30 h in LB-Medium photometrisch bestimmt. Zum Vergleich wurden die Wachstumskurven von PA14 und der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* einbezogen. Für die Generationszeiten wurde der Zeitraum 3 - 7 h gewählt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Ebenso wurde das aerobe Wachstumsverhalten der CF-Isolate M1 und M25 in ASM bestimmt (Abbildung 5.44). Im Vergleich zum Wachstum in LB-Medium konnte dabei eine längere *lag*-Phase bei M1 und M25 beobachtet werden. Auch unter diesen Bedingungen verhielten sich M1 und PA14 sowie M25 und die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* vergleichbar zueinander.

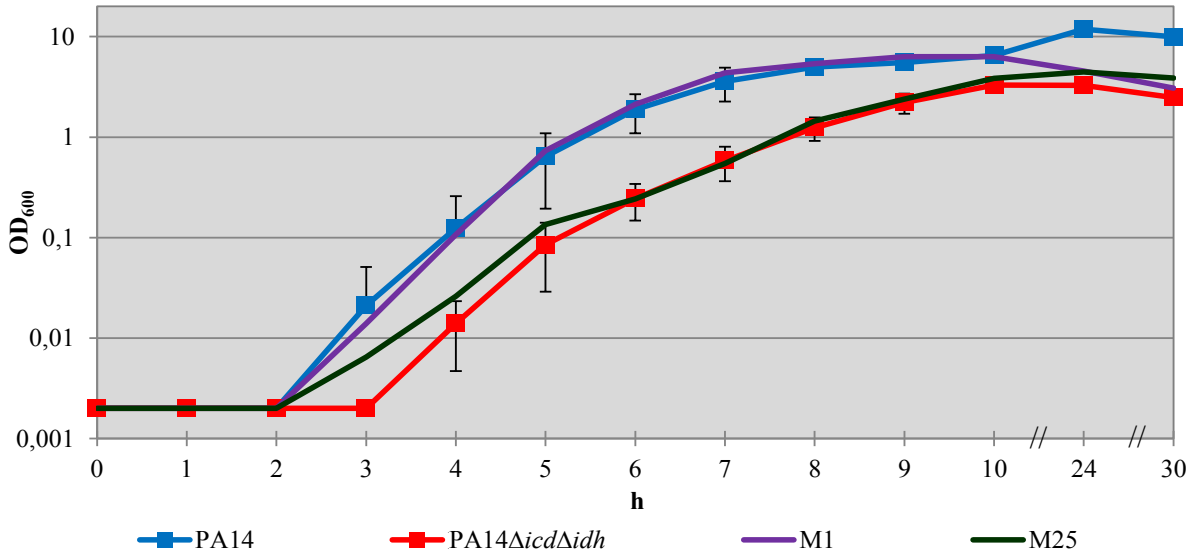


Abbildung 5.44 Aerobe Wachstumskurven von M1 und M25 in ASM
Das aerobe Wachstum der CF-Isolate M1 und M25 wurde über einen Zeitraum von 30 h in ASM photometrisch bestimmt. Zum Vergleich wurden die Wachstumskurven von PA14 und der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* einbezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.7.1.2 Anaerobes Wachstum von M1 und M25

Neben den aeroben Wachstumsversuchen wurden Wachstumsversuche beider CF-Isolate unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium und ASM bestimmt. Dabei konnte in LB-Medium beobachtet werden, dass M1 und M25 in der Exponentialphase (2 - 6 h) sich stark im Wachstum unterschieden (Abbildung 5.45). Die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* wuchs zunächst in dieser Phase (2 - 7 h) schlechter als die CF-Isolate M1 und M25 und nach 24 h Stunden konnten bei PA14 und der IDH-Doppelmutante OD_{600}-Werte von über 1,0 gemessen werden, während die der CF-Isolate stetig darunter lagen.

Unter anaeroben Wachstumsbedingungen in ASM konnten zwischen M1 und M25 keine Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 5.46). Zwischen 3 - 6 h zeigte die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gegenüber den anderen drei Stämmen ein reduziertes Wachstumsverhalten. Erneut wurden von beiden CF-Isolaten OD_{600}-Werte von 1,0 nicht überschritten, jedoch von PA14 und der IDH-Doppelmutante nach 24 h.

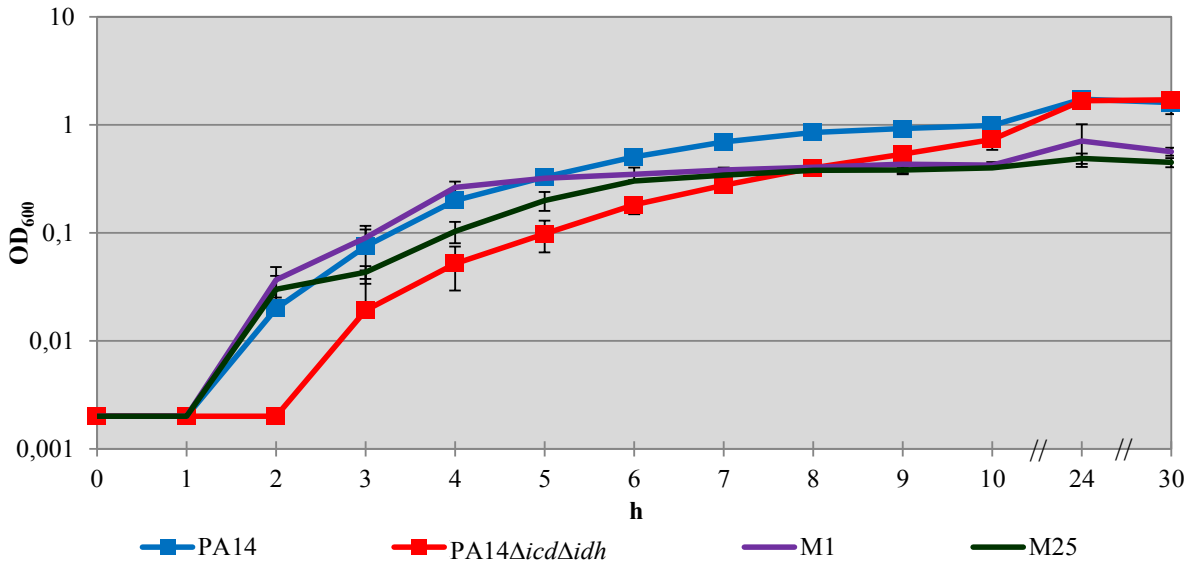


Abbildung 5.45 Anaerobe Wachstumskurven von M1 und M25
Das anaerobe Wachstum der CF-Isolate M1 und M25 wurde über einen Zeitraum von 30 h in LB-Medium photometrisch bestimmt. Zum Vergleich wurden die Wachstumskurven von PA14 und der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* einbezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

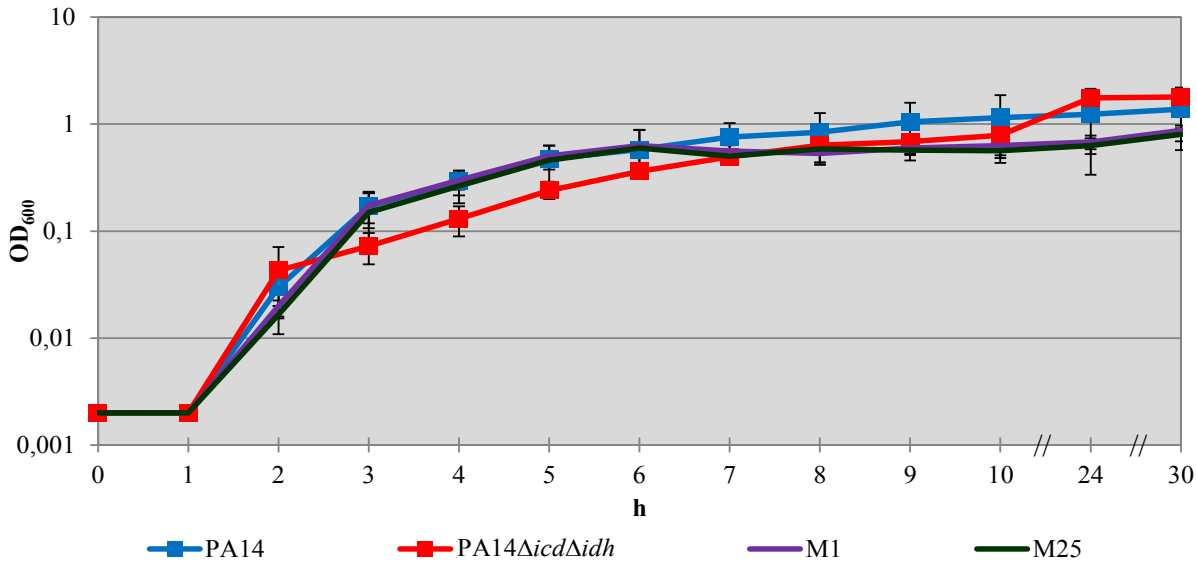


Abbildung 5.46 Anaerobe Wachstumskurven von M1 und M25 in ASM
Das anaerobe Wachstum der CF-Isolate M1 und M25 wurde über einen Zeitraum von 30 h in ASM photometrisch bestimmt. Zum Vergleich wurden die Wachstumskurven von PA14 und der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* einbezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.7.2 Bestimmung der Isocitratdehydrogenase-Aktivität von M1 und M25

In Transkriptomanalysen wurde eine höhere Expression der Isocitratdehydrogenasegene für *icd* und *idh* bei M25 im Vergleich zu M1 gezeigt (Hoboth *et al.*, 2009). Interessanterweise ergaben die IDH-Enzym-Aktivitätsmessungen einen gegenteiligen Effekt zwischen M1 und M25. Bei M1 wurde eine ca. 3-fach höhere IDH-Enzym-Aktivität als bei M25 gemessen (Abbildung 5.47 A). Wie die Ergebnisse der BN-PAGE zeigen, geht die Enzym-Aktivität von M1 v. a. auf die Aktivität der Icd

zurück (Abbildung 5.47 B). Dagegen wurde bei M25 eine kräftigere Bande und somit eine höhere Enzym-Aktivität der Idh beobachtet. Die Bande für Icd war nur schwach ausgeprägt oder war mit bloßem Auge nicht erkennbar. Diesem Ergebnis zufolge kommt es im Rahmen der Adaptation an die CF-Lunge zu einer Verschiebung der Icd/Idh-Aktivitäten (Aktivitäten von M1: Icd > Idh und M25: Icd < Idh), wobei die Isocitratdehydrogenase-Aktivität bei M25 insgesamt deutlich abnimmt. Inwieweit posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierungen) die Ergebnisse beeinflussten, konnte mit beiden Methoden nicht festgestellt werden.

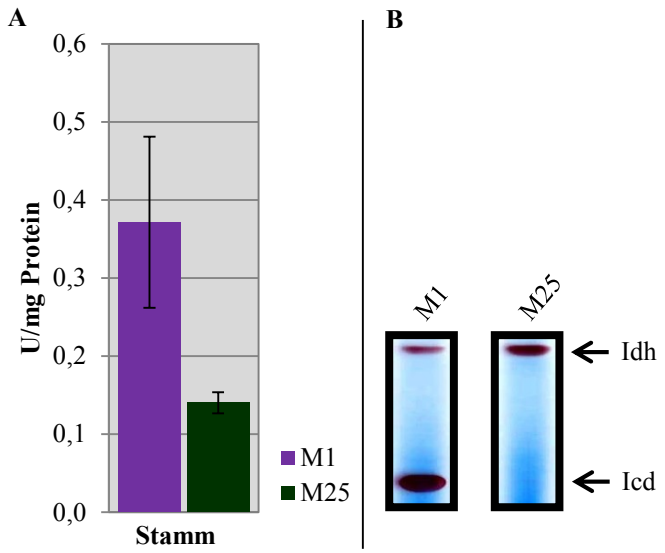


Abbildung 5.47 Bestimmung der enzymatischen Isocitratdehydrogenase-Aktivität von M1 und M25
Die enzymatische Aktivität beider Isoenzyme Icd und Idh wurde zu einem über den *in vitro*-Enzymassay (A) und über die BN-PAGE Methode (B) bestimmt. Experimente wurden mindestens in Duplikaten durchgeführt. (Für A p-Wert ≤ 0,01; für B ein Vergleich mit PA14 siehe Abbildung 5.15)

5.7.3 Virulenzfaktoren bei M1 und M25

Wie bereits erwähnt, kommt es bei adaptierten Mutator-Stämmen oft zu dem Verlust von Virulenzfaktoren (Hogardt and Heesemann, 2010), so auch bei M25 im Vergleich zum Non-Mutator-Stamm M1. Viele Virulenzfaktoren der CF-Isolate M1 und M25, z. B. Motilität oder sekretierte Virulenzfaktoren, wurden zum Teil bereits näher untersucht und charakterisiert (Hoboth *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse sollten in dieser Arbeit nochmals bestätigt und mit den Ergebnissen der neu getesteten Virulenzphänotypen wie beispielsweise Biofilm-Bildung oder Paraquat-Resistenz in diesem Abschnitt zusammengefasst werden.

5.7.3.1 Bestimmungen der Motilität von M1 und M25

In allen drei Motilitätsformen Schwimmen, *Twitching* und Schwärmen konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Non-Mutator M1 eine noch bessere Motilität aufwies als der Mutator M25, wobei der deutlichste Unterschied beim Schwimmverhalten beobachtet wurde (Abbildung 5.48).

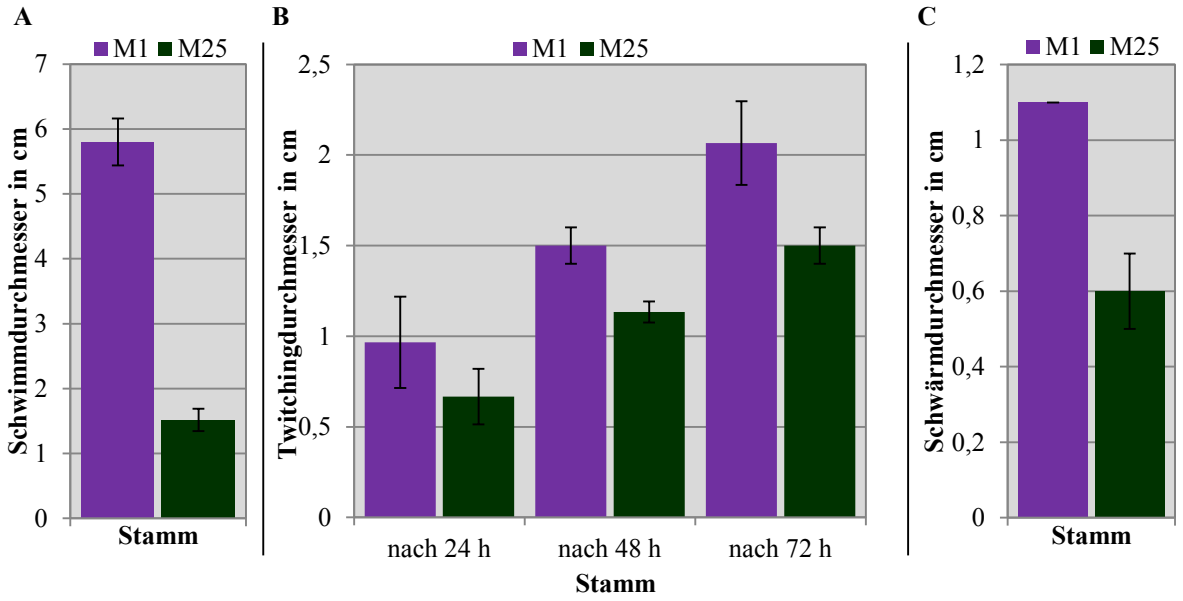


Abbildung 5.48 Bestimmungen aller drei Motilitätsformen von M1 und M25
Das Schwimm- (A), das *Twitching*- (B) und das Schwärmverhalten (C) wurden bei M1 und M25 untersucht. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (p-Werte ≤ 0,001 (Schwimmen), ≤ 0,01 und ≤ 0,05 (*Twitching* 48 h und 72 h), ≤ 0,001 (Schwärmen))

5.7.3.2 Vergleichende Bestimmungen der Biofilm-Bildung von M1 und M25

Über die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung von M1 und M25 kann sowohl für aerobe als auch anaerobe Bedingungen leider keine konkrete Aussage getroffen werden. In beiden Fällen waren die Abweichungen der Messungen wegen der schlechten Reproduzierbarkeit so hoch, das eine sinnvolle Auswertung nicht möglich ist. In der Tendenz ist jedoch zu erkennen, dass M1 unter aeroben weniger und unter anaeroben Bedingungen mehr Biofilm produzierte als M25 (Abbildung 5.49).

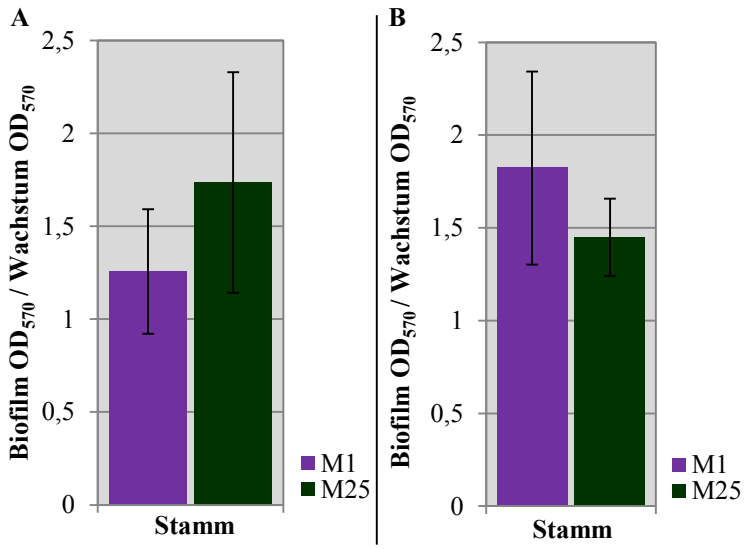


Abbildung 5.49 Messung der relativen Biofilm-Bildung bei M1 und M25
Die Biofilm-Bildung der Stämme M1 und M25 bezogen auf das Wachstum (relativ) wurde unter aeroben (A) und unter anaeroben (B) Bedingungen getestet. Mittelwerte und Standard-abweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.7.3.3 Sekretierte Virulenzfaktoren (Elastase, Proteasen und Pyocyanin) durch M1 und M25

Bei beiden CF-Isolaten konnte Elastase-Aktivität nachgewiesen werden, wobei M25 signifikant höhere Werte zeigte (Abbildung 5.50 A). Eine Protease-Aktivität dahingegen konnte ausschließlich nur beim M1 beobachtet werden (Abbildung 5.50 B). Beim M1 wurde eine hohe Pyocyanin-Produktion bezogen auf das Wachstum (relativ) gemessen, während M25 keine Aktivität mehr aufwies (Abbildung 5.50 C).

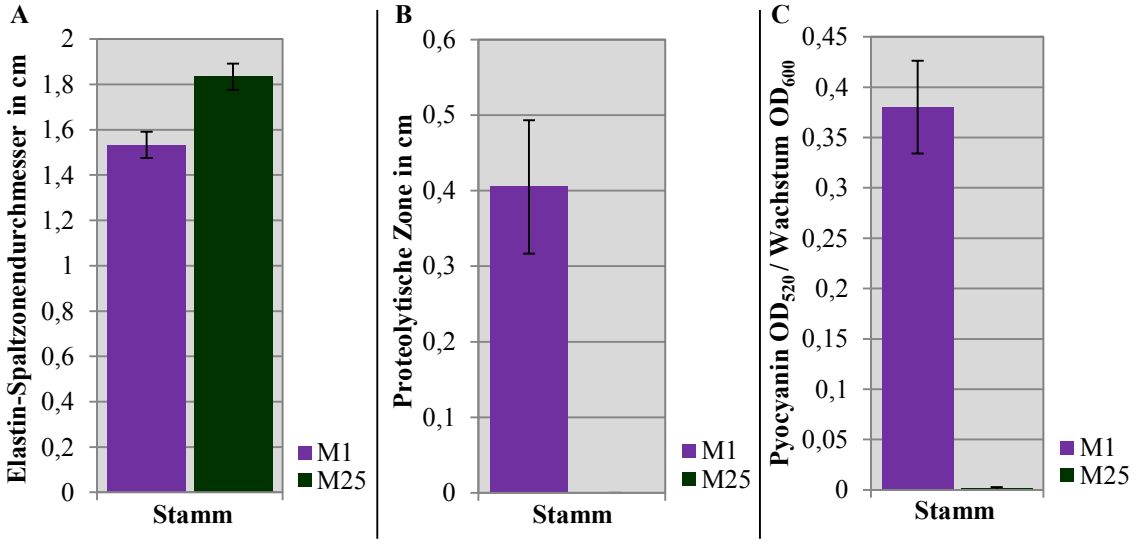


Abbildung 5.50 Bestimmung von sekretierten Virulenzfaktoren durch M1 und M25
Es wurde die Elastase-Aktivität (A), Protease-Aktivität (B) und Pyocyanin-Produktion (C) für M1 und M25 bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (p-Werte ≤ 0,01 (Elastase-Aktivität), ≤ 0,001 (Protease-Aktivität), ≤ 0,001 (Pyocyanin-Produktion))

5.7.3.4 Erstellung des LPS-Profils von M1 und M25

Die LPS-Profile von M1 und M25 zeigen leichte Unterschiede im Bereich von 34 - 55 kDa. Während beim M1 leichte „schwache Banden“ zusätzlich zu sehen sind, zeigt M25 ein LPS-Bandenmuster wie der Stamm PA14 (Bild des Silbergels im Anhang 8.3).

5.7.3.5 Bestimmung der Paraquat-Resistenz von M1 und M25

Beide CF-Isolate M1 und M25 wurden verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt, wobei keine signifikanten Unterschiede für die Substanzen Hypochlorit, Wasserstoffperoxid, Natrium- und Eisenchlorid nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Allein mit Paraquat, wie bereits beim Vergleich IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und dem PA14-Stamm, konnte ein Unterschied beobachtet werden. Wie die Abbildung 5.51 zeigt, ist das Früh-Isolat M1 (höhere IDH-Aktivität) signifikant sensitiver als M25 (geringere IDH-Aktivität).

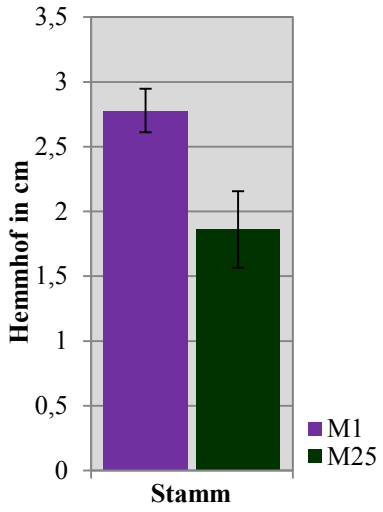


Abbildung 5.51 Bestimmung der Resistenz gegenüber Paraquat von M1 und M25
Die ausgewählten CF-Isolate wurden mit jeweils einem 30 µl-Tropfen einer 2 %-igen Paraquatlösung inkubiert und nach 24 h wurde der Hemmhof in cm bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (p-Wert ≤ 0,001)

5.8 Identifizierung von Punktmutationen (SNPs) in *icd* und *idh* bei den sequentiellen CF-Isolaten M1 und M25 von *P. aeruginosa*

Da bei dem Spät-Isolat M25 entgegen der Erwartungen eine niedrigere Enzym-Aktivität der Isocitratdehydrogenase verglichen zum Früh-Isolat M1 gemessen wurde, stellte sich die Frage, ob eine oder mehrere Mutation(en) im *icd*- oder *idh*-Gen bei M25 vorliegen. Zusätzlich handelt es sich bei dem M25 CF-Isolat um einen Mutator-Stamm, sodass aufgrund des inaktiven MMR-Reparatursystems eine hohe Anzahl an Mutationen im Vergleich zum M1 zu erwarten war. Die Selektion von Mutationen im M25-Genom könnte einen Einfluss auf die unterschiedlichen Phänotypen zwischen M1 und M25 haben. Dabei konnte allerdings nicht festgestellt werden, welche Rolle die Isocitratdehydrogenase im Einzelnen z. B. bei der Kontrolle von Virulenzfaktoren spielt. Um evtl. Gensequenzunterschiede zwischen beiden CF-Isolaten bei der Isocitratdehydrogenase zu finden, wurden jeweils die Gene *icd* und *idh* mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

Nach der Sequenzierung des *icd*-Gens von M1 (Non-Mutator) und M25 (Mutator) wurde festgestellt, dass bei M25 eine Punktmutation (*single nucleotid polymorphism*; SNP) an der Position C683T (Allel *icd1*) des *icd*-Gens vorkommt, die zur Kodonveränderung führt (T228I ≙ Icd1). Um zu prüfen, ob der Austausch T228I zu einer Proteinstrukturveränderung führen könnte, wurde die software-basierte Tertiärstruktur der Icd von *E. coli* zum Vergleich herangezogen (Abbildung 5.52), da die Proteinstruktur von *E. coli* mit Hilfe der Röntgenkristallographie im Gegensatz zu *P. aeruginosa* schon bekannt ist (Hurley *et al.*, 1990;Hurley *et al.*, 1991). Die um zwei Aminosäuren längere Isocitratdehydrogenase von *P. aeruginosa* (418 AS) ist zu 79 % identisch mit der von *E. coli* (416 AS). Durch Sequenzvergleiche (beide *Pseudomonas*-Stämme PA14/PAO1 und *E. coli*) konnte festgestellt werden, dass das Isoleucin zu Beginn eines konservierten Bereiches von über 20 AS liegt (Daten nicht gezeigt). Es befindet sich nicht in unmittelbarer Nähe des katalytischen Zentrums und der Bindungsstelle von $NADP^+$, jedoch wird das um vier Aminosäuren entfernte Lysin 232 (K232) für die

Bindung des Isocitrats im aktiven Zentrum benötigt (Thorsness and Koshland, 1987;Hurley *et al.*, 1990;Hurley *et al.*, 1991). Es ist beschrieben, dass ein Austausch K232 zu einem Methionin nicht zu einer veränderten Faltung des Proteins, jedoch zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität führt (Bolduc *et al.*, 1995;Lee *et al.*, 1995). Bevor getestet wurde, ob die Mutation C683T in *icd1* einen Einfluss auf die Enzym-Aktivität hat, wurden weitere Mutator-Stämme V43, P24 und HM1 - 14 (Hogardt *et al.*, 2006;Hoboth *et al.*, 2009) hinzugezogen, um zu sehen, ob weitere SNPs in den Genen *icd* und *idh* auch bei anderen CF-Isolaten vorkommen. Dabei wurden nur SNPs berücksichtigt, die letztendlich zu einem Aminosäurenaustausch führen und zum anderen die weder in PAO1 noch in PA14 vorkommen.

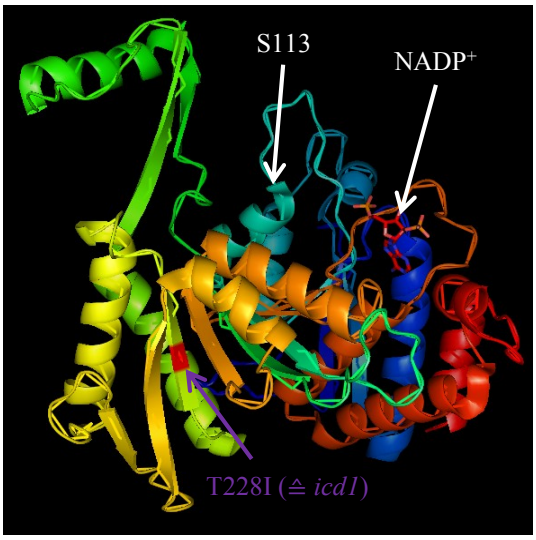


Abbildung 5.52 Lokalisation des in Icd gefundenen Aminosäurenaustauschs von M25 durch den Vergleich mit der bekannten Struktur der IcdA von *E. coli*
Zur Lokalisation des SNPs (*icd1*) bzw. des dazu gehörigen Aminosäurenaustauschs T228I im Icd Protein (Icd1), wurde die Kristallstruktur der Icd von *E. coli* herangezogen. Dieses einzig in *E. coli* vorkommende Protein ist zu 79 % identisch mit der Icd aus *P. aeruginosa* (Daten nicht gezeigt). (Datei 9ICD.pdb erhalten von www.rcsb.org und modifiziert mit der Software Pymol)

Während noch bei allen getesteten Stämmen bei einem DNA-Sequenzvergleich im *icd*-Gen eine gewisse Anzahl von SNPs entdeckt wurde, konnte auf Proteinebene lediglich nur Icd1 bei M25 beobachtet werden (siehe Anhang 8.4.1). Somit handelte es sich bei allen anderen Stämmen um stille Mutationen. Um zu klären, ob es sich bei *icd1* um eine Anpassung an die CF-Lunge handelt, wurde das *icd*-Gen bzw. das Icd-Protein mit weiteren intraspezifischen *P. aeruginosa*-Stämmen verglichen (Daten nicht gezeigt). Da keiner der weiteren getesteten Stämme diesen SNP aufwies (www.pseudomonas.com, SNP map), kann von einer Anpassung des Icd1 im M25 Stamm ausgegangen werden.

Ebenso wurde zwischen den Genen *icd* und *idh* im intergenischen Bereich (358 bp) lediglich bei HM10 (A48T) sowie bei P24 und HM14 (A214G) SNPs entdeckt (siehe Anhang 8.4.2). Durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* 39016 ebenfalls an der Position 214 ein G im intergenischen Bereich besitzt, während der SNP A48T keinen anderen *P. aeruginosa*-Stamm zugewiesen werden konnte (www.pseudomonas.com, SNP map; Daten nicht gezeigt). Um zu zeigen, welche Auswirkungen diese SNPs auf den nicht-kodierenden Bereich haben, müssten weitere

Experimente wie beispielsweise Promotoranalysen durchgeführt werden. Diese Experimente wurden jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Wie schon bei *icd* wurde auch bei Sequenzvergleichen von *idh* eine größere Anzahl an stillen Mutationen entdeckt, jedoch auch vier unterschiedliche SNPs, die für verschiedene Aminosäurenaustausche verantwortlich sind (siehe Anhang 8.4.3). Die Stämme M1, M25, HM1, HM3, HM4, HM5, HM11 und HM13, die jeweils einen gemeinsamen SNP an der Position G1347C (Allel *idh1*) tragen, bilden die größte Gruppe. Durch diesen SNP kommt es auf Proteinebene zu einem Austausch der Aminosäure Lysin (PAO1) bzw. Glutamat (PA14 und die übrigen Stämme) zu Aspartat (K/E449D ≙ Idh1). Die Stämme V43, HM2 und HM6, die die zweitgrößte Gruppe bilden, enthalten je einen SNP T215C (Allel *idh2*), der einen Aminosäurenaustausch von Valin zu Alanin (V72A ≙ Idh2) bewirkt. Gefolgt von den Stämmen P24 und HM14 konnte ein weiterer SNP an der Stelle G2182A (Allel *idh3*) entdeckt werden. Das neu gebildete Basentriplett kodiert für Histidin anstelle von Arginin (R728H ≙ Idh3). Ausschließlich HM7 trägt ein SNP an der Position A2123G (Allel *idh4*), das zu einem Austausch von Lysin zu Arginin (K708R ≙ Idh4) führt.

Zum Strukturvergleich der Idh-Varianten (Idh1 - Idh4) wurde die bereits software-basierte kristallographierte Tertiärstruktur der Idh aus *Azotobacter vinelandii* herangezogen (Abbildung 5.53) (Yasutake *et al.*, 2002). Dieses Protein ist zu 66 % mit der Idh aus *P. aeruginosa* identisch und beide Proteine bestehen insgesamt aus 741 Aminosäuren. Alle vier entdeckten Aminosäurenaustausche der Idh-Varianten liegen nach diesem Modell nicht in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums oder der $NADP^+$-Bindungsstelle. Die nur durch Proteinvergleiche bekannten Aminosäurenpositionen K255 und Y420 (www.uniprot.org), deren Austausch zu einer vorhergesagten verminderten Enzym-Aktivität führt, liegen nicht in direkter Nähe zu den zuvor erwähnten vier Aminosäurenaustausche. Bis zu diesem Zeitpunkt ist nichts über weitere Aminosäurenpositionen in der Literatur bekannt.

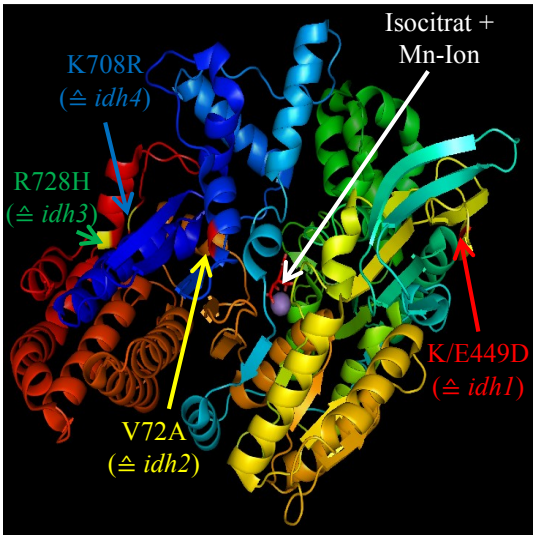


Abbildung 5.53 Lokalisation der in Idh gefundenen Aminosäurenaustausche von CF-Isolaten durch den Vergleich mit der bekannten Struktur der Idh von *A. vinelandii*
Um die gefundenen SNPs (*idh1-4*) und die dazu gehörigen Aminosäurenaustausche im Protein zu lokalisieren, wurde die bekannte Struktur der Idh von *A. vinelandii* herangezogen. Dieses Protein weist eine 66 %-ige Identität zu der Idh in *P. aeruginosa* auf. (Datei 1ITW.pdb erhalten von www.rcsb.org und modifiziert mit der Software Pymol)

Auch für die vier SNPs in *idh1-4* sollte geklärt werden, ob diese ggf. als Anpassung an die CF-Lunge selektioniert wurden oder ob es sich um bereits in anderen *Pseudomonas spp.* beschriebene SNPs handelt. Durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass *idh1* bei *P. aeruginosa* C3719 vorkommt. Ansonsten sind *idh1-2* noch bei *P. aeruginosa* LESB58 vorhanden (www.pseudomonas.com, SNP map; Daten nicht gezeigt). Bei diesem Stamm handelt es sich um einen als besonders pathogenen Epidemie-Stamm (Non-Mutator), der ein breites Spektrum an Antibiotika-Resistenz aufweist. Ob es sich bei *idh1-2* um eine Anpassung an die CF-Lunge handelt bleibt unklar (Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2008;Winstanley *et al.*, 2009). Anders sieht es hingegen für *idh3* und *idh4* aus. Bei keinem anderen Stamm wurden diese SNPs durch Sequenzvergleiche entdeckt (www.pseudomonas.com, SNP map; Daten nicht gezeigt), sodass von einer Anpassung an die CF-Lunge ausgegangen werden kann.

5.8.1 Vergleich der Wachstumsraten bei IDH-Varianten von *P. aeruginosa*

Zunächst wurde der Einfluss der *icd*- bzw. *idh*-Allele nach Komplementation auf die Wachstumsrate und auf die IDH-Enzym-Aktivität bestimmt und mit der des Ausgangsstammes PA14 und der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen. Dazu wurde die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit den Allelen *icd1* bzw. *idh1-4* sowie den PA14 Genen *icd* bzw. *idh* komplementiert und dann hinsichtlich der Wachstumsrate und der IDH-Enzym-Aktivität verglichen.

Wie in 5.2.1 gezeigt wurde, besitzt die IDH-Doppelmutante von PA14 im Vergleich zu PA14 einen deutlichen Wachstumsdefekt, der durch die Komplementation mit dem Gen *icd* vollständig komplementiert wird. Eine Komplementation der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit dem Gen *icd1* aus M25 führt zu einem langsameren Wachstum, das ungefähr zwischen der IDH-Doppelmutante und dem PA14 liegt (Abbildung 5.54). Auch mit dem Gen *idh* konnte der Wachstumsdefekt der IDH-Doppelmutante vollständig komplementiert werden. Eine Komplementation der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit allen SNP-Varianten im *idh*-Gen führt verglichen zu der Komplementation mit dem Gen *idh* zu einer Wachstumsminderung (*idh2* und *idh4*) oder bis zu einer Rate der IDH-Doppelmutante mit den Allelen *idh1* und *idh3* (Abbildung 5.55). Alle SNP-tragenden Komplementanten im *idh*-Gen zeigen ein schlechteres Wachstum als die Komplementante mit dem *icd*-Gen.

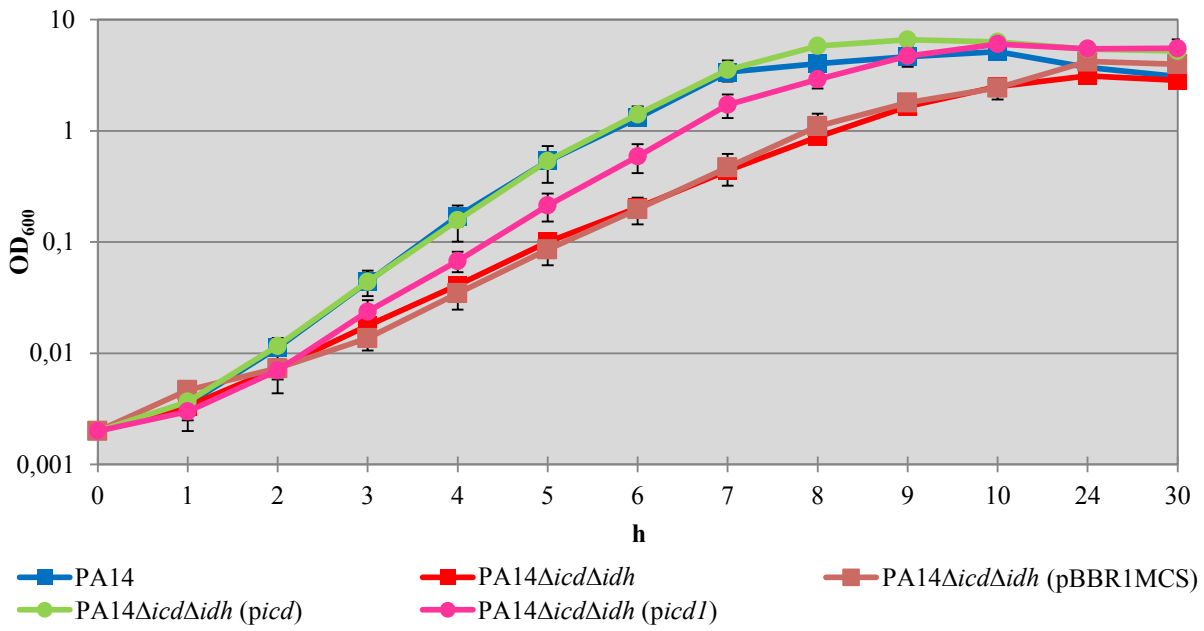


Abbildung 5.54 Einfluss des *icd1*-Allels auf das aerobe Wachstum von *P. aeruginosa*
Vergleich der Wachstumskurven (LB-Medium, 37 °C, aerob) von PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh* mit den Komplementanten p*icd* und p*icd1* (Vektorkontrolle pBBR1MCS). Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

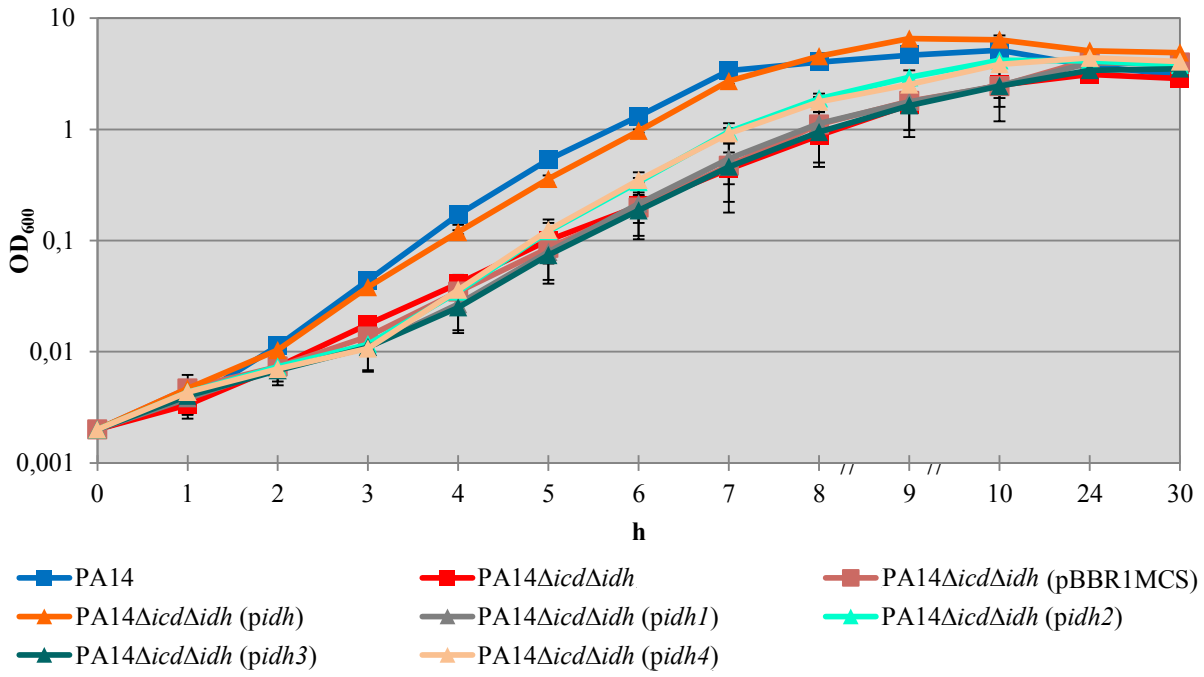


Abbildung 5.55 Einfluss der *idh1-4*-Allele auf das aerobe Wachstum von *P. aeruginosa*
Vergleich der Wachstumskurven (LB-Medium, 37 °C, aerob) von PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh* mit den Komplementanten p*idh* und *pidh1-4* (Vektorkontrolle pBBR1MCS). Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.8.2 Einfluss der SNPs auf die IDH-Enzym-Aktivität von *P. aeruginosa*

Mittels Enzymtest und BN-PAGE wurde im Folgenden überprüft, welchen Effekt die verschiedenen SNPs auf die Isocitratdehydrogenase-Aktivität haben. Während eine Komplementation der IDH-Doppelmutante mit *icd* (0,42 U/mg Protein +/- 0,07) im Vergleich zu PA14 (0,25 U/mg Protein +/- 0,06) etwa zu einer Verdopplung der IDH-Enzym-Aktivität des PA14-Stammes führte, betrug diese nach Komplementation mit *icd1* ungefähr nur die Hälfte (0,11 U/mg Protein +/- 0,06) des PA14-Stammes (Abbildung 5.56). Dieses Ergebnis passt zu dem Allel in *icd1* bzw. Icd1, das ein Aminosäurenaustausch in der Nähe von K232 (s. oben) hat und das ein langsameres Wachstum in der Komplementante PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd1*) bewirkt. Eine dazu geringfügig höhere Aktivität, jedoch immer noch unterhalb des Stammes PA14, wurde bei der Komplementante der IDH-Doppelmutante mit dem *idh*-Gen beobachtet. Aufgrund der vorangegangenen Wachstumsversuche wurde zunächst eine reduzierte Enzym-Aktivität bei der Komplementation der IDH-Doppelmutante mit *idh1* oder *idh3* erwartet. Wurde die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit den Allelen *idh1*, *2* oder *4* komplementiert, so konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Komplementanten im Vergleich zur Komplementation mit dem PA14-Gen *idh* festgestellt werden. Für den einzigen deutlichen signifikanten Unterschied für PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh3*) wurde ungefähr die gleiche Enzym-Aktivität wie bei PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd1*) gemessen. Insgesamt konnte durch jeden SNP entweder eine verminderte oder unveränderte Enzym-Aktivität bei den Komplementationsstämmen beobachtet werden. Zum Vergleich wurden bei Gliom- und Leukämie-Zellen verschiedene IDH-Mutationen (z. B. IDH1: R132; IDH2: R140 oder R172) identifiziert, die zum einen zu einer verminderten Bindung von Isocitrat führen und zum anderen wird 2-Hydroxyglutarat in der reversen Reaktion vermehrt gebildet (Dang *et al.*, 2010a;Dang *et al.*, 2010b;Smolková and Jezek, 2012).

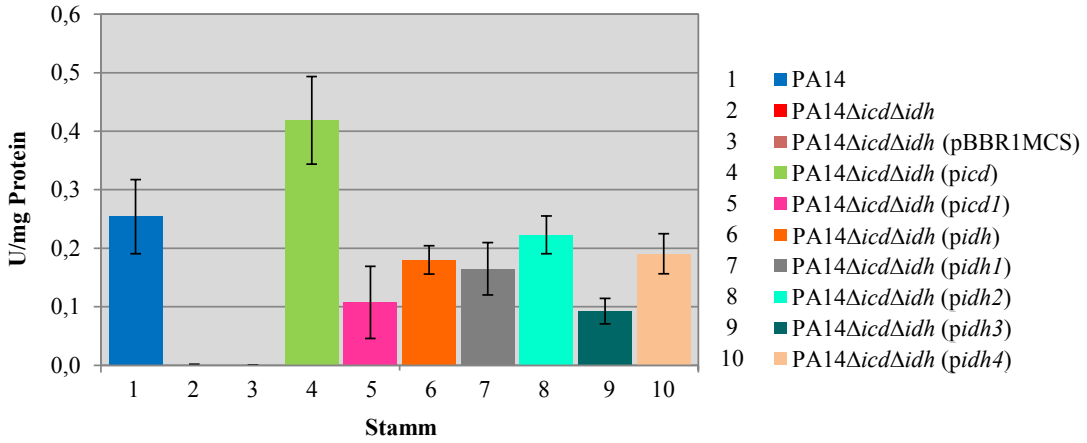


Abbildung 5.56 Einfluss der *icd*/*idh*-Allele auf die Isocitratdehydrogenase-Aktivität
Dargestellt sind die Enzym-Aktivitäten der mit den Allelen *icd*, *icd1* bzw. *idh*, *idh1-4* komplementierten Stämmen verglichen mit den Aktivitäten des PA14-Stammes, der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*, der Leervektorkontrolle sowie der beiden Komplementanten PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*) und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*). Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*) zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd1*) p-Wert ≤ 0,001, PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh23*) p-Werte ≤ 0,05 und ≤ 0,001)

Zur isolierten Darstellung der Enzym-Aktivität von Icd und Idh wurde die BN-PAGE-Methode angewendet. Während bei PA14 die zwei charakteristischen Aktivitätsbanden der Isoenzyme Icd und Idh zu sehen waren, fehlten diese wie erwartet bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und der Leervektorkontrolle (Abbildung 5.57). Auch mit dieser Methode konnte bestätigt werden, dass der SNP im *icd*-Allel zu einer geringeren Enzym-Aktivität führte. Eine Komplementation mit dem *idh*-Gen bei der IDH-Doppelmutante zeigte eine gleichstarke Bande wie bei PA14. Ebenso konnte bestätigt werden, dass das *idh3*-Allel für ein Protein mit verminderter Enzym-Aktivität kodiert. Bei allen anderen komplementierten Stämmen (*idh1*, *idh2* bzw. *idh4*) wurde kein Unterschied verglichen mit der Komplementation durch das Ausgangsgen *idh* festgestellt. Insgesamt wurden somit die Ergebnisse der Enzym-Aktivitätsmessung mittels BN-PAGE bestätigt.

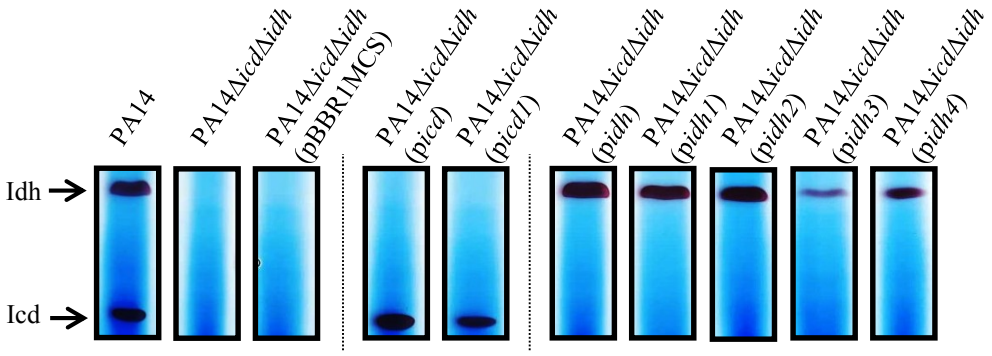


Abbildung 5.57 Visualisierung der Aktivitäten von Icd und Idh von SNP-Varianten bei der BN-PAGE
Mit Hilfe der BN-PAGE-Methode wurden die Enzym-Aktivitäten der jeweiligen getesteten Stämme sichtbar gemacht. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

5.8.3 Phänotypische Charakterisierungen der SNP-komplementierten Stämme

Mit den unterschiedlichen *icd*- bzw. *idh*-Allelen komplementierten Stämmen wurden weitere Experimente durchgeführt, um die Folgen der Aminosäurenaustausche auf die Isocitratdehydrogenase-Aktivität phänotypisch zu charakterisieren. Dabei wurde versucht zu klären, ob die SNPs dem jeweiligen Stamm hinsichtlich einer Anpassung an die CF-Lunge selektive Vor- oder Nachteile verschaffen könnten. So wurde der Einfluss der SNPs auf die Expression der Bakterienbeweglichkeit und anderer Pathogenitätsfaktoren untersucht.

5.8.3.1 Vergleich der Schwimm-Motilität

Das *icd1*- Allel hatte bei der Komplementante keinen Einfluss auf das Schwimmverhalten, wie der Vergleich von PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*) und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd1*) zeigt (Abbildung 5.58). Im Kontrast konnte für alle *idh*-Allele ein reduzierender Effekt auf das Schwimmverhalten beobachtet werden. Bei der *idh2*-Komplementante war noch das stärkste Schwimmverhalten zu verzeichnen, was etwa dem der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* entspricht.

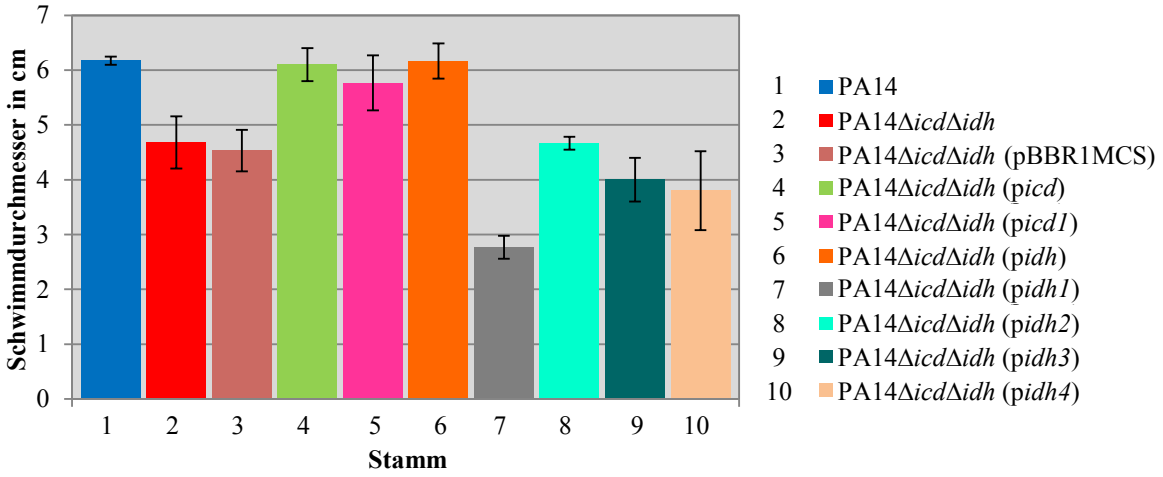


Abbildung 5.58 Einfluss der *icd*/*idh*-Allele auf die Schwimm-Motilität
In diesem Experiment wurde der Einfluss der verschiedenen Allele auf das Schwimmverhalten gemessen. Dargestellt sind die Schwimmdurchmesser der mit den Varianten *icd1*/*idh1-4* komplementierten Stämmen verglichen mit den Durchmessern des PA14-Stammes, der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*, der Leervektorkontrolle sowie der beiden Komplementanten PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*) und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*). Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh1*) p-Werte ≤ 0,001, zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh234*) ≤ 0,01)

5.8.3.2 Vergleich der *Twitching*-Motilität

Eine Komplementation der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit *icd*, *icd1* und *idh* ergab eine dem PA14 vergleichbare oder sogar stärkere *Twitching*-Motilität (Abbildung 5.59). Wie schon zuvor beim Schwimmverhalten zeigte die Komplementation mit dem *icd1*-Gen keine Auswirkung auf die *Twitching*-Motilität. Bei einer Komplementation der IDH-Doppelmutante mit *idh2*, *idh3* oder *idh4*

wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet, wohingegen eine Komplementation der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit *idh1* selbst nach 72 h zu einer stagnierenden anstelle einer sonst zunehmenden Motilität führte. Die Ursache für diesen Phänotyp konnte nicht aufgedeckt werden, jedoch wird deutlich, dass die Ergebnisse aus den Wachstumsmessungen und der Enzym-Aktivitätsbestimmung nicht mit den Motilitäts-Ergebnissen korrelieren.

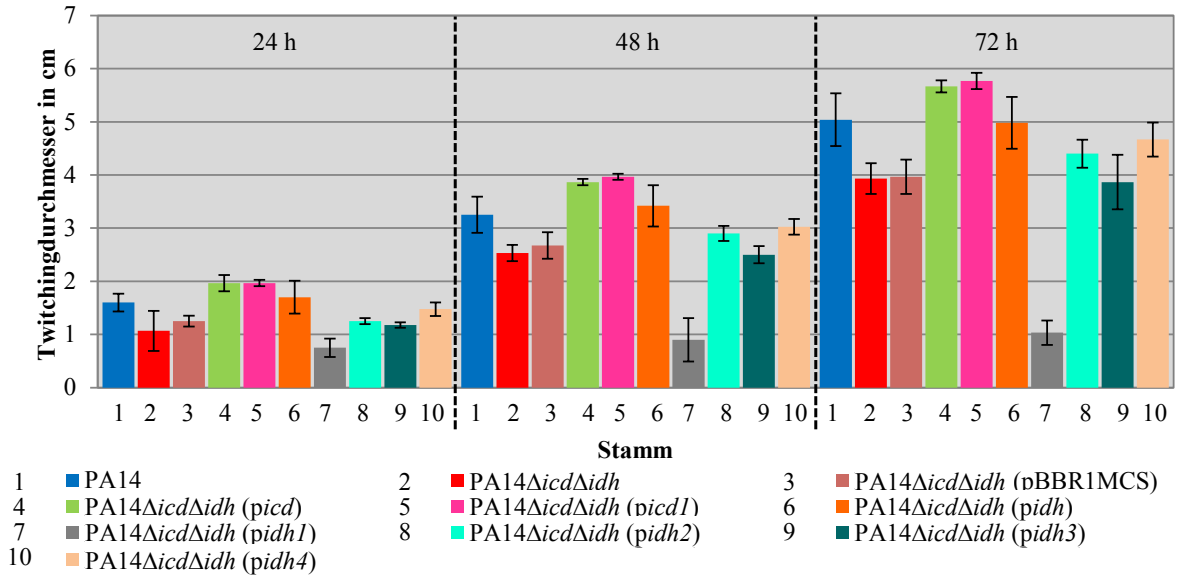


Abbildung 5.59 Einfluss der *icd*/*idh*-Allele auf die *Twitching*-Motilität
Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die *Twitching*-Motilität der verwendeten Stämme durch Messung des Motilität-Durchmessers bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. ((PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh1*) p-Werte ≤ 0,001, zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh23*) ≤ 0,05 (24 h); zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh1*) ≤ 0,001, zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh2*) ≤ 0,05, zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh3*) ≤ 0,01 (48 h), zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh1*) ≤ 0,001, zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh3*) ≤ 0,05 (72h))

5.8.3.3 Vergleich der Schwärm-Motilität

Das Schwärmverhalten war bei allen getesteten PA14 Derivaten mit Ausnahme des PA14 Ausgangstammes nur schwach ausgeprägt (Abbildung 5.60). Eine Komplementation des Schwärmdefekts der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* konnte weder mit *icd* oder *idh* noch mit den Allelen *icd1* oder *idh1-4* erreicht werden. Dies ist insofern verwunderlich, da bei den Enzym-Aktivitäten im Enzymtest bzw. bei der BN-PAGE gezeigt werden konnte, dass es bei allen Stämmen zur Proteinexpression der Isocitratdehydrogenase kommt und zumindest der metabolische Defekt damit erfolgreich komplementiert werden konnte. Da außerdem die Komplementation bei der Schwimm- und bei der *Twitching*-Motilität zumindest weitgehend erfolgreich war, muss von einem komplexeren Regulon für das Schwärmverhalten ausgegangen werden. Welche Faktoren bzw. welche regulatorischen Schnittstellen hier eine Rolle spielen, müsste in weiteren Versuchen, z. B. RT-PCRs (transkriptionale Ebene), geklärt werden.

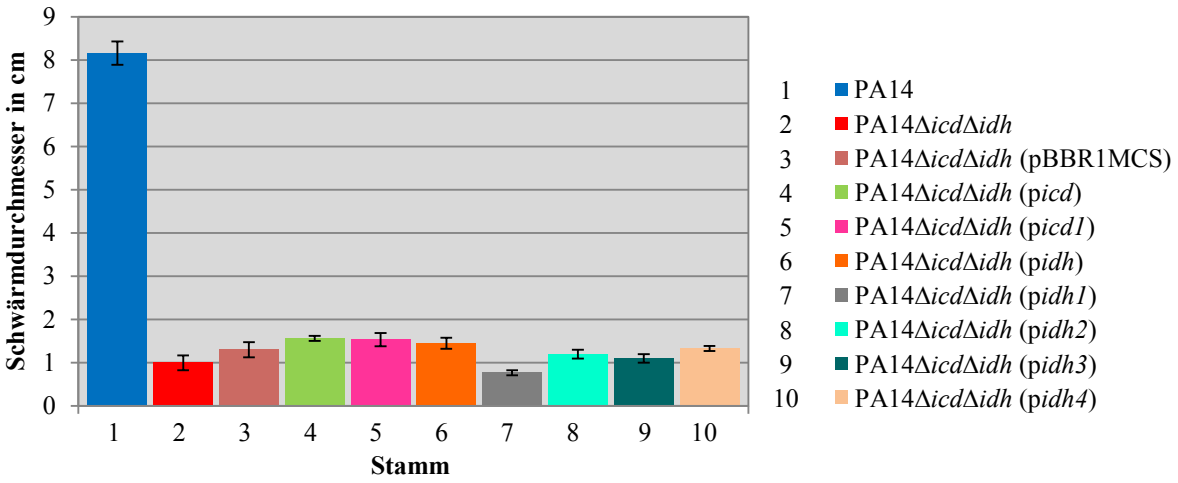


Abbildung 5.60 Einfluss der *icd*/*idh*-Allele auf die Schwärm-Motilität
Nach 24 h wurde die Schwärm-Motilität der verwendeten Stämme durch Messung des Motilität-Durchmessers bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh1*) p-Werte ≤ 0,001, zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh23*) ≤ 0,05)

5.8.3.4 Vergleich der Elastase-Aktivität

Im folgenden Experiment wurden die verschiedenen *icd*- und *idh*-Allele in den Komplementationsstämme bezüglich ihres Einflusses auf die Elastase-Aktivität überprüft. Eine gegenüber dem PA14 etwa halb so starke Elastase-Aktivität wurde bei der Komplementation der IDH-Doppelmutante mit *icd* bzw. *icd1* und *idh* bzw. *idh4* beobachtet (Abbildung 5.61). Dagegen führte eine Komplementation mit *idh1*, *2* oder *3* nur zu einer geringen Erhöhung der Elastase-Aktivität in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*.

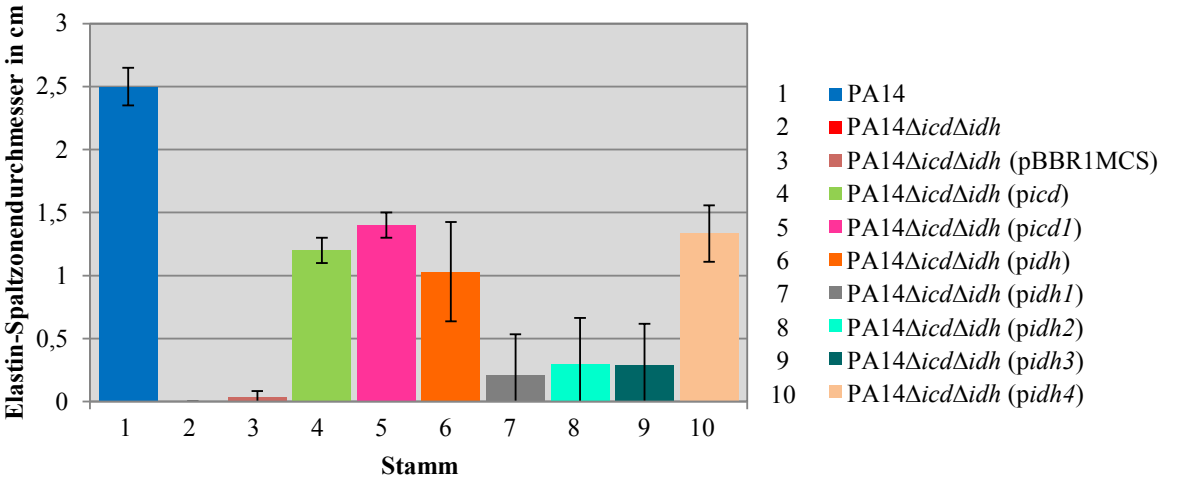


Abbildung 5.61 Einfluss der icd/idh-Allele auf die Elastase-Aktivität
Nach 24 h wurde die Elastase-Aktivität der verwendeten Stämme durch Messung des Elastin-Spaltzonendurchmessers bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (p-Werte PA14ΔicdΔidh (pidh) zu ≤ 0,001 (idh123)

5.8.3.5 Vergleich der Gesamt-Protease-Aktivität

Wie in Abbildung 5.62 gezeigt, konnte bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und der Leervektorkontrolle nahezu keine Gesamt-Protease-Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden verglichen zum Ausgangsstamm PA14. Die Komplementanten mit p*icd*, p*idh* bzw. ihren Allelen zeigten alle eine ca. 50 %-ige Gesamt-Protease-Aktivität des Ausgangstammes PA14.

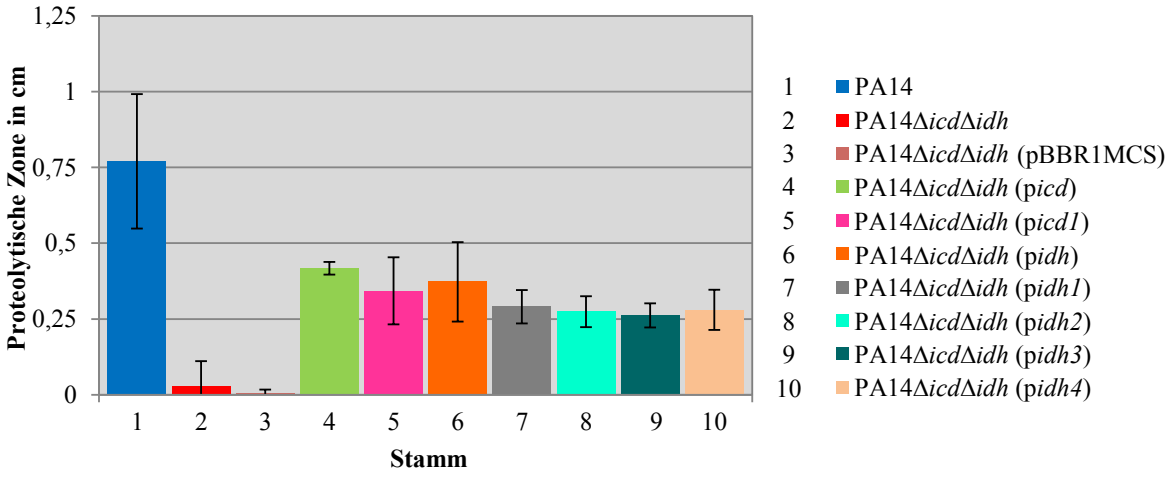


Abbildung 5.62 Einfluss der *icd*/*idh*-Allele auf die Gesamt-Protease-Aktivität
Die Gesamt-Protease-Aktivität wurde durch Messung der proteolytischen Zone im Milchagar nach 48 h bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.8.3.6 Vergleich der Pyocyanin-Produktion

Der Ausgangsstamm PA14, die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* sowie die Komplementanten wurden hinsichtlich der Pyocyanin-Produktion verglichen. Da die verschiedenen Stämme unterschiedliche Wachstumsraten haben, wurden die Pyocyaninkonzentrationsbestimmungen (OD_{520}) auf die Bakteriendichte (OD_{600}) bezogen (relative Pyocyanin-Werte OD_{520}/OD_{600}). Während bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nahezu die gleiche relative Pyocyanin-Produktion wie bei der Leervektorkontrolle und PA14 zu sehen war, wurden unerwarteterweise bei allen Komplementationsstämmen deutlich höhere relative Konzentrationen an Pyocyanin gemessen (Abbildung 5.63). Die Ursache hierfür ist unklar, jedoch könnte dieses Phänomen durch den Komplementationsvektor pBBR1MCS erklärt werden. Durch die gesteigerte Kopierzahl des Vektors kommt es im Vergleich zum Ausgangsstamm PA14 zu einer Überexpression des Isocitratdehydrogenasegens (Kopieeffekt), sodass es dadurch vermutlich durch eine veränderte Regulation im Stoffwechsel zu einer gesteigerten Pyocyanin-Produktion kommt (gilt auch für Abbildung 5.30).

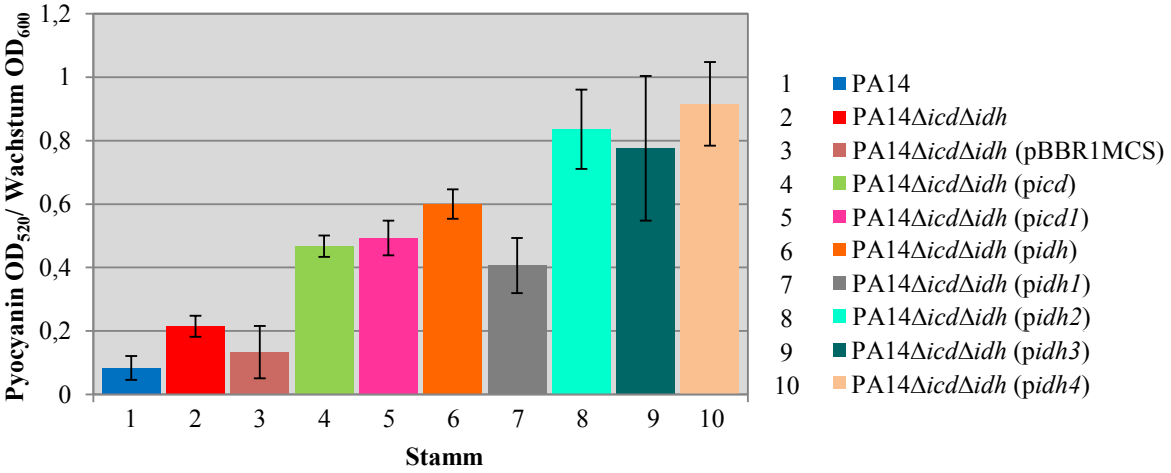


Abbildung 5.63 Einfluss der *icd*/*idh*-Allele auf die Pyocyanin-Produktion
Die relative Pyocyanin-Produktion wurde nach 24 h bestimmt, indem die gemessene Pyocyaninkonzentration (OD_{520}) durch das Wachstum (OD_{600}) geteilt wurde. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

5.8.3.7 Vergleich der Paraquat-Resistenz

Paraquat-Resistenz ist ein Phänotyp für eine Resistenz gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Eine erhöhte Resistenz gegenüber Paraquat (kleiner Hemmhof) zeigt PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen mit PA14 (großer Hemmhof) (Abbildung 5.64). Dieser Phänotyp konnte durch Komplementation mit *icd* sogar über die Paraquat-Empfindlichkeit von PA14 hinaus kompensiert werden (Hemmhof ca. 2,9 cm +/- 0,06). Bei Komplementation mit *icd1* (Abbildung 5.64, Nr. 5) wurde eine geringfügige Empfindlichkeitssteigerung erhalten (Hemmhof ca. 1,7 cm +/- 0,1). Damit konnte gezeigt werden, dass *icd1* die Paraquat-Resistenz von der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* erhöht. Eine Komplementation mit *idh* führt so zur Verringerung der Paraquat-Resistenz ähnlich wie *icd*. Dagegen führt eine Komplementation mit den Allelen *idh1*, *2*, *3* und *4* nicht zur Paraquat-Empfindlichkeitssteigerung der IDH-Doppelmutante (Abbildung 5.64, Nr. 7 - 10). Demzufolge scheinen Stämme mit den Allelen *icd1* bzw. *idh1*, *2*, *3* und *4* zu einer unveränderten bzw. verminderten IDH-Enzym-Aktivität beizutragen. Diese Paraquat-Resistenzerhöhung oder ROS-Resistenz könnte für die Anpassung an die CF-Lunge günstig sein.

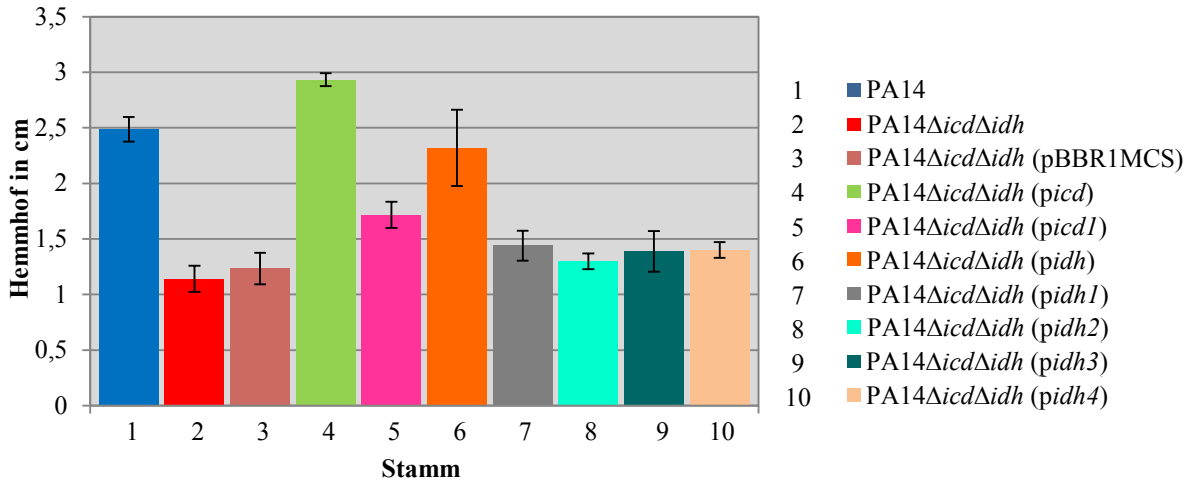
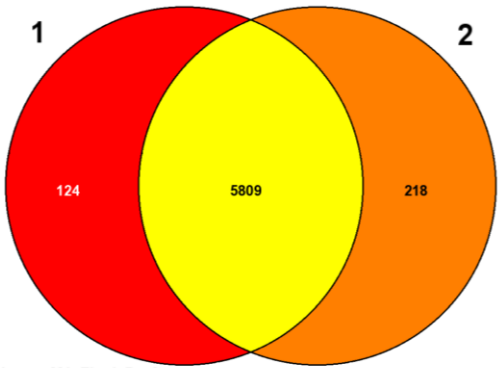


Abbildung 5.64 Einfluss der *icd*/*idh*-Allele auf die Paraquat-Resistenz
Nach 24 h wurde die Paraquat-Resistenz der verwendeten Stämme durch Messung des Hemmhof-Durchmessers bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd*) zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*icd1*) p-Wert ≤ 0,001, PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) zu PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh1234*) p-Werte ≤ 0,001)

5.9 Vergleichende Genomanalyse der CF-Isolate M1 und M25

Um einen Gesamtüberblick der adaptiven Anpassung von *P. aeruginosa* an die chronisch-infizierte CF-Lunge auf genomischer Ebene zu erhalten, wurden die Genome der CF-Isolate M1 (Non-Mutator, frühe Infektion) und M25 (Mutator, späte Infektion) sequenziert und Genomsequenzvergleiche beider Isolate durchgeführt. Zwischen der Isolierung des Non-Mutators M1 (1998) und des Mutators M25 (2001) lagen über drei Jahre (Hogardt *et al.*, 2007), sodass zahlreiche adaptive Genomsequenz-unterschiede zwischen beiden Stämmen zu erwarten waren.

Die chromosomale DNA beider CF-Isolate M1 und M25 wurde isoliert und anschließend zu unserem Kooperationspartner nach Bielefeld geschickt (F. J. Vorhölter; *Center for Biotechnology* (Cebitec), Universität Bielefeld). Mit Hilfe der Sequenzierungsmethode *454 Titanium-Technology* (Roche) wurden dort beide Genome sequenziert. Nähere Angaben zur Sequenzierung beider Genome sind samt statistischer Daten im Anhang zu finden (8.5.1). Es war nicht möglich die Genome vollständig bzw. lückenlos zu sequenzieren (kompletter Ringschluss), da manche Bereiche im Genom aufgrund z. B. von großen Homopolymeren oder repetitiven Sequenzbereichen nicht sicher sequenziert bzw. lokalisiert werden konnten. Deshalb konnte nur ein sog. *Draft*-Genom erstellt werden. Während das *Draft*-Genom von M1 noch insgesamt 172 unsequenzierte Bereiche (< ca. 7 kb) hat, sind es bei M25 nur 151 unsequenzierte Bereiche (< ca. 6,5 kb). Das *Draft*-Genom von M25 ist mit 6.798.595 bp interessanterweise um fast 100.000 bp größer als das von M1 mit 6.702.874 bp. Während beide Genome einen GC-Gehalt von ca. 66 % und eine durch die automatisierte Annotation ermittelte gleiche Anzahl an tRNAs (62) und rRNA (3) aufweisen, wurden im M25 6027 Gene und damit insgesamt 94 Gene mehr automatisch annotiert als bei M1 (5933 Gene). Beim Vergleich der Genausstattungen beider Isolate sind 5809 Gene dem Kerngenom zuzuordnen (Abbildung 5.65). M1 besitzt wahrscheinlich mit 124 Genen die kleinere Anzahl an sog. Singletons (Gene die spezifisch für den jeweiligen Stamm sind), während M25 218 Singletons aufweist. Diese Abschätzungen hängen von dem jeweiligen Auswerte-Algorithmus zur Detektion von Singletons ab, sodass die Werte variieren können.



1: *P. aeruginosa* M1 Final Draft
2: *P. aeruginosa* M25 Final Draft

Abbildung 5.65 Bioinformatische Vorhersage der Anzahl von Genen im M1 und M25 Genom
In dem Venn-Diagramm ist die Anzahl der in M1 und M25 vorkommenden Gene dargestellt. Der gelbe Bereich symbolisiert das sog. Kerngenom, d. h. die Anzahl der Gene, die in beiden CF-Isolaten vorkommen. Der rote und der orangene Bereich (Rot: M1/Orange: M25) stellen die Singletons beider Stämme dar, d. h. die Anzahl der Gene, die nur in einem Stamm vorkommen.

Beim Vergleich beider Draft-Genome wird deutlich, dass sich die Genome in ihrer Anordnung, bis auf zwei größere Genombereiche, nicht sonderlich voneinander unterscheiden. Bei M1 befindet sich der erste veränderte Genombereich bei ca. 780.000 – 798.0000 bp und ist ca. 16 kb groß, wohingegen bei M25 dieser Bereich stromabwärts bzw. terminal bei ca. 5.720.000 – 5.748.000 bp liegt und durch zusätzliche Insertionen ca. 26 kb groß ist. Verglichen mit M1 weist dieser Bereich in M25 Inversionen sowie eine veränderte Reihenfolge von Genombereichen auf. Der zweite betroffene etwas größere Genombereich im M25 Genom befindet sich bei ca. 3.165.000 - 3.260.000 bp und beruht v. a. auf einer Insertion von ca. 95 kb. Eine Blast-Analyse ergab, dass diese Insertion zum größten Teil (*Query cover* 98 %) mit der Sequenz von *P. aeruginosa* LESB58 zu 99 % (*Identity*) identisch ist (Daten nicht gezeigt). Bei *P. aeruginosa* LESB58 handelt es sich ebenfalls um ein CF-Isolat, das ursprünglich 1988 in Liverpool isoliert wurde. Im Vergleich zu vielen anderen CF-Isolaten ist dieser Stamm ein aggressiver Non-Mutator (Winstanley *et al.*, 2009). Ob der gesamte Bereich oder Teilbereiche von einer Prophage oder einem anderen Stamm über horizontalen Gentransfer (HGT) auf M1 übertragen wurde, muss in weiteren Analysen geklärt werden.

Bis auf die zwei erwähnten Ausnahmen gibt es kaum größere Unterschiede in der Anordnung von ganzen Genbereichen in den Genomen von M1 und M25. Da es sich bei M25 um einen Mutator-Stamm handelt, ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl von SNPs oder Indels im Genom von M25 verglichen zu M1 vorhanden ist. Höchstwahrscheinlich sind die in einer vorangegangenen Studie (Hoboth *et al.*, 2009) im Transkriptom, Proteom und beim Phänotyp gemessenen Unterschiede zwischen M1 und M25 durch SNPs und Indels zu erklären. Aus diesem Grund wurde eine SNP- und Indel-Analyse durchgeführt, bei der das M1-Genom als Referenz diente.

Insgesamt wurden 881 SNPs, 34 Insertionen und 113 Deletionen im Genom von M25 verglichen zu M1 identifiziert. Eine ausführliche Tabelle aller SNPs und Indels befindet sich im Anhang (Tabelle 8.12). Um zu sehen, welche Gene bzw. Genklassen (*PseudoCAP Function Class, www.pseudomonas.com*) von einem SNP im CF-Isolat M1 betroffen sind, wurden die entsprechenden orthologen Gene mittels Sequenzvergleich mit *P. aeruginosa* PAO1 bestimmt (Software Edgar, Cebitec), wodurch 687 SNPs von insgesamt 881 identifizierten SNPs zugeordnet werden konnten. Die Abbildung 5.66 zeigt die Verteilung der von einem SNP betroffenen Gene in den verschiedenen Genklassen. Zum einen wird deutlich, dass besonders die Genklassen „Hypothetische, unklassifizierte, unbekannte Proteine“, „Transport von kleinen Molekülen“, „Transkriptionale Regulatoren“, „Putative Enzyme“ und „Membranproteine“ von SNPs betroffen sind. Zum anderen ist erkennbar, dass die größte Anzahl (n = 523) aller identifizierten SNPs einen Aminosäurenaustausch im jeweiligen Gen bewirken (Nicht-synonyme SNPs). Ob diese Aminosäurenaustausche biologisch relevant (z. B. Verlust oder Veränderung der (Enzym-)Aktivität im jeweiligen Gen) sind, konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Dagegen ist es sehr wahrscheinlich, dass SNPs, die ein Stop-Kodon vorzeitig in einem Gen bewirken (*nonsense*-Mutation) oder aufheben (*read through*-Mutation), zu einem Funktionsverlust des jeweiligen Genes führen. Insgesamt konnten 14 verschiedene solcher SNPs in

M1 verglichen zu M25 identifiziert werden (Tabelle 5.12). Auch hierbei ist zu erkennen, dass neben Genen kodierend für hypothetische Proteine eine große Anzahl an transkriptionale Regulatoren durch SNPs betroffen ist.

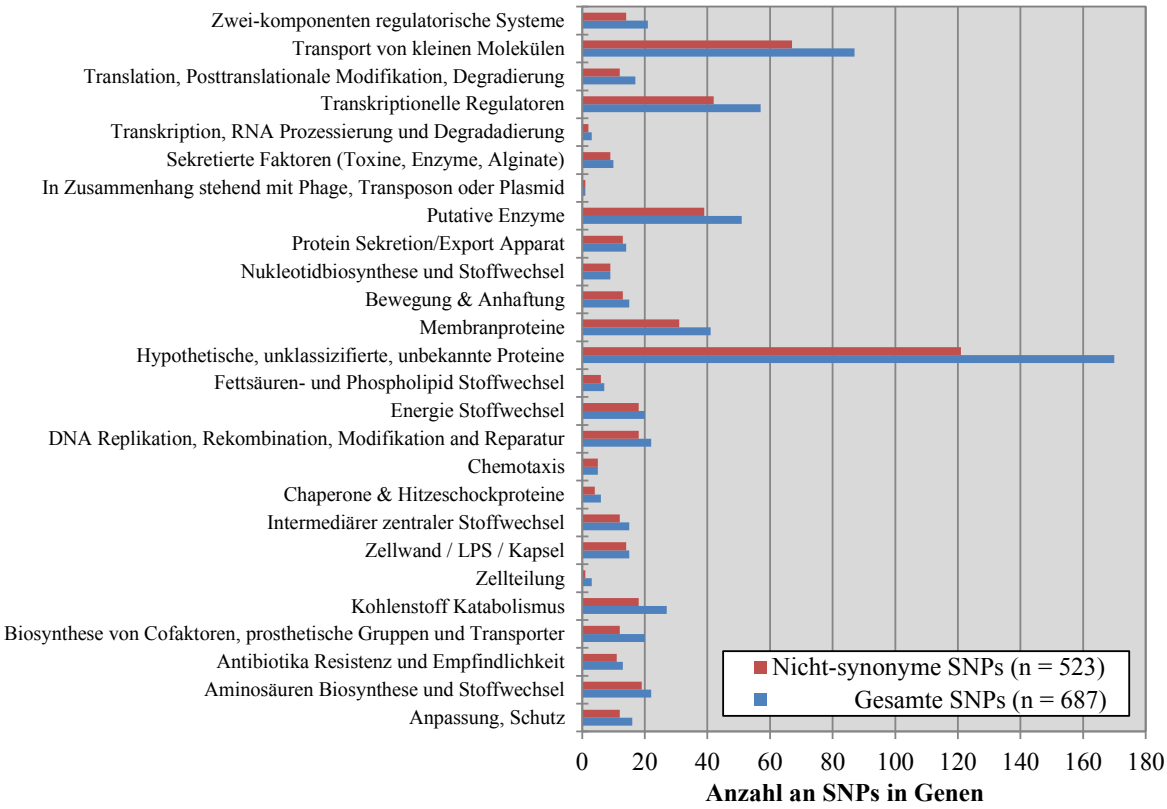


Abbildung 5.66 Verteilung der in M1 von SNPs betroffenen Gene in Genklassen
Verschiedene Gene in M1 verglichen mit M25 waren von insgesamt 881 SNPs betroffen, wovon 687 SNPs orthologen Gene *P. aeruginosa* PAO1 über Sequenzvergleich zugeordnet werden konnten. In dieser Abbildung ist zum einen die Verteilung der von den gesamten 687 SNPs betroffenen Gene auf Genklassen (*PseudoCAP Function Class, www.pseudomonas.com*) dargestellt (Blau). Zum anderen zeigt die Abbildung die Verteilung von 523 Genen auf die Genklassen, in denen ein SNP einen Aminosäurenaustausch im Gen bewirkt (Rot).

Von den insgesamt 1028 gefundenen genomischen Veränderungen (881 SNPs, 34 Insertionen und 113 Deletionen) zwischen M1 und M25 konnten insgesamt 852 mit einer Frequenz > 95 %, 128 mit einer Frequenz > 85 % und 48 mit einer Frequenz > 75 % identifiziert werden (s. Anhang Tabelle 8.12). Dabei kann von einer guten Identifizierungsrate für SNPs und Indels ausgegangen werden, da das bereits in der Literatur beschriebene Fehlen von Basenpaaren im *mutS*-Gen (Hogardt *et al.*, 2007) wie zu erwarten auch in dieser Analyse identifiziert wurde. In der Regel wird zur Validierung von SNPs eine Resequenzierung ausgewählter SNPs empfohlen (meist nach Sanger). Zur Bestätigung der hier bereits sehr guten Identifizierungen von SNPs und Indels ist für die Zukunft eine Resequenzierung der Genome von M1 und M25 mittels „*Illumina*“-Sequenzierung (Illumina) geplant. Dadurch sollen die durch die Sequenzierungsmethode *454 Titanium-Technology* (Roche) erstellten Ergebnisse validiert werden und evtl. falsch-positive SNPs bzw. Indels identifiziert werden. Vermutlich wird dadurch sich die gesamte Anzahl an gefundenen SNPs und Indels vermindern.

Tabelle 5.12 *„nonsense“*- und *„read through“*-SNPs betroffene Gene in M1 verglichen zu M25
Die in dieser Tabelle aufgelisteten SNPs bewirken ein vorzeitiges Stop-Kodon im Gen oder heben ein vorhandenes Stop-Kodon auf. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass es bei diesen Genen zu einem Funktionsverlust kommt. Als Referenzstamm diente das CF-Isolat M1.

M1 Pos.	M1 Ref.	Typ	M25 SNP	Subs.	Genbezeichnung	PA Nummer	Gen	Produkt
1098391	C	SNP	T	Gln->Stop	P_aeru_M1_draft_1067	PA3974	*ladS*	*Lost*-Adhärenz-Sensor
1230133	G	SNP	A	Gln-> Stop	P_aeru_M1_draft_1182	PA3878	*narX*	Zwei-komponenten Sensor
1319971	G	SNP	A	Trp-> Stop	P_aeru_M1_draft_1264	PA3794	-	Hypothetisches Protein
1545042	C	SNP	T	Trp-> Stop	P_aeru_M1_draft_1464	PA3599	-	Putativer transkriptionaler Regulator
1928459	G	SNP	A	Gln-> Stop	P_aeru_M1_draft_1796	PA3250	-	Hypothetisches Protein
2028181	C	SNP	T	Gln-> Stop	P_aeru_M1_draft_1891	-	-	Glykosyltransferase-ähnliches Protein
3195186	T	SNP	C	Stop ->Trp	P_aeru_M1_draft_2898	PA2152	-	mögliche Trehalose-Synthase
3349120	A	SNP	G	Stop ->Arg	P_aeru_M1_draft_3031	PA2020	-	Putativer transkriptionaler Regulator
3367176	G	SNP	A	Trp-> Stop	P_aeru_M1_draft_3045	PA2006	-	möglicher (MFS)-Transporter
3370841	G	SNP	A	Trp-> Stop	P_aeru_M1_draft_3047	PA2004	*yxjC*	Hypothetisches Protein
3539366	T	SNP	C	Stop ->Arg	P_aeru_M1_draft_3181	PA1864	-	Putativer transkriptionaler Regulator
3721126	G	SNP	A	Gln-> Stop	P_aeru_M1_draft_3358	PA1759	-	Putativer transkriptionaler Regulator
5353816	G	SNP	A	Gln-> Stop	P_aeru_M1_draft_4829	PA4522	*ampD*	ß-Laktamase Expressions-Regulator
5607930	A	SNP	G	Stop ->Gln	P_aeru_M1_draft_5046	PA4661	*pagL*	Lipid A 3-O-Deacylase

Pos. = Position, Ref. = Referenz, Subs. = Substitution, (MFS) = *major facilitator superfamily*

6 Diskussion

6.1 Anpassung von *P. aeruginosa* an die Bedingungen der chronisch-infizierten CF-Lunge

Gelangt der in der Umwelt weit verbreitete Nasskeim *P. aeruginosa* in die vorgeschädigte CF-Lunge, so findet er offenbar geeignete Lebensbedingungen vor. Aufgrund des *CFTR*-Gendefekts wird vermehrt zähflüssiges Sekret gebildet, das reich an Lipiden, Proteinen, Aminosäuren sowie DNA ist, was ein ideales Milieu für eine Kolonisierung und Wachstum für Bakterien darstellt (Sriramulu *et al.*, 2005;Schobert and Jahn, 2010). Durch die zusätzlich gestörte „mukoziliäre Clearance" in der CF-Lunge kommt es leicht zu einer Ansammlung von Bakterien (Boucher, 2007b). Im Verlauf der Kolonisierung (Infektion der Atemwege) kommt es durch die Produktion von Virulenzfaktoren durch *P. aeruginosa* aber auch durch die Koinfektionen mit verschiedenen anderen Bakterienarten zur Schädigung des Lungengewebes (Bragonzi *et al.*, 2012). Während in einigen Studien festgestellt werden konnte, dass unter CF-Patienten Kreuzinfektionen möglich sind (Frederiksen *et al.*, 1999;Jones *et al.*, 2001;McCallum *et al.*, 2001), zeigten andere Studien wiederum, dass solche Infektionen nicht oder nur in sehr geringem Maße vorkommen (Speert *et al.*, 1982;Williams, 1997;Tubbs *et al.*, 2001;Speert *et al.*, 2002). In der Regel werden CF-Isolate nicht auf Nicht-CF-Patienten übertragen, jedoch wurde in einzelnen Fällen von einer Übertragung von CF-Isolaten auf Mensch oder Tier berichtet (Robinson *et al.*, 2003;Mohan *et al.*, 2008). Die im Rahmen der bakteriellen Infektionen rekrutierten Immunzellen produzieren zur Bekämpfung der Erreger Sauerstoffradikale, welche auch die Schädigung des Lungengewebes weiter fördern. Durch die progressiven Gewebsnekrosen stehen neue Nährstoffquellen wie Proteine, DNA und Lipide zur Verfügung.

Um dauerhaft unter diesen extrem und lokal unterschiedlichen Bedingungen in der CF-Lunge persistieren zu können, kommt es offenbar unter dem Selektionsdruck zu einer ausgeprägten geno- und phänotypischen Anpassung von *P. aeruginosa*, aber auch anderer CF-Erreger, z. B. *S. aureus* oder *H. influenzae* (Döring *et al.*, 2011;Pompilio *et al.*, 2011;Qin *et al.*, 2012). Bei einer schlechten Immunabwehr in der CF-Lunge wirkt ein schwacher Selektionsdruck auf die Virulenz der Erreger. Die Selektion Lungen-adaptierter Varianten kann durch die erhöhte Mutationsrate hypervariabler Stämme (Mutator-Stämme) nach dem Prinzip „*survival of the fittest*" beschleunigt bzw. begünstigt werden (Hogardt *et al.*, 2006). Gerade bei Mutator-Stämmen kommt es vermehrt zu SNPs (*single nucleotide polymorphism*) im Genom, wobei nicht-synonyme Mutationen (Kodonänderung, Aminosäureaustausch) einen Einfluss auf die Funktion und/oder Regulation eines Proteins, z. B. der Aktivität eines Enzyms, zur Folge haben können (Oliver *et al.*, 2000;Vignal *et al.*, 2002;Hogardt *et al.*, 2006). Die bakterielle Habitatsanpassung kann außerdem durch den Erwerb von mobilen Elementen, z. B. Plasmiden oder Pathogenitätsinseln, die von anderen Kolonisierern oder Bakteriophagen kommen, gesteigert werden. Ebenso kann der Verlust von nicht-essentiellen Genen dem Bakterium

Vorteile verschaffen (Hacker and Carniel, 2001;Dobrindt *et al.*, 2004;Frost *et al.*, 2005;Thomas and Nielsen, 2005). Denkbar ist, dass diese beiden Veränderungen ebenso in der CF-Lunge stattfinden. Ein Anpassungsverhalten im Zuge der sich bildenden anaeroben Wachstumsbedingungen ist die Überexpression des anaeroben Regulators Anr, des Porins OprF über das Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) in die Zelle gelangen sowie die Enzyme der Arginin-Fermentation (Hassett *et al.*, 2009;Hogardt and Heesemann, 2010). Des Weiteren gehört eine *loss of function* vieler Virulenzfaktoren zur phänotypischen Anpassung von *P. aeruginosa* (z. B. Flagelle, Typ III-Sekretionssystem). Durch die unterschiedlichen Mikrohabitate in der CF-Lunge entwickeln sich im Laufe der Zeit wahrscheinlich unterschiedliche adaptierte Varianten mit unterschiedlichen Eigenschaften, was auch als „*adaptive radiation*" bezeichnet wird (Rainey and Travisano, 1998;Ciofu *et al.*, 2010). Nicht-virulente Erreger oder Bakterien mit einer reduzierten Virulenz scheinen bei der Selektion an die CF-Lunge begünstigt zu werden, da Virulenzfaktoren eine starke Immunabwehr bzw. Entzündung auslösen (Smith *et al.*, 2006).

Unter anderem konnte in einer Studie und in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe Hogardt gezeigt werden, dass die Anpassung von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge mit der veränderten Expression zahlreicher virulenter aber auch metabolischer Gene einhergeht (Silo-Suh *et al.*, 2005;Hoboth *et al.*, 2009). Bei vergleichenden Transkriptom- und Proteomversuchen zwischen einem Non-Mutator (M1 = Früh-Isolat) und einem Mutator (M25 = Spät-Isolat) wurde festgestellt, dass v. a. metabolische Gene und/oder Proteine beispielsweise des Citratzyklus, des Glyoxylatwegs sowie des Lipid- und Aminosäurestoffwechsels verstärkt exprimiert werden (Hoboth *et al.*, 2009). Dies deutet v. a. auch auf eine metabolische Habitatsanpassung von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge hin. Obwohl wie oben erwähnt einige Adapationsmechanismen von *P. aeruginosa* beschrieben wurden, ist über die metabolische Anpassung an die CF-Lunge noch wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte primär die metabolische Anpassung und sekundär im Kontext der Kontrolle der Pathogenität des Erregers am Beispiel v. a. der Isocitratdehydrogenase und der Malatdehydrogenase von *P. aeruginosa* näher untersucht werden. Anhand dieser Enzyme sollte ebenso überprüft werden, ob eine verminderte intrazelluläre Konzentration an NAD(P)H (Detoxifikation von ROS) zu einer verschlechterten antioxidativen Stressantwort führt (Singh *et al.*, 2008). Zusätzlich sollte die Anpassung zweier phänotypisch ausgiebig charakterisierter CF-Isolate M1 und M25 auf genomischer Ebene näher untersucht werden. Ein besseres Verständnis der metabolischen Adaptation und der daraus folgenden Persistenz von *P. aeruginosa* kann dazu beitragen, potentielle Angriffspunkte für neue antibakterielle Wirkstoffe aufzuzeigen, um so eine bessere und effektivere Eradikation dieses hartnäckigen Keimes oder gar Prävention der chronischen Infektion in der CF-Lunge zu ermöglichen.

6.1.1 Konstruktion der IDH-Doppelmutante und Mdh-Mutante von *P. aeruginosa*

In dieser Arbeit wurde erfolgreich eine IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* durch Deletion beider in *P. aeruginosa* vorkommenden Isocitratdehydrogenasegene *icd* und *idh* konstruiert. Da die Isocitratdehydrogenase aufgrund ihrer enzymatischen (Synthese von α-Ketoglutarat aus Isocitrat), regulatorischen (Schnittstelle zwischen Citratzyklus und Glyoxylatweg), energetischen und möglicherweise antioxidativen Funktion (Bildung von NADPH) ein metabolisches Schlüsselenzym darstellt (Eikmanns *et al.*, 1995), stellte sich zunächst die Frage, ob die Konstruktion einer IDH-Doppelmutante möglich ist. Da das für eine Isocitratdehydrogenase kodierende einzige Gen *icdA* in *E. coli* ohne letale Folgen deletiert werden kann (Kabir and Shimizu, 2004), sollte die Deletion des *icd*- und *idh*-Gens in *P. aeruginosa* möglich sein. Die Konstruktion der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* in *P. aeruginosa* erwies sich jedoch als problematisch, da nach doppelt homologer Rekombination selektionierte Mutanten zwar immer korrekte Antibiotikamarkerresistenzen jedoch nie eine korrekte Gendeletion aufwiesen. Erst nach wiederholten Versuchen mit Veränderung einiger Parameter (z. B. Antibiotikakonzentration) war es geglückt, eine IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit korrektem Genotyp zu selektionieren, die v. a. durch ihr verlangsamtes Wachstum auffiel. Zuvor ist die IDH-Doppelmutante wahrscheinlich durch schneller wachsende jedoch fehlerhafte Resistenz-Mutanten überwuchert worden. Die mit derselben Strategie nach Hoang *et al.* (Hoang *et al.*, 1998) durchgeführte Inaktivierung des *mdh*-Gens zur Konstruktion der Insertionsmutante PA14 *mdh*::Gm war dagegen unproblematisch. Die Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm zeigte kein verlangsamtes Wachstum, da die in *P. aeruginosa* mehrfach vorkommenden Isoenzyme den Defekt der *mdh* wahrscheinlich ausgleichen konnten.
In diesem Jahr wurde von einer *P. aeruginosa icd*/*idh*-Doppelmutante berichtet, die allerdings nicht näher charakterisiert wurde, sondern nur für vergleichende Analysen hinsichtlich einer vollständigen Aktivierung des Glyoxylatwegs genutzt wurde (Chung *et al.*, 2013).

6.1.2 Einfluss der Isocitrat- und Malatdehydrogenase auf das Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen

Beim Wachstum in LB-Medium wurde bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* ein signifikanter Defekt beobachtet, der durch Komplementation mit einer intakten Genkopie (*icd, idh* bzw. *icd* und *idh*) aufgehoben werden konnte. Durch das LB-Medium stehen dem Bakterium hauptsächlich Oligopeptide als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, jedoch keine Zucker (Sezonov *et al.*, 2007). Vermutlich ist der beobachtete Wachstumsdefekt auf die Unterbrechung des Citratzyklus zurückzuführen, da die Transposoninsertion und somit Inaktivierung nur einer Isocitratdehydrogenase wie in PA14 *icd*::Tn und in PA14 *idh*::Tn keine Auswirkungen auf das Wachstum hatte. Wahrscheinlich kann durch die alternativ genutzten Stoffwechselwege (Aminosäuren-Katabolismus)

nicht ausreichend Energie und/oder Intermediate zur Verfügung gestellt werden, um eine normale Zellvermehrung zu gewährleisten. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass sich beide Isoenzyme (Icd und Idh) in LB-Medium gegenseitig komplementieren können (Eichner, 2012). Zusätzlich konnte anhand der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm festgestellt werden, dass dieser Defekt nicht zum Wachstumsdefekt in LB-Medium führt. Weitere Isoenzyme der Malatdehydrogenase (z. B. MqoA oder MqoB) gewährleisten sehr wahrscheinlich einen effektiven Citratzyklus (Rakhimova *et al.*, 2008).

Wahrscheinlich wird die metabolische Anpassung von *P. aeruginosa* nicht nur vom Sauerstoffgehalt, sondern auch von der besonderen Zusammensetzung des CF-Mukus und den darin enthaltenen Nährstoffen beeinflusst. In den verschiedenen Habitaten des menschlichen Körpers stehen einem pathogenem Bakterium bis zu 100 verwertbare Kohlenstoffquellen sowie verschiedene Stickstoff-, Phosphat- und Schwefelquellen zur Verfügung (Eisenreich *et al.*, 2010). Essentielle Metallionen wie Mg^{2+} (in LB-Medium ca. 200 µM), Mn^{2+} oder Fe^{2+} liegen im Allgemeinen in geringen und sehr schwankenden Konzentrationen auch im LB-Medium vor (Nikaido, 2009;Eisenreich *et al.*, 2010). Für die Aufnahme dieser Stoffe sind spezifische Aufnahmesysteme und Stoffwechselwege notwendig (Eisenreich *et al.*, 2010). Selbst bei Wachstumsversuchen in ASM konnte das Ausmaß des Wachstumsdefekts der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* weder vermindert noch aufgehoben werden. Da das ASM Glukose, Nukleinsäuren, Fettsäuren, Proteine und alle 20 einzelne Aminosäuren enthält, ist es nährstoffreicher als das LB-Medium. Der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* standen somit alle wichtigen Nährstoffe zur Verfügung, sodass dies vermuten lässt, dass andere Ursachen wie Transporter oder Porine für den Wachstumsdefekt verantwortlich sein könnten. Diese Vermutung würde mit den Transkriptomdaten korrelieren, da eine große Anzahl an Transportern und Porinen in der IDH-Doppelmutante signifikante Genexpressionsveränderungen verglichen zum PA14 aufweisen (s. a. 5.4.5). Wie unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium und ASM beobachtet werden konnte, ist der Wachstumsdefekt der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* weiterhin vorhanden, jedoch ist der Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh* nicht so ausgeprägt wie unter aeroben Bedingungen. Unter anaeroben Bedingungen zeigt PA14 bereits ein vermindertes Wachstum. Dies lässt vermuten, dass der Citratzyklus in *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen weniger essentiell ist als unter aeroben Bedingungen, zumal die im Citratzyklus gebildeten Reduktionsäquvialente an NADH nicht unter anaeroben Bedingungen in der Atmungskette regeneriert werden können (Berg *et al.*, 2002;Lengeler *et al.*, 2009).

Neben dem Nährstoffangebot spielt der pH-Wert eine Rolle für das bakterielle Wachstum. Über den pH-Wert werden eine große Anzahl an periplasmatischen und zellwandassoziierten Stresssystemen, Transportern, Chaperonen und Redoxregulatoren kontrolliert (Maurer *et al.*, 2005). Wie die Wachstumsversuche bei unterschiedlichem pH-Wert zeigten, wird der Wachstumsdefekt der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* bei steigendem pH-Wert noch deutlicher, wobei der größte sichtbare Wachstumsdefekt im sauren pH-Bereich zu erkennen ist. Demnach wird die Isocitratdehydrogenase-Aktivität bei sauren Bedingungen mehr benötigt, wie auch in einer Studie mit *E. coli* gezeigt werden

konnte. Dort liegen die Expressionen der Gene des Citratzyklus einschließlich der Isocitratdehydrogenase *icdA* unter sauren Bedingungen (pH 5) höher als unter basischen Bedingungen (pH 8,7) (Maurer *et al.*, 2005). Anhand einer *E. coli icdA*-Mutante konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung der Isocitratdehydrogenase zu einer Anhäufung von Citrat oder Isocitrat führt (Lakshmi and Helling, 1976). Es kann daher sein, dass Citrat bzw. Isocitrat ebenfalls in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* angehäuft und ins umliegende Medium sezerniert wird, wodurch es zu einer Ansäuerung des Mediums kommt. Während in *P. fluorescens* dieses Phänomen durch eine Überexpression der Citrat-Synthase von *E. coli* erreicht wurde (Buch *et al.*, 2009), konnte dies bei *Streptomyces coelicolor* durch eine Aconitase-Mutante gezeigt werden (Viollier *et al.*, 2001). Durch biochemische Analysen konnte sogar bei gestressten *Salmonella* Typhimurium-Zellen festgestellt werden, dass Eisen oder Citrat über einen neu identifizierten Eisen-Citrat-Effluxtransporter IceT aus der Zelle transportiert wird, wodurch der Metabolismus kontrolliert und die Zelle vor Stress geschützt wird (Frawley *et al.*, 2013). Unter normalen Wachstumsbedingungen (aerob, 37 °C) konnte jedoch kein Unterschied beim pH-Wert zwischen PA14 und der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nach 24 h im LB-Kulturmedium festgestellt werden, was gegen eine Akkumulation von Citrat oder Isocitrat spricht (Daten nicht gezeigt). Über einen Citrat-Effluxtransporter (z. B. wie IceT) ist in *P. aeruginosa* nichts bekannt.

Durch phänotypische *Microarrays* sollte die Fähigkeit der IDH-Doppelmutante und der Mdh-Mutante zur Metabolisierung/Verstoffwechselung unterschiedlicher C-Quellen wie Zucker (z. B. Glukose), Carbonsäuren (z. B. Citrat), Aminosäuren (z. B. Glutamat) etc. getestet werden. Interessanterweise war die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nur in der Lage, α-Ketoglutarat und die Aminosäuren Histidin, Glutamat, Glutamin, Arginin und Prolin zu verwerten, jedoch keine weiteren Substrate/Zwischenprodukte des Citratzyklus oder weitere Aminosäuren (5.4.1). Eine entscheidende Rolle für das Wachstum von PA14Δ*icd*Δ*idh* spielt wahrscheinlich Glutamat, da diese Aminosäure eine Verbindung zu verschiedenen Stoffwechselwegen von *P. aeruginosa* herstellt und als zentraler Metabolit für verschiedene anabole und katabole Prozesse verwendet werden kann (Frimmersdorf *et al.*, 2010). Bei der Mdh-Mutante konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede gegenüber PA14 festgestellt werden, da wie bereits ausgeführt vorhandene Isoenzyme die Funktion vermutlich übernehmen und somit der Citratzyklus weiterhin intakt ist. Metabolom-Analysen oder sog. Metabolomics würden eine umfassende Charakterisierung aller Metabolite der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* liefern und somit die Frage einer Akkumulation präzise beantworten.

Im Verhältnis zu anderen Prokaryoten besitzt *P. aeruginosa* ein auffallend großes Genom und v. a. ein außergewöhnliches Repertoire an metabolischen Genen (Stover *et al.*, 2000;Lee *et al.*, 2006), die z. B. zur Aufnahme und Metabolisierung von Substraten dienen (> 300 bekannte und putative Substrataufnahmesysteme), was z. B. die Nutzung eines breiten Nährstoffspektrums und damit eine hohe Anpassungsfähigkeit an verschiedene Umweltbedingungen gewährleistet (Stanier *et al.*, 1966;Tamber and Hancock, 2003). Beim Wachstum auf Minimalmedium supplementiert mit einer

einzigen C-Quelle (z. B. Glutamat) zeigten die IDH-Doppelmutante und die Mdh-Mutante ein vergleichbares Wachstumsverhalten (s. a. Abbildung 6.1). Interessanterweise wuchs die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nur bei Zugabe von α-Ketoglutarat, Glutamat, Arginin oder Ornithin. Die Resultate der Wachstumsversuche mit supplementiertem Minimalmedium bestätigen somit die Ergebnisse der phänotypischen *Microarrays*. Unklar ist lediglich, welche Stoffwechselwege die IDH-Doppelmutante als Alternative zu dem unterbrochenen Citratzyklus nutzt, um z. B. an Energie oder essentielle Nährstoffe wie Aminosäuren zum Wachstum zu gelangen.

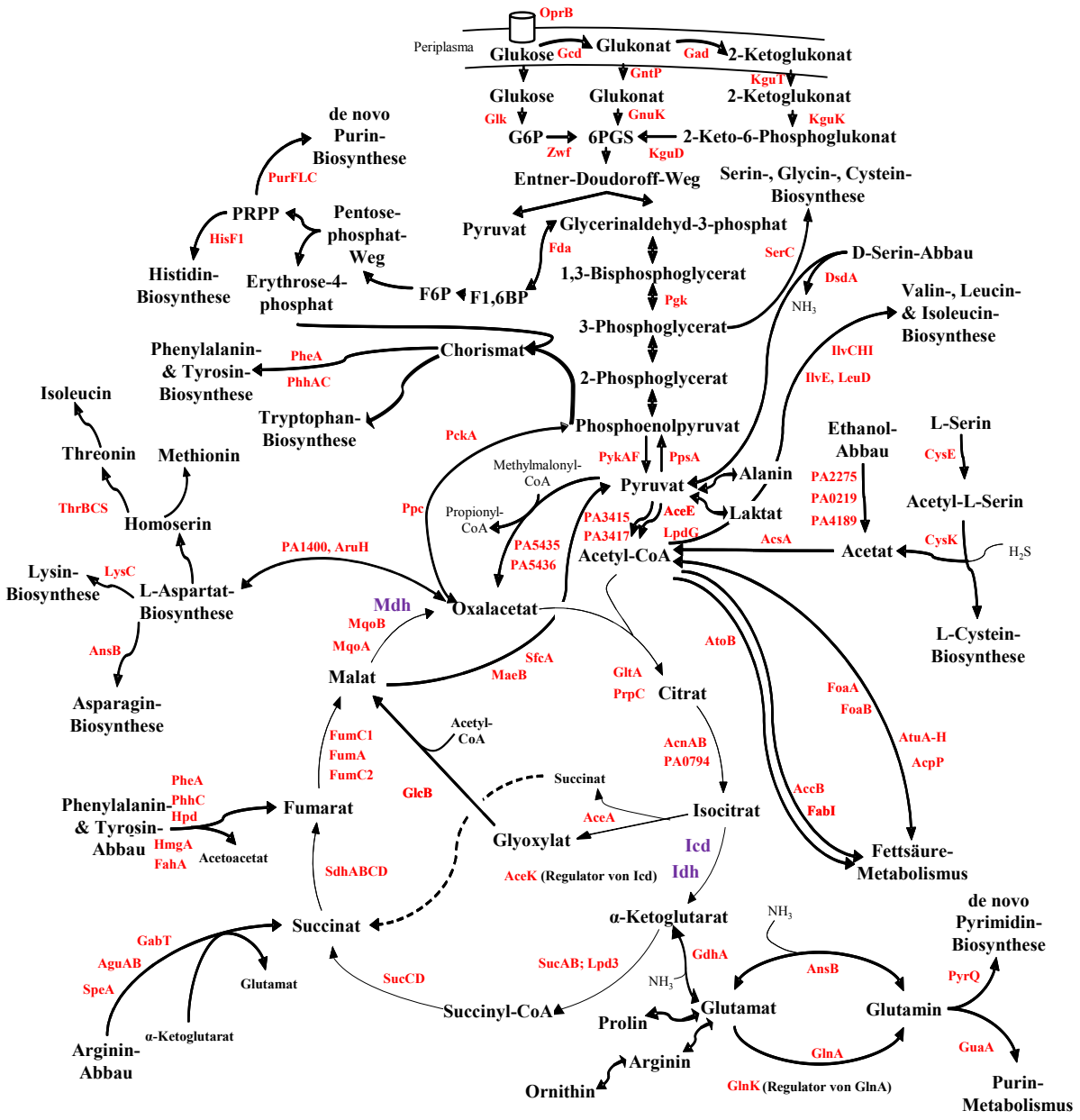


Abbildung 6.1 Schematische Darstellung der Stoffwechselwege bei *P. aeruginosa*
In dieser Abbildung sind schematisch die Stoffwechselwege inkl. der Enzyme bzw. PA-Nummern (Rot) von *P. aeruginosa* dargestellt. Von den Enzymen Icd, Idh und Mdh (Lila) wurden entsprechende Mutanten in dieser Arbeit konstruiert. Abkürzungen: G6P: Glukose-6-phosphat, 6PGS: 6-Phosphoglukonat, F1,6BP: Fruktose-1,6-bisphosphat, F6P: Fruktose-6-phosphat, PRPP: Phosphoribosylpyrophosphat. (Abbildung modifiziert nach (Hoboth, 2007))

Bei der Verstoffwechselung von Glukose zeigte die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nur eine geringe Stoffwechsel-Aktivität im Vergleich zu PA14 und der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm (Biolog). Obwohl *P. aeruginosa* Intermediate aus dem Citratzyklus vor einem Intermediat aus dem Entner-Doudoroff-Weg (z. B. Glukose) bevorzugt (Görke and Stülke, 2008), konnte bei den Versuchen mit Glukose supplementiertem Minimalmedium kein Wachstum der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* beobachtet werden. Glukose sowie weitere Zucker Fruktose, Glycerin und Mannitol gelangen über das spezifische Porin OprB in den periplasmatischen Raum (Wylie and Worobec, 1995;Adewoye and Worobec, 2000). Da für die Transkriptomanalysen die Stämme in nahezu glukosefreiem LB-Medium angezogen wurden, war eine Verminderung der *oprB*-Expression an sich zu erwarten (Sezonov *et al.*, 2007). Jedoch wurde für das *oprB*-Gen (10,54↓) in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* eine signifikant verminderte Genexpression gegenüber PA14 festgestellt, was wiederum mit den Ergebnissen aus den Biolog- und Minimalmedium-Experimenten korreliert. Es wäre deshalb interessant zu erfahren, wie sich die IDH-Doppelmutante bei einer Anzucht mit Glukose (z. B. LB-Medium + Glukose) in Transkriptomanalysen verhält. Nach der Aufnahme in den periplasmatischen Raum kann Glukose in *P. aeruginosa* nun entweder über den phosphorylierten oder über den oxidativen Weg zu 6-Phosphoglukonat verstoffwechseln, welches dann im Entner-Doudoroff-Weg weiter katabolisiert wird (s. a. Abbildung 6.1). Beim phosphorylierten Weg gelangt Glukose vom periplasmatischen Raum über ABC-Transporter unverändert ins Cytoplasma, wo es zunächst durch die Glukokinase (Glk) zu Glukose-6-phosphat und anschließend durch die Glukose-6-phosphatdehydrogenase (Zwf) weiter zu 6-Phosphoglukonat umgesetzt wird. Beim oxidativen Weg, der nur unter aeroben Bedingungen abläuft, wird Glukose ohne Phosphorylierung im periplasmatischen Raum durch die Glukosedehydrogenase (Gcd) und Gluconatdehydrogenase (Gad) zu Glukonat und 2-Ketoglukonat verstoffwechselt. Beide Kohlenhydrate können dann über entsprechende Aufnahmesysteme vom Periplasma in die Zelle aufgenommen werden (Whiting *et al.*, 1976;Lessie and Phibbs, Jr., 1984;Williams *et al.*, 1996;Ma *et al.*, 1998). Aus den Transkriptomdaten zwischen der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 können über die Gene beider Stoffwechselwege keine Informationen gewonnen werden, da entweder die Expressionsveränderungen der Gene zu gering (< 2-fach) oder die p-Werte zu hoch (> 0,05) waren. Zusätzlich kann über die Versuche mit Minimalmedium eine Energiegewinnung über Glukoneogenese mit Pyruvat als alleinige C-Quelle bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* ausgeschlossen werden.

Der Citratzyklus ist für den Katabolismus von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fettsäuren und viele Biosynthesewege, die vom Citratzyklus abzweigen für Proteobakterien wichtig (s. a. Abbildung 6.1). So münden z. B. durch den Abbau von Aminosäuren Intermediate an verschiedenen Stellen in den Citratzyklus (Owen *et al.*, 2002). Es gibt aber zahlreiche Bakteriengattungen, denen ein vollständiger oder überhaupt ein Citratzyklus fehlt, z. B. *Mycoplasma pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi*, Streptokokken oder Cyanobakterien (z. B. *Synechocystis* sp. PCC6803) (Trivett and Meyer, 1971;Muro-Pastor and Florencio, 1992;Fraser *et al.*, 1997;Huynen *et al.*, 1999;Eisenreich

et al., 2010;Fuchs *et al.*, 2012). Während autotrophe Bakterien Pyruvat über den oxidativen Citratzyklus bis zum α-Ketoglutarat synthetisieren, nutzen methanogene Archaen oder *Archaeoglobus fulgidus* den reduktiven Citratzyklus (Fuchs and Stupperich, 1978;Huynen *et al.*, 1999). Interessanterweise, ist die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nicht in der Lage Pyruvat als C-Quelle für die Verstoffwechselung (Biolog) oder Vermehrung (Minimalmedium) zu nutzen. Zusätzlich ist in der Literatur nichts über eine Nutzung des reduktiven Citratzyklus bei *P. aeruginosa* bekannt. Dagegen ist *Streptococcus pyogenes* in der Lage, obwohl die meisten Enzyme des Citratzyklus einschließlich der Citrat-Synthase fehlen, mit Hilfe der vorhandenen Citratlyase Citrat über den reduktiven Citratzyklus zurück zu Oxalacetat zu katalysieren, um daraus Aminosäuren der Aspartat-Familie zu bilden (Fuchs *et al.*, 2012). Im Kontrast kann die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nur in geringem Maße Citrat, Malat, Fumarat und Succinat verstoffwechseln und ist nicht in der Lage mit Oxalacetat, Malat, Fumarat und Succinat als alleinige C-Quelle zu wachsen. Ein ähnliches Bild ist bei der *icd*-Mutante von *E. coli* zu beobachten, bei der im Vergleich zum WT von *E. coli* die Enzyme von der α-Ketoglutaratdehydrogenase bis hin zur Fumarase herunterreguliert sind (Kabir and Shimizu, 2004). Selbst die Fähigkeit von *P. aeruginosa* Substrate wie Malat (mittels *malic enzymes*) bzw. Oxalacetat (mittels Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) über eine kataplerotische Reaktion zu Pyruvat bzw. Phosphoenolpyruvat zu verwerten, scheint der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* in den Minimalmedium-Wachstumsexperimenten nicht zu nützen.

Es wird vermutet, dass der Glyoxylatweg in *P. aeruginosa* (s. a. Abbildung 6.1) zum Abbau bestimmter Nährstoffe dient und zum anderen für eine optimale Ausbildung von verschiedenen Virulenzfaktoren wichtig ist (Hagins *et al.*, 2010). In *E. coli* führt eine Inaktivierung des *icd*-Gens zu einer Erhöhung des Glyoxylatwegs (Kabir and Shimizu, 2004). Es kann nicht sicher beurteilt werden, ob dies ebenfalls bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* aus *P. aeruginosa* der Fall ist. Dagegen sprechen folgende Argumente: 1) Die IDH-Doppelmutante ist nicht in der Lage Pyruvat, Citrat, Isocitrat oder die Fettsäure Palmitinsäure zu verstoffwechseln bzw. damit zu wachsen. 2) Zum anderen wurden keine erhöhten Genexpressionswerte für die Isocitratlyase und Malatsynthase bei den Transkriptomanalysen gemessen. 3) Zusätzlich zeigt die *icd*-Mutante von *E. coli* verglichen zum WT von *E. coli* eine höhere Malatdehydrogenase *mdh*-Genexpression (Kabir and Shimizu, 2004). Insgesamt sind in den Transkriptomdaten bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gegenüber PA14 für alle fünf Gene, die für Malat-verwertende Enzyme kodieren, keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression zu beobachten. Es ist davon auszugehen, dass der Citratzyklus in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nicht die Rolle wie unter aeroben Bedingungen spielt, da die Energiegewinnung in der Atmungskette durch die im Citratzyklus gebildeten Reduktionsäquivalente wegfällt. Wie in *E. coli* gezeigt werden konnte, ist die Citratzyklus-Aktivität inkl. der Isocitratdehydrogenase unter anaeroben Bedingungen reduziert (Nakano *et al.*, 1998).

Interessanterweise ist die IDH-Doppelmutante nur fähig, Aminosäuren der Glutamat-Familie (Glutamat, Glutamin, Prolin, Arginin, Ornithin etc.) mit Ausnahme von Histidin zu verwerten.

Glutamat und Glutamin spielen neben ihrer Rolle als katabolisches Substrat eine wichtige metabolische Funktion für die Aminosäurebiosynthese in *P. aeruginosa* aufgrund ihres Transaminierungs- und Transamidierungspotentials. Mit der Beteiligung an der ATP- und Glutathion-Produktion leisten beide Aminosäuren zusätzlich wichtige Funktionen für die Bakterienzelle (Moat, 2002). Wie die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit einem inaktiven Citratzyklus an andere essentiellen Aminosäuren gelangt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden (s. a. Abbildung 6.1). Spezies der Gattung *Buchnera* beziehen Aminosäuren beispielsweise entweder über Buchnera-spezifische Stoffwechselwege, in Symbiose mit Wirts-spezifischen Enzymen oder direkt vom Wirt (Hansen and Moran, 2011;Fuchs *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einigen Expressionsveränderungen von Effluxpumpengenen in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen zu PA14 kommt. Da viele universelle Effluxpumpen unter anderem auch Nährstoffe aus der Zelle befördern, kann eine erhöhte Expression nicht nur beispielsweise eine Antibiotika-Resistenz, sondern auch weitere Funktionen von *P. aeruginosa* betreffen (Webber and Piddock, 2003). Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass wichtige Nährstoffe bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* aus der Zelle heraustransportiert werden, die jedoch zum Wachstum benötigt werden.

Über Isotopolog-Experimente oder Metabolomanalysen wäre es möglich, zusätzliche Informationen zu Stoffwechselwegen und Energiegewinnung der IDH-Doppelmutante zu erhalten. In dieser Arbeit begonnene Isotopolog-Experimente lieferten keine stichhaltigen Ergebnisse und müssten wiederholt werden.

6.1.3 Auswirkungen der IDH-Inaktivierung auf das Transkriptom von *P. aeruginosa*

In der Dissertationsschrift von A. Eichner wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits einige/erste Experimente mit den IDH-Insertionsmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn durchgeführt (Eichner, 2012), jedoch keine Transkriptomanalysen. Insgesamt wurden zur weiteren Klärung der spezifischen Funktion beider Isoenzyme mit den zwei IDH-Insertionsmutanten (PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn), der IDH-Doppeldeletionsmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und dem PA14 in LB-Medium Transkriptomanalysen durchgeführt. Bei der Interpretation von Transkriptomdaten ist jedoch zu beachten, dass z. B. posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen nicht berücksichtigt werden, diese jedoch den Phänotyp entscheidend beeinflussen können. Des Weiteren sind methodische Besonderheiten zu berücksichtigen. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurde für jeden zu testenden Stamm die Anzucht in Triplikaten und jeweils ein *Microarray* durchgeführt (biologische Replikate). Nach den anschließenden Messungen und Auswertungen der Expressionen wurden nur Gene berücksichtigt, die mindestens eine $\geq$ 2-fach veränderte Genexpression zum Vergleichsstamm und gleichzeitig einen p-Wert $\leq$ 0,05 aufweisen. Manche Gene, die zwar Genexpressionsveränderungen von ≥ 2 aufweisen, jedoch einen p-Wert > 0,05 haben, können

aufgrund des gesetzten Kriteriums, um die Anzahl an falsch-positiven Transkripten gering zu halten, nicht mehr berücksichtigt werden. Weist die Mehrheit der Gene eines Stammes in einem Operon Genexpressionsveränderungen auf, ist es sehr wahrscheinlich, dass das gesamte Operon in seiner Genexpression zum Vergleichsstamm verändert ist (Sabatti *et al.*, 2002;Price *et al.*, 2006;Xiao *et al.*, 2006). Insgesamt geben die Transkriptomanalysen wichtige Hinweise über Gene und Genklassen eines Stammes, die durch Experimente zur Proteinexpression validiert werden sollten.

Wie in dieser Arbeit und in der Dissertation von A. Eichner wiederholt gezeigt werden konnte, können sich die Isoenzyme Icd und Idh bei Funktionsverlust eines Enzyms gegenseitig offensichtlich weitgehend kompensieren. Dies zeigt besonders eindrucksvoll der Vergleich der Transkriptome beider IDH-Insertionsmutanten, wobei nur zwei Gene unter den gesetzten Auswertekriterien (≥ 2-fache Genexpression, p-Wert ≤ 0,05) ermittelt wurden, die bei PA14 *idh*::Tn um das 4,47-fache erniedrigt bzw. um das 2,16-fache erhöht waren. Ansonsten zeigten die Transkriptome beider IDH-Insertionsmutanten keinerlei Unterschiede. Die Transkriptome beider IDH-Insertionsmutanten zeigen im Vergleich zu PA14 dagegen deutlich mehr Veränderungen in der Genexpression v. a. in den Gengruppen „Kohlenstoff-Katabolismus“, „Hypothetische, unklassizifierte, unbekannte Proteine“ und „Transport von kleinen Molekülen“. Da es sich bei der Isocitratdehydrogenase um ein metabolisches Enzym handelt, ist eine Veränderung insbesondere im „Kohlenstoff-Katabolismus“ nicht unerwartet. Ebenso ist die große Anzahl an Veränderungen in den Transkripten von „Hypothetischen, unklassizifierten, unbekannten“ Proteinen im Transkriptom nicht ungewöhnlich.

Bei dem Transkriptomvergleich von PA14Δ*icd*Δ*idh* mit PA14 wurden wie erwartet deutlich mehr Expressionsunterschiede bei insgesamt 447 Genen festgestellt. Die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* weist ebenfalls in der Gengruppe „Transport von kleinen Molekülen“ eine hohe Anzahl (n = 68) an veränderten Transkripten auf. Insgesamt sind die Transkripte für den Stoffwechsel in der IDH-Doppelmutante herunter reguliert, was auch das langsame Wachstum erklären würde. Des Weiteren sind für die Gengruppen „Energie Stoffwechsel“ (n = 17), „Kohlenstoff-Katabolismus“ (n = 18), „Biosynthese von Kofaktoren, prosthetische Gruppen und Transportmoleküle“ (n = 13) sowie „Biosynthese von Aminosäuren und Metabolismus“ (n = 25) ebenfalls eine hohe Anzahl von Transkripten erniedrigt in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen mit PA14, was auch für eine allgemeine Verminderung der Stoffwechsel-Aktivität spricht. Neben der Transkription von metabolischen Genen sind auch zahlreiche Transkripte von transkriptionale Regulatoren in quantitativer Hinsicht in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* verändert, so z. B. *rsaL* und *rhlR*, was auf eine Veränderung im Quorum Sensing (QS) hindeutet. Das Gen *rsaL*, das in der IDH-Doppelmutante im Vergleich zu PA14 die größte Transkriptonsreduktion von 101,95↓ zeigt, kodiert für einen Repressor des *lasI* -Genes, wodurch die QS-Kaskade blockiert wird (de Kievit *et al.*, 1999). Eine *rsaL*-Mutante von *P. aeruginosa* PAO1 zeigte eine dramatisch erhöhte Produktion von N-acyl-Homoserinlaktonen (Rampioni *et al.*, 2006). Bei der *rsaL*-Mutante wurde auch eine Dysregulation von Genen für Effluxpumpen (z. B. *mexGHI-opmD*) und Sekretionsvorgänge (z. B. für Pyocyanin)

festgestellt (Rampioni *et al.*, 2009). Neben der Transportfunktion von Molekülen können Effluxpumpen auch einen Einfluss auf Virulenzfaktoren haben. So führt eine Überexpression der Effluxpumpen MexAB-OprM oder MexEF-OprN zu einem Defekt im QS, da auch Autoinduktoren exportiert werden (Evans *et al.*, 1998;Köhler *et al.*, 2001). Ebenso konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass eine Überproduktion der Effluxpumpen MexEF-OprN oder MexCD-OprJ zu einer Reduzierung des Typ III-Sekretionssystems von *P. aeruginosa* führt (Linares *et al.*, 2005). Ähnlich wurden in dieser Arbeit bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* Expressionsveränderungen für Effluxpumpen- und QS-Gene festgestellt sowie eine Tendenz für ein reduziertes Typ III-Sekretionssystem (s. 6.2.3) und eine erhöhte Pyocyanin-Produktion. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und der PAO1 *rsaL*-Mutante ist eine verstärkte Antibiotikaempfindlichkeit (Rampioni *et al.*, 2009). Da Regulatoren von Regulons in der Regel eine Vielzahl von Genen steuern, hat eine Veränderung der Expression oft weitreichende Folgen auf die Physiologie der gesamten Bakterienzelle. Interessanterweise sind bei den Transkriptomanalysen für die aus dem Kohlenstoffmetabolismus bekannten Transkriptionsregulatoren CsrA (*carbon storage regulator*) und Crc (*catabolite repression control*) keine signifikanten Unterschiede zwischen PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Weitere wichtige Transkripte von Regulatoren ExsA (Typ III-Sekretion) oder RpoS (alternativer Sigmafaktor der stationären Phase) zeigen ebenfalls keine deutlichen Unterschiede (Daten nicht gezeigt). In der *icdA*-Mutante von *E. coli* wurde verglichen mit dem WT eine höhere Malatdehydrogenase-Expression (*mdh*) gemessen (Kabir and Shimizu, 2004), wohingegen bei der IDH-Doppelmutante von *P. aeruginosa* dies nicht der Fall ist.

6.2 Auswirkungen der Deletion von *icd*, *idh* bzw. *mdh* auf die Expression von Virulenzfaktoren bei *P. aeruginosa* PA14

6.2.1 Beeinträchtigung der Motilität von *P. aeruginosa* durch Inaktivierung der IDH

In Motilitäts-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* einen eindeutigen Defekt in allen drei Motilitätsformen (*Swimming*, *Twitching*, *Swarming*) aufweist. Die erniedrigten Genexpressionen von *flgD* (2,31↓) und *fliH* (2,68↓) aus der Transkriptomanalyse geben erste Hinweise auf eine Veränderung der Flagellenproduktion in PA14Δ*icd*Δ*idh*. FlgD wird für den „Flagellen-Haken-Aufbau“ benötigt und bildet den „Proteindeckel“ (*Cap*) des wachsenden Hakens (Chevance and Hughes, 2008;Moriya *et al.*, 2011;Zhou *et al.*, 2011). FliH ist ein negativer Regulator und ist Bestandteil eines FliH-FliI-FliJ-ATPase-Komplexes. Es wird vermutet, dass dieser Komplex Sekretionssubstrate bzw. Flagellarproteine zum integralen Flagellar-Proteinexportapparat im MS Ring für eine ATP-abhängige Sekretion überbringt (Chevance and Hughes, 2008;Minamino *et al.*, 2008;Minamino *et al.*, 2012). Die beiden Genexpressionsveränderungen *flgD* und *fliH* müssen jedoch nicht zwangsläufig zu einem völligen Defekt der Motilität führen. So konnte anhand von *Spiroplasma*

spp. und einigen marinen Cyanobakterien der Gattung *Synechococcus* gezeigt werden, dass die Schwimm-Motilität auch ohne Flagelle möglich ist (Jarrell and McBride, 2008). Dagegen wurde in einer anderen Studie anhand von *P. aeruginosa flgE*-, *fliC*- und *fliD*-Mutanten gezeigt, dass eine intakte Flagelle notwendig für die Schwimm-Motilität ist (Zhang *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde in einer anderen Studie mit CF-Isolaten von *P. aeruginosa* beobachtet, dass ca. 95 % der Isolate unter dem Mikroskop nicht-motil sind, jedoch ca. 60 % eine intakte Flagelle besitzen (Palmer *et al.*, 2005). Es müsste in weiteren Versuchen geklärt werden, welchen Einfluss die verminderten Genexpressionen von *flgD* und *fliH* auf die Flagellenproduktion von PA14Δ*icd*Δ*idh* haben.

Wie anhand von *E. coli* und *S. enterica* serovar Typhimurium gezeigt werden konnte, spielt der pH-Wert für die Motilität ebenfalls eine große Rolle. So zeigten beide Stämme im sauren Bereich ein besseres Schwimmverhalten als im basischen Bereich. Zusätzlich wird vermutet, dass eine enge Verbindung zwischen Säurestress und oxidativen Stress besteht (Maurer *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass AcnB (Aconitase) aus *S. enterica* neben der katalytischen eine regulatorische Funktion bei oxidativen Stress aufweist, wodurch weitere Gene reguliert werden. So wurde bei einer *S. enterica acnB*-Mutante gegenüber dem WT eine reduzierte Motilität sowie eine geringere Flagellenbildung festgestellt (Tang *et al.*, 2004). Weitere regulatorische Mechanismen bilden die Transkriptionsregulatoren FlhD/FlhC aus *E. coli*, die verschiedene Flagellen- und nicht-Flagellengene regulieren, unter anderem auch Stoffwechselwege wie den Entner-Doudoroff-Weg (Prüß *et al.*, 2003). Durch Blast-Analysen konnten jedoch keine homologen Gene für *flhD* und *flhC* in *P. aeruginosa* identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus liegt bei der IDH-Doppelmutante ein Defekt für die *Twitching*-Motilität vor, der wie auch bei der *Swimming*-Motilität durch *icd* und *idh* komplementiert werden konnte. Gene, die für Typ IV-Pili benötigt werden, zeigten zum Teil ebenfalls signifikante Veränderungen in den Genexpressionen, z. B. *pilG* (3,54↓), *pilJ* (2,8↓), *pilK* (2,64↓) und *pilM* (2,9↓).

Beim Schwärmen wurde ebenfalls ein deutlicher Defekt der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* im Vergleich zu PA14 beobachtet, wobei die Schwärm-Motilität praktisch nicht komplementiert werden konnte (Komplementation mit p*icd* und/oder p*idh* zeigte schwache Schwärmzunahme). Wie in einer anderen Studie gezeigt wurde, handelt es sich beim Schwärmen um eine komplexe Motilitätsform, bei der eine Vielzahl von Genen involviert sind (Overhage *et al.*, 2007). Das Schwärmen ist zum einen stark abhängig von der Flagelle, den Typ IV-Pili und der Rhamnolipid-Produktion und zum anderen von der bakteriellen Zelldichte, der Verfügbarkeit von Nährstoffen und dem Wassergehalt im Medium (Overhage *et al.*, 2007;Overhage *et al.*, 2008;Kearns, 2010). Als mögliche Ursache für den Schwärmdefekt kann die verminderte Expression der Flagelle und der Typ IV-Pili wie bereits oben erwähnt angenommen werden. Auch ein möglicher Verlust von Energiespeichern (z. B. ATP) und Reduktionsäquivalenten (NADPH und NADH) aufgrund des unterbrochenen Citratzyklus in der IDH-Doppelmutante könnte zu den Motilitäts-Defekten beitragen. Zusätzlich kann aufgrund des langsameren Wachstums der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* vermutet werden, dass die erst spät

zustande kommende und benötigte Zelldichte ein weiterer Grund für den Schwärmdefekt ist. Die Produktion von Rhamnolipiden, die den sog. *surfactants* angehören, wird durch das QS-System reguliert (Kearns, 2010). Da in der IDH-Doppelmutante auch das QS-System dereguliert ist (s. Transkriptomdaten), stellt auch eine veränderte Bildung von Rhamnolipiden eine mögliche Ursache für den Schwärmdefekt dar. Das Schwärmverhalten von PA14Δ*icd*Δ*idh* wurde auch über einen längeren Zeitraum als 24 h bestimmt, jedoch war der Schwärmdefekt weiterhin vorhanden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet wahrscheinlich, dass der Schwärmdefekt von PA14Δ*icd*Δ*idh* nicht von der Zelldichte abhängig ist. Abgesehen davon konnte in einer anderen Studie im Umkehrschluss gezeigt werden, dass ein Schwärmdefekt nicht unbedingt einen Einfluss auf das Wachstum haben muss (Overhage *et al.*, 2007).

In weiteren Studien wurde festgestellt, dass eine veränderte LPS-Struktur einen Einfluss auf die Motilität haben kann (Genevaux *et al.*, 1999;Huang *et al.*, 2006). So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es Unterschiede im LPS-Profil (s. Abbildung 5.38) und in den Genexpressionen von Membranproteinen sowie Transportern (Transkriptomdaten) zwischen PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 gibt, die eine veränderte Membranzusammensetzung von PA14Δ*icd*Δ*idh* vermuten lassen.

Die Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm zeigte gegenüber PA14 ebenfalls einen Defekt bei der Schwimm-Motilität, der jedoch nicht so stark ausgeprägt war als wie bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*. Dieses Ergebnis korreliert mit einer anderen Studie, bei der eine Transposonmutante Tn::*mdh* im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* UTI89 (UPEC) einen deutlich signifikanten Schwimmdefekt aufzeigte (Hadjifrangiskou *et al.*, 2012). Warum es zu dem Motilitätsdefekt bei PA14 *mdh*::Gm kommt, konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

6.2.2 Auswirkungen der IDH-Inaktivierung auf die Biofilm-Bildung von *P. aeruginosa*

Für die Biofilm-Bildung sind sowohl die Flagellen-abhängige *Swimming*-Motilität, die Typ IV-Pili-abhängige *Twitching*-Motilität, die *Swarming*-Motilität sowie ein funktionstüchtiges QS wichtig (Shrout *et al.*, 2006;Schaber *et al.*, 2007). Für alle drei Motilitätsformen konnten Defekte in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* festgestellt werden; zusätzlich wurden Veränderungen im QS-System (z. B. *rsaL*) beobachtet. Diesen Ergebnissen zufolge war eine schwächere Biofilm-Bildung bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen mit dem PA14 zu erwarten. Interessanterweise konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der (relativen) Biofilm-Bildung weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen beobachtet werden. Aktuell konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass unter anaerobe Bedingungen eine PAO1 *icd*-/*idh*-Doppelmutante von *P. aeruginosa* eine leichte erhöhte Biofilm-Bildung verglichen zum WT PAO1 aufweist (Chung *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurden die gesamten Biofilm-Experimente jedoch mit der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 von *P. aeruginosa* durchgeführt. Dennoch korrelieren die unter anaeroben Bedingungen erzielten Ergebnisse mit der zuvor erwähnten aktuellen Studie (s. Abbildung 5.27).

Warum keine Unterschiede feststellbar waren, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden; mehrere Ursachen könnten dafür jedoch verantwortlich sein. So ist die Biofilm-Bildung ein dynamischer Prozess, sodass es schwierig ist diese Entwicklung unter *in vitro*-Bedingungen zu simulieren und auch mögliche Fehler zu entdecken, da lediglich Endpunktbestimmungen durchgeführt wurden. Bei der Durchführung der Biofilmprotokolle handelt es sich um eine sehr sensible Methode, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass an der Flüssigkeitsoberfläche gebildete Biofilme z. B. bei den Waschschritten abgesaugt wurden und es so zu einer Verfälschung der Ergebnisse kam, trotz mehrmaliger Versuchsdurchführungen. Des Weiteren haben verschiedene physikalische Faktoren Einfluss auf die Biofilm-Bildung. Da es sich bei der Bildung um einen eher statistischen Prozess handelt, ist es schwer exakte Reproduktionen zu erzielen, selbst unter konstanten experimentellen Bedingungen (Heydorn *et al.*, 2002).

6.2.3 Einfluss der IDH-Inaktivierung auf sekretierte Virulenzfaktoren

Verschiedene Studien haben zeigen können, dass es bei Bakterien eine regulatorische Verbindung zwischen Metabolismus und Virulenz gibt (Rietsch and Mekalanos, 2006;Herbst *et al.*, 2009;Pohl *et al.*, 2009;Daddaoua *et al.*, 2012). Es könnte deshalb sein, dass Sekretionssysteme durch Funktions- und ATP-Verluste sowie einen Protonengradient-Abfall in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* betroffen sind. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die IDH-Doppelmutante nicht mehr fähig ist, ausreichend Elastase (LasB) zu exprimieren. Neben dem am häufigsten über das Typ II-Sekretionssystem (Xcp) sekretierten LasB Protein werden von *P. aeruginosa* eine Vielzahl weiterer Virulenzfaktoren wie Proteasen, Exotoxin A, Lipasen, Alkaline-Phosphatase oder Phospholipase C sekretiert (Filloux *et al.*, 1998;Douzi *et al.*, 2011). Wie im Falle der Elastase zeigt die IDH-Doppelmutante auch eine fehlende Gesamt-Protease-Aktivität, was insgesamt für eine Störung oder verminderte Aktivität des Typ II-Sekretionssystems (Xcp) spricht. Bestätigt wird diese Vermutung durch die Transkriptomdaten der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*, bei der mehrere Gene inkl. *lasB* signifikant herunterreguliert sind. Das veränderte LPS der IDH-Doppelmutante könnte sich ebenso auf die korrekte Funktion der Xcp-Maschinerie auswirken, da bestimmte LPS-Mutanten von *P. aeruginosa* kein funktionierendes Xcp-Sekretionssystem mehr aufweisen (Michel *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ein defektes Typ II-Sekretionssystem (Xcp) auch Auswirkungen auf andere Virulenzfaktoren hat. So wurde bei einer *lasB*-Mutante sowie bei *xcpS*-, *xcpT*- und *xcpY*-Mutanten, letztere die jeweils einen Defekt in Komponenten des Typ II-Sekretionssystems von *P. aeruginosa* aufweisen, ein Motilitätsdefekt beobachtet (Overhage *et al.*, 2007). Dies korreliert mit der IDH-Doppelmutante, die ebenfalls Defekte in ihrer Motilität aufweist.
Neben der Typ II-abhängigen Sekretion existieren für Proteasen noch weitere Sekretionssysteme (z. B. AprA über Typ I) in *P. aeruginosa*. Trotz nicht signifikanter Werte bei den Transkriptomdaten können jedoch aufgrund der insgesamt großen Anzahl in ihrer Expression veränderter Gene bei der IDH-

Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* weitere Abweichungen für andere Sekretionssysteme vermutet werden. Während das Typ III-Sekretionssystem in der IDH-Doppelmutante ebenfalls negativ beeinflusst zu sein scheint, deuten weitere Genexpressionen auf eine Aktivierung des Typ VI-Sekretionssystems hin (Daten nicht gezeigt).

Wie belegt werden konnte, wurde bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* eine fast doppelt so hohe Produktion des Pigments Pyocyanin im Vergleich zu PA14 gemessen. Die Komplementation dieser Überproduktion war jedoch nicht möglich und die komplementierten Stämme wiesen sogar eine noch stärkere Pyocyanin-Produktion auf als die IDH-Doppelmutante. In einer anderen Studie wurde mit einer *oxyR*-Mutante von *P. aeruginosa* hinsichtlich der Pyocyanin-Produktion ein vergleichbares Ergebnis erzielt (Vinckx *et al.*, 2010). Die Komplementation mit einem Einzelkopie-Vektor war anschließend erfolgreich. Höchstwahrscheinlich ist dadurch die erhöhte Pyocyanin-Produktion der Komplementanten in dieser Arbeit auf die Kopienanzahl des pBBR1MCS-Vektors zurückzuführen. Weitere negative Komplementationen (z. B. beim Schwärmen) in dieser Arbeit könnten demnach auf den gleichen Effekt zurückzuführen sein. Pyocyanin wird von *P. aeruginosa* nicht nur als Virulenzfaktor, sondern auch als Signalmolekül verwendet (Möker *et al.*, 2010). So reguliert das Pyocyanin in der frühen stationären Phase eine Vielzahl von Genen, die unter anderem eine Rolle in Efflux- und Redoxprozessen sowie für den Erwerb von Eisen spielen (Dietrich *et al.*, 2006;Vinckx *et al.*, 2010). Dies würde vermuten lassen, dass neben den QS-Systemen ein weiterer Signalübertragungsmechanismus in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* beeinflusst ist.

Das Farbpigment Pyocyanin ähnelt strukturell dem Superoxidradikalbildner Paraquat. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass wenn *P. aeruginosa* Paraquat oder auch Pyocyanin ausgesetzt ist, es unter anderem zu einer Aktivierung der Transkription der Gene *mexGHI-opmD*, PA2274 und PA3718 durch den Transkriptionsregulator und Superoxidanionsensor ($O_2^{\cdot -}$) SoxR (PA2273) kommt (Kobayashi and Tagawa, 2004;Palma *et al.*, 2005;Dietrich *et al.*, 2006;Möker *et al.*, 2010). Vor PA2274 und PA3718 und dem *mexGHI-opmD*-Operon befindet sich stromaufwärts eine spezifische Bindestelle (*Sox-box*), an die SoxR bindet, das homolog zum SoxR von *E. coli* ist, und somit die Expression der Gene aktiviert (Kobayashi and Tagawa, 2004;Palma *et al.*, 2005). Aufgrund eines schlechten p-Wertes (> 0,05) kann keine Bewertung über die Genexpression in den Transkriptomdaten von *soxR* bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen zu PA14 gemacht werden. Basierend auf der Sequenzhomologie mit *S. coelicolor*, stellt PA2274 eine putative Monooxygenase dar, die an Actinorhodin, ein aromatisches Polyketid (ähnliche Struktur wie Phenazine), bindet und es oxidiert (Sciara *et al.*, 2003;Dietrich *et al.*, 2006). Bemerkenswerterweise kodiert PA3718 für ein inneres Membranprotein bzw. eine mögliche Effluxpumpe, die aufgrund von Sequenzvergleichen zu 27 % identisch mit SmvA aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ist, das mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Paraquat in Verbindung gebracht wird (Hongo *et al.*, 1994;Palma *et al.*, 2005;Gil *et al.*, 2007). Die höchste Identität mit SmvA auf Proteinebene besteht mit PA1282 bzw. PA14_47640 (40 % bzw. 45 %) von *P. aeruginosa*, das für einen möglichen Transporter kodiert (Daten nicht

gezeigt). Für alle Gene konnten keine Auffälligkeiten in den Genexpression bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* festgestellt werden, was sehr wahrscheinlich auf eine ungenügende Induzierung durch Paraquat zurückzuführen ist. Allerdings konnten verschiedene phänotypische Veränderungen der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nach Inkubation mit Paraquat beobachtet werden, welche im nächsten Abschnitt erläutert werden.

6.2.4 Erhöhte Toleranz von *P. aeruginosa* gegenüber oxidativem Stress

In weiteren Versuchen wurde die Sensitivität der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und verschiedener komplementierter Stämme gegenüber dem Superoxidradikalbildner Paraquat untersucht. Die Toxizität von Paraquat hängt dabei zum einen von einem Elektronendonor wie NADPH ab, der Paraquat zu einem Kationradikal reduziert und zum anderen von Sauerstoff der Paraquat reoxidiert (Abbildung 6.2) (Hassan and Fridovich, 1978;Bus and Gibson, 1984;Suntres, 2002). Die IDH-Doppelmutante war unerwarteterweise im Vergleich zu PA14 unter aeroben Bedingungen in LB-Medium signifikant resistenter gegen Paraquat; ein Phänotyp der auch mit den Plasmiden p*icd* und/oder p*idh* komplementiert werden konnte. Unter anaeroben Bedingungen wurde wie erwartet keine Beeinträchtigung des Wachstums durch Paraquat gefunden (Daten nicht gezeigt), da Paraquat Sauerstoff (O_2) für seine Toxizität benötigt.

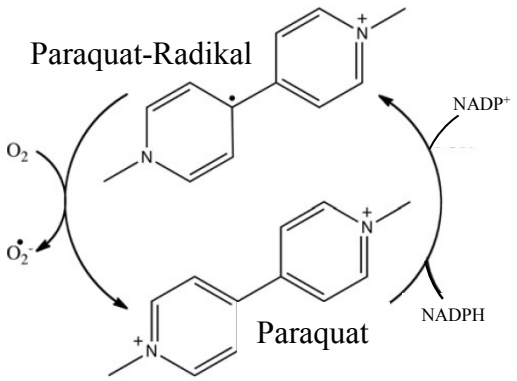


Abbildung 6.2 Redox-Reaktionszyklus von Paraquat
Mit Hilfe von z. B. NADPH wird die oxidierte Form von Paraquat reduziert, wodurch das reaktive Paraquat-Radikal entsteht. Die Elektronen werden anschließend von dem Radikalmolekül auf O_2 übertragen, sodass ein Superoxidradikal entsteht. Die erneut oxidierte Form des Paraquats kann in einem neuen Zyklus neue Elektronen aufnehmen. Die Toxizität des Paraquats beruht zum einen auf der Bildung des Superoxidradikals und zum anderen auf der Reduzierung der Konzentration von Reduktionsäquivalenten wie NADPH. (Abbildung modifiziert nach (Fussell *et al.*, 2011))

Die Inkubation von Lungengewebe von Ratten *in vitro* mit Paraquat führt zu einer Induktion des Pentosephosphatwegs der Gewebszellen, was beispielsweise auch bei *E. coli* gezeigt werden konnte. Durch Induktion dieses Stoffwechselwegs wird neues NADPH generiert, da durch Paraquat die Konzentration von NADPH im Cytoplasma vorher reduziert wurde (Rose *et al.*, 1976;Pomposiello *et al.*, 2001;Suntres, 2002). Dieser Zusammenhang konnte in anderen Studien mit *E. coli* und

P. aeruginosa bestätigt werden. Das Gen *zwf* kodiert für die Glukose-6-phosphatdeydrogenase, welche die Konversion von Glukose-6-phosphat zu 6-Phosphoglukonat katalysiert unter der Bildung von NADH oder NADPH. Eine *zwf*-Mutante von *E. coli* oder *P. aeruginosa* ist sensitiver gegenüber Paraquat als der WT (Greenberg *et al.*, 1990;Ma *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis korreliert mit der Hypothese, dass eine stärkere Verfügbarkeit an NADPH zu einem besseren Schutz gegen oxidativen Stress führt (Pomposiello *et al.*, 2001;Singh *et al.*, 2008). Es war daher zu erwarten, dass der Ausfall der Isocitratdehydrogenase in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Paraquat führt.

Entgegen dieser Erwartungen wurde jedoch in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen zu PA14 keine verminderten Konzentrationen an Reduktionsäquvialenten, weder für NADH noch NADPH gemessen. Der NADPH-Bedarf der Zelle ist an den Aufbau von Biomasse gekoppelt (Fuhrer and Sauer, 2009). Obwohl durch den Ausfall der Isocitratdehydrogenase die Bildung von NADPH durch diese Reaktion im Stoffwechsel zum Erliegen kommt, scheint in der IDH-Doppelmutante dieser Ausfall insgesamt kompensiert zu werden. Verschiedene mögliche biochemische Mechanismen sind denkbar, die in der Bakterienzelle den Bedarf an NADH (Katabolismus) oder NADPH (Anabolismus) regulieren. Es gibt Mechanismen, die ein Ungleichgewicht von NADH und NADPH vermeiden oder durch bestimmte Enzyme ausgleichen können. So werden in verschiedenen Hefen je nach dem welcher Stoffwechselweg zum Abbau von C-Quellen verwendet wird (Glykolyse vs. Pentosephosphatweg; Citratzyklus vs. Glyoxylatweg), unterschiedliche Mengen an NADPH in der Zelle gebildet (Blank *et al.*, 2005). Zusätzlich können bestimmte Isoenzyme, z. B. sog. *malic enzymes*, mit ihrer breiten Kofaktorspezifität (NADH oder NADPH) das Verhältnis der Reduktionsäquivalente beeinflussen (Eyzaguirre *et al.*, 1973;Driscoll and Finan, 1997;Doan *et al.*, 2003). Für einen Einfluss der beiden zuvor beschriebenen Mechanismen konnten jedoch keine Hinweise in den Transkriptomdaten der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gefunden werden. Wie oben erwähnt, gibt es Enzyme die unabhängig vom Katabolismus die NADPH-Konzentration beeinflussen, so z. B. Transhydrogenasen ($NADH + NADP^+ \leftrightarrow NADPH + NAD^+$). In *E. coli*, *P. aeruginosa* und *A. vinelandii* konnte gezeigt werden, dass durch Transhydrogenasen Reduktionsäquivalente konvertiert werden können (Hoek and Rydstrom, 1988;Bizouarn *et al.*, 2002). Des Weiteren hängt die Effizienz der SOD, der KAT und der GPX von der Versorgung durch NADPH als Reduktionsmittel ab, für dessen Bildung wiederum die oxidierte Form von NADPH, das $NADP^+$ benötigt wird. Die Versorgung mit $NADP^+$ in *Pseudomonas fluorescens* wird durch die beiden Enzyme NADK und NADPase kontrolliert (Singh *et al.*, 2007;Singh *et al.*, 2008). Die NAD-Kinase (NADK) katalysiert die Konversion von NAD^+ zu $NADP^+$, während die NADP-Phosphatase (NADPase) die Reaktion in die entgegengesetzte Richtung fördert. Beide Enzyme beeinflussen somit die intrazelluläre Konzentration von NAD^+ und $NADP^+$ (Singh *et al.*, 2007;Shi *et al.*, 2009). Über Sequenzvergleiche (www.pseudomonas.com) konnte bei *P. aeruginosa* lediglich PA3088 als NADK identifiziert werden. Sowohl für die in *Pseudomonas*-vorkommenden Transhydrogenasen (PA0195, PA0196 und PA2991)

als auch für die NADK (PA3088) (www.pseudomonas.com) konnten in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gegenüber PA14 keine signifikanten Genexpressionsveränderungen festgestellt werden. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der Bedarf an NADPH aufgrund des langsameren Wachstums von PA14Δ*icd*Δ*idh* und der geringeren Stoffwechselaktivität gegenüber PA14 reduziert ist. Die Resistenz gegenüber Paraquat hängt jedoch außer von Elektronendonatoren wie NADPH auch von der Ab- oder Anwesenheit anderer Faktoren ab, z. B. „oxidativen Abwehrenzymen“ (z. B. SOD), DNA-Reparatursystemen und verschiedenen regulatorischen Proteine (Ma *et al.*, 1998). Vermutlich spielen deshalb für die Paraquat-Resistenz der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* verschiedene Faktoren (z. B. Effluxpumpen und Porine) und nicht alleine die Bildung von NADPH eine wichtige Rolle.

Wie in *E. coli* gezeigt werden konnte, hängen Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress auch von den jeweiligen Wachstumsbedingungen ab (de Spiegeleer *et al.*, 2004). Phosphat- und Chloridsalze schützen die Zelle vor einer Schädigung durch Paraquat (Kitzler and Fridovich, 1986). Welchen Einfluss der Salzgehalt auf die Paraquat-Resistenz der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* hat, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden. Zusätzlich zeigen Gene für oxidativen Schutz in *E. coli* eine z. B. pH-abhängige Expression, wenn die Bakterienzelle Paraquat oder H_2O_2 ausgesetzt wird (Maurer *et al.*, 2005). Zwischen der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 wurde jedoch kein pH-Unterschied im LB-Kulturmedium nach 24 h festgestellt (Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wurden in den Paraquat-Versuchen für alle Stämme die gleichen Wachstumsbedingungen und das gleiche Medium (LB) verwendet. Es wäre interessant zu testen, wie sich die Paraquat-Resistenz der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* in anderen Medien verhält, z. B. Minimalmedium + Glukose, LB-Medium + Glukose oder ASM.

Das *P. aeruginosa*-Genom kodiert für eine große Anzahl von antioxidativen bzw. protektiven Proteinen, einschließlich zweier Superoxiddismutasen (SodM, Mangan-abhängig und SodB, Eisen-abhängig = SOD), Katalasen (KAT), Glutathionperoxidase (GPX) und -reduktase (GSR), des Hydroperoxid-Resistenzproteins Ohr und der Alkylhydroperoxidreduktase (Suntres *et al.*, 2002;Hare *et al.*, 2011). Wie Abbildung 6.3 verdeutlicht, können Superoxidradikale mit Hilfe der SOD und anschließend H_2O_2 durch KAT und GPX entgiftet werden. In *E. coli* führen Paraquat und hohe Sauerstoffkonzentrationen zu einer Induktion der Katalase und der Mangan-abhängigen-Superoxiddismutase SodM (im Cytoplasma lokalisiert) (Hassan and Fridovich, 1977a;Hassan and Fridovich, 1977b). Dagegen wird die Eisen-abhängige-Superoxiddismutase SodB (im periplasmatischen Raum lokalisiert) unter anaeroben und aeroben Bedingungen konstitutiv exprimiert (Hassan and Fridovich, 1977a;Polack *et al.*, 1996). Da O_2^- geladen ist und somit nicht einfach durch die Membranen der Bakterienzelle diffundieren kann, wird das im Cytoplasma durch Paraquat gebildete Superoxidradikal ausschließlich von der Mangan-abhängigen SodM enttoxifiziert. Es wurde aber auch gezeigt, dass O_2^- bei einem normalen Stoffwechsel ins Periplasma freigesetzt wird (Imlay, 2003). Dagegen wurde in anderen Studien mit *P. aeruginosa*-SOD-Mutanten und klinischen Isolaten

festgestellt, dass für das aerobe Wachstum oder für die Paraquat-Resistenz die Eisen-abhängige-Superoxiddismutase SodB die wichtigere SOD im Vergleich zu der Mangan-abhängigen-Superoxiddismutase SodM darstellt (Hassett *et al.*, 1995;Britigan *et al.*, 2001).

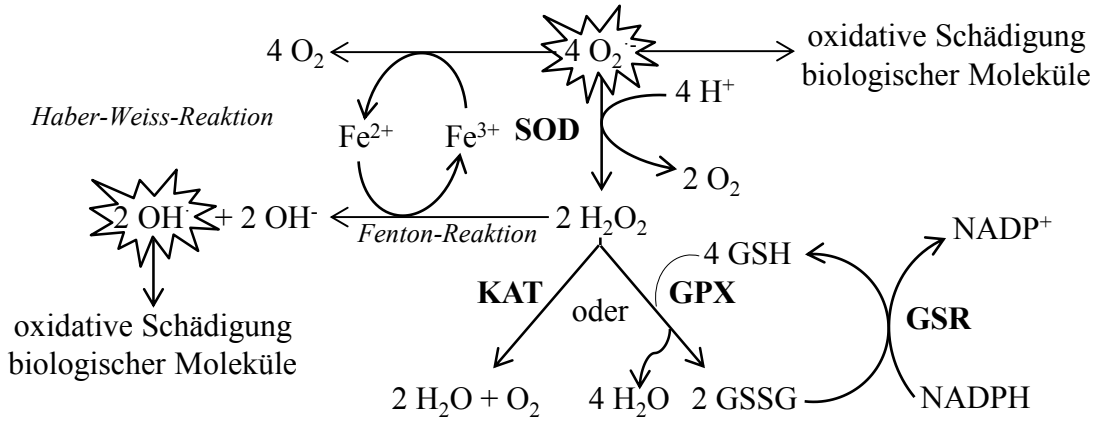


Abbildung 6.3 Antioxidative Enzyme in *P. aeruginosa*
Verschiedene Enzyme tragen in *P. aeruginosa* zum Schutz der Zelle gegenüber Radikalen bei. So wird aus Superoxid durch die Superoxiddismutase (SOD) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet, welches dann entweder durch die Katalase (KAT) zu Wasser und Sauerstoff katalysiert oder alternativ mit Glutathion (GSH) durch die Glutathionperoxidase (GPX) zu Wasser und Glutathiondisulfid (GSSG) enttoxifiziert wird. Durch die Glutathionreduktase (GSR) unter Verwendung von NADPH kann das oxidierte GSSG dann wieder zu GSH reduziert werden. Hydroxylradikale ($OH^{\cdot}$) können aus Dioxid ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen (Haber-Weiss-Reaktion), wobei das Eisen (Fe^{2+}) als Katalysator dient.

E. coli besitzt zwei monomere Aconitasen (AcnA und AcnB), die jeweils einen Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S) enthalten und die reversible Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat katalysieren. Die eher instabilere AcnB wird während der exponentiellen Phase gebildet, wobei die eher stabilere AcnA ein stress-induziertes und stationär phasen-abhängiges Enzym ist. Eisenmangel oder oxidativer Stress, z. B. ausgelöst durch Paraquat, führt zu der Zerstörung des 4Fe-4S-Clusters, wodurch die katalytische Funktion des Enzyms verloren geht. Das daraus resultierende Apoenzym nimmt seine regulatorische Funktion ein und bindet an verschiedene mRNAs (Cunningham *et al.*, 1997;Tang and Guest, 1999;Tang *et al.*, 2005;Tong and Rouault, 2007). So konnte gezeigt werden, dass die Transkription der Superoxiddismutase SodA (manganabhängig) von Apo-AcnA positiv und von Apo-AcnB negativ reguliert wird (Tang *et al.*, 2002;Tang *et al.*, 2004). Bei *P. aeruginosa* ist über eine derartige Regulation in der Literatur nichts bekannt. Es ist jedoch anzunehmen, da neben *E. coli* auch andere Organismen wie *S. enterica* eine Regulierung durch die Apo-Aconitasen aufweisen (Baothman *et al.*, 2013), dass die gleiche oder zu mindestens eine ähnliche Regulation in *P. aeruginosa* vorhanden ist. Da in dieser Arbeit für die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* nach der Zugabe von 200 µM Paraquat nur lediglich eine Tendenz für eine erhöhte SOD gemessen wurde, kann es sein, dass die Paraquat-Konzentration zu gering war und somit die positive Regulation von Apo-AcnA gegenüber der Apo-AcnB nicht ausreichte.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Paraquat-Resistenz der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* könnte eine vermehrte SOD-Aktivität sein, sodass die Sauerstoffradikale effizienter entgiftet und weniger Schaden in der Zelle verursachen. Mittels RT-PCR, Western Blot oder SOD-Aktivitätsmessung könnte diese Hypothese geprüft werden. Bei der Darstellung der SOD-Aktivitäten in dieser Arbeit wurde im ungestressten Zustand bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 eine gleich starke SOD-Aktivität gemessen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten einer anderen Arbeit, in der eine *zwf*-Mutante (*zwf* kodiert für Glukose-6-phosphatdehydrogenase; Entner-Doudoroff-Weg) von *P. aeruginosa* keine Unterschiede in den Aktivitäten von SOD und KAT aufzeigte (Ma *et al.*, 1998). Wird *P. aeruginosa* dagegen direkt H_2O_2 ausgesetzt, zeigt sich im Transkriptom, dass der primäre Stoffwechsel vermindert und Abwehrmechanismen erhöht werden (Palma *et al.*, 2004;Chang *et al.*, 2005). Erstaunlicherweise zeigte die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* in dieser Arbeit keine Unterschiede zu PA14, wenn die Zellen mit H_2O_2 gestresst wurden. Wie aus der Literatur bekannt, induzieren bzw. aktivieren H_2O_2 und Paraquat unterschiedliche Gene in *P. aeruginosa*. So aktiviert H_2O_2 in *P. aeruginosa* den globalen Transkriptionsregulator OxyR, der weitere Gene induziert, z. B. *katB* oder *ahpBCF* (Hare *et al.*, 2011). In der Anwesenheit von Fenton-reaktiven Metallionen (beispielsweise Fe^{2+} und Cu^{2+}; s. a. Abbildung 6.3), kann H_2O_2 Einzelstrangbrüche verursachen, die wiederum Mutationen zur Folge haben können (Yoon and Hassett, 2004). Andere Forschergruppen zeigten, dass z. B. die Operons PA0939 - PA0942 und PA4471-*fumC*-PA4469-*sodM* durch Paraquat induziert werden (Salunkhe *et al.*, 2002;Palma *et al.*, 2004). Warum letztlich die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gegen Paraquat nicht jedoch gegen H_2O_2 resistenter ist, müsste in weiteren Versuchen verifiziert werden.

Durch Veränderung des Stoffwechselflusses der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* kann mit Hilfe der sog. *malic enzymes* NADPH und Pyruvat gebildet werden. Die Substrate Pyruvat und α-Ketoglutarat können neben ihrer Bedeutung als Metabolite auch als „ROS-Fänger“ fungieren, wie am Beispiel von *P. fluorescens* gezeigt werden konnte. Mit Hilfe von Pyruvat und weiteren Enzymen wird NADH zu NADPH katalysiert, das wiederum für die Entgiftung von ROS wichtig ist (Singh *et al.*, 2008). Des Weiteren führt ROS unter anderem zu einer Deaktivierung der α-Ketoglutaratdehydrogenase, sodass es zu einer Anhäufung von α-Ketoglutarat kommt. In einer Studie konnte durch ^{13}C-NMR gezeigt werden, dass α-Ketoglutarat in Anwesenheit von H_2O_2 nicht enzymatisch zu Succinat decarboxyliert wird und die Konzentration an ROS gleichzeitig abnimmt (Mailloux *et al.*, 2009;Lemire *et al.*, 2010). Beide Abwehrsysteme haben gemeinsam, dass sie zusätzlich den NADH-Pool in der Zelle reduzieren. Dies hat eine Reduzierung der ROS-Produktion zufolge, jedoch wird dadurch auch weniger ATP gebildet (Singh *et al.*, 2007). Mit dieser globalen Strategie kann *P. fluorescens* unter oxidativem Stress z. B. hervorgerufen durch Antibiotika überleben, jedoch auf Kosten einer Reduzierung des Citratzyklus und geringeren ATP-Synthese (Singh *et al.*, 2007;Wright, 2007). Eine effektive Produktion von ATP über die oxidative Phosphorylierung kann jedoch nur gewährleistet werden, wenn ein kontinuierlicher Vorrat an NADPH der Zelle zur

Verfügung steht (Singh *et al.*, 2007). Es ist deshalb vorstellbar, dass die Inaktivierung der Isocitratdehydrogenase in der IDH-Doppelmutante einen vergleichbaren Effekt zur Folge hat. Aufgrund des langsamen Wachstums von PA14Δ*icd*Δ*idh* wird vermutlich auch nicht weniger ATP benötigt als bei PA14.

6.2.5 Einfluss der IDH-Inaktivierung auf die Antibiotika-Resistenz von *P. aeruginosa*

Neben Paraquat zeigt die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* auch eine erhöhte Resistenz v. a. gegenüber den Antibiotikaklassen Penicilline und Cephalosporine aber auch Peneme, Monobactame und Gyrasehemmer/Chinolone. Die Selektion von Antibiotika-Resistenzen ist auch ein typischer Phänotyp von *P. aeruginosa*-Isolaten der CF-Lunge. Es gibt drei wichtige Faktoren, die die bakterielle Resistenz gegenüber Antibiotika fördern: 1) die Membranbarriere, die die Ein- und Ausfuhr von Antibiotika bestimmt; 2) Enzyme, die Antibiotika inaktivieren sowie 3) die Modifikation bzw. Protektion der Zielmoleküle, was die antibakterielle Aktivität vermindert (Pagès *et al.*, 2008).
P. aeruginosa besitzt zahlreiche intrinsische Resistenzmechanismen und hat die Fähigkeit, sich durch (erworbene) Resistenzen gegen Antibiotika zusätzlich zu schützen. Die intrinsische Resistenz beruht v. a. auf der reduzierten Permeabilität der Außenmembran von *P. aeruginosa* für viele Substanzen (Dötsch *et al.*, 2009). Wie anhand der LPS-Profile gezeigt werden konnte, gibt es somit Unterschiede in der Membranstruktur zwischen PA14 und IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh*. Denkbar ist, dass das veränderte LPS der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* mit zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika und Paraquat beiträgt.
Neben der Membranpermeabilität insgesamt spielen Effluxpumpen und Porine eine wichtige Rolle für die Entstehung von Antibiotika-Resistenzen. Während manche Effluxpumpen sehr spezifisch für bestimmte Substrate sein können, sind andere eher unspezifisch und transportieren eine Vielzahl von Substanzen wie Antibiotika, chemotherapeutische Wirkstoffe, Detergenzien, Farbstoffe und andere Inhibitoren aus der Zelle (Nikaido, 1998). Bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* konnte für *mexX* und *rhlR* (Regulator von *mexGHI-opmD*) eine signifikante Erhöhung bzw. Repression gegenüber PA14 nachgewiesen werden. MexX ist Bestandteil eines Effluxsystems, dass viele Antibiotika unter anderem auch ß-Laktame (Penicilline und Cephalosporine, ausgenommen Carbenicillin, Sulbenicillin, Cefsulodin, Ceftazidim und Carbapeneme) aus der Zelle ausschleust (Skiada *et al.*, 2011). Die Transkriptomdaten von PA14Δ*icd*Δ*idh* zeigen, dass auch einige Effluxpumpengene in ihren Genexpressionen erhöht bzw. erniedrigt sein könnten. Aufgrund fehlender Signifikanz bei diesen Genen kann keine Aussage über deren Einflüsse in der IDH-Doppelmutante getroffen werden. Weitere Aufklärung könnten Experimente mit Effluxinhibitoren oder mit Antibiotika induzierten Zellen erbringen.
Ebenso ist den Transkriptomdaten folgend eine große Anzahl an Porinen in PA14Δ*icd*Δ*idh* herunterreguliert. Kleine hydrophile Moleküle wie ß-Laktame und Quinolone können ausschließlich

über Porine transportiert werden. Während ß-Laktame (Piperacillin, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem und Aztreonam) die Transpeptidase im periplasmatischen Raum inhibieren, bindet Colistin (Polymyxin) dagegen an das LPS und zerstört die Permeabilität der Außenmembran (Lambert, 2002;Giedraitienè *et al.*, 2011). Gerade eine veränderte Struktur der Außenmembran z. B. durch Porine könnte sich positiv auf die Aufnahme von Antibiotika wie ß-Laktame auswirken. Die Transkriptomdaten und die LPS-Profile deuten darauf hin, dass die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gegenüber PA14 eine veränderte Membranzusammensetzung inkl. Porine aufweist, die mit einer erhöhten Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika vereinbar sind.

ß-Laktamasen hydrolysieren nahezu alle ß-Laktam-Antibiotika die eine Ester- und Amidbindung aufweisen, z. B. Penicilline, Monobactame oder Carbapeneme (Giedraitienè *et al.*, 2011). Bei der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* wurde in der exponentiellen als auch in der stationären Phase eine schnellere und größere ß-Laktamase-Aktivität als bei PA14 gemessen. In weiteren Versuchen z. B. mittels RT-PCR müsste geklärt werden, ob dies auf eine verstärkte Genexpression z. B. der AmpC oder anderer ß-Laktamasen zurückzuführen ist. Ein Test (MAST Diagnostica) zum Nachweis von AmpC-Phänotypen konnte nicht klären, ob die AmpC für das zuvor beschriebene Ergebnis verantwortlich ist.

Bereits 1944 konnte anhand von *S. aureus* gezeigt werden, dass ein verlangsamtes Wachstum einen Einfluss auf die Antibiotikaempfindlichkeit hat (Lee *et al.*, 1944), was später auch als *drug indifference* bezeichnet wurde (McDermott, 1958). Ebenso sind sog. Persister-Zellen, die als phänotypische Varianten des Wildtyp-Stammes spontan entstehen und ein langsames oder kein Wachstum aufweisen, dafür bekannt, dass sie resistent gegen bakterizide Antibiotika sind (Gad, 2011;Lechner *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch der Metabolismus zum Zeitpunkt der Antibiotikagabe (z. B. aerob oder anaerob) wichtig ist (Martinez and Rojo, 2011).

Es wird vermutet, dass bakterizide Antibiotika wie Aminoglykoside, Quinolone und ß-Laktame die Nutzung des Citratzyklus in der Bakterienzelle stimulieren, sodass NADH gebildet wird (Abbildung 6.4). Dieses wird in der Atmungskette oxidiert und durch eine Überaktivität der Elektronentransportkette kommt es zur vermehrten Bildung Superoxidradikalen $O_2^{\cdot -}$, jedoch nicht von H_2O_2. Dies hat zur Folge, dass Eisen-Schwefel Cluster in Proteinen oxidiert werden (Fenton-Reaktion: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$; (Hippeli and Elstner, 1999;Kehrer, 2000)) und Hydroxylradikale $OH^{\cdot}$ entstehen, die DNA, Lipide und/oder Proteine schädigen. Die zuvor genannten Antibiotika tragen somit zum induzierten Zelltod des Bakteriums bei (Dwyer *et al.*, 2009;Kohanski *et al.*, 2010;Mailloux *et al.*, 2011;Martinez and Rojo, 2011). Bestätigt wurde diese Hypothese durch Citratzyklus-Mutanten aus *E. coli*. Neben mehreren Mutanten zeigte eine Unterbrechung des Citratzyklus bei einer *icdA*- und *acnB*-Mutante die größten NAD^+/NADH-Verhältnisse, sowie eine verstärkte Resistenz gegenüber Norfloxacin, Ampicillin und Kanamycin verglichen zum WT (Kohanski *et al.*, 2007). In einer anderen Studie wurde der WT von *E. coli* mit einer *icdA*-Mutante verglichen. Die *icdA*-Mutante zeigte ein vermindertes Wachstumverhalten sowie eine geringe intrazelluläre NADPH- und ATP-Konzentration

(Kabir and Shimizu, 2004). Andere Untersuchungen ergaben, dass eine *Staphylococcus epidermis*-Citratzyklus-Mutante im Vergleich zum WT einen verbesserten Schutz gegenüber ß-Laktam-Antibiotika, eine reduzierte Autolyse-Empfindlichkeit sowie eine positiv geladene Zelloberfläche aufweist (Chittezham *et al.*, 2013). Ebenso ist eine Blockierung des Citratzyklus bei *Salmonella* Typhimurium mit einer gesteigerten Antibiotikatoleranz verbunden (Frawley *et al.*, 2013). Zusätzlich zeigen bakterielle Zellen mit einer schwachen metabolischen Aktivität in den innersten Regionen von Biofilmen eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika auf (Martinez *et al.*, 2009). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Kohlenstofflimitierung bei Bakterien die Effizienz des Abtötens durch bakterizide Antibiotika reduziert (Eng *et al.*, 1991).

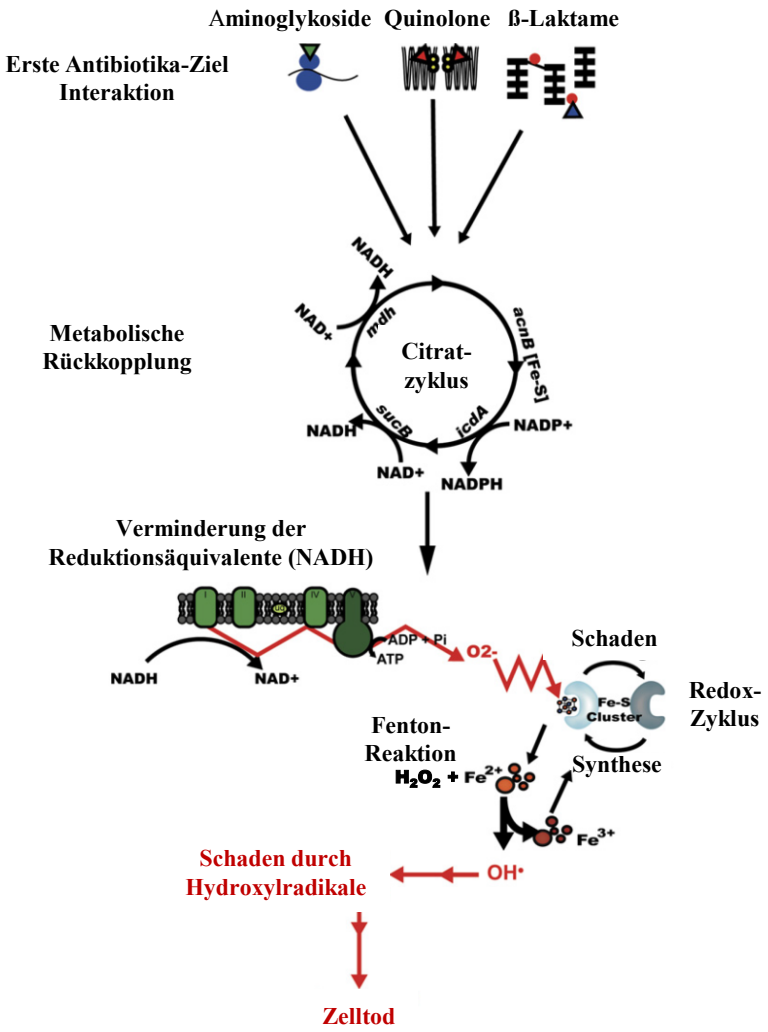


Abbildung 6.4 Mechanismus des bakteriellen Zelltods infolge ROS-Bildung aufgrund bakterizider Antibiotika
Durch Antibiotikastress wird der Citratzyklus stimuliert, wobei Reduktionsäquvialente gebildet werden. Aufgrund der Hyperaktivität des Elektronentransports in der Atmungskette unter Verwendung der gebildeten Reduktionsäquivalente wird die Bildung von Superoxiden O_2^- stimuliert, was Schäden in Enzymen z. B. Aconitase mit Eisen-Schwefel-Clustern induziert. Über das frei gewordene Eisen werden über die Fenton-Reaktion Hydroxylradikale gebildet, die weitere Schäden (DNA, Proteine und Lipide) in der Zelle verursachen, sodass es letztendlich zum Zelltod kommt. (Abbildung modifiziert nach (Kohanski *et al.*, 2007))

Die Hypothese wird durch die Ergebnisse der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* bestätigt, jedoch konnten bei dieser Mutante und auch bei den beiden IDH-Einzelmutanten PA14 *icd*::Tn und PA14 *idh*::Tn keine veränderten intrazellulären Konzentrationen an Reduktionsäquivalenten $NAD(P)^+$ und NAD(P)H (Homöostase) gegenüber dem Stamm PA14 gemessen werden, sowohl absolut als auch hinsichtlich des Verhältnisses von NADH zu NADPH. Während NADH unter aeroben Bedingungen eine primäre Rolle in der Atmungskette zur Bildung von ATP spielt (Katabolismus), wird NADPH für anabole Reaktionen benötigt (Anabolismus). Trotz der unterschiedlichen Funktionen befindet sich in Bakterienzellen in der Regel kein thermodynamisches Gleichgewicht unter den Reduktionsäquivalenten, d. h. das $NADPH/NADP^+$ in einer geringeren Konzentration vorhanden ist als $NADH/NAD^+$ (Fuhrer and Sauer, 2009), wie in dieser Arbeit durch Messungen der intrazellulären Konzentrationen der Reduktionsäquivalente bestätigt werden konnte. Wie anhand von persistierenden *E. colis* gezeigt werden konnte, ist für die Produktion von NADH weder der Pentosephosphatweg, Entner-Doudoroff-Weg noch der Citratzyklus zwingend notwendig (Allison *et al.*, 2011). Für NADPH gibt es neben der Isocitratdehydrogenase weitere Enzyme beispielsweise die Glukose-6-phosphat-dehydrogenase, 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und die sog. *malic enzymes*, die das reduzierte Reduktionsäquivalent in der Zelle bilden (Corpas *et al.*, 1999;Singh *et al.*, 2007;Singh *et al.*, 2008). Eventuell ist die Endpunktbestimmung der intrazellulären Reduktions-äquivalente jedoch nicht sensitiv genug, um Unterschiede zwischen der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 festzustellen. Diesbezüglich müssten die Konzentrationen der Reduktions-äquivalente z. B. im Verlauf der Wachstumskurve bestimmt werden. Die meisten Antibiotika-Resistenzen gehen auf Kosten der bakteriellen Fitness, wobei je nach *in vitro*- oder *in vivo*-Bedin-gungen die zugrunde liegenden Mutationen einen unterschiedlichen Fitnessdefekt auslösen können (Björkman *et al.*, 2000). Noch unbekannte komplexe Regulationen und alternative Stoffwechselwege könnten dazu beitragen, dass die Konzentrationen beider Reduktionsäquivalente konstant bleiben.

6.3 Phäno- und genotypischer Vergleich von PA14 und PA14Δ*icd*Δ*idh* mit M1 und M25

Um die erzielten Ergebnisse der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* und der Mdh-Mutante PA14 *mdh*::Gm im Kontext der Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge in Einklang interpretieren zu können, wurden vergleichbare Versuche mit den isogenen CF-Isolaten M1 und M25 durchgeführt. Während es sich bei PA14 um ein hypervirulentes Brandwundenisolat handelt, sind M1 (Früh-Isolat) und M25 (Spät-Isolat) CF-Isolate, die 1998 bzw. 2001 von einem Patienten isoliert wurden (Hogardt *et al.*, 2007;Mikkelsen *et al.*, 2011). Wie bereits erwähnt, zeigte der Non-Mutator-Stamm M1 Unterschiede zum Mutator-Stamm M25 sowohl im Wachstum als auch hinsichtlich der Produktion von Virulenzfaktoren (z. B. Elastase- und Gesamt-Protease-Aktivität oder Pyocyanin-Produktion). Es wurde unter aeroben Bedingungen gezeigt, dass PA14 sich ähnlich wie M1 und die IDH-

Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* ähnlich wie M25 verhielt. Unter anaeroben Bedingungen scheint der Citratzyklus nicht in dem Maße genutzt zu werden wie unter aeroben Bedingungen, da anaerob alle vier Stämme ein ähnliches Wachstumsverhalten aufweisen. Obwohl in Transkriptomanalysen beim M25 eine höhere Genexpression der Isocitratdehydrogenase als beim M1 gemessen wurde (Hoboth *et al.*, 2009), zeigte M25 in folgenden Analysen eine deutlich geringere spezifische IDH-Enzym-Aktivität als M1. Als Ursache wurde in dieser Arbeit ein SNP im *icd*-Gen von M25 nachgewiesen, der nicht bei M1 vorkommt. Plausibel wäre, dass die Reduktion der Enzym-Aktivität kompensatorisch eine erhöhte Genexpression zur Folge hat. Bei den Virulenztestungen zeigte die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* einen zu M25 vergleichbaren Phänotyp z. B. den Verlust der Motilität und eine erhöhte Paraquat-Resistenz.

Obwohl die Ergebnisse von PA14Δ*icd*Δ*idh* mit M25 in der Regel weitestgehend korrelieren, ist es nicht möglich, eine direkte Beziehung zwischen beiden Phänotypen herzustellen. Während die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* eine definierte Gendeletion im Genom trägt, sind die Änderungen im Genom adaptierter CF-Isolate wie M25 durch die kumulative Selektion von Mutationen wesentlich komplexer. So wurde z. B. bei einem Vergleich eines Früh-Isolates (6 Monate) mit einem Spät-Isolat (96 Monate) von *P. aeruginosa* CF-Isolaten festgestellt, dass die häufigsten Mutationen im adaptierten Spät-Isolat SNPs oder 1 - 3 Basenpaar-Insertion/Deletionen (Indels) sind (Smith *et al.*, 2006). Ein frühzeitiger Translationsstop, eine Verschiebung des Leserasters oder die Insertion/Deletion eines Transposons sind vermutlich die häufigsten Gründe für die teilweisen oder kompletten Verluste von Genfunktionen. Soweit können lediglich Vermutungen zu den genetischen Ursachen für den Phänotyp der beiden CF-Isolate M1 und M25 gemacht werden. Die wechselnden Umweltbedingungen in der CF-Lunge, die sich zeitlich und räumlich ändern, tragen zu einer Diversität von Isolaten in einem Ökosystem bei (Nguyen and Singh, 2006). Durch die Anhäufung von Mutationen bei hypermutablen Stämmen wird die Fähigkeit erheblich reduziert, sich an eine andere Umwelt anzupassen (Montanari *et al.*, 2007). So wurde gezeigt, dass adaptierte CF-Isolate nicht mehr in sterilem Leitungswasser wachsen können (Hogardt *et al.*, 2007).

6.4 Auswirkungen von SNPs auf die Adaptation an die CF-Lunge

Durch Komplementation der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* konnte gezeigt werden, dass im *icd*- bzw. *idh*-Gen von M25 bzw. weiterer hypermutierender CF-Isolate vorkommende SNPs einen deutlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten, die enzymatische IDH-Aktivität und die Expression verschiedener Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* haben. Bei den Komplementanten PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh2*) und PA14Δ*icd*Δ*idh* (p*idh*) wurde eine vergleichbar starke IDH-Enzym-Aktivität gemessen. Da beide Stämme jedoch eine unterschiedliche Paraquat-Resistenz zeigten, ist zu vermuten, dass die Isocitratdehydrogenase neben ihrer enzymatischen Funktion noch weitere physiologische Funktionen

in *P. aeruginosa* wahrnimmt. Insgesamt ist nur wenig über weitere Funktionen der IDH-Isoenzyme und deren Regulation in *P. aeruginosa* bekannt.

Beim Vergleich der Genomsequenz eines *P. aeruginosa*-Früh-Isolats (6 Monate) mit einem Spät-Isolat (96 Monate) eines CF-Patienten konnte gezeigt werden, dass insgesamt 60 verschiedene Mutationen, d. h. 41 SNPs und 19 Indels, in Genen des Spät-Isolats im Vergleich zum Früh-Isolat vorhanden waren (Smith *et al.*, 2006). Insbesondere Virulenzfaktoren und -regulatoren (n = 13), sowie Gene, die für den Transport von kleinen Molekülen und für Antibiotika-Resistenz (n = 12) wichtig sind, waren im Spät-Isolat durch Mutationen betroffen (Smith *et al.*, 2006). Der Genomvergleich zwischen Früh-Isolat M1 und Spät-Isolat M25 (im Abstand von 3 Jahren isoliert) in dieser Arbeit ergab insgesamt 881 SNPs und 147 Indels bei M25. Diese deutlich höhere Anzahl von Mutationen im Vergleich zur Studie von Smith *et al.* (Smith *et al.*, 2006) könnte auf die Mutator-Aktivität von M25 zurückzuführen sein. Es wurde eine nicht-synonyme Mutation im *mutS*-Gen des 96-monatigen Spät-Isolats gefunden, jedoch wurde nicht überprüft, ob diese Mutation zu einer erhöhten Mutationsfrequenz führt (Smith *et al.*, 2006). Bei M25 handelt es sich dagegen um einen Mutator-Stamm mit einer 17-Basenpaar-Deletion im *mutS*-Gen (nicht-funktionelles *mutS*) und einer erhöhten Mutationsfrequenz (Hogardt *et al.*, 2007). Die SNP-/Indel-Analyse in dieser Arbeit zeigte, dass M25 zusätzlich zwei SNPs im *mutL*-Gen besitzt, die je einen Aminosäurenaustausch zur Folge haben. Ob diese beiden SNPs zu einer erhöhten Mutationsfrequenz von M25 beitragen, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht überprüft. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine bessere und fortgeschrittene Sequenziertechnologie inkl. einer höheren „*Coverage*“ für die einzelnen Genome verwendet, mit der mit erhöhter Sicherheit mehr SNPs identifiziert werden können. Insgesamt sind die Daten der SNP-/Indel-Analyse als valide anzusehen, da sowohl die bereits beschriebenen fehlenden Basenpaare im *mutS*-Gen (Hogardt *et al.*, 2007) als auch der im *icd*-Gen bekannte SNP (*icd1*) durch die Genomanalyse bestätigt wurden. Trotz der bereits sehr verlässlichen Sequenzierung müssten identifizierte SNPs/Indels mit einer zweiten Methode zumindest in Stichproben überprüft werden (*Illumina*-Sequenzierung). Die Auswirkungen aller genomischen Veränderungen von M25 können durch pleiotropische und polygenische Effekte insgesamt sehr komplexe Auswirkungen auf den Phänotyp von *P. aeruginosa* haben, sodass „Omics“-Techniken wie Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics u. a. im Vergleich verschiedener Wachstumsbedingungen und Nährstoffangebote für die weitergehende Analyse angewendet werden müssten.

6.5 Bedeutung der Inaktivierung von Icd und Idh für Metabolismus/Virulenz von *P. aeruginosa*

Wie in dieser Arbeit anhand der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gezeigt wurde, spielt die Funktionalität der Isocitratdehydrogenase eine entscheidende Rolle nicht nur für einen intakten Metabolismus, sondern auch für die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*.

Alle untersuchten Faktoren und ihre Beeinflussung durch den Defekt der IDH sind in Abbildung 6.5 zusammengefasst. Es zeigt sich, dass neben der Vermehrungsrate besonders die Motilität, das Typ II-Sekretionssystem, das QS, die Empfindlichkeit gegenüber Paraquat und bestimmten Antibiotika beeinflusst sind. Die über 100-fache Reprimierung von *rsaL* und somit die Beeinflussung des QS macht deutlich, welche Wirkung eine Störung des Citratzyklus auf regulatorische Netzwerke haben kann. Aufgrund von mathematischen Modellen wird vermutet, dass alleine durch das Fehlen von RsaL das QS wesentlich früher d. h. schon bei geringerer Zelldichte induziert wird (Fagerlind *et al.*, 2003), was durch eine andere Studie ebenfalls experimentell belegt werden konnte (de Kievit *et al.*, 1999). Ein verstärkt aktiviertes QS in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* könnte eine Art „SOS-Signal" für die Bakterienzelle darstellen oder eine verfrühte stationäre Phase simulieren. Anhand eines *S. aureus*-Isolates, bei dem die Aconitase inaktiviert wurde, konnte festgestellt werden, dass bei einer Unterbrechung des Citratzyklus die spät-exponentielle Phase bei Wachstum in einem reichhaltigen Medium verhindert wurde und vorzeitig die stationäre Phase einsetzte (Somerville *et al.*, 2002). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des „*stringent response*"-Proteins RelA in *P. aeruginosa* zu einer früheren Induktion einiger QS-kontrollierter Prozesse (z. B. Elastase und Acyl-HSL) unabhängig von der Zelldichte führt (van Delden *et al.*, 2001). Während QS-regulierte Gene in der logarithmischen Phase durch eine frühe Expression von LasR, RhlR und RpoS aktiviert werden konnten, war eine Aktivierung durch Zugabe von Signalmolekülen 3O-C_{12}-HSL oder C_4-HSL nur für eine geringe Anzahl von QS-regulierten Genen möglich. Dies lässt vermuten, dass das QS selbst in ein globales regulatorisches Netzwerk eingebunden ist und andere zusätzliche regulatorische Komponenten daran beteiligt sind (Schuster and Greenberg, 2007). Eine Rolle dabei könnte MvaT in *P. aeruginosa* spielen, das ursprünglich als globaler Regulator für die Expression verschiedener Virulenzgene sowie als ein Repressor des QS in einer wachstumsphasenabhängigen Regulation identifiziert wurde (Diggle *et al.*, 2002). Inzwischen wird MvaT der *histone-like nucleoid structuring* (H-NS)-Protein-Familie zugeordnet und gezeigt, dass hierüber die Expression von mindestens 150 Genen kontrolliert wird (Castang and Dove, 2012). Neben den Regulierungen von zahlreichen Genen spielen H-NS-Proteine auch eine wichtige Rolle in der „Verdichtung" von DNA (*Silencing*) (Castang *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* im Vergleich zu PA14 für MvaT (3,10↓) eine signifikante Genexpressionsverminderung festgestellt. Erstaunlicherweise hat die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* viele Gemeinsamkeiten bzw. in der Tendenz vergleichbare Eigenschaften mit einer *P. aeruginosa* PAO1 *mvaT*-Mutante. Wie verschiedene Studien zeigten, weist die *mvaT*-Mutante eine 1) gesteigerte Pyocyanin-Produktion, 2) reduzierte Schwärm-Motilität, 3) verminderte Elastase-Aktivität (Diggle *et al.*, 2002), 4) verstärkte Expression des *cupA*-Genclusters (Vallet *et al.*, 2004;Vallet-Gely *et al.*, 2005) sowie 5) eine erhöhte *mexEF-oprN*- und verminderte *oprD*-Expression auf (Westfall *et al.*, 2006). Ein zweites H-NS Mitglied MvaU, das paralog zu MvaT ist, spielt eine kleinere Rolle in der Kontrolle von Genexpressionen in *P. aeruginosa*. MvaU kann einige Funktionen von MvaT übernehmen und kann

mit MvaT einen Komplex bilden (Vallet-Gely *et al.*, 2005). Wie durch die Transkriptomanalysen in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, ist die Genexpression von MvaU (3,21↓) in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gegenüber PA14 ebenfalls vermindert. Dieser Expressionswert sowie der von MvaT scheint nicht besonders groß zu sein, doch in *E. coli* zählen H-NS-Proteine mit ca. 20.000 Molekülen zu den häufigsten DNA-bindenden Proteinen in der Zelle (Lammi *et al.*, 1984;Tupper *et al.*, 1994;Dorman, 2004). So könnten diese vermeintlichen kleinen Genexpressionen dramatische Einflüsse auf die Regulationen in der IDH-Doppelmutante haben. In einer anderen Studie konnten mit Hilfe eines ClpXP Protease-basierten Protein-Depletion-Systems *P. aeruginosa*-Stämme konstruiert werden, bei denen MvaT in einer Δ*mvaU*-Mutante oder MvaU in einer Δ*mvaT*-Mutante in der Bakterienzelle depletiert wurde. Dieses System wurde angewendet, da eine „echte" MvaT/MvaU-Doppelmutante nicht lebensfähig ist. Beide „MvaT/MvaU-Doppelmutanten" zeigten eine gesteigerte Expression von Pf4-Genen sowie eine Produktion von Pf4-Phagen, wodurch die Bakterienzellen abgetötet oder in ihrem Wachstum gehemmt wurden (Castang *et al.*, 2008;Li *et al.*, 2009;Castang and Dove, 2012). Weitere „MvaT/MvaU-Doppelmutanten", die nach Transposonmutagenese unter anderem Insertionen in Regulatoren für Typ IV-Pili oder Pf4-Prophagengenen besaßen, konnten den Verlust von MvaT und MvaU tolerieren (Castang and Dove, 2012). Interessanterweise sind beide Gene, MvaT und MvaU, in der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* gegenüber PA14 geringer exprimiert sowie viele Gene (z. B. *pilM*) in ihrer Genexpression verändert, deren Produkte für Typ IV-Pili oder Phagen-ähnliche Proteine kodieren. MvaT und MvaU könnten somit die langandauernde Konstruktion der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* erklären, weil erst über die Quantität ein Klon mit einer geringen Frequenz isoliert werden konnte, der Mutationen in Regulatoren für Typ IV-Pili oder Pf4-Prophagengenen besaß.

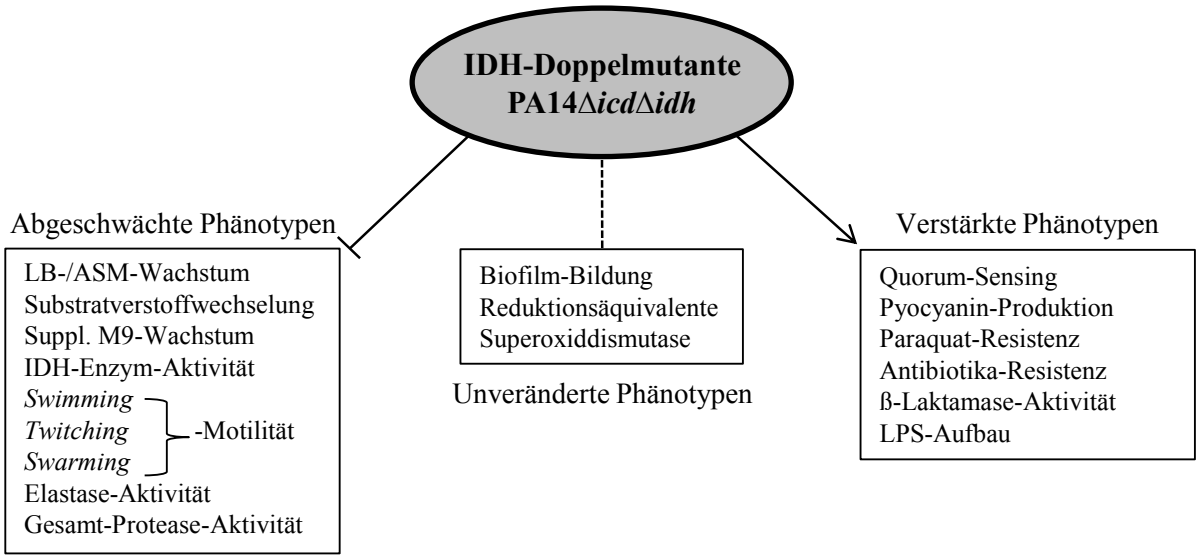


Abbildung 6.5 Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung der IDH-Doppelmutante im Vergleich zum Ausgangsstamm PA14
Zusammenfassung der untersuchten Phänotypen der IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* im Vergleich zum Ausgangsstamm PA14 in drei Gruppen: Abgeschwächte Phänotypen, unveränderte Phänotypen und verstärkte Phänotypen.

Es wäre interessant zu erfahren, wie sich die IDH-Doppelmutante PA14Δ*icd*Δ*idh* *in vivo* in Tiermodellen und *in vitro* in Zellkultur oder in Kompetitionsexperimenten gegenüber anderen pathogenen und kommensalen Bakterien verhalten würde. Für die Konkurrenzfähigkeit von *P. aeruginosa* gegenüber anderen in der CF-Lunge vorherrschenden Keimen wie *S. aureus* ist wahrscheinlich unter anderem die Induktion mehrerer bakterizider Faktoren entscheidend (Palmer *et al.*, 2005). Ein weniger virulenter Stamm der IDH-Doppelmutante wäre verglichen zu PA14 unter anderem aufgrund des verlangsamten Wachstums, der gestörten Substratverstoffwechselung und der vielen Virulenzdefekte zu erwarten. Demgegenüber stehen unter anderem eine verstärkte Pyocyanin-Produktion, eine erhöhte Toleranz gegenüber Superoxidradikalbildner wie Paraquat sowie eine erhöhte Antibiotika-Resistenz. Bestärkt wird diese Vermutung durch eine Studie, in der gezeigt werden konnte, dass eine *rsaL*-Mutante hypervirulenter in einem wirbellosen Virulenz-Modell ist als der WT (Rampioni *et al.*, 2009). Es konnte auch gezeigt werden, dass QS-defiziente klinische *P. aeruginosa*-Isolate in der Lage sind, chronische Infektionen zu verursachen (Schaber *et al.*, 2004). Des Weiteren dürften je nach Nährstoffversorgung und Infektionsnische unterschiedliche Stoffwechselwege bevorzugt werden. So konnte mit uropathogenen *E. coli*-Stämmen (UPECs) gezeigt werden, dass Glukoneogenese und Citratzyklus, nicht jedoch Glykolyse und Entner-Doudoroff-Weg, für eine Infektion wichtig sind (Alteri *et al.*, 2009), wohingegen bei enteropathogenen *E. coli*-Stämmen (EPECs) aus dem Darmtrakt diese Stoffwechselwege keine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen (Chang *et al.*, 2004). Eine Beeinflussung oder Störung des Metabolismus von bakteriellen Erregern stellt eine Alternative zur Bekämpfung von Bakterien dar. Metabolische Stoffwechselwege, die während einer Infektion vom Bakterium aktiv genutzt werden, sind ein wichtiger geeigneter Angriffspunkt für therapeutische Interventionen, sofern sie für das Bakterium essentiell sind (Hagins *et al.*, 2010). Die unter Bakterien hoch konservierte Acetyl-CoA Carboxylase, welche den ersten essentiellen Schritt in der Fettsäurenbiosynthese katalysiert, stellt einen geeigneten Angriffspunkt gegen *E. coli* und andere Bakterienspezies dar (Freiberg *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit für eine therapeutische Intervention bildet die Isoprenoid-Synthese. Alle Isoprenoide (natürliche organische Produkte) leiten sich von dem universalen C_5-Vorläufer Isopentyldiphosphat (IPP) oder seinem Isomer Dimethlallylpyrophosphat (DMAPP) ab. IPP und DMAPP können über einen von zwei unabhängigen nichthomologen Weg synthetisiert werden, entweder über den klassischen Mevalonat-Weg oder über den alternativen 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)-Weg (Enzyme nicht in Säugetierzellen vorhanden). Da Isoprenoide essentiell für bakterielle zelluläre Kernfunktionen sind, bietet der MEP-Weg geeignete Angriffspunkte gegen bestimmte gram-negative (z. B. *P. aeruginosa*) oder gram-positive (z. B. *B. subtilis*) Pathogene (Putra *et al.*, 1998;Laupitz *et al.*, 2004;Odom, 2011;Heuston *et al.*, 2012). Alternativ zur Isoprenoid-Biosynthese haben andere Studien gezeigt, dass die Isocitratlyase, ein Enzym des Glyoxylatwegs, und der Histidin-Biosyntheseweg *in vitro* potentielle Angriffspunkte für Interventionen gegen *M. tuberculosis* bieten (Dunn *et al.*, 2009;Beste *et al.*, 2011;Krátký and Vinsova, 2012;Lunardi *et al.*, 2013).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, welche vielfältigen Funktionen die Isocitratdehydrogenase als metabolisches Enzym - auch im Hinblick auf die Virulenzeigenschaften - von *P. aeruginosa* einnimmt. Viele dieser funktionellen Zusammenhänge sind jedoch ungeklärt, sodass eine gezielte Erforschung zur Identifizierung neuer Therapieansätze auch zukünftig notwendig sein wird.

7 Literaturverzeichnis

Aaron,S.D., Ferris,W., Ramotar,K., Vandemheen,K., Chan,F., and Saginur,R. (2002) Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **40**: 4172-4179.

Abdel-Mawgoud,A.M., Lépine,F., and Déziel,E. (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1323-1336.

Accurso,F.J., Rowe,S.M., Clancy,J.P., Boyle,M.P., Dunitz,J.M., Durie,P.R. *et al.* (2010) Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med* **363**: 1991-2003.

Adewoye,L.O., and Worobec,E.A. (2000) Identification and characterization of the *gltK* gene encoding a membrane-associated glucose transport protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **253**: 323-330.

Aires,J.R., Köhler,T., Nikaido,H., and Plesiat,P. (1999) Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2624-2628.

Al Alam,D., Deslee,G., Tournois,C., Lamkhioued,B., Lebargy,F., Merten,M. *et al.* (2010) Impaired interleukin-8 chemokine secretion by *Staphylococcus aureus*-activated epithelium and T-cell chemotaxis in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**: 644-650.

Alcorn,J.F., and Wright,J.R. (2004) Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* **279**: 30871-30879.

Allison,K.R., Brynildsen,M.P., and Collins,J.J. (2011) Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* **473**: 216-220.

Alteri,C.J., Smith,S.N., and Mobley,H.L. (2009) Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle. *PLoS Pathog* **5**: e1000448.

Alton,E.W., Stern,M., Farley,R., Jaffe,A., Chadwick,S.L., Phillips,J. *et al.* (1999) Cationic lipid-mediated *CFTR* gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* **353**: 947-954.

Andersen,D. (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *American Journal of Diseases of Children* **56**: 344-399.

Anderson,G.G., Moreau-Marquis,S., Stanton,B.A., and O'Toole,G.A. (2008) *In vitro* analysis of tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived airway epithelial cells. *Infect Immun* **76**: 1423-1433.

Anderson,P. (2010) Emerging therapies in cystic fibrosis. *Ther Adv Respir Dis* **4**: 177-185.

Andersson,C., Servetnyk,Z., and Roomans,G.M. (2003) Activation of CFTR by genistein in human airway epithelial cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 518-522.

Anzai,Y., Kim,H., Park,J.Y., Wakabayashi,H., and Oyaizu,H. (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**: 1563-1589.

Armitage,J.P., and Evans,M.C. (1983) The motile and tactic behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* in anaerobic environments. *FEBS Lett* **156**: 113-118.

Balfour-Lynn,I.M., and Welch,K. (2012) Inhaled corticosteroids for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* **11**: CD001915.

Bals,R., Hubert,D., and Tümmler,B. (2011) Antibiotic treatment of CF lung disease: from bench to bedside. *J Cyst Fibros* **10 Suppl 2**: S146-S151.

Banerjee,S., Nandyala,A., Podili,R., Katoch,V.M., and Hasnain,S.E. (2005) Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate dehydrogenases (ICD-1 and ICD-2) reveals differences in coenzyme affinity, oligomeric state, pH tolerance and phylogenetic affiliation. *BMC Biochem* **6**: 20.

Baothman,O.A., Rolfe,M.D., and Green,J. (2013) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aconitase A. *Microbiology* **159**: 1209-1216.

Baquero,F., Canton,R., Martinez-Beltran,J., and Bolmstrom,A. (1992) The E-Test as an epidemiologic tool. *Diagn Microbiol Infect Dis* **15**: 483-487.

Baquero,M.R., Galan,J.C., del Carmen,T.M., Canton,R., Coque,T.M., Martinez,J.L., and Baquero,F. (2005) Increased mutation frequencies in *Escherichia coli* isolates harboring extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4754-4756.

Bardoel,B.W., van der Ent,S., Pel,M.J., Tommassen,J., Pieterse,C.M., van Kessel,K.P., and van Strijp,J.A. (2011) *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog* **7**: e1002206.

Bartling,T.R., and Drumm,M.L. (2009) Oxidative stress causes IL8 promoter hyperacetylation in cystic fibrosis airway cell models. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**: 58-65.

Battesti,A., and Bouveret,E. (2009) Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the acyl carrier protein-SpoT interaction. *J Bacteriol* **191**: 616-624.

Battle,S.E., Rello,J., and Hauser,A.R. (2009) Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **290**: 70-78.

Ben Haj Khalifa,A., Moissenet,D., Vu,T.H., and Khedher,M. (2011) Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris)* **69**: 393-403.

Berg,J.M., Tymoczko,J.L., and Stryer,L. (2002) Biochemistry, Fifth Edition W.H. Freeman, pp. 531-559.

Bergogne-Berezin,E. (1987) Pharmacokinetics of antibiotics in cystic fibrosis patients with particular reference to the bronchopulmonary tree. *Infection* **15**: 288-294.

Bériault,R., Chenier,D., Singh,R., Middaugh,J., and Appanna,V. (2005) Detection and purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **26**: 2892-2897.

Bertani,G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300.

Bérubé,J., Roussel,L., Nattagh,L., and Rousseau,S. (2010) Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **285**: 22299-22307.

Beste,D.J., Bonde,B., Hawkins,N., Ward,J.L., Beale,M.H., Noack,S. *et al.* (2011) ^{13}C metabolic flux analysis identifies an unusual route for pyruvate dissimilation in mycobacteria which requires isocitrate lyase and carbon dioxide fixation. *PLoS Pathog* **7**: e1002091.

Bielecki,P., Glik,J., Kawecki,M., and Martins dos Santos,V.A. (2008) Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* **30**: 777-790.

Birkenstock,T., Liebeke,M., Winstel,V., Krismer,B., Gekeler,C., Niemiec,M.J. *et al.* (2012) Exometabolome analysis identifies pyruvate dehydrogenase as a target for the antibiotic triphenylbismuthdichloride in multiresistant bacterial pathogens. *J Biol Chem* **287**: 2887-2895.

Bizouarn,T., Althage,M., Pedersen,A., Tigerstrom,A., Karlsson,J., Johansson,C., and Rydstrom,J. (2002) The organization of the membrane domain and its interaction with the NADP(H)-binding site in proton-translocating transhydrogenase from *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* **1555**: 122-127.

Björkman,J., Nagaev,I., Berg,O.G., Hughes,D., and Andersson,D.I. (2000) Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science* **287**: 1479-1482.

Bjorn,M.J., Pavlovskis,O.R., Thompson,M.R., and Iglewski,B.H. (1979) Production of exoenzyme S during *Pseudomonas aeruginosa* infections of burned mice. *Infect Immun* **24**: 837-842.

Blank,L.M., Lehmbeck,F., and Sauer,U. (2005) Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* **5**: 545-558.

Blankenfeldt,W., Giraud,M.F., Leonard,G., Rahim,R., Creuzenet,C., Lam,J.S., and Naismith,J.H. (2000) The purification, crystallization and preliminary structural characterization of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase (RmlA), the first enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**: 1501-1504.

Blattner,F.R., Plunkett,G., III, Bloch,C.A., Perna,N.T., Burland,V., Riley,M. *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.

Bleves,S., Viarre,V., Salacha,R., Michel,G.P., Filloux,A., and Voulhoux,R. (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* **300**: 534-543.

Blom,J., Albaum,S.P., Doppmeier,D., Pühler,A., Vorhölter,F.J., Zakrzewski,M., and Goesmann,A. (2009) EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics* **10**: 154.

Blumer,C., and Haas,D. (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol* **173**: 170-177.

Bochner,B.R., Gadzinski,P., and Panomitros,E. (2001) Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* **11**: 1246-1255.

Bohlin,J., van Passel,M.W., Snipen,L., Kristoffersen,A.B., Ussery,D., and Hardy,S.P. (2012) Relative entropy differences in bacterial chromosomes, plasmids, phages and genomic islands. *BMC Genomics* **13**: 66.

Bolduc,J.M., Dyer,D.H., Scott,W.G., Singer,P., Sweet,R.M., Koshland,D.E., and Stoddard,B.L. (1995) Mutagenesis and Laue structures of enzyme intermediates: isocitrate dehydrogenase. *Science* **268**: 1312-1318.

Boncoeur,E., Roque,T., Bonvin,E., Saint-Criq,V., Bonora,M., Clement,A. *et al.* (2008) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator controls lung proteasomal degradation and nuclear factor-kappaB activity in conditions of oxidative stress. *Am J Pathol* **172**: 1184-1194.

Boucher,J.C., Yu,H., Mudd,M.H., and Deretic,V. (1997) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun* **65**: 3838-3846.

Boucher,R.C. (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* **23**: 146-158.

Boucher,R.C. (2007a) Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* **58**: 157-170.

Boucher,R.C. (2007b) Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med* **13**: 231-240.

Boyer,H.W., and Roulland-Dussoix,D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**: 459-472.

Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Bragonzi,A., Farulla,I., Paroni,M., Twomey,K.B., Pirone,L., Lore,N.I. *et al.* (2012) Modelling co-infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PLoS One* **7**: e52330.

Bragonzi,A., Wiehlmann,L., Klockgether,J., Cramer,N., Worlitzsch,D., Döring,G., and Tümmler,B. (2006) Sequence diversity of the *mucABD* locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* **152**: 3261-3269.

Brigulla,M., and Wackernagel,W. (2010) Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1027-1041.

Britigan,B.E., Miller,R.A., Hassett,D.J., Pfaller,M.A., McCormick,M.L., and Rasmussen,G.T. (2001) Antioxidant enzyme expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of an atypical form of manganese superoxide dismutase. *Infect Immun* **69**: 7396-7401.

Buch,A.D., Archana,G., and Kumar,G.N. (2009) Enhanced citric acid biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 by overexpression of the *Escherichia coli* citrate synthase gene. *Microbiology* **155**: 2620-2629.

Buchrieser,C., Brosch,R., Bach,S., Guiyoule,A., and Carniel,E. (1998) The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes. *Mol Microbiol* **30**: 965-978.

Bus,J.S., and Gibson,J.E. (1984) Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* **55**: 37-46.

Caballero,A., Marquart,M., Traidej,M., and O'Callaghan,R. (2004) *Pseudomonas* keratitis: protease IV gene conservation, distribution, and production relative to virulence and other *Pseudomonas* proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 522-530.

Cahill,P., Nason,M.W., Ambrose,C., Yao,T.Y., Thomas,P., and Egan,M.E. (2000) Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domains that are important for interactions with ROMK2. *J Biol Chem* **275**: 16697-16701.

Cantin,A.M., Bilodeau,G., Ouellet,C., Liao,J., and Hanrahan,J.W. (2006) Oxidant stress suppresses *CFTR* expression. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C262-C270.

Cantwell,S.G., Lau,E.P., Watt,D.S., and Fall,R.R. (1978) Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* **135**: 324-333.

Casadevall,A., and Pirofski,L.A. (2000) Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* **68**: 6511-6518.

Castang,S., and Dove,S.L. (2012) Basis for the essentiality of H-NS family members in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **194**: 5101-5109.

Castang,S., McManus,H.R., Turner,K.H., and Dove,S.L. (2008) H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18947-18952.

Chang,D.E., Smalley,D.J., Tucker,D.L., Leatham,M.P., Norris,W.E., Stevenson,S.J. *et al.* (2004) Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7427-7432.

Chang,W., Small,D.A., Toghrol,F., and Bentley,W.E. (2005) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC Genomics* **6**: 115.

Charusanti,P., Conrad,T.M., Knight,E.M., Venkataraman,K., Fong,N.L., Xie,B. *et al.* (2010) Genetic basis of growth adaptation of *Escherichia coli* after deletion of *pgi*, a major metabolic gene. *PLoS Genet* **6**: e1001186.

Chen,J., and Novick,R.P. (2009) Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science* **323**: 139-141.

Chevance,F.F., and Hughes,K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* **6**: 455-465.

Chitkara,Y.K., and Feierabend,T.C. (1981) Endogenous and exogenous infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a burns unit. *Int Surg* **66**: 237-240.

Chittezham,T.V., Kinkead,L.C., Janssen,A., Schaeffer,C.R., Woods,K.M., Lindgren,J.K. *et al.* (2013) A dysfunctional tricarboxylic acid cycle enhances fitness of *Staphylococcus epidermidis* during beta-lactam stress. *MBio* **4**.

Chung,J.C., Rzhepishevska,O., Ramstedt,M., and Welch,M. (2013) Type III secretion system expression in oxygen-limited *Pseudomonas aeruginosa* cultures is stimulated by isocitrate lyase activity. *Open Biol* **3**: 120131.

Ciofu,O., Mandsberg,L.F., Bjarnsholt,T., Wassermann,T., and Høiby,N. (2010) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants. *Microbiology* **156**: 1108-1119.

Ciofu,O., Riis,B., Pressler,T., Poulsen,H.E., and Høiby,N. (2005) Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2276-2282.

Cohen,T.S. (2012) Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med* **18**: 509-519.

Collis,C.M., Kim,M.J., Partridge,S.R., Stokes,H.W., and Hall,R.M. (2002) Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* **184**: 3017-3026.

Colovos,C., Cascio,D., and Yeates,T.O. (1998) The 1.8 A crystal structure of the *ycaC* gene product from *Escherichia coli* reveals an octameric hydrolase of unknown specificity. *Structure* **6**: 1329-1337.

Conway,S.P., Brownlee,K.G., Denton,M., and Peckham,D.G. (2003) Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* **2**: 321-332.

Corpas,F.J., Barroso,J.B., Sandalio,L.M., Palma,J.M., Lupianez,J.A., and del Rio,L.A. (1999) Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence. *Plant Physiol* **121**: 921-928.

Couce,A., Guelfo,J.R., and Blazquez,J. (2013) Mutational spectrum drives the rise of mutator bacteria. *PLoS Genet* **9**: e1003167.

Couce,M., O'Brien,T.D., Moran,A., Roche,P.C., and Butler,P.C. (1996) Diabetes mellitus in cystic fibrosis is characterized by islet amyloidosis. *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 1267-1272.

Cox,C.D., and Parker,J. (1979) Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **9**: 479-484.

Cozzone,A.J., and El-Mansi,M. (2005) Control of isocitrate dehydrogenase catalytic activity by protein phosphorylation in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**: 132-146.

Cunningham,L., Gruer,M.J., and Guest,J.R. (1997) Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143 Pt 12**: 3795-3805.

D'Argenio,D.A., Calfee,M.W., Rainey,P.B., and Pesci,E.C. (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* **184**: 6481-6489.

D'Argenio,D.A., Wu,M., Hoffman,L.R., Kulasekara,H.D., Déziel,E., Smith,E.E. *et al.* (2007) Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol* **64**: 512-533.

Daddaoua,A., Fillet,S., Fernandez,M., Udaondo,Z., Krell,T., and Ramos,J.L. (2012) Genes for carbon metabolism and the ToxA virulence factor in *Pseudomonas aeruginosa* are regulated through molecular interactions of PtxR and PtxS. *PLoS One* **7**: e39390.

Dalebroux,Z.D., Svensson,S.L., Gaynor,E.C., and Swanson,M.S. (2010) ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 171-199.

Daly,J.A., Boshard,R., and Matsen,J.M. (1984) Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **19**: 742-743.

Dang,L., Jin,S., and Su,S.M. (2010a) IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med* **16**: 387-397.

Dang,L., White,D.W., Gross,S., Bennett,B.D., Bittinger,M.A., Driggers,E.M. *et al.* (2010b) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **465**: 966.

Darling,A.C., Mau,B., Blattner,F.R., and Perna,N.T. (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* **14**: 1394-1403.

Darzins,A., and Chakrabarty,A.M. (1984) Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **159**: 9-18.

Davis,P.B. (1985) Reproductive complications of cystic fibrosis. *Seminars in Respiratory Medicine*: 314-318.

de Kievit,T., Seed,P.C., Nezezon,J., Passador,L., and Iglewski,B.H. (1999) RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 2175-2184.

de Kievit,T.R., and Iglewski,B.H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* **68**: 4839-4849.

de Spiegeleer,P., Sermon,J., Lietaert,A., Aertsen,A., and Michiels,C.W. (2004) Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **97**: 124-133.

Demko,C.A., Byard,P.J., and Davis,P.B. (1995) Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Clin Epidemiol* **48**: 1041-1049.

Denning,G.M., Railsback,M.A., Rasmussen,G.T., Cox,C.D., and Britigan,B.E. (1998) *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* **274**: L893-L900.

Déziel,E., Gopalan,S., Tampakaki,A.P., Lépine,F., Padfield,K.E., Saucier,M. *et al.* (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* **55**: 998-1014.

Dietrich,L.E., Price-Whelan,A., Petersen,A., Whiteley,M., and Newman,D.K. (2006) The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **61**: 1308-1321.

Diggle,S.P., Winzer,K., Chhabra,S.R., Worrall,K.E., Camara,M., and Williams,P. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* **50**: 29-43.

Diggle,S.P., Winzer,K., Lazdunski,A., Williams,P., and Camara,M. (2002) Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**: 2576-2586.

Diso,D., Anile,M., Patella,M., Pecoraro,Y., Rendina,E.A., Carillo,C. *et al.* (2013) Lung transplantation for cystic fibrosis: outcome of 101 single-center consecutive patients. *Transplant Proc* **45**: 346-348.

Doan,T., Servant,P., Tojo,S., Yamaguchi,H., Lerondel,G., Yoshida,K. *et al.* (2003) The *Bacillus subtilis ywkA* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology* **149**: 2331-2343.

Dobrindt,U., Hochhut,B., Hentschel,U., and Hacker,J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**: 414-424.

Dodge,J.A., and Turck,D. (2006) Cystic fibrosis: nutritional consequences and management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **20**: 531-546.

Donlan,R.M., and Costerton,J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.

Döring,G., and Gulbins,E. (2009) Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cell Microbiol* **11**: 208-216.

Döring,G., Parameswaran,I.G., and Murphy,T.F. (2011) Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 124-146.

Dorman,C.J. (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**: 391-400.

Dötsch,A., Becker,T., Pommerenke,C., Magnowska,Z., Jansch,L., and Häussler,S. (2009) Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2522-2531.

Douzi,B., Ball,G., Cambillau,C., Tegoni,M., and Voulhoux,R. (2011) Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *J Biol Chem* **286**: 40792-40801.

Driffield,K.L., Bostock,J.M., Miller,K., O´Neill,A.J., Hobbs,J.K., and Chopra,I. (2006) Evolution of extended-spectrum beta-lactamases in a MutS-deficient *Pseudomonas aeruginosa* hypermutator. *J Antimicrob Chemother* **58**: 905-907.

Driscoll,B.T., and Finan,T.M. (1997) Properties of NAD($^+$)- and NADP($^+$)-dependent malic enzymes of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* and differential expression of their genes in nitrogen-fixing bacteroids. *Microbiology* **143 Pt 2**: 489-498.

Dubern,J.F., and Diggle,S.P. (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* **4**: 882-888.

Dunn,M.F., Ramirez-Trujillo,J.A., and Hernandez-Lucas,I. (2009) Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology* **155**: 3166-3175.

Durand,E., Bernadac,A., Ball,G., Lazdunski,A., Sturgis,J.N., and Filloux,A. (2003) Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol* **185**: 2749-2758.

Dwyer,D.J., Kohanski,M.A., and Collins,J.J. (2009) Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr Opin Microbiol* **12**: 482-489.

Eichner,A. (2012) Anpassung von *Pseudomonas aeruginosa* an die Mukoviszidose-Lunge. *Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie*.

Eikmanns,B.J., Rittmann,D., and Sahm,H. (1995) Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J Bacteriol* **177**: 774-782.

Eisenreich,W., Dandekar,T., Heesemann,J., and Goebel,W. (2010) Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Microbiol* **8**: 401-412.

Elder,M.J., Stapleton,F., Evans,E., and Dart,J.K. (1995) Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye (Lond)* **9 Pt 1**: 102-109.

Elkins,M.R., Robinson,M., Rose,B.R., Harbour,C., Moriarty,C.P., Marks,G.B. *et al.* (2006) A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **354**: 229-240.

Eng,R.H., Padberg,F.T., Smith,S.M., Tan,E.N., and Cherubin,C.E. (1991) Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 1824-1828.

Engel,L.S., Hill,J.M., Caballero,A.R., Green,L.C., and O'Callaghan,R.J. (1998) Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **273**: 16792-16797.

Ernst,R.K., Yi,E.C., Guo,L., Lim,K.B., Burns,J.L., Hackett,M., and Miller,S.I. (1999) Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**: 1561-1565.

Eschbach,M., Schreiber,K., Trunk,K., Buer,J., Jahn,D., and Schobert,M. (2004) Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* **186**: 4596-4604.

Evans,K., Passador,L., Srikumar,R., Tsang,E., Nezezon,J., and Poole,K. (1998) Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**: 5443-5447.

Evans,L.R., and Linker,A. (1973) Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **116**: 915-924.

Eylert,E., Herrmann,V., Jules,M., Gillmaier,N., Lautner,M., Buchrieser,C. *et al.* (2010) Isotopologue profiling of *Legionella pneumophila*: role of serine and glucose as carbon substrates. *J Biol Chem* **285**: 22232-22243.

Eyzaguirre,J., Cornwell,E., Borie,G., and Ramirez,B. (1973) Two malic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **116**: 215-221.

Fagerlind,M.G., Rice,S.A., Nilsson,P., Harlen,M., James,S., Charlton,T., and Kjelleberg,S. (2003) The role of regulators in the expression of quorum-sensing signals in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**: 88-100.

Fanconi,G., Uehlinger,E., and Knauer,C. (1936) Das Coeliakiesyndrom bei angeborener Panreasfibromatose und Brochiektasien. *Wien Med Wochenschr* **86**: 753-756.

Favero,M.S., Carson,L.A., Bond,W.W., and Petersen,N.J. (1971) *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* **173**: 836-838.

Figurski,D.H., and Helinski,D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 1648-1652.

Filloux,A. (2011) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An essay on diversity, evolution, and function. *Front Microbiol* **2**: 155.

Filloux,A., Michel,G., and Bally,M. (1998) GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 177-198.

Flotte,T.R., and Laube,B.L. (2001) Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest* **120**: 124S-131S.

Folkesson,A., Jelsbak,L., Yang,L., Johansen,H.K., Ciofu,O., Høiby,N., and Molin,S. (2012) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **10**: 841-851.

Foster,J.W., and Spector,M.P. (1995) How *Salmonella* survive against the odds. *Annu Rev Microbiol* **49**: 145-174.

Fraser,C.M., Casjens,S., Huang,W.M., Sutton,G.G., Clayton,R., Lathigra,R. *et al.* (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**: 580-586.

Frawley,E.R., Crouch,M.L., Bingham-Ramos,L.K., Robbins,H.F., Wang,W., Wright,G.D., and Fang,F.C. (2013) Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 12054-12059.

Frederiksen,B., Koch,C., and Høiby,N. (1999) Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients (1974-1995). *Pediatr Pulmonol* **28**: 159-166.

Freiberg,C., Brunner,N.A., Schiffer,G., Lampe,T., Pohlmann,J., Brands,M. *et al.* (2004) Identification and characterization of the first class of potent bacterial acetyl-CoA carboxylase inhibitors with antibacterial activity. *J Biol Chem* **279**: 26066-26073.

Frimmersdorf,E., Horatzek,S., Pelnikevich,A., Wiehlmann,L., and Schomburg,D. (2010) How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol* **12**: 1734-1747.

Frost,L.S., Leplae,R., Summers,A.O., and Toussaint,A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.

Fuchs,G., and Stupperich,E. (1978) Evidence for an incomplete reductive carboxylic acid cycle in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **118**: 121-125.

Fuchs,H.J., Borowitz,D.S., Christiansen,D.H., Morris,E.M., Nash,M.L., Ramsey,B.W. *et al.* (1994) Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The pulmozyme study group. *N Engl J Med* **331**: 637-642.

Fuchs,T.M., Eisenreich,W., Heesemann,J., and Goebel,W. (2012) Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 435-462.

Fuhrer,T., and Sauer,U. (2009) Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J Bacteriol* **191**: 2112-2121.

Fung,C., Naughton,S., Turnbull,L., Tingpej,P., Rose,B., Arthur,J. *et al.* (2010) Gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* in a mucin-containing synthetic growth medium mimicking cystic fibrosis lung sputum. *J Med Microbiol* **59**: 1089-1100.

Fussell,K.C., Udasin,R.G., Gray,J.P., Mishin,V., Smith,P.J., Heck,D.E., and Laskin,J.D. (2011) Redox cycling and increased oxygen utilization contribute to diquat-induced oxidative stress and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells overexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase. *Free Radic Biol Med* **50**: 874-882.

Fux,C.A., Shirtliff,M., Stoodley,P., and Costerton,J.W. (2005) Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? *Trends Microbiol* **13**: 58-63.

Gad,S.C. (2011) Development of therapeutic agents handbook Wiley.

Gaillard,M., Vallaeys,T., Vorholter,F.J., Minoia,M., Werlen,C., Sentchilo,V. *et al.* (2006) The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *J Bacteriol* **188**: 1999-2013.

Gal-Mor,O., and Finlay,B.B. (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* **8**: 1707-1719.

Gallagher,L.A., McKnight,S.L., Kuznetsova,M.S., Pesci,E.C., and Manoil,C. (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**: 6472-6480.

Garner,A.L., Struss,A.K., Fullagar,J.L., Agrawal,A., Moreno,A.Y., Cohen,S.M., and Janda,K.D. (2012) 3-Hydroxy-1-alkyl-2-methylpyridine-4(1H)-thiones: Inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factor LasB. *ACS Med Chem Lett* **3**: 668-672.

Genevaux,P., Bauda,P., DuBow,M.S., and Oudega,B. (1999) Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiol* **172**: 1-8.

Gershman,A.J., Mehta,A.C., Infeld,M., and Budev,M.M. (2006) Cystic fibrosis in adults: an overview for the internist. *Cleve Clin J Med* **73**: 1065-1074.

Giedraitienė,A., Vitkauskiene,A., Naginiene,R., and Pavilonis,A. (2011) Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)* **47**: 137-146.

Gil,F., Hernandez-Lucas,I., Polanco,R., Pacheco,N., Collao,B., Villarreal,J.M. *et al.* (2009) SoxS regulates the expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompW* gene. *Microbiology* **155**: 2490-2497.

Gil,F., Ipinza,F., Fuentes,J., Fumeron,R., Villarreal,J.M., Aspee,A. *et al.* (2007) The *ompW* (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Res Microbiol* **158**: 529-536.

Giraud,A., Matic,I., Tenaillon,O., Clara,A., Radman,M., Fons,M., and Taddei,F. (2001) Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* **291**: 2606-2608.

Godfrey,A.J., Hatlelid,L., and Bryan,L.E. (1984) Correlation between lipopolysaccharide structure and permeability resistance in beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **26**: 181-186.

Görke,B., and Stülke,J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**: 613-624.

Goss,C.H., and Muhlebach,M.S. (2011) Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **10**: 298-306.

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

Govan,J.R., and Fyfe,J.A. (1978) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: resistance of the mucoid from to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoid variants *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* **4**: 233-240.

Greenberg,J.T., Monach,P., Chou,J.H., Josephy,P.D., and Demple,B. (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6181-6185.

Greene,C.M., Carroll,T.P., Smith,S.G., Taggart,C.C., Devaney,J., Griffin,S. *et al.* (2005) TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol* **174**: 1638-1646.

Griesenbach,U., Ferrari,S., Geddes,D.M., and Alton,E.W. (2002) Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* **9**: 1344-1350.

Groisman,E.A., and Ochman,H. (1996) Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**: 791-794.

Guerin,E., Cambray,G., Sanchez-Alberola,N., Campoy,S., Erill,I., Da,R.S. *et al.* (2009) The SOS response controls integron recombination. *Science* **324**: 1034.

Gutteridge,J.M., and Halliwell,B. (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* **393**: 561-564.

Haase,G., Skopnik,H., Groten,T., Kusenbach,G., and Posselt,H.G. (1991) Long-term fungal cultures from sputum of patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **34**: 373-376.

Hacker,J., Blum-Oehler,G., Muhldorfer,I., and Tschape,H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097.

Hacker,J., and Carniel,E. (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* **2**: 376-381.

Hacker,J., and Kaper,J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-679.

Hadjifrangiskou,M., Gu,A.P., Pinkner,J.S., Kostakioti,M., Zhang,E.W., Greene,S.E., and Hultgren,S.J. (2012) Transposon mutagenesis identifies uropathogenic *Escherichia coli* biofilm factors. *J Bacteriol* **194**: 6195-6205.

Hagins,J.M., Scoffield,J.A., Suh,S.J., and Silo-Suh,L. (2010) Influence of RpoN on isocitrate lyase activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **156**: 1201-1210.

Hall-Stoodley,L., Costerton,J.W., and Stoodley,P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95-108.

Halliwell,B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* **344**: 721-724.

Halliwell,B., and Cross,C.E. (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 10**: 5-12.

Halliwell,B., and Whiteman,M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**: 231-255.

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

Hansen,A.K., and Moran,N.A. (2011) Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2849-2854.

Hare,N.J., Scott,N.E., Shin,E.H., Connolly,A.M., Larsen,M.R., Palmisano,G., and Cordwell,S.J. (2011) Proteomics of the oxidative stress response induced by hydrogen peroxide and paraquat reveals a novel AhpC-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* **11**: 3056-3069.

Harrison,F. (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **153**: 917-923.

Härtel,T., Eylert,E., Schulz,C., Petruschka,L., Gierok,P., Grubmuller,S. *et al.* (2012) Characterization of central carbon metabolism of *Streptococcus pneumoniae* by isotopologue profiling. *J Biol Chem* **287**: 4260-4274.

Hassan,H.M., and Fridovich,I. (1977a) Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **129**: 1574-1583.

Hassan,H.M., and Fridovich,I. (1977b) Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Induction by methyl viologen. *J Biol Chem* **252**: 7667-7672.

Hassan,H.M., and Fridovich,I. (1978) Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **253**: 8143-8148.

Hassett,D.J., Cuppoletti,J., Trapnell,B., Lymar,S.V., Rowe,J.J., Yoon,S.S. *et al.* (2002) Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* **54**: 1425-1443.

Hassett,D.J., Schweizer,H.P., and Ohman,D.E. (1995) *Pseudomonas aeruginosa sodA* and *sodB* mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. *J Bacteriol* **177**: 6330-6337.

Hassett,D.J., Sutton,M.D., Schurr,M.J., Herr,A.B., Caldwell,C.C., and Matu,J.O. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol* **17**: 130-138.

Hauser,A.R. (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **7**: 654-665.

Häussler,S. (2004) Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **6**: 546-551.

Häussler,S., Tümmler,B., Weissbrodt,H., Rohde,M., and Steinmetz,I. (1999) Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* **29**: 621-625.

He,J., Baldini,R.L., Déziel,E., Saucier,M., Zhang,Q., Liberati,N.T. *et al.* (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2530-2535.

Head,N.E., and Yu,H. (2004) Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infect Immun* **72**: 133-144.

Heck,L.W., Morihara,K., McRae,W.B., and Miller,E.J. (1986) Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* **51**: 115-118.

Hentschel,U., and Hacker,J. (2001) Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes Infect* **3**: 545-548.

Herbst,K., Bujara,M., Heroven,A.K., Opitz,W., Weichert,M., Zimmermann,A., and Dersch,P. (2009) Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog* **5**: e1000435.

Heuston,S., Begley,M., Gahan,C.G., and Hill,C. (2012) Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology* **158**: 1389-1401.

Heydorn,A., Ersboll,B., Kato,J., Hentzer,M., Parsek,M.R., Tolker-Nielsen,T. *et al.* (2002) Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2008-2017.

Hibbing,M.E., Fuqua,C., Parsek,M.R., and Peterson,S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* **8**: 15-25.

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

Hippeli,S., and Elstner,E.F. (1999) Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. *FEBS Lett* **443**: 1-7.

Hirche,T.O., Loitsch,S., Smaczny,C., and Wagner,T.O.F. (2005) Neue Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie der Mukoviszidose. *Pneumologie* **59**: 811-818.

Hoang,T.T., Karkhoff-Schweizer,R.R., Kutchma,A.J., and Schweizer,H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77-86.

Hoboth,C. (2007) Charakterisierung hypermutierender *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate von Patienten mit zystischer Fibrose mittels Transkriptom- und Proteomanalyse. *Dissertation, TU München: Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt*.

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

Hoek,J.B., and Rydstrom,J. (1988) Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J* **254**: 1-10.

Hogardt,M., and Heesemann,J. (2010) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**: 557-562.

Hogardt,M., and Heesemann,J. (2012) Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr Top Microbiol Immunol* **358**: 91-118.

Hogardt,M., Hoboth,C., Schmoldt,S., Henke,C., Bader,L., and Heesemann,J. (2007) Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **195**: 70-80.

Hogardt,M., Roeder,M., Schreff,A.M., Eberl,L., and Heesemann,J. (2004) Expression of *Pseudomonas aeruginosa exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* **150**: 843-851.

Hogardt,M., Schubert,S., Gotzfried,M., and Heesemann,J. (2006) Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Int J Med Microbiol* **296**: 313-320.

Høiby,N. (2011) Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med* **9**: 32.

Høiby,N., Bjarnsholt,T., Givskov,M., Molin,S., and Ciofu,O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **35**: 322-332.

Høiby,N., Krogh,J.H., Moser,C., Song,Z., Ciofu,O., and Kharazmi,A. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. *Microbes Infect* **3**: 23-35.

Holloway,B.W., Egan,J.B., and Monk,M. (1960) Lysogeny in *Pseudomonas aeruginosa*. *Aust J Exp Biol Med Sci* **38**: 321-329.

Hongo,E., Morimyo,M., Mita,K., Machida,I., Hama-Inaba,H., Tsuji,H. *et al.* (1994) The methyl viologen-resistance-encoding gene *smvA* of *Salmonella typhimurium*. *Gene* **148**: 173-174.

Horvat,R.T., Clabaugh,M., Duval-Jobe,C., and Parmely,M.J. (1989) Inactivation of human gamma interferon by *Pseudomonas aeruginosa* proteases: elastase augments the effects of alkaline protease despite the presence of alpha 2-macroglobulin. *Infect Immun* **57**: 1668-1674.

Huang,T.P., Somers,E.B., and Wong,A.C. (2006) Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **188**: 3116-3120.

Hurley,J.H., Dean,A.M., Koshland,D.E., and Stroud,R.M. (1991) Catalytic mechanism of NADP($^+$)-dependent isocitrate dehydrogenase: implications from the structures of magnesium-isocitrate and $NADP^+$ complexes. *Biochemistry* **30**: 8671-8678.

Hurley,J.H., Dean,A.M., Thorsness,P.E., Koshland,D.E., and Stroud,R.M. (1990) Regulation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation involves no long-range conformational change in the free enzyme. *J Biol Chem* **265**: 3599-3602.

Huynen,M.A., Dandekar,T., and Bork,P. (1999) Variation and evolution of the citric-acid cycle: a genomic perspective. *Trends Microbiol* **7**: 281-291.

Iglewski,B.H., and Kabat,D. (1975) NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2284-2288.

Imlay,J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**: 395-418.

Jackson,R.W., Vinatzer,B., Arnold,D.L., Dorus,S., and Murillo,J. (2011) The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mob Genet Elements* **1**: 55-65.

Jäger,W., Schäfer,A., Pühler,A., Labes,G., and Wohlleben,W. (1992) Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **174**: 5462-5465.

Jarrell,K.F., and McBride,M.J. (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**: 466-476.

Jesaitis,A.J., Franklin,M.J., Berglund,D., Sasaki,M., Lord,C.I., Bleazard,J.B. *et al.* (2003) Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* **171**: 4329-4339.

John,G., Yildirim,A.O., Rubin,B.K., Gruenert,D.C., and Henke,M.O. (2010) TLR-4-mediated innate immunity is reduced in cystic fibrosis airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**: 424-431.

Jones,A.M., Govan,J.R., Doherty,C.J., Dodd,M.E., Isalska,B.J., Stanbridge,T.N., and Webb,A.K. (2001) Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* **358**: 557-558.

Joo,N.S., Lee,D.J., Winges,K.M., Rustagi,A., and Wine,J.J. (2004) Regulation of antiprotease and antimicrobial protein secretion by airway submucosal gland serous cells. *J Biol Chem* **279**: 38854-38860.

Josenhans,C., and Suerbaum,S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 605-614.

Jovov,B., Ismailov,I.I., Berdiev,B.K., Fuller,C.M., Sorscher,E.J., Dedman,J.R. *et al.* (1995) Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J Biol Chem* **270**: 29194-29200.

Juhas,M., Eberl,L., and Tümmler,B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **7**: 459-471.

Juhas,M., van der Meer,J.R., Gaillard,M., Harding,R.M., Hood,D.W., and Crook,D.W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 376-393.

Kabir,M.M., and Shimizu,K. (2004) Metabolic regulation analysis of *icd*-gene knockout *Escherichia coli* based on 2D electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry and enzyme activity measurements. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**: 84-96.

Kamath,J.M., Britigan,B.E., Cox,C.D., and Shasby,D.M. (1995) Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits prostacyclin release from endothelial cells. *Infect Immun* **63**: 4921-4923.

Kearney,B., and Staskawicz,B.J. (1990) Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. *J Bacteriol* **172**: 143-148.

Kearns,D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**: 634-644.

Kehrer,J.P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**: 43-50.

Kelly,F.J. (2003) Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* **60**: 612-616.

Kerem,B., Rommens,J.M., Buchanan,J.A., Markiewicz,D., Cox,T.K., Chakravarti,A. *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**: 1073-1080.

Khan,T.Z., Wagener,J.S., Bost,T., Accurso,F.J., and Riches,D.W. (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **151**: 1075-1082.

King,E.O., Ward,M.K., and Raney,D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44**: 301-307.

King,J.D., Kocincova,D., Westman,E.L., and Lam,J.S. (2009) Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun* **15**: 261-312.

Kisiela,D.I., Chattopadhyay,S., Libby,S.J., Karlinsey,J.E., Fang,F.C., Tchesnokova,V. *et al.* (2012) Evolution of *Salmonella enterica* virulence via point mutations in the fimbrial adhesin. *PLoS Pathog* **8**: e1002733.

Kitzler,J., and Fridovich,I. (1986) Effects of salts on the lethality of paraquat. *J Bacteriol* **167**: 346-349.

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

Klockgether,J., Cramer,N., Wiehlmann,L., Davenport,C.F., and Tümmler,B. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol* **2**: 150.

Klockgether,J., Reva,O., Larbig,K., and Tümmler,B. (2004) Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* **186**: 518-534.

Klockgether,J., Wurdemann,D., Reva,O., Wiehlmann,L., and Tümmler,B. (2007) Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 2443-2459.

Knowles,M.R., Church,N.L., Waltner,W.E., Yankaskas,J.R., Gilligan,P., King,M. *et al.* (1990) A pilot study of aerosolized amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* **322**: 1189-1194.

Knowles,M.R., Clarke,L.L., and Boucher,R.C. (1991) Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **325**: 533-538.

Knowles,M.R., Hohneker,K.W., Zhou,Z., Olsen,J.C., Noah,T.L., Hu,P.C. *et al.* (1995) A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **333**: 823-831.

Kobayashi,K., and Tagawa,S. (2004) Activation of SoxR-dependent transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem* **136**: 607-615.

Kohanski,M.A., Dwyer,D.J., and Collins,J.J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* **8**: 423-435.

Kohanski,M.A., Dwyer,D.J., Hayete,B., Lawrence,C.A., and Collins,J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**: 797-810.

Köhler,T., van Delden,C., Curty,L.K., Hamzehpour,M.M., and Pechere,J.C. (2001) Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 5213-5222.

Komori,Y., Nonogaki,T., and Nikai,T. (2001) Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). *Toxicon* **39**: 1327-1332.

Kong,K.F., Jayawardena,S.R., Del,P.A., Wiehlmann,L., Laabs,U., Tümmler,B., and Mathee,K. (2005) Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene* **358**: 82-92.

Kossel,H. (1894) Zur Frage der Pathogenität des *Bacillus pyocyaneus* für den Menschen. *Zeitschr f Hygiene* **16**: 368-372.

Kovach,M.E., Phillips,R.W., Elzer,P.H., Roop,R.M., and Peterson,K.M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-802.

Krannhals,H. (1893) Ueber Pyocyaneusinfectionen. *Deutsche Zeitschrift f Chirurgie* **37**: 181-200.

Krátký,M., and Vinsova,J. (2012) Advances in mycobacterial isocitrate lyase targeting and inhibitors. *Curr Med Chem* **19**: 6126-6137.

Kretzschmar,U., Ruckert,A., Jeoung,J.H., and Gorisch,H. (2002) Malate:quinone oxidoreductase is essential for growth on ethanol or acetate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**: 3839-3847.

Kretzschmar,U., Schobert,M., and Gorisch,H. (2001) The *Pseudomonas aeruginosa acsA* gene, encoding an acetyl-CoA synthetase, is essential for growth on ethanol. *Microbiology* **147**: 2671-2677.

Kukavica-Ibrulj,I., Bragonzi,A., Paroni,M., Winstanley,C., Sanschagrin,F., O'Toole,G.A., and Levesque,R.C. (2008) *In vivo* growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. *J Bacteriol* **190**: 2804-2813.

Kulesus,R.R., Diaz-Perez,K., Slechta,E.S., Eto,D.S., and Mulvey,M.A. (2008) Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **76**: 3019-3026.

Kung,V.L., Ozer,E.A., and Hauser,A.R. (2010) The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 621-641.

Kunzelmann,K., Kiser,G.L., Schreiber,R., and Riordan,J.R. (1997) Inhibition of epithelial Na^+ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* **400**: 341-344.

Laarman,A.J., Bardoel,B.W., Ruyken,M., Fernie,J., Milder,F.J., van Strijp,J.A., and Rooijakkers,S.H. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol* **188**: 386-393.

Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lakshmi,T.M., and Helling,R.B. (1976) Selection for citrate synthase deficiency in *icd* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **127**: 76-83.

Lam,J.S., Taylor,V.L., Islam,S.T., Hao,Y., and Kocincova,D. (2011) Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Front Microbiol* **2**: 118.

Lambert,P.A. (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* **95 Suppl 41**: 22-26.

Lammi,M., Paci,M., Pon,C.L., Losso,M.A., Miano,A., Pawlik,R.T. *et al.* (1984) Proteins from the prokaryotic nucleoid: biochemical and 1H NMR studies on three bacterial histone-like proteins. *Adv Exp Med Biol* **179**: 467-477.

Landgraf,A., Weingart,H., Tsiamis,G., and Boch,J. (2006) Different versions of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 exist due to the activity of an effector transposon. *Mol Plant Pathol* **7**: 355-364.

Landry,R.M., An,D., Hupp,J.T., Singh,P.K., and Parsek,M.R. (2006) Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* **59**: 142-151.

Larbig,K.D., Christmann,A., Johann,A., Klockgether,J., Hartsch,T., Merkl,R. *et al.* (2002) Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *J Bacteriol* **184**: 6665-6680.

Larkin,M.A., Blackshields,G., Brown,N.P., Chenna,R., McGettigan,P.A., McWilliam,H. *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Laupitz,R., Hecht,S., Amslinger,S., Zepeck,F., Kaiser,J., Richter,G. *et al.* (2004) Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur J Biochem* **271**: 2658-2669.

Le Bouguénec,C., and Schouler,C. (2011) Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria. *Int J Med Microbiol* **301**: 1-6.

Le Magrex-Debar,E., Lemoine,J., Gelle,M.P., Jacquelin,L.F., and Choisy,C. (2000) Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int J Food Microbiol* **55**: 239-243.

Lechner,S., Lewis,K., and Bertram,R. (2012) *Staphylococcus aureus* persisters tolerant to bactericidal antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol* **22**: 235-244.

Lee,C.H., and Tsai,C.M. (1999) Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. *Anal Biochem* **267**: 161-168.

Lee,D.G., Urbach,J.M., Wu,G., Liberati,N.T., Feinbaum,R.L., Miyata,S. *et al.* (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* **7**: R90.

Lee,M.E., Dyer,D.H., Klein,O.D., Bolduc,J.M., Stoddard,B.L., and Koshland,D.E. (1995) Mutational analysis of the catalytic residues lysine 230 and tyrosine 160 in the NADP($^+$)-dependent isocitrate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**: 378-384.

Lee,S.W., Foley,E.J., and Epstein,J.A. (1944) Mode of action of penicillin: I. Bacterial growth and penicillin activity-*Staphylococcus aureus* FDA. *J Bacteriol* **48**: 393-399.

Lee,T.W. (2009) Eradication of early *Pseudomonas* infection in cystic fibrosis. *Chron Respir Dis* **6**: 99-107.

Leichert,L.I., Scharf,C., and Hecker,M. (2003) Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 1967-1975.

Leid,J.G., Willson,C.J., Shirtliff,M.E., Hassett,D.J., Parsek,M.R., and Jeffers,A.K. (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* **175**: 7512-7518.

Lemire,J., Milandu,Y., Auger,C., Bignucolo,A., Appanna,V.P., and Appanna,V.D. (2010) Histidine is a source of the antioxidant, alpha-ketoglutarate, in *Pseudomonas fluorescens* challenged by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett* **309**: 170-177.

Lengeler,J., Drews,G., and Schlegel,H. (2009) Biology of the Prokaryotes, First Edition, Wiley, pp. 278-326.

Lesic,B., and Carniel,E. (2005) Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **187**: 3352-3358.

Lessie,T.G., and Phibbs,P.V., Jr. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in Pseudomonads. *Annu Rev Microbiol* **38**: 359-388.

Lewarchik,C.M., Peters,K.W., Qi,J., and Frizzell,R.A. (2008) Regulation of CFTR trafficking by its R domain. *J Biol Chem* **283**: 28401-28412.

Li,C., Wally,H., Miller,S.J., and Lu,C.D. (2009) The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **191**: 6211-6218.

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

Liberati,N.T., Urbach,J.M., Miyata,S., Lee,D.G., Drenkard,E., Wu,G. *et al.* (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2833-2838.

Linares,J.F., Lopez,J.A., Camafeita,E., Albar,J.P., Rojo,F., and Martinez,J.L. (2005) Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 1384-1391.

Linares,J.F., Moreno,R., Fajardo,A., Martinez-Solano,L., Escalante,R., Rojo,F., and Martinez,J.L. (2010) The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **12**: 3196-3212.

Liou,T.G., Adler,F.R., Cox,D.R., and Cahill,B.C. (2007) Lung transplantation and survival in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **357**: 2143-2152.

Lipuma,J.J. (2010) The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **23**: 299-323.

Livermore,D.M. (2001) Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* **47**: 247-250.

Luciani,A., Villella,V.R., Esposito,S., Brunetti-Pierri,N., Medina,D., Settembre,C. *et al.* (2010) Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* **12**: 863-875.

Luján,A.M., Maciá,M.D., Yang,L., Molin,S., Oliver,A., and Smania,A.M. (2011) Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLoS One* **6**: e27842.

Lunardi,J., Nunes,J.E., Bizarro,C.V., Basso,L.A., Santos,D.S., and Machado,P. (2013) Targeting the Histidine Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Top Med Chem*.

Lyczak,J.B., Cannon,C.L., and Pier,G.B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**: 1051-1060.

Lyczak,J.B., Cannon,C.L., and Pier,G.B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**: 194-222.

Lynch,S.V., and Bruce,K.D. (2013) The cystic fibrosis airway microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**.

Ma,J.F., Hager,P.W., Howell,M.L., Phibbs,P.V., and Hassett,D.J. (1998) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *J Bacteriol* **180**: 1741-1749.

MacDonald,K.D., McKenzie,K.R., and Zeitlin,P.L. (2007) Cystic fibrosis transmembrane regulator protein mutations. *Pediatr-Drugs* **9**: 1-10.

Maciá,M.D., Blanquer,D., Togores,B., Sauleda,J., Perez,J.L., and Oliver,A. (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3382-3386.

Mailloux,R.J., Lemire,J., and Appanna,V.D. (2011) Metabolic networks to combat oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**: 433-442.

Mailloux,R.J., Singh,R., Brewer,G., Auger,C., Lemire,J., and Appanna,V.D. (2009) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant alpha-ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **191**: 3804-3810.

Maki,S., Yoneta,M., and Takada,Y. (2006) Two isocitrate dehydrogenases from a psychrophilic bacterium, *Colwellia psychrerythraea*. *Extremophiles* **10**: 237-249.

Malloy,J.L., Veldhuizen,R.A., Thibodeaux,B.A., O'Callaghan,R.J., and Wright,J.R. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**: L409-L418.

Mann,E.E., and Wozniak,D.J. (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 893-916.

Mann,S. (1966) Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*. *Archiv Mikrobiol* **54**: 184-190.

Marcus,H., and Baker,N.R. (1985) Quantitation of adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to hamster tracheal epithelium. *Infect Immun* **47**: 723-729.

Marìn,M.M., Yuste,L., and Rojo,F. (2003) Differential expression of the components of the two alkane hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**: 3232-3237.

Marshall,B., Stintzi,A., Gilmour,C., Meyer,J.M., and Poole,K. (2009) Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology* **155**: 305-315.

Martinez,J.L., Fajardo,A., Garmendia,L., Hernandez,A., Linares,J.F., Martinez-Solano,L., and Sanchez,M.B. (2009) A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 44-65.

Martinez,J.L., and Rojo,F. (2011) Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 768-789.

Mathee,K., Ciofu,O., Sternberg,C., Lindum,P.W., Campbell,J.I., Jensen,P. *et al.* (1999) Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **145 Pt 6**: 1349-1357.

Matsui,H., Verghese,M.W., Kesimer,M., Schwab,U.E., Randell,S.H., Sheehan,J.K. *et al.* (2005) Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *J Immunol* **175**: 1090-1099.

Matsukawa,M., and Greenberg,E.P. (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**: 4449-4456.

Mattick,J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**: 289-314.

Maughan,H., Wang,P.W., Diaz-Caballero,J., Fung,P., Gong,Y., Donaldson,S.L. *et al.* (2012) Analysis of the cystic fibrosis lung microbiota via serial Illumina sequencing of bacterial 16S rRNA hypervariable regions. *PLoS One* **7**: e45791.

Maurer,L.M., Yohannes,E., Bondurant,S.S., Radmacher,M., and Slonczewski,J.L. (2005) pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **187**: 304-319.

Mazel,D. (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* **4**: 608-620.

McCallum,S.J., Corkill,J., Gallagher,M., Ledson,M.J., Hart,C.A., and Walshaw,M.J. (2001) Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonised by *P. aeruginosa*. *Lancet* **358**: 558-560.

McCarty,N.A., Standaert,T.A., Teresi,M., Tuthill,C., Launspach,J., Kelley,T.J. *et al.* (2002) A phase I randomized, multicenter trial of CPX in adult subjects with mild cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **33**: 90-98.

McDermott,W. (1958) Microbial persistence. *Yale J Biol Med* **30**: 257-291.

McKnight,S.L., Iglewski,B.H., and Pesci,E.C. (2000) The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 2702-2708.

McKoy,N.A., Saldanha,I.J., Odelola,O.A., and Robinson,K.A. (2012) Active cycle of breathing technique for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* **12**: CD007862.

Mena,A., Smith,E.E., Burns,J.L., Speert,D.P., Moskowitz,S.M., Perez,J.L., and Oliver,A. (2008) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol* **190**: 7910-7917.

Mesaros,N., Nordmann,P., Plesiat,P., Roussel-Delvallez,M., van Eldere,J., Glupczynski,Y. *et al.* (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* **13**: 560-578.

Meyer,F., Goesmann,A., McHardy,A.C., Bartels,D., Bekel,T., Clausen,J. *et al.* (2003) GenDB-an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* **31**: 2187-2195.

Meyer,J.M., Neely,A., Stintzi,A., Georges,C., and Holder,I.A. (1996) Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**: 518-523.

Michel,G., Ball,G., Goldberg,J.B., and Lazdunski,A. (2000) Alteration of the lipopolysaccharide structure affects the functioning of the Xcp secretory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 696-703.

Mikkelsen,H., McMullan,R., and Filloux,A. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One* **6**: e29113.

Miller,J.H. (1972) Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory.

Miller,J.H. (1996) Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol* **50**: 625-643.

Miller,R.V., and Rubero,V.J. (1984) Mucoid conversion by phages of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **19**: 717-719.

Minamino,T., Imada,K., and Namba,K. (2008) Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 693-701.

Minamino,T., Kinoshita,M., Imada,K., and Namba,K. (2012) Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export. *Mol Microbiol* **83**: 168-178.

Moat,A.G. (2002) Biosynthesis and metabolism of amino acids. In Microbial Physiology, Fourth Edition. Hoboken,N.U. (ed). John Wiley & Sons, Inc., pp. 503-544.

Mohan,K., Fothergill,J.L., Storrar,J., Ledson,M.J., Winstanley,C., and Walshaw,M.J. (2008) Transmission of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain from a patient with cystic fibrosis to a pet cat. *Thorax* **63**: 839-840.

Möker,N., Dean,C.R., and Tao,J. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol* **192**: 1946-1955.

Montanari,S., Oliver,A., Salerno,P., Mena,A., Bertoni,G., Tümmler,B. *et al.* (2007) Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* **153**: 1445-1454.

Montie,T.C., Doyle-Huntzinger,D., Craven,R.C., and Holder,I.A. (1982) Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect Immun* **38**: 1296-1298.

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

Morihara,K., Tsuzuki,H., Oka,T., Inoue,H., and Ebata,M. (1965) *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Isolation, crystallization, and preliminary characterization. *J Biol Chem* **240**: 3295-3304.

Moriya,N., Minamino,T., Imada,K., and Namba,K. (2011) Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly. *Microbiology* **157**: 1354-1362.

Moskowitz,S.M., Foster,J.M., Emerson,J., and Burns,J.L. (2004) Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **42**: 1915-1922.

Moss,R.B., Milla,C., Colombo,J., Zeitlin,P.L., Clancy,J.P., Spencer,L.T. *et al.* (2007) Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther* **18**: 726-732.

Muir,A., Soong,G., Sokol,S., Reddy,B., Gomez,M.I., and van Heeckeren,A. (2004) Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**: 777-783.

Muller,C., Plesiat,P., and Jeannot,K. (2011) A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 1211-1221.

Muller,M. (2002) Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic Biol Med* **33**: 1527-1533.

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

Mullis,K.B., and Faloona,F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.

Muro-Pastor,M.I., and Florencio,F.J. (1992) Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **203**: 99-105.

Naas,T., Cuzon,G., Villegas,M.V., Lartigue,M.F., Quinn,J.P., and Nordmann,P. (2008) Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla* $_{KPC}$ gene. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1257-1263.

Nakano,M.M., Zuber,P., and Sonenshein,A.L. (1998) Anaerobic regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *J Bacteriol* **180**: 3304-3311.

Ng,F.M., and Dawes,E.A. (1973) Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochem J* **132**: 129-140.

Nguyen,D., and Singh,P.K. (2006) Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8305-8306.

Nikaido,H. (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr Opin Microbiol* **1**: 516-523.

Nikaido,H. (2009) The Limitations of LB Medium. Small things considered. ASM. *The Microbe Blog*: http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009-11/the-limitations-of-lb-medium.html.

Nissim-Rafinia,M., Linde,L., and Kerem,B. (2006) The *CFTR* gene: structure, mutations and specific therapeutic approaches. In Cystic fibrosis in the 21st Century. Bush,A., Alton,E.W.F.W., Davies,J.C., Griesenbach,U., and Jaffe,A. (eds)., pp. 2-10.

Ntimbane,T., Comte,B., Mailhot,G., Berthiaume,Y., Poitout,V., Prentki,M. *et al.* (2009) Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev* **30**: 153-177.

O'Callaghan,C.H., Morris,A., Kirby,S.M., and Shingler,A.H. (1972) Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* **1**: 283-288.

O'Malley,Y.Q., Reszka,K.J., Rasmussen,G.T., Abdalla,M.Y., Denning,G.M., and Britigan,B.E. (2003) The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**: L1077-L1086.

Odom,A.R. (2011) Five questions about non-mevalonate isoprenoid biosynthesis. *PLoS Pathog* **7**: e1002323.

Ohman,D.E., and Chakrabarty,A.M. (1982) Utilization of human respiratory secretions by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* of cystic fibrosis origin. *Infect Immun* **37**: 662-669.

Oliver,A., Canton,R., Campo,P., Baquero,F., and Blazquez,J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**: 1251-1254.

Oliver,A., Levin,B.R., Juan,C., Baquero,F., and Blazquez,J. (2004) Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4226-4233.

Oppenheim,A.B., Kobiler,O., Stavans,J., Court,D.L., and Adhya,S. (2005) Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet* **39**: 409-429.

Overhage,J., Bains,M., Brazas,M.D., and Hancock,R.E. (2008) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**: 2671-2679.

Overhage,J., Lewenza,S., Marr,A.K., and Hancock,R.E. (2007) Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *J Bacteriol* **189**: 2164-2169.

Owen,O.E., Kalhan,S.C., and Hanson,R.W. (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* **277**: 30409-30412.

Pagès,J.M., James,C.E., and Winterhalter,M. (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**: 893-903.

Palma,M., DeLuca,D., Worgall,S., and Quadri,L.E. (2004) Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **186**: 248-252.

Palma,M., Zurita,J., Ferreras,J.A., Worgall,S., Larone,D.H., Shi,L. *et al.* (2005) *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect Immun* **73**: 2958-2966.

Palmer,K.L., Mashburn,L.M., Singh,P.K., and Whiteley,M. (2005) Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J Bacteriol* **187**: 5267-5277.

Palomaki,G.E., FitzSimmons,S.C., and Haddow,J.E. (2004) Clinical sensitivity of prenatal screening for cystic fibrosis via CFTR carrier testing in a United States panethnic population. *Genet Med* **6**: 405-414.

Peferoen,M., Huybrechts,R., and de Loof,A. (1982) Vacuum-blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to nitrocellulose. *FEBS Letters* **145**: 369-372.

Peng,K., and Monack,D.M. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *Francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infect Immun* **78**: 2723-2733.

Peters,J.E., and Galloway,D.R. (1990) Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J Bacteriol* **172**: 2236-2240.

Pezzulo,A.A., Tang,X.X., Hoegger,M.J., Alaiwa,M.H., Ramachandran,S., Moninger,T.O. *et al.* (2012) Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* **487**: 109-113.

Pier,G.B. (2000) Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8822-8828.

Pier,G.B., Coleman,F., Grout,M., Franklin,M., and Ohman,D.E. (2001) Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* **69**: 1895-1901.

Pier,G.B., Grout,M., Zaidi,T., Meluleni,G., Mueschenborn,S.S., Banting,G. *et al.* (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393**: 79-82.

Pirnay,J.P., Bilocq,F., Pot,B., Cornelis,P., Zizi,M., van Eldere,J. *et al.* (2009) *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One* **4**: e7740.

Pohl,K., Francois,P., Stenz,L., Schlink,F., Geiger,T., Herbert,S. *et al.* (2009) CodY in *Staphylococcus aureus*: a regulatory link between metabolism and virulence gene expression. *J Bacteriol* **191**: 2953-2963.

Polack,B., Dacheux,D., Delic-Attree,I., Toussaint,B., and Vignais,P.M. (1996) Role of manganese superoxide dismutase in a mucoid isolate of *Pseudomonas aeruginosa*: adaptation to oxidative stress. *Infect Immun* **64**: 2216-2219.

Pompilio,A., Pomponio,S., Crocetta,V., Gherardi,G., Verginelli,F., Fiscarelli,E. *et al.* (2011) Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol* **11**: 159.

Pomposiello,P.J., Bennik,M.H., and Demple,B. (2001) Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* **183**: 3890-3902.

Poncet,S., Milohanic,E., Maze,A., Nait,A.J., Ake,F., Larribe,M. *et al.* (2009) Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib Microbiol* **16**: 88-102.

Poo,H., Song,J.J., Hong,S.P., Choi,Y.H., Yun,S.W., Kim,J.H. *et al.* (2002) Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis factor. *Biotechnology Letters* **24**: 1185-1189.

Pratt,L.A., and Kolter,R. (1999) Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **2**: 598-603.

Price,M.N., Arkin,A.P., and Alm,E.J. (2006) OpWise: operons aid the identification of differentially expressed genes in bacterial microarray experiments. *BMC Bioinformatics* **7**: 19.

Prüß,B.M., Campbell,J.W., Van Dyk,T.K., Zhu,C., Kogan,Y., and Matsumura,P. (2003) FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer. *J Bacteriol* **185**: 534-543.

Pugashetti,B.K., Metzger,H.M., Vadas,L., and Feingold,D.S. (1982) Phenotypic differences among clinically isolated mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Clin Microbiol* **16**: 686-691.

Putra,S.R., Disch,A., Bravo,J.M., and Rohmer,M. (1998) Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gram-negative bacteria and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **164**: 169-175.

Qin,X., Zerr,D.M., McNutt,M.A., Berry,J.E., Burns,J.L., and Kapur,R.P. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* syntrophy in chronically colonized airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 5971-5981.

Rada,B., and Leto,T.L. (2008) Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol* **15**: 164-187.

Rahman,I. (2003) Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* **36**: 95-109.

Rahme,L.G., Stevens,E.J., Wolfort,S.F., Shao,J., Tompkins,R.G., and Ausubel,F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**: 1899-1902.

Rahme,L.G., Tan,M.W., Le,L., Wong,S.M., Tompkins,R.G., Calderwood,S.B., and Ausubel,F.M. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13245-13250.

Rainey,P.B., and Travisano,M. (1998) Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**: 69-72.

Rakhimova,E., Munder,A., Wiehlmann,L., Bredenbruch,F., and Tümmler,B. (2008) Fitness of isogenic colony morphology variants of *Pseudomonas aeruginosa* in murine airway infection. *PLoS One* **3**: e1685.

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

Rampioni,G., Bertani,I., Zennaro,E., Polticelli,F., Venturi,V., and Leoni,L. (2006) The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J Bacteriol* **188**: 815-819.

Rampioni,G., Schuster,M., Greenberg,E.P., Bertani,I., Grasso,M., Venturi,V. *et al.* (2007) RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **66**: 1557-1565.

Rampioni,G., Schuster,M., Greenberg,E.P., Zennaro,E., and Leoni,L. (2009) Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **301**: 210-217.

Ramsey,D.M., and Wozniak,D.J. (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* **56**: 309-322.

Ran,H., Hassett,D.J., and Lau,G.W. (2003) Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14315-14320.

Ratjen,F., and Döring,G. (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* **361**: 681-689.

Rayssiguier,C., Thaler,D.S., and Radman,M. (1989) The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342**: 396-401.

Reszka,K.J., O'Malley,Y., McCormick,M.L., Denning,G.M., and Britigan,B.E. (2004) Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **36**: 1448-1459.

Rietsch,A., and Mekalanos,J.J. (2006) Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**: 807-820.

Riordan,J.R. (2008) CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* **77**: 701-726.

Riordan,J.R., Rommens,J.M., Kerem,B., Alon,N., Rozmahel,R., Grzelczak,Z. *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1073.

Rivera,S.L., Vargas,E., Ramirez-Diaz,M.I., Campos-Garcia,J., and Cervantes,C. (2008) Genes related to chromate resistance by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**: 299-305.

Robinson,P., Carzino,R., Armstrong,D., and Olinsky,A. (2003) *Pseudomonas* cross-infection from cystic fibrosis patients to non-cystic fibrosis patients: implications for inpatient care of respiratory patients. *J Clin Microbiol* **41**: 5741.

Rodríguez-Rojas,A., Mena,A., Martin,S., Borrell,N., Oliver,A., and Blazquez,J. (2009) Inactivation of the *hmgA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection. *Microbiology* **155**: 1050-1057.

Rohmer,L., Hocquet,D., and Miller,S.I. (2011) Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* **19**: 341-348.

Rommens,J.M., Iannuzzi,M.C., Kerem,B., Drumm,M.L., Melmer,G., Dean,M. *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059-1065.

Rose,M.S., Smith,L.L., and Wyatt,I. (1976) The relevance of pentose phosphate pathway stimulation in rat lung to the mechanism of paraquat toxicity. *Biochem Pharmacol* **25**: 1763-1767.

Rottner,M., Tual-Chalot,S., Mostefai,H.A., Andriantsitohaina,R., Freyssinet,J.M., and Martinez,M.C. (2011) Increased oxidative stress induces apoptosis in human cystic fibrosis cells. *PLoS One* **6**: e24880.

Rowe,S.M., Miller,S., and Sorscher,E.J. (2005) Cystic fibrosis. *N Engl J Med* **352**: 1992-2001.

Roy,P.H. (1999) Horizontal transfer of genes in bacteria. *Microbiology Today* **26**: 168-171.

Ryall,B., Davies,J.C., Wilson,R., Shoemark,A., and Williams,H.D. (2008) *Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients. *Eur Respir J* **32**: 740-747.

Sabatti,C., Rohlin,L., Oh,M.K., and Liao,J.C. (2002) Co-expression pattern from DNA microarray experiments as a tool for operon prediction. *Nucleic Acids Res* **30**: 2886-2893.

Sabra,W., Kim,E.J., and Zeng,A.P. (2002) Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology* **148**: 3195-3202.

Sadikot,R.T., Blackwell,T.S., Christman,J.W., and Prince,A.S. (2005) Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **171**: 1209-1223.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T. *et al.* (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Salunkhe,P., Wiehlmann,L., Lauber,J., Buer,J., and Tümmler,B. (2002) GeneChip Expression Analysis of the Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Paraquat-Induced Superoxide Stress. *Genome Letters* **1**: 165-174.

Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez,C.J., Mende,K., Beckius,M.L., Akers,K.S., Romano,D.R., Wenke,J.C., and Murray,C.K. (2013) Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* **13**: 47.

Santiviago,C.A., Fuentes,J.A., Bueno,S.M., Trombert,A.N., Hildago,A.A., Socias,L.T. *et al.* (2002) The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Mol Microbiol* **46**: 687-698.

Sato,H., Frank,D.W., Hillard,C.J., Feix,J.B., Pankhaniya,R.R., Moriyama,K. *et al.* (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **22**: 2959-2969.

Sato,H., Okinaga,K., and Saito,H. (1988) Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection. *Microbiol Immunol* **32**: 131-139.

Sauer,K., Camper,A.K., Ehrlich,G.D., Costerton,J.W., and Davies,D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140-1154.

Schaber,J.A., Carty,N.L., McDonald,N.A., Graham,E.D., Cheluvappa,R., Griswold,J.A., and Hamood,A.N. (2004) Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **53**: 841-853.

Schaber,J.A., Hammond,A., Carty,N.L., Williams,S.C., Colmer-Hamood,J.A., Burrowes,B.H. *et al.* (2007) Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **56**: 738-748.

Schade,S.Z., Adler,J., and Ris,H. (1967) How bacteriophage chi attacks motile bacteria. *J Virol* **1**: 599-609.

Schägger,H., and Jagow,G.v. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**: 223-231.

Schmidt,H., and Hensel,M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.

Schobert,M., and Jahn,D. (2010) Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**: 549-556.

Schölmerich,J., Burdach,S., Drexler,H., Hallek,M., Hiddemann,W., Hörl,W.H. *et al.* (2005) Medizinische Therapie 2005/2006. Springer London, Limited.

Schreiber,R., Nitschke,R., Greger,R., and Kunzelmann,K. (1999) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J Biol Chem* **274**: 11811-11816.

Schulte,M., and Michel,A. (2006) Vergleichende Nutzenbetrachtung ausgewählter Breitbandherbizide. *Journal of Plant Diseases and Protection* **XX**: 667-674.

Schultz,D.R., and Miller,K.D. (1974) Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect Immun* **10**: 128-135.

Schuster,M., and Greenberg,E.P. (2007) Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics* **8**: 287.

Schuster,M., Lostroh,C.P., Ogi,T., and Greenberg,E.P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**: 2066-2079.

Schwarzmann,S., and Boring,J.R. (1971) Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **3**: 762-767.

Schweizer,H.P., Klassen,T.R., and Hoang,T.T. (1996) Improved methods for gene analysis and expression in *Pseudomonas*. In Molecular Biology of Pseudomonas. Nardocci,G., Furukawa,K., Haas,D., and Silver,S. (eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 229-237.

Sciara,G., Kendrew,S.G., Miele,A.E., Marsh,N.G., Federici,L., Malatesta,F. *et al.* (2003) The structure of ActVA-Orf6, a novel type of monooxygenase involved in actinorhodin biosynthesis. *EMBO J* **22**: 205-215.

Selsted,M.E., and Ouellette,A.J. (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* **6**: 551-557.

Semmler,A.B., Whitchurch,C.B., and Mattick,J.S. (1999) A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **145 Pt 10**: 2863-2873.

Sezonov,G., Joseleau-Petit,D., and D'Ari,R. (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* **189**: 8746-8749.

Shaver,C.M., and Hauser,A.R. (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* **72**: 6969-6977.

Sheppard,D.N., and Welsh,M.J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* **79**: S23-S45.

Shi,F., Li,Y., Li,Y., and Wang,X. (2009) Molecular properties, functions, and potential applications of NAD kinases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **41**: 352-361.

Shrout,J.D., Chopp,D.L., Just,C.L., Hentzer,M., Givskov,M., and Parsek,M.R. (2006) The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**: 1264-1277.

Shumaker,H., Amlal,H., Ulrich,C.D., and Soleimani,M. (1999) CFTR drives Na^{+}-*n*HCO^{-3} cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective HCO^{-3} secretion in CF. *Am J Physiol* **276**: C16-C25.

Siguier,P., Filee,J., and Chandler,M. (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr Opin Microbiol* **9**: 526-531.

Sikkens,E.C., Cahen,D.L., Kuipers,E.J., and Bruno,M.J. (2010) Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **24**: 337-347.

Silo-Suh,L., Suh,S.J., Phibbs,P.V., and Ohman,D.E. (2005) Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung environment can include deregulation of *zwf*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Bacteriol* **187**: 7561-7568.

Singh,R., Lemire,J., Mailloux,R.J., and Appanna,V.D. (2008) A novel strategy involved in [corrected] anti-oxidative defense: the conversion of NADH into NADPH by a metabolic network. *PLoS One* **3**: e2682.

Singh,R., Mailloux,R.J., Puiseux-Dao,S., and Appanna,V.D. (2007) Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **189**: 6665-6675.

Skaar,E.P. (2010) The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog* **6**: e1000949.

Skiada,A., Markogiannakis,A., Plachouras,D., and Daikos,G.L. (2011) Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **37**: 187-193.

Smith,E.E., Buckley,D.G., Wu,Z., Saenphimmachak,C., Hoffman,L.R., D'Argenio,D.A. *et al.* (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8487-8492.

Smith,L.L. (1986) The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Annu Rev Physiol* **48**: 681-692.

Smith,M.J., Efthimiou,J., Hodson,M.E., and Batten,J.C. (1984) Mycobacterial isolations in young adults with cystic fibrosis. *Thorax* **39**: 369-375.

Smolková,K., and Jezek,P. (2012) The Role of Mitochondrial NADPH-Dependent Isocitrate Dehydrogenase in Cancer Cells. *Int J Cell Biol* **2012**: 273947.

Soberón-Chávez,G., Lépine,F., and Déziel,E. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 718-725.

Somerville,G.A., Chaussee,M.S., Morgan,C.I., Fitzgerald,J.R., Dorward,D.W., Reitzer,L.J., and Musser,J.M. (2002) *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. *Infect Immun* **70**: 6373-6382.

Somerville,G.A., and Proctor,R.A. (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 233-248.

Song,H., Hwang,J., Yi,H., Ulrich,R.L., Yu,Y., Nierman,W.C., and Kim,H.S. (2010) The early stage of bacterial genome-reductive evolution in the host. *PLoS Pathog* **6**: e1000922.

Songer,J.G. (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* **5**: 156-161.

Southern,E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.

Späth,I. (2009) Pseudomonas. In Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Darai,G., Handermann,M., Sonntag,H.G., Tidona,C.A., and Zöller,L. (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 683-685.

Speert,D.P., Campbell,M.E., Henry,D.A., Milner,R., Taha,F., Gravelle,A. *et al.* (2002) Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med* **166**: 988-993.

Speert,D.P., Lawton,D., and Damm,S. (1982) Communicability of *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis summer camp. *J Pediatr* **101**: 227-228.

Spencer,D.H., Kas,A., Smith,E.E., Raymond,C.K., Sims,E.H., Hastings,M. *et al.* (2003) Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**: 1316-1325.

Sriramulu,D.D., Lunsdorf,H., Lam,J.S., and Romling,U. (2005) Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol* **54**: 667-676.

Stanier,R.Y., Palleroni,N.J., and Doudoroff,M. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**: 159-271.

Stanislavsky,E.S., and Lam,J.S. (1997) *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 243-277.

Stapleton,M.J., Jagger,K.S., and Warren,R.L. (1984) Transposon mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* exoprotease genes. *J Bacteriol* **157**: 7-12.

Starkey,M., Hickman,J.H., Ma,L., Zhang,N., de Long,S., Hinz,A. *et al.* (2009) *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* **191**: 3492-3503.

Steinmetz,I. (2012) Nichtfermentierende Bakterien (Nonfermenter): *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*. In Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Hahn,H., Burchard,G.D., Kaufmann,S.H., and Schulz,T.F. (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 265-274.

Stoodley,P., Lewandowski,Z., Boyle,J.D., and Lappin-Scott,H.M. (1999) The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environ Microbiol* **1**: 447-455.

Stover,C.K., Pham,X.Q., Erwin,A.L., Mizoguchi,S.D., Warrener,P., Hickey,M.J. *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

Strandvik,B. (1988) Antibiotic therapy of pulmonary infections in cystic fibrosis. Dosage schedules and duration of treatment. *Chest* **94**: 146S-149S.

Suh,S.J., Silo-Suh,L., Woods,D.E., Hassett,D.J., West,S.E., and Ohman,D.E. (1999) Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 3890-3897.

Sundin,G.W. (2007) Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 129-151.

Suntres,Z.E. (2002) Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* **180**: 65-77.

Suntres,Z.E., Omri,A., and Shek,P.N. (2002) *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury: role of oxidative stress. *Microb Pathog* **32**: 27-34.

Taccetti,G., Campana,S., Neri,A.S., Boni,V., and Festini,F. (2008) Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Chemother* **20**: 166-169.

Taddei,F., Radman,M., Maynard-Smith,J., Toupance,B., Gouyon,P.H., and Godelle,B. (1997) Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **387**: 700-702.

Tamber,S., and Hancock,R.E. (2003) On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. *Front Biosci* **8**: s472-s483.

Tamber,S., Ochs,M.M., and Hancock,R.E. (2006) Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 45-54.

Tang,H.B., Di Mango,E., Bryan,R., Gambello,M., Iglewski,B.H., and Goldberg,J.B. (1996) Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* **64**: 37-43.

Tang,J.K., You,L., Blankenship,R.E., and Tang,Y.J. (2012) Recent advances in mapping environmental microbial metabolisms through ^{13}C isotopic fingerprints. *J R Soc Interface* **9**: 2767-2780.

Tang,Y., and Guest,J.R. (1999) Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. *Microbiology* **145 Pt 11**: 3069-3079.

Tang,Y., Guest,J.R., Artymiuk,P.J., and Green,J. (2005) Switching aconitase B between catalytic and regulatory modes involves iron-dependent dimer formation. *Mol Microbiol* **56**: 1149-1158.

Tang,Y., Guest,J.R., Artymiuk,P.J., Read,R.C., and Green,J. (2004) Post-transcriptional regulation of bacterial motility by aconitase proteins. *Mol Microbiol* **51**: 1817-1826.

Tang,Y., Quail,M.A., Artymiuk,P.J., Guest,J.R., and Green,J. (2002) *Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of *sodA* expression. *Microbiology* **148**: 1027-1037.

Tashiro,Y., Yawata,Y., Toyofuku,M., Uchiyama,H., and Nomura,N. (2013) Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes Environ* **28**: 13-24.

Tate,S., MacGregor,G., Davis,M., Innes,J.A., and Greening,A.P. (2002) Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* **57**: 926-929.

Tateda,K., Ishii,Y., Hirakata,Y., Matsumoto,T., Ohno,A., and Yamaguchi,K. (1994) Profiles of outer membrane proteins and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* grown in the presence of sub-

MICs of macrolide antibiotics and their relation to enhanced serum sensitivity. *J Antimicrob Chemother* **34**: 931-942.

Termine,E., and Michel,G.P. (2009) Transcriptome and secretome analyses of the adaptive response of *Pseudomonas aeruginosa* to suboptimal growth temperature. *Int Microbiol* **12**: 7-12.

Thomas,C.M., and Nielsen,K.M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 711-721.

Thorsness,P.E., and Koshland,D.E. (1987) Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate. *J Biol Chem* **262**: 10422-10425.

Tirouvanziam,R., de Bentzmann,S., Hubeau,C., Hinnrasky,J., Jacquot,J., Peault,B., and Puchelle,E. (2000) Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**: 121-127.

Tong,W.H., and Rouault,T.A. (2007) Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis. *Biometals* **20**: 549-564.

Travis,J.M., and Travis,E.R. (2002) Mutator dynamics in fluctuating environments. *Proc Biol Sci* **269**: 591-597.

Trivett,T.L., and Meyer,E.A. (1971) Citrate cycle and related metabolism of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **107**: 770-779.

Troxell,B., and Hassan,H.M. (2013) Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 59.

Tubbs,D., Lenney,W., Alcock,P., Campbell,C.A., Gray,J., and Pantin,C. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: cross-infection and the need for segregation. *Respir Med* **95**: 147-152.

Tupper,A.E., Owen-Hughes,T.A., Ussery,D.W., Santos,D.S., Ferguson,D.J., Sidebotham,J.M. *et al.* (1994) The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*. *EMBO J* **13**: 258-268.

Usher,L.R., Lawson,R.A., Geary,I., Taylor,C.J., Bingle,C.D., Taylor,G.W., and Whyte,M.K. (2002) Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* **168**: 1861-1868.

Valle,C.W., and Vij,N. (2012) Can correcting the DeltaF508-CFTR proteostasis-defect rescue CF lung disease? *Curr Mol Med* **12**: 860-871.

Vallet,I., Diggle,S.P., Stacey,R.E., Camara,M., Ventre,I., Lory,S. *et al.* (2004) Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J Bacteriol* **186**: 2880-2890.

Vallet,I., Olson,J.W., Lory,S., Lazdunski,A., and Filloux,A. (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6911-6916.

Vallet-Gely,I., Donovan,K.E., Fang,R., Joung,J.K., and Dove,S.L. (2005) Repression of phase-variable cup gene expression by H-NS-like proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11082-11087.

van Alst,N.E., Picardo,K.F., Iglewski,B.H., and Haidaris,C.G. (2007) Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **75**: 3780-3790.

van Delden,C., Comte,R., and Bally,A.M. (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 5376-5384.

van der Rest,M.E., Frank,C., and Molenaar,D. (2000) Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 6892-6899.

van der Wauven,C., Pierard,A., Kley-Raymann,M., and Haas,D. (1984) *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* **160**: 928-934.

van Ewijk,B.E., van der Zalm,M.M., Wolfs,T.F., and van der Ent,C.K. (2005) Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **4 Suppl 2**: 31-36.

van Goor,F., Hadida,S., Grootenhuis,P.D., Burton,B., Stack,J.H., Straley,K.S. *et al.* (2011) Correction of the F508del-CFTR protein processing defect *in vitro* by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 18843-18848.

Venturi,V., Rampioni,G., Pongor,S., and Leoni,L. (2011) The virtue of temperance: built-in negative regulators of quorum sensing in *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **82**: 1060-1070.

Verhaeghe,C., Delbecque,K., de Leval,L., Oury,C., and Bours,V. (2007) Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J Cyst Fibros* **6**: 304-308.

Verkman,A.S., Song,Y., and Thiagarajah,J.R. (2003) Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**: C2-15.

Vignal,A., Milan,D., SanCristobal,M., and Eggen,A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* **34**: 275-305.

Vij,N., Mazur,S., and Zeitlin,P.L. (2009) CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One* **4**: e4664.

Vinckx,T., Wei,Q., Matthijs,S., and Cornelis,P. (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. *Microbiology* **156**: 678-686.

Viollier,P.H., Nguyen,K.T., Minas,W., Folcher,M., Dale,G.E., and Thompson,C.J. (2001) Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **183**: 3193-3203.

Vogt,S.L., Green,C., Stevens,K.M., Day,B., Erickson,D.L., Woods,D.E., and Storey,D.G. (2011) The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. *Infect Immun* **79**: 4094-4104.

Wagner,V.E., Frelinger,J.G., Barth,R.K., and Iglewski,B.H. (2006) Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol* **14**: 55-58.

Wallace,W.H., Fleming,J.T., White,D.C., and Sayler,G.S. (1994) An *algD*-bioluminescent reporter plasmid to monitor alginate production in biofilms. *Microbial Ecology* **27**: 225-239.

Ward,C.L., Omura,S., and Kopito,R.R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**: 121-127.

Wargo,M.J., Gross,M.J., Rajamani,S., Allard,J.L., Lundblad,L.K., Allen,G.B. *et al.* (2011) Hemolytic phospholipase C inhibition protects lung function during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* **184**: 345-354.

Webb,J.S., Lau,M., and Kjelleberg,S. (2004) Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**: 8066-8073.

Webber,M.A., and Piddock,L.J. (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **51**: 9-11.

Weber,A.J., Soong,G., Bryan,R., and Saba,S. (2001) Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl^- channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**: L71-L78.

Wei,Q., Tarighi,S., Dötsch,A., Häussler,S., Musken,M., Wright,V.J. *et al.* (2011a) Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant small colony variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **6**: e29276.

Wei,Y., Wang,X., Liu,J., Nememan,I., Singh,A.H., Weiss,H., and Levin,B.R. (2011b) The population dynamics of bacteria in physically structured habitats and the adaptive virtue of random motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4047-4052.

West,N.P., Jungnitz,H., Fitter,J.T., McArthur,J.D., Guzman,C.A., and Walker,M.J. (2000) Role of phosphoglucomutase of *Bordetella bronchiseptica* in lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect Immun* **68**: 4673-4680.

West,S.E., Schweizer,H.P., Dall,C., Sample,A.K., and Runyen-Janecky,L.J. (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**: 81-86.

Westfall,L.W., Carty,N.L., Layland,N., Kuan,P., Colmer-Hamood,J.A., and Hamood,A.N. (2006) *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 247-254.

Whiteley,M., Lee,K.M., and Greenberg,E.P. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13904-13909.

Whiting,P.H., Midgley,M., and Dawes,E.A. (1976) The role of glucose limitation in the regulation of the transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **92**: 304-310.

Wiehlmann,L., Wagner,G., Cramer,N., Siebert,B., Gudowius,P., Morales,G. *et al.* (2007) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8101-8106.

Wilder,C.N., Diggle,S.P., and Schuster,M. (2011) Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the roles of the *las*, *rhl* and *pqs* quorum-sensing systems. *ISME J* **5**: 1332-1343.

Williams,P., and Camara,M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**: 182-191.

Williams,S.G., Greenwood,J.A., and Jones,C.W. (1996) Physiological and biochemical changes accompanying the loss of mucoidy by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **142 Pt 4**: 881-888.

Williams,T. (1997) Evaluation of antimicrobial sensitivity patterns as markers of *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection at a cystic fibrosis clinic. *Br J Biomed Sci* **54**: 181-185.

Wills,P.J. (2007) Inhaled mannitol in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* **16**: 1121-1126.

Wilson,K. (2001) Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 2**: Unit.

Wilson,R., Pitt,T., Taylor,G., Watson,D., MacDermot,J., Sykes,D. *et al.* (1987) Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia *in vitro*. *J Clin Invest* **79**: 221-229.

Winsor,G.L., Lam,D.K., Fleming,L., Lo,R., Whiteside,M.D., Yu,N.Y. *et al.* (2011) *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res* **39**: D596-D600.

Winstanley,C., Langille,M.G., Fothergill,J.L., Kukavica-Ibrulj,I., Paradis-Bleau,C., Sanschagrin,F. *et al.* (2009) Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of *in vivo* competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* **19**: 12-23.

Wolff,J.A., MacGregor,C.H., Eisenberg,R.C., and Phibbs,P.V., Jr. (1991) Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* **173**: 4700-4706.

Wolfgang,M.C., Kulasekara,B.R., Liang,X., Boyd,D., Wu,K., Yang,Q. *et al.* (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8484-8489.

Wood,L.G., Gibson,P.G., and Garg,M.L. (2005) Circulating markers to assess nutritional therapy in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* **353**: 13-29.

Worlitzsch,D., Tarran,R., Ulrich,M., Schwab,U., Cekici,A., Meyer,K.C. *et al.* (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **109**: 317-325.

Wright,D.T., Cohn,L.A., Li,H., Fischer,B., Li,C.M., and Adler,K.B. (1994) Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 10**: 85-90.

Wright,G.D. (2007) On the road to bacterial cell death. *Cell* **130**: 781-783.

Wylie,J.L., and Worobec,E.A. (1995) The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **177**: 3021-3026.

Xiangdong,J., Ming,L., Yijing,Z., Yanjun,R., Guangran,G., Hong,S., and Yuanchao,Z. (2011) Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model. *Hum Exp Toxicol* **30**: 460-469.

Xiao,G., Martinez-Vaz,B., Pan,W., and Khodursky,A.B. (2006) Operon information improves gene expression estimation for cDNA microarrays. *BMC Genomics* **7**: 87.

Xu,Z., Li,L., Shirtliff,M.E., Alam,M.J., Yamasaki,S., and Shi,L. (2009) Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. *J Clin Microbiol* **47**: 230-234.

Yahr,T.L., Vallis,A.J., Hancock,M.K., Barbieri,J.T., and Frank,D.W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13899-13904.

Yasutake,Y., Watanabe,S., Yao,M., Takada,Y., Fukunaga,N., and Tanaka,I. (2002) Structure of the monomeric isocitrate dehydrogenase: evidence of a protein monomerization by a domain duplication. *Structure* **10**: 1637-1648.

Yeung,A.T., Bains,M., and Hancock,R.E. (2011) The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**: 918-931.

Yoon,S.S., and Hassett,D.J. (2004) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis airway disease: metabolic changes that unravel novel drug targets. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2**: 611-623.

Zabner,J., Ramsey,B.W., Meeker,D.P., Aitken,M.L., Balfour,R.P., Gibson,R.L. *et al.* (1996) Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* **97**: 1504-1511.

Zamboni,N., Fendt,S.M., Ruhl,M., and Sauer,U. (2009) (13)C-based metabolic flux analysis. *Nat Protoc* **4**: 878-892.

Zdziarski,J., Brzuszkiewicz,E., Wullt,B., Liesegang,H., Biran,D., Voigt,B. *et al.* (2010) Host imprints on bacterial genomes rapid, divergent evolution in individual patients. *PLoS Pathog* **6**: e1001078.

Zhang,S., McCormack,F.X., Levesque,R.C., O'Toole,G.A., and Lau,G.W. (2007) The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. *PLoS One* **2**: e564.

Zhang,Z., Louboutin,J.P., Weiner,D.J., Goldberg,J.B., and Wilson,J.M. (2005) Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infect Immun* **73**: 7151-7160.

Zhou,H., Luo,M., Cai,X., Tang,J., Niu,S., Zhang,W. *et al.* (2011) Crystal structure of a novel dimer form of FlgD from *P. aeruginosa* PAO1. *Proteins* **79**: 2346-2351.

Ziebach,R., Pietsch-Breitfeld,B., Bichler,M., Busch,A., Riethmuller,J., and Stern,M. (2001) Bronchodilatory effects of salbutamol, ipratropium bromide, and their combination: double-blind, placebo-controlled crossover study in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **31**: 431-435.

Zulianello,L., Canard,C., Köhler,T., Caille,D., Lacroix,J.S., and Meda,P. (2006) Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**: 3134-3147.

8 Anhang

8.1 Phänotypische *Microarrays*™ (Biolog)

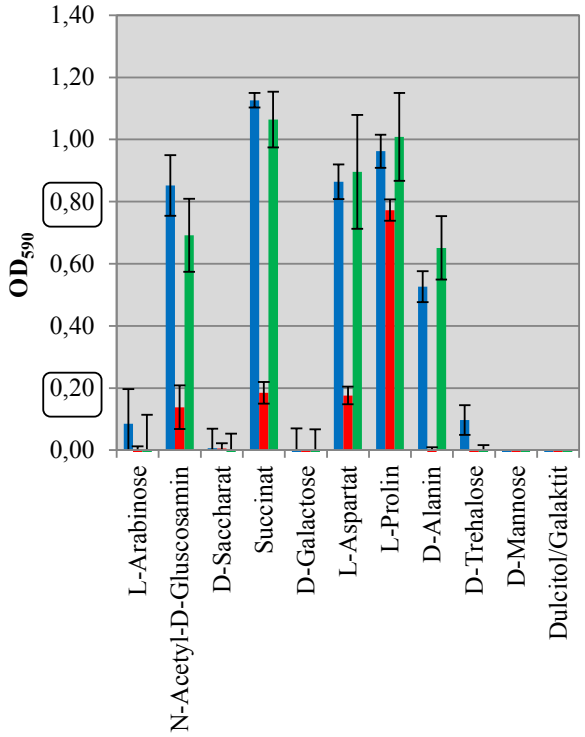
Auf den folgenden Seiten sind die Zusammenstellungen der kommerziellen Biolog-Platten PM1 (8.1.1) und PM3 (8.1.3), die Mikrotiterplatten (PM3) der getesteten Stämme PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm nach 24 h (8.1.4) sowie die gesamten gemessenen Biolog-Daten von allen drei getesteten Stämmen für die Platten PM1 und PM3 gezeigt (8.1.2 und 8.1.5).

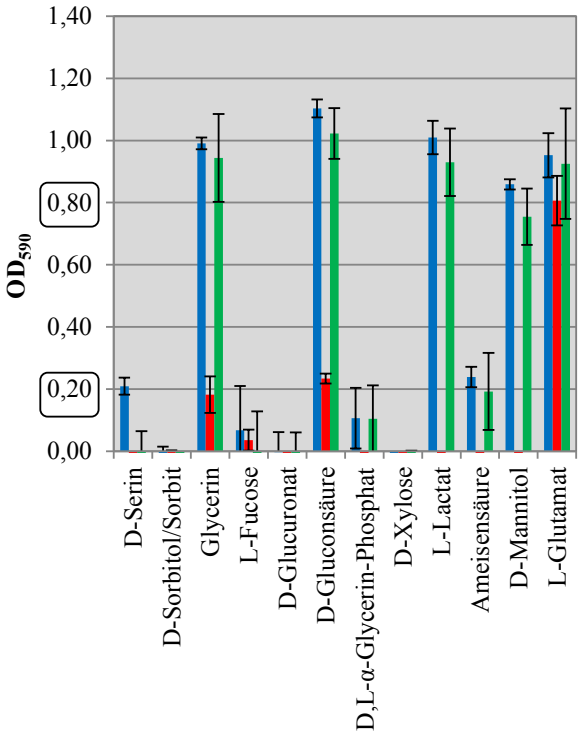
8.1.1 Kohlenstoff-Zusammenstellung der Mikrotiterplatte PM1

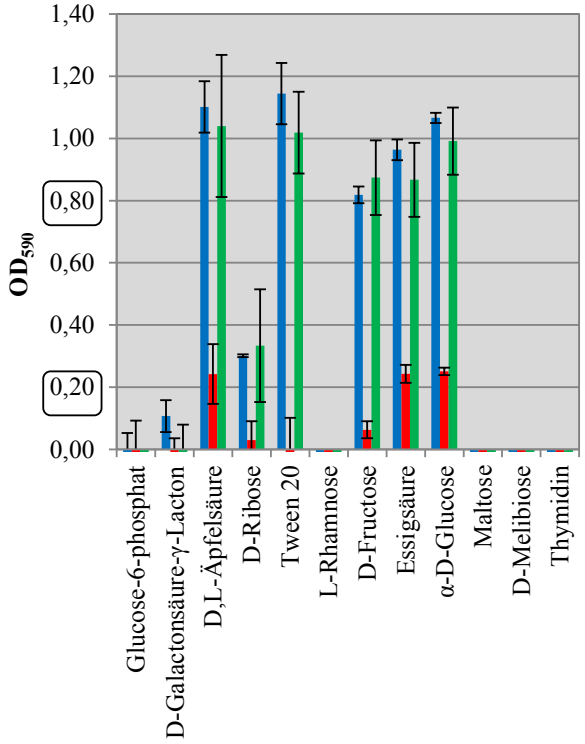
Tabelle 8.1 Mikrotiterplatte PM1 (Kohlenstoffquellen; s. a. www.biolog.com)

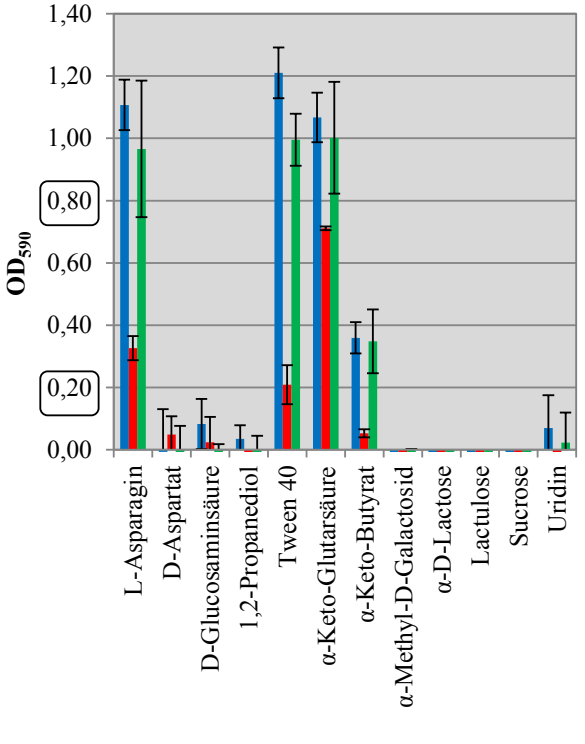
A1 Negative Control	A2 L-Arabinose	A3 N-Acetyl-D-Glucosamine	A4 D-Saccharic Acid	A5 Succinic Acid	A6 D-Galactose	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Proline	A9 D-Alanine	A10 D-Trehalose	A11 D-Mannose	A12 Dulcitol
B1 D-Serine	B2 D-Sorbitol	B3 Glycerol	B4 L-Fucose	B5 D-Glucuronic Acid	B6 D-Gluconic Acid	B7 D,L-α-Glycerol-Phosphate	B8 D-Xylose	B9 L-Lactic Acid	B10 Formic Acid	B11 D-Mannitol	B12 L-Glutamic Acid
C1 D-Glucose-6-Phosphate	C2 D-Galactonic Acid-γ-Lactone	C3 D,L-Malic Acid	C4 D-Ribose	C5 Tween 20	C6 L-Rhamnose	C7 D-Fructose	C8 Acetic Acid	C9 α-D-Glucose	C10 Maltose	C11 D-Melibiose	C12 Thymidine
D-1 L-Asparagine	D2 D-Aspartic Acid	D3 D-Glucosaminic Acid	D4 1,2-Propanediol	D5 Tween 40	D6 α-Keto-Glutaric Acid	D7 α-Keto-Butyric Acid	D8 α-Methyl-D-Galactoside	D9 α-D-Lactose	D10 Lactulose	D11 Sucrose	D12 Uridine
E1 L-Glutamine	E2 M-Tartaric Acid	E3 D-Glucose-1-Phosphate	E4 D-Fructose-6-Phosphate	E5 Tween 80	E6 α-Hydroxy Glutaric Acid-γ-Lactone	E7 α-Hydroxy Butyric Acid	E8 β-Methyl-D-Glucoside	E9 Adonitol	E10 Maltotriose	E11 2-Deoxy Adenosine	E12 Adenosine
F1 Glycyl-L-Aspartic Acid	F2 Citric Acid	F3 M-Inositol	F4 D-Threonine	F5 Fumaric Acid	F6 Bromo Succinic Acid	F7 Propionic Acid	F8 Mucic Acid	F9 Glycolic Acid	F10 Glyoxylic Acid	F11 D-Cellobiose	F12 Inosine
G1 Glycyl-L-Glutamic Acid	G2 Tricarballylic Acid	G3 L-Serine	G4 L-Threonine	G5 L-Alanine	G6 L-Alanyl-Glycine	G7 Acetoacetic Acid	G8 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	G9 Mono Methyl Succinate	G10 Methyl Pyruvate	G11 D-Malic Acid	G12 L-Malic Acid
H1 Glycyl-L-Proline	H2 p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H3 m-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H4 Tyramine	H5 D-Psicose	H6 L-Lyxose	H7 Glucuronamide	H8 Pyruvic Acid	H9 L-Galactonic Acid-γ-Lactone	H10 D-Galacturonic Acid	H11 Phenylethyl-amine	H12 2-Aminoethanol

8.1.2 Verstoffwechselung von C-Quellen (PM1) nach 24 h (Biolog-Experimente)









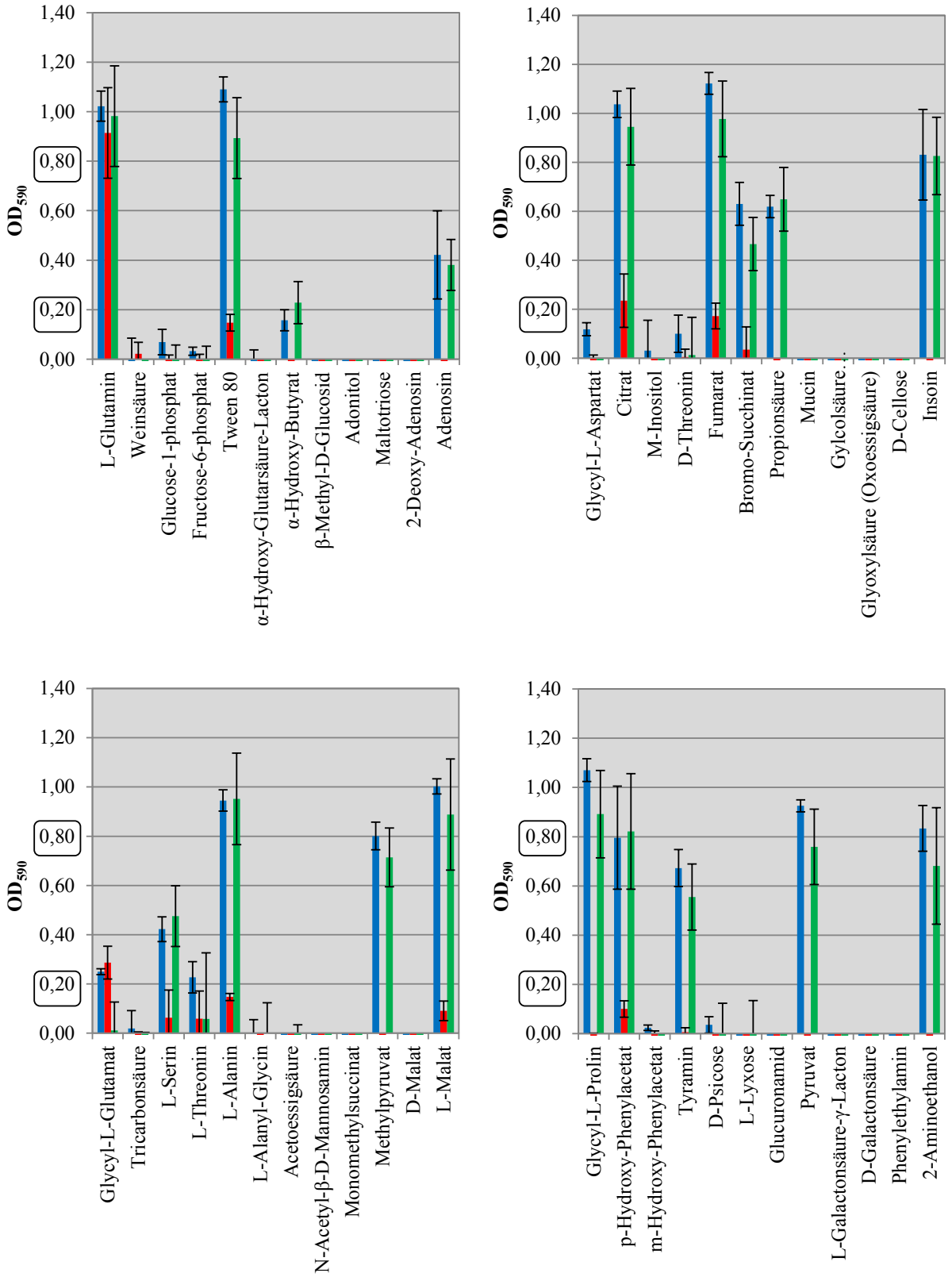


Abbildung 8.1 Verstoffwechselung von C-Quellen (PM1) durch PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm
Insgesamt wurde die Verstoffwechselung von 95 verschiedenen C-Quellen durch die getesteten Stämme PA14 (Blau), PA14Δ*icd*Δ*idh* (Rot) und PA14 *mdh*::Gm (Grün) gemessen. Ein OD_{590}-Wert ≥ 0,8 wurde als eine starke, OD_{590} ≥ 0,2 als eine mittelstarke und OD_{590} < 0,2 als eine schwache oder keine Verstoffwechselung gewertet.

8.1.3 AS- und Stickstoff-Zusammenstellung der Mikrotiterplatte PM3

Tabelle 8.2 Mikrotiterplatte PM3 (AS- und Stickstoffquellen; s. a. www.biolog.com)

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Biuret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
D-1 N-Acetyl-D,L-Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L-Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamine	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 β-Phenylethyl-amine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D-Galactosamine	E10 D-Mannosamine	E11 N-Acetyl-D-Glucosamine	E12 N-Acetyl-D-Galactosamine
F1 N-Acetyl-D-Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Allantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L-α-Amino-N-Butyric Acid	G8 γ-Amino-N-Butyric Acid	G9 ε-Amino-N-Caproic Acid	G10 D,L-α-Amino-Caprylic Acid	G11 δ-Amino-N-Valeric Acid	G12 α-Amino-N-Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

8.1.4 Abbildungen der Mikrotiterplatten (PM3) nach 24 h (Endpunktbestimmung)

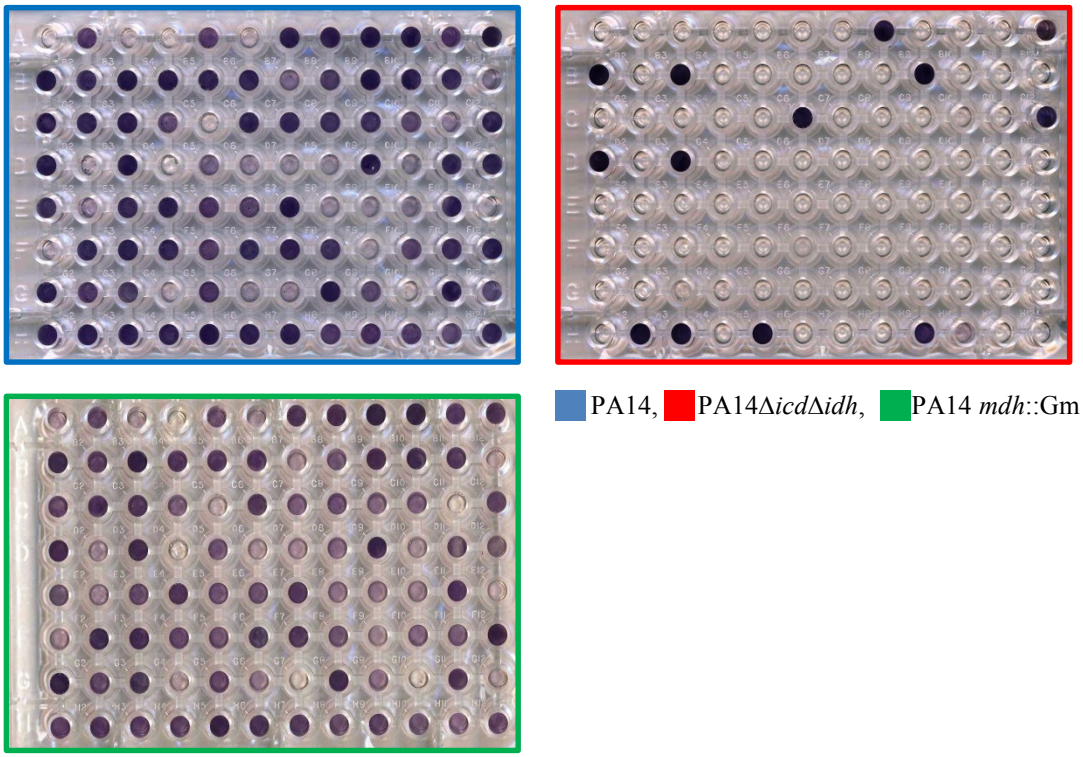
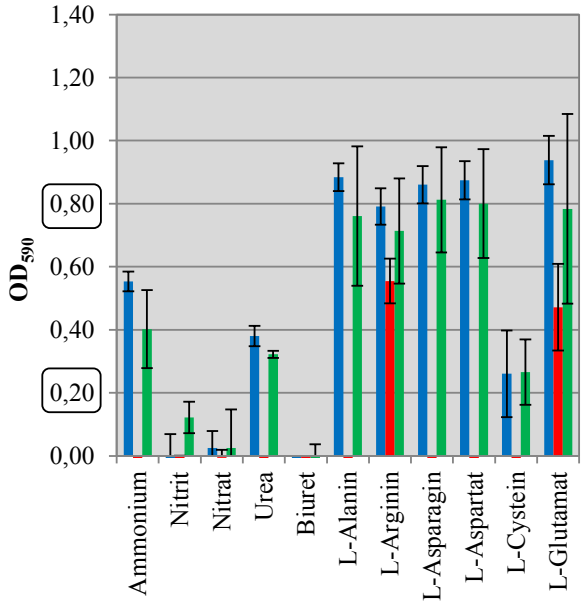
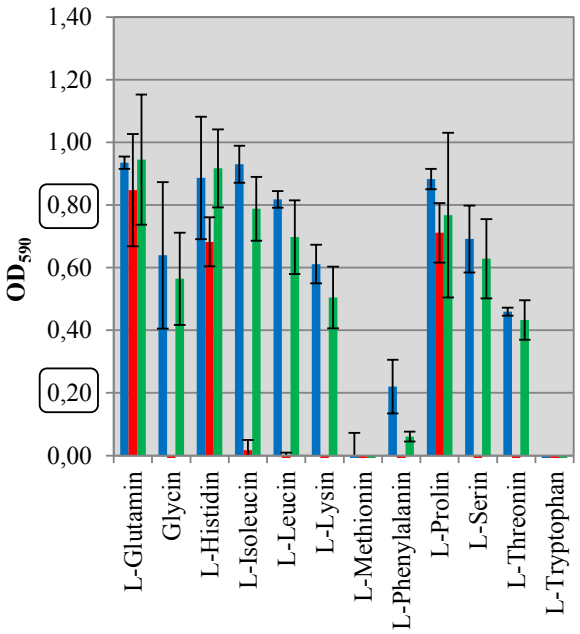
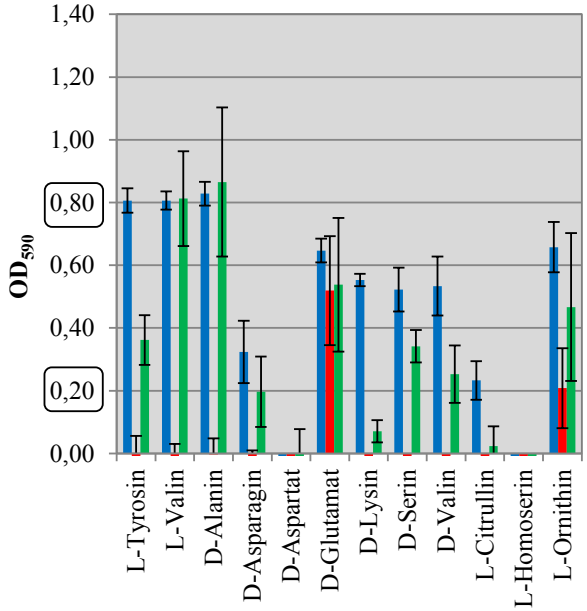


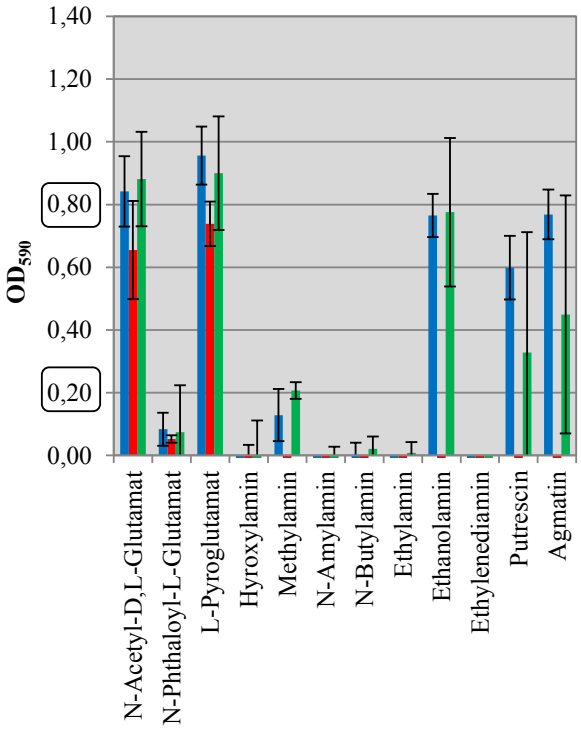
Abbildung 8.2 Mikrotiterplatten (PM3) der Stämme PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm nach 24 h

8.1.5 Verstoffwechselung von AS-/N-Quellen (PM3) nach 24 h (Biolog-Experimente)









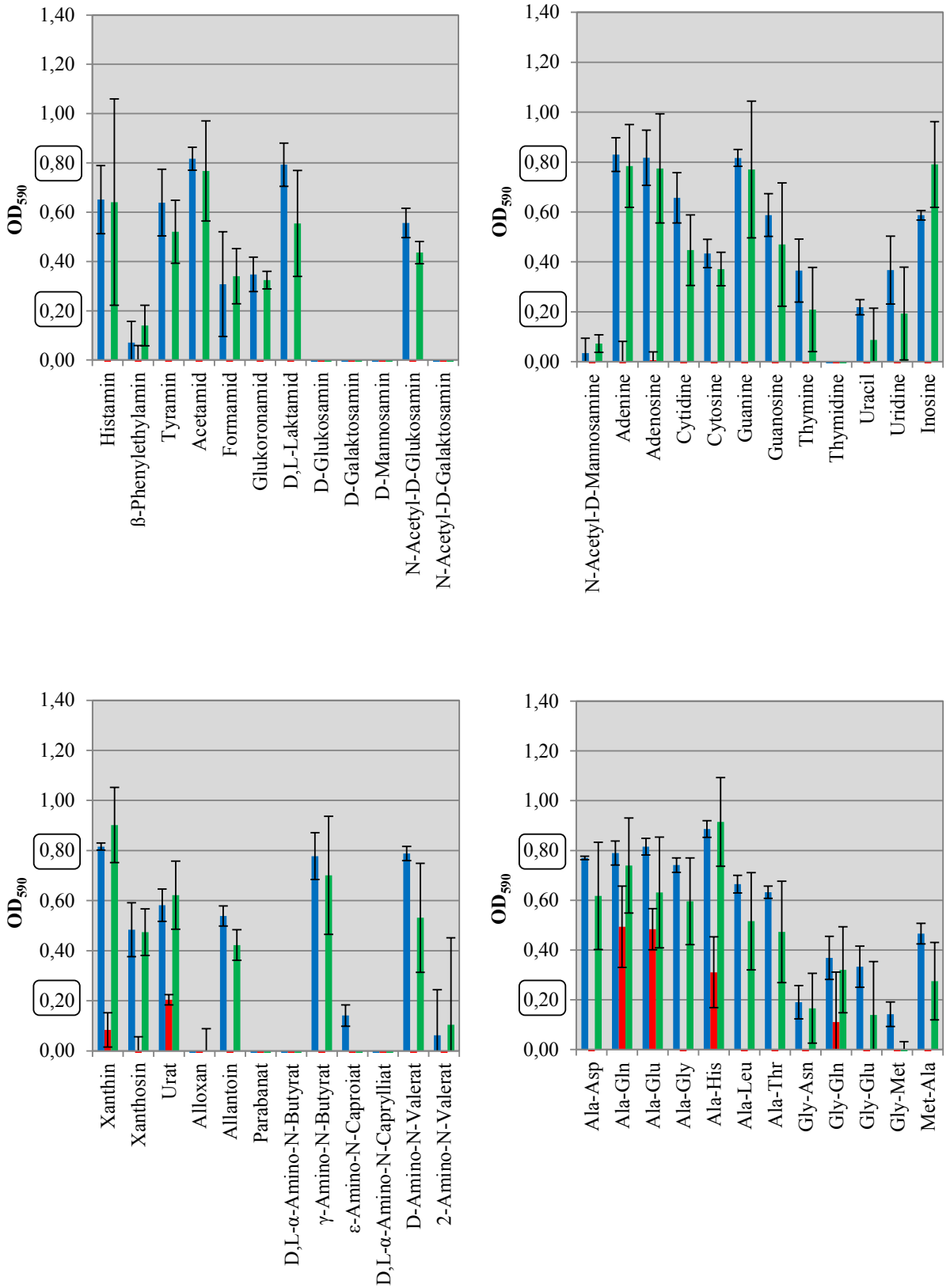


Abbildung 8.3 Verstoffwechselung von AS-/N-Quellen (PM3) durch PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm

Insgesamt wurde die Verstoffwechselung von 95 verschiedenen AS-/N-Quellen durch die getesteten Stämme PA14 (Blau), PA14Δ*icd*Δ*idh* (Rot) und PA14 *mdh*::Gm (Grün) gemessen. Ein OD_{590}-Wert ≥ 0,8 wurde als eine starke, OD_{590} ≥ 0,2 als eine mittelstarke und OD_{590} < 0,2 als eine schwache oder keine Verstoffwechselung gewertet.

8.2 Transkriptom-Daten

In den folgenden Tabellen 8.3 - 8.5 sind die vollständigen Ergebnisse der Transkriptomanalysen dargestellt.

8.2.1 Transkriptomanalysenvergleich zwischen PA14 *icd*::Tn und PA14

Tabelle 8.3 Stärker-(↑) und schwächer(↓)-exprimierten Gene in PA14 *icd*::Tn verglichen zu PA14
In dieser Tabelle sind die Gene aufgelistet, die in PA14 *icd*::Tn verglichen zu PA14 mindestens eine 2-fach veränderte Expression und einen p-Wert ≤ 0,05 aufweisen.

locus tag	gene name	synonym	product	-fold	adj. p-value
Amino acid biosynthesis and metabolism					
PA0036	*trpB*		tryptophan synthase beta chain	4,05↑	0,0008
PA0164			probable gamma-glutamyltranspeptidase	3,02↑	0,0153
Antibiotic resistance and susceptibility					
PA3719	*armR*		antirepressor for MexR, ArmR	4,34↑	0,0398
PA4599	*mexC*		Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux membrane fusion protein MexC precursor	14,81↑	0,0068
Carbon compound catabolism					
PA0265	*gabD*		succinate-semialdehyde dehydrogenase (Class 2)	4,55↑	0,0010
PA0266	*gabT*		4-aminobutyrate aminotransferase	6,67↑	0,0026
PA0297	*spuA*	*ycjL*	probable glutamine amidotransferase	2,82↑	0,0447
PA2776	*pauB3*	*ordL*	FAD-dependent oxidoreductase (Class 2)	11,77↑	0,0033
PA5309	*pauB4*		FAD-dependent oxidoreductase	2,24↑	0,0329
PA5312	*pauC*	*kauB*	Aldehyde dehydrogenase (Class 2)	5,07↑	0,0042
PA5313	*gabT2*	*paaT*	Transaminase (Class 2)	6,98↑	0,0225
PA5522	*pauA6*		Glutamylpolyamine synthetase (Class 1)	2,17↑	0,0195
Energy metabolism					
PA1317	*cyoA*		cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	2,07↑	0,0472
PA1318	*cyoB*		cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	2,37↑	0,0078
PA1319	*cyoC*		cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	2,10↑	0,0013
PA3397	*fpr*		NADP+-dependent ferredoxin reductase	4,14↑	0,0455
Hypothetical, unclassified, unknown					
PA5314			hypothetical protein (Class 4)	3,09↑	0,0096
Membrane proteins					
PA2026		*yfeH*	conserved hypothetical protein	2,78↑	0,0363
PA3431		*ywbG*	conserved hypothetical protein (Class 4)	3,10↑	0,0034
Putative enzymes					
PA1137			probable oxidoreductase (Class 3)	9,36↑	0,0348
PA4131			probable iron-sulfur protein	2,57↑	0,0391
Transcriptional regulators					
PA1283			probable transcriptional regulator	5,89↑	0,0027
PA4600	*nfxB*		transcriptional regulator NfxB (Class 1)	6,99↑	0,0009
PA4878			probable transcriptional regulator	3,79↑	0,0006
Transport of small molecules					
PA1549		*fixI*	probable cation-transporting P-type ATPase	2,03↑	0,0009
PA3523			probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein precursor	3,52↑	0,0068
PA3610	*potD*		polyamine transport protein PotD	3,37↑	0,0019
PA3920		*yvgX*	probable metal transporting P-type ATPase	7,38↑	0,0010
PA4206	*mexH*	*mexH*	probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein precursor	2,29↑	0,0191
PA4770	*lldP*	*lctP*	L-lactate permease (Class 2)	8,60↑	0,0455
Adaptation, Protection					
PA0867	*mliC*		membrane-bound lysozyme inhibitor of c-type lysozyme MliC	2,99↓	0,0309
PA5372	*betA*		choline dehydrogenase	2,29↓	0,0322

Amino acid biosynthesis and metabolism					
PA0896	*aruF*		arginine/ornithine succinyltransferase AI subunit	2,13↓	0,0378
PA1337	*ansB*	*pga*	glutaminase-asparaginase	4,35↓	0,0150
PA1421	*gbuA*	*speB2*	guanidinobutyrase	6,04↓	0,0013
PA4695	*ilvH*			2,09↓	0,0437
Carbon compound catabolism					
PA0129	bauD		Amino acid permease	3,20↓	0,0078
PA0131	*bauB*		hypothetical protein	2,55↓	0,0010
PA0795	*prpC*		citrate synthase 2	11,78↓	0,0148
PA0796	*prpB*	*bcpA*	carboxyphosphonoenolpyruvate phosphonomutase	3,69↓	0,0350
PA1950	*rbsK*		ribokinase	4,50↓	0,0356
PA2011	*liuE*	*mvaB*; *gnyL*	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase	4,32↓	0,0045
PA2013	*liuC*	*menB*; *gnyH*	putative 3-methylglutaconyl-CoA hydratase	8,12↓	0,0006
PA2014	*liuB*	*gnyB*	methylcrotonyl-CoA carboxylase, beta-subunit	7,32↓	0,0078
PA2015	*liuA*	*gnyD*; *ivd*	putative isovaleryl-CoA dehydrogenase, Citronelloyl-CoA dehydrogenase, GnyD	3,28↓	0,0463
PA5508	*pauA7*		Glutamylpolyamine synthetase homologue	3,42↓	0,0182
Cell wall /LPS/capsule					
PA5448	*wbpY*		glycosyltransferase WbpY	4,49↓	0,0078
Central intermediary metabolism					
PA1338	*ggt*		gamma-glutamyltranspeptidase precursor	5,99↓	0,0003
PA4865	*ureA*		urease gamma subunit	4,04↓	0,0303
DNA replication, recombination, modification and repair					
PA5348			probable DNA-binding protein	12,16↓	0,0459
Energy metabolism					
PA0794			probable aconitate hydratase	3,37↓	0,0113
PA2623	*icd*	*icdA*	isocitrate dehydrogenase	5,04↓	0,0350
Fatty acid and phospholipid metabolism					
PA2557			probable AMP-binding enzyme	4,20↓	0,0000
Hypothetical, unclassified, unknown					
PA0793			hypothetical protein	3,20↓	0,0113
PA1420			hypothetical protein	4,21↓	0,0082
PA1618		*ybdB*	conserved hypothetical protein	2,25↓	0,0056
PA3270			hypothetical protein	2,56↓	0,0320
PA3836			hypothetical protein	3,02↓	0,0148
PA4773			hypothetical protein	5,02↓	0,0011
PA4782			hypothetical protein	2,19↓	0,0034
PA5347			hypothetical protein	2,10↓	0,0019
PA5455			hypothetical protein	2,52↓	0,0102
PA5457			hypothetical protein	2,08↓	0,0019
PA5459			hypothetical protein	2,63↓	0,0001
PA5507			hypothetical protein	3,02↓	0,0344
PA5509			hypothetical protein	8,16↓	0,0257
Membrane proteins					
PA0751			conserved hypothetical protein	2,40↓	0,0357
PA3235		*yjcH*	conserved hypothetical protein	35,37↓	0,0231
PA5442			conserved hypothetical protein	2,94↓	0,0000
Putative enzymes					
PA0473		*psfA*	probable glutathione S-transferase	2,86↓	0,0271
PA2553			probable acyl-CoA thiolase	7,53↓	0,0037
PA2554			probable short-chain dehydrogenase	5,11↓	0,0034
PA3295			probable HIT family protein	2,68↓	0,0296
Transcriptional regulators					
PA1285			probable transcriptional regulator	2,03↓	0,0363
PA1760			probable transcriptional regulator	2,26↓	0,0271
PA1949	*rbsR*		ribose operon repressor RbsR	2,73↓	0,0455
PA4787			probable transcriptional regulator	2,18↓	0,0363
Translation, post-translational modification, degradation					
PA3049	*rmf*		ribosome modulation factor	4,00↓	0,0258
Transport of small molecules					
PA0789			probable amino acid permease	5,51↓	0,0289
PA0958	*oprD*		Basic amino acid, basic peptide and imipenem outer membrane porin OprD precursor	3,44↓	0,0348
PA1070	*braG*		branched-chain amino acid transport protein BraG	4,80↓	0,0348

PA1071	*braF*		branched-chain amino acid transport protein BraF	3,42↓	0,0329
PA1072	*braE*		branched-chain amino acid transport protein BraE	3,81↓	0,0012
PA1073	*braD*		branched-chain amino acid transport protein BraD	4,57↓	0,0009
PA1339			amino acid ABC transporter ATP binding protein	2,42↓	0,0148
PA1340			amino acid ABC transporter membrane protein	3,57↓	0,0007
PA1341			amino acid ABC transporter membrane protein	2,14↓	0,0008
PA1342			probable binding protein component of ABC transporter	7,77↓	0,0455
PA1948	*rbsC*		membrane protein component of ABC ribose transporter	2,37↓	0,0394
PA2533			probable sodium:alanine symporter	5,17↓	0,0012
PA3038		*opdQ*	probable porin	17,28↓	0,0148
PA3186	*oprB*		Glucose/carbohydrate outer membrane porin OprB precursor	8,04↓	0,0010
PA3187		*gltK*	probable ATP-binding component of ABC transporter	14,80↓	0,0000
PA3188		*gltG*	probable permease of ABC sugar transporter	45,19↓	0,0000
PA3189		*gltF*	probable permease of ABC sugar transporter	17,71↓	0,0000
PA3190		*gltB*	probable binding protein component of ABC sugar transporter	9,81↓	0,0000
PA3234		*yjcG*	probable sodium:solute symporter	26,14↓	0,0225
PA3838			probable ATP-binding component of ABC transporter	3,50↓	0,0072
PA4225	*pchF*		pyochelin synthetase	2,17↓	0,0115
PA4230	*pchB*		salicylate biosynthesis protein PchB	3,67↓	0,0012
PA4496			probable binding protein component of ABC transporter	7,38↓	0,0329
PA4504		*dppC*	probable permease of ABC transporter	9,49↓	0,0472
PA4505		*dppD*	probable ATP-binding component of ABC transporter	3,25↓	0,0459
PA4506		*dppF*	probable ATP-binding component of ABC dipeptide transporter	9,38↓	0,0214
PA5153			amino acid (lysine/arginine/ornithine/histidine/octopine) ABC transporter periplasmic binding protein	8,75↓	0,0455
PA5154			probable permease of ABC transporter	15,39↓	0,0148
PA5155			amino acid (lysine/arginine/ornithine/histidine/octopine) ABC transporter membrane protein	7,60↓	0,0182
PA5375	*betT1*		choline transporter BetT	2,57↓	0,0003
PA5451	*wzm*		membrane subunit of A-band LPS efflux transporter	4,14↓	0,0447
Two-component regulatory systems					
PA1992	*ercS*		ErcS	2,81↓	0,0078
PA4776	*pmrA*		two-component regulator system response regulator PmrA	2,23↓	0,0231

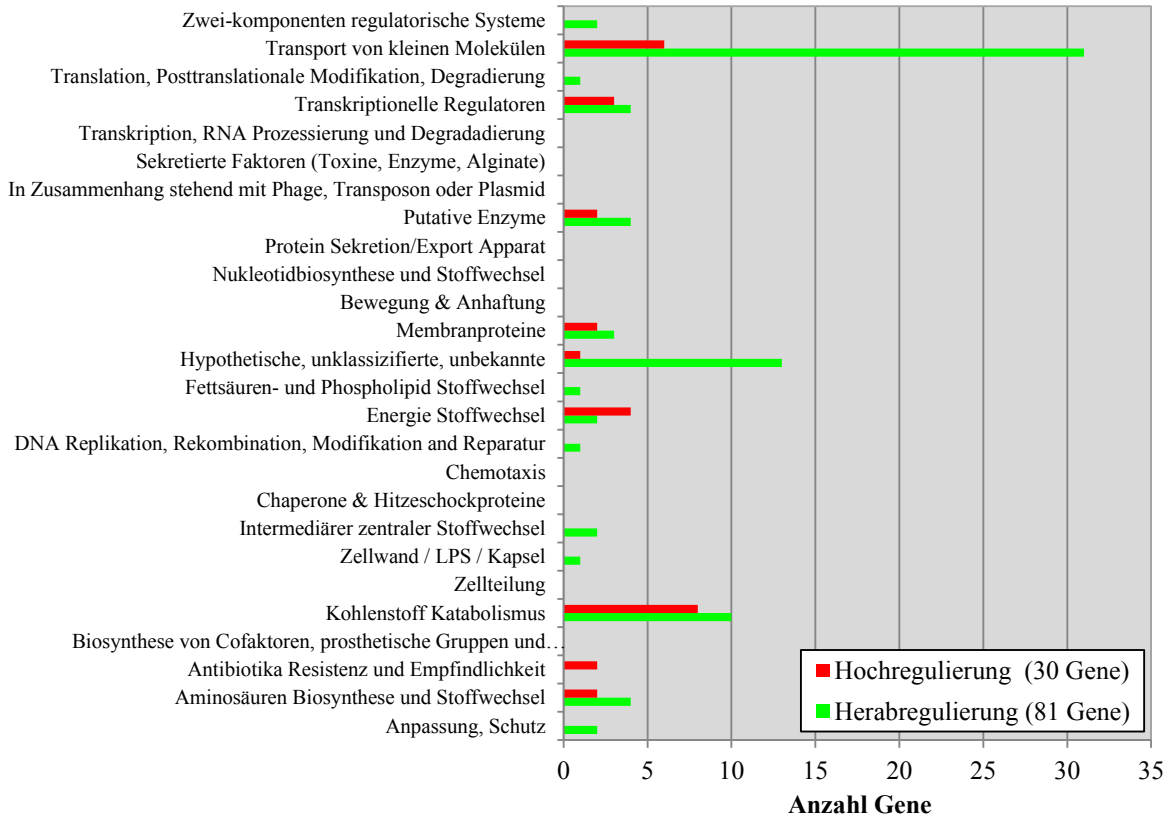


Abbildung 8.4 Transkriptomübersicht beim Vergleich von PA14*icd*::Tn mit PA14
Insgesamt waren 111 Gene in PA14 *icd*::Tn im Vergleich zu PA14 in der Genexpression verändert, wobei der größte Teil der Transkripte erniedrigt war.

8.2.2 Transkriptomanalysenvergleich zwischen PA14 *idh*::Tn und PA14

Tabelle 8.4 Stärker-(↑) und schwächer(↓)-exprimierten Gene in PA14 *idh*::Tn verglichen zu PA14
In dieser Tabelle sind die Gene aufgelistet, die in PA14 *idh*::Tn verglichen zu PA14 mindestens eine 2-fach veränderte Expression und einen p-Wert ≤ 0,05 aufweisen.

locus tag	gene name	synonym	product	-fold	adj. p-value
Carbon compound catabolism					
PA0265	*gabD*		succinate-semialdehyde dehydrogenase (Class 2)	4,94↑	0,0024
PA0266	*gabT*		4-aminobutyrate aminotransferase	7,98↑	0,0042
PA2776	*pauB3*	*ordL*	FAD-dependent oxidoreductase (Class 2)	14,81↑	0,0049
PA5309	*pauB4*		FAD-dependent oxidoreductase	2,81↑	0,0239
PA5312	*pauC*	*kauB*	Aldehyde dehydrogenase (Class 2)	6,97↑	0,0039
PA5313	*gabT2*	*paaT*	Transaminase (Class 2)	10,54↑	0,0208
PA5522	*pauA6*		Glutamylpolyamine synthetase (Class 1)	2,44↑	0,0242
Hypothetical, unclassified, unknown					
PA4452			conserved hypothetical protein	2,09↑	0,0178
PA5314			hypothetical protein (Class 4)	4,27↑	0,0056
Transcriptional regulators					
PA1283			probable transcriptional regulator	8,03↑	0,0034
PA4600	*nfxB*		transcriptional regulator NfxB (Class 1)	4,31↑	0,0124
PA4878			probable transcriptional regulator	8,96↑	0,0000
Transport of small molecules					
PA3523			probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein precursor	6,89↑	0,0017
PA3610	*potD*		polyamine transport protein PotD	3,61↑	0,0039
PA3920		*yvgX*	probable metal transporting P-type ATPase	11,32↑	0,0009
PA4770	*lldP*	*lctP*	L-lactate permease (Class 2)	21,85↑	0,0200
Carbon compound catabolism					
PA0129	*bauD*		Amino acid permease	3,13↓	0,0239
PA0131	*bauB*		hypothetical protein	2,58↓	0,0027
PA2011	*liuE*	*mvaB*; *gnyL*	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase	3,56↓	0,0281
PA2013	*liuC*	*menB*; *gnyH*	putative 3-methylglutaconyl-CoA hydratase	5,72↓	0,0037
Central intermediary metabolism					
PA1338	*ggt*		gamma-glutamyltranspeptidase precursor	5,61↓	0,0009
Fatty acid and phospholipid metabolism					
PA2557			probable AMP-binding enzyme	4,20↓	0,0000
Hypothetical, unclassified, unknown					
PA0026	*plcB*		phospholipase C, PlcB	2,07↓	0,0027
PA1618		*ybdB*	conserved hypothetical protein	2,09↓	0,0265
PA3836			hypothetical protein	3,06↓	0,0387
PA5347			hypothetical protein	2,15↓	0,0042
PA5396			hypothetical protein	2,52↓	0,0243
PA5459			hypothetical protein	2,53↓	0,0003
Membrane proteins					
PA5442			conserved hypothetical protein	2,89↓	0,0000
Protein secretion/export apparatus					
PA1705	*pcrG*		regulator in type III secretion	2,49↓	0,0472
PA1706	*pcrV*		type III secretion protein PcrV	3,18↓	0,0037
Putative enzymes					
PA2553			probable acyl-CoA thiolase	7,53↓	0,0108
PA2554			probable short-chain dehydrogenase	5,39↓	0,0078
PA3535		*eprS*	probable serine protease	2,25↓	0,0043
Translation, post-translational modification, degradation					
PA3049	*rmf*		ribosome modulation factor	6,31↓	0,0143
Transport of small molecules					
PA1072	*braE*		branched-chain amino acid transport protein BraE	2,85↓	0,0143
PA1073	*braD*		branched-chain amino acid transport protein BraD	3,64↓	0,0060
PA1339			amino acid ABC transporter ATP binding protein	3,12↓	0,0095
PA1340			amino acid ABC transporter membrane protein	3,40↓	0,0024
PA1341			amino acid ABC transporter membrane protein	2,20↓	0,0018
PA2533			probable sodium:alanine symporter	3,46↓	0,0200
PA3186	*oprB*		Glucose/carbohydrate outer membrane porin OprB	7,55↓	0,0035

		precursor		
PA3187	*gltK*	probable ATP-binding component of ABC transporter	15,56↓	0,0000
PA3188	*gltG*	probable permease of ABC sugar transporter	41,05↓	0,0000
PA3189	*gltF*	probable permease of ABC sugar transporter	16,65↓	0,0000
PA3190	*gltB*	probable binding protein component of ABC sugar transporter	12,00↓	0,0000
PA3838		probable ATP-binding component of ABC transporter	2,99↓	0,0420
PA5375	*betT1*	choline transporter BetT	2,68↓	0,0007
Two-component regulatory systems				
PA1992	*ercS*	ErcS	2,68↓	0,0281

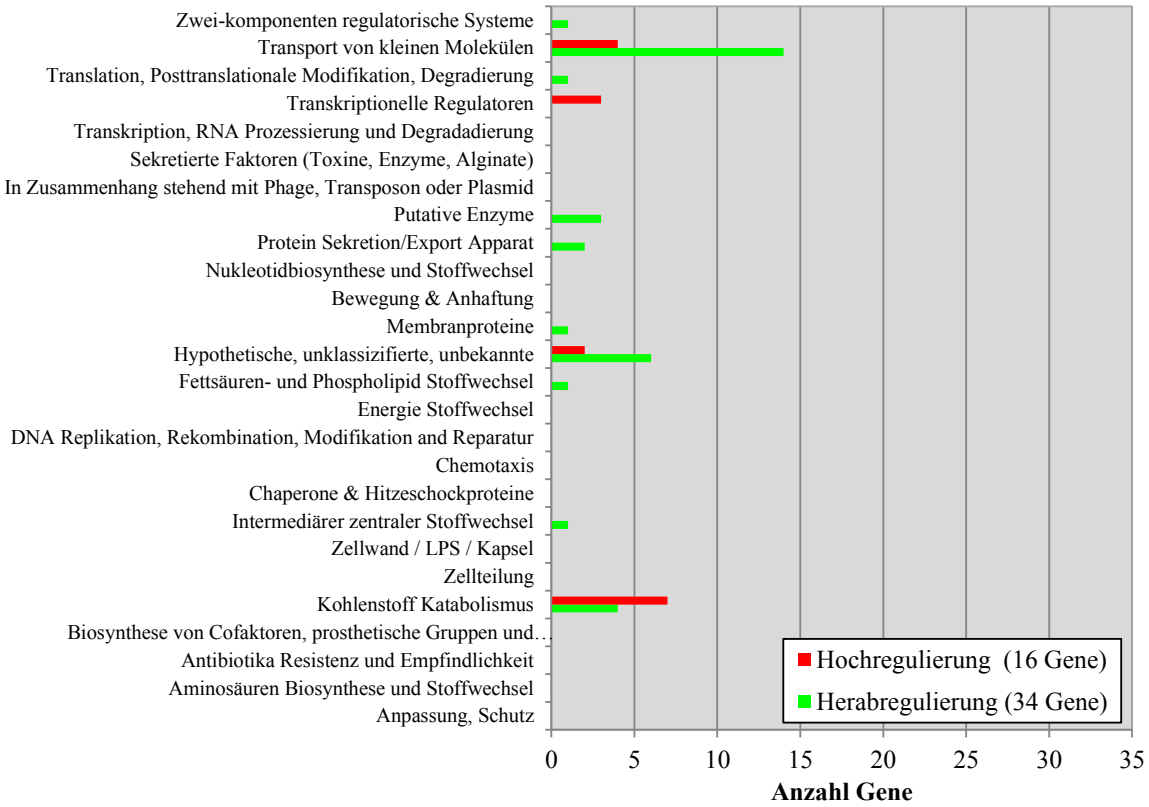


Abbildung 8.5 Transkriptomübersicht beim Vergleich von PA14*idh*::Tn mit PA14
Insgesamt waren 50 Gene in PA14 *idh*::Tn im Vergleich zu PA14 in der Genexpression verändert, wobei ca. 2/3 der Transkripte erniedrigt war.

8.2.3 Transkriptomanalysenvergleich zwischen PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14

Tabelle 8.5 Stärker-(↑) und schwächer(↓)-exprimierten Gene in PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen zu PA14
In dieser Tabelle sind die Gene aufgelistet, die in PA14Δ*icd*Δ*idh* verglichen zu PA14 mindestens eine 2-fach veränderte Expression und einen p-Wert ≤ 0,05 aufweisen.

locus tag	gene name	synonym	product	-fold	adj. p-value
Adaptation, Protection					
PA0950			probable arsenate reductase (Class 3)	2,18↑	0,0379
PA3815	*iscR*		iron-sulfur cluster assembly transcription factor IscR	2,26↑	0,0008
Amino acid biosynthesis and metabolism					
PA0649	*trpG*	*pabA*	anthranilate synthase component II (Class 1)	2,80↑	0,0467
PA3537	*argF*		ornithine carbamoyltransferase, anabolic (Class 1)	2,34↑	0,0324
PA4519	*speC*		ornithine decarboxylase (Class 1)	2,02↑	0,0092
Antibiotic resistance and susceptibility					
PA2019		*amrA*; *mexX*; *mexG*	Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug precursor efflux membrane fusion protein precursor (Class 2)	7,26↑	0,0053
PA5471			hypothetical protein (Class 4)	5,14↑	0,0009
PA5471.1			PA5471 leader peptide (Class 1)		
Carbon compound catabolism					
PA0265	*gabD*		succinate-semialdehyde dehydrogenase (Class 2)	2,95↑	0,0025
PA2776	*pauB3*	*ordL*	FAD-dependent oxidoreductase (Class 2)	6,62↑	0,0045
PA5301	*pauR*	*ycjC*	probable transcriptional regulator (Class 1)	4,06↑	0,0122
PA5312	*pauC*	*kauB*	Aldehyde dehydrogenase (Class 2)	2,33↑	0,0355
PA5313	*gabT2*	*paaT*; *bioA*	Transaminase (Class 2)	6,14↑	0,0092
PA5522	*pauA6*		Glutamylpolyamine synthetase (Class 1)	2,00↑	0,0100
Cell wall/LPS/capsule					
PA2231	*pslA*		PslA (Class 1)	2,52↑	0,0504
PA4625	*cdrA*		cyclic diguanylate-regulated TPS partner A, CdrA (Class 1)	2,23↑	0,0256
Chaperones & heat shock proteins					
PA2132	*cupA5*		chaperone CupA5 (Class 1), probable pili assembly chaperone	4,57↑	0,0039
DNA replication, recombination, modification and repair					
PA4763	*recN*		DNA repair protein RecN (Class 2), recombination protein	4,54↑	0,0028
Hypothetical, unclassified, unknown					
PA0050			hypothetical protein (Class 4)	2,44↑	0,0006
PA0101			hypothetical protein (Class 4)	3,12↑	0,0073
PA0613			hypothetical protein (Class 4)	5,46↑	0,0014
PA0614		*hol*	hypothetical protein (Class 4)	6,98↑	0,0331
PA0670			hypothetical protein (Class 4)	2,38↑	0,0000
PA0907			hypothetical protein (Class 4)	3,23↑	0,0001
PA0911			hypothetical protein (Class 4)	3,27↑	0,0227
PA1206			hypothetical protein (Class 4)	3,58↑	0,0000
PA1244			hypothetical protein (Class 4)	4,92↑	0,0341
PA1545			hypothetical protein (Class 4)	2,21↑	0,0008
PA1968			hypothetical protein (Class 4)	2,05↑	0,0045
PA2433			hypothetical protein (Class 4)	11,34↑	0,0001
PA2562			hypothetical protein (Class 4)	9,05↑	0,0000
PA2659			hypothetical protein (Class 4)	2,03↑	0,0063
PA2779			hypothetical protein (Class 4)	2,11↑	0,0499
PA2781			hypothetical protein (Class 4)	3,22↑	0,0000
PA2833			conserved hypothetical protein (Class 4)	2,04↑	0,0127
PA2971		*yceD*	conserved hypothetical protein (Class 4)	2,68↑	0,0203
PA3661			hypothetical protein (Class 4)	3,93↑	0,0293
PA3729			conserved hypothetical protein (Class 4)	2,88↑	0,0413
PA3731		*yjfJ*	conserved hypothetical protein (Class 4)	2,01↑	0,0154
PA3732		*yjfI*	conserved hypothetical protein (Class 4)	2,54↑	0,0003
PA3967			hypothetical protein (Class 4)	2,21↑	0,0259
PA3979			hypothetical protein (Class 4)	2,81↑	0,0035
PA4354			conserved hypothetical protein (Class 4)	2,58↑	0,0258
PA4379			conserved hypothetical protein (Class 4)	2,40↑	0,0070
PA4582			conserved hypothetical protein (Class 4)	2,25↑	0,0174
PA4583		*rtcB*	conserved hypothetical protein (Class 4)	4,05↑	0,0000
PA4766		*yfjF*	conserved hypothetical protein (Class 4)	3,80↑	0,0001
PA4826			hypothetical protein (Class 4)	2,83↑	0,0066
PA5176		*yrfE*	conserved hypothetical protein (Class 4)	3,96↑	0,0068
PA5285			hypothetical protein (Class 4)	2,27↑	0,0272

PA5314			hypothetical protein (Class 4)	2,53↑	0,0081
Membrane proteins					
PA0260			hypothetical protein (Class 4)	2,04↑	0,0357
PA1652			hypothetical protein (Class 4)	2,89↑	0,0108
PA2538			hypothetical protein (Class 4)	4,52↑	0,0059
PA3431		*ywbG*	conserved hypothetical protein (Class 4)	2,21↑	0,0076
PA3794			hypothetical protein (Class 4)	2,06↑	0,0342
PA5107	*blc*		outer membrane lipoprotein Blc (Class 2)	3,11↑	0,0324
PA5182			hypothetical protein (Class 4)	4,50↑	0,0013
PA5211		*ybbJ*	conserved hypothetical protein (Class 4)	2,12↑	0,0493
Motility & Attachment					
PA2128	*cupA1*		fimbrial subunit CupA1 (Class 1)	27,39↑	0,0345
PA4550	*fimU*		type 4 fimbrial biogenesis protein FimU (Class 1)	2,37↑	0,0037
Protein secretion/export apparatus					
PA0079	*tssK1*		TssK1 (Class 2)	3,25↑	0,0357
PA0090	*clpV1*		ClpV1 (Class 2)	6,13↑	0,0090
Putative enzymes					
PA1137			probable oxidoreductase (Class 3)	8,86↑	0,0119
PA1202		*ycaC*	probable hydrolase (Class 3)	17,56↑	0,0488
PA2541			probable CDP-alcohol phosphatidyltransferase (Class 3)	3,44↑	0,0000
Related to phage, transposon, or plasmid					
PA0629			conserved hypothetical protein (Class 4)	7,67↑	0,0019
PA0630			hypothetical protein (Class 4)	12,66↑	0,0488
PA0722			hypothetical protein of bacteriophage Pf1 (Class 4)	4,21↑	0,0335
Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)					
PA0041			probable hemagglutinin (Class 3)	3,68↑	0,0001
Transcription, RNA processing and degradation					
PA3950			probable ATP-dependent RNA helicase (Class 3)	2,10↑	0,0229
Transcriptional regulators					
PA0424	*mexR*		multidrug resistance operon repressor MexR (Class 1)	2,52↑	0,0069
PA0610	*prtN*		transcriptional regulator PrtN (Class 1)	5,83↑	0,0063
PA0612	*ptrB*		repressor, PtrB (Class 1)	6,24↑	0,0027
PA0906			probable transcriptional regulator (Class 3)	6,47↑	0,0031
PA2020		*amrR*; *mexZ*	probable transcriptional regulator (Class 3)	2,74↑	0,0323
PA2930			probable transcriptional regulator (Class 3)	2,75↑	0,0001
PA4600	*nfxB*		transcriptional regulator NfxB (Class 1)	2,15↑	0,0369
Translation, post-translational modification, degradation					
PA0579	*rpsU*		30S ribosomal protein S21 (Class 2)	3,88↑	0,0047
PA2755	*eco*		ecotin precursor (Class 2)	4,95↑	0,0131
PA4498			probable metallopeptidase (Class 3)	4,68↑	0,0099
PA5470		*prfH*	probable peptide chain release factor (Class 3)	5,93↑	0,0009
Transport of small molecules					
PA4514		*piuA*	probable outer membrane receptor for iron transport (Class 3)	2,19↑	0,0088
PA4770	*lldP*	*lctP*	L-lactate permease (Class 2)	5,13↑	0,0492
Two-component regulatory systems					
PA3204			probable two-component response regulator (Class 3)	2,83↑	0,0154
PA4381		*colR*	probable two-component response regulator (Class 3)	2,20↑	0,0431
Adaptation, Protection					
PA0867	*mliC*		membrane-bound lysozyme inhibitor of c-type lysozyme MliC	5,46↓	0,0008
PA1001	*phnA*		anthranilate synthase component I	10,91↓	0,0189
PA1002	*phnB*		anthranilate synthase component II, phenazine biosynthesis protein PhnB	6,49↓	0,0040
PA1432	*lasI*		autoinducer synthesis protein LasI	9,33↓	0,0041
PA3476	*rhlI*		autoinducer synthesis protein RhlI	2,81↓	0,0007
PA4606	*cstA*		conserved hypothetical protein	6,66↓	0,0159
PA5372	*betA*		choline dehydrogenase	4,71↓	0,0004
PA5373	*betB*		betaine aldehyde dehydrogenase	7,07↓	0,0021
Amino acid biosynthesis and metabolism					
PA0782	*putA*	*pruB*; *pruA*	proline dehydrogenase PutA	3,72↓	0,0028
PA0865	*hpd*		4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	27,31↓	0,0278

PA0870	*phhC*	*aspC*; *tyrB*	aromatic amino acid aminotransferase	5,07↓	0,0264
PA0871	*phhB*		pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	6,66↓	0,0126
PA0872	*phhA*		phenylalanine-4-hydroxylase	8,16↓	0,0276
PA0895	*aruC*	*dapC*; *astC*	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	2,48↓	0,0323
PA0897	*aruG*		arginine/ornithine succinyltransferase AII subunit	2,37↓	0,0042
PA0898	*aruD*	*astD*	succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	3,98↓	0,0009
PA0899	*aruB*		succinylarginine dihydrolase	2,22↓	0,0258
PA1337	*ansB*	*pga*	glutaminase-asparaginase	5,68↓	0,0019
PA1421	*gbuA*	*speB2*	guanidinobutyrase	8,29↓	0,0002
PA1681	*aroC*		chorismate synthase	2,18↓	0,0004
PA1684			1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase MtnD	2,21↓	0,0009
PA1818	*ldcA*	*speC*; *ldcC*	lysine-specific pyridoxal 5'-phosphate-dependent carboxylase, LdcA	4,91↓	0,0039
PA2081	*kynB*		kynurenine formamidase, KynB	3,38↓	0,0003
PA2247	*bkdA1*		2-oxoisovalerate dehydrogenase (alpha subunit)	25,82↓	0,0231
PA2248	*bkdA2*		2-oxoisovalerate dehydrogenase (beta subunit)	14,14↓	0,0205
PA2709	*cysK*		cysteine synthase A	2,18↓	0,0163
PA3068	*gdhB*		NAD^+-dependent glutamate dehydrogenase	4,31↓	0,0013
PA3113	*trpF*		N-(5'phosphoribosyl)anthranilate (PRA) isomerase	2,32↓	0,0007
PA4389			probable short-chain dehydrogenase	2,23↓	0,0089
PA5141	*hisA*		phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide	2,37↓	0,0017
PA5172	*arcB*		ornithine carbamoyltransferase, catabolic	3,44↓	0,0030
PA5206	*argE*		acetylornithine deacetylase	2,08↓	0,0069
PA5411	*gbcB*		glycine betaine catabolism protein	2,50↓	0,0302
Antibiotic resistance and susceptibility					
PA2760	*oprQ*		OprQ	4,04↓	0,0066
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers					
PA0501	*bioF*		8-amino-7-oxononanoate synthase	2,02↓	0,0017
PA0502		*bioH*	probable biotin biosynthesis protein bioH	3,11↓	0,0008
PA0503		*bioC*	probable biotin synthesis protein BioC	2,04↓	0,0057
PA0996	*pqsA*		probable coenzyme A ligase	12,82↓	0,0035
PA0997	*pqsB*		3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	16,78↓	0,0040
PA0998	*pqsC*		3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	8,99↓	0,0002
PA0999	*pqsD*	*fabH1*	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	13,26↓	0,0099
PA1000	*pqsE*		Quinolone signal response protein	13,86↓	0,0039
PA1277	*cobQ*	*cbiP*	cobyric acid synthase	2,47↓	0,0000
PA1278	*cobP*	*cobU*	cobinamide kinase	2,66↓	0,0004
PA2587	*pqsH*		probable FAD-dependent monooxygenase	12,30↓	0,0029
PA2964	*pabC*		4-amino-4-deoxychorismate lyase	3,08↓	0,0060
PA5223	*ubiH*	*visB*	UbiH protein	2,03↓	0,0022
Carbon compound catabolism					
PA0129	*bauD*		Amino acid permease	3,68↓	0,0013
PA0131	*bauB*		hypothetical protein	2,59↓	0,0003
PA0795	*prpC*		citrate synthase 2	7,83↓	0,0113
PA1602			probable oxidoreductase	3,85↓	0,0028
PA1950	*rbsK*		ribokinase	3,00↓	0,0465
PA2007	*maiA*		maleylacetoacetate isomerase	13,01↓	0,0207
PA2008	*fahA*		fumarylacetoacetase	22,47↓	0,0111
PA2009	*hmgA*		homogentisate 1,2-dioxygenase	28,77↓	0,0027
PA2011	*liuE*	*mvaB*; *gnyL*	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase	4,14↓	0,0017
PA2013	*liuC*	*menB*; *gnyH*	putative 3-methylglutaconyl-CoA hydratase	9,61↓	0,0001
PA2014	*liuB*	*gnyB*	methylcrotonyl-CoA carboxylase, beta-subunit	6,30↓	0,0038
PA2015	*liuA*	*gnyD*; *ivd*	putative isovaleryl-CoA dehydrogenase, Citronelloyl-CoA dehydrogenase, GnyD	7,00↓	0,0012
PA2323		*gapN*; *gapB*	probable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3,56↓	0,0002
PA2796	*tal*		transaldolase	2,53↓	0,0019
PA4590	*pra*		protein activator	4,88↓	0,0026
PA4726	*cbrB*		two-component response regulator CbrB	2,28↓	0,0400
PA5350	*rubA2*		Rubredoxin 2	2,15↓	0,0357
PA5508	*pauA7*		Glutamylpolyamine synthetase homologue	6,87↓	0,0004
Cell division					
PA2615	*ftsK*		cell division protein FtsK	2,11↓	0,0389
PA4408	*ftsA*		cell division protein FtsA	2,12↓	0,0001
PA4409	*ftsQ*		cell division protein FtsQ	2,04↓	0,0408
PA4419	*ftsL*		cell division protein FtsL	2,80↓	0,0053
PA5562	*spoOJ*		chromosome partitioning protein Spo0J	2,48↓	0,0163
Cell wall/LPS/capsule					
PA3326	*clpP2*		ClpP2	3,03↓	0,0190
PA3337	*rfaD*		ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase	4,02↓	0,0201
PA4367	*bifA*		BifA	2,01↓	0,0084

PA4410	*ddlB*		D-alanine--D-alanine ligase	3,34↓	0,0378
PA4414	*murD*		UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	2,19↓	0,0004
PA4415	*mraY*		phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	3,10↓	0,0190
PA4416	*murF*		UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase	2,90↓	0,0037
PA4418	*ftsI*	*pbpB*	cell-division protein FtsI	2,80↓	0,0006
PA5012	*waaF*	*rfaF*	heptosyltransferase II	2,08↓	0,0029
PA5164	*rmlC*	*rfbC*	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	3,02↓	0,0037
PA5447	*wbpZ*		glycosyltransferase WbpZ	2,62↓	0,0149
PA5448	*wbpY*		glycosyltransferase WbpY	4,03↓	0,0037
PA5449	*wbpX*		glycosyltransferase WbpX	4,15↓	0,0144
Central intermediary metabolism					
PA0887	*acsA*		acetyl-coenzyme A synthetase	20,04↓	0,0303
PA1338	*ggt*		gamma-glutamyltranspeptidase precursor	6,05↓	0,0001
PA2193	*hcnA*		hydrogen cyanide synthase HcnA	16,87↓	0,0001
PA2194	*hcnB*		hydrogen cyanide synthase HcnB	2,17↓	0,0120
PA3182	*pgl*		6-phosphogluconolactonase	2,11↓	0,0325
PA3582	*glpK*		glycerol kinase	6,60↓	0,0078
PA4865	*ureA*		urease gamma subunit	3,62↓	0,0131
Chaperones & heat shock proteins					
PA1805	*ppiD*		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	2,52↓	0,0054
Chemotaxis					
PA0414	*chpB*		probable methylesterase	2,40↓	0,0037
PA1457	*cheZ*		chemotaxis protein CheZ	2,05↓	0,0210
PA1561	*aer*		aerotaxis receptor Aer	3,95↓	0,0114
PA4915			probable chemotaxis transducer	2,31↓	0,0387
DNA replication, recombination, modification and repair					
PA1804	*hupB*		DNA-binding protein HU	2,93↓	0,0127
PA2961	*holB*		DNA polymerase III, delta prime subunit	2,14↓	0,0054
PA5345	*recG*		ATP-dependent DNA helicase RecG	3,36↓	0,0021
PA5348			probable DNA-binding protein	7,93↓	0,0357
Energy metabolism					
PA0518	*nirM*		cytochrome c-551 precursor	2,35↓	0,0108
PA0794			probable aconitate hydratase	3,33↓	0,0036
PA1555	*ccoP2*	*ccoP*; *fixP*	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoP subunit	3,45↓	0,0298
PA1588	*sucC*		succinyl-CoA synthetase beta chain	2,17↓	0,0242
PA2250	*lpdV*		lipoamide dehydrogenase-Val	9,31↓	0,0312
PA2623	*icd*	*icdA*	isocitrate dehydrogenase	27,79↓	0,0002
PA2624	*idh*		isocitrate dehydrogenase	11,31↓	0,0000
PA2637	*nuoA*		NADH dehydrogenase I chain A	2,89↓	0,0467
PA2638	*nuoB*		NADH dehydrogenase I chain B	3,42↓	0,0322
PA2640	*nuoE*		NADH dehydrogenase I chain E	3,16↓	0,0019
PA2641	*nuoF*		NADH dehydrogenase I chain F	2,27↓	0,0106
PA2644	*nuoI*		NADH Dehydrogenase I chain I	4,08↓	0,0182
PA2646	*nuoK*		NADH dehydrogenase I chain K	5,94↓	0,0324
PA2647	*nuoL*		NADH dehydrogenase I chain L	5,31↓	0,0414
PA2648	*nuoM*		NADH dehydrogenase I chain M	6,39↓	0,0135
PA2649	*nuoN*		NADH dehydrogenase I chain N	4,61↓	0,0117
PA4587	*ccpR*		cytochrome c551 peroxidase precursor	2,86↓	0,0071
Fatty acid and phospholipid metabolism					
PA1806	*fabI*	*envM*	NADH-dependent enoyl-ACP reductase	5,64↓	0,0013
PA1869			probable acyl carrier protein	2,22↓	0,0120
PA2557			probable AMP-binding enzyme	4,20↓	0,0000
PA2965	*fabF1*		beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II	2,53↓	0,0340
Hypothetical, unclassified, unknown					
PA0026	*plcB*		phospholipase C, PlcB	4,07↓	0,0000
PA0027			hypothetical protein	2,05↓	0,0211
PA0128		*phnA*	conserved hypothetical protein	2,36↓	0,0134
PA0141			conserved hypothetical protein	2,08↓	0,0094
PA0168		*yigZ*	conserved hypothetical protein	5,78↓	0,0189
PA0254			conserved hypothetical protein	2,21↓	0,0471
PA0359			hypothetical protein	3,02↓	0,0168
PA0449			hypothetical protein	4,54↓	0,0005
PA0492		*ycsF*	conserved hypothetical protein	5,00↓	0,0288
PA0713			hypothetical protein	2,44↓	0,0215
PA0793			hypothetical protein	2,08↓	0,0324
PA1076			hypothetical protein	4,90↓	0,0009
PA1420			hypothetical protein	5,03↓	0,0013
PA1517			conserved hypothetical protein	2,79↓	0,0058

PA1530			hypothetical protein	4,94↓	0,0002
PA1530.1			4.5S ribosomal RNA		
PA1604			hypothetical protein	2,05↓	0,0014
PA1618		*ybdB*	conserved hypothetical protein	3,89↓	0,0001
PA1640			conserved hypothetical protein	2,07↓	0,0382
PA1673			hypothetical protein	5,79↓	0,0303
PA1746			hypothetical protein	3,30↓	0,0057
PA1761			hypothetical protein	3,81↓	0,0254
PA1847	*nfuA*	*yhgI*	NfuA	2,12↓	0,0198
PA1941			hypothetical protein	2,46↓	0,0037
PA2044			hypothetical protein	2,46↓	0,0038
PA2080	*kynU*		kynureninase KynU	3,30↓	0,0042
PA2423			hypothetical protein	2,76↓	0,0412
PA2613		*ycaJ*	conserved hypothetical protein	2,24↓	0,0011
PA2621			conserved hypothetical protein	2,57↓	0,0311
PA2630		*ycfD*	conserved hypothetical protein	3,34↓	0,0062
PA2753			hypothetical protein	9,91↓	0,0065
PA2874			hypothetical protein	2,17↓	0,0304
PA2986			conserved hypothetical protein	2,06↓	0,0246
PA3046		*yggL*	conserved hypothetical protein	2,36↓	0,0001
PA3081			conserved hypothetical protein	2,17↓	0,0001
PA3213			hypothetical protein	2,16↓	0,0121
PA3214			hypothetical protein	2,63↓	0,0188
PA3233			hypothetical protein	2,59↓	0,0207
PA3309		*uspK*	conserved hypothetical protein	4,26↓	0,0116
PA3347			hypothetical protein	3,07↓	0,0089
PA3576			hypothetical protein	3,21↓	0,0040
PA3613			hypothetical protein	2,88↓	0,0004
PA3695			hypothetical protein	2,19↓	0,0122
PA3836			hypothetical protein	2,79↓	0,0064
PA3848			hypothetical protein	2,07↓	0,0019
PA3904			hypothetical protein	23,62↓	0,0000
PA3905			hypothetical protein	3,73↓	0,0003
PA3906			hypothetical protein	5,63↓	0,0005
PA3907			hypothetical protein	6,90↓	0,0000
PA3983			conserved hypothetical protein	2,16↓	0,0025
PA4012			hypothetical protein	2,18↓	0,0163
PA4182			hypothetical protein	2,84↓	0,0026
PA4352			conserved hypothetical protein	3,32↓	0,0024
PA4523			hypothetical protein	3,43↓	0,0001
PA4577			hypothetical protein	6,52↓	0,0004
PA4604		*yjiA*	conserved hypothetical protein	2,67↓	0,0205
PA4605		*ybdD*	conserved hypothetical protein	4,13↓	0,0188
PA4608			hypothetical protein	2,86↓	0,0003
PA4610			hypothetical protein	4,72↓	0,0205
PA4611			hypothetical protein	2,96↓	0,0492
PA4677			hypothetical protein	5,48↓	0,0000
PA4689			hypothetical protein	2,07↓	0,0334
PA4714			conserved hypothetical protein	3,29↓	0,0254
PA4773			hypothetical protein	5,29↓	0,0003
PA4782			hypothetical protein	3,37↓	0,0001
PA4916			hypothetical protein	2,61↓	0,0035
PA4917			hypothetical protein	3,81↓	0,0007
PA4965			hypothetical protein	3,58↓	0,0004
PA4966			hypothetical protein	2,18↓	0,0335
PA5006			hypothetical protein	2,04↓	0,0252
PA5027			hypothetical protein	6,21↓	0,0070
PA5208			conserved hypothetical protein	3,35↓	0,0019
PA5232		*yhiI*	conserved hypothetical protein	4,67↓	0,0439
PA5269			hypothetical protein	2,86↓	0,0265
PA5271			hypothetical protein	4,93↓	0,0015
PA5295			hypothetical protein	2,84↓	0,0144
PA5329			conserved hypothetical protein	2,46↓	0,0152
PA5347			hypothetical protein	2,46↓	0,0002
PA5396			hypothetical protein	2,70↓	0,0019
PA5455			hypothetical protein	2,44↓	0,0038
PA5456			hypothetical protein	4,47↓	0,0036
PA5457			hypothetical protein	2,01↓	0,0008
PA5459			hypothetical protein	3,25↓	0,0000
PA5475			hypothetical protein	7,82↓	0,0001
PA5506			hypothetical protein	2,50↓	0,0335
PA5507			hypothetical protein	5,15↓	0,0012
PA5509			hypothetical protein	10,62↓	0,0040
Membrane proteins					
PA0109			hypothetical protein	2,93↓	0,0099

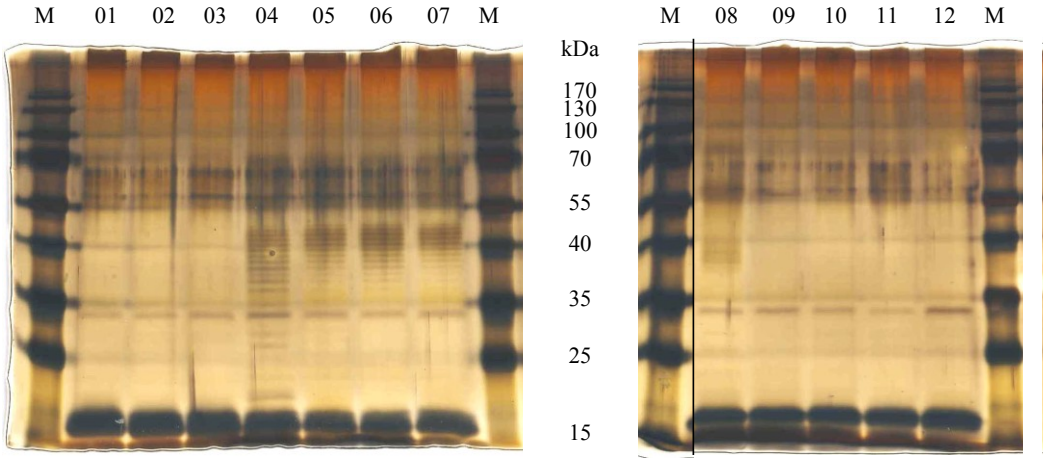
PA0751			conserved hypothetical protein	2,35↓	0,0122
PA1513			hypothetical protein	2,02↓	0,0066
PA2501			hypothetical protein	6,28↓	0,0094
PA2710			hypothetical protein	2,46↓	0,0286
PA2746			hypothetical protein	4,64↓	0,0004
PA3079			hypothetical protein	2,06↓	0,0272
PA3235		*yjcH*	conserved hypothetical protein	16,63↓	0,0212
PA3465		*yfiS*	conserved hypothetical protein	5,51↓	0,0025
PA3934			conserved hypothetical protein	2,62↓	0,0003
PA4224	*pchG*		pyochelin biosynthetic protein PchG	6,50↓	0,0026
PA5442			conserved hypothetical protein	3,11↓	0,0000
Motility & Attachment					
PA0408	*pilG*		twitching motility protein PilG	3,54↓	0,0202
PA0411	*pilJ*		twitching motility protein PilJ	2,80↓	0,0143
PA0412	*pilK*		methyltransferase PilK	2,64↓	0,0181
PA0861			hypothetical protein	2,05↓	0,0069
PA1079	*flgD*		flagellar basal-body rod modification protein FlgD	2,31↓	0,0414
PA1103		*fliH*	probable flagellar assembly protein	2,68↓	0,0172
PA5044	*pilM*		type 4 fimbrial biogenesis protein PilM	2,90↓	0,0001
Nucleotide biosynthesis and metabolism					
PA0441	*dht*	*hyuA*	dihydropyrimidinase	3,19↓	0,0127
PA5425	*purK*		phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	2,60↓	0,0063
Protein secretion/export apparatus					
PA1706	*pcrV*		type III secretion protein PcrV	2,91↓	0,0006
PA1707	*pcrH*		regulatory protein PcrH	2,13↓	0,0099
PA3101	*xcpT*	*pddA*	general secretion pathway protein G, PilD-dependent protein PddA	3,60↓	0,0009
PA3103	*xcpR*		general secretion pathway protein E, type II traffic warden ATPase	2,61↓	0,0007
PA3104	*xcpP*		secretion protein XcpP	2,91↓	0,0068
PA3105	*xcpQ*		general secretion pathway protein D	2,97↓	0,0004
PA3820	*secF*		secretion protein SecF	2,97↓	0,0028
Putative enzymes					
PA0493			probable biotin-requiring enzyme	7,19↓	0,0190
PA0545			hypothetical protein	2,46↓	0,0224
PA0745			probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	5,70↓	0,0304
PA1287			probable glutathione peroxidase	2,56↓	0,0022
PA1601			probable aldehyde dehydrogenase	2,46↓	0,0109
PA1966			hypothetical protein	2,38↓	0,0220
PA2552		*acdB*	probable acyl-CoA dehydrogenase	2,77↓	0,0131
PA2553			probable acyl-CoA thiolase	7,46↓	0,0012
PA2554			probable short-chain dehydrogenase	4,81↓	0,0014
PA2555			probable AMP-binding enzyme	3,29↓	0,0266
PA3535		*eprS*	probable serine protease	2,91↓	0,0001
PA3579			probable carbohydrate kinase	2,03↓	0,0275
PA4986			probable oxidoreductase	3,79↓	0,0065
PA5007		*inaA*; *wapQ*	hypothetical protein	2,20↓	0,0001
PA5008		*waaX*; *wapP*	hypothetical protein	2,47↓	0,0014
PA5190			probable nitroreductase	2,19↓	0,0007
Related to phage, transposon, or plasmid					
PA0979			conserved hypothetical protein	14,98↓	0,0485
Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)					
PA0766	*mucD*		serine protease MucD precursor	2,16↓	0,0144
PA0852	*cbpD*		chitin-binding protein CbpD precursor	3,91↓	0,0060
PA1250	*aprI*		alkaline proteinase inhibitor AprI	3,12↓	0,0375
Transcription, RNA processing and degradation					
PA2975	*rluC*	*yceC*	ribosomal large subunit pseudouridine synthase C	2,20↓	0,0323
PA3861	*rhl*		ATP-dependent RNA helicase RhlB	2,09↓	0,0023
PA4269	*rpoC*		DNA-directed RNA polymerase beta* chain	2,26↓	0,0154
PA4275	*nusG*		transcription antitermination protein NusG	2,78↓	0,0135
PA4755	*greA*		transcription elongation factor GreA	2,39↓	0,0012
PA5337	*rpoZ*		RNA polymerase omega subunit	2,16↓	0,0008
Transcriptional regulators					
PA0893	*argR*		transcriptional regulator ArgR	2,18↓	0,0093
PA1196			probable transcriptional regulator	4,58↓	0,0008
PA1283			probable transcriptional regulator	2,23↓	0,0492
PA1290			probable transcriptional regulator	8,85↓	0,0013
PA1431	*rsaL*		regulatory protein RsaL	101,95↓	0,0034

PA1759			probable transcriptional regulator	2,96↓	0,0022
PA1760			probable transcriptional regulator	2,26↓	0,0077
PA1949	*rbsR*		ribose operon repressor RbsR	3,52↓	0,0047
PA2016	*liuR*	*gnyR*	regulator of liu genes	3,06↓	0,0211
PA2082	*kynR*		KynR	3,32↓	0,0006
PA2591			probable transcriptional regulator	8,93↓	0,0002
PA2667	*mvaU*		MvaU	3,21↓	0,0025
PA2879		*hpkR*	probable transcriptional regulator	4,24↓	0,0001
PA2897			probable transcriptional regulator	2,83↓	0,0012
PA2899			probable transcriptional regulator	2,41↓	0,0043
PA3006	*psrA*		transcriptional regulator PsrA	2,07↓	0,0464
PA3458			probable transcriptional regulator	2,37↓	0,0180
PA3477	*rhlR*		transcriptional regulator RhlR	5,76↓	0,0047
PA3678			probable transcriptional regulator	2,31↓	0,0001
PA3973			probable transcriptional regulator	7,44↓	0,0000
PA4185			probable transcriptional regulator	2,38↓	0,0004
PA4315	*mvaT*		transcriptional regulator MvaT, P16 subunit	3,10↓	0,0005
PA4596			probable transcriptional regulator	4,79↓	0,0003
PA4778	*cueR*	*ybbI*	CueR	2,92↓	0,0009
PA4787			probable transcriptional regulator	3,13↓	0,0015
PA5374	*betI*		transcriptional regulator BetI	5,83↓	0,0001
PA5438			probable transcriptional regulator	2,99↓	0,0043
Translation, post-translational modification, degradation					
PA3724	*lasB*		elastase LasB	4,27↓	0,0099
PA4237	*rplQ*		50S ribosomal protein L17	2,81↓	0,0417
PA5224	*pepP*		aminopeptidase P	2,30↓	0,0226
Transport of small molecules					
PA0295			probable periplasmic polyamine binding protein	3,58↓	0,0437
PA0303	*spuG*	*potH*	polyamine transport protein PotH	2,84↓	0,0285
PA0783	*putP*		sodium/proline symporter PutP	6,30↓	0,0060
PA0789			probable amino acid permease	7,71↓	0,0034
PA0860			probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	2,18↓	0,0020
PA0866	*aroP2*		aromatic amino acid transport protein AroP2	13,73↓	0,0181
PA0892	*aotP*		arginine/ornithine transport protein AotP	2,52↓	0,0060
PA0958	*oprD*		Basic amino acid, basic peptide and imipenem outer membrane porin OprD precursor	2,89↓	0,0213
PA1070	*braG*		branched-chain amino acid transport protein BraG	3,38↓	0,0335
PA1071	*braF*		branched-chain amino acid transport protein BraF	4,25↓	0,0041
PA1072	*braE*		branched-chain amino acid transport protein BraE	4,00↓	0,0003
PA1073	*braD*		branched-chain amino acid transport protein BraD	4,40↓	0,0003
PA1074	*braC*		branched-chain amino acid transport protein BraC	3,38↓	0,0214
PA1288		*ompP1*; *fadL*	probable outer membrane protein precursor	2,43↓	0,0339
PA1339			amino acid ABC transporter ATP binding protein	3,26↓	0,0008
PA1340			amino acid ABC transporter membrane protein	3,49↓	0,0002
PA1341			amino acid ABC transporter membrane protein	2,36↓	0,0001
PA1342			probable binding protein component of ABC transporter	8,62↓	0,0119
PA1418			probable sodium:solute symport protein	3,09↓	0,0272
PA1429			probable cation-transporting P-type ATPase	3,93↓	0,0474
PA1777	*oprF*		Major porin and structural outer membrane porin OprF precursor	2,26↓	0,0311
PA1808			probable permease of ABC transporter	2,36↓	0,0047
PA1809			probable permease of ABC transporter	3,09↓	0,0003
PA1811			probable solute-binding protein	3,80↓	0,0011
PA1946	*rbsB*		binding protein component precursor of ABC ribose transporter	5,53↓	0,0000
PA1947	*rbsA*		ribose transport protein RbsA	5,26↓	0,0414
PA1948	*rbsC*		membrane protein component of ABC ribose transporter	4,47↓	0,0006
PA2006			probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	7,03↓	0,0272
PA2533			probable sodium:alanine symporter	4,84↓	0,0005
PA3000	*aroP1*		aromatic amino acid transport protein AroP1	2,71↓	0,0215
PA3038		*opdQ*	probable porin	15,96↓	0,0052
PA3186	*oprB*		Glucose/carbohydrate outer membrane porin OprB precursor	10,54↓	0,0001
PA3187		*gltK*	probable ATP-binding component of ABC transporter	27,63↓	0,0000
PA3188		*gltG*	probable permease of ABC sugar transporter	47,05↓	0,0000
PA3189		*gltF*	probable permease of ABC sugar transporter	18,09↓	0,0000
PA3190		*gltB*	probable binding protein component of ABC sugar transporter	13,38↓	0,0000
PA3228			probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	2,15↓	0,0058
PA3234		*yjcG*	probable sodium:solute symporter	24,26↓	0,0071
PA3753		*fbp*	conserved hypothetical protein	2,78↓	0,0150
PA3837			probable permease of ABC transporter	2,45↓	0,0200
PA3838			probable ATP-binding component of ABC transporter	3,05↓	0,0041
PA3877	*narK1*		nitrite extrusion protein 1	2,75↓	0,0028

PA4221	*fptA*		Fe(III)-pyochelin outer membrane receptor precursor	6,83↓	0,0000
PA4222		*pchI*	probable ATP-binding component of ABC transporter	3,03↓	0,0143
PA4223		*pchH*	probable ATP-binding component of ABC transporter	5,35↓	0,0000
PA4225	*pchF*		pyochelin synthetase	3,12↓	0,0004
PA4226	*pchE*		dihydroaeruginoic acid synthetase	2,15↓	0,0006
PA4229	*pchC*		pyochelin biosynthetic protein PchC	2,16↓	0,0127
PA4230	*pchB*		salicylate biosynthesis protein PchB	9,19↓	0,0000
PA4231	*pchA*		salicylate biosynthesis isochorismate synthase	5,02↓	0,0062
PA4496			probable binding protein component of ABC transporter	8,84↓	0,0063
PA4500			probable binding protein component of ABC transporter	8,10↓	0,0171
PA4502			probable binding protein component of ABC transporter	9,55↓	0,0203
PA4504		*dppC*	probable permease of ABC transporter	5,75↓	0,0492
PA4505		*dppD*	probable ATP-binding component of ABC transporter	3,17↓	0,0171
PA4506		*dppF*	probable ATP-binding component of ABC transporter	5,74↓	0,0206
PA5152			probable ATP-binding component of ABC transporter	5,29↓	0,0323
PA5153			amino acid (lysine/arginine/ornithine/histidine/octopine) ABC transporter periplasmic binding protein	18,95↓	0,0033
PA5154			probable permease of ABC transporter	16,97↓	0,0037
PA5155			amino acid (lysine/arginine/ornithine/histidine/octopine) ABC transporter membrane protein	9,36↓	0,0033
PA5230		*yhhJ*	probable permease of ABC transporter	4,59↓	0,0001
PA5235	*glpT*		glycerol-3-phosphate transporter	2,05↓	0,0312
PA5375	*betT1*		choline transporter BetT	2,68↓	0,0001
PA5450	*wzt*		ABC subunit of A-band LPS efflux transporter	7,06↓	0,0246
PA5451	*wzm*		membrane subunit of A-band LPS efflux transporter	4,54↓	0,0104
PA5510			probable transporter	6,90↓	0,0135
Two-component regulatory systems					
PA1992	*ercS*		ErcS	2,63↓	0,0036
PA3879	*narL*		two-component response regulator NarL	2,02↓	0,0283
PA3974	*ladS*		Lost Adherence Sensor, LadS	3,26↓	0,0000
PA4983		*dmsR*	probable two-component response regulator	2,61↓	0,0003

8.3 LPS-Profile

Neben den bereits gezeigten LPS-Profilen der Stämme PA14, PA14Δ*icd*Δ*idh* und PA14 *mdh*::Gm (Abbildung 5.39) sind in der Abbildung 8.6 die LPS-Profile weiterer Stämme gezeigt.



01 PA14
02 PA14 *icd*::Tn
03 PA14 *idh*::Tn
04 PA14Δ*icd*Δ*idh*
05 PA14Δ*icd*Δ*idh* + (p*icd*)
06 PA14Δ*icd*Δ*idh* + (p*idh*)
07 PA14Δ*icd*Δ*idh* + (p*icd*/*idh*)

08 M1
09 M25
10 PA14 *mdh*::Gm
11 PA14 *mdh*::Tn
12 PA14 *mdh*::Gm + (p*mdh*)

Abbildung 8.6 LPS-Profile der Stämme PA14, der IDH- und Mdh-Mutanten sowie von M1 und M25
In dem Silbergel sind die LPS-Profile der Stämme PA14, der Isocitratdehydrogenase- und Malatdehydrogenase-Mutanten sowie der beiden CF-Isolate M1 und M25 gezeigt. Es wurde jeweils 5 µg LPS pro Gelspur aufgetragen.

8.4 Sequenzalignments von *P. aeruginosa* CF-Isolaten mit PAO1/PA14

Durch Sequenzalignments von *P. aeruginosa* CF-Isolaten mit PAO1 und PA14 sollten die Gene *icd* und *idh* sowie der dazwischen liegende intergenische Bereich auf SNPs hin untersucht werden. Neben den CF-Isolaten M1 und M25 wurden weitere 16 CF-Isolate mit untersucht (Hogardt *et al.*, 2006;Hoboth *et al.*, 2009), um evtl. *Hot-Spots* unter den gefundenen SNPs zu entdecken. Die DNA-Sequenzen für die CF-Isolate wurden durch Sequenzierung ermittelt, die für PAO1 und PA14 wurden von www.pseudomonas.com entnommen. Durch den bekannten genetischen Code konnten die DNA-Sequenzen in die Proteinsequenz übersetzt werden. Es wurden nur SNPs nach den Alignments berücksichtigt, die letztendlich zu einem Aminosäurenaustausch führen und zum anderen die weder in PAO1 noch in PA14 vorkommen. Sowohl die Sequenzvergleiche auf DNA- als auch auf Proteinebene sind in den folgenden Abschnitten gezeigt.

8.4.1 Sequenzalignment von *P. aeruginosa*-Stämmen für das Gen *icd* und Protein Icd

Tabelle 8.6 *icd*-Alignment von *P. aeruginosa*-Stämmen (DNA-Ebene)
Das Alignment wurde mit der internet-basierten Software CLUSTAL 2.1 *multiple sequence alignment* erstellt. Basen-Farbcode: □ = Übereinstimmung, □ = wie in PAO1, □ = wie in PA14, □ = nicht in PAO1 und PA14 und führt zum keinen AS-Austausch, □ = nicht in PAO1 und PA14 und führt zum AS-Austausch

```
P.aeruginosa_PAO1_icd      ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_PA14_icd      ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_M1_icd        ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_M25_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_V43_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_P24_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM1_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM2_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM3_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM4_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM5_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM6_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM7_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM8_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM9_icd       ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM10_icd      ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM11_icd      ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM12_icd      ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM13_icd      ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
P.aeruginosa_HM14_icd      ATGGGATACCAAAAGATCCAGGTGCCGGCGACCGGTGACAAAATCACTGTGAATGCCGACATGTCCTTGAGCGTACCGAAGAACCCGATCATCCCGTTCA 100
                           ****************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_icd      TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_PA14_icd      TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_M1_icd        TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_M25_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_V43_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_P24_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM1_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM2_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM3_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM4_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM5_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM6_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM7_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM8_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM9_icd       TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM10_icd      TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM11_icd      TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM12_icd      TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM13_icd      TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
P.aeruginosa_HM14_icd      TCGAGGGTGATGGCATCGGCGTCGATATCAGCCCGGTCATGATCAAGGTTGTCGACGCTGCAGTGGAAAAAGCATACAAGGGCGAGCGCAAGATCGCCTG 200
                           ****************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_icd      GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_PA14_icd      GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTGTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTGCGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_M1_icd        GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_M25_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_V43_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_P24_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTTTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTGCGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM1_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTGTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM2_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM3_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM4_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM5_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTGTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTGCGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM6_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM7_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM8_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTGTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTGCGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM9_icd       GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTGTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTGCGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM10_icd      GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM11_icd      GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM12_icd      GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM13_icd      GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTACGCGACTACGTGGTTTCC 300
P.aeruginosa_HM14_icd      GATGGAAGTCTACGCCGGCGAGAAGGCCACCCAGGTTTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCCGTGCGCGACTACGTGGTTTCC 300
                           ************************************ ******************************************** ******************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_icd     ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_PA14_icd     ATCAAGGGTCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGTTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_M1_icd       ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_M25_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_V43_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_P24_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM1_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM2_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM3_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM4_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM5_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM6_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM7_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM8_icd      ATCAAGGGTCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGTTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM9_icd      ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM10_icd     ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM11_icd     ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM12_icd     ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM13_icd     ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
P.aeruginosa_HM14_icd     ATCAAGGGCCCGCTGACCACCCCGGTCGGTGGCGGCATCCGCTCCCTGAACGTGGCCCTGCGCCAGCAACTCGATCTCTACGTCTGCCAGCGCCCGGTAC 400
                          ******** ******************************** ************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_icd     GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_PA14_icd     GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTAGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_M1_icd       GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_M25_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_V43_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_P24_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCTGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM1_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM2_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM3_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM4_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM5_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM6_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM7_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM8_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTAGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM9_icd      GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM10_icd     GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM11_icd     GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM12_icd     GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM13_icd     GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCCGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
P.aeruginosa_HM14_icd     GCTGGTTCGAAGGCGTGCCCAGCCCGGTGAAGAAGCCTGGCGACGTGGACATGGTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAGGACATCTATGCCGGCGTCGAGTG 500
                          ************************************** ******** ****************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_icd      GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_PA14_icd      GAAGGCCGGTTCGCCGGAGGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAANATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_M1_icd        GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_M25_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_V43_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_P24_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAGGCTGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM1_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM2_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM3_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM4_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM5_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM6_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM7_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM8_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAGGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAANATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM9_icd       GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM10_icd      GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGTGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM11_icd      GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM12_icd      GAAGGCCGGTTCGCCGGAAGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM13_icd      GAAGGCCGGTTCGCCGGAGGCGGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
P.aeruginosa_HM14_icd      GAAGGCCGGTTCGCCGGAGGCTGAGAAGGTCATCAAGTTCCTCACCGAGGAAATGGGCGTCAAGAAGATCCGCTTCACCGAGAACTGCGGCATCGGCATC 600
                           ****************** ** ********************************** ******** ********************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_icd      AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_PA14_icd      AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_M1_icd        AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_M25_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGATCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_V43_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_P24_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM1_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM2_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM3_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM4_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM5_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM6_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM7_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM8_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM9_icd       AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM10_icd      AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM11_icd      AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM12_icd      AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM13_icd      AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
P.aeruginosa_HM14_icd      AAGCCGGTTTCCCAGGAAGGCACCAAGCGCCTGGTGCGCAAGGCCCTGCAATACGCCGTCGACAACGACCGCAGTTCGGTGACCCTGGTGCACAAGGGCA 700
                           ******************************************************************************** *****************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_icd     ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_PA14_icd     ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGTTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_M1_icd       ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_M25_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_V43_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_P24_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM1_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM2_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM3_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM4_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM5_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM6_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM7_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM8_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGTTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM9_icd      ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM10_icd     ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM11_icd     ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM12_icd     ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM13_icd     ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
P.aeruginosa_HM14_icd     ACATCATGAAGTTCACCGAGGGTGCCTTCAAGGATTGGGGCTACGAAGTCGCGCGCGATGAATTCGGCGCCGAGCTGCTGGACGGCGGTCCGTGGATGCA 800
                          **************************************** ************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_icd     GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_PA14_icd     GTTCAAGAACCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATTCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_M1_icd       GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_M25_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_V43_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_P24_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM1_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM2_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM3_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM4_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM5_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM6_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM7_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM8_icd      GTTCAAGAACCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATTCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM9_icd      GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM10_icd     GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM11_icd     GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM12_icd     GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM13_icd     GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
P.aeruginosa_HM14_icd     GTTCAAGAATCCGAAGACCGGCAAGAACGTCGTGGTCAAGGACGTGATCGCCGACGCCATGTTGCAGCAGATCCTGCTGCGCCCCGCCGAGTACGACGTG 900
                          ********* ************************************************************* ***************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_icd      ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_PA14_icd      ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_M1_icd        ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_M25_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_V43_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGTGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_P24_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM1_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM2_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGTGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM3_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGTGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM4_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM5_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM6_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGTGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM7_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGTGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM8_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM9_icd       ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM10_icd      ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM11_icd      ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM12_icd      ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM13_icd      ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGTGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
P.aeruginosa_HM14_icd      ATCGCCACCCTGAACCTGAACGGCGACTATCTCTCCGACGCCCTGGCGGCCGAGGTCGGCGGCATCGGCATCGCGCCCGGCGCCAACCTGTCCGATTCGG 1000
                           ********************************************************** ****************************************

P.aeruginosa_PAO1_icd      TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_PA14_icd      TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_M1_icd        TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGTACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_M25_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGTACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_V43_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_P24_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM1_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM2_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM3_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM4_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGTACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM5_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM6_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM7_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM8_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM9_icd       TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAATCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM10_icd      TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM11_icd      TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM12_icd      TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM13_icd      TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
P.aeruginosa_HM14_icd      TGGCCATGTTCGAGGCGACCCACGGCACCGCGCCGAAGTACGCCGGCCAGGACAAGGTCAACCCGGGTTCGCTGATCCTCTCCGCGGAGATGATGCTGCG 1100
                           ************************* ********************************** ****************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_icd      CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_PA14_icd      CCACATGGGCTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_M1_icd        CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_M25_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_V43_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_P24_icd       CCACATGGGCTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM1_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM2_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM3_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM4_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM5_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM6_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM7_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM8_icd       CCACATGGGCTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM9_icd       CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM10_icd      CCACATGGGCTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM11_icd      CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM12_icd      CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM13_icd      CCACATGGGTTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
P.aeruginosa_HM14_icd      CCACATGGGCTGGACCGAGGCGGCCGACCTGATCATCAAGGGCACCAACGGGGCGATCGCCGCCAAGACCGTGACCTATGACTTCGAACGCCTGATGGAC 1200
                           ********* ******************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_icd      GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_PA14_icd      GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATCGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_M1_icd        GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_M25_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_V43_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_P24_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATCGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM1_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM2_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM3_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM4_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM5_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM6_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM7_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM8_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATCGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM9_icd       GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM10_icd      GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM11_icd      GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM12_icd      GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM13_icd      GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATTGCCAAGATGTAG 1257
P.aeruginosa_HM14_icd      GGCGCGACCCTGCTGTCCTGCTCGGAGTTCGGCGACGCGATGATCGCCAAGATGTAG 1257
                           ******************************************* ************
```

Tabelle 8.7 Icd-Alignment von *P. aeruginosa*-Stämmen (Protein-Ebene)
Das Alignment wurde mit der internet-basierten Software CLUSTAL 2.1 *multiple sequence alignment* erstellt. AS-Farbcode: □ = Übereinstimmung, □ = wie in PAO1, □ = wie in PA14, □ = nicht in PAO1 und PA14

```
P.aeruginosa_PAO1_Icd      MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_PA14_Icd      MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_M1_Icd        MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_M25_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_V43_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_P24_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM1_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM2_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM3_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM4_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM5_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM6_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM7_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM8_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM9_Icd       MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM10_Icd      MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM11_Icd      MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM12_Icd      MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM13_Icd      MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
P.aeruginosa_HM14_Icd      MGYQKIQVPATGDKITVNADMSLSVPKNPIIPFIEGDGIGVDISPVMIKVVDAAVEKAYKGERKIAWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVRDYVVS 100
                           ****************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_Icd      IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_PA14_Icd      IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_M1_Icd        IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_M25_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_V43_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_P24_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM1_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM2_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM3_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM4_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM5_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM6_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM7_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM8_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM9_Icd       IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM10_Icd      IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM11_Icd      IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM12_Icd      IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM13_Icd      IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
P.aeruginosa_HM14_Icd      IKGPLTTPVGGGIRSLNVALRQQLDLYVCQRPVRWFEGVPSPVKKPGDVDMVIFRENSEDIYAGVEWKAGSPEAEKVIKFLTEEMGVKKIRFTENCGIGI 200
                           ****************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_Icd      KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_PA14_Icd      KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_M1_Icd        KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_M25_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_V43_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_P24_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM1_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM2_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM3_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM4_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM5_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM6_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM7_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM8_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM9_Icd       KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM10_Icd      KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM11_Icd      KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM12_Icd      KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM13_Icd      KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
P.aeruginosa_HM14_Icd      KPVSQEGTKRLVRKALQYAVDNDRSSVTLVHKGNIMKFTEGAFKDWGYEVARDEFGAELLDGGPWMQFKNPKTGKNVVVKDVIADAMLQQILLRPAEYDV 300
                           *************************** ******************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_Icd      IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_PA14_Icd      IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_M1_Icd        IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_M25_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_V43_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_P24_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM1_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM2_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM3_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM4_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM5_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM6_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM7_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM8_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM9_Icd       IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM10_Icd      IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM11_Icd      IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM12_Icd      IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM13_Icd      IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
P.aeruginosa_HM14_Icd      IATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDSVAMFEATHGTAPKYAGQDKVNPGSLILSAEMMLRHMGWTEAADLIIKGTNGAIAAKTVTYDFERLMD 400
                           ****************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_Icd      GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_PA14_Icd      GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_M1_Icd        GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_M25_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_V43_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_P24_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM1_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM2_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM3_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM4_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM5_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM6_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM7_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM8_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM9_Icd       GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM10_Icd      GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM11_Icd      GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM12_Icd      GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM13_Icd      GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
P.aeruginosa_HM14_Icd      GATLLSCSEFGDAMIAKM 418
                           ******************
```

8.4.2 Sequenzalignment von *P. aeruginosa*-Stämmen für den intergenischen Bereich

Tabelle 8.8 Intergenischer Bereich (IB)-Alignment von *P. aeruginosa*-Stämmen (DNA-Ebene)
Das Alignment wurde mit der internet-basierten Software CLUSTAL 2.1 *multiple sequence alignment* erstellt. Basen-Farbcode: □ = Übereinstimmung, □ = wie in PAO1, □ = wie in PA14, □ = nicht in PAO1 und PA14

```
P.aeruginosa_PAO1_IB     GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_PA14_IB     GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_M1_IB       GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_M25_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_V43_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_P24_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM1_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM2_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM3_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM4_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM5_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM6_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM7_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM8_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM9_IB      GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM10_IB     GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTTGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM11_IB     GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM12_IB     GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM13_IB     GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
P.aeruginosa_HM14_IB     GCTGAACTCCGTGTTGTGGTTAAAACCCTGTTGCAGCCTTCTAGGGTAGCCCAGTTGTCCGCCCGGAAACCACATCTTCCTTAGTCTAAACAGGCGAGCG 100
                         ********************************************** ****************************************************

P.aeruginosa_PAO1_IB     CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_PA14_IB     CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_M1_IB       CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_M25_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_V43_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_P24_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM1_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM2_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM3_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM4_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM5_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM6_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM7_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM8_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM9_IB      CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM10_IB     CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM11_IB     CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM12_IB     CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM13_IB     CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
P.aeruginosa_HM14_IB     CATCAGCCCGGCGAGAGGGTGGTATACTGCGCGCCATGACTTCGCAGTCATCGAGGTCCGAGCAGTCTGGGACCAGACCCTCTCCCCTCGCAGCGTCGGG 200
                         ************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_IB      TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_PA14_IB      TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_M1_IB        TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_M25_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_V43_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_P24_IB       TTCGCCACCATGAGCCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM1_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM2_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM3_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM4_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM5_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM6_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM7_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM8_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM9_IB       TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM10_IB      TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM11_IB      TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM12_IB      TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM13_IB      TTCGCCACCATGAACCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
P.aeruginosa_HM14_IB      TTCGCCACCATGAGCCCGCCGTACAACGCTCTACTGGCGCCCCTATATCCCGCGGCATATCTCGATTTCGATTCAACCCGATGTTGAGCGAAGGCATCGC 300
                          ************* ******************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_IB      GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_PA14_IB      GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_M1_IB        GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_M25_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_V43_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_P24_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM1_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM2_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM3_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM4_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM5_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM6_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM7_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM8_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM9_IB       GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM10_IB      GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM11_IB      GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM12_IB      GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM13_IB      GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
P.aeruginosa_HM14_IB      GTCCACCAACGCGTATCGAGACTCTGTGCGCGCCCAGCAAAAAAGAGAGTTACCGTAG 358
                          ***********************************************************
```

8.4.3 Sequenzalignment von *P. aeruginosa*-Stämmen für das Gen *idh* und Protein Idh

Tabelle 8.9 *idh*-Alignment von *P. aeruginosa*-Stämmen (DNA-Ebene)
Das Alignment wurde mit der internet-basierten Software CLUSTAL 2.1 *multiple sequence alignment* erstellt. Basen-Farbcode: □ = Übereinstimmung, □ = wie in PAO1, □ = wie in PA14, □ = nicht in PAO1 und PA14 und führt zum keinen AS-Austausch, □ = nicht in PAO1 und PA14 und führt zum AS-Austausch

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_PA14_idh      ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_M1_idh        ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_M25_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_V43_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_P24_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCTGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCGTCCG 100
P.aeruginosa_HM1_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM2_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM3_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM4_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM5_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM6_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM7_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM8_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM9_idh       ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM10_idh      ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM11_idh      ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM12_idh      ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM13_idh      ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCCGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCTTCCG 100
P.aeruginosa_HM14_idh      ATGTCCATCCGCTCGAAGATCACCTACACCTTCACCGACGAAGCACCTGCGCTCGCCACCTACTCGCTCCTCCCCATCGTCAAGGCCTTTGCCGCGTCCG 100
                           ********************************************** ********************************************** ****

P.aeruginosa_PAO1_idh      CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_PA14_idh      CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGACGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_M1_idh        CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_M25_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_V43_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_P24_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGACGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM1_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM2_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM3_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM4_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM5_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM6_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM7_idh       CCGGCATTGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM8_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGACGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM9_idh       CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM10_idh      CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM11_idh      CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM12_idh      CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM13_idh      CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGAAGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
P.aeruginosa_HM14_idh      CCGGCATCGACGTCGAGACCAGCGACATCTCTCTTGCAGGACGCATCCTGGCCAACTTCGCCGACCGCCTCGACGCCGACCAGCGTATCGAAGACGACCT 200
                           ******* ************************************************************** **************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_PA14_idh      CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCAATCGCCGAA 300
P.aeruginosa_M1_idh        CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_M25_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_V43_idh       CGCCCGCCTGGCGGCCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_P24_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM1_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM2_idh       CGCCCGCCTGGCGGCCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM3_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM4_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM5_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM6_idh       CGCCCGCCTGGCGGCCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM7_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM8_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCAATCGCCGAA 300
P.aeruginosa_HM9_idh       CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM10_idh      CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM11_idh      CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM12_idh      CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM13_idh      CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
P.aeruginosa_HM14_idh      CGCCCGCCTGGCGGTCCTGGCCACCTCGCCCGACGCCAATATCATCAAGCTGCCCAACATCAGCGCCTCGGTGCCCCAGCTGAAAGGCGCGATCGCCGAG 300
                           ************** ******************************************************************************** ********
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_PA14_idh      CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_M1_idh        CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_M25_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAAGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_V43_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_P24_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM1_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM2_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM3_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM4_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAAGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM5_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM6_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM7_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM8_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM9_idh       CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM10_idh      CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM11_idh      CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM12_idh      CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM13_idh      CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
P.aeruginosa_HM14_idh      CTGCAGGGCCTGGGCTACAAGGTTCCCGACTTCCCGGAAGACCCGCAGACCGACGAAGAGAAAGAGGTTCGCGCACGCTACGCGAAGATCCTCGGCAGCG 400
                           ******************** ******************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_PA14_idh      CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAACTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCGGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_M1_idh        CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_M25_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_V43_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_P24_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAACTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCGGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM1_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM2_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM3_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM4_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM5_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM6_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM7_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM8_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAACTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCGGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM9_idh       CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM10_idh      CCGTGAATCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM11_idh      CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM12_idh      CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM13_idh      CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAATTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCAGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
P.aeruginosa_HM14_idh      CCGTGAACCCGGTCCTGCGCGAAGGCAACTCCGACCGTCGCGCGCCTGCCGCGGTGAAGGCCTACGCCCGCAAGCACCCGCACTCCATGGGCAAGTGGAG 500
                           ******* ******************** ********************** ***********************************************

P.aeruginosa_PAO1_idh      CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_PA14_idh      CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAG 600
P.aeruginosa_M1_idh        CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_M25_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_V43_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_P24_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAG 600
P.aeruginosa_HM1_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM2_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM3_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM4_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM5_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM6_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM7_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM8_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAG 600
P.aeruginosa_HM9_idh       CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM10_idh      CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM11_idh      CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM12_idh      CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM13_idh      CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAA 600
P.aeruginosa_HM14_idh      CATGGCCTCGCGCTCCCACGCCGACTACATGCGCGGCGGCGACTTCTTCTCCAGCGAACAGTCCATCACCATGGCCAAGGCCGGTGACGTGCGCATCGAG 600
                           ********* ******************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_PA14_idh      TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_M1_idh        TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_M25_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_V43_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_P24_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM1_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM2_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM3_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM4_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM5_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM6_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM7_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM8_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM9_idh       TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM10_idh      TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM11_idh      TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM12_idh      TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM13_idh      TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
P.aeruginosa_HM14_idh      TTCGTCGGCAAGGACGGCAAGGTCGAGGTCAAGAAGCAACTGAGCCTGCAGGAAGGCGAAGTGCTCGACAGCATGTTCATGAGCTGCGGCAAGCTGCGCG 700
                           ****************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_idh      ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_PA14_idh      ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_M1_idh        ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_M25_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_V43_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_P24_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM1_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM2_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM3_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM4_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM5_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM6_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM7_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM8_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM9_idh       ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM10_idh      ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM11_idh      ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM12_idh      ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM13_idh      ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
P.aeruginosa_HM14_idh      ACTTCTTCGAGAAGACCCTGCAGGACTGCAAGGAAACCGGCGTCATGTGGTCCCTGCACGTCAAGGCGACCATGATGAAGATTTCCCACCCGATCGTCTT 800
                           ****************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_PA14_idh      CGGGCATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_M1_idh        CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCAAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_M25_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCAAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_V43_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_P24_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM1_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM2_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM3_idh       CGGGCATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM4_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCAAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM5_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM6_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM7_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM8_idh       CGGGCATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM9_idh       CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM10_idh      CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM11_idh      CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM12_idh      CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM13_idh      CGGGCATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
P.aeruginosa_HM14_idh      CGGACATGCGGTGAGCGTCTACTACAAGGACGTCTTCGACAAGTGGGGCCAACTCTTCGAAGAGCTCGGCGTGAACCCGAACAACGGTATCTCCAGCGTC 900
                           *** ************************************************************************** *********************

P.aeruginosa_PAO1_idh      TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_PA14_idh      TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_M1_idh        TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_M25_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_V43_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_P24_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM1_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM2_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM3_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM4_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM5_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM6_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM7_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM8_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM9_idh       TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM10_idh      TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM11_idh      TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM12_idh      TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM13_idh      TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
P.aeruginosa_HM14_idh      TACGACAAGATCAAGTCGCTGCCCGCCTCCCAGCAGGAAGAGATCCTCCACGACATCCACGAGGTGTACAGCCACCGCCCGGAAATGGCGATGGTCGACT 1000
                           ******************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_PA14_idh      CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_M1_idh        CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_M25_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_V43_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_P24_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM1_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM2_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM3_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM4_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM5_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM6_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM7_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM8_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM9_idh       CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM10_idh      CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM11_idh      CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM12_idh      CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM13_idh      CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
P.aeruginosa_HM14_idh      CCGTGAAAGGCATCACCAACCTGCACATTCCGAGCGACGTCATCGTCGACGCCTCGATGCCGGCGATGATCCGCAACTCCGGCCAGATGTGGGGCAAGGA 1100
                           ************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_idh      CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_PA14_idh      CGGCAAGCAGAAAGATACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_M1_idh        CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_M25_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_V43_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_P24_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM1_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM2_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM3_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM4_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM5_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM6_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM7_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM8_idh       CGGCAAGCAGAAAGATACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM9_idh       CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM10_idh      CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM11_idh      CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM12_idh      CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM13_idh      CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
P.aeruginosa_HM14_idh      CGGCAAGCAGAAAGACACCAAGGCGGTAATGCCGGAAAGCACCTACGCCCGCATCTACCAGGAGATGATCAACTTCTGCAAGACCAACGGCGCCTTCGAC 1200
                           *************** ********************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_PA14_idh      CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_M1_idh        CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_M25_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_V43_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_P24_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM1_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM2_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM3_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM4_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM5_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM6_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM7_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM8_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM9_idh       CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM10_idh      CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM11_idh      CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM12_idh      CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM13_idh      CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
P.aeruginosa_HM14_idh      CCGACCACCATGGGCAGCGTGCCGAACGTCGGCCTGATGGCGCAGAAGGCCGAGGAATACGGCTCCCACGACAAGACCTTCGAAATGACCGCCGACGGCA 1300
                           ****************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_idh      CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACAAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_PA14_idh      CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACAGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_M1_idh        CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_M25_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_V43_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_P24_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGTTGATGCAGCACCAGGTGGAGACAGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM1_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM2_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM3_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM4_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM5_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM6_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM7_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM8_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACAGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM9_idh       CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM10_idh      CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM11_idh      CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM12_idh      CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM13_idh      CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGCTGATGCAGCACCAGGTGGAGACCGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCACCGATCCG 1400
P.aeruginosa_HM14_idh      CCATGCGCGTGGTCCTGGCCGACGGCAGCGTGTTGATGCAGCACCAGGTGGAGACAGGCGACATCTGGCGCGCCTGCCAGACCAAGGACGCGCCGATCCG 1400
                           ******************************** *********** * ******** ********************************** ********
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh     CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_PA14_idh     CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCGCGCCAGTCCGACACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_M1_idh       CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_M25_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_V43_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_P24_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCGCGCCAGTCCGACACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM1_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM2_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM3_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM4_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM5_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM6_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM7_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM8_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCGCGCCAGTCCGACACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM9_idh      CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM10_idh     CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM11_idh     CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM12_idh     CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM13_idh     CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCACGCCAGTCCGATACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
P.aeruginosa_HM14_idh     CGACTGGGTCAAGCTGGCCGTCACCCGCGCGCGCCAGTCCGACACCCCGGCGATCTTCTGGCTGGACCCGGAGCGCGCCCACGACCGCGAACTGCGCAAG 1500
                          ****************************** *********** ************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_idh     AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_PA14_idh     AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGCCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_M1_idh       AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_M25_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_V43_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_P24_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGCCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM1_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM2_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM3_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM4_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM5_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM6_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM7_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM8_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGCCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM9_idh      AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM10_idh     AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM11_idh     AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM12_idh     AAGGTCGAACTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM13_idh     AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGTCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
P.aeruginosa_HM14_idh     AAGGTCGAGCTGTACCTCAAGGACCACGACCTGACCGGCCTCGACATCAGCATCATGGGCTACAACGAGGCCATTCGCGTCAGCATGGAACGCCTGATCC 1600
                          ******** ***************************** ************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_PA14_idh      GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_M1_idh        GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_M25_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_V43_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_P24_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM1_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM2_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM3_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM4_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM5_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAATGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM6_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM7_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM8_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM9_idh       GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM10_idh      GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM11_idh      GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM12_idh      GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM13_idh      GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
P.aeruginosa_HM14_idh      GCGGCAAGGACACCATCTCGGTGACCGGCAACGTCCTGCGCGACTACCTGACCGACCTGTTCCCGATCATGGAACTGGGCACCTCGGCCAAGATGCTCTC 1700
                           ******************************* ************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_idh      CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_PA14_idh      CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_M1_idh        CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_M25_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_V43_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_P24_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM1_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM2_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM3_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM4_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM5_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM6_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM7_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM8_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM9_idh       CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM10_idh      CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM11_idh      CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM12_idh      CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM13_idh      CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
P.aeruginosa_HM14_idh      CATCGTTCCGCTGATGGCGGGCGGCGGCATGTACGAAACCGGCGCCGGCGGCTCGGCACCCAAGCACGTCCAGCAACTGGTGGAAGAGAACTACCTGCGC 1800
                           ******************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_PA14_idh      TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_M1_idh        TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_M25_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_V43_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_P24_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM1_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM2_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM3_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM4_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM5_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM6_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM7_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM8_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM9_idh       TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM10_idh      TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM11_idh      TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM12_idh      TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM13_idh      TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
P.aeruginosa_HM14_idh      TGGGACTCCCTGGGCGAGTTCCTGGCCCTGGCCGTGTCCCTGGAGGAAACCGGGATCAAGACCGGCAACGCCAAGGCCAAGCTGCTCGGCAAGGCGCTGG 1900
                           ****************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_idh      ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_PA14_idh      ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_M1_idh        ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_M25_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_V43_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_P24_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM1_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM2_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM3_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM4_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM5_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM6_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM7_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM8_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM9_idh       ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM10_idh      ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM11_idh      ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM12_idh      ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM13_idh      ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
P.aeruginosa_HM14_idh      ACGAAGCCACCGGCAAGCTGCTGGACAACAACAAGTCGCCGTCGCGCAAGGTCGGCGACATCGACAACCGCGGCAGCCACTTCTACCTGGCGATGTACTG 2000
                           ****************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh     GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGAACGAAGACGCTGAGCTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_PA14_idh     GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAGCTGAAAGCGCACTTCGCGCCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_M1_idh       GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_M25_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_V43_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCTGAGCTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_P24_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM1_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCTGAGCTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM2_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCTGAGCTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM3_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCTGAGCTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM4_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM5_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM6_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCTGAGCTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM7_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM8_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAGCTGAAAGCGCACTTCGCGCCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM9_idh      GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM10_idh     GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGAACGAAGACGCTGAGCTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM11_idh     GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM12_idh     GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM13_idh     GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCTGAGCTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
P.aeruginosa_HM14_idh     GGCCCAGGCCCTGGCCGCCCAGGACGAAGACGCCGAACTGAAAGCGCACTTCGCACCGCTGGCCAAGGCCCTGACCGAGCAGGAAGCGACCATCGTCGCC 2100
                          ********************** ********** ** ***************** ********************************************

P.aeruginosa_PAO1_idh     GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_PA14_idh     GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_M1_idh       GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_M25_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_V43_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_P24_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCACCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM1_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM2_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM3_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM4_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM5_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM6_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM7_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAGGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM8_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM9_idh      GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM10_idh     GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM11_idh     GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM12_idh     GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM13_idh     GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCGCCCCAGCGCCACCTTCA 2200
P.aeruginosa_HM14_idh     GAACTCAATGCGGTCCAGGGCAAGCCGGCCGAGATCGGCGGCTACTATCGCTCCAACCCGGAGCTGACCAGCAAGGTGATGCACCCCAGCGCCACCTTCA 2200
                          ********************** ************************************************************ *****************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_idh      ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_PA14_idh      ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_M1_idh        ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_M25_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_V43_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_P24_idh       ACGCAGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM1_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM2_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM3_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM4_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM5_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM6_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM7_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM8_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM9_idh       ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM10_idh      ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM11_idh      ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM12_idh      ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM13_idh      ACGCGGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
P.aeruginosa_HM14_idh      ACGCAGCGATCGACAGCCTGGCCTGA 2226
                           **** ********************
```

Tabelle 8.10 Icd-Alignment von *P. aeruginosa*-Stämmen (Protein-Ebene)
Das Alignment wurde mit der internet-basierten Software CLUSTAL 2.1 *multiple sequence alignment* erstellt. AS-Farbcode: □ = Übereinstimmung, □ = wie in PAO1, □ = wie in PA14, □ = nicht in PAO1 und PA14

```
P.aeruginosa_PAO1_Idh      MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_PA14_Idh      MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLDADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_M1_Idh        MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_M25_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_V43_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAALATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_P24_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLDADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM1_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM2_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAALATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM3_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM4_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM5_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM6_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAALATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM7_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM8_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLDADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM9_Idh       MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM10_Idh      MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM11_Idh      MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM12_Idh      MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM13_Idh      MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLEADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
P.aeruginosa_HM14_Idh      MSIRSKITYTFTDEAPALATYSLLPIVKAFAASAGIDVETSDISLAGRILANFADRLDADQRIEDDLARLAVLATSPDANIIKLPNISASVPQLKGAIAE 100
                           ********************************************************:*************.***************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_Idh      LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_PA14_Idh      LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_M1_Idh        LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_M25_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_V43_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_P24_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM1_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM2_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM3_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM4_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM5_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM6_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM7_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM8_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM9_Idh       LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM10_Idh      LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM11_Idh      LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM12_Idh      LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM13_Idh      LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
P.aeruginosa_HM14_Idh      LQGLGYKVPDFPEDPQTDEEKEVRARYAKILGSAVNPVLREGNSDRRAPAAVKAYARKHPHSMGKWSMASRSHADYMRGGDFFSSEQSITMAKAGDVRIE 200
                           ****************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_Idh      FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_PA14_Idh      FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_M1_Idh        FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_M25_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_V43_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_P24_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM1_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM2_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM3_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM4_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM5_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM6_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM7_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM8_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM9_Idh       FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM10_Idh      FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM11_Idh      FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM12_Idh      FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM13_Idh      FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
P.aeruginosa_HM14_Idh      FVGKDGKVEVKKQLSLQEGEVLDSMFMSCGKLRDFFEKTLQDCKETGVMWSLHVKATMMKISHPIVFGHAVSVYYKDVFDKWGQLFEELGVNPNNGISSV 300
                           ****************************************************************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_Idh      YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_PA14_Idh      YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_M1_Idh        YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_M25_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_V43_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_P24_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM1_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM2_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM3_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM4_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM5_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM6_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM7_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM8_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM9_Idh       YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM10_Idh      YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM11_Idh      YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM12_Idh      YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM13_Idh      YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
P.aeruginosa_HM14_Idh      YDKIKSLPASQQEEILHDIHEVYSHRPEMAMVDSVKGITNLHIPSDVIVDASMPAMIRNSGQMWGKDGKQKDTKAVMPESTYARIYQEMINFCKTNGAFD 400
                           ****************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_Idh      PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHKVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_PA14_Idh      PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_M1_Idh        PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHDVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_M25_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHDVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_V43_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_P24_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM1_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHDVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM2_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM3_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHDVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM4_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHDVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM5_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHDVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM6_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM7_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM8_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM9_Idh       PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM10_Idh      PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM11_Idh      PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHDVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM12_Idh      PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM13_Idh      PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHDVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
P.aeruginosa_HM14_Idh      PTTMGSVPNVGLMAQKAEEYGSHDKTFEMTADGTMRVVLADGSVLMQHEVETGDIWRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARQSDTPAIFWLDPERAHDRELRK 500
                           ************************************************.***************************************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_Idh      KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_PA14_Idh      KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_M1_Idh        KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_M25_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_V43_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_P24_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM1_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM2_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM3_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM4_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM5_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM6_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM7_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM8_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM9_Idh       KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM10_Idh      KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM11_Idh      KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM12_Idh      KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM13_Idh      KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
P.aeruginosa_HM14_Idh      KVELYLKDHDLTGLDISIMGYNEAIRVSMERLIRGKDTISVTGNVLRDYLTDLFPIMELGTSAKMLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPKHVQQLVEENYLR 600
                           ************************************************************************************************

P.aeruginosa_PAO1_Idh      WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQNEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_PA14_Idh      WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_M1_Idh        WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_M25_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_V43_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_P24_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM1_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM2_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM3_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM4_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM5_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM6_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM7_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM8_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM9_Idh       WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM10_Idh      WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQNEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM11_Idh      WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM12_Idh      WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM13_Idh      WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
P.aeruginosa_HM14_Idh      WDSLGEFLALAVSLEETGIKTGNAKAKLLGKALDEATGKLLDNNKSPSRKVGDIDNRGSHFYLAMYWAQALAAQDEDAELKAHFAPLAKALTEQEATIVA 700
                           ***********************************************************************:*************************
```

```
P.aeruginosa_PAO1_Idh      ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_PA14_Idh      ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_M1_Idh        ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_M25_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_V43_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_P24_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMHPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM1_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM2_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM3_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM4_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM5_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM6_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM7_Idh       ELNAVQGRPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM8_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM9_Idh       ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM10_Idh      ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM11_Idh      ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM12_Idh      ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM13_Idh      ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMRPSATFNAAIDSLA 741
P.aeruginosa_HM14_Idh      ELNAVQGKPAEIGGYYRSNPELTSKVMHPSATFNAAIDSLA 741
                           *******:******************:*************
```

8.5 Vergleich der Genome von M1 und M25

8.5.1 Statistische Daten zur Sequenzierung der CF-Isolate M1 und M25

Tabelle 8.11 Statistische Daten zur Sequenzierung von M1 und M25

	Deutsche Erläuterung	M1	M25
Aligned Reads (All/PairedEnd)	(Alle Reads/Reads von beiden Seiten sequenziert)	1,098,076/433,021	979,073/373,941
Assembled Bases	Insgesamt verwendete Basen	212,122,749	184,942,538
PE-Size	Durchschnittslänge der Reads in Basen	7,048 +/- 1,762	6,519 +/- 1,629
Scaffolds (All/True)	(Alle Scaffolds, die nicht zugeordnet werden konnten/Scaffolds, die überhaupt nicht zugeordnet werden können)	7/1	11/2
Contigs (Scaffolded/Large/All)	(Contigs in Scaffolds/Contigs > 500 bp/Alle Contigs)	172/219/264	151/183/220
Bases in Scaffolds	Alle Scaffolds + geschätzte Größen der Lücken; entspricht ungefähr Genomgröße	6,704,929	6,798,475
Coverage	Durchschnitt der Sequenzierungen	31.64	27.20
GC content (%)	GC-Gehalt (%)	66.16	66.16
Avg. Scaffold	Durchschnittsgröße eines Scaffolds in Basen	957,847	618,043
N50 Scaffold	Median der Scaffolds in Basen	6,686,275	5,014,174
Largest Scaffold	Größter Scaffold in Basen	6,686,275	5,014,174
Avg. Contig	Durchschnittsgröße eines Contigs in Basen	30,059	36,486
N50 Contig	Median der Contigs in Basen	87,331	108,878
Largest Contig	Größter Contig in Basen	326,884	321,356

8.5.2 SNP- und Indel-Analyse von M1 und M25

Tabelle 8.12 Gefundene SNPs und Indels bei M1 und M25
In dieser Tabelle sind alle SNPs und Indels dargestellt, die in M1 und M25 gefunden wurden, wobei M1 als Referenzstamm diente. Es wurden dabei nur SNPs und Indels berücksichtigt, bei denen eine Frequency > 75 % und eine Coverage > 10 vorhanden war. Abkürzungen: Ref. = Reference, SNP = *single nucleotide polymorphism*, Ins = Insertions, Del = Deletions, Freq. = Frequency, Cov. = Coverage, Subst. = Substitution, No. = Number

Position	M1 Ref.	Type	M25 SNP	Freq.	Count	Cov.	Subst.	Gene in M1	≙ PA No.	Gene	Annotation
608	A	SNP	G	93,0	40	43	-	-		-	-
5196	G	SNP	C	98,0	50	51	Glu->Asp	P_aeru_M1_draft_68	PA0004	*gyrB*	DNA gyrase subunit B
13523	G	SNP	A	100,0	48	48	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_74	PA0010	*tag*	DNA-3-methyladenine glycosidase I
15800	A	SNP	G	88,0	22	25	-	-		-	-
18346	G	SNP	C	96,3	26	27	His->Gln	P_aeru_M1_draft_81	PA0017	*rsmB*	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B
19479	G	SNP	A	100,0	20	20	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_81	PA0017	*rsmB*	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B
27809	C	SNP	T	100,0	28	28	-	P_aeru_M1_draft_90	PA0026	*plcB*	phospholipase C, PlcB
38651	C	SNP	T	97,2	35	36	-	-		-	-
58061	T	SNP	C	100,0	35	35	-	-		-	-
68767	A	SNP	G	100,0	31	31	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_120	PA0054	*kptA*	Probable RNA 2'-phosphotransferase
75591	A	SNP	G	100,0	20	20	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_130	PA0064	-	hypothetical protein
83647	T	SNP	C	97,4	38	39	His->Arg	P_aeru_M1_draft_137	PA0071	-	hypothetical protein
85594	C	SNP	A	76,8	43	56	Ser->Ile	P_aeru_M1_draft_139	PA0073	-	ABC transporter ATP-binding protein
85595	T	Del	GAP	76,8	43	56	-	P_aeru_M1_draft_139	PA0073	-	ABC transporter ATP-binding protein
89012	T	SNP	C	100,0	31	31	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_141	-	*ppkA*	serine/threonine protein kinase PpkA
128724	A	SNP	G	100,0	48	48	His->Arg	P_aeru_M1_draft_174	PA0106	*ctaD*	Cytochrome c oxidase subunit 1
132833	C	SNP	T	94,4	34	36	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_179	PA0111	-	hypothetical protein
136396	C	SNP	T	100,0	39	39	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_183	PA0115	-	hypothetical protein
139692	A	SNP	G	100,0	34	34	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_187	PA0119	*dctA1*	C4-dicarboxylate transport protein 1
140583	G	SNP	A	97,4	37	38	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_188	PA0120	-	transcriptional regulator
148491	C	SNP	T	97,1	34	35	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_198	PA0130	*mmsA*	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]
170756	G	SNP	A	100,0	33	33	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_217	PA0149	-	ECF subfamily RNA polymerase sigma-70 factor
171419	C	SNP	G	100,0	19	19	Ala->Gly	P_aeru_M1_draft_218	PA0150	-	transmembrane sensor
197881	G	SNP	A	97,1	34	35	-	-		-	-
205121	C	SNP	T	100,0	18	18	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_245	PA0178	*cheA*	Chemotaxis protein CheA
215576	C	SNP	T	100,0	33	33	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_254	PA0187	-	hypothetical protein
218927	A	SNP	G	100,0	28	28	-	P_aeru_M1_draft_257	PA0190	-	acid phosphatase
233560	A	SNP	G	97,4	38	39	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_271	PA0208	-	hypothetical protein

240012	T	SNP	C	97,1	34	35	-	-		-	-
245802	A	SNP	G	100,0	35	35	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_284	PA0220	-	amino acid APC family transporter
249926	G	SNP	A	100,0	33	33	Thr->Ile	P_aeru_M1_draft_288	PA0224	-	class II aldolase/adducin domain-containing protein
268331	C	SNP	T	93,2	41	44	-	P_aeru_M1_draft_305	PA0241	-	major facilitator superfamily (MFS) transporter
279204	T	SNP	C	100,0	31	31	-	P_aeru_M1_draft_315	PA0251	-	hypothetical protein
283671	A	SNP	G	100,0	56	56	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_320	PA0256	-	hypothetical protein
293849	G	SNP	A	98,4	61	62	-	P_aeru_M1_draft_326	-	-	hypothetical protein
293912	G	SNP	T	100,0	28	28	-	-		-	-
293915	T	SNP	C	96,0	24	25	-	-		-	-
293933	C	SNP	T	100,0	25	25	-	-		-	-
293942	A	SNP	G	100,0	26	26	-	-		-	-
307194	C	SNP	T	100,0	36	36	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_338	PA0275	-	transcriptional regulator
328434	T	SNP	C	100,0	30	30	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_357	PA0294	-	hypothetical protein
345462	T	SNP	C	100,0	48	48	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_371	-	-	hypothetical protein
348470	G	SNP	A	96,4	27	28	-	P_aeru_M1_draft_375	PA0310	-	hypothetical protein
351967	C	SNP	T	92,9	26	28	-	-		-	-
370588	A	SNP	G	100,0	17	17	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_396	PA0331	*ilvA*	L-threonine dehydratase biosynthetic IlvA
374569	A	SNP	G	100,0	24	24	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_400	PA0334	-	hypothetical protein
375319	T	SNP	C	100,0	29	29	-	P_aeru_M1_draft_401	PA0335	-	hypothetical protein
376608	A	SNP	G	100,0	49	49	-	-		-	-
390820	T	SNP	C	100,0	30	30	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_416	PA0348	-	hypothetical protein
397320	C	SNP	T	100,0	31	31	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_422	PA0354	-	putative SAM-dependent methyltransferase
426039	A	SNP	G	100,0	49	49	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_452	PA0383	-	Uncharacterized protein PA3922
439168	C	SNP	T	100,0	32	32	-	-		-	-
441786	G	SNP	A	100,0	26	26	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_469	PA0400	*metC*	Cystathionine beta-lyase
443064	C	SNP	G	100,0	31	31	Val->Leu	P_aeru_M1_draft_470	PA0401	*pyrC'*	Dihydroorotase-like protein
445340	T	SNP	C	96,4	27	28	-	P_aeru_M1_draft_472	PA0403	*pyrR*	Bifunctional protein pyrR
470276	A	SNP	G	100,0	38	38	Ile->Val	P_aeru_M1_draft_493	PA0423	-	UPF0312 protein PA14_05510
480052	C	SNP	T	98,2	56	57	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_499	PA0429	-	hypothetical protein
481303	C	SNP	T	95,2	20	21	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_500	PA0430	*metF*	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
485302	C	SNP	T	100,0	33	33	-	-		-	-
489031	A	SNP	G	96,4	27	28	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_506	PA0437	*codA*	Cytosine deaminase
499257	C	SNP	T	91,7	22	24	-	-		-	-
507380	G	SNP	A	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_519	PA0452	-	Uncharacterized protein AF_1420
514879	A	SNP	G	100,0	43	43	Ile->Thr	P_aeru_M1_draft_526	PA0458	*hsrA*	Probable transport protein hsrA

519906	A	SNP	G	100,0	36	36	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_529	PA0461	-	hypothetical protein
524774	A	SNP	G	92,9	39	42	Met->Val	P_aeru_M1_draft_532	PA0465	-	inner membrane protein
530874	C	SNP	T	100,0	26	26	-	-		-	-
540397	A	SNP	G	100,0	31	31	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_547	PA0482	*glcB*	Malate synthase G
541181	C	SNP	T	96,9	31	32	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_547	PA0482	*glcB*	Malate synthase G
551300	C	SNP	T	100,0	34	34	-	P_aeru_M1_draft_560	PA0493	-	-
553623	G	SNP	A	100,0	30	30	Arg->His	P_aeru_M1_draft_562	PA0495	-	hypothetical protein
566769	C	SNP	T	96,7	29	30	Thr->Ile	P_aeru_M1_draft_574	PA0508	-	acyl-CoA dehydrogenase
576421	G	SNP	A	97,7	42	43	His->Tyr	P_aeru_M1_draft_584	PA0519	*nirS*	Nitrite reductase
589410	A	SNP	G	100,0	41	41	His->Arg	P_aeru_M1_draft_600	PA0533	-	transcriptional regulator
592561	C	SNP	T	96,6	28	29	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_602	PA0535	-	transcriptional regulator
594096	C	SNP	T	100,0	37	37	Arg->His	P_aeru_M1_draft_603	PA0536	-	putative dehydrogenase
617918	A	SNP	G	100,0	22	22	-	-		-	-
619574	T	SNP	C	100,0	28	28	-	P_aeru_M1_draft_632	PA0565	-	hypothetical protein
620690	G	SNP	A	100,0	48	48	Val->Met	P_aeru_M1_draft_634	PA0567	-	hypothetical membrane protein
625294	C	SNP	T	100,0	25	25	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_639	PA0572	-	hypothetical protein
629172	A	SNP	G	100,0	36	36	-	-		-	-
631404	A	SNP	C	100,0	28	28	Cys->Gly	P_aeru_M1_draft_642	PA0575	-	hypothetical protein
643568	C	SNP	T	100,0	56	56	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_653	PA0586	*ycgB*	Uncharacterized protein ycgB
651555	C	SNP	T	100,0	34	34	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_660	PA0593	*pdxA1*	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase 1
656124	A	SNP	G	96,7	29	30	-	P_aeru_M1_draft_663	PA0596	-	hypothetical protein
689251	G	SNP	A	100,0	35	35	Met->Ile	P_aeru_M1_draft_698	PA0650	*trpD*	Anthranilate phosphoribosyltransferase
696124	G	SNP	A	100,0	24	24	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_705	PA0657	-	hypothetical protein
740144	A	SNP	G	100,0	35	35	-	P_aeru_M1_draft_745	PA4250	*rpsN*	30S ribosomal protein S14
742554	A	SNP	G	100,0	41	41	Lys->Arg	P_aeru_M1_draft_751	PA4244	*rplO*	50S ribosomal protein L15
750832	A	SNP	G	90,9	20	22	Tyr->His	P_aeru_M1_draft_761	PA4234	*uvrA*	UvrABC system protein A
754582	A	SNP	G	100,0	27	27	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_763	PA4232	*ssb*	Single-stranded DNA-binding protein
755983	A	SNP	G	100,0	25	25	-	P_aeru_M1_draft_764	PA4231	*pchA*	Salicylate biosynthesis isochorismate synthase
759807	A	SNP	G	100,0	24	24	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_768	PA4227	*pchR*	Regulatory protein pchR
760717	C	SNP	T	100,0	20	20	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_769	PA4226	*pchE*	dihydroaeruginoic acid synthetase
766715	G	SNP	A	100,0	19	19	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_770	PA4225	*pchF*	pyochelin synthetase
767010	T	SNP	C	100,0	10	10	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_770	PA4225	*pchF*	pyochelin synthetase
769305	A	SNP	G	100,0	16	16	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_771	-	*pchF*	pyochelin synthetase
776008	A	SNP	G	100,0	22	22	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_776	PA4221	*fptA*	Fe(3+)-pyochelin receptor
776294	C	SNP	T	96,8	30	31	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_776	PA4221	*fptA*	Fe(3+)-pyochelin receptor

786556	A	Del	GAP	100,0	11	11	-	-		-	-
786557	G	Del	GAP	91,7	11	12	-	-		-	-
793222	G	Del	GAP	100,0	36	36	-	-		-	-
793224	T	Del	GAP	100,0	33	33	-	P_aeru_M1_draft_790	PA2458	-	hypothetical protein
797875	G	SNP	C	76,6	121	158	-	P_aeru_M1_draft_65	-	-	23s_rRNA
805119	A	SNP	G	100,0	34	34	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_794	PA4207	-	Uncharacterized transporter HI_0895
808365	A	SNP	G	100,0	21	21	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_797	PA4204	-	hypothetical protein
808425	C	SNP	T	100,0	25	25	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_797	PA4204	-	hypothetical protein
813809	A	SNP	G	100,0	30	30	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_802	PA4199	-	putative acyl-CoA dehydrogenase
825557	T	SNP	C	100,0	28	28	His->Arg	P_aeru_M1_draft_812	PA4189	*puuC*	Aldehyde dehydrogenase PuuC
828940	A	SNP	G	100,0	43	43	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_815	PA4187	-	major facilitator superfamily (MFS) transporter
829692	A	SNP	G	100,0	36	36	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_816	PA4186	-	hypothetical protein
833187	T	SNP	C	100,0	19	19	Ser->Pro	P_aeru_M1_draft_819	PA4183	-	hypothetical protein
834527	C	SNP	T	80,0	16	20	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_821	PA4181	-	hypothetical protein
836510	C	SNP	T	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_822	PA4180	-	acetolactate synthase
842758	C	SNP	T	100,0	18	18	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_828	PA4174	-	putative transcriptional regulator
855956	C	SNP	T	100,0	38	38	-	P_aeru_M1_draft_841	PA4162	-	short-chain dehydrogenase
859894	T	SNP	C	100,0	24	24	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_845	PA4158	*fepC*	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC
863899	A	SNP	G	92,3	12	13	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_848	PA4155	-	hypothetical protein
867711	G	SNP	A	100,0	30	30	-	-		-	-
870372	C	SNP	T	100,0	25	25	Ser->Asn	P_aeru_M1_draft_853	PA4149	-	hypothetical protein
877157	T	SNP	C	100,0	12	12	-	-		-	-
882395	C	SNP	T	96,3	26	27	Val->Ile	P_aeru_M1_draft_861	PA4140	-	hypothetical protein
896965	G	SNP	A	100,0	56	56	-	-		-	-
897278	A	SNP	G	100,0	44	44	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_878	-	-	DNA replication protein DnaC
920715	G	SNP	A	98,3	59	60	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_903	-	-	hypothetical protein
922239	T	SNP	C	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_904	-	-	hypothetical protein
924443	C	SNP	T	100,0	31	31	-	-		-	-
929216	C	SNP	T	100,0	44	44	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_912	PA4135	-	transcriptional regulator
930476	C	SNP	T	89,3	25	28	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_914	PA4133	*fixN*	Cytochrome c oxidase subunit 1 homolog, bacteroid
943419	A	SNP	G	100,0	28	28	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_924	PA4122	*hpaG*	4-hydroxyphenylacetate degradation bifunctional isomerase/decarboxylase
944888	G	SNP	A	100,0	34	34	-	P_aeru_M1_draft_926	PA4120	-	transcriptional regulator
948882	A	SNP	G	100,0	28	28	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_929	PA4117	*bphP*	Bacteriophytochrome
956163	T	SNP	C	100,0	25	25	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_934	PA4112	-	hypothetical protein

957915	C	SNP	T	97,1	33	34	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_934	PA4112	-	hypothetical protein
959399	A	SNP	G	100,0	24	24	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_936	PA4110	*ampC*	Beta-lactamase
964959	C	SNP	T	96,4	27	28	-	P_aeru_M1_draft_942	PA4105	-	hypothetical protein
971500	A	SNP	G	85,7	18	21	-	P_aeru_M1_draft_949	PA4099	-	hypothetical protein
972892	G	Del	GAP	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_950	PA4098	-	short-chain dehydrogenase
978110	T	SNP	C	100,0	28	28	Cys->Arg	P_aeru_M1_draft_954	PA4093	-	hypothetical protein
978964	C	SNP	T	96,7	29	30	-	P_aeru_M1_draft_956	PA4091	*hpaB*	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oxygenase component
980467	C	SNP	T	83,3	20	24	-	-		-	-
983203	A	SNP	G	96,3	26	27	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_959	PA4088	-	hypothetical protein
991466	A	SNP	G	85,7	18	21	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_965	PA4082	*cupB5*	adhesive protein CupB5
993905	T	SNP	C	79,2	19	24	-	-		-	-
1000842	T	SNP	C	95,2	20	21	Glu->Gly	P_aeru_M1_draft_974	PA4074	-	transcriptional regulator
1009193	C	SNP	T	96,3	26	27	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_982	PA4067	-	hypothetical protein
1010563	A	SNP	G	100,0	14	14	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_984	PA4065	-	hypothetical protein
1019005	C	SNP	T	100,0	14	14	-	P_aeru_M1_draft_993	PA4054	*ribB*	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase
1032657	C	SNP	T	97,7	42	43	-	P_aeru_M1_draft_1005	PA4039	-	hypothetical protein
1052636	A	SNP	G	100,0	28	28	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_1024	PA4021	*acoR*	Acetoin catabolism regulatory protein
1055017	A	SNP	G	100,0	18	18	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_1025	PA4020	*mpl*	UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase
1078113	C	SNP	T	100,0	16	16	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1049	PA3995	-	hypothetical protein
1083785	C	SNP	T	95,5	21	22	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1055	PA3987	*leuS*	Leucine--tRNA ligase
1087184	G	SNP	A	100,0	29	29	Glu->Lys	P_aeru_M1_draft_1057	PA3985	-	hypothetical protein
1090373	A	SNP	G	100,0	31	31	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_1060	PA3982	-	Probable rRNA maturation factor
1096618	C	SNP	T	100,0	20	20	-	P_aeru_M1_draft_1066	PA3975	-	hypothetical protein
1098391	C	SNP	T	100,0	37	37	Gln->_	P_aeru_M1_draft_1067	PA3974	-	hypothetical protein
1115906	T	SNP	C	100,0	32	32	-	-		-	-
1131705	A	SNP	G	100,0	31	31	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_1097	-	-	hypothetical protein
1133724	C	SNP	T	100,0	51	51	Cys->Tyr	P_aeru_M1_draft_1098	-	-	hypothetical protein
1135937	A	SNP	G	100,0	51	51	-	-		-	-
1141500	G	SNP	A	100,0	36	36	Arg->Trp	P_aeru_M1_draft_1106	PA3954	-	hypothetical protein
1141799	A	SNP	G	92,7	38	41	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_1106	PA3954	-	hypothetical protein
1143373	C	SNP	T	100,0	27	27	-	P_aeru_M1_draft_1108	PA3952	-	hypothetical protein
1147285	C	SNP	T	100,0	35	35	Arg->His	P_aeru_M1_draft_1112	PA3948	*bvgA*	Virulence factors putative positive transcription regulator BvgA

1153832	A	SNP	G	100,0	36	36	-	-		-	-
1156186	A	SNP	G	97,4	37	38	Glu->Gly	P_aeru_M1_draft_1117	PA3942	*tesB*	Acyl-CoA thioesterase 2
1160558	C	SNP	T	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_1122	PA3937	*tauB*	Taurine import ATP-binding protein TauB
1161584	C	SNP	T	100,0	15	15	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_1123	PA3936	*tauC*	Taurine transport system permease protein tauC
1182148	C	SNP	T	100,0	25	25	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_1138	PA3921	-	putative transcriptional regulator
1187142	G	SNP	A	93,5	29	31	-	-		-	-
1188545	G	SNP	A	100,0	24	24	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_1140	PA3919	-	hypothetical protein
1188804	C	SNP	T	92,3	12	13	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_1141	PA3918	*moaC*	Molybdenum cofactor biosynthesis protein C
1208658	T	SNP	C	96,0	24	25	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_1160	PA3899	-	RNA polymerase sigma factor
1213544	A	SNP	G	100,0	22	22	His->Arg	P_aeru_M1_draft_1165	PA3894	*fusA*	Fusaric acid resistance protein fusA
1219992	A	SNP	G	95,7	22	23	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_1169	PA3890	-	ABC transporter permease
1221007	T	SNP	C	95,0	19	20	-	P_aeru_M1_draft_1170	PA3889	-	hypothetical protein
1221413	C	SNP	T	100,0	24	24	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1171	PA3888	-	ABC transporter permease
1230133	G	SNP	A	100,0	31	31	Gln->_	P_aeru_M1_draft_1182	PA3878	*narX*	two-component sensor NarX
1242264	G	SNP	A	100,0	24	24	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_1190	PA3870	*moaA1*	Molybdenum cofactor biosynthesis protein A 1
1247691	T	SNP	C	100,0	30	30	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_1195	PA3861	*rhlB*	ATP-dependent RNA helicase rhlB
1248195	A	SNP	G	100,0	18	18	Tyr->His	P_aeru_M1_draft_1195	PA3861	*rhlB*	ATP-dependent RNA helicase rhlB
1251101	C	SNP	T	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_1197	PA3859	*estA*	Carboxylesterase 1
1251288	A	SNP	G	100,0	25	25	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_1197	PA3859	*estA*	Carboxylesterase 1
1257802	C	SNP	T	94,7	18	19	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_1205	PA3851	-	hypothetical protein
1258583	T	SNP	C	100,0	14	14	Trp->Arg	P_aeru_M1_draft_1206	PA3850	-	hypothetical protein
1259136	C	SNP	T	100,0	17	17	-	-		-	-
1259141	T	SNP	C	100,0	17	17	-	-		-	-
1259145	T	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
1266810	A	SNP	G	97,7	43	44	-	P_aeru_M1_draft_1216	PA3841	*aexT*	ADP-ribosyltransferase toxin AexT
1274999	A	SNP	G	95,8	46	48	-	-		-	-
1299842	C	SNP	T	100,0	40	40	Thr->Met	P_aeru_M1_draft_1243	PA3816	*cysE*	Serine acetyltransferase
1308806	C	SNP	T	100,0	32	32	-	P_aeru_M1_draft_1254	PA3804	-	hypothetical protein
1319971	G	SNP	A	100,0	30	30	Trp->_	P_aeru_M1_draft_1264	PA3794	-	hypothetical protein
1321159	C	SNP	T	97,1	34	35	Ser->Asn	P_aeru_M1_draft_1266	PA3792	*leuA*	2-isopropylmalate synthase
1328605	C	SNP	T	96,2	25	26	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_1272	PA3786	-	hypothetical protein
1332746	A	SNP	G	91,7	22	24	Ser->Pro	P_aeru_M1_draft_1278	PA3781	-	transporter
1336245	C	SNP	T	100,0	31	31	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1281	PA3778	-	transcriptional regulator
1338343	C	SNP	T	100,0	27	27	-	P_aeru_M1_draft_1283	PA3776	-	hypothetical protein
1358697	G	SNP	A	85,7	12	14	Gly->Glu	P_aeru_M1_draft_1299	PA3765	-	hypothetical protein

1369273	A	SNP	G	100,0	18	18	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_1305	PA3760	-	putative phosphotransferase protein
1374876	G	SNP	A	100,0	37	37	Arg->His	P_aeru_M1_draft_1312	PA3753	-	Uncharacterized protein PA3753
1378714	C	SNP	T	100,0	31	31	-	P_aeru_M1_draft_1316	PA3749	*yhjE*	Inner membrane metabolite transport protein yhjE
1379519	A	SNP	G	97,7	43	44	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_1317	PA3748	*yfjD*	UPF0053 inner membrane protein yfjD
1398734	C	SNP	T	94,7	36	38	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_1336	PA3730	-	hypothetical protein
1410384	A	SNP	G	100,0	26	26	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_1342	PA3724	*lasB*	Pseudolysin
1414245	T	SNP	C	100,0	26	26	Ser->Pro	P_aeru_M1_draft_1348	PA3719	-	hypothetical protein
1414850	C	SNP	T	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_1349	PA3718	-	hypothetical protein
1418957	C	SNP	T	100,0	25	25	-	-		-	-
1428553	C	SNP	T	100,0	28	28	Leu->Phe	P_aeru_M1_draft_1358	PA3708	*wspA*	putative chemotaxis transducer
1429943	T	SNP	C	96,6	28	29	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_1360	PA3706	-	hypothetical protein
1431673	C	SNP	T	100,0	24	24	-	P_aeru_M1_draft_1361	PA3705	*wspD*	hypothetical protein
1436085	C	SNP	T	100,0	14	14	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1450595	C	SNP	T	95,5	21	22	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_1379	PA3687	*ppc*	Phosphoenolpyruvate carboxylase
1452128	G	SNP	A	100,0	18	18	Arg->His	P_aeru_M1_draft_1379	PA3687	*ppc*	Phosphoenolpyruvate carboxylase
1463794	A	SNP	G	88,2	15	17	-	-		-	-
1469321	G	SNP	A	100,0	24	24	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_1395	PA3671	-	hypothetical protein
1476228	A	SNP	G	100,0	23	23	-	P_aeru_M1_draft_1400	PA3666	*dapD*	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase
1519595	G	SNP	A	100,0	39	39	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_1439	PA3624	*pcm*	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
1523972	A	Del	GAP	100,0	13	13	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523973	T	Del	GAP	92,3	12	13	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523974	G	Del	GAP	92,3	12	13	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523975	T	Del	GAP	92,3	12	13	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523976	A	Del	GAP	100,0	13	13	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523977	G	Del	GAP	86,7	13	15	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523978	T	Del	GAP	80,0	12	15	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523979	C	Del	GAP	80,0	12	15	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523980	G	Del	GAP	80,0	12	15	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523981	G	Del	GAP	80,0	12	15	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523982	C	Del	GAP	75,0	12	16	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523983	C	Del	GAP	75,0	12	16	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523984	G	Del	GAP	75,0	12	16	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523985	G	Del	GAP	75,0	12	16	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1523986	C	Del	GAP	75,0	12	16	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS

1523987	G	Del	GAP	80,0	12	15	-	P_aeru_M1_draft_1443	PA3620	*mutS*	DNA mismatch repair protein MutS
1530176	C	SNP	T	100,0	35	35	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_1449	PA3614	-	putative metallo-beta-lactamase superfamily protein
1544136	A	SNP	G	97,0	32	33	Lys->Glu	P_aeru_M1_draft_1462	PA3601	-	Conserved hypothetical protein
1544896	A	SNP	G	100,0	36	36	Cys->Arg	P_aeru_M1_draft_1464	PA3599	-	transcriptional regulator
1545029	C	SNP	T	100,0	33	33	-	P_aeru_M1_draft_1464	PA3599	-	transcriptional regulator
1545042	C	SNP	T	100,0	28	28	Trp->_	P_aeru_M1_draft_1464	PA3599	-	transcriptional regulator
1545729	T	SNP	C	100,0	11	11	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_1465	PA3598	*ramA*	(R)-stereoselective amidase
1556763	A	SNP	G	100,0	33	33	-	-		-	-
1556914	A	SNP	G	100,0	24	24	-	-		-	-
1558931	A	SNP	G	100,0	23	23	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_1474	PA3588	-	porin
1568201	A	SNP	G	100,0	21	21	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_1483	PA3579	*glpK2*	Glycerol kinase 2
1603654	C	SNP	T	97,3	36	37	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_1515	PA3549	*algJ*	Alginate biosynthesis protein AlgJ
1605370	A	SNP	G	100,0	29	29	Tyr->His	P_aeru_M1_draft_1516	PA3548	*algI*	Probable poly(beta-D-mannuronate) O-acetylase
1611067	A	SNP	G	96,4	27	28	Tyr->His	P_aeru_M1_draft_1520	PA3544	*algE*	Alginate production protein AlgE
1629386	C	SNP	T	93,5	29	31	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_1533	PA3531	*bfr*	Bacterioferritin
1632767	T	SNP	C	100,0	21	21	-	P_aeru_M1_draft_1538	PA3526	-	hypothetical protein
1637247	C	SNP	T	100,0	28	28	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_1542	PA3522	*bepE*	Efflux pump membrane transporter BepE
1640213	G	SNP	A	95,2	20	21	-	P_aeru_M1_draft_1542	PA3522	*bepE*	Efflux pump membrane transporter BepE
1643091	A	SNP	G	100,0	31	31	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_1545	PA3519	-	hypothetical protein
1645362	A	SNP	G	100,0	21	21	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_1547	PA3517	-	adenylosuccinate lyase
1652338	C	SNP	T	100,0	16	16	-	P_aeru_M1_draft_1554	PA3492	*rnfD*	Electron transport complex protein RnfD
1653932	A	SNP	G	100,0	12	12	Leu->Ser	P_aeru_M1_draft_1556	PA3491	*rnfC*	Electron transport complex protein RnfC
1657109	C	SNP	T	100,0	33	33	Arg->Gln	P_aeru_M1_draft_1559	PA3484	-	hypothetical protein
1658755	A	SNP	G	88,9	16	18	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_1560	PA3483	-	hypothetical protein
1675724	C	SNP	T	100,0	19	19	Val->Ile	P_aeru_M1_draft_1576	PA3467	-	MFS transporter
1684001	T	SNP	C	100,0	17	17	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_1581	PA3462	-	hypothetical protein
1688849	A	SNP	G	100,0	38	38	-	-		-	-
1691064	C	SNP	T	100,0	39	39	Arg->Trp	P_aeru_M1_draft_1585	PA3458	-	transcriptional regulator
1695984	G	SNP	A	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_1590	PA3455	-	hypothetical protein
1697923	C	SNP	T	96,3	26	27	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_1591	PA3454	*fadA*	3-ketoacyl-CoA thiolase
1699081	A	SNP	G	100,0	25	25	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_1593	PA3452	*mqo1*	Probable malate:quinone oxidoreductase 1
1701267	A	SNP	G	96,6	28	29	His->Arg	P_aeru_M1_draft_1595	PA3450	-	Peroxiredoxin-like protein DDB_G0282517, mitochondrial
1741358	T	SNP	C	100,0	17	17	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_1638	PA3408	-	hypothetical protein
1747052	C	SNP	T	100,0	41	41	Ser->Leu	P_aeru_M1_draft_1642	PA3404	*aprF*	Alkaline protease secretion protein AprF
1749526	T	SNP	C	100,0	25	25	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_1646	PA3401	-	hypothetical protein

1768831	G	SNP	A	92,3	36	39	Gly->Arg	P_aeru_M1_draft_1666	PA3382	*phnE*	Putative phosphonates transport system permease protein phnE
1773092	T	SNP	C	100,0	20	20	Cys->Arg	P_aeru_M1_draft_1672	PA3376	*phnK*	Phosphonates transport ATP-binding protein PhnK
1796825	C	SNP	T	100,0	17	17	-	P_aeru_M1_draft_1691	PA3357	*dsdA*	Probable D-serine dehydratase
1797611	C	SNP	T	95,5	21	22	-	P_aeru_M1_draft_1692	PA3356	-	hypothetical protein
1805825	T	SNP	C	93,8	30	32	-	P_aeru_M1_draft_1700	PA3347	-	hypothetical protein
1808908	G	SNP	A	100,0	22	22	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1703	PA3344	*recQ*	ATP-dependent DNA helicase RecQ
1827006	A	SNP	G	96,6	28	29	Cys->Arg	P_aeru_M1_draft_1719	PA3328	-	FAD-dependent monooxygenase
1827744	C	SNP	T	100,0	25	25	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1719	PA3328	-	FAD-dependent monooxygenase
1828895	A	SNP	G	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_1720	PA3327	-	hypothetical protein
1838329	C	SNP	T	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_1723	PA3324	-	hypothetical protein
1850846	C	SNP	T	100,0	16	16	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1735	PA3311	-	Uncharacterized signaling protein PA3311
1861772	T	SNP	C	100,0	19	19	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_1743	PA3305	-	hypothetical protein
1886046	C	SNP	T	100,0	31	31	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_1762	PA3286	-	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III
1893865	A	SNP	G	100,0	19	19	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_1770	PA3279	*oprP*	Porin P
1904003	C	SNP	T	100,0	25	25	Val->Met	P_aeru_M1_draft_1777	PA3271	-	hypothetical protein
1907621	A	SNP	G	100,0	22	22	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_1779	PA3268	*fecA*	Fe(3+) dicitrate transport protein FecA
1911143	A	SNP	G	100,0	28	28	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_1780	PA3267	-	hypothetical protein
1918332	A	SNP	G	100,0	11	11	-	-		-	-
1928236	T	SNP	C	97,0	32	33	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_1796	PA3250	-	hypothetical protein
1928459	G	SNP	A	100,0	25	25	Gln->_	P_aeru_M1_draft_1796	PA3250	-	hypothetical protein
1942228	A	SNP	G	92,5	37	40	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_1811	PA3235	-	hypothetical protein
1943336	T	SNP	C	100,0	20	20	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_1812	PA3234	*actP*	Cation/acetate symporter ActP
1965200	A	SNP	G	95,7	22	23	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_1836	PA3210	*trkH*	potassium uptake protein TrkH
1974232	C	SNP	T	100,0	20	20	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_1848	PA3198	*scpA*	Segregation and condensation protein A
1978887	A	SNP	G	100,0	24	24	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_1853	PA3194	*edd*	Phosphogluconate dehydratase
1990495	A	SNP	G	100,0	26	26	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_1861	PA3185	-	hypothetical protein
1995096	C	SNP	T	100,0	44	44	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_1866	PA3180	-	putative 7,8-dihydro-8-oxoguanine-triphosphatase
1997190	G	SNP	A	100,0	34	34	-	-		-	-
2006801	A	SNP	G	100,0	29	29	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_1878	PA3168	*gyrA*	DNA gyrase subunit A
2014159	G	SNP	A	100,0	24	24	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_1882	-	*aroA*	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
2023133	G	SNP	A	100,0	31	31	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1889	-	-	hypothetical protein
2027679	G	Del	GAP	100,0	32	32	-	-		-	-
2027680	C	Del	GAP	100,0	32	32	-	-		-	-
2027681	G	Del	GAP	100,0	32	32	-	-		-	-

2027682	G	Del	GAP	100,0	32	32	-	-		-	-
2028181	C	SNP	T	100,0	49	49	Gln->_	P_aeru_M1_draft_1891	-	-	glycosyl transferase-like protein
2037132	C	SNP	T	100,0	37	37	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_1897	PA3138	*uvrB*	UvrABC system protein B
2038426	C	SNP	T	100,0	35	35	Arg->His	P_aeru_M1_draft_1898	PA3137	-	MFS family transporter
2039645	A	SNP	G	96,4	27	28	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_1899	PA3136	-	putative secretion protein
2040832	C	SNP	T	100,0	13	13	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_1900	PA3135	-	transcriptional regulator
2043373	A	SNP	G	90,6	29	32	-	P_aeru_M1_draft_17	-	-	tRNA
2058217	A	SNP	G	100,0	18	18	Ser->Gly	P_aeru_M1_draft_1918	PA3117	*asd*	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase
2064421	C	SNP	T	100,0	16	16	-	-		-	-
2072960	C	SNP	T	100,0	29	29	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1930	PA3105	*xcpQ*	Type II secretion system protein D
2073271	C	SNP	T	100,0	24	24	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_1930	PA3105	*xcpQ*	Type II secretion system protein D
2076721	T	SNP	C	100,0	20	20	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_1933	PA3102	*xcpS*	Type II secretion system protein F
2088475	C	SNP	T	100,0	21	21	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_1944	PA3091	-	hypothetical protein
2094959	A	SNP	G	100,0	19	19	His->Arg	P_aeru_M1_draft_1950	PA3084	-	hypothetical protein
2095675	C	SNP	T	100,0	33	33	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_1951	PA3083	*pepN*	Aminopeptidase N
2102757	A	SNP	G	95,0	19	20	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_1954	PA3080	-	putative BNR/Asp-box repeat protein
2108554	C	SNP	T	95,8	23	24	-	P_aeru_M1_draft_1958	PA3076	-	hypothetical protein
2114388	C	SNP	T	100,0	24	24	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_1963	PA3071	-	hypothetical protein
2118047	A	SNP	G	95,2	20	21	His->Arg	P_aeru_M1_draft_1966	PA3068	*gdhB*	NAD^+-specific glutamate dehydrogenase
2126571	C	SNP	T	100,0	41	41	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_1970	PA3064	*pelA*	PelA protein
2145426	A	SNP	G	100,0	18	18	Ile->Val	P_aeru_M1_draft_1983	PA3048	*rlmL*	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase L
2147101	C	SNP	T	100,0	10	10	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_1984	PA3047	-	hypothetical protein
2174035	C	SNP	T	100,0	15	15	-	P_aeru_M1_draft_2009	PA3022	-	hypothetical protein
2175309	C	SNP	T	100,0	24	24	Arg->His	P_aeru_M1_draft_2010	PA3020	-	hypothetical protein
2187629	G	SNP	A	92,0	23	25	-	P_aeru_M1_draft_2018	PA3011	*topA*	DNA topoisomerase 1
2189226	A	SNP	G	89,3	25	28	-	-		-	-
2196716	A	SNP	G	100,0	26	26	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_2027	PA3002	*mfd*	Transcription-repair-coupling factor
2209952	A	SNP	G	100,0	23	23	-	P_aeru_M1_draft_2039	PA2990	-	phosphodiesterase
2217817	A	SNP	G	100,0	34	34	-	P_aeru_M1_draft_2046	PA2983	-	tolQ-type transporter
2218983	C	SNP	T	100,0	27	27	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_2048	PA2981	*lpxK*	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase
2250214	C	SNP	T	100,0	19	19	-	-		-	-
2255461	T	SNP	C	100,0	14	14	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2085	PA2944	*cobN*	Aerobic cobaltochelatase subunit CobN
2259304	C	SNP	T	100,0	19	19	-	-		-	-
2259876	C	SNP	T	100,0	19	19	-	P_aeru_M1_draft_2087	PA2942	-	Uncharacterized protein Rv2850c/MT2916
2270833	C	SNP	T	100,0	23	23	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_2096	PA2932	*nemA*	N-ethylmaleimide reductase

2273710	C	SNP	T	100,0	34	34	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_2100	PA2928	-	hypothetical protein
2281972	A	SNP	G	92,9	13	14	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_2108	PA2921	-	putative transcriptional regulator
2284793	A	SNP	G	100,0	17	17	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_2111	PA2918	-	hypothetical protein
2314608	A	SNP	G	100,0	18	18	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_2140	PA2891	*MCCC 1*	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial
2331104	T	SNP	C	100,0	16	16	Trp->Arg	P_aeru_M1_draft_2156	PA2874	-	hypothetical protein
2336097	A	SNP	G	100,0	20	20	Cys->Arg	P_aeru_M1_draft_2159	PA2870	-	hypothetical protein
2359081	C	SNP	T	100,0	25	25	-	P_aeru_M1_draft_2184	PA2844	-	hypothetical protein
2377867	C	SNP	T	100,0	37	37	Arg->His	P_aeru_M1_draft_2200	PA2828	*alaA*	Glutamate-pyruvate aminotransferase AlaA
2379520	G	SNP	A	100,0	24	24	Cys->Tyr	P_aeru_M1_draft_2203	PA2825	*ospR*	OspR
2397978	C	SNP	T	95,8	23	24	-	P_aeru_M1_draft_2222	PA2812	*yadG*	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YadG
2414807	C	SNP	T	100,0	18	18	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_2241	PA2792	-	hypothetical protein
2417026	C	SNP	T	100,0	33	33	-	P_aeru_M1_draft_2243	-	-	hypothetical protein
2422855	A	SNP	G	100,0	17	17	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2248	PA2787	*cpg2*	glutamate carboxypeptidase
2435470	A	SNP	G	100,0	17	17	-	P_aeru_M1_draft_2264	PA2772	-	hypothetical protein
2442338	G	SNP	A	100,0	16	16	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_2274	PA2764	-	hypothetical protein
2443338	G	SNP	A	100,0	37	37	-	-		-	-
2448204	G	SNP	A	100,0	20	20	-	P_aeru_M1_draft_2282	PA2758	-	transcriptional regulator
2450115	A	SNP	G	90,0	18	20	-	-		-	-
2462186	C	SNP	T	100,0	31	31	-	P_aeru_M1_draft_2305	PA2743	*infC*	Translation initiation factor IF-3
2465564	G	SNP	A	100,0	23	23	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_2309	PA2739	*pheT*	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit
2467631	A	SNP	G	100,0	24	24	-	-		-	-
2470983	A	SNP	G	100,0	21	21	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_2314	-	-	hypothetical protein
2478268	T	SNP	G	100,0	26	26	Asn->His	P_aeru_M1_draft_2320	PA2728	-	hypothetical protein
2478779	C	SNP	T	95,2	20	21	-	P_aeru_M1_draft_2320	PA2728	-	hypothetical protein
2483285	C	SNP	T	100,0	17	17	-	-		-	-
2484981	C	SNP	T	95,8	23	24	-	P_aeru_M1_draft_2322	PA2725	-	hypothetical protein
2485207	A	SNP	G	100,0	12	12	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_2322	PA2725	-	hypothetical protein
2501630	T	SNP	C	100,0	28	28	-	-		-	-
2509893	A	SNP	G	93,8	15	16	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_2346	PA2699	-	putative hydrolase
2537281	T	SNP	C	100,0	20	20	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2368	PA2678	-	ABC transporter permease
2542390	A	SNP	G	100,0	13	13	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_2374	PA2672	-	hypothetical protein
2555286	A	SNP	G	100,0	15	15	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_2389	PA2656	-	two-component sensor
2555856	A	SNP	G	100,0	23	23	His->Arg	P_aeru_M1_draft_2389	PA2656	-	two-component sensor

2559541	T	SNP	C	100,0	19	19	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_2392	PA2653	-	Uncharacterized membrane protein VP2115
2568938	C	SNP	T	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_2398	PA2647	*nuoL*	NADH-quinone oxidoreductase subunit L
2578684	C	SNP	T	100,0	34	34	Val->Met	P_aeru_M1_draft_2407	PA2638	*nuoB*	NADH-quinone oxidoreductase subunit B
2596861	C	SNP	T	100,0	42	42	Thr->Ile	P_aeru_M1_draft_2423	PA2623	*icd*	Isocitrate dehydrogenase [$NADP^+$]
2602197	C	SNP	T	100,0	17	17	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_2429	PA2617	*aat*	Leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase
2609215	G	SNP	A	100,0	25	25	Val->Ile	P_aeru_M1_draft_2434	PA2612	*serS*	Serine--tRNA ligase
2615639	C	SNP	T	100,0	19	19	Glu->Lys	P_aeru_M1_draft_2443	PA2603	-	hypothetical protein
2616827	A	SNP	G	100,0	20	20	Ser->Pro	P_aeru_M1_draft_2443	PA2603	-	hypothetical protein
2616850	A	SNP	G	100,0	21	21	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_2443	PA2603	-	hypothetical protein
2619375	A	SNP	G	100,0	37	37	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_2447	PA2600	-	putative flavin-dependent oxidoreductase
2620339	C	SNP	T	100,0	10	10	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_2448	-	-	-
2624976	A	SNP	G	100,0	29	29	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_2453	PA2595	-	hypothetical protein
2625475	G	SNP	A	100,0	32	32	-	P_aeru_M1_draft_2453	PA2595	-	hypothetical protein
2626174	C	SNP	T	100,0	12	12	-	P_aeru_M1_draft_2454	PA2594	-	putative periplasmic aliphatic sulfonate-binding protein
2641660	A	SNP	G	92,9	13	14	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_2462	-	*pltC*	polyketide synthase type I
2664548	C	SNP	T	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_2478	PA2589	-	hypothetical protein
2665459	T	SNP	G	100,0	24	24	Val->Gly	P_aeru_M1_draft_2478	PA2589	-	hypothetical protein
2668825	C	SNP	T	100,0	35	35	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_2481	PA2586	*gacA*	Response regulator gacA
2672928	A	SNP	G	93,3	28	30	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_2484	PA2583	-	sensor/response regulator hybrid
2681655	G	SNP	A	100,0	13	13	Gly->Arg	P_aeru_M1_draft_2491	PA2576	-	putative permease
2693038	G	SNP	A	100,0	33	33	-	-		-	-
2699375	C	SNP	T	100,0	15	15	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_2507	PA2561	-	putative chemotaxis transducer
2707293	T	SNP	C	84,6	11	13	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_2515	PA2555	-	AMP-binding protein
2723872	A	SNP	G	100,0	11	11	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_2529	PA2542	-	hypothetical protein
2737430	C	SNP	T	93,8	15	16	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_2541	PA2530	-	hypothetical protein
2749111	A	SNP	G	100,0	18	18	Glu->Gly	P_aeru_M1_draft_2546	PA2525	-	hypothetical protein
2751685	A	SNP	G	100,0	62	62	-	-		-	-
2756964	C	SNP	T	100,0	26	26	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_2552	PA2520	*czcA*	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA
2768564	C	SNP	T	100,0	19	19	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_2563	PA2510	*catR*	HTH-type transcriptional regulator CatR
2771066	C	SNP	T	100,0	13	13	-	P_aeru_M1_draft_2566	PA2507	*catA*	Catechol 1,2-dioxygenase
2776036	T	SNP	G	100,0	14	14	Phe->Val	P_aeru_M1_draft_2571	PA2502	-	putative kinase
2791784	A	SNP	T	100,0	30	30	-	-		-	-
2804099	A	SNP	G	100,0	24	24	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_2595	PA2477	-	thiol:disulfide interchange protein
2813363	T	SNP	C	94,1	16	17	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2604	PA2467	-	hypothetical protein
2813386	A	SNP	G	100,0	15	15	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_2604	PA2467	-	hypothetical protein

2827020	C	SNP	T	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_2612	PA2452	-	enterochelin esterase-related enzyme
2834061	A	Del	GAP	100,0	13	13	-	-		-	-
2849965	A	Del	GAP	100,0	11	11	-	P_aeru_M1_draft_2631	-	-	hypothetical membrane protein
2860957	A	SNP	G	100,0	28	28	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2642	PA2426	-	hypothetical protein
2864566	C	SNP	T	100,0	13	13	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_2644	PA2424	*pvdL*	peptide synthase
2866761	A	SNP	G	91,7	11	12	-	P_aeru_M1_draft_2644	PA2424	*pvdL*	peptide synthase
2894095	C	SNP	T	100,0	15	15	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_2662	PA2408	-	ABC transporter ATP-binding protein
2899039	T	SNP	C	100,0	21	21	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2667	-	*lgrC*	Linear gramicidin synthase subunit C
2900287	C	Del	GAP	82,4	14	17	-	P_aeru_M1_draft_2667	-	*lgrC*	Linear gramicidin synthase subunit C
2900289	A	Del	GAP	88,2	15	17	-	P_aeru_M1_draft_2667	-	*lgrC*	Linear gramicidin synthase subunit C
2900290	G	Del	GAP	88,2	15	17	-	P_aeru_M1_draft_2667	-	*lgrC*	Linear gramicidin synthase subunit C
2900291	C	Del	GAP	88,2	15	17	-	P_aeru_M1_draft_2667	-	*lgrC*	Linear gramicidin synthase subunit C
2900292	T	Del	GAP	88,2	15	17	-	P_aeru_M1_draft_2667	-	*lgrC*	Linear gramicidin synthase subunit C
2900293	A	Del	GAP	100,0	16	16	-	P_aeru_M1_draft_2667	-	*lgrC*	Linear gramicidin synthase subunit C
2900294	G	Del	GAP	93,8	15	16	-	P_aeru_M1_draft_2667	-	*lgrC*	Linear gramicidin synthase subunit C
2900295	C	Del	GAP	100,0	16	16	-	-		-	-
2900296	T	Del	GAP	100,0	16	16	-	-		-	-
2900297	A	Del	GAP	100,0	16	16	-	-		-	-
2900298	G	Del	GAP	100,0	16	16	-	-		-	-
2900299	C	Del	GAP	88,9	16	18	-	-		-	-
2900300	T	Del	GAP	84,2	16	19	-	-		-	-
2900301	A	Del	GAP	78,9	15	19	-	-		-	-
2900302	G	Del	GAP	78,9	15	19	-	-		-	-
2900303	C	Del	GAP	78,9	15	19	-	-		-	-
2900304	T	Del	GAP	84,2	16	19	-	-		-	-
2900305	A	Del	GAP	78,9	15	19	-	-		-	-
2900306	G	Del	GAP	75,0	15	20	-	-		-	-
2900395	G	SNP	A	75,0	24	32	-	P_aeru_M1_draft_2668	-	*pvdI*	peptide synthetase
2901979	T	Del	GAP	100,0	12	12	-	-		-	-
2901981	G	SNP	C	100,0	13	13	-	-		-	-
2901984	A	SNP	G	100,0	13	13	-	-		-	-
2910695	C	SNP	T	100,0	11	11	-	P_aeru_M1_draft_2669	-	-	peptide synthase
2922307	T	Del	GAP	100,0	15	15	-	-		-	-
2922309	G	SNP	C	100,0	16	16	-	-		-	-
2923487	A	SNP	G	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_2671	-	-	peptide synthase

2928928	C	SNP	T	100,0	18	18	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_2673	-	-	hypothetical protein
2933482	A	SNP	G	100,0	14	14	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_2676	PA2395	-	PvdO
2942897	A	SNP	G	100,0	12	12	Tyr->His	P_aeru_M1_draft_2682	PA2389	-	hypothetical protein
2954767	G	SNP	A	100,0	16	16	-	P_aeru_M1_draft_2694	PA2378	-	putative aldehyde dehydrogenase
2958431	A	SNP	G	100,0	24	24	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_2696	PA2376	-	transcriptional regulator
2965556	C	SNP	T	100,0	14	14	-	P_aeru_M1_draft_2701	PA2370	-	hypothetical protein
2965934	A	SNP	G	100,0	15	15	-	P_aeru_M1_draft_2701	PA2370	-	hypothetical protein
2970079	G	SNP	A	100,0	23	23	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_2705	PA2366	-	uricase
2973292	C	Del	GAP	89,5	17	19	-	-		-	-
2973293	T	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973294	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973295	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973296	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973297	T	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973298	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973299	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973300	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973301	T	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973302	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973303	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973304	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973305	T	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973306	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973307	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973308	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973309	T	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973310	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973311	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973312	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973313	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973314	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973315	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973316	T	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973317	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973318	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-

2973319	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973320	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973321	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973322	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973323	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973324	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973325	A	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973326	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973327	G	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
2973328	A	Del	GAP	94,4	17	18	-	-		-	-
2985273	A	SNP	G	95,0	19	20	-	P_aeru_M1_draft_2720	PA2353	-	hypothetical protein
2985716	T	SNP	C	100,0	18	18	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_2720	PA2353	-	hypothetical protein
2999012	G	SNP	A	95,5	21	22	-	P_aeru_M1_draft_2730	PA2342	-	Mannitol 2-dehydrogenase
3015768	C	SNP	T	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_2745	PA2328	-	hypothetical protein
3020570	C	SNP	T	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_2748	PA2325	-	hypothetical protein
3023493	G	SNP	A	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_2750	PA2323	-	putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
3025411	C	Del	GAP	93,8	15	16	-	-		-	-
3025413	A	Del	GAP	100,0	15	15	-	-		-	-
3028543	G	SNP	A	100,0	25	25	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_2756	PA2318	-	hypothetical protein
3030991	A	SNP	G	100,0	13	13	Phe->Ser	P_aeru_M1_draft_2758	PA2316	-	putative transcriptional regulator
3055686	A	SNP	G	94,7	18	19	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_2777	PA2300	*chiC*	chitinase
3059770	T	SNP	C	100,0	25	25	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2781	PA2296	-	hypothetical protein
3062639	C	SNP	T	100,0	12	12	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_2783	PA2293	-	putative phycobiliprotein
3066046	A	Del	GAP	100,0	12	12	-	P_aeru_M1_draft_2785	-	-	Conserved hypothetical membrane protein
3066047	G	Del	GAP	100,0	12	12	-	P_aeru_M1_draft_2785	-	-	Conserved hypothetical membrane protein
3066050	A	SNP	G	100,0	12	12	-	-		-	-
3074839	G	SNP	A	100,0	10	10	-	-		-	-
3092100	G	SNP	A	100,0	38	38	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_2810	PA2265	-	Gluconate 2-dehydrogenase flavoprotein
3100785	T	SNP	C	90,5	19	21	Met->Thr	P_aeru_M1_draft_2818	PA2258	*ptxR*	HTH-type transcriptional regulator PtxR
3105569	A	SNP	G	100,0	29	29	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_2822	PA2254	*pvcA*	pyoverdine biosynthesis protein PvcA
3109944	C	SNP	T	100,0	14	14	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_2826	PA2250	*lpdV*	Dihydrolipoyl dehydrogenase
3125860	C	SNP	T	100,0	22	22	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_2840	PA2237	*pslG*	protein PslG
3127534	G	SNP	A	100,0	23	23	-	-		-	-
3137888	T	SNP	C	100,0	14	14	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_2849	-	-	hypothetical protein
3142282	G	SNP	A	100,0	27	27	-	-		-	-

3170874	A	SNP	G	100,0	24	24	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2874	-	*copB*	Copper resistance protein B
3171876	A	SNP	C	100,0	26	26	His->Gln	P_aeru_M1_draft_2875	-	*copA*	Copper resistance protein A
3176323	A	SNP	G	100,0	49	49	-	-		-	-
3181869	A	SNP	G	100,0	35	35	Ser->Pro	P_aeru_M1_draft_2883	-	*silP*	Silver exporting P-type ATPase
3182134	C	SNP	T	97,3	36	37	Gly->Glu	P_aeru_M1_draft_2884	-	-	Conserved hypothetical membrane protein
3191095	A	SNP	G	100,0	24	24	-	-		-	-
3191529	A	Del	GAP	100,0	10	10	-	-		-	-
3195186	T	SNP	C	100,0	13	13	_->Trp	P_aeru_M1_draft_2898	PA2152	-	hypothetical protein
3205782	C	SNP	T	100,0	20	20	-	-		-	-
3210431	A	SNP	G	100,0	11	11	_->Arg	P_aeru_M1_draft_2913	PA2140	-	hypothetical protein
3212478	T	SNP	C	92,3	12	13	-	P_aeru_M1_draft_2916	PA2138	*ligD*	ATP-dependent DNA ligase
3212480	G	SNP	A	100,0	13	13	-	P_aeru_M1_draft_2916	PA2138	*ligD*	ATP-dependent DNA ligase
3218373	T	SNP	C	92,9	13	14	Glu->Gly	P_aeru_M1_draft_2924	PA2132	*cupA5*	chaperone CupA5
3225227	G	SNP	A	100,0	20	20	-	-		-	-
3233659	T	SNP	C	100,0	19	19	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_2933	PA2122	-	hypothetical protein
3238171	T	SNP	C	100,0	11	11	-	-		-	-
3253745	G	SNP	A	100,0	29	29	-	P_aeru_M1_draft_2954	PA2097	-	flavin-binding monooxygenase
3264567	C	SNP	T	100,0	16	16	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_2962	PA2089	-	hypothetical protein
3267426	C	SNP	T	100,0	18	18	Arg->His	P_aeru_M1_draft_2965	PA2086	-	Fluoroacetate dehalogenase
3268192	A	SNP	G	100,0	11	11	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_2967	PA2084	-	hypothetical protein
3273490	A	SNP	G	100,0	16	16	-	-		-	-
3281839	T	SNP	C	86,7	13	15	-	-		-	-
3282314	C	Del	GAP	76,9	10	13	-	P_aeru_M1_draft_2976	PA2075	-	hypothetical protein
3295943	C	SNP	T	92,9	13	14	-	P_aeru_M1_draft_2984	PA2065	*copA*	Copper resistance protein A homolog
3303731	G	SNP	A	100,0	19	19	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_2989	PA2060	*yejE*	Inner membrane ABC transporter permease protein yejE
3324061	T	SNP	C	100,0	22	22	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_3007	PA2044	-	hypothetical protein
3332070	G	SNP	A	100,0	19	19	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_3013	PA2039	-	hypothetical protein
3347815	T	Del	GAP	100,0	10	10	-	-		-	-
3349120	A	SNP	G	100,0	21	21	_->Arg	P_aeru_M1_draft_3031	PA2020	-	transcriptional regulator
3349824	C	SNP	T	100,0	34	34	-	-		-	-
3352530	G	SNP	A	100,0	14	14	-	P_aeru_M1_draft_3033	PA2018	*acrD*	Probable aminoglycoside efflux pump
3354291	G	SNP	A	100,0	17	17	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_3034	-	-	hypothetical secreted protein
3356425	G	SNP	A	100,0	16	16	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_3037	PA2015	*IVD1*	Isovaleryl-CoA dehydrogenase 1, mitochondrial
3357173	G	SNP	A	100,0	14	14	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_3037	PA2015	*IVD1*	Isovaleryl-CoA dehydrogenase 1, mitochondrial
3367176	G	SNP	A	100,0	14	14	Trp->_	P_aeru_M1_draft_3045	PA2006	-	hypothetical protein

3370841	G	SNP	A	100,0	19	19	Trp->_	P_aeru_M1_draft_3047	PA2004	*yxjC*	Uncharacterized transporter YxjC
3371591	C	SNP	T	100,0	17	17	-	P_aeru_M1_draft_3048	PA2003	*hbdH1*	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase
3372009	G	SNP	A	100,0	14	14	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_3048	PA2003	*hbdH1*	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase
3374802	T	SNP	C	100,0	11	11	Ile->Val	P_aeru_M1_draft_3050	PA2001	*atoB*	Acetyl-CoA acetyltransferase
3380768	T	SNP	C	100,0	18	18	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_3056	PA1994	-	hypothetical protein
3382029	C	SNP	T	100,0	10	10	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_3057	PA1993	-	UPF0226 membrane protein PLES_33301
3384163	C	SNP	T	100,0	15	15	-	P_aeru_M1_draft_3059	PA1992	-	putative two-component sensor
3388711	C	SNP	T	100,0	11	11	Met->Ile	P_aeru_M1_draft_3062	PA1989	*pqqE*	Coenzyme PQQ synthesis protein E
3389108	G	SNP	A	100,0	23	23	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_3062	PA1989	*pqqE*	Coenzyme PQQ synthesis protein E
3389245	G	SNP	A	100,0	18	18	-	-		-	-
3399340	G	SNP	A	100,0	17	17	-	P_aeru_M1_draft_3072	PA1978	*agmR*	Glycerol metabolism activator
3404425	G	SNP	A	100,0	12	12	-	P_aeru_M1_draft_3075	PA1975	-	hypothetical protein
3438653	A	SNP	G	100,0	20	20	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_3109	PA1941	-	hypothetical protein
3450319	G	SNP	A	100,0	36	36	-	-		-	-
3452181	A	SNP	G	100,0	21	21	His->Arg	P_aeru_M1_draft_3117	PA1929	-	Conserved hypothetical protein
3466764	G	SNP	A	91,7	11	12	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_3126	PA1920	*nrdD*	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase
3475456	G	SNP	A	96,0	24	25	Gly->Arg	P_aeru_M1_draft_3133	PA1914	-	putative halovibrin
3479093	G	SNP	A	100,0	10	10	Gly->Glu	P_aeru_M1_draft_3138	PA1910	-	hypothetical protein
3501167	G	SNP	A	92,3	36	39	Gly->Glu	P_aeru_M1_draft_3151	PA1892	-	hypothetical protein
3504102	G	SNP	A	90,9	10	11	-	P_aeru_M1_draft_3156	-	-	dihydrodipicolinate synthase
3517143	G	SNP	A	100,0	27	27	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_3168	PA1875	-	hypothetical protein
3519523	G	SNP	A	100,0	15	15	-	-		-	-
3524600	T	SNP	C	90,9	10	11	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_3170	-	-	-
3525760	G	SNP	A	100,0	23	23	-	-		-	-
3525948	T	SNP	C	100,0	24	24	-	-		-	-
3539366	T	SNP	C	94,4	17	18	_->Arg	P_aeru_M1_draft_3181	PA1864	-	transcriptional regulator
3540756	T	SNP	C	100,0	12	12	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_3183	PA1862	*modB*	Molybdenum transport system permease protein modB
3540764	A	SNP	G	100,0	12	12	Ile->Val	P_aeru_M1_draft_3183	PA1862	*modB*	Molybdenum transport system permease protein modB
3543593	G	SNP	C	90,9	20	22	-	-		-	-
3545300	T	SNP	C	100,0	15	15	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_3189	PA1857	*yedI*	Inner membrane protein yedI
3550912	G	SNP	A	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_3195	PA1851	-	hypothetical protein
3554248	G	SNP	A	100,0	16	16	-	P_aeru_M1_draft_3198	PA1848	-	major facilitator superfamily (MFS) transporter
3558610	G	SNP	A	100,0	25	25	Arg->His	P_aeru_M1_draft_3201	PA1845	-	hypothetical protein
3563020	C	SNP	T	100,0	15	15	-	P_aeru_M1_draft_3203	PA1843	*metH*	Methionine synthase

3582404	T	SNP	C	94,1	16	17	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_3227	PA1821	*Ech1*	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial
3584887	G	SNP	A	100,0	19	19	Thr->Ile	P_aeru_M1_draft_3229	PA1819	-	amino acid permease
3595516	G	SNP	A	100,0	19	19	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_3237	PA1810	-	Uncharacterized protein y4wM
3606071	G	SNP	A	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_3244	PA1803	*lon*	Lon protease
3611788	T	SNP	C	100,0	16	16	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_3249	PA1798	-	hypothetical protein
3613031	G	SNP	A	83,3	15	18	Glu->Lys	P_aeru_M1_draft_3250	PA1797	-	hypothetical protein
3688036	G	SNP	A	100,0	25	25	Glu->Lys	P_aeru_M1_draft_3333	PA1784	-	hypothetical protein
3693179	G	SNP	A	100,0	14	14	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_3336	PA1781	*nasD*	Nitrite reductase [NAD(P)H]
3694014	C	SNP	T	100,0	41	41	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_3336	PA1781	*nasD*	Nitrite reductase [NAD(P)H]
3696696	T	SNP	C	93,3	14	15	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_3338	PA1779	-	hypothetical protein
3701874	C	SNP	T	100,0	17	17	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_3344	PA1773	*cmaX*	CmaX protein
3711526	T	SNP	C	100,0	33	33	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_3352	PA1765	-	hypothetical protein
3717953	G	SNP	A	100,0	26	26	Leu->Phe	P_aeru_M1_draft_3357	PA1760	-	hypothetical protein
3720031	C	SNP	T	94,4	17	18	Gly->Arg	P_aeru_M1_draft_3358	PA1759	-	putative transcriptional regulator
3721126	G	SNP	A	100,0	18	18	Gln->_	P_aeru_M1_draft_3358	PA1759	-	putative transcriptional regulator
3739479	G	SNP	A	100,0	12	12	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_3380	PA1737	-	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
3745482	T	SNP	C	100,0	32	32	-	P_aeru_M1_draft_3386	PA1731	-	hypothetical protein
3766441	G	SNP	A	92,3	12	13	Ser->Phe	P_aeru_M1_draft_3405	PA1708	*popB*	translocator protein PopB
3771782	C	SNP	T	100,0	10	10	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_3413	PA1700	-	type III secretion protein
3805787	G	SNP	A	100,0	16	16	Leu->Phe	P_aeru_M1_draft_3448	PA1663	-	transcriptional regulator
3819310	T	SNP	C	100,0	11	11	Lys->Arg	P_aeru_M1_draft_3457	PA1654	-	putative transcriptional regulator, MarR family
3829054	G	SNP	A	100,0	14	14	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_3466	PA1646	-	putative chemotaxis transducer
3837999	T	SNP	C	100,0	16	16	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_3477	-	-	two-component sensor KdpD
3845280	T	SNP	C	100,0	15	15	-	-		-	-
3879805	G	SNP	A	93,8	15	16	-	P_aeru_M1_draft_3513	PA1599	-	transcriptional regulator
3902656	G	SNP	A	100,0	19	19	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_3534	PA1580	*gltA*	Citrate synthase
3915053	T	SNP	C	100,0	15	15	Met->Thr	P_aeru_M1_draft_3549	PA1566	-	putative glutamine synthetase
3922245	A	SNP	G	100,0	26	26	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_3554	PA1561	*aer*	aerotaxis receptor Aer
3922560	G	SNP	A	100,0	12	12	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_3554	PA1561	*aer*	aerotaxis receptor Aer
3938243	T	SNP	C	100,0	14	14	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_3569	PA1546	*hemN*	Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase
3947804	T	SNP	C	100,0	35	35	-	P_aeru_M1_draft_3579	PA1535	-	acyl-CoA dehydrogenase
3955292	T	SNP	C	100,0	26	26	-	-		-	-
3976663	G	SNP	A	100,0	35	35	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_3599	PA1523	*XDH*	Xanthine dehydrogenase/oxidase
3992430	G	SNP	A	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_3612	PA1365	-	putative siderophore receptor

4001951	G	SNP	A	100,0	24	24	Arg->His	P_aeru_M1_draft_3622	PA1354	-	hypothetical protein
4006132	G	SNP	A	100,0	25	25	-	-		-	-
4018757	T	SNP	C	100,0	27	27	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_3638	PA1338	*ggt*	Gamma-glutamyltranspeptidase
4022764	A	SNP	G	100,0	15	15	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_3641	PA1335	*dctD*	C4-dicarboxylate transport transcriptional regulatory protein dctD
4045223	G	SNP	A	100,0	26	26	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_3660	PA1315	-	transcriptional regulator
4050908	A	SNP	G	100,0	18	18	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_3666	PA1309	-	putative transcriptional regulator
4055869	T	SNP	C	100,0	12	12	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_3671	PA1304	-	oligopeptidase
4078056	G	SNP	A	82,8	24	29	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_3690	-	-	conserved hypothetical protein
4082730	T	SNP	C	93,3	14	15	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_3694	PA1507	*ygfU*	Putative purine permease ygfU
4084827	C	SNP	T	87,9	29	33	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_3696	PA1505	*moaA2*	Molybdenum cofactor biosynthesis protein A 2
4090044	C	SNP	T	100,0	29	29	-	P_aeru_M1_draft_3701	PA1500	*glxR*	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase
4093715	T	SNP	C	100,0	18	18	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_3703	PA1498	*pyk*	Pyruvate kinase
4107790	T	SNP	C	100,0	28	28	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_3716	PA1485	-	putative amino acid permease
4112515	T	SNP	C	100,0	15	15	Glu->Gly	P_aeru_M1_draft_3721	PA1481	*dsbE*	Thiol:disulfide interchange protein DsbE
4118677	G	SNP	A	100,0	13	13	-	P_aeru_M1_draft_3728	PA1474	-	hypothetical protein
4126360	T	SNP	C	100,0	12	12	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_3738	PA1463	-	hypothetical protein
4127184	G	SNP	A	100,0	18	18	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_3739	PA1462	-	plasmid partitioning protein
4129227	T	SNP	C	96,6	28	29	-	-		-	-
4129387	G	SNP	A	95,2	20	21	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_3742	PA1459	*cheB1*	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase of group 1 operon
4140266	C	SNP	T	100,0	14	14	-	P_aeru_M1_draft_3750	PA1451	-	hypothetical protein
4142342	T	SNP	C	87,0	20	23	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_3752	PA1449	*flhB*	Flagellar biosynthetic protein flhB
4153108	G	SNP	A	100,0	33	33	Thr->Ile	P_aeru_M1_draft_3764	PA1436	*mdtB*	Multidrug resistance protein MdtB
4166289	G	SNP	A	97,6	41	42	Arg->Gln	P_aeru_M1_draft_3772	-	-	hypothetical protein
4175583	G	SNP	T	100,0	19	19	Gly->Val	P_aeru_M1_draft_3781	PA1418	-	sodium:solute symport protein
4186814	G	SNP	A	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_3791	PA1408	-	hypothetical protein
4187043	C	SNP	T	100,0	29	29	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_3791	PA1408	-	hypothetical protein
4190093	C	SNP	T	100,0	20	20	-	P_aeru_M1_draft_3792	PA1407	-	hypothetical protein
4229493	A	SNP	G	100,0	31	31	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_3825	PA1284	-	acyl-CoA dehydrogenase
4239320	T	SNP	C	100,0	13	13	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_3834	PA1275	*cobD*	Cobalamin biosynthesis protein CobD
4251482	G	SNP	A	100,0	10	10	-	P_aeru_M1_draft_3845	PA1265	-	hypothetical protein
4252867	T	SNP	C	100,0	15	15	-	P_aeru_M1_draft_3846	PA1264	-	putative transcriptional regulator
4258044	G	SNP	A	100,0	10	10	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_3850	PA1259	-	hypothetical protein
4260167	T	SNP	C	100,0	24	24	Tyr->His	P_aeru_M1_draft_3851	PA1258	-	ABC transporter permease

4265382	T	SNP	C	100,0	18	18	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_3856	PA1253	*aldH*	$NADP^+$-dependent fatty aldehyde dehydrogenase
4286572	G	SNP	C	90,0	18	20	-	-		-	-
4288919	A	SNP	G	100,0	11	11	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_3871	PA1237	-	multidrug resistance efflux pump
4307175	C	SNP	T	100,0	22	22	Arg->Trp	P_aeru_M1_draft_3890	PA1219	-	hypothetical protein
4344896	T	SNP	C	100,0	26	26	-	-		-	-
4347518	G	SNP	A	100,0	15	15	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_3924	PA1189	*sprT*	Protein SprT
4355310	G	SNP	A	100,0	16	16	Arg->His	P_aeru_M1_draft_3931	PA1182	-	hypothetical protein
4359222	C	SNP	T	100,0	25	25	Glu->Lys	P_aeru_M1_draft_3933	PA1180	*phoQ*	two-component sensor PhoQ
4369146	G	SNP	A	100,0	18	18	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_3943	PA1169	*lox*	Oleic acid lipoxygenase
4375717	G	SNP	A	96,6	28	29	Gly->Glu	P_aeru_M1_draft_3949	PA1163	-	hypothetical protein
4387614	A	SNP	G	95,7	22	23	-	-		-	-
4388467	A	SNP	C	100,0	32	32	Ile->Leu	P_aeru_M1_draft_3957	PA1155	*nrdB*	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta
4392123	G	SNP	A	100,0	32	32	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_3961	PA1150	*pys2*	Pyocin-S2
4394959	T	SNP	C	100,0	21	21	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_3963	PA1148	*eta*	Exotoxin A
4402187	A	SNP	G	92,3	12	13	Ser->Gly	P_aeru_M1_draft_3967	PA1144	-	MFS family transporter
4430529	G	SNP	A	100,0	12	12	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_3998	PA1113	-	ABC transporter ATP-binding protein/permease
4432499	G	SNP	A	100,0	23	23	-	P_aeru_M1_draft_4001	PA1112	*yliI*	Soluble aldose sugar dehydrogenase yliI
4439210	A	SNP	C	100,0	20	20	Ser->Arg	P_aeru_M1_draft_4007	PA1106	-	hypothetical protein
4465990	G	SNP	A	93,8	15	16	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_4031	-	-	hypothetical protein
4477893	T	SNP	C	100,0	24	24	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_4042	PA1082	*flgG*	Flagellar basal-body rod protein flgG
4489532	G	SNP	A	100,0	29	29	Ser->Leu	P_aeru_M1_draft_4055	PA1069	-	hypothetical protein
4489691	T	SNP	C	100,0	36	36	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_4055	PA1069	-	hypothetical protein
4501571	T	SNP	C	100,0	24	24	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_4070	PA1054	*phaAB*	Probable K(+)/H(+) antiporter subunit A/B
4520877	C	SNP	T	100,0	20	20	-	-		-	-
4524150	T	SNP	C	100,0	30	30	-	P_aeru_M1_draft_4091	PA1032	*quiP*	Acyl-homoserine lactone acylase quiP
4527313	C	SNP	T	93,8	30	32	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_4092	PA1031	*rmuC*	DNA recombination protein rmuC homolog
4529374	A	SNP	G	100,0	14	14	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4093	PA1030	-	hypothetical protein
4531533	A	SNP	G	100,0	27	27	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4095	PA1028	-	oxidoreductase
4554895	G	SNP	A	95,5	21	22	-	P_aeru_M1_draft_4119	PA1007	*perM*	Putative permease perM
4565612	T	SNP	C	100,0	19	19	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_4128	PA0998	*pqsC*	PqsC
4571393	T	SNP	C	96,3	26	27	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_4132	PA0994	-	usher CupC3
4580044	T	SNP	C	100,0	33	33	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4140	-	-	hypothetical protein
4580562	T	SNP	C	93,8	30	32	Met->Thr	P_aeru_M1_draft_4141	-	-	hypothetical protein
4581267	C	Del	GAP	100,0	24	24	-	-		-	-
4581269	A	Del	GAP	100,0	24	24	-	-		-	-

4584288	G	SNP	A	100,0	35	35	-	P_aeru_M1_draft_4143	-	-	hypothetical protein
4590749	T	SNP	C	86,2	25	29	-	-		-	-
4591601	C	SNP	A	78,6	11	14	-	-		-	-
4591603	A	SNP	T	87,1	27	31	-	-		-	-
4591607	T	SNP	C	83,8	31	37	-	-		-	-
4593658	G	SNP	A	96,0	24	25	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_4154	-	-	single strand DNA binding protein
4595894	A	Del	GAP	100,0	20	20	-	P_aeru_M1_draft_4155	-	-	DNA topoisomerase I, plasmid
4595897	T	Del	GAP	85,0	17	20	-	-		-	-
4600147	T	Del	GAP	100,0	23	23	-	P_aeru_M1_draft_4158	-	-	putative DNA helicase
4600148	A	Del	GAP	100,0	23	23	-	P_aeru_M1_draft_4158	-	-	putative DNA helicase
4625415	A	SNP	G	100,0	19	19	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4183	-	-	CRISPR-associated Cas5d family protein
4631396	G	SNP	A	97,6	40	41	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_4190	-	-	TraG/TraD family protein
4636005	G	SNP	A	100,0	21	21	Val->Ile	P_aeru_M1_draft_4197	-	-	hypothetical protein
4637342	C	SNP	A	100,0	16	16	Ala->Asp	P_aeru_M1_draft_4199	-	-	hypothetical protein
4637344	A	SNP	G	93,8	15	16	Ser->Gly	P_aeru_M1_draft_4199	-	-	hypothetical protein
4644419	T	SNP	C	100,0	43	43	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_4203	-	-	hypothetical protein
4644659	G	SNP	A	100,0	29	29	Arg->His	P_aeru_M1_draft_4203	-	-	hypothetical protein
4651010	A	SNP	G	90,9	10	11	-	P_aeru_M1_draft_4208	-	-	hypothetical protein
4654679	G	SNP	A	100,0	29	29	-	P_aeru_M1_draft_4214	-	-	long-chain-fatty-acid-CoA ligase
4663423	C	SNP	G	100,0	19	19	-	-		-	-
4663426	G	SNP	A	100,0	19	19	-	-		-	-
4663431	C	Del	GAP	100,0	19	19	-	-		-	-
4665581	T	SNP	C	96,6	28	29	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_4223	-	-	hypothetical protein
4671353	G	SNP	A	100,0	53	53	-	P_aeru_M1_draft_4229	-	-	amine oxidase
4671517	G	SNP	A	98,1	52	53	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_4229	-	-	amine oxidase
4676127	T	SNP	C	94,7	18	19	-	-		-	-
4685853	G	SNP	A	100,0	44	44	Arg->His	P_aeru_M1_draft_4245	-	*gap3*	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3
4704608	G	SNP	A	97,3	36	37	-	P_aeru_M1_draft_4256	PA0971	*tolA*	Protein tolA
4706196	T	SNP	C	95,8	23	24	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_4258	PA0969	*tolQ*	Protein tolQ
4715977	G	SNP	A	100,0	33	33	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_4269	PA0958	*oprD*	Porin D
4724712	G	SNP	A	100,0	51	51	-	P_aeru_M1_draft_4281	PA0947	*hda*	DnaA-homolog protein hda
4733618	G	SNP	A	100,0	26	26	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_4293	PA0936	*lpxO2*	lipopolysaccharide biosynthetic protein LpxO2
4736181	T	SNP	C	93,8	30	32	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_4295	PA0934	*relA*	GTP pyrophosphokinase
4747726	C	SNP	T	100,0	19	19	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_4302	PA0927	*ddh*	2-hydroxyacid dehydrogenase homolog
4758870	T	SNP	C	96,3	26	27	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_4312	PA0917	*kup*	Probable potassium transport system protein kup

4767812	A	SNP	C	100,0	17	17	Lys->Thr	P_aeru_M1_draft_4323	PA0906	*prtR*	HTH-type transcriptional regulator PrtR
4772134	G	SNP	A	100,0	16	16	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_4326	PA0903	*alaS*	Alanine--tRNA ligase
4778312	T	SNP	G	100,0	23	23	Glu->Asp	P_aeru_M1_draft_4331	PA0898	*astD*	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase
4789852	A	SNP	G	100,0	32	32	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_4342	PA0887	*acsA1*	Acetyl-coenzyme A synthetase 1
4792341	C	SNP	T	100,0	13	13	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_4344	PA0885	-	C4-dicarboxylate transporter
4795763	T	SNP	C	100,0	30	30	Lys->Arg	P_aeru_M1_draft_4347	PA0882	-	hypothetical protein
4804229	G	SNP	A	100,0	12	12	-	P_aeru_M1_draft_4354	PA0875	-	conserved hypothetical protein
4807570	A	SNP	G	100,0	37	37	Glu->Gly	P_aeru_M1_draft_4357	PA0872	*phhA*	Phenylalanine-4-hydroxylase
4811136	C	SNP	T	100,0	27	27	Val->Ile	P_aeru_M1_draft_4361	PA0868	-	Peptidyl-tRNA hydrolase
4823162	G	SNP	A	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_4371	PA0858	-	UPF0176 protein PA0858
4827023	G	SNP	A	100,0	20	20	-	P_aeru_M1_draft_4375	PA0854	*fumC2*	Fumarate hydratase class II 2
4828835	A	SNP	G	100,0	30	30	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_4377	PA0852	-	hypothetical protein
4834871	A	SNP	G	100,0	10	10	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_4381	PA0847	-	hypothetical protein
4836879	G	SNP	A	100,0	23	23	Val->Ile	P_aeru_M1_draft_4383	PA0845	-	Neutral ceramidase
4836996	A	SNP	G	100,0	32	32	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_4383	PA0845	-	Neutral ceramidase
4853178	G	SNP	A	100,0	21	21	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_4396	PA0832	-	hypothetical protein
4856883	G	SNP	A	89,5	17	19	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_4400	PA0828	-	hypothetical protein
4864027	C	SNP	T	100,0	20	20	Arg->His	P_aeru_M1_draft_4410	PA0815	-	transcriptional regulator
4873358	C	SNP	T	96,0	24	25	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_4418	PA0807	-	conserved hypothetical protein
4878042	G	SNP	A	100,0	28	28	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_4424	PA0801	-	hypothetical protein
4882169	G	SNP	A	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_4426	PA0798	*pmtA*	phospholipid methyltransferase
4896301	A	SNP	G	100,0	19	19	Tyr->Cys	P_aeru_M1_draft_4437	PA0788	-	hypothetical protein
4901945	G	SNP	A	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_4442	PA0783	*putP*	Sodium/proline symporter
4911285	G	SNP	A	96,0	24	25	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_4446	PA0779	*lon2*	Lon protease 2
4918314	G	SNP	A	100,0	27	27	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_4454	PA0771	*era*	GTPase Era
4920986	T	SNP	C	100,0	25	25	-	P_aeru_M1_draft_4457	PA0768	*lepB*	Signal peptidase I
4928171	T	SNP	C	100,0	24	24	Tyr->His	P_aeru_M1_draft_4464	PA0761	*nadB*	L-aspartate oxidase
4934990	C	SNP	T	100,0	29	29	Thr->Ile	P_aeru_M1_draft_4471	PA0755	-	hypothetical protein
4938432	G	SNP	A	100,0	17	17	-	P_aeru_M1_draft_4474	PA0752	-	conserved hypothetical protein
4940167	T	SNP	G	100,0	37	37	Ile->Leu	P_aeru_M1_draft_4476	PA0750	*ung*	Uracil-DNA glycosylase
4950257	A	SNP	G	100,0	19	19	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_4486	PA0740	*BDS1*	Alkyl/aryl-sulfatase BDS1
4962904	A	SNP	G	100,0	30	30	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_4501	PA0727	-	Uncharacterized protein ORF430
4975566	T	SNP	C	100,0	39	39	-	-		-	-
4985949	C	SNP	T	97,6	41	42	-	P_aeru_M1_draft_4515	-	-	hypothetical protein
4986624	T	SNP	C	100,0	32	32	-	P_aeru_M1_draft_4515	-	-	hypothetical protein

4990207	G	SNP	A	100,0	32	32	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_4518	-	-	hypothetical protein
4993540	G	SNP	A	100,0	24	24	-	P_aeru_M1_draft_4523	-	-	hypothetical protein
4998215	T	SNP	C	100,0	23	23	-	P_aeru_M1_draft_4527	-	-	hypothetical protein
4998801	A	SNP	G	100,0	30	30	-	-		-	-
5002233	T	SNP	C	100,0	24	24	His->Arg	P_aeru_M1_draft_4529	-	-	bifunctional DNA primase/polymerase
5005487	A	SNP	G	95,8	46	48	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_4532	-	-	putative transcriptional regulator
5015087	T	SNP	C	97,7	43	44	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_4545	-	-	hypothetical protein
5016776	C	SNP	T	100,0	36	36	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_4547	PA0713	-	Conserved hypothetical secreted protein
5031129	A	SNP	G	100,0	34	34	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_4564	PA0696	-	hypothetical protein
5033183	G	SNP	A	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_4565	PA0695	-	hypothetical protein
5038666	G	SNP	A	100,0	27	27	-	-		-	-
5041487	C	SNP	T	100,0	28	28	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_4570	PA0690	-	hypothetical protein
5042125	G	SNP	A	100,0	24	24	-	P_aeru_M1_draft_4570	PA0690	-	hypothetical protein
5048571	G	SNP	A	100,0	30	30	-	-		-	-
5057282	A	SNP	G	91,7	22	24	Ser->Pro	P_aeru_M1_draft_4575	PA0686	*xcpR*	Type II secretion system protein E
5068479	T	SNP	C	100,0	30	30	-	P_aeru_M1_draft_4585	PA0674	*vreA*	VreA
5072046	G	SNP	A	100,0	31	31	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_4590	PA0669	*dnaE2*	Error-prone DNA polymerase
5073228	T	SNP	C	100,0	39	39	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_4590	PA0669	*dnaE2*	Error-prone DNA polymerase
5080282	C	SNP	T	78,5	128	163	-	-		-	-
5108639	T	SNP	C	100,0	25	25	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_4607	PA4297	*tadG*	protein TadG
5112047	A	SNP	G	100,0	23	23	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4611	PA4301	*tadB*	protein TadB
5119962	T	SNP	C	100,0	16	16	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_4618	PA4308	*yjgR*	Uncharacterized protein yjgR
5125809	G	SNP	A	97,0	32	33	-	-		-	-
5126935	G	SNP	A	100,0	26	26	-	-		-	-
5129284	C	SNP	T	100,0	26	26	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_4624	PA4314	*purU*	Formyltetrahydrofolate deformylase
5133276	G	SNP	A	95,0	19	20	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_4628	PA4318	-	hypothetical protein
5144801	A	SNP	C	75,0	21	28	-	-		-	-
5156834	A	SNP	G	95,0	19	20	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_4650	PA4341	-	transcriptional regulator
5156969	T	SNP	C	87,1	27	31	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_4650	PA4341	-	transcriptional regulator
5162642	T	SNP	C	90,5	19	21	-	-		-	-
5165341	G	SNP	A	100,0	17	17	-	P_aeru_M1_draft_4657	PA4349	-	hypothetical protein
5174052	T	SNP	C	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_4667	PA4358	*feoB*	Ferrous iron transport protein B
5181563	G	SNP	A	100,0	28	28	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_4675	PA4366	*sodB*	Superoxide dismutase [Fe]
5184340	T	SNP	C	90,0	9	10	-	P_aeru_M1_draft_4677	PA4368	-	hypothetical protein
5197160	T	SNP	C	100,0	40	40	Arg->Gly	P_aeru_M1_draft_4687	PA4378	-	InaA protein

5211172	T	SNP	C	97,6	40	41	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4702	PA4393	-	hypothetical protein
5212206	G	SNP	A	100,0	25	25	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_4702	PA4393	-	hypothetical protein
5215372	T	SNP	C	97,3	36	37	-	P_aeru_M1_draft_4706	PA4398	-	two-component sensor
5220773	T	SNP	C	100,0	37	37	Ser->Gly	P_aeru_M1_draft_4710	PA4402	*argJ*	Glutamate N-acetyltransferase
5224629	G	SNP	A	100,0	37	37	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_4711	PA4403	*secA*	Protein translocase subunit SecA
5234215	A	SNP	G	100,0	20	20	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_4720	PA4412	*murG*	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase
5260068	T	SNP	C	94,7	18	19	-	-		-	-
5272089	G	SNP	A	100,0	32	32	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_4757	PA4449	*hisG*	ATP phosphoribosyltransferase
5294107	G	SNP	A	100,0	21	21	-	P_aeru_M1_draft_4784	PA4476	-	hypothetical protein
5295333	A	SNP	G	100,0	31	31	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_4784	PA4476	-	hypothetical protein
5331815	T	SNP	C	100,0	35	35	Phe->Ser	P_aeru_M1_draft_4812	PA4504	*dppC*	Dipeptide transport system permease protein dppC
5332183	G	SNP	A	100,0	16	16	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_4812	PA4504	*dppC*	Dipeptide transport system permease protein dppC
5332241	T	SNP	C	100,0	18	18	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4812	PA4504	*dppC*	Dipeptide transport system permease protein dppC
5336636	C	SNP	T	100,0	24	24	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_4817	PA4509	-	hypothetical protein
5342316	T	SNP	C	100,0	33	33	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_4821	PA4514	-	hypothetical protein
5349145	T	SNP	C	100,0	31	31	Ile->Val	P_aeru_M1_draft_4826	PA4519	*speC*	ornithine decarboxylase
5353816	G	SNP	A	100,0	38	38	Gln->_	P_aeru_M1_draft_4829	PA4522	*ampD*	1,6-anhydro-N-acetylmuramyl-L-alanine amidase AmpD
5368860	G	SNP	A	100,0	41	41	-	-		-	-
5379698	C	Del	GAP	100,0	31	31	-	-		-	-
5379700	A	Del	GAP	100,0	30	30	-	-		-	-
5382049	T	SNP	C	96,4	27	28	-	-		-	-
5388948	A	SNP	G	100,0	41	41	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_4859	-	-	hypothetical protein
5398148	A	Del	GAP	100,0	33	33	-	P_aeru_M1_draft_4866	-	-	DNA topoisomerase I, plasmid
5398151	T	Del	GAP	97,0	32	33	-	-		-	-
5402824	T	Del	GAP	90,6	29	32	-	P_aeru_M1_draft_4870	-	-	putative DNA helicase
5402825	A	Del	GAP	100,0	29	29	-	P_aeru_M1_draft_4870	-	-	putative DNA helicase
5403842	A	SNP	G	100,0	18	18	-	-		-	-
5408317	T	SNP	C	100,0	37	37	Phe->Ser	P_aeru_M1_draft_4875	-	-	R64 PilN family type IVB pilus formation outer membrane protein
5430282	G	SNP	A	100,0	54	54	-	-		-	-
5430699	A	SNP	C	100,0	35	35	-	P_aeru_M1_draft_4896	-	-	conserved hypothetical protein
5430756	C	SNP	T	95,8	23	24	-	P_aeru_M1_draft_4896	-	-	conserved hypothetical protein
5431023	A	SNP	T	100,0	19	19	-	P_aeru_M1_draft_4896	-	-	conserved hypothetical protein

5431149	G	SNP	A	100,0	14	14	-	P_aeru_M1_draft_4896	-	-	conserved hypothetical protein
5435928	G	SNP	T	100,0	14	14	-	P_aeru_M1_draft_4902	-	-	hypothetical protein
5435934	A	SNP	G	100,0	14	14	-	P_aeru_M1_draft_4902	-	-	hypothetical protein
5435944	G	SNP	A	91,7	11	12	Val->Ile	P_aeru_M1_draft_4902	-	-	hypothetical protein
5435958	A	SNP	T	100,0	14	14	-	P_aeru_M1_draft_4902	-	-	hypothetical protein
5443134	C	SNP	T	93,9	31	33	-	P_aeru_M1_draft_4910	-	-	hypothetical protein
5443379	C	SNP	A	100,0	18	18	Ala->Asp	P_aeru_M1_draft_4910	-	-	hypothetical protein
5443381	A	SNP	G	94,4	17	18	Ser->Gly	P_aeru_M1_draft_4910	-	-	hypothetical protein
5450551	C	SNP	T	96,7	29	30	-	-		-	-
5450558	C	SNP	G	100,0	29	29	-	-		-	-
5454021	C	SNP	A	100,0	42	42	-	-		-	-
5454023	A	SNP	G	100,0	43	43	-	-		-	-
5472967	G	SNP	A	100,0	35	35	Gly->Arg	P_aeru_M1_draft_4929	PA4547	*pilR*	Type 4 fimbriae expression regulatory protein pilR
5473964	A	SNP	G	100,0	34	34	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4930	PA4548	-	Probable D-amino acid oxidase PA4548
5481209	T	SNP	C	100,0	39	39	Tyr->His	P_aeru_M1_draft_4935	PA4554	-	hypothetical protein
5496636	T	SNP	C	100,0	34	34	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_4952	PA4571	-	putative cytochrome c
5496998	G	SNP	A	100,0	16	16	-	P_aeru_M1_draft_4952	PA4571	-	putative cytochrome c
5504871	G	SNP	A	100,0	34	34	Glu->Lys	P_aeru_M1_draft_4959	PA4579	-	hypothetical protein
5505967	T	SNP	C	95,8	23	24	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4959	PA4579	-	hypothetical protein
5515519	G	SNP	A	97,6	40	41	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_4969	PA4588	*gdhA*	$NADP^+$-specific glutamate dehydrogenase
5521699	G	SNP	A	100,0	19	19	-	P_aeru_M1_draft_4973	PA4592	-	hypothetical protein
5524710	G	SNP	C	100,0	19	19	-	-		-	-
5531254	C	SNP	T	100,0	21	21	-	P_aeru_M1_draft_4979	PA4598	*acrB*	Acriflavine resistance protein B
5531376	C	SNP	T	84,2	16	19	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_4979	PA4598	*acrB*	Acriflavine resistance protein B
5534570	T	SNP	C	100,0	21	21	Ser->Pro	P_aeru_M1_draft_4982	PA4601	*morA*	motility regulator
5535915	T	SNP	C	91,7	33	36	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_4982	PA4601	*morA*	motility regulator
5546409	G	SNP	A	100,0	22	22	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_4990	PA4609	*radA*	DNA repair protein RadA homolog
5558357	T	SNP	C	100,0	18	18	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_5003	PA4621	-	hypothetical protein
5559982	T	SNP	C	100,0	36	36	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_5003	PA4621	-	hypothetical protein
5568350	G	SNP	A	90,9	30	33	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5008	PA4625	-	hypothetical protein
5571838	G	SNP	A	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_5009	PA4626	*hprA*	Glycerate dehydrogenase
5592458	T	SNP	C	90,3	28	31	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_5032	PA4647	*uraA*	Probable uracil permease
5595383	T	SNP	C	100,0	21	21	Trp->Arg	P_aeru_M1_draft_5036	PA4651	-	hypothetical protein
5596568	G	SNP	A	100,0	40	40	-	P_aeru_M1_draft_5037	PA4652	-	hypothetical protein
5607392	G	SNP	A	87,9	29	33	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_5045	PA4660	*phrB*	Deoxyribodipyrimidine photo-lyase

5607930	A	SNP	G	100,0	27	27	_->Gln	P_aeru_M1_draft_5046	PA4661	*pagL*	lipid A 3-O-deacylase
5624202	T	SNP	C	100,0	19	19	-	P_aeru_M1_draft_5061	PA4666	-	Uncharacterized protein ORF424
5627420	A	SNP	G	78,6	44	56	-	P_aeru_M1_draft_5066	PA4671	*V*	DNA-Binding protein G5P
5627438	C	SNP	T	80,7	46	57	-	P_aeru_M1_draft_5066	PA4671	*V*	DNA-Binding protein G5P
5629558	A	SNP	G	96,6	28	29	-	-		-	-
5637659	T	SNP	C	100,0	32	32	Ser->Gly	P_aeru_M1_draft_5071	PA4676	-	carbonic anhydrase
5649531	A	SNP	G	100,0	26	26	-	-		-	-
5665745	A	SNP	G	100,0	37	37	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_5092	PA4696	*ilvI*	Acetolactate synthase isozyme 3 large subunit
5673699	G	SNP	A	96,7	29	30	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_5098	PA4702	-	hypothetical protein
5674867	G	SNP	A	100,0	31	31	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_5099	PA4703	-	hypothetical protein
5691995	T	SNP	C	93,3	14	15	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_5116	PA4721	*sfsA*	Sugar fermentation stimulation protein homolog
5696608	C	SNP	T	100,0	35	35	-	P_aeru_M1_draft_5121	PA4725	-	hypothetical protein
5700919	A	Del	GAP	97,0	32	33	-	-		-	-
5705835	G	SNP	A	100,0	36	36	Arg->His	P_aeru_M1_draft_5128	PA4732	*pgi*	Glucose-6-phosphate isomerase
5707870	A	SNP	G	100,0	45	45	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_5129	PA4733	*acsA2*	Acetyl-coenzyme A synthetase 2
5709732	G	SNP	A	100,0	27	27	Met->Ile	P_aeru_M1_draft_5130	PA4734	-	hypothetical protein
5711208	T	SNP	C	100,0	33	33	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_5131	PA4735	-	hypothetical protein
5712446	C	SNP	T	100,0	39	39	Arg->Trp	P_aeru_M1_draft_5131	PA4735	-	hypothetical protein
5714466	G	SNP	A	92,6	25	27	-	-		-	-
5718464	G	SNP	A	97,6	40	41	-	P_aeru_M1_draft_5137	PA4742	*truB*	tRNA pseudouridine synthase B
5719791	G	SNP	A	89,7	35	39	-	P_aeru_M1_draft_5138	PA4743	*infB*	Translation initiation factor IF-2
5729298	G	Del	GAP	100,0	33	33	-	P_aeru_M1_draft_5145	PA4751	*ftsH*	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
5729299	C	Del	GAP	100,0	33	33	-	P_aeru_M1_draft_5145	PA4751	*ftsH*	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
5729300	C	Del	GAP	100,0	33	33	-	P_aeru_M1_draft_5145	PA4751	*ftsH*	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
5735015	G	SNP	A	100,0	34	34	-	P_aeru_M1_draft_5150	PA4756	*carB*	Carbamoyl-phosphate synthase large chain
5738905	T	SNP	C	96,0	24	25	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_5154	PA4760	*dnaJ*	Chaperone protein DnaJ
5744827	G	SNP	A	100,0	20	20	-	P_aeru_M1_draft_5160	PA4766	-	Conserved hypothetical protein
5745160	T	SNP	C	100,0	30	30	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_5161	PA4767	*ratA*	Ribosome association toxin RatA
5758094	A	SNP	G	100,0	21	21	-	P_aeru_M1_draft_5172	PA4777	*pmrB*	PmrB: two-component regulator system signal sensor kinase PmrB
5758390	G	SNP	A	100,0	33	33	Arg->His	P_aeru_M1_draft_5172	PA4777	*pmrB*	PmrB: two-component regulator system signal sensor kinase PmrB
5764624	G	SNP	A	100,0	23	23	-	P_aeru_M1_draft_5180	PA4784	-	transcriptional regulator
5765234	G	SNP	A	100,0	32	32	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5181	PA4785	*fadI*	3-ketoacyl-CoA thiolase
5766438	T	SNP	C	94,4	34	36	-	-		-	-

5766677	G	SNP	A	100,0	30	30	-	P_aeru_M1_draft_5182	PA4786	*fabG*	3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase
5780846	G	SNP	C	86,8	33	38	Ala->Gly	P_aeru_M1_draft_5199	PA4804	-	amino acid permease
5782100	T	SNP	C	100,0	37	37	His->Arg	P_aeru_M1_draft_5200	PA4805	-	hypothetical protein
5789186	G	SNP	A	83,3	20	24	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_5206	PA4811	*fdoH*	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit
5794752	A	SNP	G	100,0	26	26	Ile->Val	P_aeru_M1_draft_5210	PA4814	*fadH*	2,4-dienoyl-CoA reductase [NADPH]
5796957	G	SNP	A	100,0	19	19	Gly->Arg	P_aeru_M1_draft_5211	PA4815	-	hypothetical protein
5797076	A	SNP	G	94,7	18	19	-	-		-	-
5812392	A	SNP	G	100,0	16	16	Trp->Arg	P_aeru_M1_draft_5224	PA4829	*lpd3*	Dihydrolipoyl dehydrogenase 3
5813556	G	SNP	A	100,0	37	37	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_5226	PA4831	-	transcriptional regulator
5818465	T	SNP	C	100,0	21	21	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_5230	PA4836	-	hypothetical protein
5822175	T	SNP	C	90,5	19	21	-	-		-	-
5834415	C	SNP	G	100,0	30	30	His->Gln	P_aeru_M1_draft_5242	PA4848	*accC*	Biotin carboxylase
5846061	G	SNP	A	100,0	13	13	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_5251	PA4857	-	hypothetical protein
5846917	G	SNP	A	100,0	25	25	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_5251	PA4857	-	hypothetical protein
5862477	G	SNP	A	95,7	22	23	-	-		-	-
5864466	G	SNP	A	100,0	32	32	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_5271	PA4877	-	hypothetical protein
5876020	T	SNP	G	95,0	19	20	Glu->Asp	P_aeru_M1_draft_5281	PA4888	*desA3*	Stearoyl-CoA 9-desaturase
5879285	G	SNP	A	100,0	23	23	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_5285	PA4892	*ureF*	Urease accessory protein UreF
5884909	G	SNP	A	100,0	20	20	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_5290	PA4897	-	putative extracellular heme-binding protein
5901278	C	SNP	T	100,0	36	36	-	P_aeru_M1_draft_5304	PA4911	*braE*	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein BraE
5903066	C	SNP	T	100,0	13	13	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_5306	PA4913	-	Leu/Ile/Val-binding protein homolog 1
5911070	C	SNP	T	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_5312	PA4920	*nadE*	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase
5915770	G	SNP	A	97,9	47	48	-	-		-	-
5922725	T	SNP	C	100,0	21	21	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_5321	PA4929	-	hypothetical protein
5941048	T	SNP	C	100,0	25	25	Gln->Arg	P_aeru_M1_draft_5338	PA4946	*mutL*	DNA mismatch repair protein mutL
5942135	G	SNP	A	100,0	23	23	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_5338	PA4946	*mutL*	DNA mismatch repair protein mutL
5955102	G	SNP	A	100,0	31	31	Gly->Arg	P_aeru_M1_draft_5349	PA4958	-	hypothetical protein
5955930	G	SNP	A	94,4	17	18	Gly->Ser	P_aeru_M1_draft_5349	PA4958	-	hypothetical protein
5961871	C	SNP	T	100,0	22	22	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_5353	PA4962	-	putative membrane-bound metal-dependent hydrolase
5964015	G	SNP	A	100,0	29	29	Arg->Cys	P_aeru_M1_draft_5355	PA4964	*parC*	DNA topoisomerase 4 subunit A
5975442	T	SNP	C	100,0	14	14	Trp->Arg	P_aeru_M1_draft_5365	PA4974	-	hypothetical protein
5985221	T	SNP	C	93,9	31	33	-	P_aeru_M1_draft_5373	PA4981	*rocC*	Amino-acid permease RocC
5994648	G	SNP	A	95,7	22	23	-	-		-	-
5996596	A	SNP	G	100,0	30	30	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_5380	PA4988	*waaA*	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase

6003815	T	SNP	C	96,4	54	56	-	-		-	-
6013155	G	SNP	A	97,0	32	33	-	P_aeru_M1_draft_5394	PA5001	-	hypothetical protein
6028607	C	SNP	T	100,0	23	23	Gly->Glu	P_aeru_M1_draft_5407	PA5014	*glnE*	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase
6031665	T	SNP	C	93,9	31	33	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_5408	PA5015	*aceE*	Pyruvate dehydrogenase E1 component
6039103	T	SNP	C	100,0	14	14	His->Arg	P_aeru_M1_draft_5412	PA5019	-	Uncharacterized protein HI_0441
6046939	T	SNP	C	100,0	18	18	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_5417	PA5023	-	UPF0061 protein PLES_54131
6073097	G	SNP	A	100,0	36	36	Pro->Ser	P_aeru_M1_draft_5437	PA5042	*pilO*	type 4 fimbrial biogenesis protein PilO
6078097	G	SNP	A	97,4	37	38	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5441	PA5046	*maeB*	$NADP^+$-dependent malic enzyme
6078619	T	SNP	C	96,9	31	32	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_5441	PA5046	*maeB*	$NADP^+$-dependent malic enzyme
6080035	A	SNP	G	100,0	30	30	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_5442	PA5047	-	hypothetical protein
6082806	T	SNP	C	100,0	34	34	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_5444	PA5050	*priA*	Primosomal protein N'
6086261	C	SNP	T	100,0	18	18	-	P_aeru_M1_draft_5446	PA5052	-	hypothetical protein
6087819	C	SNP	T	97,4	37	38	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5448	PA5054	*hslU*	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
6140808	A	SNP	G	100,0	25	25	Trp->Arg	P_aeru_M1_draft_5498	PA5102	-	putative fatty acid desaturase
6145389	T	SNP	G	100,0	33	33	Glu->Ala	P_aeru_M1_draft_5503	PA5107	*blc*	outer membrane lipoprotein Blc
6148435	G	SNP	A	100,0	19	19	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5508	PA5112	*estA*	Esterase estA
6157898	A	SNP	G	100,0	24	24	Ser->Pro	P_aeru_M1_draft_5513	PA5117	*typA*	GTP-binding protein TypA/BipA
6163102	A	SNP	G	96,2	25	26	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_5517	PA5121	-	hypothetical protein
6173856	T	SNP	C	100,0	24	24	-	-		-	-
6179652	G	SNP	A	97,4	37	38	Arg->His	P_aeru_M1_draft_5533	PA5136	-	hypothetical protein
6196630	G	SNP	A	97,4	37	38	Asp->Asn	P_aeru_M1_draft_5553	PA5136	-	amino acid ABC transporter substrate-binding protein
6198260	G	SNP	A	95,0	19	20	Arg->Gln	P_aeru_M1_draft_5555	PA5155	*occM*	Octopine transport system permease protein occM
6198569	G	SNP	A	95,0	38	40	-	-		-	-
6199784	G	SNP	A	96,0	48	50	-	P_aeru_M1_draft_5556	PA5156	-	hypothetical protein
6234970	G	SNP	A	100,0	26	26	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_5590	-	-	hypothetical protein
6238699	C	SNP	T	100,0	30	30	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5594	PA0612	-	hypothetical protein
6240422	A	SNP	G	100,0	16	16	Ser->Gly	P_aeru_M1_draft_5597	-	-	C-5 cytosine-specific DNA methylase
6240526	C	SNP	T	100,0	22	22	-	P_aeru_M1_draft_5597	-	-	C-5 cytosine-specific DNA methylase
6250960	G	SNP	A	100,0	28	28	-	P_aeru_M1_draft_5605	PA5166	*dctD*	C4-dicarboxylate transport transcriptional regulatory protein dctD
6261636	G	SNP	A	100,0	18	18	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_5613	PA5174	-	beta-ketoacyl synthase
6268153	G	SNP	A	100,0	26	26	-	P_aeru_M1_draft_5620	PA5181	-	Uncharacterized protein Mb2924c
6274556	G	SNP	A	100,0	41	41	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5627	PA5187	-	putative acyl-CoA dehydrogenase
6280211	T	SNP	C	100,0	32	32	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_5632	PA5192	*pckA*	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]
6307423	A	SNP	C	100,0	28	28	Ile->Ser	P_aeru_M1_draft_5655	PA5216	-	iron ABC transporter substrate-binding protein

6308255	C	SNP	T	95,8	23	24	Ala->Thr	P_aeru_M1_draft_5655	PA5216	-	iron ABC transporter substrate-binding protein
6321862	C	SNP	T	100,0	38	38	-	P_aeru_M1_draft_5670	PA5231	*yhiH*	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YhiH
6322233	T	SNP	C	100,0	22	22	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_5670	PA5231	*yhiH*	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YhiH
6326676	T	SNP	C	100,0	35	35	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_5673	PA5234	-	oxidoreductase
6335442	A	SNP	G	100,0	41	41	-	P_aeru_M1_draft_5680	PA5241	*ppx*	Exopolyphosphatase
6337320	A	SNP	G	100,0	38	38	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_5681	PA5242	*ppk*	Polyphosphate kinase
6355771	G	SNP	A	100,0	17	17	-	P_aeru_M1_draft_5699	PA5260	*hemC*	Porphobilinogen deaminase
6368082	C	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
6368083	T	Del	GAP	100,0	17	17	-	-		-	-
6370717	G	SNP	A	100,0	34	34	Gly->Asp	P_aeru_M1_draft_5710	PA5270	-	putative ABC-type amino acid transporter
6407033	C	SNP	T	100,0	31	31	-	P_aeru_M1_draft_5740	PA5302	*dadX*	Alanine racemase, catabolic
6410202	T	SNP	C	100,0	26	26	Asn->Ser	P_aeru_M1_draft_5745	PA5307	-	hypothetical protein
6435009	G	SNP	A	93,1	27	29	Pro->Leu	P_aeru_M1_draft_5765	PA5327	-	putative oxidoreductase
6436383	G	SNP	A	100,0	37	37	-	P_aeru_M1_draft_5768	PA5330	-	hypothetical protein
6442772	T	SNP	C	100,0	32	32	Phe->Leu	P_aeru_M1_draft_5776	PA5338	*spoT*	Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase
6446959	C	SNP	T	100,0	35	35	Glu->Lys	P_aeru_M1_draft_5781	PA5343	-	hypothetical protein
6448897	C	SNP	T	100,0	32	32	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5782	PA5345	*recG*	ATP-dependent DNA helicase recG
6453191	T	SNP	C	96,3	26	27	Asp->Gly	P_aeru_M1_draft_5786	PA5349	*alkT*	Rubredoxin-NAD(+) reductase
6455298	T	SNP	C	100,0	23	23	His->Arg	P_aeru_M1_draft_5789	PA5352	-	hypothetical protein
6458904	A	SNP	G	100,0	30	30	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_5793	PA5355	*glcD*	Glycolate oxidase subunit glcD
6472775	T	SNP	C	100,0	26	26	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_5806	PA5368	-	hypothetical protein
6532609	C	SNP	T	100,0	52	52	Ser->Leu	P_aeru_M1_draft_5855	PA5416	*soxB*	Sarcosine oxidase subunit beta
6536761	G	SNP	A	83,3	10	12	-	-		-	-
6538189	G	SNP	A	100,0	35	35	Val->Ile	P_aeru_M1_draft_5861	PA5420	*purU*	Formyltetrahydrofolate deformylase
6546962	A	SNP	G	100,0	42	42	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_5870	PA5429	*aspA*	Aspartate ammonia-lyase
6549248	G	SNP	A	100,0	16	16	-	P_aeru_M1_draft_5872	PA5431	-	hypothetical protein
6573660	T	SNP	C	93,9	46	49	Ile->Val	P_aeru_M1_draft_5889	PA5447	*wbpZ*	glycosyltransferase WbpZ
6580246	T	SNP	C	100,0	43	43	Thr->Ala	P_aeru_M1_draft_5894	PA5453	*gca*	GDP-mannose 4,6-dehydratase
6586369	T	SNP	C	84,2	32	38	Leu->Pro	P_aeru_M1_draft_5898	PA5458	-	putative acyltransferase
6596465	T	SNP	C	100,0	29	29	His->Arg	P_aeru_M1_draft_5911	PA5471	-	hypothetical protein
6602522	A	SNP	G	97,7	43	44	-	P_aeru_M1_draft_5915	PA5475	-	hypothetical protein
6630127	C	SNP	T	97,1	33	34	Thr->Ile	P_aeru_M1_draft_5939	PA5501	*znuB*	High-affinity zinc uptake system membrane protein znuB

6662256	C	SNP	T	100,0	54	54	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5967	PA5530	*kgtP*	Alpha-ketoglutarate permease
6665473	T	SNP	C	100,0	38	38	-	-		-	-
6672264	A	SNP	G	93,5	29	31	His->Arg	P_aeru_M1_draft_5976	PA5541	*pyrQ*	dihydroorotase
6679431	G	SNP	A	100,0	28	28	-	P_aeru_M1_draft_5981	PA5547	-	hypothetical protein
6688203	G	SNP	A	100,0	52	52	Ala->Val	P_aeru_M1_draft_5989	PA5555	*atpG*	ATP synthase gamma chain
6688308	A	SNP	G	100,0	48	48	Val->Ala	P_aeru_M1_draft_5989	PA5555	*atpG*	ATP synthase gamma chain
6693483	C	SNP	T	95,1	39	41	-	P_aeru_M1_draft_5996	PA5562	*parB*	Probable chromosome-partitioning protein parB
6694854	G	SNP	A	100,0	38	38	-	P_aeru_M1_draft_5998	PA5564	*rsmG*	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G
1259138i1	A	Ins	G	100,0	17	17	-	-		-	-
1259138i2	A	Ins	G	100,0	17	17	-	-		-	-
1259142i1	A	Ins	C	82,4	14	17	-	-		-	-
1436034i1	C	Ins	T	85,7	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i10	C	Ins	G	78,6	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i11	C	Ins	C	78,6	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i12	C	Ins	A	78,6	10	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i2	C	Ins	C	85,7	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i3	C	Ins	G	85,7	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i4	C	Ins	G	85,7	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i5	C	Ins	C	85,7	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i6	C	Ins	G	85,7	12	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i7	C	Ins	T	85,7	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i8	C	Ins	C	85,7	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
1436034i9	C	Ins	A	78,6	11	14	-	P_aeru_M1_draft_1364	PA3702	*wspR*	two-component response regulator
2849963i1	C	Ins	G	100,0	11	11	-	P_aeru_M1_draft_2631	-	-	hypothetical membrane protein
2901986i1	G	Ins	C	82,4	13	17	-	-		-	-
2972336i1	G	Ins	G	88,2	15	17	-	P_aeru_M1_draft_2709	-	-	hypothetical protein
2972341i1	C	Ins	C	88,2	15	17	-	P_aeru_M1_draft_2709	-	-	hypothetical protein
3066044i1	C	Ins	G	100,0	12	12	-	P_aeru_M1_draft_2785	-	-	Conserved hypothetical membrane protein
3191528i1	T	Ins	G	100,0	10	10	-	-		-	-
3543592i1	A	Ins	A	86,4	19	22	-	-		-	-
3950514i1	C	Ins	C	100,0	8	12	-	P_aeru_M1_draft_3582	-	-	hypothetical protein
3950514i2	C	Ins	T	100,0	8	12	-	P_aeru_M1_draft_3582	-	-	hypothetical protein
3950514i3	C	Ins	C	100,0	8	12	-	P_aeru_M1_draft_3582	-	-	hypothetical protein
3950514i4	C	Ins	G	100,0	7	12	-	P_aeru_M1_draft_3582	-	-	hypothetical protein

3950514i5	C	Ins	G	100,0	12	12	-	P_aeru_M1_draft_3582	-	-	hypothetical protein
3984696i1	G	Ins	A	100,0	15	15	-	P_aeru_M1_draft_3606	-	*fabF2*	3-oxoacyl-ACP synthase
4595892i1	C	Ins	G	87,0	20	23	-	P_aeru_M1_draft_4155	-	-	DNA topoisomerase I, plasmid
4663425i1	A	Ins	C	100,0	19	19	-	-		-	-
5219710i1	G	Ins	C	76,5	13	17	-	P_aeru_M1_draft_4708	PA4400	-	hypothetical protein
5398146i1	C	Ins	G	97,0	31	33	-	P_aeru_M1_draft_4866	-	-	DNA topoisomerase I, plasmid
793228i1	T	Ins	G	100,0	8	10	-	P_aeru_M1_draft_790	PA2458	-	hypothetical protein
797873i1	A	Ins	C	84,9	141	166	-	P_aeru_M1_draft_65	-	-	23s_rRNA

I. Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren-Nomenklatur: (nach IUPAC-IUB-Vereinbarung 1969)

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

Tabelle I.1 Umgekehrter Aminosäure-Code
Dargestellt sind die Aminosäuren mit ihren jeweiligen Eigenschaften und ihren dazugehörigen Kodons. Für jede AS kodieren unterschiedlich viele Kodons (aufsteigende Reihenfolge).

Anzahl	Aminosäure	Eigenschaft	Kodon (5´-3´)
1	Start	-	AUG
1	Met	hydrophob (unpolar)	AUG
1	Trp	hydrophob (unpolar)	UGG
2	Tyr	hydrophil, neutral (polar)	UAU UAC
2	Phe	hydrophob (unpolar)	UUU UUC
2	Cys	hydrophil, neutral (polar)	UGU UGC
2	Asn	hydrophil, neutral (polar)	AAU AAC
2	Asp	hydrophil, negativ geladen (sauer)	GAU GAC
2	Gln	hydrophil, neutral (polar)	CAA CAG
2	Glu	hydrophil, negativ geladen (sauer)	GAA GAG
2	His	hydrophil, positiv geladen (basisch)	CAU CAC
2	Lys	hydrophil, positiv geladen (basisch)	AAA AAG
3	Ile	hydrophob (unpolar)	AUU AUC AUA
4	Gly	hydrophob (unpolar)	GGU GGC GGA GGG
4	Ala	hydrophob (unpolar)	GCU GCC GCA GCG
4	Val	hydrophob (unpolar)	GUU GUC GUA GUG
4	Thr	hydrophil, neutral (polar)	ACU ACC ACA ACG
4	Pro	hydrophob (unpolar)	CCU CCC CCA CCG
6	Leu	hydrophob (unpolar)	CUU CUC CUA CUG UUA UUG
6	Ser	hydrophil, neutral (polar)	UCU UCC UCA UCG AGU AGC
6	Arg	hydrophil, positiv geladen (basisch)	CGU CGC CGA CGG AGA AGG
3	Stop	-	UAA UAG UGA

Einheiten		Vorsätze		
A	Ampère	M	Mega	10^6
bar	Druck	k	Kilo	10^3
bp	Basenpaar(e)	d	Dezi	10^{-1}
°C	Grad Celsius	c	Centi	10^{-2}
Da	Dalton	m	Milli	10^{-3}
g	Gramm	µ	Mikro	10^{-6}
h	Stunde(n)	n	Nano	10^{-9}
l	Liter	p	Piko	10^{-12}
m	Meter			
mol	molar			
M	Mol	Nukleotide		
min	Minute(n)			
N	Normalität	A	Adenin	
sek	Sekunde(n)	C	Cytosin	
U	Units	G	Guanin	
Upm	Umdrehungen pro Minute	T	Thymin	
V	Volt	U	Uracil	
W	Watt			

Tabelle I.2 Sonstige Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
%	Prozent
% (v/v)	Volumen/Volumen-Prozent
% (w/v)	Gewicht/Volumen-Prozent
©	Copyright
®	(*registered*) *Trade Mark*, eingetragene Handelsmarke
Abb.	Abbildung(en)
abs.	absolut, 100 %
ad	lat. auf, zu
add.	zugeben
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
$AgNO_3$	Silbernitrat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
Anr	*anaerobic nitrate regulation*, anaerober Transkriptionsregulator
anschl.	anschließend
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ASL	*airway surface liquid*, Flüssigkeitsfilm der Atemwege
ATP	Adenosintriphosphat
BPB	Bromphenolblau
BSA	*bovine serum albumin*, Rinderalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
$C_{12}H_{14}N_2$	Paraquat
$C_6H_5Na_3O_7$	Natriumcitrat
ca.	circa, ungefähr
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cAMP	*cyclic adenosine monophosphate*, zyklisches Adenosinmonophosphat
CAMPs	*cationic antimicrobial (poly)peptides*, kationische antimikrobielle (Poly-)Peptide
Cb	Carbenicillin
cDNA	*complementary* DNA, komplementäre DNA
CF	*cystic fibrosis*, zystische Fibrose
CFTR	*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
chrom. DNA	chromosomale DNA

CIAP	*calf intestinal alkaline phosphatase*, Phosphatase (aus Kälberdarm)
Cl^-	Chlor
Cm	Chloramphenicol
CO_2	Kohlenstoffdioxid
C(-Quelle)	Kohlenstoff(quelle)
CTP	Cytidintriphosphat
d	Durchmesser
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
di	zwei
DIG	Digoxigenin
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	*deoxyribonucleic acid*/Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	*epithelial Na channel*, epitheliale Natriumkanal
EPS	Exopolysaccharid
et al.	lat. et alii (Maskulinum) bzw. et aliae (Femininum); (und andere)
etc.	lat. et cetera, und so weiter
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
f/for	*forward*, vorwärts
Fa.	Firma
FBS (HI)	*fetal bovine serum* (*heat inactivated*), Fetales Kälberserum
$FeCl_3$	Eisenchlorid
GC	Gaschromatographie
Gfp	*green fluorescence protein*, grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
Gm	Gentamicin
GPX	Glutathionperoxidasen
GSR	Glutathionreduktasen
GTP	Guanosintriphosphat
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HCN	Wasserstoffcyanid
HCO_3	Hydrogencarbonat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HGT	Horizontaler Gentransfer
HOCl	Hypochlorit
Icd	Isocitratdehydrogenase, dimere Form
ICE	*integrative conjugative elements*, integrative konjugative Elemente
Idh	Isocitratdehydrogenase, monomere Form
IDH	Isocitratdehydrogenase (monomere + dimere Form)
IL	Interleukin(e)
Inc.	*incorporated*, handelsgerichtlich eingetragen
Indels	Insertion(en)/Deletion(en)
inkl.	inklusiv(e)
intr.	intrazellulär(e)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	Insertionssequenz
K_2SO_4	Kaliumsulfat
KAT	Katalasen

KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
Km	Kanamycin
lat.	lateinisch
LB	*lysogeny broth*
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	*multiple cloning site*, Multiple Klonierstelle
Mdh	Malatdehydrogenase
MDR	multidrug-resistant, Multiresistenz
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MHK	Minimale Hemmkonzentration
mind.	mindestens
MM	Minimal-Medium
MMR	*methyl-directed mismatch-repair*, Methylierungs-abhängiges DNA-Reparatursystem
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA, Boten-RNS
MRSA	Methicilin-resistenter *Staphylococcus aureus*
MS	Massenspektroskopie
N	Stickstoff
Na^+	Natrium
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
Na_2EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
$Na_2S_2O_3$	Natriumthiosulfat
Na_3-Citrat	Natriumnitrat
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
$NADP^+$	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
$NaNO_3$	Natriumnitrat
NaOH	Natriumhydroxid
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NMR	*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanzspektroskopie
NO	Stickstoffmonoxid
NO_2	Nitrit
NO_3	Nitrat
O_2	Sauerstoff
OD_x	optische Dichte, gemessen bei Wellenlänge λ= x nm
ORF	*open reading frame*, offener Leserahmen
ori	*origin*, Startpunkt
oriT	*origin of transfer*, Transferursprung
p. A.	lat. pro analysi, zur Analyse (Reinheit entsprechend der Anforderung bei Chemikalien)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAGI	*P. aeruginosa gene island*, *P. aeruginosa*-Geninsel
PAMPs	*pathogen-associated molecular patterns*, Pathogen-assoziiertes Molekülmuster
PAPI	*P. aeruginosa pathogenicity island*, *P. aeruginosa*-Pathogenitätsinsel
PBS	*phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	*polymerase chain reaction*; Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	lat. pondus hydrogenii
PIA	*Pseudomonas*- Isolationsagar
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
(p)ppGpp	Guanosin-3′,5′-bispyrophosphat
Prog.	Programm
QS	Quorum Sensing
R	Resistenz
r/rev	*reverse*, rückwärts

Rfp	*red fluorescence protein,* rot fluoreszierendes Protein
RNA/RNS	ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNS	*reactive nitrose species*, reaktive Stickstoffspezies
ROS	*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur oder *Real Time*
s. a.	siehe auch
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
schem.	schematisch
SCV	*small colony variants*, kleine Kolonie-Varianten
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SNP	*single nucleotide polymorphism*, Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOD	Superoxiddismutasen
sog.	sogenannt
sp.	Spezies (Singular)
spez.	spezifisch
spp.	Spezies (Plural)
SSC	*saline-sodium citrate*, Standard-Saline-Citrat
ssDNA	*single stranded* DNA, einzelsträngige DNA
s. u.	siehe unten
suppl.	supplementiert
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Tc	Tetrazyklin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
™	(*unregistered*) *Trade Mark*, (nicht eingetragene) Handelsmarke
Tm	Schmelztemperatur
Tn	Transposon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTC	2,3,5- Triphenyltetrazoliumchlorid
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
üN-Kultur	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volumen
v. a.	vor allem/allen
vs.	lat. versus, gegen(übergestellt)
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
VT	Volumenteil(e)
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
XOD	Xanthinoxidase
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
α	alpha
ß	beta
Δ	delta
ε	epsilon
λ	lambda; Wellenlänge
σ	sigma

II. Abbildungsverzeichnis

III. Tabellenverzeichnis

IV. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann danke ich für die Vergabe des interessanten Themas und dass ich meine Promotion am Max-von-Pettenkofer-Institut (MvP) in München unter seiner Leitung durchführen durfte sowie für seine konstruktiven Anregungen, Gespräche und Korrekturen.

Besondere Wertschätzung gebührt meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. M. Hogardt, der mich stetig mit neuen Anregungen und Vorschlägen motivierte sowie mir die Möglichkeiten gab, meine wissenschaftlichen Interessen und Schwerpunkte zu verfolgen.

Herrn Prof. Dr. V. Kempf sei aufrichtig gedankt, dass ich meine Promotion an seinem Institut in Frankfurt am Main fortführen konnte.

Ebenso möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Herrn Dr. F.-J. Vorhölter (Uni. Bielefeld) für das Voranschreiten des Genomprojekts und seine immer hilfsbereite Unterstützung, Herrn Prof. Dr. D. Busch, Frau S. Weidner und Frau O. Prazeres da Costa (TU München) für die schnelle Bearbeitung und Auswertung der Genchips sowie Herrn Prof. Dr. W. Eisenreich (TU München) für die Durchführung der Isotopolog-Experimente und Ratschläge bedanken.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. S. Häussler (TWINCORE, Hannover), Frau Prof. Dr. B. Kahl (Uni. Münster) und Herrn PD. Dr. M. Schobert (Uni. Braunschweig) für die Bereitstellung mancher Stämme und Plasmide oder auch für die interessanten und freundlichen Gespräche bei Kongressen. Herrn Prof. Dr. S. Schubert (MvP) danke ich für seine stets vorhandene Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Einen nicht geringeren Dank möchte ich an meine ehemaligen Kollegen vom MvP-Institut richten, insbesondere aus der AG Hogardt Frau Dr. N. Günther, Frau Dr. A. Eichner, Frau M. Götzfried und Herrn Dr. B. Würstl, sowie aus der AG Schubert Herrn C. Meyer und Herrn M. Messerer, für die schöne und produktive Zeit. Für die Ermöglichung des Ultrazentrifugierens bin ich Frau M. Schiffner und Frau P. Vrabcova sehr verbunden. Den Kollegen aus Frankfurt am Main danke ich sehr für die freundliche Aufnahme sowie für die harmonische und schöne Arbeitsatmosphäre.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, die mich immer und in jeglicher Hinsicht unterstützte und motivierte - auch in schwierigen Zeiten.

V. Eidesstattliche Versicherung

Arnold, Martin
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Molekulare Charakterisierung der Isocitratdehydrogenase von *P. aeruginosa* und deren Bedeutung im Rahmen der metabolischen Adaptation an die Mukoviszidose-Lunge“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand