

Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
und
Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und
medizinische Mikrobiologie der LMU München

**CHARAKTERISIERUNG HYPERMUTIERENDER
PSEUDOMONAS AERUGINOSA-ISOLATE VON PATIENTEN
MIT ZYSTISCHER FIBROSE MITTELS TRANSKRIPTOM-
UND PROTEOMANALYSE**

Christina Marion Hoboth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. W. Höll

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer
 2. Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Heesemann
- Ludwigs-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 22.01.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.03.2007 angenommen.

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Heesemann im Zeitraum Oktober 2002 bis März 2006 angefertigt.

PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Publikationen:

Hogardt M., Hoboth C., Schmoldt S., Henke C., Bader L., Heesemann J.

Dynamics of adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection of cystic fibrosis. J Infect Dis 2007; **195** (1): 70-80.

Hoboth C., Henke C., Imhof A., Eichner A., Hoffmann R., Heesemann J. Hogardt M.

Microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic infection of the cystic fibrosis lung. In Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	9
A.1	MUKOVISZIDOSE (ZYSTISCHE FIBROSE)	9
A.3	DER HYPERMUTIERENDE PHÄNOTYP	21
A.4	 Globale Transkriptom- und Proteomanalyse	22
A.5	ZIELE DIESER ARBEIT	25
B	Material und Methoden	27
B.1	CF-PATIENTEN	27
B.2	ORGANISMEN UND PLASMIDE	27
B.3	ANZUCHT UND STAMMHALTUNG	28
B.3.1	KULTUR-UND TESTMEDIEN	28
B.3.1.1	KULTURMEDIEN	28
B.3.1.2	TESTMEDIEN	30
B.3.2	KULTIVIERUNG	31
B.3.3	STAMMHALTUNG	31
B.4	PHÄNOTYPISCHE UNTERSUCHUNGEN	32
B.4.1	ELASTASE-TEST	32
B.4.2	NITRAT/NITRIT-ABBAU	32
B.5	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	33
B.5.1	ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	33
B.5.1.1	ISOLIERUNG UND REINIGUNG HOCHMOLEKULARER DNA	33
B.5.1.2	HITZEPRÄPARATION VON DNA	34
B.5.1.3	RNA-ISOLIERUNG MITTELS TRIZOL	34
B.5.1.4	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA	35
B.5.2	QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	35
B.5.3	ENZYMATISCHE MODIFIKATION VON DNA	36
B.5.3.1	RESTRIKTIONSENZYMVERDAU	36
B.5.3.2	DNA-LIGATION	36

INHALTSVERZEICHNIS

B.5.3.3	<i>IN VITRO</i>-AMPLIFIKATION MITTELS PCR (POYMERASE-KETTENREAKTION)	37
B.5.3.3.1	OLIGONUKLEOTIDE	37
B.5.3.3.2	POLYMERASEKETTENREAKTION	38
B.5.3.3.2.1	PCR MIT AMPLITAQ GOLD	38
B.5.3.3.2.2	PCR MIT HIGH-GC POLYMERASE	39
B.5.3.3.2.3	REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN	39
B.5.3.3.3	REAL-TIME (RT) PCR MIT CDNA	40
B.5.3.3.3.1	CDNA SYNTHESE FÜR RT-PCR MIT RANDOM HEXAMEREN	40
B.5.3.3.3.2	REAL-TIME (RT) PCR AM LIGHTCYCLER	40
B.5.3.4	TRANSKRIPТОMANALYSE MIT GENCHIP[®] <i>P. AERUGINOSA</i>	41
B.5.3.4.1	CDNA SYNTHESE	41
B.5.3.4.2	CDNA FRAGMENTIERUNG	42
B.5.3.4.3	TERMINALES LABELING	43
B.5.4	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	43
B.5.5	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> MIT PLASMID-DNA	44
B.5.5.1	HERSTELLUNG CALZIUM-KOMPETENTER <i>E. COLI</i>-ZELLEN	44
B.5.5.2	TRANSFORMATION	44
B.5.6	PLASMID-DNA-ÜBERTRAGUNG DURCH KONJUGATION	45
B.6	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	45
B.6.1	ZELLERTE UND PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE 2-DIMENSIONALE GEL-ELEKTROPHORESE	45
B.6.1.1	EXTRAKTION DES GESAMTZELLYSATS	46
B.6.1.1.1	ZELLAUF SCHLUß DURCH ULTRASCHALL	46
B.6.1.1.2	ZELLAUF SCHLUß DURCH FRENCH PRESS	46
B.6.1.2	EXTRAKTION VON MEMBRANPROTEINEN	46
B.6.1.2.1	EXTRAKTION VON MEMBRAN-ASSOZIIERTEN PROTEINE	47
B.6.1.2.1.1	SAURE GLYCIN-EXTRAKTION	47
B.6.1.3	PRÄZIPITATION DER KULTURÜBERSTANDSPROTEINE	48
B.6.2	PHENOLEXTRAKTION	49
B.6.3	POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	50
B.6.3.1	DISKONTINUIERLICHE GELELEKTROPHORSE	50

INHALTSVERZEICHNIS

B.6.3.2	COOMASSIE-FÄRBUNG	53
B.6.3.3	QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG	53
B.7	HOCHAUFLÖSENDE 2D-GELELEKTROPHORESE	54
B.7.1	ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG (1. DIMENSION)	55
B.7.1.1	PROBENAUFTRAG MITTELS EINQUELLEN	56
B.7.2	SDS-PAGE (2. DIMENSION)	57
B.7.2.1	GIESSEN DER SDS-PAGE GELE	57
B.7.2.1.1.1	ANSETZEN DER GELLÖSUNG	58
B.7.2.1.2	VORBEREITUNG DER ELEKTROPHORESE-KAMMER	59
B.7.2.2	EQUILIBRIERUNG DER IPG-STREIFEN	59
B.7.2.3	ELEKTROPHORESE-START	60
B.7.2.4	DETEKTIONSVERFAHREN UND AUSWERTUNG	61
B.7.2.4.1	SILBER-FÄRBUNG	61
B.7.2.4.2	COLLOIDALE COOMASSIE-FÄRBUNG	62
B.7.2.4.3	DIGITALISIERUNG DER GELE	63
B.7.2.4.4	ANALYSE DER BILDDATEN	63
B.7.2.4.5	IDENTIFIZIERUNG DER PROTEINSPOTS	63
B.7.2.4.5.1	„PEPTIDE MASS FINGERPRINTS“	63
C	Ergebnisse	64
C.1	SEQUENZANALYSE DES <i>MUTS</i>-GENS	64
C.1.1	SEQUENZIERUNG SEQUENTIELLER CF-ISOLATE	64
C.1.2	HÄUFIGKEIT VON <i>MUTS</i>- UND <i>MUTS</i>⁺-STÄMMEN WÄHREND DER CHRONISCHEN LUNGENINFEKTION	66
C.2	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG SEQUENTIELLER <i>P. AERUGINOSA</i>-ISOLATE	66
C.2.1	PYOCYANIN	66
C.2.2	MOTILITÄT	67
C.2.3	SIDEROPHOR-BILDUNG	67
C.2.4	PROTEASE-AKTIVITÄT	68
C.2.4.1	ELASTASE-AKTIVITÄT	70
C.2.5	RESISTENZENTWICKLUNG	70

INHALTSVERZEICHNIS

C.2.5.1	CEFINASETEST	71
C.2.5.2	MINIMALE HEMMKONZENTRATION	71
C.2.5.3	RT-PCR DES β -LACTAMASE-GENS	71
C.2.5.4	SEQUENZANALYSE	73
C.3	VERGLEICH DER PROTEOME SEQUENTIELLER <i>P. AERUGINOSA</i> -ISOLATE	74
C.3.1	VERGLEICH SEQUENTIELLER <i>P. AERUGINOSA</i> -ISOLATE VON PATIENT M	75
C.3.1.1	GESAMTZELLYSAT	77
C.3.1.1.1	GELAUSWERTUNG DES GESAMTZELLYSATS	77
C.3.1.2	KULTURÜBERSTANDSPROTEINE	93
C.3.1.2.1	GELAUSWERTUNG DER KULTURÜBERSTANDSPROTEINE	93
C.3.1.3	MEMBRAN-ASSOZIIERTE PROTEINFRAKTION	103
C.3.1.3.1	GELAUSWERTUNG DER MEMBRAN-ASSOZIIERTEN PROTEINFRAKTION	103
C.3.2	PROTEOMANALYSE VON ISOLATEN DER PATIENTEN V UND P	111
C.4	TRANSKRIPТОMANALYSE SEQUENTIELLER CF-ISOLATE	118
C.4.1	VERGLEICH VON TRANSKRIPТОM- UND PROTEOMDATEN	119
C.4.2	GLOBALE AUSWERTUNG DER TRANSKRIPТОM DATEN	123
C.4.2.1	BEZUG ZWEIER SPÄTER <i>MUTS</i> -STÄMME AUF EINEN FRÜHEN <i>MUTS</i> ⁺ -STAMM	123
C.4.2.2	BEZUG <i>MUTS</i> - AUF <i>MUTS</i> ⁺ -STÄMME	125
C.5	MARKERPROTEINE DER LUNGENADAPTATION	127
C.6	PROTEOM / TRANSKRIPТОM-BASIERTE HERLEITUNG DES METABOLOMS	130
C.6.1	INTERMEDIÄRMETABOLISMUS	130
C.6.2	TRANSKRIPТОIONS- UND TRANSLATIONS-LEISTUNG	134
C.6.3	PURIN- UND PYRIMIDINBASEN	134
C.6.4	KOFAKTOREN	136
C.6.5	KATABOLISMUS	137
C.6.6	STICKSTOFFMETABOLISMUS	139
C.6.7	ENERGIEMETABOLISMUS	141
C.6.7.1	ELEKTRONENTRANSPORT - GEKOPPELTE PHOSPHORYLIERUNG	141

INHALTSVERZEICHNIS

C.6.7.1.1	SAUERSTOFF ALS TERMINALER ELEKTRONENAKZEPTOR _____	141
C.6.7.1.2	DENITRIFIKATION _____	143
C.6.7.1.3	NITRAT/NITRIT-ABBAU _____	145
C.6.7.2	EXPRESSION DER ANAEROBEN REGULATOREN ANR, DNR UND IHF __	147
C.6.7.2.1	SEQUENZANALYSE DER ANAEROBEN REGULATOREN _____	150
C.6.7.3	PROTEOMANALYSEN VON <i>P. AERUGINOSA</i> UNTER ANAEROBEN KULTURBEDINGUNGEN _____	150
C.6.7.4	POTENTIELL ANR-REGULIERTE GENE _____	156
D	Diskussion _____	158
D.1	DER HYPERMUTIERENDE PHÄNOTYP _____	158
D.1.1	MUTATIONSLOCI _____	159
D.2	RESISTENZMECHANISMEN _____	160
D.2.1	DIE AMPC β-LACTAMASE _____	160
D.2.2	„MULTI-DRUG“-EFFLUXPUMPEN _____	162
D.3	VIRULENZFAKTOREN _____	163
D.4	ADAPTION DES METABOLISMUS _____	166
D.5	ENERGIEMETABOLISMUS _____	174
D.6	REGULATORISCHE NETZWERKE _____	183
E	Zusammenfassung _____	184
F	Literaturverzeichnis _____	187
G	Anhang _____	218

Liste der verwendeten Abkürzungen

λ	Wellenlänge
μ	mikro (10^{-6})
A	Adenin, Ampere
Abb.	Abbildung
AHL	<i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlacton
Ap ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASL	“airways surface liquid”
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAS	Chromazurol S
C	Cytosin, Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CF	zystische Fibrose
CFTR	CF transmembrane conductance regulator
Cm	Chloramphenicol
CM	Cytoplasmamembran
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
dest	destilliert
d	Dicke
d.h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest}	destilliertes, entionisiertes und sterilfiltriertes Wasser
IAA	Iodoacetamid
Km ^R	Kanamycinresistenz
k	kilo (10 ³)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LSU	„large subunit“
m	Meter, milli (10 ⁻³)
M	Mol
mcs	„multiple cloning site“
min	Minute
MW	Molekulargewicht
n	nano (10 ⁻⁹)
N	Stickstoff, Nukleotid
NL	nicht linear
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OH-Gruppe	Hydroxyl-Gruppe
p	piko (10 ⁻¹²)
Pa	Pascal
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„Polymerase-Kettenreaktion“

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PIA	Pseudomonas Isolation Agar
QS	Quorum-sensing
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (engl.: Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
spp.	Spezies
SSU	„small subunit“
T	Thymin
T _M	Schmelztemperatur
TAE	Tris / Acetat / EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
Tn	Transposon
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)amino-methan
U	Unit (engl. Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galaktopyranosid
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

A Einleitung

A.1 Mukoviszidose (Zystische Fibrose)

Die Mukoviszidose (*lat. mucus: Schleim, viscidus: zäh, klebrig*) oder Zystische Fibrose (*engl.: cystic fibrosis, CF*) ist eine seit langem bekannte, genetisch bedingte und auch heute noch früh letal verlaufende Stoffwechselerkrankung. Neben den ungenauen Beschreibungen des Krankheitsbilds durch den spanischen Anatomen Alfonso y de los Ruyzes aus dem Jahre 1606 existieren Überlieferungen aus dem Mittelalter: „Das Kinde stirbt bald wieder, dessen Stirne beim Küssen salzig schmeckt“ (zur Übersicht siehe Quinton, 1999).

Erstmals 1938 wurde die CF als klinisches Syndrom beschrieben (Andersen, 1938). Wenig später erkannte man den zugrunde liegenden autosomal-rezessiven Erbgang. Aufgrund der autosomal-rezessiven Vererbung liegt bei heterozygoten Eltern die Wahrscheinlichkeit, dass ein Neugeborenes an CF erkrankt, bei 25%. Abhängig vom ethnischen Ursprung liegt die Inzidenz der CF bei Neugeborenen in Nordamerika und Europa zwischen 1:2500 und 1:1600 (Gibson *et al.*, 2003). Dabei erschweren verschiedene Untersuchungsstrategien, aber auch unterschiedliche Diagnosekriterien den Vergleich der weltweiten Inzidenzen der CF. Die wenigen Arbeiten von anderen Kontinenten und Nichtkaukasiern ergaben eine Häufigkeit von 1:9000 in Südamerika, 1:15000 in Afrika und 1:32000 in Asien (Grebe *et al.*, 1994; Hamosh *et al.*, 1998; Imalzumi, 1995). Damit ist die CF in der kaukasischen (weißen) Bevölkerung die am häufigsten vorkommende autosomal-rezessive Erbkrankheit. Die Ursache für die Erkrankung wurde erstmals 1989 erkannt und beruht auf einer oder mehrerer Mutationen in einem einzigen Gen auf dem menschlichen Chromosom 7 (Riordan *et al.*, 1989). Dieses 250 kb große Gen mit 27 Exons kodiert für einen 1480 Aminosäuren langen (Zielenski *et al.*, 1991), von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) abhängigen Chloridionenkanal, den „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR), der die intrazelluläre Chloridionenkonzentration reguliert. Dieser Gendefekt bewirkt eine unzureichende Bildung des CFTR und in der Folge eine Fehlfunktion aller exokrinen Drüsen des Menschen.

Bis heute sind 1523 Mutationen des CFTR-Gens bekannt¹, die aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Funktion des CFTR-Proteins in sechs Klassen unterteilt werden (Gallati, 2003;

¹ <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

EINLEITUNG

Pilewski und Frizzell, 1999; Stuhmann *et al.*, 1999; Tsui und Durie, 1997). Die Mutationsklassen I-VI sind in Abbildung A-1 dargestellt.

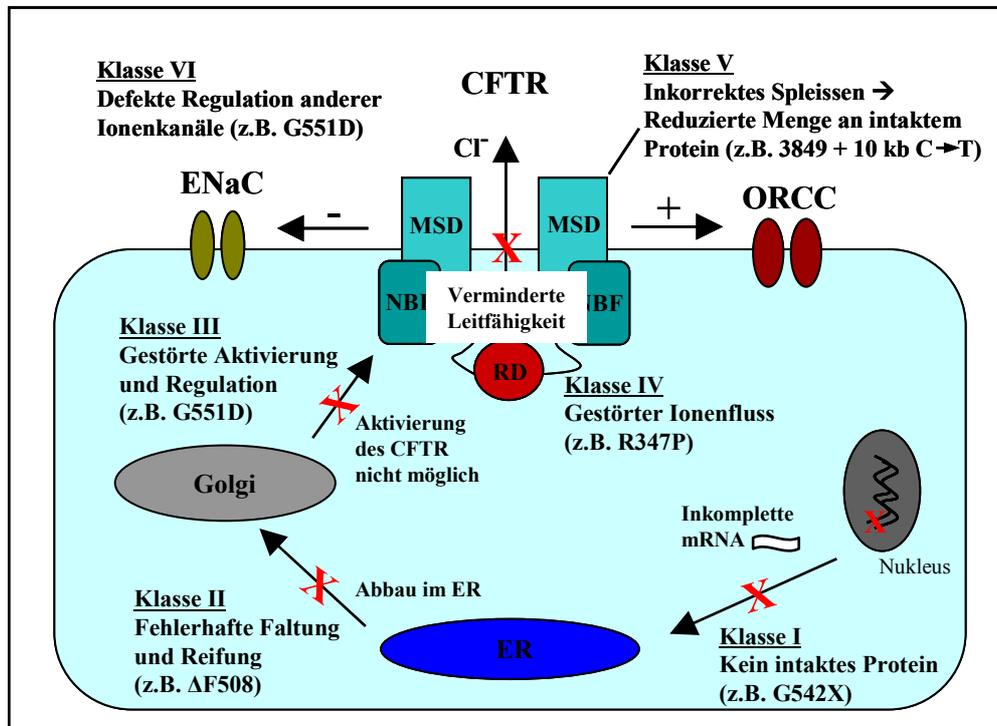


Abbildung A-1: Differenzierung der Mutationen des *cftr*-Gens in die CFTR-Mutationsklassen I-VI (mod. nach Gallati, 2003). ENaC, Epithelialer Na-Kanal; ORCC, Outward-rectifying Cl-Channel; MSD, Membrane-Spanning Domain; NBF, Nucleotide-Binding Factor; RD, Regulatory Domain.

Die verschiedenen CFTR-Mutationsklassen führen entweder zum Einbau eines defekten Kanals, zu einem fehlgefalteten Protein, das im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verbleibt und abgebaut wird; oder zu gar keinem intaktem Protein. Generell gibt es eine Korrelation zwischen der Schwere des zugrunde liegenden Gendefekts und der Schwere des Verlaufs der Erkrankung.

Die Mutation $\Delta F508$ ist die weltweit häufigste und bestcharakterisierte. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Deletion der Aminosäure Phenylalanin an Position 508 des Proteins. Die dadurch bedingte fehlerhafte Reifung des CFTR-Proteins wird im ER erkannt, wo es verbleibt und degradiert wird. (Klasse II). Daraus resultiert eine drastische Reduktion an CFTR-Protein in der apikalen Plasmamembran der Zelle (Morales *et al.*, 1999; Welsh und Smith, 1995). Die Häufigkeit der Mutation $\Delta F508$ liegt weltweit etwa bei ca. 70 %, während alle anderen Mutationen jeweils unter 10 % liegen (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1990, 1994). In Europa liegt der Prozentsatz der Mutation $\Delta F508$ bei 71,5 % (Helmkamp, 2000; Tümmler *et al.*, 1996).

Bei homozygotem CFTR-Defekt kommt es zur Störung des transepithelialen Transports von Chloridionen in allen exokrinen Drüsen und somit des Wasser- und Elektrolythaushalts. Die verminderte oder nicht mehr vorhandene Sekretion der Chloridionen führt zu einer passiven Rückresorption von Na^+ und H_2O und somit zu einer stark erhöhten Viskosität der Sekrete.

Verdicktes, zähes Sekret verstopft die Ausführungsgänge der Drüsen, wodurch es in vielen Organsystemen wie beispielsweise im Gastrointestinaltrakt (GT), im Respirationstrakt (RT) und im Urogenitalsystem (UGS) zu Sekretstau und zu Entzündungsreaktionen kommt. In der Folge geht das Gewebe allmählich zugrunde und wird zum Teil sekundär durch Zysten und Bindegewebe ersetzt. Diese Veränderungen haben der Erkrankung den Namen Zystische Fibrose gegeben (Andersen, 1938).

Die meisten CF-Patienten leiden neben einem hohen Elektrolytverlust an einer Retention von Verdauungsenzymen mit ungenügendem Aufschluss der Nahrung und somit an Malnutrition, die infolge einer Gedeihstörung früher oft zum Tode führte. Mit Hilfe einer Substitutionstherapie kann der durch die Pankreasinsuffizienz der CF-Patienten bedingte intestinale Enzymmangel gut ausgeglichen werden. Deshalb ist heutzutage die chronisch bakterielle Pneumonie der Hauptgrund für die erheblich reduzierte Lebenserwartung der CF-Patienten.

Die Veränderungen im Respirationstrakt (RT) führen zu einer Prädisposition für chronische Infektionen. Zäher Schleim verschließt die Bronchien, und die ziliäre Clearance kommt zum Erliegen. Dieses Milieu erweist sich auch in den tiefen, normalerweise keimfreien Luftwegen als optimaler Nährboden für Virus- und vor allem Bakterieninfektionen, die bei letzteren oft zu chronischen Lungenentzündungen führen.

Die Infektion der CF-Lunge kann durch verschiedene bakterielle Erreger erfolgen. Neben den klassischen Erregern von Atemwegsinfektionen, den A-Streptokokken und Pneumokokken, kann es zu einer Infektion mit CF-spezifischen Bakterien wie *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und Vertretern des *Burkholderia cepacia*-Komplexes (BCC) kommen. Eine erste Kolonisierung im Kleinkindesalter erfolgt typischerweise mit *S. aureus* und *H. influenzae*. Mit zunehmendem Alter der CF-Patienten dominiert *P. aeruginosa*. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* und Vertreter des BCC besiedeln die CF-Lunge mit mäßiger Prävalenz z.T. schon früh und sind so über alle Altersklassen hinweg zu finden (Abbildung A-2). Charakteristisch für die fortschreitende Pneumonie ist die progressive Destruktion von Lungengewebe. Dabei sind die physiologischen und histologischen Veränderungen der Lunge eines CF-Patienten eng mit den Veränderungen der mikrobiellen Kolonisierung verbunden. In der Endphase der Erkrankung findet man *P. aeruginosa* in den am meisten geschädigten Bereichen, wo es sich

an defekte Membranen anheftet oder in Exsudaten als multizelluläre biofilm-ähnliche Kolonien vorkommt (Baltimore *et al.*, 1989).

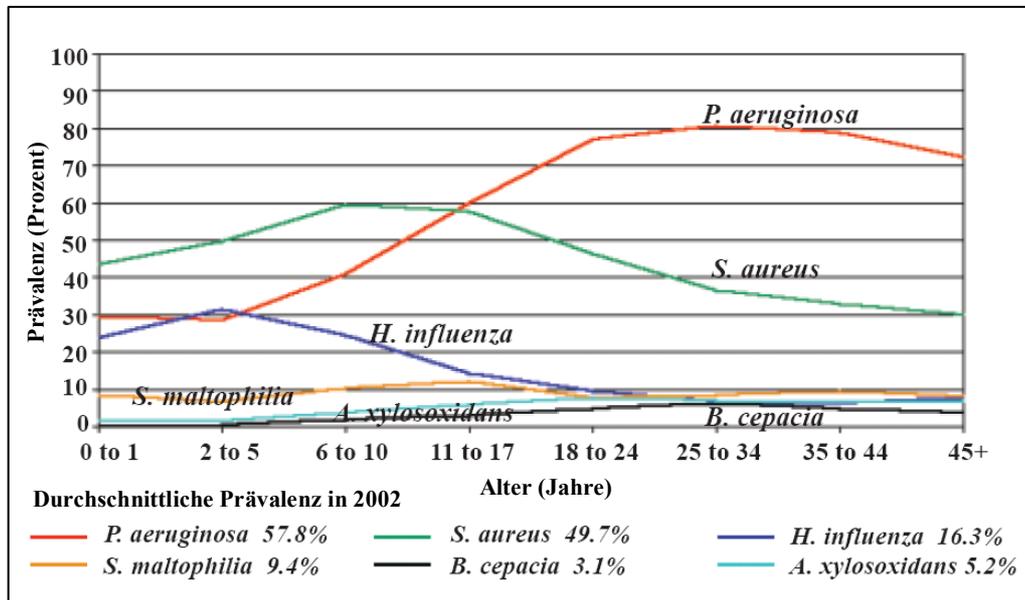


Abbildung A-2: Art und Anzahl der CF-Isolate in Abhängigkeit vom Alter der Patienten (Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2004)

Die Besiedelung der CF-Lunge mit *P. aeruginosa* erfolgt häufig bereits in einem Alter von fünf bis zehn Jahren (Tümmler und Kiewitz, 1999) im Gefolge eines banalen viralen oder bakteriellen Infekts der oberen Atemwege. 30% aller CF-Patienten sind schon kurz nach der Geburt mit *P. aeruginosa* besiedelt, wohingegen einige CF-Patienten auch im Erwachsenenalter noch *Pseudomonas*-frei sein können. 1993 konnte nachgewiesen werden, dass die Art der Mutation des CFTR-Gens die Wahrscheinlichkeit einer frühzeitigen Infektion determiniert (Kubesch *et al.*, 1993). Nach dem Abklingen des akuten Infekts kann *P. aeruginosa* oft auch mit *in vitro* wirksamen Antibiotika nicht wieder eradiziert werden. Heute leiden etwa 90% der CF-Patienten an einer chronischen Infektion der Lunge durch *P. aeruginosa*.

Im Verlauf der Infektion kommt es durch weitere Entzündungsprozesse und die zystisch-fibrotische Degeneration des Lungengewebes zu einer fortschreitenden Reduktion der Lungenfunktion. Die daraus resultierende respiratorische Insuffizienz ist für 90% der Todesfälle bei CF-Patienten verantwortlich (Hirche *et al.*, 2003).

Heutzutage existieren mehrere Hypothesen der Pathophysiologie. Die „high-salt“-Hypothese spricht von einer Beeinträchtigung der Funktion der körpereigenen kationischen Defensine, die aus der erhöhten Salzkonzentration in dem das Epithel bekleidenden Flüssigkeitsfilm (ASL, „airways surface liquid“) resultiert (Smith *et al.*, 1996).

Sehr kontrovers wird die Hypothese diskutiert, dass *P. aeruginosa*-Lipopolysaccharid (LPS) mit dem CFTR-Protein interagiert und CFTR so als Rezeptor fungiert (Pier *et al.*, 1997; Coleman *et al.*, 2003). Eine Arbeitsgruppe um Alice Prince konnte - allerdings mit Laborstämmen und nicht mit Patientenisolaten - zeigen, dass CF-Epithelzellen einen Rezeptor besitzen, an den *P. aeruginosa* binden kann (Imundo *et al.*, 1995). Durch die intrazelluläre Retention des unfertigen CFTR-Proteins kommt es zu einer vermehrten Sialisierung von Glykolipiden auf den Membranen einer Epithelzellkultur (Bryan *et al.*, 1998). Dies führt zu einer erhöhten Anzahl der asialo-GM₁-Rezeptoren, was wiederum die Pilusvermittelte Anheftung von *P. aeruginosa* verstärkt (Zar *et al.*, 1995). Neben der Beobachtung, dass Pili bei *P. aeruginosa*-CF-Isolaten oft fehlen (Schroeder *et al.*, 2001), lässt auch die Tatsache, dass *P. aeruginosa* überwiegend an den Mukus in der ASL, nicht aber direkt an das Epithel adhärirt, die Asialo-GM₁-Hypothese eher unwahrscheinlich erscheinen (Worlitzsch *et al.*, 2002).

Grundlegend wird die Frage der intrinsischen Entzündungsneigung der CF-Lunge diskutiert. Die wohl wesentlichste Studie zu diesem Thema zeigt, dass in Bronchialepithelzellen von Gesunden das antiinflammatorische Zytokin IL-10 zu finden ist, nicht aber die proinflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8. CF-Epithelzellen dagegen sezernieren IL-6 und IL-8, aber kein IL-10 (Bonfield *et al.*, 1995). Darüber hinaus stimuliert die erhöhte IL-8 Sekretion auch eine vermehrte Aktivierung von NF-κB (DiMango *et al.*, 1998). Die Aktivierung von NF-κB und proinflammatorischen Genen wird aber auch über die Bindung einiger *P. aeruginosa*-Oberflächenkomponenten an verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLR) hervorgerufen. So bindet beispielsweise die polare Flagelle an TLR2 und TLR5, ebenso wie an Asialo-GM₁ (Adamo *et al.*, 2004). Pili und non-pilus-Adhäsine binden an TLR2 (Soong *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2004) und ExoS (siehe Kapitel A.2) aktiviert Monozyten durch die Bindung an TLR2 und TLR4 (Epelman *et al.*, 2004). Eine Signalkaskade wird auch von *P. aeruginosa*-LPS durch die Bindung an TLR4 ausgelöst (Backhed *et al.*, 2003).

Diese älteste pathophysiologische Hypothese spricht von ungewöhnlich viskösen Sekreten aus den submukösen Drüsen, bedingt durch die Fehlfunktion des CFTR („abnormal gland secretion“-Hypothese; Engelhardt *et al.*, 1992; Trout *et al.*, 1998), die mit der verringerten Sekretion von Salz und Wasser erklärt wird.

Die „low volume“-Hypothese geht davon aus, dass die mechanische Reinigung der Atemwege von Mukus die wichtigste körpereigene Abwehr gegen inhalierte Bakterien darstellt. Infolge der Fehlfunktion des CFTR kommt es durch mehrere Faktoren zu einer Verringerung des ASL-Volumens. Zum einen werden Cl⁻-Ionen nicht mehr aktiv aus der Zelle sezerniert, was zu einem passiven Nachstrom von Wasser und somit zu einer Volumenzunahme des ASL führen würde, und zum anderen wird die aktive Aufnahme von Natrium-

ionen in die Zelle durch den epithelialen Natriumkanal ENaC nicht mehr inhibiert. Die dadurch in der Zelle stark erhöhte Konzentration an Elektrolyten führt zu einem passiven Einstrom von Wasser durch die für Wasser (nicht aber für große Moleküle) in hohem Maße permeable Zellmembran und somit zu einer Konzentrierung von Muzinen und Proteinen in der ASL. Die nun hochviskose Mukus-Schicht kann durch die Zilientätigkeit nicht mehr abtransportiert werden und verbleibt in den Atemwegen (Rubenstein, 2005). Darüber hinaus weisen CF-Epithelzellen einen vermehrten Sauerstoffverbrauch auf, so dass der Sauerstoffpartialdruck der Mukus-Schicht über dem Epithel stetig abnimmt (Stutts *et al.*, 1986; Worlitzsch *et al.*, 2002). Der O₂-Verbrauch durch das fakultativ anaerobe Bakterium *P. aeruginosa* trägt zusätzlich zur Schaffung von mikroaeroben Verhältnissen bei. In anaeroben Regionen liegt *P. aeruginosa* in Makrokolonien vor, die Ähnlichkeit mit der 3D-Struktur von Biofilmen aufweisen. Auf den metabolischen Stress durch den Sauerstoffmangel reagiert *P. aeruginosa* mit einer erhöhten Alginatproduktion, was die Sauerstoffdiffusion nochmals abschwächt (Hasset, 1996). Diese Alginatschicht dient zudem als Schutz gegen antimikrobielle Produkte der Neutrophilen, die in der anaeroben Umgebung darüber hinaus nicht mehr in der Lage sind, Sauerstoffradikale zu bilden.

Abbildung A-3 zeigt ein schematisches Modell des veränderten Milieus in der CF-Lunge.

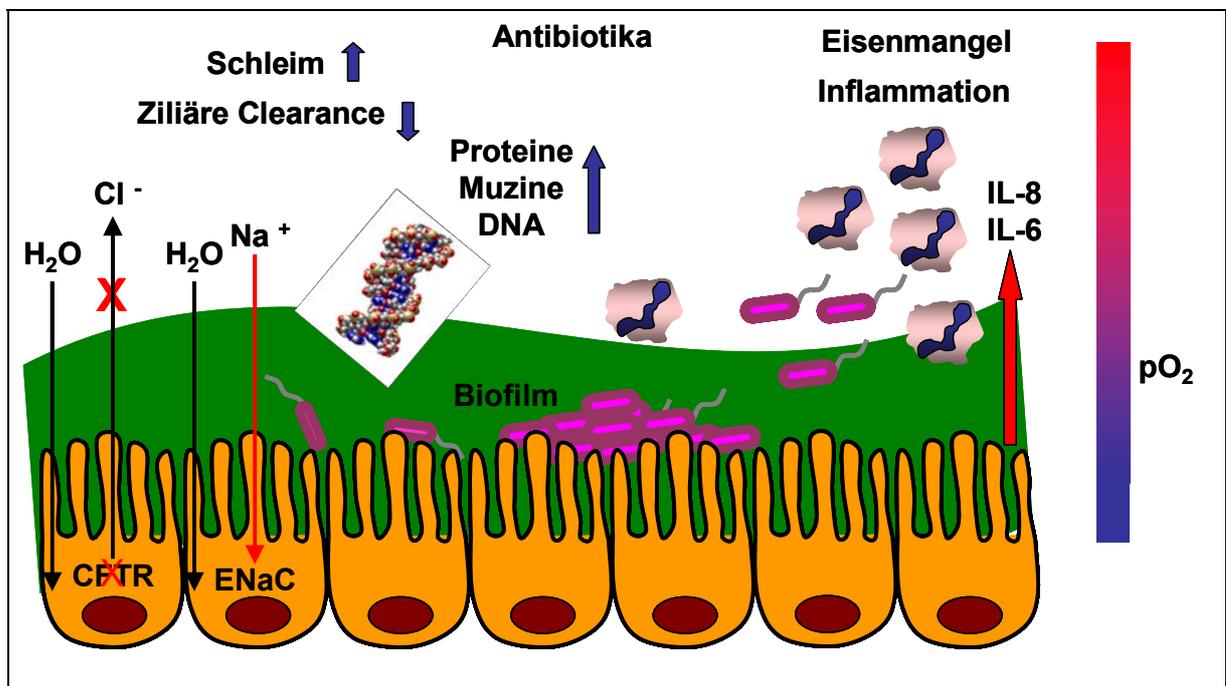


Abbildung A-3 Schematische Darstellung des durch den defekten CFTR und die chronische *P. aeruginosa*-Infektion veränderten Milieus der CF-Lunge.

Im Verlauf der Infektion findet auch bei Klonalität der CF-Isolate eine hohe phänotypische Diversifizierung von *P. aeruginosa* statt. Isolate des chronischen Erkrankungsstadiums zeigen oft eine eingeschränkte Motilität, produzieren kein vollständiges Lipopolysaccharid (z.B. O-Antigenfizienz) mehr und sekretieren nur noch reduzierte Mengen an Virulenzfaktoren (siehe Kapitel A.2). Viele Isolate zeigen eine erhöhte Produktion an Alginate, so genannte mukoide Stämme. Umschlossen von dieser Schleimhülle bildet *P. aeruginosa* biofilmähnliche Mikrokolonien. In diesen Biofilmen ist *P. aeruginosa* nun weder vom Immunsystem des Patienten noch durch Antibiotika wieder zu eradizieren. Die Lebenserwartung eines CF-Patienten beträgt heute im Durchschnitt 32 Jahre, selten über 40 Jahre (Nasr, 2000). Vor dem Einsatz von Antibiotika hingegen verstarb ein Großteil der Patienten bereits im Kindesalter. Durch eine regelmäßige systemische und inhalative Gabe von Pseudomonas-wirksamen β -Lactam-Antibiotika (z.B. Aminoglykoside oder Polymyxine) kann die chronische Infektion abgemildert und die Lungenfunktion über einen längeren Zeitraum einigermaßen stabil gehalten werden. Bei Ausschöpfung aller konservativen Therapieoptionen kann eine Lungentransplantation die Lebenserwartung nochmals erhöhen. Allerdings ist auch die transplantierte Lunge gefährdet, durch *P. aeruginosa* besiedelt zu werden, da das Bakterium als Teil der Besiedelungsflora in den oberen Atemwegen (z.B. Sinus) persistiert und von dort nicht eradiziert werden kann. Begünstigend wirkt die medikamentöse Immunsuppression des Patienten, die notwendig ist, um eine Transplantatabstoßung zu vermeiden. Von einer Heilung oder Verhinderung der CF-Infektion kann bis heute keine Rede sein. Ansätze, Impfstoffe zu entwickeln, waren bis jetzt erfolglos. Noch schwieriger gestaltet sich eine mögliche gentherapeutische Heilung der CFTR-Mutation.

A.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist die am längsten bekannte und humanmedizinisch wichtigste Pseudomonaspezies. 1882 gelang es Gessard erstmals, sie in Reinkultur zu kultivieren. Gessard gab ihr den Namen *Bacterium pyocyaneum* nach dem Pigment Pyocyanin, das die typische blau-grüne Färbung der Kulturen und auch des Eiters bei Wundinfektionen durch *P. aeruginosa* verursacht.

Die Bezeichnung *Pseudomonas* wurde 1894 von Migula eingeführt und fasste alle geraden, stäbchenförmigen Bakterien mit polaren Bewegungsorganellen zu einer Gattung zusammen (Migula, 1894). Erst die Möglichkeit der molekularbiologischen 16S rRNA-Untersuchung ermöglichte eine präzise Gattungsbeschreibung dieser morphologisch so heterogenen Gruppe. Basierend auf rRNA-Homologien konnte die Gruppe 1973 in fünf

rRNA-Homologiegruppen eingeteilt werden (Palleroni *et al.*, 1973). Alle fünf Gruppen gehören zu der Division der Proteobakterien, wo sie den verschiedenen Subdivisionen zugeordnet sind. *P. aeruginosa* gehört taxonomisch zur Familie der *Pseudomonaceae*, die die rRNA-Homologiegruppe I umfasst und in die Subdivision der γ -Proteobakterien eingeordnet wird².

P. aeruginosa ist ein Gram-negatives, polar begeißeltes, 0,5-1 x 1,5-5 μm großes Stäbchenbakterium mit hohem GC-Gehalt (bis 68%). Ihren Namen erhielt die Spezies (*aerugo*, lat. = Grünspan) durch ihre charakteristische Farbe, die durch die Bildung der Pigmente Pyocyanin (blaugrün) und Pyoverdin, ehemals Fluoreszein (gelbgrüne Fluoreszenz), zustande kommt (Braveny und Krump-Schmidt, 1985). Weitere Pigmente sind Pyrro Rubin (rötlich) und Pyomelanin (bräunlich). Charakteristisch ist auch die Bildung des Duftstoffs o-Aminoacetophenon, durch den die Kulturen einen süßlich-aromatischen (=lindenblütenartigen) Geruch aufweisen.

P. aeruginosa ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium und gilt als typischer Nasskeim. Er stellt äußerst geringe Anforderungen an seinen Lebensraum und vermag sich durch gezielte Regulation seines umfangreichen Genoms (bis zu 6,3 Mbp), an nahezu jegliche Lebensbedingung anzupassen. *P. aeruginosa* ist in der Lage bei Temperaturen von 10°C bis 42°C zu wachsen, wobei das Wachstumsoptimum bei 35°C liegt. Bekannt für seine metabolische Vielseitigkeit kann *P. aeruginosa* mehr als 100 verschiedene organische Verbindungen als Kohlenstoffquelle nutzen. Dazu gehören verschiedene Mono-, Di- und Tricarbonsäuren, sowie Zucker, Fettsäuren, Alkohole, Polyalkohole, Glycole, aromatische Verbindungen, Amine und Aminosäuren. Auch in destilliertem Wasser kann er gedeihen, sofern es Spuren von organischen Substanzen enthält (Favero *et al.*, 1971). Für den Abbau von Glucose verwenden Pseudomonaden den Entner-Doudoroff-Weg, der wegen des charakteristischen Zwischenprodukts 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat auch KDPG-Weg genannt wird. Enterobakterien nutzen dagegen hauptsächlich den Embden-Meyerhof-Weg, bei dem Glucose-6-phosphat, anstatt über 6-Phosphogluconat und KDPG, über Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat umgewandelt wird (Abbildung A-4).

² http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline_5_2004.pdf

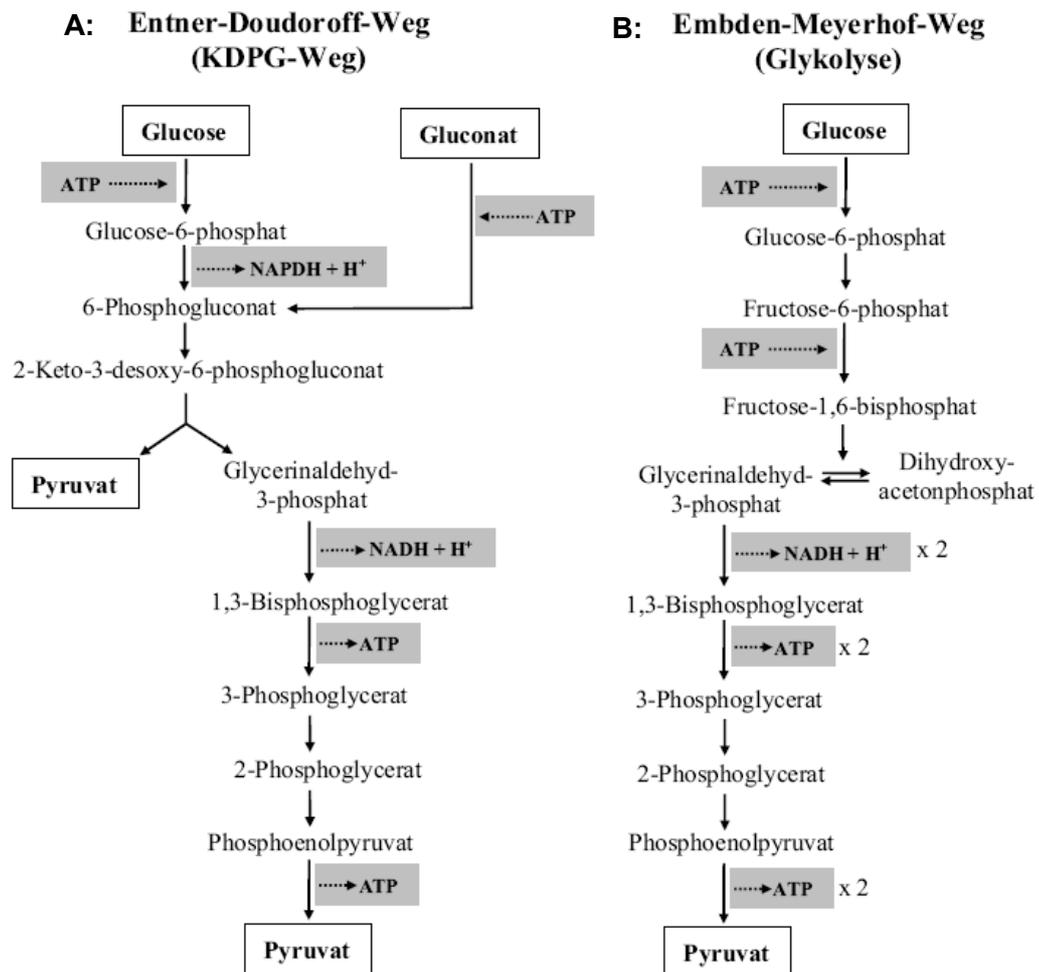


Abbildung A-4: Wege des Hexose-Abbaus: A: Entner-Doudoroff-Weg (KDPG-Weg), B: Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse). Mit dem Embden-Meyerhof-Weg werden aus 1 Mol Glucose 2 mol NADH + H⁺ und 2 Mol ATP erzeugt. Mit dem Entner-Doudoroff-Weg werden aus 1 Mol Glucose 1 mol NADPH + H⁺, 1 Mol NADH + H⁺ und nur 1 Mol ATP gewonnen.

Allerdings bevorzugt *P. aeruginosa*, wie bereits erwähnt, organische Säuren (vor allem Zwischenprodukte des TCA-Zyklus) anstelle von Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle.

Die Literatur beschreibt *P. aeruginosa* als einen fakultativ anaeroben Nonfermenter, der bei Sauerstoffmangel in der Lage ist, über Denitrifikation (anaerobe Atmung) Nitrat (NO₃⁻) anstelle von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden. Obwohl Pseudomonaden allgemein als Bakterien gelten, die nicht dazu fähig sind, eine Gärung durchzuführen, wurde bereits die Fermentation von Arginin oder auch Pyruvat zur Energiegewinnung beschrieben (Van der Wauven *et al.*, 1984; Eschbach *et al.*, 2004).

Diese Fähigkeit ist möglicherweise gerade bei der Besiedelung der CF-Lunge von besonderer Bedeutung, da *P. aeruginosa* dort wahrscheinlich unter mikroaeroben Bedingungen persistiert (Worlitzsch *et al.*, 2002)

Typische Habitate von *P. aeruginosa* sind neben dem Erdboden und Oberflächenwasser auch Salben, Seifen, Kontaktlinsenflüssigkeiten, Schläuche von Beatmungsgeräten und Infusionsgeräten, Baby-Inkubatoren, Endoskope und sogar Desinfektionsmittel (Adair *et al.*, 1969). Die Abwehrmechanismen gesunder Menschen sind in der Regel in der Lage, den Erreger abzuwehren. Zu schweren Infektionen kommt es daher bei prädisponierten Patientengruppen, weswegen *P. aeruginosa* als opportunistischer Erreger gilt. Die bedeutendste Prädisposition ist eine Schwächung des Immunsystems, sei sie primär durch eine immunsupprimierende Grunderkrankung oder sekundär durch eine medikamentöse Immunsuppression bedingt. Daher leiden vor allem Patienten auf Intensivstationen und Tumor- oder AIDS-Patienten an einer Infektion mit *P. aeruginosa*. Die Insuffizienz der Abwehr kann aber auch in einer fehlenden Kontinuität der ersten Abwehrbarrieren, nämlich der Haut und der Schleimhäute bestehen, weswegen Verbrennungspatienten und Patienten mit chronischen Wunden häufig mit *P. aeruginosa* infiziert sind. Eine große Rolle spielt *P. aeruginosa* bei Patienten mit CF, bei denen es fast immer zu einer chronischen Infektion des Respirationstrakts kommt (siehe Kapitel A.1). Damit ist *P. aeruginosa* zu einem der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen geworden (z.B. Pneumonien, Harnwegsinfektionen, Katheterinfektionen; Tennant *et al.*, 2005).

Ein besonderes Problem bei Infektion mit *P. aeruginosa* ist seine ausgeprägte intrinsische Antibiotikaresistenz, sowie seine außergewöhnliche Fähigkeit zur Entwicklung multipler Resistenzen. Maßgeblich für die intrinsische Antibiotikaresistenz ist der Aufbau der äußeren Zellmembran, die bei allen Gram-negativen Bakterien eine semipermeable Barriere gegenüber dem umgebenden Milieu darstellt. Eine unspezifische Aufnahme kleiner hydrophiler Moleküle, wie beispielsweise β -Lactam-Antibiotika, kann nur über aus Pori-
nen (z.B. OprM) gebildeten, wassergefüllten Kanälen erfolgen. Einen Mechanismus zur spezifischen Entgiftung der Zelle stellen die so genannten Efflux-Systeme dar (z.B. die fünf „multidrug-efflux“ Pumpen). Hierbei handelt es sich um Proteinkomplexe, die den aktiven Transport unterschiedlicher Substanzen, einschließlich verschiedener Antibiotikaklassen aus der Zelle heraus bewirken. Zusätzlich verfügt *P. aeruginosa* über eine chromosomal kodierte β -Lactamase (AmpC), die β -Lactam-Antibiotika spaltet, sowie über verschiedene Aminoglykosid-Phosphotransferasen.

Darüber hinaus ist *P. aeruginosa* in der Lage, Biofilme zu bilden (Dunne *et al.*, 2002). Ein Biofilm ist eine komplexe Aggregation von Bakterien, charakterisiert durch Oberflächenanhaftung, strukturelle Heterogenität, genetische Diversität, komplexe Interaktionen und eine extrazelluläre Matrix. Die nach der Anheftung an den Untergrund gebildeten Mikro-

kolonien werden von einer hochviskosen Alginatschicht aus einem linearen anionischen Polymer aus 1,4-verknüpfter β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronsäure, umgeben (Gill *et al.*, 1987). In dieser Form weist *P. aeruginosa* eine erhöhte Antibiotikatoleranz auf (Nickel *et al.*, 1985). Außerdem vermittelt die Anheftung der Zellen an den Untergrund den Kolonien Halt gegen mechanische Beanspruchungen wie etwa Gewässerströmungen oder den Zilienschlag eines besiedelten Epithels (Read and Costerton, 1987).

Kontrolliert wird die Biofilmbildung, ebenso wie die Expression der Virulenzfaktoren durch ein Zelldichte-abhängiges Zell-Zell-Kommunikationssystem, dem Quorum Sensing (QS). Diese bakteriellen Kommunikationssysteme beruhen in der Regel auf kleinen, frei diffundierbaren Signalmolekülen. Gram-positive Bakterien verwenden hierbei meist Aminosäuren und kurze Peptide, Gram-negative Bakterien dagegen zumeist Fettsäurederivate (Kleerebezem *et al.*, 1997; Lazizzera *et al.*, 1998; Shapiro *et al.*, 1998). Die bei Gram-negativen Bakterien am häufigsten vorkommenden Botenstoffe sind N-Acyl-Homoserinlactone (AHL). QS-Systeme basieren auf zwei Proteinen, einer AHL-Synthase und einem AHL-Rezeptor, der als transkriptioneller Regulator fungiert. Bei geringen Populationsdichten produzieren die Zellen mittels der AHL-Synthase eine basale AHL-Konzentration. Sobald die Zelldichte ansteigt, reichern sich die AHL-Signalmoleküle im Kulturüberstand an. Da AHL-Moleküle jedoch frei durch die bakterielle Zellwand diffundieren können, steigt mit zunehmender Populationsdichte auch die intrazelluläre AHL-Konzentration. Bei einer kritischen Schwellenkonzentration bindet das Signalmolekül an ein Rezeptorprotein und bewirkt die Induktion oder Repression der Transkription von Zielgenen. Über dieses System wurde zum ersten Mal bei dem marinen Organismus *Vibrio fischeri* berichtet, bei dem es dessen Biolumineszenz kontrolliert (Nealson *et al.*, 1970). Bei *P. aeruginosa* sind zwei hierarchisch angeordnete QS-Systeme bekannt. Das *las*-System, bestehend aus dem transkriptionellen Regulator LasR und der AHL Synthase LasI, die die Synthese des N-3-oxo-dodecanoyl-Homoserinlactons (3-oxo-C12-HSL) katalysiert, und das *rhl*-System, bestehend aus RhlR und RhlI, das die Synthese des N-butanoyl-Homoserinlactons (C4-HSL) synthetisiert.

Darüber hinaus verfügt *P. aeruginosa* über ein großes Repertoire an zellassozierten und sekretierten Virulenzfaktoren. Zellanhänge, wie die Flagelle und die Typ IV Pili, sind neben der Motilität auch für die Anheftung an Epithelzellen zuständig und damit essentiell für die Etablierung einer Infektion. Sekretierte Proteasen, wie die Elastasen (LasA und LasB) und die alkalische Protease (AprA), erleichtern eine Invasion, da sie die interzellulären Verbindungen der Organe zur Auflösung bringen. Die Fähigkeit von LasA und LasB, Elastin zu zerstören, ist einer der wichtigsten Pathomechanismen während der akuten Infektion.

EINLEITUNG

Elastin ist ein Hauptbestandteil des menschlichen Lungengewebes und für ihre Elastizität verantwortlich. Darüber hinaus sorgt Elastin auch in den Blutgefäßen für deren Elastizität. Neben dem elastolytischen Effekt vermag LasB auch Fibrin und Kollagen abzubauen. Darüber hinaus inaktiviert LasB die humanen Immunglobuline IgG und IgA, Atemwegs-Lysozym, Komplementbestandteile, sowie Substanzen, die beim Schutz der Lunge gegen Proteasen eine Rolle spielen, wie der α -1-Proteaseinhibitor und der Bronchialmukus-Proteaseinhibitor. LasB kann also neben der direkten Schädigung von Gewebe auch das Immunsystem schwächen. Die Rolle der Elastasen während einer chronischen Infektion, wie beispielsweise bei CF-Patienten, ist noch nicht eindeutig geklärt. Studien sprechen von einer Neutralisierung von LasB durch hohe AK-Titer und von einem Abbau von LasA durch neutrophile Elastase.

Hämolsine, insbesondere hitzestabile Phospholipase C und Glycolipid, zerstören Zellen, indem sie Lipide und Lecithin spalten. Durch die Schädigung polymorphkerniger Granulozyten wird damit die Phagozytose erschwert.

Des Weiteren wird eine Gewebeschädigung durch die indirekte Wirkung von Endotoxin und die direkte Wirkung von Exotoxin A und S (ExoA, ExoS) erreicht. Gelangt Lipid A lysierter Bakterienzellen in den Blutkreislauf, so ergeben sich eine Reihe schwerer Folgen wie Fieber, Hypotonie und Entzündung bis hin zum septischen Schock.

Wie auch das Diphtherietoxin (ADP-Ribosyltransferase) katalysiert ExoA von *P. aeruginosa* die ADP-Ribosylierung und damit die Inaktivierung des eukaryotischen Elongationsfaktors EF-2. Dadurch kommt es zur Inhibierung der Proteinbiosynthese in der Wirtszelle und zum Zelltod. Auch bei ExoS handelt es sich um eine ADP-Ribosyltransferase. Sie inaktiviert vor allem GTP-Bindeproteine wie Ras. Drei weitere Effektorproteine sind ExoT, ebenfalls eine ADP-Ribosyltransferase, ExoU, eine Phospholipase, sowie ExoY, eine Adenylatzyklase.

Außer ExoA, das vom TypII-Sekretionssystem (T2SS) transloziert wird, sind alle anderen Effektorproteine (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) von einem funktionsfähigen TypIII-Sekretionssystem (T3SS) abhängig, das sie an ihren Wirkungsort in die Zielzelle transloziert. Die Gencluster, welche für das T3SS kodieren, werden als *psc*-, *pcr*-, *exs*- und *pop*-Gene bezeichnet. Dabei kodieren die *psc*- und *pcr*-Gene hauptsächlich die Komponenten des Sekretionsapparats, während die *exs*-Genprodukte in die Regulation des T3SS involviert sind. Die Proteine PopB und PopD sind essentiell für die Translokation der Effektorproteine in die Wirtszelle.

Die Siderophore Pyoverdin und Pyochelin tragen, neben ihrer Funktion als Eisenchelatoren, durch die Bildung von Hydroxylradikalen zur Gewebeschädigung bei.

A.3 Der hypermutierende Phänotyp

Mutator- oder hypermutierende Stämme besitzen im Vergleich zu den normalerweise vorkommenden Vertretern einer Spezies eine um den Faktor 10-1000 erhöhte Mutationsrate. Diese Stämme weisen meist Veränderungen in den Genen auf, die für DNA-Reparatursysteme kodieren (Miller, 1996).

Hypermutierende Isolate pathogener Bakterien wurden in natürlichen Populationen von *E. coli*, *Salmonella enterica*, *P. aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *S. aureus* und *H. influenzae* beschrieben (Bucci *et al.*, 1999; Denamur *et al.*, 2002; LeClerc *et al.*, 1996; Matic *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 2000, 2002; Prunier *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004). Bei der Mehrheit dieser Mutatorstämmen wurden Defekte in einer oder mehreren Komponenten des methylierungsabhängigen DNA-Reparatursystems (MMR) gefunden, vor allem aber im *mutS*-Gen (LeClerc *et al.*; 1996; Li *et al.*, 2003; Matic *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 2002). Das MMR-System ist für die Korrektur von Replikationsfehlern zuständig und reduziert die Häufigkeit der Rekombination homologer DNA Sequenzen (Matic *et al.*, 1995; Modrich & Lahue, 1996; Rayssiguier *et al.*, 1989). In *E. coli* besteht das MMR-System aus den Proteinen MutS, MutL, MutH und der HelicaseII (UvrD), wohingegen MutH in *P. aeruginosa* nicht existiert.

Mutationen in den MMR-Genen führen neben einer 100–1000 fach erhöhten Mutationsrate auch zu einer erhöhten Rekombination zwischen nicht-identischen DNA-Sequenzen (Cox, 1976; Glickman & Radman, 1980; Matic *et al.*, 1995; Schaaper & Dunn, 1987).

Das Vorkommen des hypermutierender Stämme in natürlichen Populationen wird nur auf etwa 1% geschätzt, wobei der Mutatoranteil unter speziellen Bedingungen, wie der chronischen Infektion der CF-Lunge, auf bis zu 20 % ansteigen kann (LeClerc *et al.*, 1996; Matic *et al.*, 1997; Oliver *et al.*; 2000).

Als Grund für die relativ geringe Verbreitung von Mutatorstämmen wird die negative Selektion durch ein hohes Maß an schädlichen Mutationen gesehen (Dawson, 1999). Wird jedoch eine nützliche Mutation erworben, wie beispielsweise eine Resistenz gegen Antibiotika, kann sich der hypermutierende Phänotyp dank dieser Mutation herausselektionieren und stabilisieren (Chao & Cox, 1983; Giraud *et al.*, 2002; Taddei *et al.*; 1997a). Dieser Effekt konnte auch anhand eines gnotobiotischen Mausmodells gezeigt werden, bei dem eine Antibiotikabehandlung nicht nur zu einer Selektion auf resistente Bakterien, sondern auch zu einer Selektion auf MMR-defekte Mutatorstämmen geführt hat (Giraud *et al.*; 2002). In einer sich stetig verändernden Umgebung können Bakterien mit einer höheren Mutationsrate vermutlich besser überleben, da sie sich schneller und effektiver an wech-

selnde Bedingungen anpassen (Giraud *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 1989; LeClerc *et al.*, 1996; Sniegowski *et al.*, 1997; Taddei *et al.*, 1997b).

Hypermutierende Bakterien sind von besonderer klinischer Relevanz, da sie die Entstehung multipler Resistenzen begünstigen, welche mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergehen (Carmeli *et al.*, 1999).

Vor allem aus der Lunge von CF-Patienten sind in den letzten Jahren vermehrt hypermutierende Bakterien isoliert worden. Die Entstehung hypermutierender Stämme scheint hier aufgrund der Habitatunterschiede im stark verzweigten Bronchialbaum der entzündeten Lunge, der Immunabwehr und den häufigen Antibiotikatherapien ein Überlebensvorteil zu sein. Hypermutierende Stämme wurden bei *P. aeruginosa*, *H. influenzae* und *S. aureus* CF-Isolaten beschrieben (Oliver *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 2004; Le Clercq *et al.*, 2003). Diese sind übereinstimmend durch zwei Ergebnisse gekennzeichnet: zum einen konnten keine hypermutierenden Stämme bei anderen Patientenkollektiven mit akuten *P. aeruginosa*-Infektionen gefunden werden, zum anderen ist ein Klon mit stabilem Mutatorphänotyp vorherrschend.

Ein Defekt im *mutS*-Gen bei *P. aeruginosa* führt zu einer raschen Resistenzentwicklung gegen alle bekannten antipseudomonalen Substanzen. Bei *in vitro*-Analysen setzte sich der resistente *mutS*-Stamm innerhalb weniger Stunden durch (Oliver *et al.*, 2004).

Rund 60% der chronisch mit *P. aeruginosa* infizierten CF-Patienten sind mit einem hypermutierenden Klon kolonisiert (Oliver *et al.*, 2005). Hypermutabilität ist also einerseits bedeutsam für die Entwicklung multipler Resistenzen und andererseits wahrscheinlich ebenso für eine Adaption, um auf lange Zeit in der CF-Lunge persistieren zu können. Während dieser Zeit vollzieht der Mutator eine umfangreiche Anpassung an das Lungenhabitat (siehe Kapitel A-1).

A.4 Globale Transkriptom- und Proteomanalyse

Der Begriff „Genomics“ bezeichnet die Kartierung, Sequenzierung und Analyse von Genomen. Aber selbst die komplette Beschreibung des Genoms eines Organismus reicht nicht aus, um seine funktionelle Organisation wie z.B. die Regulation der Genexpression oder die Zuordnung von Phänotypen zu Genotypen zu verstehen. Zusätzlich impliziert das Vorhandensein eines offenen Leserahmens („open reading frame“, ORF) in den Genom-Datenbanken nicht unbedingt die Existenz eines funktionellen Gens (Eisenberg *et al.*, 2000)

Welche Gene tatsächlich aktiv sind und Einfluss auf die Zelle ausüben, zeigt erst eine Analyse der messenger-RNA (mRNA) -Moleküle, dem Transkriptom, das seine Informationen an die Proteinsynthesemaschinerie weiterleitet. Allerdings spiegelt selbst der mRNA-Level einer Zelle die Proteinexpression nicht adäquat wider. Schon auf der Ebene der Transkription setzen die ersten Mechanismen zur Genregulation ein. Hinzu kommen unterschiedliche Prozessierung und alternatives „Splicing“, die zu unterschiedlichen Isoformen eines Proteins führen können, sowie nachfolgende Regulationen während der Translation.

Die vollständige Sequenzierung von PAO1 und die Annotation von 5570 OFRs³ ermöglichte den Einsatz einer neuen Methode zur Analyse Genom-umfassender Veränderungen auf transkriptionellem Niveau. Das Transkriptom stellt die Gesamtheit der von einer Zelle exprimierten messenger-RNAs (mRNA), den Transkripten des Genoms, dar. Im Gegensatz zum statischen Genom verhält es sich hochdynamisch und ändert sich in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen oder physiologischen Prozessen. Obwohl die mRNA nur ein Zwischenschritt bei der Proteinsynthese ist, gibt ihre Messung doch Aufschluß über die Genaktivität und -regulation. Eine Aussage über die tatsächliche Expression eines Proteins kann aber erst anhand einer Untersuchung des Proteoms getroffen werden. Der Begriff des 'Proteoms' (**protein complement expressed by the genome**) wurde 1994 von den Australiern Marc Wilkins und Keith Williams geprägt. Er bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vom Genom einer Zelle oder einem Organismus exprimiert werden.

Die Untersuchung des Transkriptoms einerseits und des Proteoms andererseits ergänzen sich. Sie liefern aber dennoch Ergebnisse mit unterschiedlichem Informationsgehalt, so dass keine Technik die andere zu ersetzen vermag. Sowohl Transkriptom- als auch Proteomanalyse weisen entscheidende Vorteile, aber auch einige Nachteile gegenüber dem jeweiligen Forschungsansatz auf.

Ein unbestrittener Vorteil der Transkriptomanalyse ist die schnelle und umfassende Identifizierung aller zum Zeitpunkt der Probeentnahme transkribierten Gene. Mit Hilfe der Mikroarray-Technologie (z.B. *P. aeruginosa*-GenChip®, Affymetrix) ist die mRNA-Expressionsanalyse relativ schnell durchzuführen, und die Identifizierung der Gene erfordert keine weiteren Analysen mehr. Mit einem einzigen Experiment lässt sich damit bereits eine Aussage über die Expression aller Gene treffen.

Eine komplette Bestimmung des Proteoms ist derzeit technisch nicht machbar. Zum einen ist ein Teil des Proteoms der Analyse nicht zugänglich, da er nicht geeignet solubilisiert werden kann. Zum anderen liegen viele Proteine in der Zelle in so geringer Kopienzahl

³ www.pseudomonas.com

vor, dass eine Visualisierung oder gar Identifizierung nicht möglich ist. Im Gegensatz zur Untersuchung von Nukleinsäuren existiert für Proteine bis heute keine Amplifikationstechnik.

Mit Hilfe der Transkriptomanalyse kann auch bei nicht charakterisierten Transkripten auf deren Funktion geschlossen werden. Gene mit ähnlichem Expressionsmuster besitzen meist auch eine ähnliche molekulare Funktion oder sind zumindest in verwandte biologische Prozesse involviert. In Cluster-Analysen werden Gene nach der Ähnlichkeit ihres Expressionsmusters gruppiert und so eine Identifizierung co-exprimierter Gene ermöglicht. Trotz der genannten Nachteile bleibt die Erforschung des Proteoms zum Verständnis der auf die Expression der mRNA folgenden komplexen Netzwerke der Zellregulation unverzichtbar.

Proteomics ist somit eine wichtige Ergänzung zu Genomics, da es sich auf die Genprodukte konzentriert, die tatsächlich zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Wachstumsbedingungen in einer Zelle aktiv sind.

Ausgehend von den klassischen, arbeitsintensiven Verfahren zur Protein-Analyse hat eine rasante Entwicklung hoch empfindlicher Analyse- und Detektionsverfahren begonnen.

Die ersten Proteinstudien, die als "Proteomics" bezeichnet werden konnten, begannen 1975 mit O'Farrell, der die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) entwickelte. Die 2-DE machte es zwar möglich, Proteine zu trennen und darzustellen, allerdings war man damals noch nicht in der Lage, sie zu identifizieren. Ein großes Problem stellte die geringe Sensitivität der Protein-Sequenzierungs-Methoden auf der einen und die begrenzte Ladekapazität der Gele auf der anderen Seite dar. Eine der ersten Methoden zur Identifizierung war die Sequenzierung der Proteine durch den Edman-Abbau (Edman *et al.*, 1949), der 1987 von Aebersold *et al.* in seiner Sensitivität enorm verbessert werden konnte. Die bedeutendste Entwicklung bildete jedoch die Massenspektroskopie, mit deren Hilfe Proteine bis in Femtomol-Bereiche identifiziert werden können (Andersen *et al.*, 2000). Die massenspektroskopische Analyse von Peptidgemischen mit MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry) bestimmt den Quotienten von Masse zu Ladung (m/z) von Ionen. Mithilfe eines Lasers werden die Peptide ionisiert und anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt, wo sie zu einem, durch ihre Masse bestimmten Zeitpunkt auf ein Vakuum treffen. So kann die Masse der einzelnen Peptide berechnet werden, welche für ein Protein spezifische Spektren ergeben. Diese eignen sich dann für den Datenbankabgleich mit bekannten Protein-Spektren von Organismen, deren Gesamtgenom bereits sequenziert und annotiert wurde.

Die 2-DE gilt bis heute als die einzige Methode, die die Möglichkeit bietet, mehrere tausend Proteine zu trennen und unter Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse gleichzeitig auf einem Gel darzustellen. Zu einer verlässlichen und reproduzierbaren Methode wur-

de sie aber erst in jüngster Zeit durch erhebliche Verbesserungen von Görg *et al.* (1988; 2000).

Zum einen garantiert die 2-DE eine hohe Auflösung, da die Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Kriterien, nämlich isoelektrischem Punkt (pI) und Molekulargewicht (MW), getrennt werden, zum anderen können mit der 2-DE mehrere hundert Genprodukte simultan analysiert werden. In Kombination mit Computer-unterstützten Bildauswertungssystemen lässt sich diese Technik somit zu einer qualitativen und quantitativen Untersuchung von Proteinen einsetzen.

A.5 Ziele Dieser Arbeit

In der CF-Arbeitsgruppe des Max von Pettenkofer-Instituts wurden hypermutierende *P. aeruginosa*-Isolate bei CF-Patienten nachgewiesen. Die Sequenzierung des *mutS*-Gens dieser Mutatorstämme ergab zahlreiche Nukleotidsubstitutionen, wobei 95% neutrale (stille) Mutationen waren. Bei 5 *P. aeruginosa*-Isolaten konnte ein Funktionsverlust von MutS aufgrund von Deletionen oder Insertionen mit Verschiebungen im Leserahmen des *mutS*-Gens nachgewiesen werden. Da 13 der 15 untersuchten Patienten verschiedene hypermutierende *P. aeruginosa*-Klone aufwiesen, scheint die Übertragung der *mutS*-Stämme von Patient zu Patient eine untergeordnete Rolle zu spielen (Hogardt *et al.*, 2006).

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von exemplarischen *P. aeruginosa-mutS*-Isolaten von drei CF-Patienten mittels Analyse des Transkriptoms und Proteoms. Ergänzt wurde die Untersuchung durch Charakterisierung der Virulenz-assoziierten Phänotypen. Es sollten so erste Hinweise auf Adaptation von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge erarbeitet werden.

Dazu wurden sequentielle *P. aeruginosa*-Isolate der CF-Patienten M, V und P im Endstadium der Lungenentzündung untersucht. M, V und P waren chronisch mit jeweils einem Patienten-spezifischen dominanten *P. aeruginosa*-Klon infiziert. Alle drei Klone entwickelten offensichtlich im Verlauf der Infektion einen individuellen, stabilen *mutS*-Phänotyp mit unterschiedlicher Mutation im *mutS*-Gen. Die Sequenzierung des *mutS*-Gens des jeweiligen *P. aeruginosa*-Klones hatte in Patient M eine 17-bp große Deletion, in Patient V eine 8-bp große Insertion und bei Patient P eine 1-bp Insertion ergeben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Prävalenz der *mutS*-Stämme während des finalen Stadiums der Erkrankung festgestellt werden. Weiterhin sollte ein Vergleich des frühen MutS⁺-Stamms und des späten *mutS*-Stamms Aufschluss über die Anpassung geben, die *P. aeruginosa* während der Persistenz in der CF-Lunge vollzieht. Dazu wurden

EINLEITUNG

umfangreiche phänotypische Untersuchungen der sequentiellen Isolate aller drei Patienten durchgeführt. Eine Analyse des Proteoms, sowie des Transkriptoms sequentieller MutS⁺-, sowie *mutS*-Stämme sollte die durch die Lungen-Adaptation bedingten Veränderungen deutlich machen und Rückschlüsse auf das Überleben von *P. aeruginosa* in der entzündlich veränderten CF-Lunge zulassen. Die Analyse von Isolaten aller drei Patienten sollte zeigen, ob bei der Anpassung an das Lungenhabitat bei unabhängigen *P. aeruginosa*-Klonen verschiedener Patienten einheitliche Veränderungen zu Grunde liegen. Dies könnte eine allgemeine Aussage über das Selektionsmilieu in der infizierten Lunge von CF-Patienten erlauben und damit auch eine Grundlage liefern, um neue Therapieansätze oder Impfstoffe zu entwickeln.

B Material und Methoden

B.1 CF-Patienten

Bei Patient M (männlich, geboren 1967) wurde seit 1997 eine chronische Pneumonie mit *P. aeruginosa* dokumentiert. Frühere Daten waren nicht verfügbar. Während der letzten 7 Lebensmonate wurde eine Ko-Infektion mit *S. maltophilia* festgestellt. 2001 verstarb er im Alter von 34 Jahren.

Patient V (weiblich, geboren 1972) war spätestens seit 1992 mit *P. aeruginosa* infiziert. Von 1997-2000 wurde intermittierend *S. aureus*, seit 2001 regelmäßig *S. maltophilia* isoliert. Die Patientin V starb 2002 im Alter von 30 Jahren.

Auch Patient P (weiblich, geboren 1975) war spätestens seit 1987 von *P. aeruginosa* kolonisiert. Daneben wurde *A. xylosoxidans* seit 1997 wiederholt isoliert. Patient P unterzog sich einer Lungentransplantation, der weitere klinische Verlauf war aber mit Komplikationen verbunden. Der Patient verstarb im Jahre 2004, im Alter von 29 Jahren. Zu diesem Zeitpunkt konnten neben *P. aeruginosa* auch *A. xylosoxidans* und *S. aureus* aus dem Sputum isoliert werden.

B.2 Organismen und Plasmide

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Organismen (Tabelle B-1) und Plasmide (Tabelle B-2) mit ihren genotypischen Merkmalen und ihrer Herkunft aufgeführt. Die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann und Low (1976).

Tabelle B-1 : **Verwendete Organismen;** Die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann und Low (1976).

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Referenzstamm	L. Eberl, Zürich, Schweiz
<i>P. aeruginosa</i>	sequentielle Isolate M1-M26	Patient M
<i>P. aeruginosa</i>	sequentielle Isolate V1-V42	Patient V
<i>P. aeruginosa</i>	sequentielle Isolate P1-P43	Patient P
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , Δ lacU169, (Φ 80 lacZ Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983

MATERIAL UND METHODEN

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> Hb 101	Helferplasmid pRK 2013; K ^R	MvP
<i>Escherichia coli</i> XL-1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^f ZΔM15 Tn10 (Tet^R)</i>]	Stratagene, La Jolla, USA

Tabelle B-2 : Verwendete Plasmide

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
pUC 19	Klonierungsvector, Ap ^R , <i>lacZ</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA

B.3 Anzucht und Stammhaltung

B.3.1 Kultur-und Testmedien

B.3.1.1 Kulturmedien

Alle Medien wurden durch Autoklavieren in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven bei 121°C und 1,2 bar Überdruck für 20 Minuten sterilisiert. Festmedien wird 20 g Agar pro Liter Medium zugegeben. Der Zusatz von sterilfiltrierten Hemm- und Zusatzstoffen (Tabelle B-3) erfolgte nach der Sterilisation. Dabei muss bei temperaturempfindlichen Stoffen auf eine ausreichende Abkühlung des Festmediums (ca. 50°C) geachtet werden. Die Zugabe von Zusatzstoffen erfolgt vor der endgültigen Inokulation.

LB-Medium:
(Bertani, 1951)

Casein-Hydrolysat	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	4 g
ad 1000 ml H ₂ O _{dest}	

ABC-Minimalmedium:
(Clark und Maaløe, 1967)

A-10x:	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
	Na ₂ HPO ₄	60 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
	NaCl	30 g

MATERIAL UND METHODEN

		ad 1000 ml H ₂ O _{dest}	
B:	1 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2 ml	(Stock: 20.33 g/100 ml)
	0,5 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.2 ml	(Stock: 7,351 g/100 ml)
	0,01 M FeCl ₃ x 3 H ₂ O	0.3 ml	(Stock: 0,2703 g/100 ml)
		ad 900 ml H ₂ O _{dest}	

C: 1M Citrat

Die Komponenten A, B und C wurden getrennt autoklaviert. Anschließend wurden zu 900 ml B-Medium 100 ml A-10 und 10 ml Citrat gegeben.

YT-Medium

Trypton	20g
Hefeextrakt	5g
MgSO ₄	20mM
KCl	10mM
H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml; pH 7,6 mit NaOH	

PTSB-Medium:

5% Pepton
0,25% Trypticase soy broth (TSB)

Pseudomonas-Isolations-Agar (PIA):

Trypton	6,7 g
Hefeextrakt	3,3 g
NaCl	1,7 g
Agar-Agar	10 g
PIA-Agar (Difco, Becton Dickinson, Sparks, USA)	12,5 g
H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml	

SOC-Medium: (Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton (Oxoid, L42)	10 g
Hefeextrakt	0,5 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
Glukose	0,36 g
H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml, pH 7,0	

MATERIAL UND METHODEN

Zur Herstellung von Selektivmedien und zur Plasmidstabilisierung bei der Kultivierung plasmidhaltiger Stämme wurden die entsprechenden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Tabelle B-3 : Hemmstoffe und Medienzusätze

Zusatzstoff	Stammlösung	Endkonzentration im Medium	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
Carbenicillin	100mg/ml in 50% EtOH/H ₂ O _{bidest}	100 µg/ml	15µg/ml
Kanamycin	100mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml	10µg/ml
Tetracyclin	50mg/ml in 70% EtOH/H ₂ O _{bidest}	150 µg/ml	15µg/ml
IPTG	1M IPTG in 50% EtOH/ H ₂ O _{bidest}	0,2-2 mM	
X-Gal	20 mg/l in N,N-Dimethylformamid	40 µg/ml	

B.3.1.2 Testmedien

F-Agar und P-Agar:

Die Agar zum Test auf Fluoreszein (F) und auf Pyocyanin (P) wurde nach Angaben des Herstellers (Beckton-Dickinson) gemischt und autoklaviert.

Magermilch-Agar:

Der Magermilch-Agar zum Nachweis der Protease-Aktivität wurde wie folgt zubereitet: 10% (w/v) Magermilchpulver (Fluka), sowie 20 g Agar in 1000 ml H₂O_{bidest} lösen und bei 1 bar 10 min sterilisieren.

Motilitätstest-Agar

LB-Medium mit einem Zusatz von 0,3% Agar.

CAS-Agar:

(modifiziert nach Schwyn und Neilands, 1987)

CAS-Stammlösung:

Chromazurol S	60,5 mg
H ₂ O _{bidest} ad 50 ml	
1 mM FeCl ₃ x 6 H ₂ O	10 ml
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HDTA)	72,9 mg
H ₂ O _{bidest} ad 40 ml	

MATERIAL UND METHODEN

PIPES-Agar:

10 x MM9	100 ml
H ₂ O _{bidest}	500 ml
Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	31,1 g
H ₂ O _{bidest} ad 850 ml	
Agar	16 g

Herstellung des PIPES-Agar: 10 x MM9 mit H₂O_{bidest} mischen, unter ständigem Rühren PIPES zugeben und pH mit NaOH auf 6,8 einstellen. Auf 850 ml auffüllen. Nach Zugabe von 16 g Agar autoklavieren.

Nach Abkühlen des PIPES-Agar auf 50°C unter sterilen Bedingungen 30 ml 10 x LB-Medium, 10 ml 20% Glukose (sterilfiltriert), 2 ml 1 M MgSO₄-Lösung, 2 ml 1 M Na₂SO₄-Lösung, 1 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung, 100 ml CAS-Stammlösung zugeben und sofort Platten gießen.

Der Nachweis auf Siderophore ist positiv, wenn sich um die Kolonien durch den Entzug des Eisens aus dem CAS-Farbkomplex ein orange-rötlicher Hof im blauen CAS-Agar bildet.

B.3.2 Kultivierung

Das Überimpfen von *P. aeruginosa* auf Festmedien und die Inokulation von Flüssigkulturen mit 5 ml Volumen (Röhrchen) wurde mit einer Impföse, bzw. mit sterilen Zahnstochern ausgehend von einer Einzelkolonie auf Platte oder mit einer sterilen Glaspipette direkt aus der Stammsammlung durchgeführt. Flüssigkulturen mit größerem Volumen wurden mit über Nacht gewachsenen Vorkulturen 1:1000 beimpft. Die Inkubation erfolgte aerob, bzw. anaerob bei 42°C oder 37°C in lufttemperierten Rundschüttlern bei 150-200 rpm.

B.3.3 Stammhaltung

Einzelkolonieausstriche von *P. aeruginosa* auf LB-Platten, die 1 Tag bei 37°C bebrütet wurden, sind anschließend bei 4°C ca. 4 bis 5 Tage überlebensfähig. Ausgehend von diesen Kulturen können Glycerinkulturen angelegt werden, die über mehrere Jahre stabil sind. Für deren Herstellung wurden Einzelkolonien gepickt und in 5 ml Flüssigmedium ÜN bei 37°C inkubiert. Von diesen Kulturen wurde eine 1:1 Mischung mit 50%igem Glycerin angefertigt und unmittelbar darauf bei -80°C gelagert.

B.4 Phänotypische Untersuchungen

B.4.1 Elastase-Test

(Ohman *et al.*, 1980)

Reaktionspuffer:

0,1M Tris-Maleat (0,1M Tris, pH-Wert Einstellung mittels Maleinsäure)

1mM CaCl

pH 7,0

Stoppuffer:

0,7M Sodium Phosphat

pH 6,0

Protokoll:

- ÜN-Kultur von PTSB-Platten 20ml PTSB animpfen
- ÜN-Kultur zentrifugieren (4000 rpm, 30 min), Überstand sterilfiltrieren ($\emptyset = 0,2 \mu\text{m}$)
- 10 mg Elastin-Kongorot (Sigma), 2 ml Reaktionspuffer, 1ml PTSB sowie 1 ml des sterilfiltrierten Überstandes in Glasröhrchen geben (Negativkontrolle ohne Überstand)
- 16 h bei 37°C waagrecht schütteln lassen
- Reaktionsgemisch abzentrifugieren (4000 rpm, 10 min)
- Extinktion bei 495 nm gegen Leerwert (Reaktionspuffer) messen
- Extinktion der Negativkontrolle von allen Werten subtrahieren.

B.4.2 Nitrat/Nitrit-Abbau

Die Umsetzung von Nitrat zu Nitrit wurde mithilfe des Nitrat/Nitrit-Assay Kit Colorimetric[®] von Fluka gemessen. Dabei wurde strikt nach Protokoll des Herstellers verfahren.

B.5 Molekulargenetische Methoden

B.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

B.5.1.1 Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNA

nach Wisotzkey *et al.* (1990, mod.)

Lösungen:

Saline-EDTA-Lösung	0,15 M 0,01 M	NaCl EDTA; pH 8,0
Standard-Saline-Citrat (1x SSC)	0,15 M 0,015 M	NaCl tri-Natriumcitrat; pH 7,0
Lysozymlösung	10 mg/ml	Lysozym (Merck, Darmstadt, D) in 1 x SSC
RNase A-Lösung	10 mg/ml	RNase A (Merck, Darmstadt, D) in 2 x SSC; 10 min auf 100°C erhitzt (zur Inaktivierung von DNasen)
Proteinase K-Lösung	10 mg/ml	Proteinase K (Roche, Mannheim, D)
SDS-Lösung	25% (w/v)	Natriumdodecylsulfat
Natriumacetatlösung	5 M	Natriumacetat; pH 5,5
Chisom		Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)
Ethanol		absolut

Zellernte und -lyse aus Flüssigmedium:

- Zentrifugation von 2 ml ÜN-Kultur 5 min bei 14000 x g und 4°C
- Aufnahme des Pellets in 1 ml Saline-EDTA-Lösung, erneute Zentrifugation
- Resuspension des Pellets in 500 µl Saline-EDTA-Lösung
- Zugabe von 20 µl Lysozymlösung und Inkubation für 30 min bei 37°C
- Zugabe von 5 µl RNase A-Lösung und Inkubation für 30 min bei 37°C
- Zugabe von 5 µl Proteinase K-Lösung und Inkubation für 60 min bei 37°C
- Zugabe von 40 µl SDS-Lösung und Inkubation für 10 min bei 65°C (Inaktivierung von DNasen)

Zellernte und -lyse von der Platte:

Diese Variation des modifizierten Wisotzkey-Protokolls ermöglicht eine noch zügigere Isolierung kleiner Mengen hochmolekularer, chromosomaler DNA.

Resuspension von üN auf Platte gewachsenen Kolonien in 500 µl Saline-EDTA-Lösung
Zugabe von 20 µl Lysozym-, sowie 5 µl Proteinase K-Lösung und Inkubation für 45 min bei 37°C. Zugabe von 40 µl SDS-Lösung und Inkubation für 10 min bei 60°C

Reinigung der DNA:

- Zugabe von 180 μ l Natriumacetatlösung und 745 μ l Chisom, Schütteln
- Zentrifugation für 5 min bei 14000 x g und RT
- Abheben der oberen, wässrigen Phase
- Zugabe von 2 Vol Ethanol und Fällen der DNA für 30 min bei -20°C
- Zentrifugation für 15 min bei 14000 x g und 4°C
- Verwerfen des Überstands
- Waschen mit 70%igem Ethanol
- Zentrifugation für 15 min bei 14000 x g und 4°C
- Verwerfen des Überstands und Eintrocknen des Pellets
- Aufnahme in 100 μ l $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$; Lagerung bei -20°C

B.5.1.2 Hitzepräparation von DNA

Von einer frischen Bakterienkultur werden mit der Impfnadel einige Kolonien in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ eingerieben und die Suspension bei 100°C im Heizblock für 10 min gekocht. Danach sofort für 10 min bei 8000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand kann für PCRs verwendet werden.

B.5.1.3 RNA-Isolierung mittels Trizol

Für die RNA-Isolierung aus Bakterien wurden die Stämme in 50 ml LB-Medium bis zu einer $\text{OD}_{600} = 4,5$ angezogen, das Medium abzentrifugiert und abgesaugt.

Pro Ansatz wurde eine Zellzahl von 1×10^7 in 1 ml Trizol[®] (Invitrogen, Karlsruhe) durch mehrmaliges auf- und abpipettieren lysiert. Um ein gänzlich Denaturieren und Dissoziieren von Nukleoproteinkomplexen zu ermöglichen, wurde die Trizolsuspension 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform und gutem Durchmischen der zwei Phasen wurde 3 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches RNase freies 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 μ l Isopropanol präzipitiert. Das Pellet wurde 2x mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach vollständiger Trocknung wurde das Pellet in 15 μ l DEPC- H_2O resuspendiert. Für längere Lagerung wurde die RNA als Ethanolpellet bei -80°C eingefroren.

B.5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Je nach Verwendungszweck und benötigter Menge wurde die Plasmid-DNA mit dem E.Z.N.A. Plasmid Mini prep KitII[®] von peqlab oder mit dem Nucleobond AX[®] von Macherey-Nagel laut Hersteller isoliert.

B.5.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Absorptionsmaxima einzelner Nukleotide in der DNA, bzw. RNA liegen bei pH 7 zwischen 253 und 271 nm. Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde nach Clark und Switzer (1977) photometrisch bestimmt. Aliquots von Nukleinsäurelösungen wurden in Quarzküvetten überführt und in einem Spektralphotometer (LKB Ultrospec Plus, Pharmacia, Freiburg, D, bzw. Lambda 20, Perkin Elmer, Rodgau, D) bei 260 nm vermessen.

Als Grundlage zur Berechnung der vorliegenden DNA, bzw. RNA-Konzentrationen aus den erhaltenen Adsorptionswerten dienten folgende Näherungswerte:

Doppelsträngige (ds) DNA: 1 OD_{260 nm} entspricht 50 ng/μl

Einzelsträngige (ss) DNA: 1 OD_{260 nm} entspricht 33 ng/μl

Einzelsträngige (ss) RNA: 1 OD_{260 nm} entspricht 40 ng/μl

Verunreinigungen der DNA, bzw. der RNA, beispielsweise durch Proteine, können durch die Bestimmung der Extinktion bei 230, 260 und 280 nm und Bildung der Quotienten $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ sowie $E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}}$ festgestellt werden. Der für die Weiterbearbeitung der DNA, bzw. RNA nötige Reinheitsgrad ist bei folgenden Werten gewährleistet (Marmur, 1961):

$$E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}} > 1,9, \text{ sowie } E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}} > 2,2.$$

Die Berechnung der Konzentration von einzelsträngigen Oligonukleotiden erfolgt durch die Werte aus Tab. B.2 in Verbindung mit folgender Formel:

$$c = (V_{\text{Mess}} \cdot \text{OD}_{260\text{nm}}) / (V_{\text{Probe}} \cdot \varepsilon \cdot d)$$

c: Konzentration des Oligonukleotids [mM]

V_{Mess} : Meßvolumen [ml]

V_{Probe} : Probenvolumen [ml]

d: Schichtdicke [cm]

ε : Oligonukleotidspezifischer Extinktionskoeffizient [cm^2/mol]

berechnet aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Nukleotide (vgl. Tab. B.2) des Oligonukleotids.

B.5.3 Enzymatische Modifikation von DNA

B.5.3.1 Restriktionsenzymverdau

Es wurden als Restriktionsendonukleasen Enzyme der Firma Invitrogen mit den dazugehörigen Reaktionspuffern verwendet und die Hydrolyse nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug pro Ansatz zwischen 10 und 50 μl und enthielt jeweils 1-3 U Restriktionsenzym pro μg DNA. Bei Mehrfachansätzen wurde ein Prämix, bestehend aus Puffer, sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{reins}}$ und Enzym angesetzt und auf die einzelnen Eppendorf-Gefäße mit der vorgelegten DNA verteilt. Für Doppelverdau wurde entweder ein Puffer eingesetzt, in dem beide Enzyme laut Hersteller zu 80-100 % schneiden, oder es wurde zwischen zwei Verdau ein Aufreinigungsschritt mit anschließender Einengung des Volumens in einer beheizbaren Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac) durchgeführt. Inkubiert wurde für eine Stunde bei der für das Enzym laut Hersteller als optimal angegebener Reaktionstemperatur (im allgemeinen 37°C).

B.5.3.2 DNA-Ligation

Bei der Ligation werden kompatible DNA-Enden mit Hilfe der T4-Ligase kovalent miteinander verknüpft. Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Volumen von 20 μl durchgeführt:

- x μl Vektor-DNA
- x μl Insert-DNA
- 4 μl Ligase-Puffer (5x)
- 2 μl T4-Ligase

Die Substanzen wurden gemischt, mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet und über Nacht bei

15°C inkubiert. Die Menge an Insert-DNA richtete sich nach der jeweiligen Menge an Vektor-DNA und dem optimalen molaren Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA. Dieses Verhältnis lag in der Regel zwischen 1:1 („Sticky-end“-Ligationen) und 1:3 („Blunt-end“-Ligationen).

B.5.3.3 *In vitro*-Amplifikation mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Saiki *et al.*, 1988

B.5.3.3.1 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer (Tabelle B-4) wurden bei Metabion in Martinsried synthetisiert. Die lyophilisierte Primer-DNA wurde in der angegebenen Menge H_2O_{reinst} aufgenommen, um eine Konzentration von 100 pmol/ μ l zu erhalten.

Die Dissoziationstemperatur T_d wurde nach folgender Formel (Suggs *et al.*, 1981) berechnet:

$$T_d[^\circ C] = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (C+G).$$

A, C, G, T: Anzahl der entsprechenden Nukleotide

Tabelle B-4: Liste der verwendeten Primer

Targetgen	„Forward“-Primer (5'-3')	„Reverse“-Primer (5'-3')	Verwendungszweck
<i>mutS</i> M	TGGTCGAGCAGGTGCTGG	ATTCTAGCAGCTTGTGCGG	Sequenzierung
<i>mutS</i> PV	CGCTTCGAGAACCTGCAAC	TCCATCAGGAATTGCCCG	Sequenzierung
<i>mutS</i> PP	TGAACCTCGACCTGAATCGC	GCGTTGTGCAGGATGTTGG	Sequenzierung
<i>anr</i> A	GTCGCAGTTGTTTGACGC	ATTTCCCGGCTCATCAGA	Sequenzierung
<i>anr</i> B	TCTGCGAGATTCCCTTCG	CGACTTGAGGGTGAACCTCG	Sequenzierung
<i>ibpA</i>	AGCCGAGGGACTGGTAGAA	CCGATAGCGCAACGAAAT	Sequenzierung
<i>dnr</i> A	CCTGACGGTTTGAAGATTACG	GGCCTTGTGGAGAAACG	Sequenzierung
<i>dnr</i> B	CAACGAACGCAACACCTT	TGGAGGCAATACAGGCAT	Sequenzierung
<i>rpoS</i> A	TCGGGTGAAGCTGCATT	AATGGTCCGGGTCTGGTT	Sequenzierung
<i>rpoS</i> B	GTTCTCGACCTACGCCAC	AAAACCCGGCGAACGCC	Sequenzierung
<i>ihfA</i>	CCTCAGGCTGTTTGATGTG	TCGCCGATGGTGAAGTAG	Sequenzierung
<i>ihfD</i>	TGATCCGTGCTCAGATGG	ACCGCCATTAACGTACGC	Sequenzierung
<i>azu</i> A	GCGCCACAGAATACGCAGA	CCGGGAAGGTGCCAGAAGGAA	Sequenzierung
<i>azu</i> B	GGACATCCAGGGTAACGACC	TTTCATGCAGCGGATCGTC	Sequenzierung
<i>ampD</i>	CCTTCTCGAAGCATGTCG	GAAGACCGTACTCTACCC	Sequenzierung
<i>sodB</i> A	GCCTCGTGATGTGGTTCTT	GTGTTGTGGTGCTTGTCTGTG	Sequenzierung
<i>sodB</i> B	CGCAGAAACCCTGGAATACC	ATCACGAGCGAAGGTCTACC	Sequenzierung
<i>ampR</i>	GGCGCGCCATCCCTTCAT	AACCGTTATCTCCCCGCGCCTC	Sequenzierung
<i>ampR</i>	TCAGGCTGATGGCTACGG	ATGAAGGGATGGCGCGCC	Sequenzierung
<i>ccpR</i>	CGCTGCGACAACCATCCGC	GCTGGCGTCGGGCTTCTTC	Sequenzierung
<i>argR</i>	CAAGGTCATCGCCACCAATC	AAGAGAAACCGCAGGACAGG	RT-PCR
<i>ihfD</i>	ATCGTTACCCATCAGGGG	TTGACCCGATCCCGCAAC	RT-PCR
<i>dnr</i>	CAACGAACGCAACACCTT	GAAAGCGTCTCGATCTCG	RT-PCR
<i>azu</i>	TGCTACGTAAACTCGCTGCG	CCGGGAAGGTGCAGAAGAA	RT-PCR
<i>ampC</i>	AGTAGTCGCGGATCTGTGCC	CCGCTCCACACTGCTGTT	RT-PCR

B.5.3.3.2 Polymerasekettenreaktion

(Saiki *et al.*, 1988)

Bei der PCR werden DNA-Moleküle (Template) thermisch in beide Einzelstränge, an die nach Erniedrigung der Temperatur synthetische Oligonukleotide (Primer) mit jeweils zu einem der Matrizen-Stränge komplementärer Sequenz binden (Annealing), aufgeschmolzen (Denaturierung). Thermostabile DNA-Polymerasen sind in der Lage, bei hohen Temperaturen die durch die Primer entstandenen Doppelstrang-Abschnitte mithilfe der sich im Ansatz befindlichen Didesoxy-Nukleotide 3'-seitig *in vitro* zu verlängern (Elongation). Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird, unter Voraussetzung, dass die an einem Primer entstandenen Produkte jeweils die komplementäre Zielsequenz des zweiten Primer enthalten, eine exponentielle Vermehrung der zwischen den beiden Bindungsstellen liegenden Nukleotid-Sequenz gewährleistet. Über Basenaustausche in den Sequenzen verwendeter Primer ist es möglich, gerichtet Mutationen in der Sequenz des Produkts zu erzeugen, was die Generierung artifizieller Translationssignale, bzw. Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen ermöglicht.

B.5.3.3.2.1 PCR mit AmpliTaq Gold

(Roche, Mannheim)

Prä-Mix:

1 ml 10 x PCR Puffer (enthält 15 mM MgCl₂)
1 ml 2 mM dNTP-Mix
7 ml H₂O_{reinst}

Reaktionsansatz:	Prä-Mix	43,75 µl
	„Forward“ Primer	0,5 µl
	„Reverse“ Primer	0,5 µl
	Polymerase	0,25 µl
	Template-DNA	1-100 ng

Um falsch positive Ergebnisse als Folge von Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jeder Amplifikation ein Reaktionsansatz ohne Template-DNA als Negativkontrolle mitgeführt. Als Anhaltspunkt für die in einer Reaktion erforderliche Annealingtemperatur wurde

MATERIAL UND METHODEN

der Mittelwert aus den Dissoziationstemperaturen von Vorwärts- und Rückwärtsprimer genommen. Gegebenenfalls wurde die jeweils optimale Annealingtemperatur empirisch ermittelt.

Standard-Reaktionsschritte:

1. Schritt (1x)	Initiale Denaturierung	96°C	1 min
2. Schritt (30x)	Denaturierung	94°C	30 s
	Annealing	x°C	45 s
	Elongation	72°C	y min
3. Schritt (1x)	Terminale Elongation	72°C	1 min/kB

Im Verlauf jedes Zyklus wurde die Dauer der Elongationsperiode um 5 s gesteigert, um nachlassende Aktivität der DNA-Polymerase zu kompensieren.

B.5.3.3.2 PCR mit High-GC Polymerase

(Quiagen)

Der Ansatz wurde nach Protokoll des Herstellers zusammenpipettiert.

Standard-Reaktionsschritte:

1. Schritt (1x)	Initiale Denaturierung	94°C	3 min
2. Schritt (30x)	Denaturierung	94°C	30 s
	Annealing	x°C	1 min
	Elongation	72°C	y min
3. Schritt (1x)	Terminale Elongation	72°C	3 min

B.5.3.3.3 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte mit einer Länge von mehr als 500 Nukleotiden wurden mit dem Quickstep PCR Purification Kit V.5 (Edge BioSystems, Gaithersburg, Md.) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Waren die Amplifikate kürzer oder enthielten sie markierte dNTPs, wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) eingesetzt.

B.5.3.3.3 Real-time (RT) PCR mit cDNA

B.5.3.3.3.1 cDNA Synthese für RT-PCR mit Random Hexameren

Nach RNA Extraktion und darauf folgendem DNase-Verdau wurde die RNA auf 0,2 µg /µl eingestellt. Bei der anschließenden cDNA-Synthese wurde strikt nach Protokoll des Herstellers der Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe) verfahren. Zur cDNA-Synthese wurden:

1 µl	Random Hexamer Primer
2 µg	RNA
ad 11 µl	DEPC-H ₂ O

in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis und weiteren 10 min bei Raumtemperatur wurden

4 µl	First Strand Buffer
2 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	dNTP Mix (10mM)

dazupipettiert, gemischt und 2 min bei 42°C inkubiert. Abschließend wurden

2 µl	Superscript II Reverse Transkriptase
------	--------------------------------------

zugegeben, gemischt und 1 h bei 42°C inkubiert.

B.5.3.3.3.2 Real-time (RT) PCR am LightCycler

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde eine reverse Transkriptase real-time PCR am LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim) mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYBR-Green (LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I Mix, Roche Diagnostics) durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich nur in doppelsträngige DNA ein, wo er bei 470 nm angeregt und die Emission bei 530 nm gemessen werden kann. Nach jedem Elongationsschritt wird die Intensität der Fluoreszenz des Doppelstrang-spezifischen CyberGreen I aufgezeichnet, welche die Menge an spezifischem PCR Produkt widerspiegelt.

Als interner Standard wurde das „housekeeping“ Gen *rpoD* mitgeführt. Im Anschluss erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte in einem 1%igem Agarosegel mit Färbung in EtBr, um die Größe und Reinheit der amplifizierten Fragmente zu verifizieren.

MATERIAL UND METHODEN

Analytischer Ansatz:	0,5 µl	5' Primer
	0,5 µl	3' Primer
	2,0 µl	SYBR Green Master Mix
	1,6 µl	MgCl ₂
	4,0 µl	cDNA (0,1µg/µl)
	ad 20 µl	H ₂ O _{reinst.}

Programm:

Denaturierung:	95 °C	10 min
Aktivierung der Polymerase:	95 °C	0 s
Anheften der Primer:	x °C	10 s
Extension:	72 °C	bp Fragment / 25

Es wurden je 35 Zyklen durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mittels eines Excel-Programms über die $2^{\Delta\text{ct}}$ – Methode mit dem „housekeeping“-Gen als Bezugsgen.

B.5.3.4 Transkriptomanalyse mit GenChip® *P. aeruginosa*

Bei der Mikroarray-Analyse wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren (Affymetrix GeneChip®), diese setzt sich aus den folgenden Teilschritten zusammen:

B.5.3.4.1 cDNA Synthese

Pro Ansatz wurden 10 µg RNA eingesetzt. Die Inkubation des Primer-Annealing-Mixes wurde in eine Thermocycler durchgeführt. Dem Mix wurden außerdem Spike Transkripte zugegeben. Spike Transkripte sind sense RNA Kontrollen von *Bacillus subtilis* Genen. Mit ihrer prädefinierten Konzentration im Ansatz dienen sie als Kontrolle von Markierung, Hybridisierung und der Färbungseffizienz.

Primer Hybridisierungsansatz:

RNA	10 µg
Random Primer (75 ng/µl, Roche)	10,0 µl
Spike Transkript	2,0 µl
DEPC-H ₂ O	6,5 µl

MATERIAL UND METHODEN

Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C, darauf 10 min bei 25°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Danach wurde der folgende Reaktionsansatz zur cDNA Synthese dem Primer-Hybridisierungs-Mix zugegeben.

Reaktionsansatz cDNA Synthese:

5 x 1St Strand Buffer	12 µl
100 mM DTT	6 µl
10 nM dNTPs	3 µl
SUPERase In (20U/µl)	1,5 µl
SuperScript II (200U/µl)	7,5 µl

Der gut gemischte Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 25°C, darauf für 60 min bei 37°C und abschließend für 60 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz für 10 min bei 70°C und anschließend bei 4°C gehalten. 20 µl 1N NaOH wurden dazu pipettiert und der Ansatz nochmals für 30 min bei 65°C inkubiert, anschließend durch die Zugabe von 20 µl 1N HCl neutralisiert.

Die Produkte der cDNA Synthese wurden mithilfe der QIAquick Säulen (Qiagen) aufgereinigt, wobei nach Protokoll des Herstellers verfahren wurde. Die aufgereinigte cDNA wurde bei 260 nm ($1,0 A_{260} = 33 \mu\text{g/ml}$ Einzelstrang DNA) quantifiziert.

B.5.3.4.2 cDNA Fragmentierung

Reaktionsansatz:

10x One Phor-All Puffer	5 µl
cDNA	40 µl
DNase I (0,6 U/µl in 1 x One Phor-All Puffer)	2-4 µg
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde für 10 min bei 37°C und darauf 10 min bei 98°C inkubiert. Die fragmentierte cDNA wurde direkt der terminalen Markierungsreaktion zugegeben oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Die Fragmentierung wurde auf einem 15%igen PAA-Gel überprüft, welches 30min mit SYBR-Green angefärbt wurde.

B.5.3.4.3 Terminales Labeling

Zur Markierung der 3` Enden der fragmentierten cDNA wurde der Enzo BioArray™ Terminal Labeling Kit mit Biotin ddUTP (Affymetrix) verwendet.

Reaktionsansatz:

5 x Reaktionspuffer	12 µl
10 x CoCl ₂	6 µl
Biotin ddUTP	1 µl
Terminale Deoxynukleotid Transferase	2 µl
Fragmentierungsprodukt	39 µl

Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch die Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt.

Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte in Kooperation mit der Affymetrix Facility der TUM.

B.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Bestimmung von Größe, Reinheit oder, näherungsweise, Konzentration von Nukleinsäuren (chromosomale DNA, Plasmide, DNA-Amplifikate und RNA-Transkripte) wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese vorgenommen. Durch Wanderung im elektrischen Feld werden Nukleinsäuren im Agarosegel nach ihrer Masse und Konformation – linear, offen zirkulär oder superhelikal – aufgetrennt.

Visualisiert werden können Nukleinsäuren im Agarosegel unter UV-Licht (302 nm) durch Anlagerung von SYBRGreen oder Interkalation von EtBr.

Zur Bestimmung von Größe und Menge der aufgetragenen Nukleinsäure erfolgt ein Vergleich mit einem mitgeführten Längenstandard bekannter Menge.

MATERIAL UND METHODEN

Lösungen

100x TAE	4,0 M Tris 2,0 M Eisessig 0,2 M EDTA; pH 8,0
Agarosegel	1-2% Agarose (Gibco/BRL, Eggenstein, D) in 1 x TAE aufschmelzen
Standard	1 µg 1 kb-Standard (Gibco/BRL, Eggenstein, D)
Apparatur	Horizontal-Gelelektrophoreseapparatur Separation Systems: 100 ml Gelvolumen, 11x14cm (peqlab)
Färbebad	40 µl Ethidium bromide solution (SIGMA) in 400 ml VE Wasser
Geldokumentation	Herolab, E.A.S.Y. bzw. BioRad

B.5.5 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Plasmide wurden mit der modifizierten Methode nach Hanahan in *E. coli* transformiert (Hanahan, 1983). Dazu wurden zunächst calcium-kompetente *E. coli*-Zellen hergestellt.

B.5.5.1 Herstellung calcium-kompetenter *E. coli*-Zellen

Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,5 konnte die in YT-Medium angeimpfte Hauptkultur weiterverarbeitet werden. Dazu wurde die Kultur 30 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 3000 rpm und 4°C 10 min sedimentiert, das Sediment in 30 ml TFB 1 pro 100 ml Kultur resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min auf Eis gekühlt, erneut 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 4 ml TFB 2 pro 100 ml Kultur resuspendiert. Hiervon wurden 200 µl-Aliquots in Eppendorf-Cups in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

B.5.5.2 Transformation

Die calcium-kompetenten Zellen wurden 30 min auf Eis aufgetaut. Zu 200 µl der Zellen wurden maximal 10 µl ligierte DNA zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90 sekündigen Hitzeschock bei 42°C wird der Reaktionsansatz sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurde das Gemisch 45 min bei 37°C und 130 rpm inkubiert.

100 µl Aliquots wurden auf den jeweiligen AB-Platten ausgestrichen.

B.5.6 Plasmid-DNA-Übertragung durch Konjugation

(de Lorenzo und Timmis, 1994)

Plasmide wurden mittels eines triparentalen Mating-Ansatzes in *P. aeruginosa* Zellen eingebracht. Von den drei Stämmen (Helfer: *E. coli* HB101 mit Fertilitätsplasmid mit *tra*-Genen pRK2013; Donor: *E. coli* mit mobilisierbarem Donorplasmid (*oriT*), sowie Empfängerstamm *P. aeruginosa*) wird nach Zugabe des etwaigen Antibiotikums jeweils eine üN-Kultur hergestellt (*E. coli* bei 37°C, *P. aeruginosa* bei 42°C).

Je 2 ml der üN-Kulturen werden abzentrifugiert (6000 rpm, 5 min, RT), das Pellet zweimal mit LB gewaschen und in 400 µl LB resuspendiert. Jeweils 100 µl Donor und Helfer werden gemischt und bei RT 30 min inkubiert. Zu dem Donor-Helfer-Gemisch werden 200 µl des Akzeptors pipettiert, daraus zwei 2 LB-Platten mit 50 µl Spots beschichtet und diese bei 37°C für 4h inkubiert. Anschließend werden die Spots mit einem sterilen Tupfer abgenommen, in 2 ml sterilem 0,9 %igem NaCl resuspendiert und auf PIA mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

B.6 Proteinbiochemische Methoden

B.6.1 Zellernte und Probenvorbereitung für die 2-dimensionale Gelelektrophorese

(mod. nach Riedel *et al.*, 2003)

Die Bakterienzellen wurden nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase und bei gleicher OD₆₀₀ durch Zentrifugation (25 min, 4300 rpm, 4°C) geerntet. Der Überstand wurde entweder verworfen oder zur Extraktion der extrazellulären Proteine weiterverarbeitet.

Das Zellpellet wurde mind. 2x mit 0,9% NaCl oder 50 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen und konnte nach Aufnahme im doppeltem Volumen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 und Zugabe von Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten® (Inhibierung von Serin-, Cystein- und Metalloproteasen; Roche, Mannheim) für die Extraktion der intrazellulären Proteine bei -20°C gelagert werden.

Für die Extraktion der Oberflächen-, bzw. Membranproteine sollte das Pellet sofort weiterverarbeitet werden, um eine Zellyse und somit eine Kontamination durch intrazelluläre Proteine zu vermeiden.

B.6.1.1 Extraktion des Gesamtzellysats

B.6.1.1.1 Zellaufschluß durch Ultraschall

Der Aufschluss nicht zu viskoser Puffer-Zellsuspensionen bis zu einem Volumen von 5 ml erfolgt im Sonicator (UP200s, dr.hielscher GmbH). Hierbei wird die Zellsuspension in einem Wasser/Eis-Bad ca. 1 min (40% Amplitude) lang Ultraschall-Pulsen (je 5 s) unterworfen. Dieser Vorgang sollte mindestens 5-mal wiederholt werden. Der vollständige Zellaufschluss wird anschließend mikroskopisch überprüft. Nach dem Zellaufschluss wird der intrazelluläre Proteinanteil durch hochtouriges Zentrifugieren (30 min, 15000 rpm) vom Rest (Membran und Zellwandproteine) abgetrennt. Der erhaltene Zellextrakt sollte sofort weiterverarbeitet oder in 1 ml Aliquots zur Lagerung bis zur Phenolextraktion bei -80°C eingefroren werden.

B.6.1.1.2 Zellaufschluß durch French Press

Der Zellaufschluss größerer Volumen erfolgt in der French Press (SLM AIMCO INSTRUMENTS INC.). Hierbei durchläuft die Puffer-Zellsuspension mindestens 3-mal eine French-Press-Zelle bei maximalem Druck (1000 psi). Die Zellen werden bei hohem Druck durch eine sehr kleine Öffnung gepresst. Beim Verlassen der Kammer kommt es zu einem plötzlichen Druckabfall, wodurch die Zellen platzen. Der Erfolg des Zellaufschlusses wird auch hier mikroskopisch kontrolliert. Mit den aufgeschlossenen Zellen wird wie oben verfahren.

B.6.1.2 Extraktion von Membranproteinen

Die Analyse von Membranproteinen mittels 2-DE stellt ein besonderes Problem dar, da diese oftmals sehr hydrophoben Proteine während der Elektrophorese nur schwer in Lösung zu halten sind. Oberflächen- und Membranproteine lassen sich durch anionische De-

tergenzien (z.B. SDS) zwar gut solubilisieren, diese Substanzen interferieren jedoch mit der isoelektrischen Fokussierung. Alternativ können zwitterionische (z.B. CHAPS) oder nicht-ionische (z.B. Triton X100) Detergenzien verwendet werden, allerdings können dabei vielfach nicht alle Membranproteine in Lösung gebracht werden. Ein weiteres Problem stellt die Verunreinigung der Membranprotein-Fraktion mit intrazellulären Proteinen dar. Keine der derzeit gebräuchlichen Zellfraktionierungsmethoden führt zu einer 100%igen Abtrennung der einzelnen zellulären Kompartimente. Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgende Methode zur Extraktion der Membran-assoziierten Proteine verwendet:

B.6.1.2.1 Extraktion von Membran-assoziierten Proteine

B.6.1.2.1.1 Saure Glycin-Extraktion

(Nilsson *et al.*, 2000)

Bei dieser Methode werden die Membran-assoziierten Proteine durch den sauren Glycinpuffer von der Membran losgelöst. Gleichzeitig wird ihre Löslichkeit reduziert. Durch die anschließende Zugabe von NaOH wird die Salzkonzentration so eingestellt, dass die Löslichkeit der Proteine weiter reduziert wird. Anschließend werden die Proteine mit Aceton gefällt, durch Zentrifugation pelletiert und in Lysepuffer gelöst. Die Auflösung der Membranproteine vor allem im basischen Bereich konnte durch einen von Nouwens entwickelten Membranproteinpuffer stark verbessert werden (Nouwens *et al.*, 2000).

Lösungen:

NaOH und HCl zur pH Einstellung

Glycinpuffer

0,2 M Glycin

pH 2,2 mit HCl einstellen (keinesfalls niedrigerer pH sonst lysieren die Zellen)

Membranprotein-Lysepuffer (Nouwens *et al.*, 2000)

1% (w/v) Tetradecanoylamido-propyl-dimethyl-ammoniopropane-sulforat (ASB 14)

2 mM Tributylphosphin

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

0,8% (w/v) Pharmalyt 3-10 NL (1 µl auf 50 µl)

Arbeitsprotokoll:

- Zellen ernten (5000 rpm, 20 min, 4°C)
- Pellet 2 mal mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 waschen
- Pellet abwiegen und dementsprechend Glycinpuffer zufügen: 100 ml Puffer/4 g Zellen
- 15 min bei 20°C rühren lassen
- Zellen 15 min bei 7000 rpm abzentrifugieren
- Überstand mit NaOH auf pH 7 einstellen
- Fällung der Oberflächenproteine üN mit dreifachem Volumen an eiskaltem Aceton
- 60 min bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugieren – Überstand vorsichtig verwerfen, da das Pellet sehr leicht löslich ist
- Pellet 3 mal mit EtOH und 1 mal mit Aceton waschen (20 min, 12.000 rpm, 4°C)
- Pellet trocknen lassen und in 100-200 µl Membranprotein-Lysepuffer aufnehmen

B.6.1.3 Präzipitation der Kulturüberstandsproteine

Aus dem Kulturüberstand wurden die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt. Durch die Säure denaturieren die Proteine und sind somit weniger löslich und können durch Zentrifugation präzipitiert werden.

Arbeitsprotokoll:

- Zellen in 2 l ABC-Medium in 5 l-Kolben anziehen
- abzentrifugieren und Überstand in Schottflaschen sammeln
- unter Rühren und auf Eis 200 g TCA pro 1000 ml Überstand zufügen
- Proteine üN bei 4°C unter Rühren fällen
- 90 min bei 6000 rpm und 4°C in 400 ml abzentrifugieren
- Pellet gründlich mit Glaspipetten von der Becherwand kratzen
- 3 mal mit EtOH und 1 mal mit Aceton waschen (20 min, 12000 rpm, 4°C)
- Pellet trocknen lassen und in Membranprotein-Lysepuffer aufnehmen
- Je nach Dauer der Lagerung auf –20°C oder –80°C

B.6.2 Phenolextraktion

(Hanna *et al.*, 2000)

Eine Phenol-Wasser-Mischung zu gleichen Volumenteilen bildet ein Zweikomponentensystem mit einer Wasser- und einer Phenol-reichen Phase. Dieses Zweikomponentensystem ist nach 70°C-Erhitzung und anschließender Abkühlung geeignet, um Proteine (Anreicherung in der Phenol-reichen Phase) von hydrophilen Nukleinsäuren, Ribonukleinsäuren und Polysacchariden (Anreicherung in der Wasser-reichen Phase) aus wässrigen Lösungen zu trennen. Diese nochmalige Reinigung der Protein-Fraktion ermöglicht einen Auftrag höherer Protein-Konzentrationen in der 1. Dimension.

Lösungen:

Phenol (Roti[®]-Phenol; Roth)

Eiskaltes Aceton

Lysepuffer (50 ml)

- 30 g Harnstoff (USB) in 50 ml H₂O_{dest} lösen (dabei leicht erwärmen)
- 0,5 g Serdolit MB-1 zugeben, 10 min rühren und abfiltrieren
- zu 48 ml dieser Lösung 1,0 g CHAPS (Pharmacia), 0,5 g DTT, 1,0 ml Pharmalyte pH 3-10 und 50 mg Pefabloc Protease Inhibitor geben
- in 1 ml Portionen aliquotieren und bei -80°C einfrieren

Arbeitsprotokoll:

- 1 ml wässrigen Zellextrakt in Schraubdeckelcaps mit 1 ml Phenol versetzen, vortexen und 10 min bei 70°C inkubieren, 5 min auf Eis abkühlen
- zur Phasentrennung 10 min bei 7000 rpm zentrifugieren
- obere wässrige Phase verwerfen
- 1 ml H₂O_{dest} zugeben, vortexen und 10 min bei 70°C inkubieren, 5 min auf Eis abkühlen
- zur Phasentrennung 10 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- obere wässrige Phase verwerfen
- Phenolphase (wenn nötig) auf 2 Schraubdeckelcaps aufteilen und jeweils 1 ml eiskaltes Aceton zugeben, mindestens 30 min bei -20°C ausfällen
- 20 min bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugieren, Überstand verwerfen

- Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton waschen
- erneut 20 min, bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet bei RT trocknen lassen und mit 2D-Lysepuffer, speziellem Membranprotein-Puffer oder direkt im Rehydratisierungspuffer resuspendieren
- in Aliquots aufgeteilt bei -80°C einfrieren

B.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Makromoleküle, insbesondere Proteine, im elektrischen Feld an einer quervernetzten Polyacrylamid-Matrix aufgetrennt. Zwischen Proteinen bestehende Unterschiede in Ladung und Konformationszustand, die bei einer Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen eine Rolle spielen, werden durch Denaturierung in Gegenwart von SDS ausgeglichen und somit eine Trennung ausschließlich anhand der Molekülgröße gewährleistet (SDS-PAGE). Der Logarithmus der zurückgelegten Strecke im Gel steht in umgekehrt proportionalem Verhältnis zur Masse der Proteine. Durch einen Vergleich zu Wanderstrecken (R_f -Werte) von Standard-Proteinen bekannter Größe kann die Molekülmasse unbekannter Proteine und Protein-Untereinheiten bestimmt werden.

B.6.3.1 Diskontinuierliche Gelelektrophorese

(Davis *et al.*, 1976)

Um eine Trennung von Proteinen mit nur kleinen Massendifferenzen in der Gelelektrophorese zu gewährleisten, ist es notwendig, dass die Banden möglichst scharf zu erkennen sind. Eine Arbeitsmethode, die die Fokussierung des Proteingemischs vor der Auftrennung im Gel ermöglicht, ist die diskontinuierliche (Disk-) Gelelektrophorese. Dazu wird das mit einem pH-Wert von 8,8 ausgestattete Trenngel von einem sauren, weitmaschigen Sammelgel mit pH 6,8 überschichtet. Der pH-Wert im Sammelgel liegt sehr nahe dem Isoelektrischen Punkt des Glycins, welches im Elektrophoresepuffer als Ladungsträger dient. Beim Eintritt in das Sammelgel wird der überwiegende anionische Glycinat-Anteil aufgrund der pH-Werte-Verschiebung neutralisiert. Glycin wird aufgrund seiner niedrigen „elektrophoretischen“ Mobilität zum Folge-Ion. Chloridionen, die im Gel enthalten sind, haben eine hohe elektrophoretische Motilität (Leit-Ion). Da die Glycin-Zwitterionen nicht wandern, entsteht ein Mangel an beweglichen Kationen. Dadurch wird der Stromfluss herabgesetzt.

MATERIAL UND METHODEN

Der Strom muss im gesamten System jedoch aufrechterhalten werden, wodurch sich die Spannung zwischen den führenden Chloridionen und dem Glycin erhöht. Im Bereich der Chloridionen stellt sich somit eine niedrige Feldstärke und im Bereich des Glycins eine sehr hohe elektrische Feldstärke ein. Die Proteine befinden sich in einem lokal und temporär veränderlichen Feldstärkegradienten. Proteine mit hoher Mobilität folgen dem Leit-Ion. Proteine mit niedriger Mobilität werden vor dem Folge-Ion hergeschoben. Wandert ein Protein in die Zone hoher Mobilität, nimmt die Feldstärke ab, und es fällt zurück. Wandert ein Protein zu langsam, wird es durch die hohe Feldstärke beschleunigt. Es kommt so zu einer Fokussierung der Proteine im Sammelgel. Erreicht das Glycin das Trenngel (pH 8,8), geht es in das geladene Glycinat-Anion über und überholt die Proteinfront. Der Mangel an Ionen wird dadurch aufgehoben und eine konstante Feldstärke im Gel entsteht.

Lösungen:

Acrylamid-Stammlösung

Fertige Lösung 30 % (w/v) Acrylamid
0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Applichem)

Ammoniumpersulfat (APS)

10 % (w/v) APS in H₂O_{dest}
Lagerung in Aliquots bei -20°C

Trenngelpuffer (TG)

Tris 18,2 g
SDS 10% (w/v) 4 ml
H₂O_{dest} ad 100 ml
pH 8,8 mit HCl einstellen

TEMED

Tetramethylethyldiamin

Abdicht-Agarose

1% (w/v) in H₂O_{dest}

Sammelgelpuffer (SG)

Tris Base 6,1 g
SDS 10% (w/v) 4 ml
H₂O_{dest} ad 100 ml
pH 6,8 mit HCl einstellen

Tabelle B-5 : Pipettierschema für 3 Gele

Gel	Acrylamid (ml)	Gelpuffer (ml)	H ₂ O _{dest} (ml)	APS/TEMED (µl)
5 % SG	3,34	5 (SG-Puffer)	11,6	150 / 15
8 % TG	10,64	10 (TG-Puffer)	19,24	250 / 25
10 % TG	13,32	10 (TG-Puffer)	16,6	250 / 25
12 % TG	16	10 (TG-Puffer)	14	250 / 25
15 % TG	20	10 (TG-Puffer)	10	250 / 25

MATERIAL UND METHODEN

Arbeitsprotokoll:

- Glasplatten mit 96%igem EtOH gründlich säubern
- Spacer an den Seiten der Glasplatten einsetzen, mit jeweils 2 Klammern fixieren
- Glasplatten senkrecht auf eine Bodenplatte stellen, an den Seiten und am Boden sorgfältig mit Agarose abdichten
- Agarose erstarren lassen, Platten von jetzt ab nicht mehr berühren
- Trenngel-Mischung vorbereiten, als letztes TEMED und APS zugeben
- sofort mit einer 10 ml Pipette Trenngel zwischen die Platten bis ca. 2 cm unter den oberen Rand einfüllen
- mit 96% igem EtOH überschichten und Trenngel auspolymerisieren lassen (bei RT etwa 1 h)
- nach dem Auspolymerisieren EtOH mit Papiertüchern absaugen
- Sammelgel-Mischung vorbereiten, als letztes TEMED und APS zugeben
- sofort mit 5 ml Pipette Sammelgel bis kurz vor dem Überlaufen einfüllen
- Gelkamm luftblasenfrei einsetzen und Sammelgel auspolymerisieren lassen (bei RT ca. 30 min)
- bereits gegossene Gele können in feuchtes Küchenpapier und Frischhaltefolie eingewickelt bei 4°C bis ca. 4 Wochen aufbewahrt werden

Lösungen:

Auftragspuffer (4-fach)

Glycerin	7,5 ml
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
SDS	1,2 g
Bromphenolblau (1%)	200 µl
ml	
Tris	0,4 g
H ₂ O _{dest}	ad 50 ml
pH 6,8 mit HCl einstellen	

Elektrophorese-Puffer (10-fach)

Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10,0 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000

Arbeitsprotokoll:

- Gelplatten in die Elektrophorese-Apparatur einspannen, darauf achten, dass Pufferkammern dicht abschließen
- Anoden und Kathodenkammer mit 1-fach Elektrophorese-Puffer füllen
- Gelkamm vorsichtig entfernen

- Proben im Verhältnis 3:1 mit Auftragspuffer mischen und 3-5 min bei 100°C im Wasserbad denaturieren
- Proben in die Taschen auftragen (max. 20 µl pro Tasche)
- Gellauf bei 30-40 mA
- die Elektrophorese ist beendet, wenn die Bromphenolblau-Front die untere Gelkante erreicht hat (ca. 1,5 h)

B.6.3.2 Coomassie-Färbung

Lösungen:

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue (Serva Blue R)	1,5 g
Methanol	455 ml
Eisessig	80 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Entfärber

Methanol	250 ml
Eisessig	300 ml
H ₂ O _{dest}	ad 5000 ml

Arbeitsprotokoll:

Die Färbung der Proteine in der SDS-PAGE erfolgte mit der Färbelösung für 15 min bei 60°C im Schüttelwasserbad. Nicht spezifisch an das Protein gebundener Farbstoff wurde mit Entfärber bei 60°C unter Zugabe von Küchenpapier (Farbstoff-Adsorption) ausgewaschen. Anschließend können die Gele eingescannt werden und zur Lagerung zwischen 3 mm Whatmanpapier und Cellophanfolie im Vakuum 1h bei 80°C getrocknet werden.

B.6.3.3 Quantitative Proteinbestimmung

Coomassie-basierte Methode nach Bradford *et al.* (1976)

Der im Sauren anionisch vorliegende Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G250 interagiert in stöchiometrischer Weise mit den positiv geladenen Aminogruppen vorhandener Proteine unter Bildung eines blauen Farbkomplexes. Die Intensität der Färbung ist dabei im Messbereich direkt proportional zur Gesamtkonzentration an Protein und wird photometrisch

bei einer Wellenlänge von $\gamma = 595$ nm bestimmt. Erfasst werden dabei nur Proteine und Peptide, deren molare Masse größer als 3000 Da ist. Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer unbekanntem Lösung erfolgt anhand einer mit 0 bis 25 μg BSA erstellten Eichgerade.

Lösungen:

Eichlösung

1 mg /ml BSA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Färbelösung

Coomassie[®] Plus Protein Assay Reagent (Pierce)

Reaktionsansatz:

Proteinlösung	x μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	(1000– x) μl
Färbelösung	1000 μl

Nach 5 min Inkubation bei RT werden die Ansätze in einem Spektralphotometer bei OD_{595} gegen einen ansonsten analog behandelten Leerwert, der kein Protein enthält, vermessen. Die Auswertung erfolgt anhand der aus der Eichgeraden ermittelten Steigung m und dem eingesetzten Probevolumen V [μl] nach folgender Formel:

Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] = $\text{OD}_{595\text{nm}} / (m \times V)$

B.7 Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) (O'Farrell 1975) ist zurzeit die einzige Methode, die in der Lage ist, gleichzeitig hunderte von Genprodukten zu untersuchen. Dabei werden die Proteine in der 1. Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), nach ihrem pI-Wert aufgetrennt und in der nachfolgenden 2. Dimension nach ihrer Größe.

Die 2-DE ist eine äußerst anfällige Methode. Deswegen ist es wichtig, vor allem auch schon während der Probenvorbereitung, auf die Verwendung von hochreinen Substanzen und eine sorgfältige Arbeitsweise zu achten. Um eine akkurate und reproduzierbare Repräsentation einer Proteinfraction zu erhalten, ist es essentiell, dass alle Proteine in Lösung gehen und auch in Lösung bleiben (z.B.: Übertrag von erster auf die zweite Dimension). Verunreinigungen, wie z.B. Salze oder Metalle, reduzieren die Löslichkeit der Proteine und lassen sie aggregieren, was zur Proteinschweifbildung führt.

B.7.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die isoelektrische Fokussierung nutzt die unterschiedlichen Ladungseigenschaften der Proteine. Proteine tragen ein individuelles Muster geladener Aminosäurereste, sie sind also Polyelektrolyte. Die Ladung dieser Polyelektrolyte ist pH-abhängig und lässt sich als Zahl, dem pI-Wert, ausdrücken. Am isoelektrischen Punkt (pI) ist die Summe aller Ladungen im Molekül (Nettoladung) gleich Null und somit auch seine elektrophoretische Mobilität im angelegten Feld. Bei der IEF wandert also jedes Molekül zu seinem individuellen Endpunkt, nämlich dem pH-Wert, der seinem pI entspricht, und reichert sich dort an. Dazu werden pH-Gradienten in einer Gelmatrix erzeugt, wobei großporige Polyacrylamid-Gele verwendet werden, da ein Molekularsiebeffekt hier unerwünscht ist. Die pH-Gradienten werden durch so genannte Ampholyte erzeugt. Ampholyte sind Moleküle mit mehreren positiven und negativen Ladungen (Polymere mit zahlreichen Amino- und Carboxylgruppen). Ein stabiler und kontinuierlicher pH Gradient mit gleichmäßiger und konstanter Leitfähigkeit, sowie Pufferkapazität ist Grundbedingung zur Erzielung hochauflösender und reproduzierbarer Trennergebnisse. Man unterscheidet hier zwischen pH-Gradienten, die in einer Gelmatrix durch eine Mischung freier Trägerampholyte im elektrischen Feld erzeugt werden, und immobilisierten pH-Gradienten, bei der so genannte Immobiline (Acrylamid-derivate mit Amino- und Carboxylgruppen) mit der Acrylamidgelmatrix copolymerisieren und so einen kovalent verankerten pH-Gradienten erzeugen.

Nach Ende der Fokussierung werden die Streifen herausgenommen und können bis zum Beginn der 2. Dimension in Alufolie verpackt bei -20°C eingefroren werden. Erfahrungsgemäß ist die sofortige Weiterverarbeitung besser, da die Gelmatrix durch das Einfrieren brüchig und somit viel empfindlicher wird, was das Aufbringen auf die 2. Dimension erschwert.

Lösungen:

Rehydrierungs-Lösung (50 ml)

- 24 g Harnstoff (8 M; USB) in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ lösen, dabei leicht erwärmen
- 0,5 g Serdolit (Merck) zugeben, 10 min rühren, abfiltrieren
- zu 48 ml der Lösung 1 g Chaps (Pharmacia), 250 μl IPG-Puffer (Pharmacia, pH 3-10 NL, pH 4-7 oder pH 6-11) zugeben und einige Körnchen Bromphenolblau zugeben
- auf 50 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auffüllen
- Lösung in 2 ml Portionen aliquotieren und bei -80°C einfrieren
- vor der Verwendung werden pro 2 ml vollständig aufgetauter Lösung 5,6 mg DTT zugesetzt

Probenvorbereitung:

Pro isoelektrischer Fokussierung werden ca. 200 µg Protein (Silberfärbung, analytisch), 300 – 400 µg Protein (Coomassie-Färbung, analytisch) und bis zu 600 µg (präparativ zur MALDI-TOF-MS) in einem maximalen Volumen von 350 µl aufgetragen.

Beispiel: Probe hat eine Proteinkonzentration von 5 µg/µl

200 bzw. 350 µg Protein = 40 bzw. 65 µl Probe

350 µl Volumen: 40 bzw. 65 µl Probe + 310 bzw. 285 µl Rehydrierungs-Lösung

Äußerst wichtig hierbei ist es, ein Mischungsverhältnis von 1:1 (Probe zu Rehydrierungs-lösung) nicht zu überschreiten. Bei einem zu hohen Anteil an Trägerampholyten aus dem 2-DE-Lysepuffer wird die Gesamtleitfähigkeit des Streifens zu hoch, was ein Erreichen des vorgegebenen Spannungsunterschiedes und somit die Auftrennung der Proteine verhindert.

B.7.1.1 Probenauftrag mittels Einquellen

Arbeitsprotokoll:

- Stripholder sorgfältig reinigen und vollständig trocknen lassen
- Probe im Stripholder mit 1 ml Pipette sorgfältig verteilen
- Gelstreifen an hinteren Ende anfassen, die Schutzfolie von oben her abziehen und den Streifen mit der Gelseite nach unten auflegen , dabei sollten keine Luftblasen mit eingeschlossen werden und keine Flüssigkeit über den Streifen gelangen
- Streifen mit maximal 1 ml (überschüssiges Mineralöl stört die Fokussierung) Mineralöl überschichten und Deckel schließen
- Stripholder auf der IPGphor platzieren: Die Kontakte des Stripholders für Anode und Kathode müssen auf denen des IPGPhors platziert werden
- Deckel schließen und Programm starten

Tabelle B-6 : IGPhor-Programm (Biorad)

Temperatur	20°C
Max. Stromstärke	0,05 mA pro IPG-Streifen
Proben Volumen	350 µl (für einen 170 mm langen und 3 mm breiten Streifen)
Spannung	Zeit
50 V	12 Stunden (aktives Einquellen der Probe)
200 V	1 Stunde
500 V	1 Stunde
500 bis 8000 V	1 Stunde (Gradient)
8000 V	3 – 4 Stunden (eigentliche Fokussierung, 24-32kVh)

Nach Ende der Fokussierung werden die Streifen herausgenommen und können bis zum Beginn der 2. Dimension in Alufolie verpackt bei –20°C eingefroren werden

B.7.2 SDS-PAGE (2. Dimension)

Die SDS-PAGE trennt die Proteine rein aufgrund ihrer Molekülgröße. Dazu werden alle Proteine komplett denaturiert und in einheitliche, vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichartigen Ladungseigenschaften überführt. SDS ist ein negativ geladenes, stark denaturierendes Detergenz, welches alle nichtkovalenten Bindungen, die die Proteinstruktur bestimmen, aufhebt. Es bindet ungefähr im Verhältnis von 1,4 g SDS pro Gramm Aminosäure gleichförmig an alle Proteine, wobei anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Da sich aus diesem Sachverhalt eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen ergibt, kann man mit Hilfe von Markerproteinen eine Eichkurve aufstellen und die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine bestimmen. Die relative Mobilität dieser SDS-Proteinkomplexe in einem elektrischen Feld ist abhängig von der Acrylamidkonzentration der Gelmatrix. Diese bewegt sich in der Regel zwischen 6 und 15 % und bestimmt die durchschnittliche Porengröße der Gele. Sind also hochmolekulare Proteine von Interesse, empfiehlt sich ein niedrig prozentiges Gel und umgekehrt.

B.7.2.1 Giessen der SDS-Page Gele

Lösungen:

Monomeren-Stammlösung

4fach Gelpuffer

10% SDS

10% Ammoniumpersulfat

TEMED

Butanol zum Überschichten

Gelaufbewahrungs-Puffer

Monomeren-Stammlösung 1 l (bei 4°C aufbewahren)

	Endkonzentration	Menge
Acrylamide (Pharmacia)	30%	300 g
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,8%	8 g
H ₂ O _{dest}		ad 1000 ml

MATERIAL UND METHODEN

Serdolit		1 g
10 min rühren, durch Filter abgießen		

4-fach Gelpuffer 1 l (bei 4°C aufbewahren)

	Endkonzentration	Menge
Tris-Base (Pharmacia)	1,5 M	181,5 g
H ₂ O _{dest}		750 ml
HCl _{konz}		pH 8.8 einstellen
H ₂ O _{dest}		ad 1000 ml

10% SDS 250 ml (bei RT aufbewahren)

	Endkonzentration	Menge
SDS	10 %	25 g
H ₂ O _{dest}		ad 250 ml

10% Ammoniumpersulfat 10 ml (immer frisch zubereiten)

	Endkonzentration	Menge
Ammoniumpersulfat (Sigma – electrophoretic grade)	10%	1 g
H ₂ O _{dest}		ad 10 ml

Gelaufbewahrungspuffer 1 l (bei 4°C aufbewahren)

	Endkonzentration	Menge
4fach Gelpuffer	1 x	250 ml
10% SDS	0,1 %	10 ml
H ₂ O _{dest}		ad 1000 ml

B.7.2.1.1 Ansetzen der Gellösung

für 12 Gele – 1300 ml

	12 %	15 %
Momomeren-Stammlösung	522 ml	650 ml
4fach-Gelpuffer	325 ml	325 ml
10% SDS-Lösung	13 ml	13 ml
H ₂ O _{dest}	433 ml	305 ml
10% APS	6,5 ml	6,5 ml
TEMED	429 µl	429 µl

Arbeitsprotokoll:

- Gellösung in ummantelter 2 l Flasche zusammen pipettieren (bis auf APS!) und anschließend mittels Vakuumpumpe 15 min entgasen
- APS zur Gellösung geben, auf Magnetrührer 2 min sorgfältig durchmischen und anschließend sofort gießen (bis ca 1 cm unter den Rand der Gießkassette)
- Mit je 1 ml Butanol überschichten

- Gele etwa 4 h auspolymerisieren lassen
- mit Gelaufbewahrungspuffer getränktem Küchenpapier einwickeln und in Frischhaltefolie bei 4°C bis zur Elektrophorese lagern

B.7.2.1.2 Vorbereitung der Elektrophorese-Kammer

Lösungen:

Elektrophorese-Puffer 5 l

	Endkonzentration	Menge
Tris Base	25 mM	60,5 g
Glycin	192 mM	288,0 g
SDS (Fluka)	0,1 %	20 g
H ₂ O _{dest}		ad 20 l
pH muss nicht eingestellt werden		

- 5 l 4 fach-Konzentrat ansetzen und in der Kammer mit 20 l auf 25 l auffüllen
- Nach dem Befüllen der Kammer die Umwälzungspumpe und das Kühlwasserbad (10°C) starten
- Die Kammer am besten mehrere Stunden vor dem Start der Elektrophorese befüllen, damit der Puffer vollständig durchmischt und abgekühlt ist

B.7.2.2 Equilibrierung der IPG-Streifen

Die großen Mengen an Harnstoff und anderen ungeladenen chaotropen Verbindungen zur Proteinsolubilisierung aus der IEF stören die Wechselwirkungen von SDS mit den Proteinen und müssen deshalb entfernt werden. Die fertig fokussierten Gelstreifen werden deshalb vor der 2. Dimension in zwei Schritten equilibriert. Außerdem müssen während der Equilibrierung oxidative Prozesse, wie zum Beispiel die Reoxidation freier Sulfhydrylgruppen, vermieden werden. Dazu wird in einem ersten Schritt unter reduzierenden Bedingungen (DTT) gearbeitet. Im zweiten Schritt werden die Cysteinreste durch Iodacetamid alkyliert.

MATERIAL UND METHODEN

Lösungen:

Equilibrierungs-Puffer 500 ml (bei RT bis 2 Wochen haltbar)

	Endkonzentration	Menge
Harnstoff (USB)	6 M	180 g
Glycerin	30 %	150 g
SDS (Appllichem)	2 %	10 g
4fach Gelpuffer	1x	16,7 ml
H ₂ O _{dest}		ad 500 ml

Für 12 Streifen werden jeweils 150 ml Equilibrierungspuffer benötigt, in den kurz vor der Equilibrierung 1,5 g DTT (Puffer I) und 6 g Iodacetamid (Puffer II) eingewogen werden.

Arbeitsprotokoll:

- Streifen mit der Gelseite nach oben einzeln in Schraubdeckelreagenzgläser überführen
- Equilibrierungspuffer I zugeben und unter leichtem Schütteln 15 min bei RT inkubieren
- Puffer I abschütten und Puffer II zugeben, 15 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubieren
- Streifen auf Whatman-Papier abtropfen lassen und kurz im Elektrophoresepuffer schwenken

B.7.2.3 Elektrophorese-Start

Material:

Whatman-Papier Stückchen (0,5 x 0,5 cm) mit 10 µl Proteinstandard (Biorad; prestained) getränkt

Agarose-Abdicht-Lösung

Agarose-Abdicht-Lösung:

	Menge
Elektrophorese-Puffer	50 ml
Agarose	250 mg
Bromphenolblau	einige Körnchen

Arbeitsprotokoll:

- Gele aus dem Kühlschrank nehmen und mit der geschlossenen Seite nach links im Ständer bereitstellen

MATERIAL UND METHODEN

- Mit Proteinstandard getränkte Filterstreifen am linken äußeren Rand auflegen
- Equilibrierte IPG-Streifen auflegen, dabei mit einem kleinen Spatel gut andrücken
- Streifen mit ca. 1-2 ml Agarose-Abdichtlösung überschichten und fest werden lassen.
- Gele mit der geschlossenen Seite nach unten und der Seite mit den IPG-Streifen nach vorne in die Gelkammer einspannen
- Deckel schließen und Probe mit 60 mA (Stromstärke begrenzend) ca. 2 h einlaufen lassen, danach auf 1 Watt pro Gel konstant umstellen
- Die Laufdauer beträgt zwischen 18-26 h

B.7.2.4 Detektionsverfahren und Auswertung

Nach der Beendigung des Elektrophorese-Laufs (die Bromphenolblau-Front sollte das Ende der Gele erreicht haben) werden die Gelplatten aus der Elektrophorese-Kammer genommen, vorsichtig mit Hilfe eines Plastikspacers geöffnet und Agarose und IPG-Streifen entfernt. Für die anschließende Fixierung werden die Gele einzeln in Plastikwannen überführt und nach dem jeweiligen Farbe-Protokoll weiterbearbeitet.

B.7.2.4.1 Silber-Färbung

Blum *et. al.*, 1989

Lösungen:

Fixier-Lösung 2 l

800 ml Ethanol
200 ml Essigsäure
1000 ml H₂O_{dest}
ml

Thiosulfat-Reagenz (1 l)

Natriumthiosulfat 200 mg
H₂O_{dest} ad 1000 ml

Entwickler (1 l)

Natriumthiosulfat 5 mg
Natriumcarbonat 30 g
Formaldehyd (37%) 0,5 ml
H₂O_{dest} ad 1000 ml

Silbernitrat-Reagenz (1 l)

Silbernitrat 2 g
Formaldehyd (37%) 0,2 ml
H₂O_{dest} ad 1000

Wasch-Lösung (2 l)

600 ml Ethanol
1400 ml H₂O_{dest}

Stopp-Reagenz (1 l)

Glycin 5 g
H₂O_{dest} ad 1000 ml

Arbeitsprotokoll:

Schritt	Reagenz	Dauer
Fixierung	Fixierer	Mindestens 1 Stunde
Waschen	Waschlösung	2 x 20 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	1 x 20 min
Sensitivierung	Thiosulfat-Reagenz	1 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	3 x 20 s
Silberfärbung	Silbernitrat-Reagenz	20 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	3 x 20 s
Entwicklung	Entwickler	3-5 min (oder länger!)
Waschen	H ₂ O _{dest}	1 x 20 s
Abstoppen	Stopp-Reagenz	5 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	3 x 10 min

Pro Plastikbehälter und Gel ca. 300 ml Reagenz

B.7.2.4.2 Colloidale Coomassie-Färbung

Neuhoff *et. al.*, 1988

Lösungen:

Fixier-Lösung 2 l

800 ml Ethanol
 200 ml Essigsäure
 1000 ml H₂O_{dest}

Färbelösung (2 x 1 l)

(NH ₄) ₂ SO ₄	100 g
Ortho-Phosphorsäure (85%)	20 g
Methanol	250 ml
Coomassie-Brilliant Blue G250 (Serva)	0,625 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Arbeitsprotokoll:

- Gele für mindestens 1 h fixieren
- fixierte Gele 2 mal 10 – 15 min in H₂O_{dest} t waschen
- pro Gel 200 ml Färbelösung zufügen und über Nacht oder bei geringer Proteinkonzentration zwei Nächte färben
- Färbelösung abgießen (kann bis zu 4 Mal wieder verwendet werden) und die Gele mit H₂O_{dest} entfärben, Wasser dabei mehrmals wechseln

B.7.2.4.3 Digitalisierung der Gele

Bevor die 2DE-Gele mit einem Bildauswertesystem analysiert werden können, müssen sie digitalisiert werden. Unter Digitalisierung versteht man das Messen der Absorptionswerte kleiner, nebeneinander liegender Gelregionen, so genannter Pixel (picuter element), und die Transformation dieser Analogwerte in eine digitale Form, die der Computer interpretieren kann. Für diese Arbeit wurde das Densitometer GS-800 von BioRad verwendet.

B.7.2.4.4 Analyse der Bilddaten

Die Gele wurden mithilfe einer Software (PDQuest, BioRad) ausgewertet. Dabei wurde vor allem auf die Anzahl der Spots pro Gel und die Anzahl von "mismatches" (d.h.: im Vergleichsgel nicht vorhandener Spots) geachtet. Ein Vergleich der Intensitäten korrespondierender Spots machte eine Aussage darüber möglich, ob Proteine zum Vergleichsstamm stärker oder schwächer produziert werden.

B.7.2.4.5 Identifizierung der Proteinspots

B.7.2.4.5.1 „Peptide mass fingerprints“

Proteine aus 2DE-Gelen können molekular über massenspektroskopische Methoden identifiziert werden. Dazu werden die Protein-Spots aus den Coomassie-gefärbten Gelen (nur diese Färbemethode ist mit der nachfolgenden Trypsin-Proteolyse problemlos kompatibel) ausgeschnitten, die Proteine eluiert und gezielt fragmentiert. Meist werden enzymatische Methoden (z.B. die Protease Trypsin) zur Fragmentierung verwendet, bei denen die Polypeptidketten an bestimmten Konsensussequenzen gespalten werden. Die massenspektroskopische Analyse von Peptidgemischen mit MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry) bestimmt den Quotienten von Masse zu Ladung (m/z) von Ionen. Mithilfe eines Lasers werden die Peptide ionisiert und anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt, wo sie zu einem, durch ihre Masse bestimmten Zeitpunkt auf ein Vakuum treffen. So kann die Masse der einzelnen Peptide berechnet werden, welche für ein Protein spezifische Spektren ergeben. Diese eignen sich dann für den Datenbankabgleich mit bekannten Protein-Spektren von Organismen, deren Gesamtgenom bereits sequenziert und annotiert wurde.

Die massenspektroskopischen Analysen wurden vom Zentrallabor für Proteinanalytik (Dr. Axel Imhof) am Adolf-Butenandt-Institut der LMU München durchgeführt.

C Ergebnisse

Für eine umfassende Analyse des zur Persistenz befähigten *P. aeruginosa*-Phänotyps wurden sequentielle Isolate von drei CF-Patienten (M, V und P) mittels phänotypischer Tests auf Virulenzfaktoren, sowie durch den Vergleich von Transkriptom und Proteom isogener *mutS*⁻/*MutS*⁺-Stämme charakterisiert.

C.1 Sequenzanalyse des *mutS*-Gens

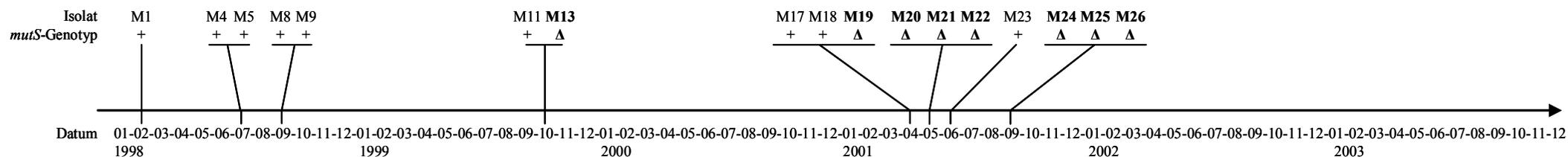
Bei den Patienten M, V und P wurde bereits gezeigt, dass CF-typisch im Verlauf der Erkrankung ein *P. aeruginosa*-Klon persistierte, und dieser im Verlauf der chronischen Infektion eine Patienten-spezifische Mutation im *mutS*-Gen aufwies. Die Sequenzierung des *mutS*-Gens sequentieller *P. aeruginosa*-Isolate, welche nach dem Zufallsprinzip aus Sputen der Patienten M, V und P isoliert wurden, sollte Aufschluss über das Auftreten sowie die Häufigkeit des hypermutierenden Phänotyps (*mutS*) im Vergleich zu *MutS*⁺-Stämmen im Verlauf der Erkrankung geben.

C.1.1 Sequenzierung sequentieller CF-Isolate

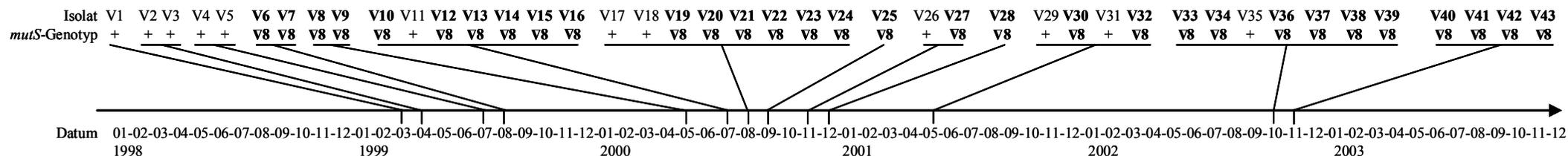
Die sequentiellen Isolate der drei Patienten M (n=26), V (n=42) und P (n=43) aus respiratorischen Untersuchungsmaterialien wurden über einen Zeitraum von 1998-2004 isoliert und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Eine Sequenzanalyse auf die Patientenspezifischen Defekte im *mutS*-Gen [17-bp Deletion (M), 8-bp Insertion (V), 1-bp Insertion (P)] ermöglichte die Unterscheidung zwischen intaktem *mutS*-Gen (*MutS*⁺) und defektem *mutS*-Gen (*mutS*). Die Analyse ergab bei allen drei Patienten im Verlauf der Erkrankung eine deutliche Zunahme der *mutS*-Stämme. Abbildung C-1 zeigt die sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolate der Patienten M, V und P nebst Datum der Isolation, sowie dem *mutS*-Genotyp. Aus der Häufigkeitsverteilung von *mutS* - und *MutS*⁺-Stämmen ließe sich rückschließen, dass *mutS*-Stämme während der chronischen Infektion der CF-Lunge einen Selektionsvorteil haben.

ERGEBNISSE

Patient M*:



Patient V:



Patient P:

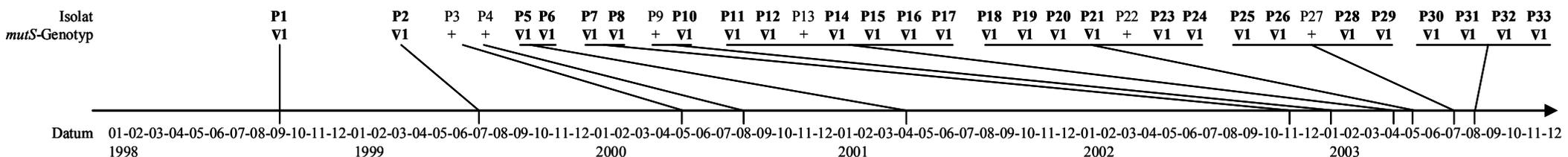


Abbildung C-1: Sequentielle *P. aeruginosa*-Isolate der Patienten M, V und P. *mutS*-Genotyp: Referenzstamm: +; Patient M: 17-bp Deletion: Δ, (Die Sprünge in der Nummerierung bei Patient M sind durch das Auftreten eines zweiten PA-Klons während der Infektion verursacht, der bei der vorliegenden Analyse nicht berücksichtigt wurde); Patient V: 8-bp Insertion: ∇8; Patient P: 1-bp Insertion: ∇1. (*: Sequenzierung der Isolate von Patient M: nicht diese Arbeit)

C.1.2 Häufigkeit von *mutS*- und *MutS*⁺-Stämmen während der chronischen Lungeninfektion

Anhand der Sputen von CF-Patienten (M, V und P) mit lang andauernder schwerer Lungeninfektion (finales Stadium) sollte geklärt werden, wie häufig der *mutS*-Genotyp im Vergleich zum *MutS*⁺-Genotyp auftritt. Jeweils 30 zufällig isolierte *P. aeruginosa*-Kolonien aus den Sputen M (01-9), V (02-11) und P (02-11) wurden hinsichtlich der Patienten-spezifischen *mutS*-Mutation sequenziert. Alle untersuchten Isolate zeigten die Patienten-spezifische *mutS*-Mutation, weshalb anzunehmen ist, dass *mutS*-Stämme einen Großteil der *P. aeruginosa*-Varianten im finalen Stadium der Erkrankung repräsentieren.

C.2 Phänotypische Charakterisierung sequentieller *P. aeruginosa*-Isolate

Anhand phänotypischer Tests sollten Virulenz-assoziierte Faktoren (VF) von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Hierzu wurden sequentielle Isolate der Patienten M, V und P mittels etablierter phänotypischer Tests hinsichtlich der Produktion von VF untersucht, die im Folgenden dargestellt sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass insbesondere die späten *mutS*-Stämme aller drei Patienten im Verlauf der chronischen Erkrankung die wichtigsten VFs verlieren. Darüber hinaus kommt es während dieses Prozesses zu *P. aeruginosa*-Varianten, die vermutlich „Übergangsstadien“ darstellen. Frühe *mutS*-Stämme können manche Virulenzfaktoren noch produzieren, während späte *MutS*⁺-Isolate schon eine deutlich reduzierte Expression dieser Virulenzfaktoren zeigen.

C.2.1 Pyocyanin

Das redox-aktive Phenazinpigment Pyocyanin (PCN) ist toxisch für bakterielle und eukaryontische Zellen, da es in der Lage ist, reaktive Sauerstoffintermediate, wie beispielsweise Superoxidradikale (O₂⁻) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂), zu generieren. Darüber hinaus werden im Hinblick auf die CF-Lungeninfektion weitere Auswirkungen der PCN-Bildung diskutiert, wie beispielsweise die Hemmung der Zilienfunktion, die Hemmung des α₁ Protease-Inhibitors (α₁PI) und die Störung des zellulären Glutathionequilibrium.

Mithilfe des *Pseudomonas* P-Agars wurden alle Isolate auf die Bildung von PCN hin getestet. Bei Patient M erwiesen sich alle MutS⁺-Stämme als PCN-positiv, während, bis auf das *mutS*-Isolat M19, das noch eine leichte Pigmentbildung aufwies, alle *mutS*-Stämme einen kompletten Verlust der PCN-Bildung zeigten. Bei den 12 MutS⁺-Isolaten von Patient V war noch eine eingeschränkte Pyocyaninproduktion zu sehen, während keines der 6 MutS⁺-Isolate von Patient P noch eine Pigmentbildung aufwies. In Tabelle C-1 ist die PCN-Produktion aller Isolate der drei Patienten zusammengefasst, wobei V1 und P4 beispielhaft für alle MutS⁺-Isolate der Patienten V und P dargestellt sind.

C.2.2 Motilität

Die polare Flagelle von *P. aeruginosa* verleiht dem Bakterium nicht nur seine Motilität, die so genannte „swimming motility“, sondern ist auch ein wichtiger Faktor bei der Adhärenz von *P. aeruginosa* an die Wirtszelle und bei der Bildung von Biofilmen.

Auf einem 0,3% LB-Agar wurden alle Isolate auf ihre Fähigkeit zur „swimming motility“ hin getestet. Insgesamt zeigten *mutS*-Stämme eine deutlich geringere Motilität, die semi-quantitativ durch die Messung des Koloniedurchmessers bestimmt wurde (> 25mm, +; 15-25mm, (+); < 15mm, -). Allerdings gibt es mutmaßliche Übergangsstämme, wie beispielsweise das späte MutS⁺-Isolat M11, das eine verminderte Motilität zeigt; und das *mutS*-Isolat M19, das die Motilität nicht vollständig verloren hat. Auch das späte MutS⁺-Isolat M25 hat die Motilität nur teilweise verloren. Die Ergebnisse der Motilitätstests aller Isolate der Patienten M, V und P sind in Tabelle C-1 zusammengefasst. Die 12 MutS⁺-Isolate von Patient V und die 6 MutS⁺-Isolate von Patient P wiesen kaum noch Motilität auf, wobei hier nur V1 und P4 beispielhaft für alle MutS⁺-Isolate gezeigt werden.

C.2.3 Siderophor-Bildung

Die Siderophore (Sid) Pyochelin und Pyoverdin sind zentrale Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*. Bei Eisenmangel, wie es in Körperflüssigkeiten der Fall ist, fungieren sie als spezielle hoch affine Eisenaufnahmesysteme. Darüber hinaus können beide Siderophore zytotoxisch wirken, da Fe³⁺ die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies katalysiert. An der Oberfläche von Bakterien gebundenes Eisen kann in Kombination mit dem sezernierten

redox-aktiven Phenazin PCN über Fenton-Reaktionen Sauerstoff-Radikale freisetzen, welche direkt zellschädigend wirken (Britigan *et al.* 1992; Britigan *et al.* 1999).

Pyochelin besitzt auch für andere Metalle, wie Molybdän (Mo(IV)) und Kobalt (Co(II)), eine hohe Affinität und ist mitverantwortlich für deren Aufnahme in die Zelle.

Der Nachweis der Siderophore erfolgte mittels des Siderophor-Indikatorfarbstoffs Chromazurol S (CAS). Der Test beruht darauf, dass Chromazurol S mit Eisen einen blauen Komplex bildet. Siderophore wie Pyoverdin und Pyochelin können diesem Chromazurol S - Eisenkomplex Eisen entziehen, wodurch ein sichtbarer Farbumschlag nach Orange in Form einer Hofbildung um die Kolonie eintritt ($\geq 5\text{mm}$: +; $< 5\text{mm}$: (+)). Bei allen *mutS*-Stämmen der Patienten M, V und P war ein solcher Farbumschlag praktisch nicht erkennbar. Da sowohl bei den 12 *MutS*⁺-Isolaten von Patient V als auch bei den 6 *MutS*⁺-Isolaten von Patient P eine starke orangefarbene Hofbildung um die Kolonie zu erkennen war, sind die Ergebnisse von V1 und P4 repräsentativ für alle *MutS*⁺-Isolate gezeigt (Tabelle C-1).

Die Produktion von Pyoverdin (Pyo) durch *P. aeruginosa* wurde außerdem auf einem speziellen *Pseudomonas* F-Agar analysiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des CAS-Agars war bei allen *MutS*⁺-Isolaten noch eine Pyo-Bildung zu erkennen, während dies bei keinem der *mutS*-Isolate der Fall war (Tabelle C-1).

C.2.4 Protease-Aktivität

Die gesamt-proteolytische Aktivität aller Proteasen der *P. aeruginosa*-Isolate wurde mithilfe eines 10%igen Magermilchagars untersucht. Proteolyse spiegelte sich auf den trüben Agarplatten als transparente Wachstumszone wider. Diese proteolytische Aktivität wurde durch eine semiquantitative Einstufung der gemessenen Durchmesser dieser Wachstumszonen determiniert ($> 5\text{mm}$, ++; 2-5mm, +; $< 2\text{mm}$, (+) und -, keine proteolytische Zone detektierbar). Während alle *MutS*⁺-Isolate der Patienten M, V und P noch eine eindeutige Proteolysezone aufwiesen, war dies bei keinem der *mutS*-Isolate aller drei Patienten noch der Fall (Tabelle C-1).

ERGEBNISSE

Tabelle C-1: Ergebnisse der physiologischen Tests: Bildung von Pyocyanin (PCN), Motilität (Mot), Protease (PR)- und Siderophor (Sid)-Aktivität und die Bildung von Pyoverdin (Pyo) der sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolate der Patienten M, V und P. Da die Ergebnisse der 12 MutS⁺-Isolate von Patient V und der 6 MutS⁺-Isolate von Patient P gleich ausfielen, sind hier nur die Isolate V1 und P4 beispielhaft aufgeführt. Bei den Patienten V und P wurden außerdem nur die spätesten *mutS*-Isolate dargestellt.

Stamm	<i>mutS</i> -Genotyp	PCN	Mot	PR	Sid	Pyo
M1	+	+	+	+	+	+
M4	+	+	+	+	+	+
M5	+	+	+	+	+	+
M8	+	+	+	+	+	+
M9	+	+	+	+	+	+
M11	+	+	(+)	+	+	+
M13	Δ	-	-	-	-	-
M17	+	+	+	+	+	+
M18	+	+	+	+	+	+
M19	Δ	-	(+)	-	-	-
M20	Δ	-	-	-	-	-
M21	Δ	-	-	-	-	-
M22	Δ	-	-	-	-	-
M23	+	+	(+)	+	+	+
M24	Δ	-	-	-	(+)	-
M25	Δ	-	-	-	(+)	-
M26	Δ	-	-	-	(+)	-
V1	+	(+)	+	(+)	+	+
V37	▼8	-	-	-	-	-
V38	▼8	-	-	-	-	-
V39	▼8	-	-	-	(+)	-
V40	▼8	-	-	-	-	-
V41	▼8	-	-	-	(+)	-
V42	▼8	-	-	-	-	-
V43	▼8	-	-	-	(+)	-
P4	+	-	+	++	+	+
P30	▼1	-	-	-	(+)	(+)
P31	▼1	-	-	(+)	-	-
P32	▼1	-	-	+	-	-
P33	▼1	-	-	-	-	-

C.2.4.1 Elastase-Aktivität

Der Elastin-Kongorot-Test sollte Aufschluss über die elastolytische Aktivität der *P. aeruginosa*-Isolate geben. Elastin-Kongorot ist eine unlösliche, rote Substanz, deren rotes Pigment durch Elastase abgespalten werden kann und dann in Lösung geht. Diese Rotfärbung des Wachstumssubstrats ist proportional zur Elastase-Aktivität und kann photometrisch bei OD₄₉₅ vermessen werden.

Stämme, die eine geringere Rotfärbung, als die Elastase-negative *lasB*-Mutante PAN10 aufwiesen, wurden als negativ in ihrer elastolytischen Aktivität (-) klassifiziert.

Bei dieser Analyse zeigte sich, dass alle Isolate der Patienten M, V und P – unabhängig vom hypermutierenden Phänotyp – bereits als negativ in ihrer elastolytischen Aktivität einzustufen sind. Abbildung C-2 zeigt dies beispielhaft anhand der *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M.

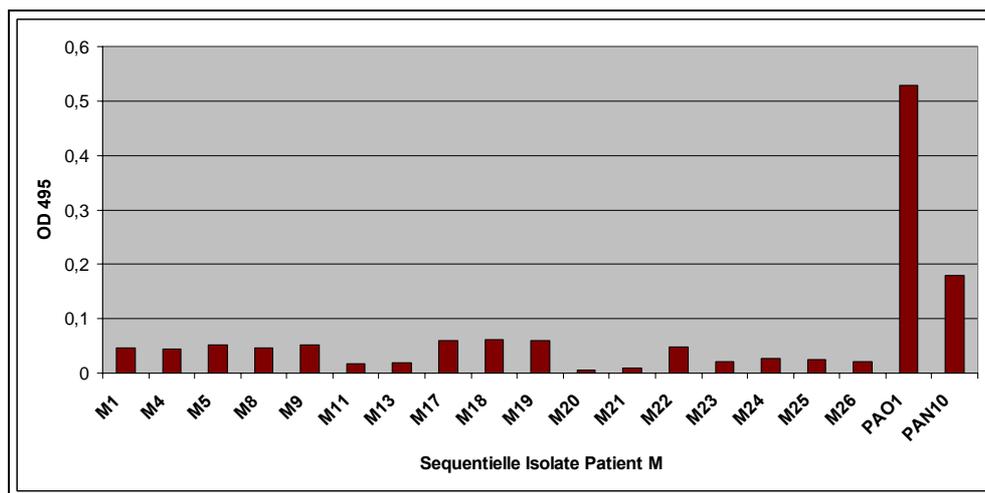


Abbildung C-2: Elastolytische Aktivität: Sequentielle Isolate von Patient M, Elastase-negative Mutante PAN10 und PAO1.

C.2.5 Resistenzentwicklung

Allen *mutS*-Isolaten gemein ist eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika, wie beispielsweise gegen β -Lactamantibiotika. Dies beruht vor allem auf der Expression der bei *P. aeruginosa* chromosomal kodierten β -Lactamase AmpC. Die Regulation der AmpC erfolgt über einen positiven Regulator AmpR und eine als negativer Regulator fungierende Amidase AmpD.

Die Resistenz gegen β -Lactamantibiotika, die AmpC-Expression, sowie die der Resistenz zu Grunde liegende Regulation, wurden analysiert.

C.2.5.1 Cefinasetest

Der Cefinase-Blättchen-Test wird für rasche Screeningtests auf die bakterielle Produktion der AmpC verwendet. Die Cefinaseblättchen sind mit dem chromogenen Cephalosporin Nitrocefin imprägniert. Durch die hydrolytische Spaltung der Amidbindung im Betalactamring durch die β -Lactamase kommt es bei Nitrocefin zu einem raschen Farbumschlag von gelb zu rot. Bis auf das erste *mutS*-Isolat M13 war dieser Farbumschlag bei allen *mutS*-Isolaten von Patient M festzustellen. Auch bei den letzten MutS⁺-Isolaten M11 und M25 war dieser Farbumschlag zu erkennen, wobei die Rotfärbung bei M11 sehr viel deutlicher ausfiel.

C.2.5.2 Minimale Hemmkonzentration

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) auf Agarplatten mit Ceftazidim (CAZ) ergab MHK-Werte von $\geq 256 \mu\text{g}$ Ceftazidim pro ml, wobei für die therapeutische Anwendung eine MHK von $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ als resistent einzustufen ist.

Hervorzuheben sind hierbei die Isolate M11 und M13. M11, eines der zuletzt isolierten MutS⁺-Isolate und M13, das erste *mutS*-Isolat, wurden aus dem gleichen Sputum isoliert. M11 war mit einer MHK von >256 eindeutig resistent gegen Ceftazidim, während M13 mit einer MHK von 3 noch als empfindlich einzustufen ist. Im Widerspruch zum Cefinasetest des MutS⁺-Isolats M9, der negativ ausfiel, ist M9 mit einer MHK von 64 in diesem Test als resistent einzustufen.

C.2.5.3 RT-PCR des β -Lactamase-Gens

Die RT-PCR sollte auf transkriptioneller Ebene Aufschluss über die Expression des *ampC*-Gens geben. Mithilfe des LightCyclers und des in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs CyberGreen konnte die Amplifizierung anhand der zunehmenden Fluoreszenz direkt qualitativ beobachtet werden. Die *ampC*-Expression wurde isolatspezi-

ERGEBNISSE

fisch als relative Expression in Relation zu dem jeweiligen Transkript des „housekeeping“-Gens *rpoD* (RNA-Polymerase Untereinheit D (S^D)) berechnet, um die Unterschiede der isolatspezifischen Expressionslevel zu berücksichtigen. Die *ampC*-Expression sequentieller *P. aeruginosa*-Isolate ist in Abbildung C-4, zusammen mit den MHK-Werten und dem Ergebnis des Cefinasetests, dargestellt.

Darüber hinaus eignete sich das *ampC*-Gen zu der Etablierung der RT-PCR am LightCycler, da das Ergebnis anhand der phänotypischen Resistenzbestimmung überprüft werden konnte. Nach erfolgter Amplifikation wurde außerdem eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Spezifität des PCR Produktes überprüft und von Primer-Dimeren oder anderen Artefakten, unterschieden werden kann (Abbildung C-3).

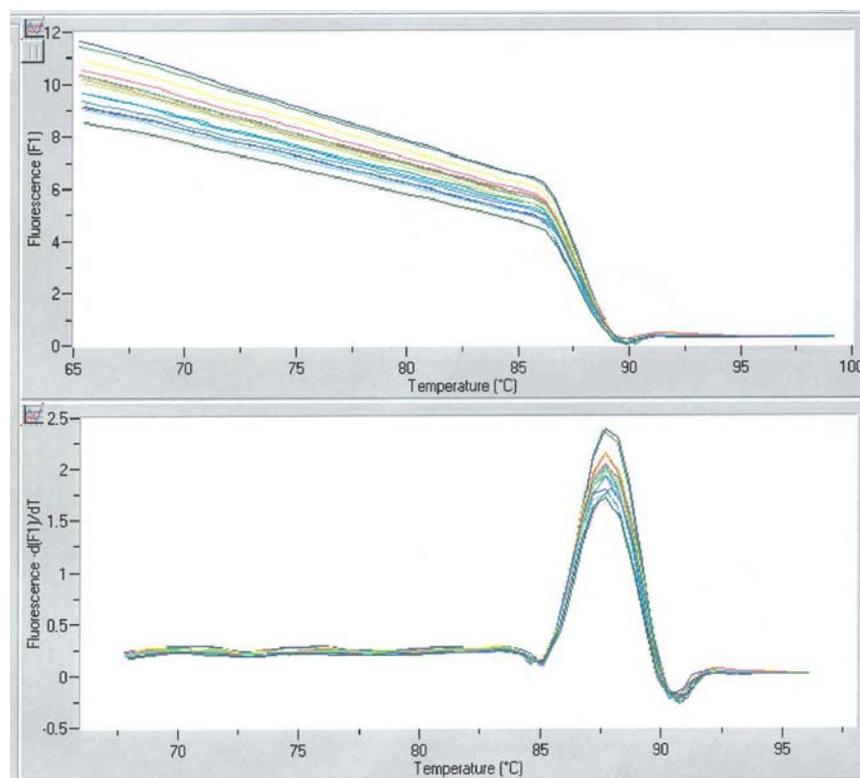


Abbildung C-3: Schmelzkurve. Die Amplifikationsprodukte schmelzen rasch und vollständig bei einer produktspezifischen Temperatur. Somit ergibt sich für ein sauberes PCR Produkt (hier *ampC*) in einer graphischen Darstellung der Schmelzkurve ein einziger schmaler Peak, der dem Schmelzpunkt entspricht. Bei einer unspezifischen Amplifikation treten dagegen mehrere, bzw. unscharfe Peaks auf.

Übereinstimmend mit der phänotypischen Resistenzbestimmung zeigten die *mutS*-Stämme, bis auf den ersten *mutS*-Stamm M13, eine eindeutig höhere Expression der β -Lactamase als die $MutS^+$ -Stämme. Die Expression der AmpC des *mutS*-Stamms M11 war deutlich erhöht, während bei M23 ($MutS^+$) nur eine schwach erhöhte Expression zu erkennen war.

ERGEBNISSE

Übereinstimmend mit dem Ergebnis des Cefinasetests war bei dem MutS⁺-Isolat M9 keine erhöhte Expression der β -Lactamase zu erkennen, so dass hierzu nur die MHK von 64 im Widerspruch steht.

Abbildung C-4 zeigt die RT-PCR der sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolate, zusammen mit den Ergebnissen des Cefinasetests und der MHK.

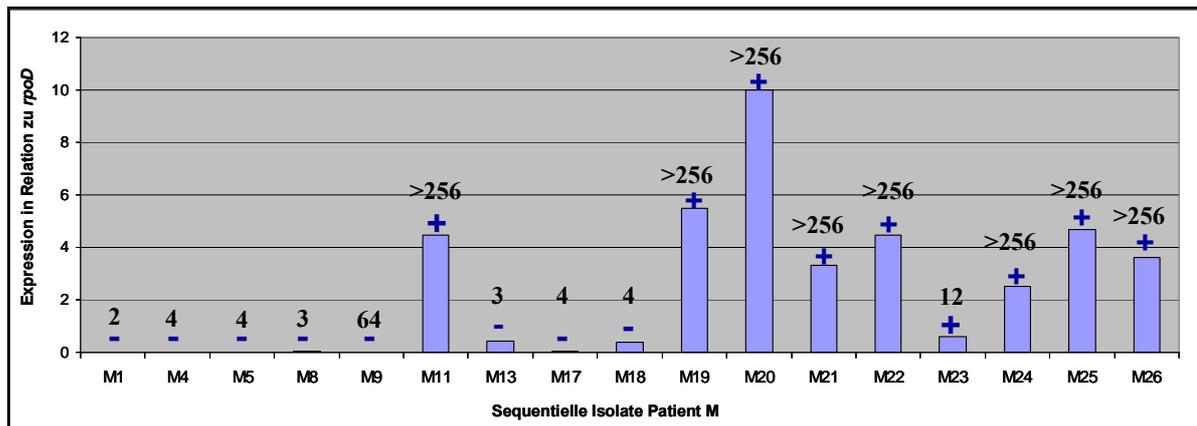


Abbildung C-4: RT-PCR des *ampC*-Gens sequentieller *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M. +/-: Cefinase positiv/negativ; CAZ-MHK ($\mu\text{g/ml}$)

C.2.5.4 Sequenzanalyse

Anschließend sollte die Sequenzierung des *ampC*-Gens, sowie der Gene der Regulatoren (*ampR*, *ampD*) Aufschluss über die molekulare Grundlage der Überexpression des *ampC*-Gens geben.

Die Sequenzierung des *ampC*-Gens, dessen Promotorbereichs, sowie des Gens des positiven Regulators AmpR, ergaben keine Mutationen.

Bei der Analyse des Gens der als Negativregulator fungierenden Amidase AmpD wurde in den Isolaten M11, M19, M20 und M25 eine zu einem Stoppcodon führende Mutation an Position 130 des *ampD*-ORFs gefunden, die in den MutS⁺-Stämmen nicht zu finden war (Abbildung C-5). Die Überexpression des *ampC*-Gens resultiert hier also aus der nicht mehr vorhandenen Repression durch den negativen Regulator AmpD (Derepression).

Die Isolate M21 und M22, deren *ampC*-Expression ebenfalls stark erhöht war, wiesen an der gleichen Stelle, statt des Stoppcodons, eine zu einem Aminosäureaustausch führende Mutation auf. Der Austausch des polaren Glutamins (CAG) in das nichtpolare, also hydrophobe Tryptophan (TTG), könnte Auswirkungen auf die Produktion oder die Funktionalität der Amidase AmpD haben. Die starke Expression der β -Lactamase in den Stämmen M24 und M26 kann nicht mit einer Mutation in *ampC*, *ampR* oder *ampD* erklärt werden.

ERGEBNISSE

M25: <i>ampD</i>	TGCTGGTCATCCACAATATCAGCCTGCCGCCGGGATAGTT	134
	L L V I H N I S L P P G * F	
PAO1: <i>ampD</i>	TGCTGGTTATCCACAATATCAGCCTGCCGCCGGGACAGTT	134
	L L V I H N I S L P P G Q F	

Abbildung C-5: Sequenzanalyse des *ampD*-Gens.

Die Mutationen befinden sich an AA-Position 130 des *ampD*-Gens.

C.3 Vergleich der Proteome sequentieller *P. aeruginosa*-Isolate

Im Folgenden wurde mit der vergleichenden 2-D-Gelelektrophorese ein globaler Ansatz gewählt, um möglichst viele Veränderungen von *P. aeruginosa* während der Adaptation an die CF-Lunge zu identifizieren. Dabei wird davon ausgegangen, dass die relativen Veränderungen im Proteom unter *in vitro* Bedingungen auch unter *in vivo* Bedingungen zutreffen.

Es wurden die Proteinmuster von sequentiellen *P. aeruginosa*-CF-Isolaten auf 2-DE Gelen verglichen. Die quantitative und qualitative Auswertung erfolgte EDV-unterstützt (PDQuest 7.2; BIORAD). Die als qualitativ oder quantitativ ($\leq 0,5$; ≥ 2) differentiell analysierten Spots wurden manuell ausgestochen und per MALDI-TOF-MS identifiziert.

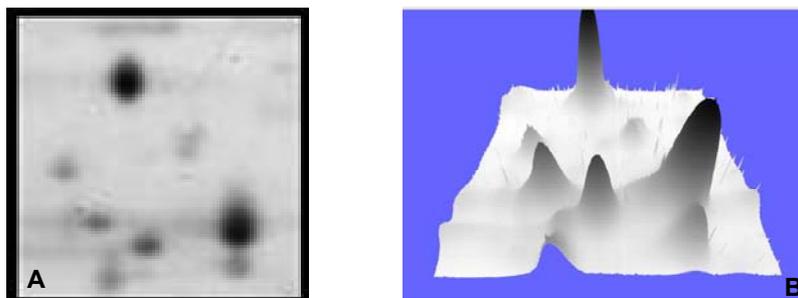


Abbildung C-6: Ausschnitt eines 2-DE Gels. A: normale Ansicht des Gelausschnitts. B: 3-DE Ansicht des Gelausschnitts. Mithilfe der PDQuest Software konnten tatsächliche Proteinspots von Verunreinigungen der Gelmatrix unterschieden werden.

Die massenspektroskopische Analyse von Peptidgemischen mit MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry) ergibt Spektren, die Fingerabdruckqualität für die jeweiligen Proteine besitzen (Abbildung C-7). Diese eignen sich dann für den Datenbankabgleich mit bekannten Protein-Spektren von Organismen, deren Gesamtgenom bereits sequenziert und annotiert wurde. Die massenspektroskopi-

ERGEBNISSE

schen Analysen wurden vom Zentrallabor für Proteinanalytik (Dr. Axel Imhof) des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU München durchgeführt.

Aus methodischen Gründen kann keine Aussage über die Gesamtzahl der Proteinspots auf einem Gel und die gefundenen Unterschiede getroffen werden. Die bei den *mutS*-Stämmen zahlreich vorkommenden stillen Mutationen führen häufiger zu Aminosäureaustauschen und diese wiederum zu Verschiebungen im pI. Erstaunlicherweise lassen sich Verschiebungen im pI sehr gut mit dem *mutS*-Phänotyp korrelieren. Die Superoxiddismutase SodB beispielsweise zeigte in den *mutS*-Stämmen M20, M25 und M26 eine Verschiebung ins Saure. Diese war weder beim Referenzstamm PAO1 noch bei den *MutS*⁺-Stämmen M1, M9 und M23 zu erkennen, allerdings auch nicht im ersten *mutS*-Stamm M13. Eine Sequenzanalyse des *sodB*-Gens zeigte, dass die Verschiebung im pI auf einen Aminosäureaustausch vom neutralen Glycin zum sauren Aspartat zurückzuführen ist. Somit kann es bei der EDV-gestützten Auswertung zu einer unzutreffend hohen Anzahl an Unterschieden kommen. Die Identität zweier an unterschiedlichen Positionen im Gel liegender Spots konnte oft erst nach Identifizierung über MALDI-MS verifiziert werden.

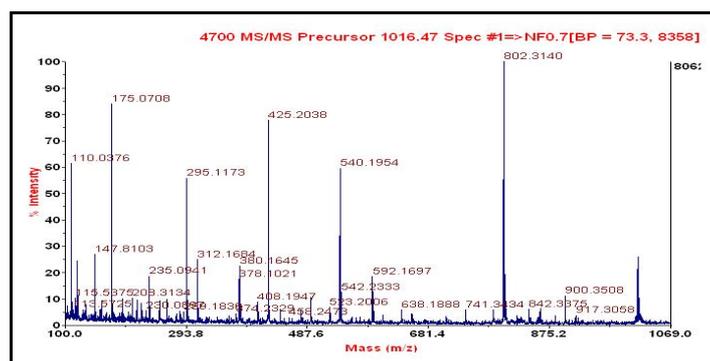


Abbildung C-7: Spezifisches Spektrum der Peptidmassen eines Proteins nach tryptischem Verdau.
Anhand der am häufigsten vorkommenden Peptide und deren Masse kann das Protein identifiziert werden.

C.3.1 Vergleich sequentieller *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M

Bei Patient M wurden die Proteinmuster des Gesamtzelllysats (GZL), der Kultur-Überstandsproteine (KÜP) und der membranassoziierten Proteine (MAP) von 7 sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolaten, sowie des Referenzstamms PAO1 analysiert. Um eine statistische Reproduzierbarkeit zu garantieren, wurden für jeden Stamm und jede Fraktion, sog. Mastergele aus drei Einzelgelen erstellt, die aus jeweils drei unabhängigen Versuchsansätzen stammten.

ERGEBNISSE

Die Anzucht der Stämme erfolgte bei 37°C und 200 rpm in LB-Medium in Erlenmeyerkolben, die mit Alufolie verschlossen wurden. Das Medium wurde mit den Stämmen in einer Konzentration von 1:100 beimpft. Eine Wachstumskurve (Abbildung C-8) bei gleichzeitiger Sauerstoffmessung (Fibox, PreSens GmbH; Abbildung C-9) sollte Aufschluss über die im Medium während der Anzucht vorliegenden Bedingungen geben. Im anfänglich mit 15 % Sauerstoff aerob vorliegenden Medium zeigte sich eine rasche O₂-Abnahme, so dass schon bald mikroaerobe Zustände herrschten. Diese mikroaeroben Wachstumsbedingungen könnten dem Wachstumsmilieu in der CF-Lunge entsprechen. Zum Zeitpunkt der Zellernte bei einer OD₆₀₀ = 4,0 wurden im Medium noch 0-0,5 % Sauerstoff gemessen.

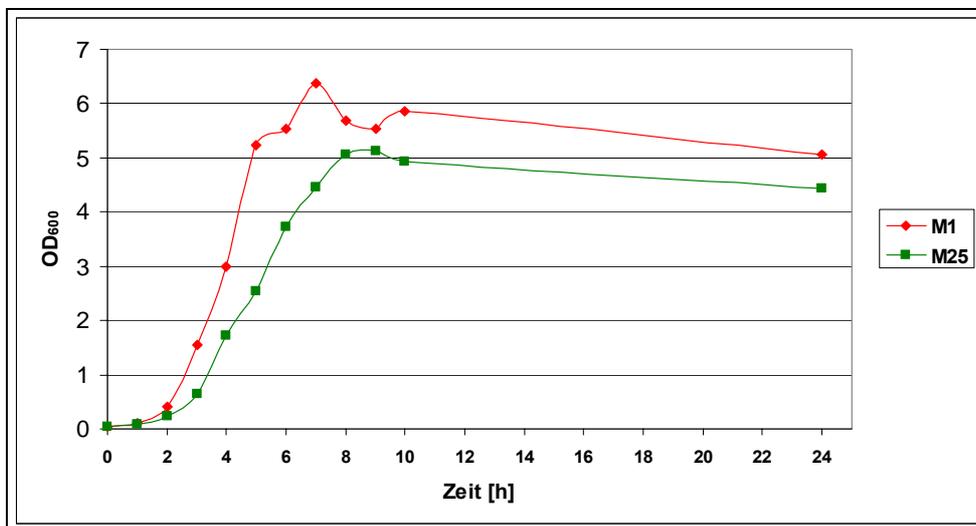


Abbildung C-8 Wachstumskurve der *P. aeruginosa* CF-Isolate M1 (*MutS*⁺) und M25 (*mutS*) bei mikroaerobem Wachstum in LB-Medium.

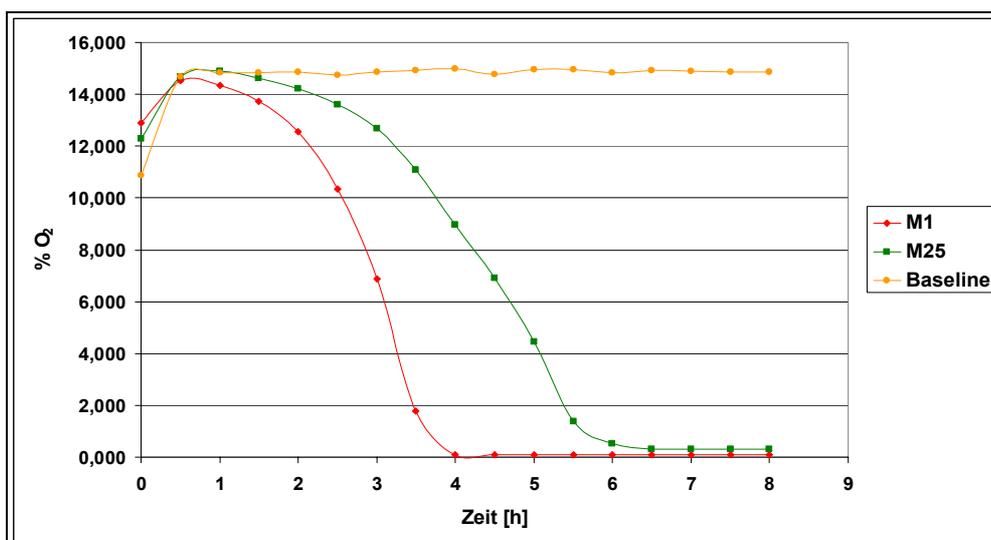


Abbildung C-9: Messung des O₂-Gehalts während der mikroaeroben Anzucht der *P. aeruginosa* CF-Isolate M1 (*MutS*⁺) und M25 (*mutS*) in LB-Medium.

C.3.1.1 Gesamtzellysat

Für die Extraktion des Gesamtzellysats wurden die Stämme in 300ml LB-Medium in 1000ml Erlenmeyerkolben angezogen. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel B.6.1.1 beschrieben.

Auf die Gele wurde jeweils 400 µg Protein aufgetragen. Die Färbung erfolgte in kolloidalem Coomassie, nachdem sich die Silberfärbung als unbrauchbar erwies. Zum einen ist die Silberfärbung nicht kompatibel mit dem nachfolgenden enzymatischen Verdau vor der Identifizierung über Maldi-MS. Zum anderen zeigte ein Vergleich der Färbemethoden ähnliche Sensitivität. Darüber hinaus zeigt Silber unterschiedliche Affinitäten zu Proteinen, ist also nicht in der Lage, die tatsächliche Quantität aller Proteine im Gel widerzuspiegeln.

C.3.1.1.1 Gelauswertung des Gesamtzellysats

Von Patient M wurden die GZLs der sieben Isolate M1 (frühester verfügbarer MutS⁺-Stamm), M9 (früher MutS⁺-Stamm), M13 (erster *mutS*-Stamm), M20 (*mutS*-Stamm), M 23 (später MutS⁺-Stamm), M25 (später *mutS*-Stamm) und M26 (später *mutS*-Stamm), sowie des Referenzstamms PAO1 verglichen. Im Folgenden wird der *mutS*-Stamm M25 als Letztisolat von Patient M verwendet, da die *mutS*-Stämme M25 und M26 zeitgleich aus demselben Sputum (0109) isoliert wurden und M25 sowohl im 2-DE-Muster als auch in den phänotypischen Tests größere Unterschiede zum Erstisolat M1 (MutS⁺) aufweist. Bei der Auswertung der Gele lag der Hauptfokus auf prominenten Unterschieden zwischen M1 (MutS⁺) und M25 (*mutS*).

Die Auswertung der Gele erfolgte mithilfe der PDQuest Software (BIORAD). Dabei diente das frühe MutS⁺-Isolat M1 als Basis für die Berechnung der Quotienten unterschiedlich exprimierter Proteine (P_n^{Xi} / P_n^{M1}). Ausgehend von dem Mittelwert der densitometrisch (GS 800, BIORAD) gemessenen Quantitäten korrespondierender Spots der Geltripletts von Isolat M1 wurde der Quotient mit den jeweiligen Quantitätsmittelwerten der Vergleichsisolate (ebenfalls aus 3 Gelen errechnet) gebildet. Neben einer möglichst genauen photometrischen Vermessung der aufzutragenden Proteinmengen bietet die Software durch Normalisierung der Gesamtquantität im jeweiligen Gel die Möglichkeit, eventuell vorhandene Konzentrationsunterschiede auszugleichen.

Im Folgenden werden exemplarische 2-DE-Übersichtsgele (Abbildung C-10 und Abbildung C-11) und anschließend die durch rote Rechtecke gekennzeichneten korrespondierenden Ausschnitte dargestellt (Abbildung C-12 bis Abbildung C-15). Die im GZL als

ERGEBNISSE

differentiell analysierten Spots, bei denen ein manuelles Ausstechen möglich war und die Maldi-TOF-MS eine Identifizierung lieferte, sind farblich gekennzeichnet und nummeriert. In Tabelle C-5 sind die identifizierten Proteine ihrer Funktion nach geordnet.

In den *mutS*-Stämmen und teilweise auch im MutS⁺-Stamm M9 fallen vor allem ribosomale Proteine, sowie Proteine der translationalen und posttranslationalen Modifikation durch ihre relativ hohen Konzentrationen auf. Darüber hinaus zeigten vor allem die früheren *mutS*-Stämme M13 und M20 eine sehr starke Überproduktion der Elongationsfaktoren EF-Ts (CF 55) und EF-Tu (CF 56).

Die erhöhte Produktion von Azurin, CcpR und OprF, welche alle mit der Denitrifikation in Verbindung gebracht werden, könnte auf eine Anpassung des späten *mutS*-Stämme an die mikroaeroben bis anaeroben Umstände in der CF-Lunge schließen. Eine starke Überproduktion der Proteine des *arcABCD*-Operons, das dem anaerob regulierten Abbau von Arginin dient, fiel vor allem bei den früheren *mutS*-Stämmen M13 und M20 auf.

Die relativ erhöhte Produktion von Enzymen des TCA-Zyklus, des Fettsäuremetabolismus, sowie des Glyoxylatshunts weisen auf verstärkten Abbau von Fettsäuren und Acetat hin.

Dagegen wurde in den späten *mutS*-Stämmen eine relativ geringe Menge der Enzyme für den Butyratabbau (AtoB, AtoD); des Porins OprD (unspezifische Aufnahme von Imipenem); der Katalase A (KatA) und des Bakterioferritins A (BfrA) nachgewiesen.

Die Flagellenuntereinheit FliC war im GZL des Referenzstamms PAO1 nur schwach nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die Abtrennung der Flagelle bereits in den vorbereitenden Waschschritten für die 2-DE erfolgte.

Eine genauere Besprechung der Daten erfolgt in Kapitel C.6, zusammen mit den Daten des Transkriptoms.

ERGEBNISSE

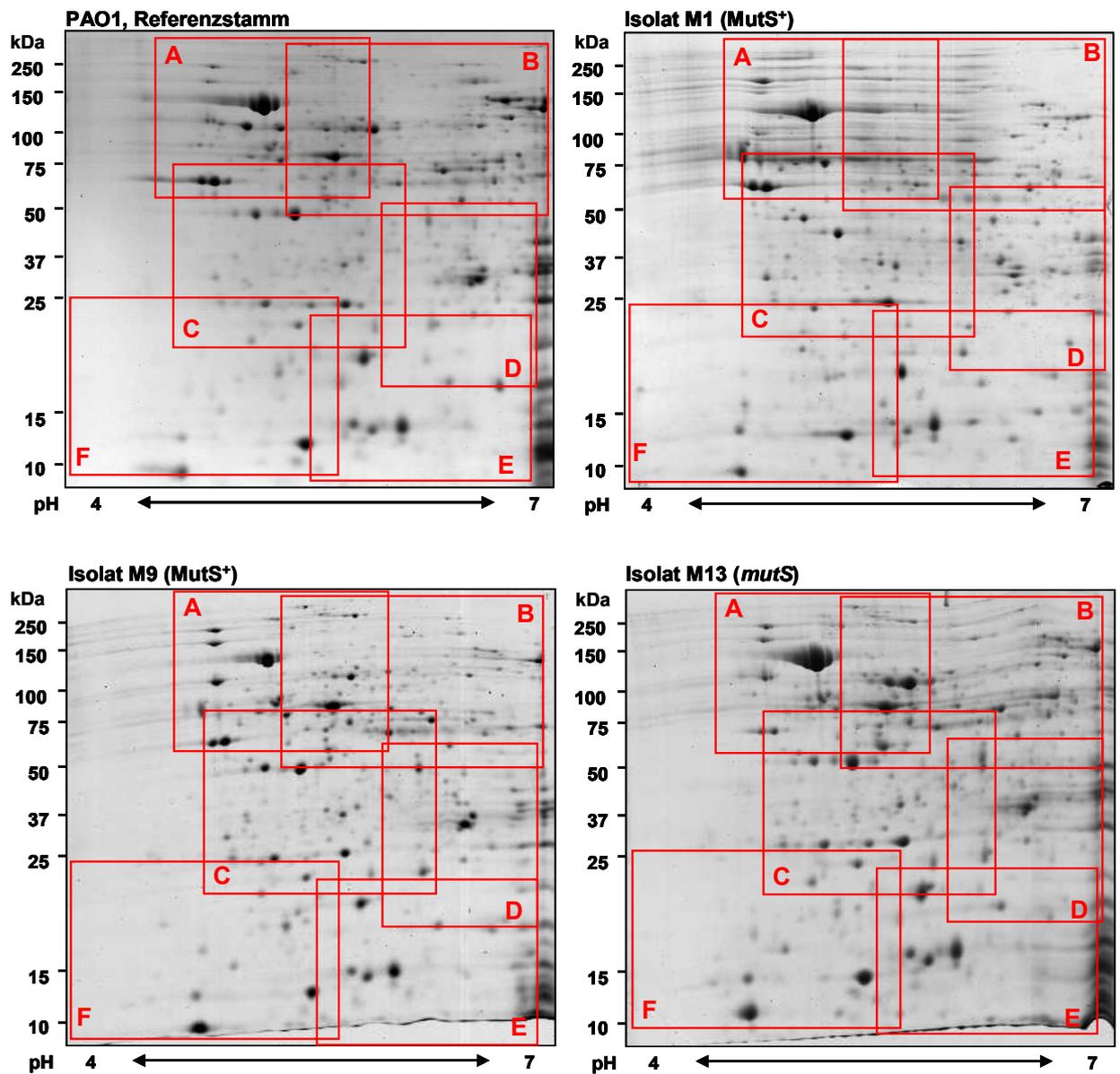


Abbildung C-10: A: Vergleich der Gesamtzelllysate (GZL) im pH-Bereich 4-7, (12,5 % PAA)
Auf den Übersichtsgelen von PAO1, Isolat M1, M9, M13, M20, M23, M25 und M26 sind sechs Bereiche A-F rot gekennzeichnet. Die korrespondierenden Bereiche sind in Abbildung C-12 bis Abbildung C-17 vergrößert dargestellt.

ERGEBNISSE

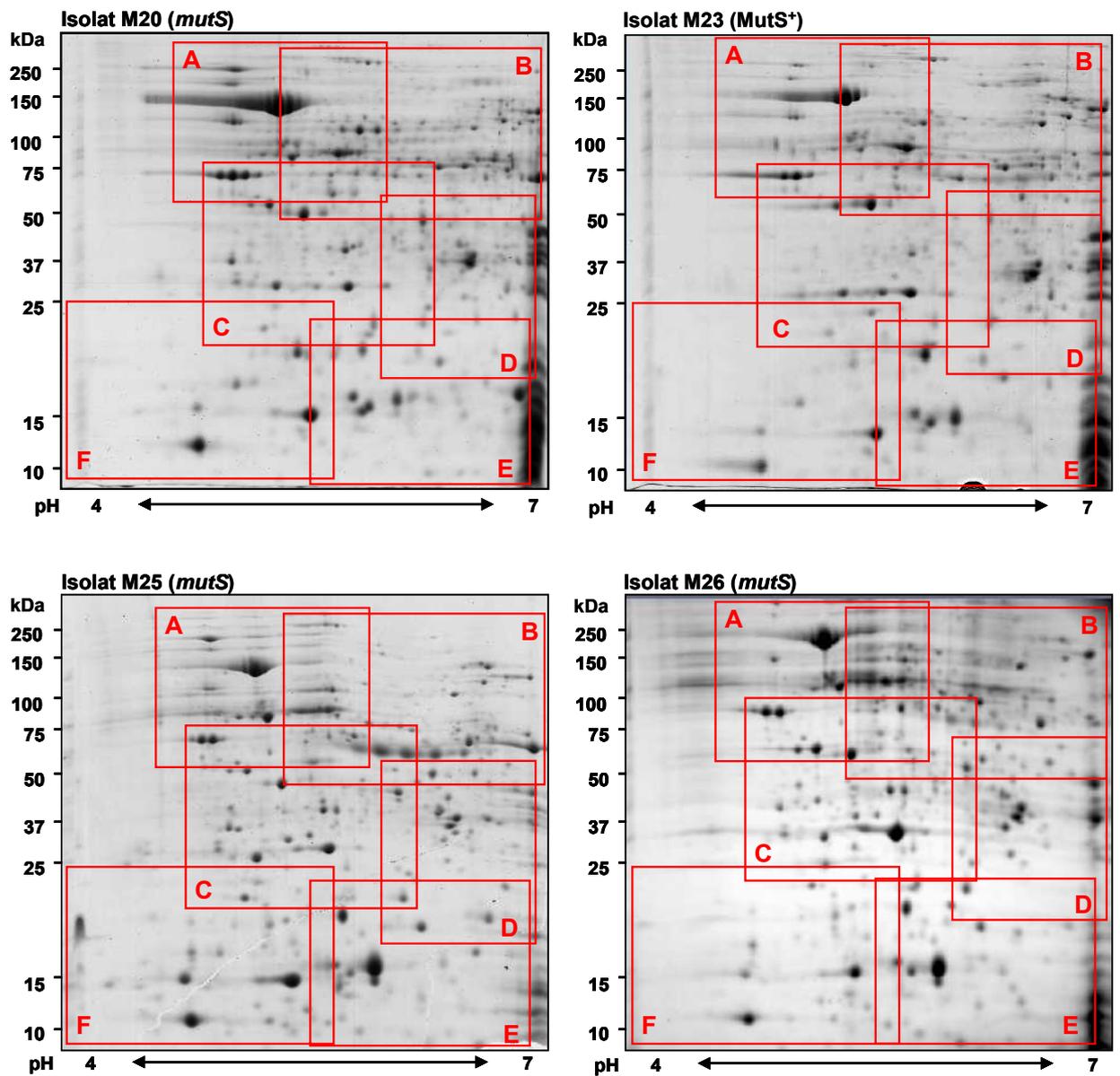


Abbildung C-11: B: Vergleich der Gesamtzelllysate im pH-Bereich 4-7, (12,5 % PAA)
Auf den Übersichtsgelen von PAO1, Isolat M1, M9, M13, M20, M23, M25 und M26 sind sechs Bereiche A-F rot gekennzeichnet. Die korrespondierenden Bereiche sind in Abbildung C-12 bis Abbildung C-17 vergrößert dargestellt.

ERGEBNISSE

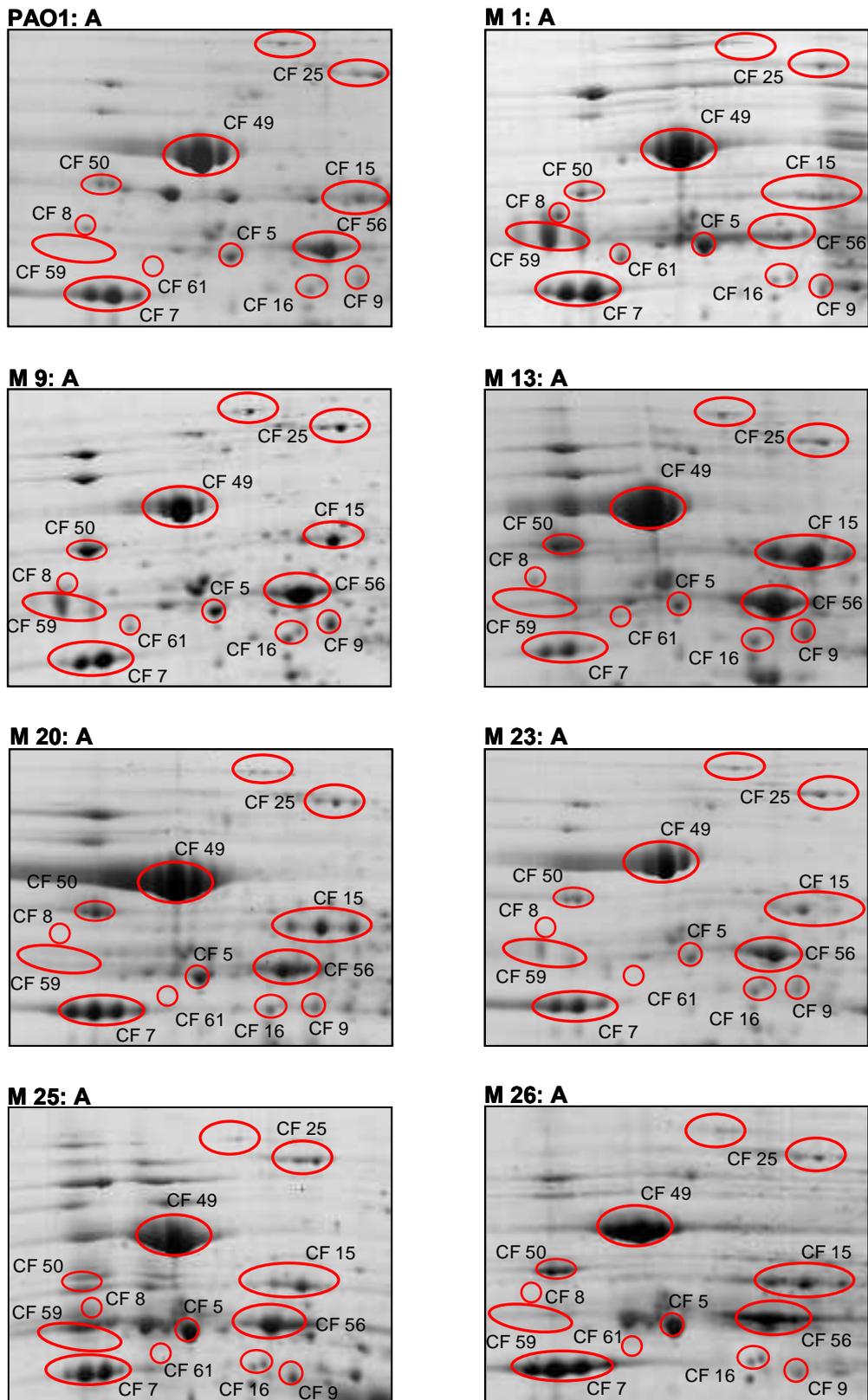
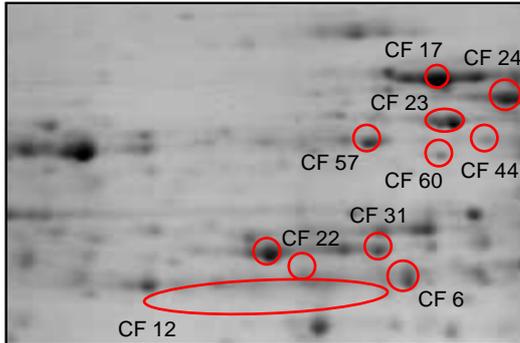


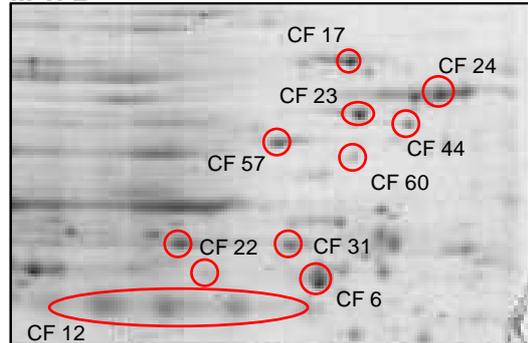
Abbildung C-12: Ausschnitt A der Übersichtsgel des GZL (Abbildung C-10 und Abbildung C-11) von PAO 1 und der 7 *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M (M1, M9, M13, M20, M23, M25 und M26)

ERGEBNISSE

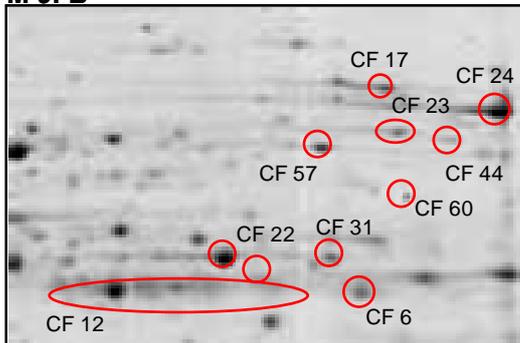
PAO1: B



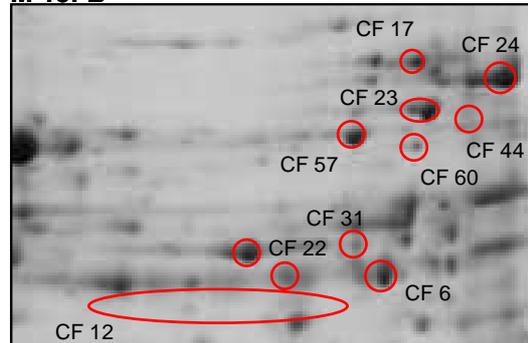
M 1: B



M 9: B



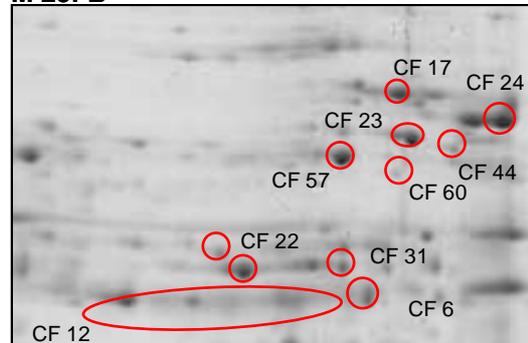
M 13: B



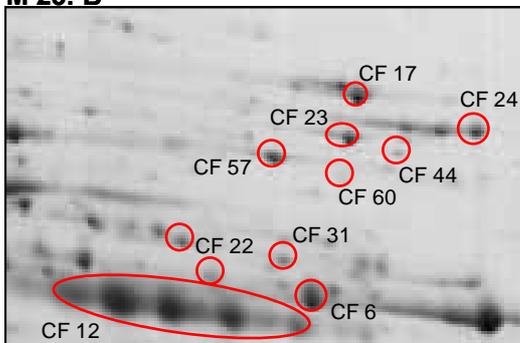
M 20: B



M 23: B



M 25: B



M 26: B

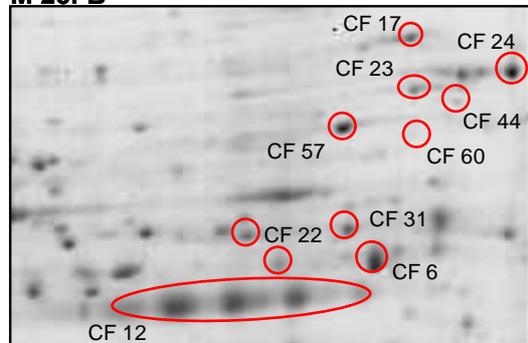


Abbildung C-13: Ausschnitt B der Übersichtsgel des GZL (Abbildung C-10 und Abbildung C-11) von PAO 1 und der 7 *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M (M1, M9, M13, M20, M23, M25 und M26)

ERGEBNISSE

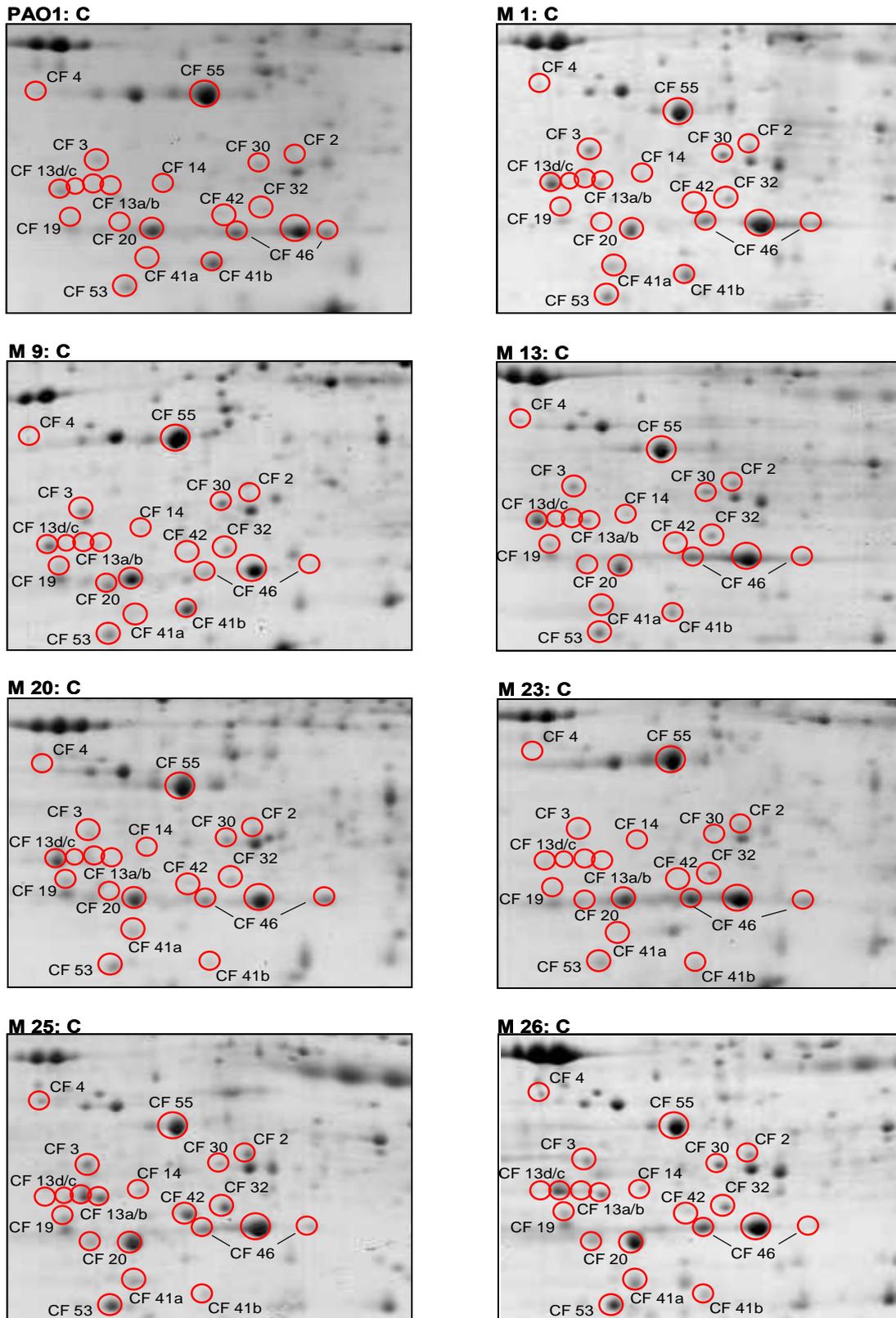


Abbildung C-14: Ausschnitt C der Übersichtsgle des GZL (Abbildung C-10 und Abbildung C-11) von PAO 1 und der 7 *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M (M1, M9, M13, M20, M23, M25 und M26)

ERGEBNISSE

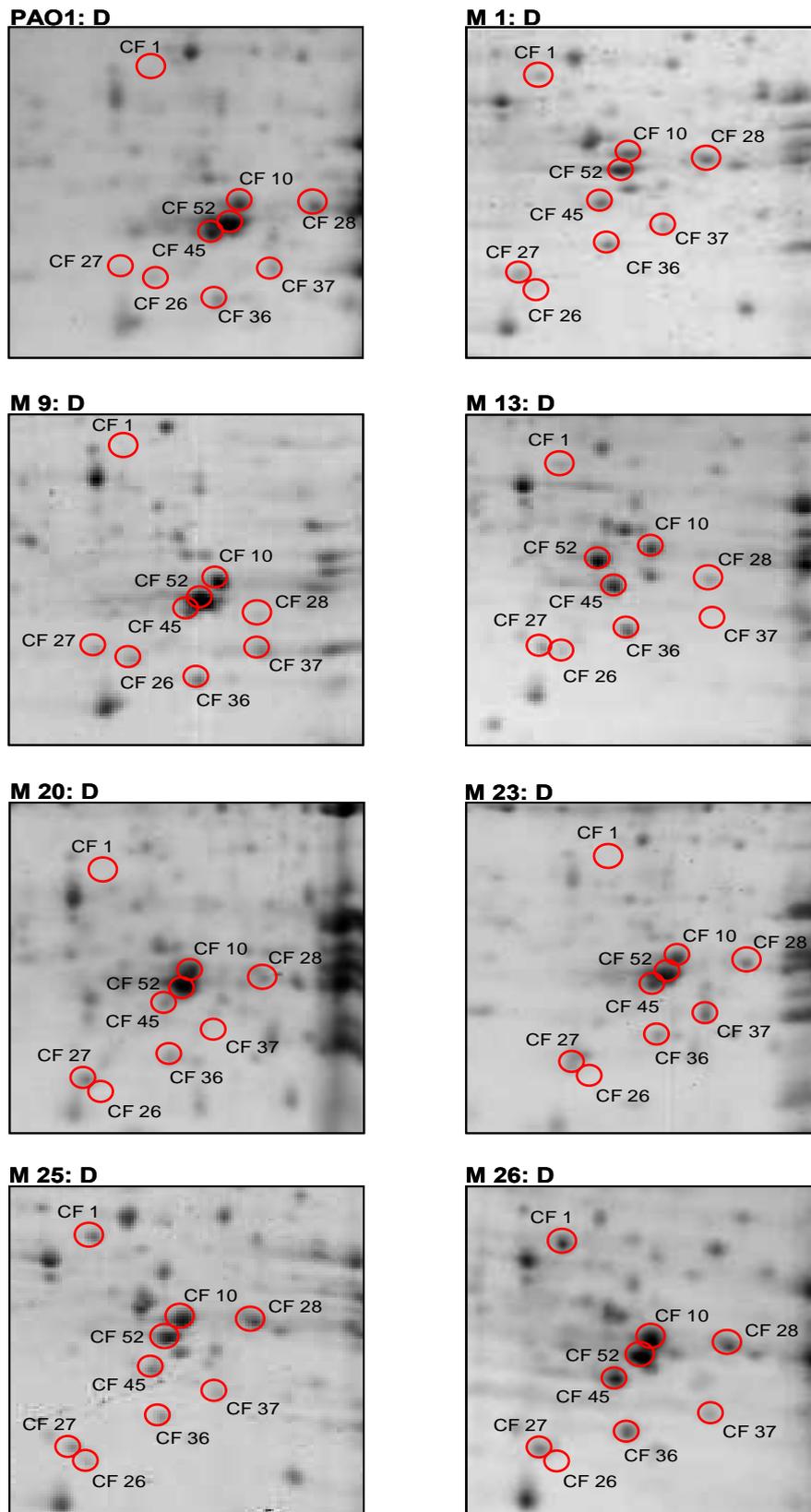


Abbildung C-15: Ausschnitt D der Übersichtsgle des GZL (Abbildung C-10 und Abbildung C-11) von PAO 1 und der 7 *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M (M1, M9, M13, M20, M23, M25 und M26)

ERGEBNISSE

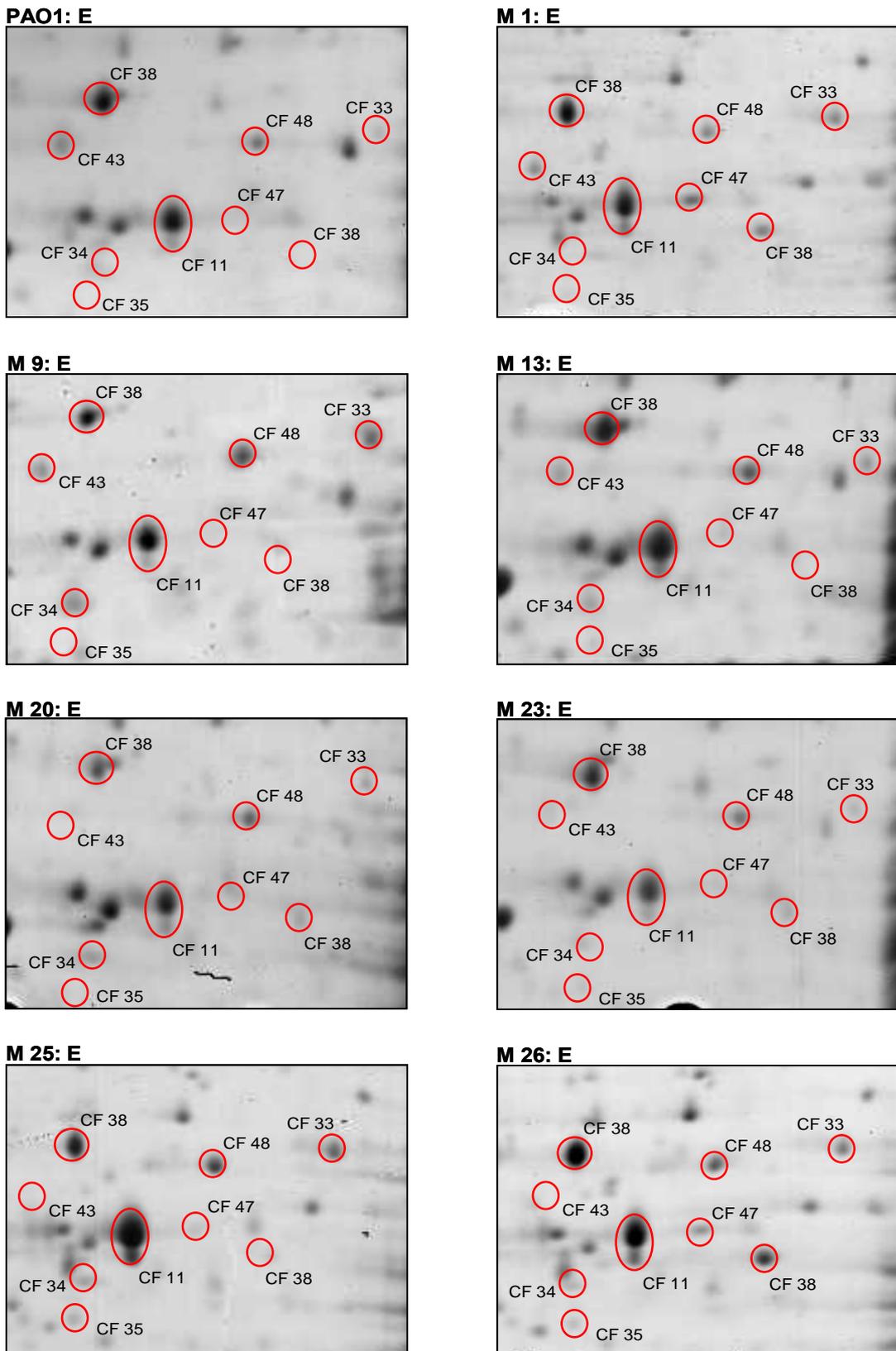
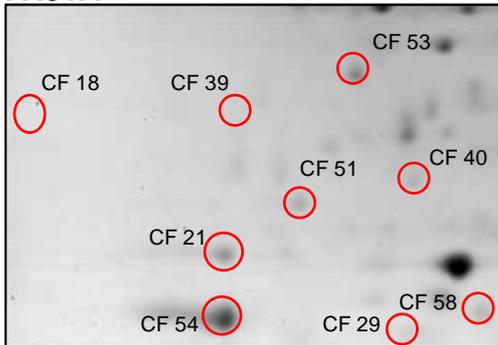


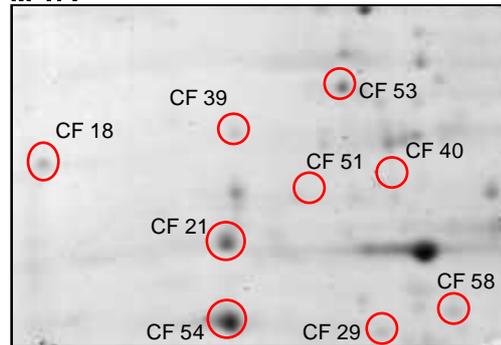
Abbildung C-16: Ausschnitt E der Übersichtsgele des GZL (Abbildung C-10 und Abbildung C-11) von PAO 1 und der 7 *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M (M1, M9, M13, M20, M23, M25 und M26)

ERGEBNISSE

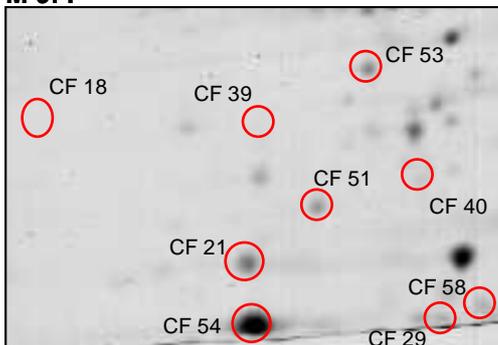
PAO1: F



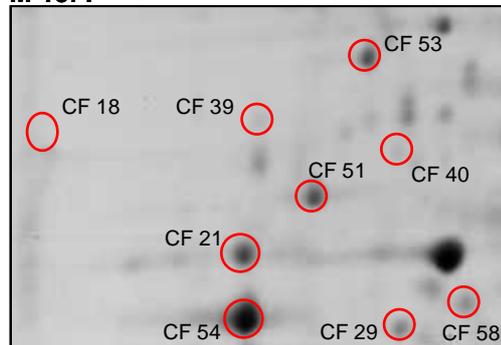
M 1: F



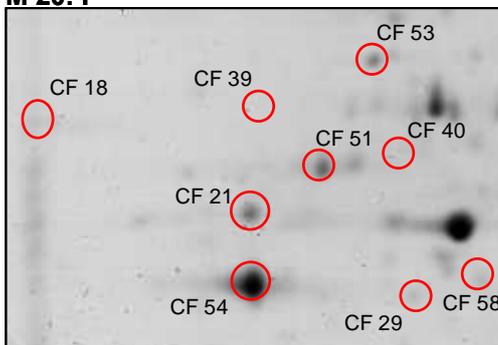
M 9: F



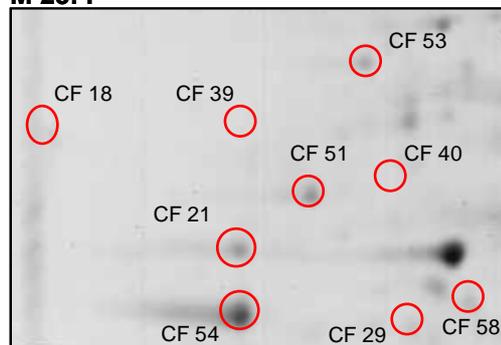
M 13: F



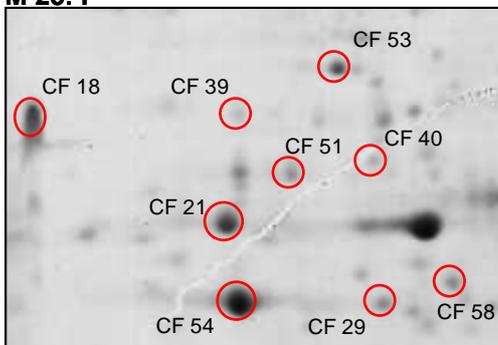
M 20: F



M 23: F



M 25: F



M 26: F

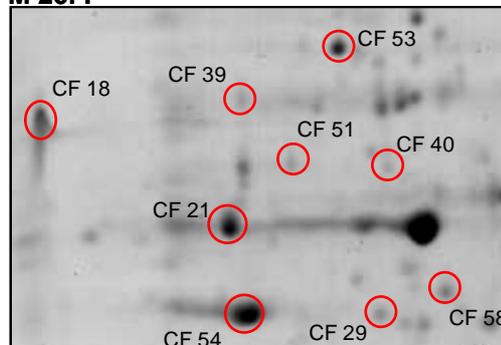


Abbildung C-17: Ausschnitt F der Übersichtsgle des GZL (Abbildung C-10 und Abbildung C-11) von PAO 1 und der 7 *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M (M1, M9, M13, M20, M23, M25 und M26)

ERGEBNISSE

Tabelle C-2: Identifizierte Proteine aus 2DE-Gelen von Gesamtzelllysaten der sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M und dem Referenzstamm PAO1.

Die angefärbten „Proteinspots“ wurden densitometrisch quantifiziert und durch Quotientenbildung auf das Erstisolat M1 bezogen (P_n^{Xi}/P_n^{M1});

P: Protein, n: laufende Nummer (CF-Nr), M1: Bezugsstamm, Xi: Patientenisolate (Mi) bzw. Referenzstamm PAO1, i: Isolatindex.

Schwarz: keine differentielle Produktion ($0,5 < x < 2$); Rot: stärker produziert ($x \geq 2$); Grün: schwächer produziert ($x \leq 0,5$).

Vorhergesagte Funktionen sind durch Anführungszeichen („“) gekennzeichnet.

*: Mehrere Proteinspots durch Isoformen mit leichter Veränderung im pI.

Proteine mit Transportfunktion										
CF-Nr.	P_n^{Xi}/P_n^{M1}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
1	0	0	0	0	0	1,07	2,06	Bindungsproteinvorläufer eines ABC-Ribosetransporters; <i>rbsACRK</i> -Operon	<i>rbsB</i>	1946
2	0	0,19	0,32	0,39	0,28	2,08	3,38	Arginin/Ornithin-Bindungsprotein AotJ	<i>aotJ</i>	0888
3	0,52	0,56	0,36	0,17	0,29	2,92	3,15	„HisJ-ABC-Typ Aminosäuretransport-/Signaltransduktions-System; periplasmatische Komponente; periplasmatisches Lysin, Arginin, Ornithinbindeprotein“	-	5153
4	0,01	0,62	0,29	0,52	0	1,15	2,4	„HisJ-ABC-Typ Aminosäuretransport-/Signaltransduktions-System; Periplasmatische Komponente; periplasmatisches Lysin-, Arginin-, Ornithinbindeprotein“	-	1260
5	0,30	1,42	0,12	0,65	0,16	2,58	2,17	Periplasmatisches ABC-Transportsystem verzweigter Aminosäuren	<i>braC</i>	1074
6	1,5	0,73	1,92	1,03	0,41	3,05	4,97	Polyamin-Transportprotein (<i>spuABCDEFGH</i> -Operon); ABC Transportsystem; Spermidin und Putrescinverwendung	<i>spuD</i>	0300
7*	0,5	0,24	0,03	0,34	0,28	0,72	0,6	Porin OprF, Transport kleiner Moleküle; Nitratpermease	<i>oprF</i>	1777
	4,87	0,36	0,84	3,09	3,31	2,62	3,46			
	2,31	0,58	1,55	4,68	7,2	18,9	3,34			
	1	0,36	0,04	0,49	0,65	0,95	0,44			
8	0	0,42	0,09	0	0	0	0	Porin OprD der äußeren Membran; Aufnahme basischer Aminosäuren, basischer Peptide und Imipenem	<i>oprD</i>	0958

Zellteilung										
CF-Nr.	P_n^{Xi}/P_n^{M1}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
61	0	0,35	0,06	0,12	0,18	0,52	0,24	Zellteilungsprotein FtsZ, Zellteilungs-GTPase	<i>ftsZ</i>	4407

ERGEBNISSE

Metabolismus										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{MI}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
9	0,91	3,36	1,61	1,43	1,23	1,82	2,28	Fruktose-1,6-bisphosphataldolase; (anaerobe) Glykolyse; Glukoneogenese, KPDG-Weg; Kohlenstoff-Fixierung	<i>fda</i>	0555
10	1,25	1,87	1,74	3,07	2,13	0,99	2,02	Adenylatkinase; Purinmetabolismus	<i>adk</i>	3686
11*	0,89	1,24	1,14	0,56	0,68	1,28	2,86	Azurinvorläufer, Redoxreaktionen, Energiemetabolismus	<i>azu</i>	4922
	0,41	0,40	0,04	0,3	0,36	3,03	2,69			
12*	0,05	-	0	0,03	0	1,64	3,77	Cytochrom c551-Peroxidasevorläufer, Redoxreaktionen, Energiemetabolismus	<i>ccpR</i>	4587
	0,07	0,51	0,06	0,02	0,08	1,56	3,95			
	0,11	0,55	0,16	0,03	0,2	1,40	3,85			
	0,15	0,3	0	0,05	0	1,23	3,23			
	0	-	0	0,31	0	0,85	2,52			
13*	0	0,36	0,11	0	0	1,39	2,6	3-Isopropylmalat-Dehydratase, kleine Untereinheit; Aminosäurebiosynthese und -metabolismus; Leucinbiosynthese	<i>leuD</i>	3120
	0,01	0,48	0	0	0	9,14	7,6			
	0,41	-	0,18	0,34	0,25	0,69	111			
	0,12	0,43	0,02	0,28	0,04	0	0			
42	0,01	0,46	0,05	0,51	0	0,38	9,89	Aerober Abbau von L-Tryptophan zu Anthranilat	<i>kynB</i>	2081
14	0,01	0,58	0,18	0,12	0,01	1,65	2,27	Imidazol-Glycerolphosphat-Synthase; Cyclase Untereinheit; Histidinbiosynthese	<i>hisF1</i>	5140
15*	0,31	7,49	4,38	0,59	0,16	0,9	1,33	Arginindeiminase; <i>arcCBAD</i> -Operon; Arginin- und Prolinmetabolismus; Arginindeiminase Abbauweg (anaerober Abbau von Arginin unter ATP-Produktion)	<i>arcA</i>	5171
	9,09	0,67	52,6	14,8	4,1	2,84	4,44			
16*	59,3	3,03	682,	373	145	255	274	Carbamatkinase; <i>arcCBAD</i> -Operon; Arginin- und Prolinmetabolismus; Arginindeiminase Abbauweg (anaerober Abbau von Arginin unter ATP-Produktion)	<i>arcC</i>	5173
	0,64	211	2,59	0,31	0,39	0,5	1,68			
	0,41	-	290	94,6	0,25	0,69	135			
17	0,11	1,20	1,44	1,12	1,08	1,77	5,22	„Biotinabhängige Carboxylase; Fettsäureabbau“	-	2888
18	0,17	0,1	0,08	0,09	0,08	121	176	Acylträgerprotein; Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus	<i>acpP</i>	2966
19	0,16	0,58	0,23	0,26	0	1,99	2,08	Biotin-Carboxylträgerprotein; Fettsäurebiosynthese; Propionatmetabolismus; Pyruvatmetabolismus	<i>accB</i>	4847
20*	0	2,69	62,9	127	100	489	248	Anorganische Pyrophosphatase; Zentraler Intermediärmetabolismus; Oxidative Phosphorylierung	<i>ppa</i>	4031
	0,41	1,65	1,14	2,38	1,21	1,88	2,25			

ERGEBNISSE

Metabolismus										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{MI}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
21	0,99	0,79	0,55	0,43	0,33	1,65	2,43	Thioredoxin; Nukleotidbiosynthese und -metabolismus; Translation, posttranslationale Modifikation und Abbau; Energiemetabolismus	<i>trxA</i>	5240
22*	0,06	3,47	2,36	2,91	2,59	1,4	1,75	Succinyl-CoA-Synthetase, β -Untereinheit; Zitronensäurezyklus	<i>sucC</i>	1588
	2,9	-	0,52	0,57	1,95	1,12	3,52			
23*	0,41	0,53	40,8	1,34	0,55	0,69	64,9	Glutaminase, Asparaginase (Transaminase); Alanin- und Aspartatmetabolismus; Stickstoffmetabolismus	<i>ansB</i>	1337
	2,64	-	1,56	2,79	2,78	0,53	1,43			
24	2,64	3,0	12,2	9,45	3,42	1,75	1,8	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase 3; Zitronensäurezyklus; Glycin-, Serin- und Threoninmetabolismus; Glycolyse/Glukoneogenese; Pyruvatmetabolismus	<i>lpd3</i>	4829
25*	3,33	1,99	0,61	3,02	1,1	1,01	1,46	Malatsynthase G; Glyoxylat- und Dicarboxylatmetabolismus	<i>glcB</i>	0482
	2,7	1,68	1,09	1,69	1,05	2,21	2,55			
	0,97	0,41	56,3	23,5	49,6	109	78,4			
26	20,2		0,44	2,08	0,55	1,2	2,17	ATP-Synthase, β -Untereinheit; Teil des ATP-Synthaseoperons, oxidative Phosphorylierung	<i>atpF</i>	5558
27	0,01	4,18	0,8	1,08	1,25	3,15	2,53	ATP Synthase, δ -Untereinheit; Teil des ATP-Synthaseoperons, oxidative Phosphorylierung	<i>atpH</i>	5557
28	0,38	1,30	0,55	0,2	0,47	0,91	2,54	Pyridoxaminphosphat-Oxidase; Biosynthese von Kofaktoren, prosthetischen Gruppen und Trägern; Vitamin B6-Metabolismus	<i>pdxH</i>	1049
29	0,38	1,58	1,16	0,75	0,85	4,22	5,54	Stickstoffregulator-Protein P II; Regulierung der Aktivität der Glutaminsynthetase GlnA	<i>glnK</i>	5288
30	0,11	1,11	0,03	0,34	0,08	1,26	0,35	„CoA-Transferase, Untereinheit A; Butyratabbau; Valin-, Leucin- und Isoleucinabbau“	<i>atoD</i>	1999
31	0,18	0,89	0,05	0,04	0,27	0,49	0,42	Acetyl-CoA-Acetyltransferase; Butyratabbau; Fettsäurebiosynthese;	<i>atoB</i>	2001

ERGEBNISSE

Hypothetische Proteine									
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{MI}							Sequenzhomologie und vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25		
32	0,13	0,69	0,49	0,45	0,59	1,73	3,13	68% Ähnlichkeit zu einer „Isomerase“ von <i>E. coli</i> ; Fumarylacetoacetat(FAA)-Hydrolase; Tyrosinabbau	0318
33	0	0,73	0,07	0,04	0	1,6	2,57	49% Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Protein YCL026c-a von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; möglicherweise Oxidoreduktase mit Verwandtschaft zu einer Nitroreduktase	2575
34	1,11	5,15	0,73	1,1	0,5	8,31	14,4	Bezeichnung der Region: “DNA Polymerase α -Untereinheit B	0388
35	0,41	-	0,18	0,34	0,25	86,4	180	80% Ähnlichkeit zu einem „Protein“ von <i>Methylobacterium extorquens</i> . Das Gen wird für die Aktivität der Glyceratkinase (Glykolyse) benötigt.	3440
36	0,5	1,44	0,18	0,33	0,54	0,37	0,42	53% Ähnlichkeit zu einem ORF mit unbekannter Funktion von <i>B. subtilis</i> . Motiv der Isochorismatasefamilie (schwach)	1677
37	0,54	3,04	0	0	1,5	0,3	0,31	72% Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein von <i>E.coli</i> -LysM-Domäne. LysM-Domänen befinden sich in einer Vielzahl von Enzymen, die in den Abbau der Zellwand involviert sind. Die Domäne besitzt eine generelle Peptidoglykan-Bindefunktion.	5178
38*	1,02	0,76	1	0,07	1,14	1,38	0,89	53% Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein von <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> MTH993 mit konserviertem Stressproteinmotiv.	3309
	0	0	0	0	0	1,85	0		
39	0,45	0,38	1,31	0,2	0,37	1,78	2,09	90% Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein (<i>vnfA</i> -5'-Region) von <i>Azotobacter vinelandii</i> . Endoribonuclease L-PSP. Wirksam bei einzelsträngiger mRNA. Inhibierung der Initiierung der Proteinsynthese. Das Protein kann auch in die Regulation der Purinbiosynthese involviert sein.	5339

Wirtsadaption & Protektion										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{MI}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
40	0,41	0,03	8,24	0,34	0,25	59,5	116	Glutathionperoxidase; Reduktion toxischer Peroxide	<i>btuE</i>	0838
41*	0,89	2,32	0,98	0	0,68	1,18	0	Superoxiddismutase (Fe-Kofaktor); Entfernung von Superoxidradikalen	<i>sodB</i>	4366

ERGEBNISSE

Wirtsadaption & Protektion										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
	0	0,00	0	0,22	0	0,15	1,03			
43	0,11	0,29	0,2	0	0	0,12	0	Bakterioferritin A, Bakterioferritin (Cytochrom b1); Transport und Metabolismus anorganischer Ionen	<i>bfrA</i>	4235
44	0,2	0,55	0	0,47	0,4	0,01	0,36	Katalase	<i>katA</i>	4236
45	2,13	0,43	0,81	0,20	1,54	0,71	0,49	Alkylhydroxidreduktase, Untereinheit C; AhpC, Peroxiredoxin	<i>ahpC</i>	0139
46*	0,28	0,13	0,37	0,19	0,67	0,89	0,44	„Peroxidase“	<i>tsaA</i>	3529
	0,95	0,76	0,96	1,23	1,73	1,0	1,2			
	0,03	0,73	0,11	0,27	0,37	0,17	0,43			

Chaperone & Hitzeschockproteine										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
47*	0	0,03	0,01	0,03	0	0,52	0,04	Hitzeschockprotein IbpA; Stressantwort auf denaturierte Proteine.	<i>ibpA</i>	3126
	-	-	-	-	-	-	136			
48	0,53	1,63	0,68	0,41	0,78	1,65	2,62	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase; Chaperone & Hitzeschockproteine	<i>ppiB</i>	1793
49	4,22	0,60	1,97	1,76	2,86	0,82	0,8	GroEL-Protein; Chaperone; Proteinturnover	<i>groEL</i>	4385
50	0,78	3,85	3,65	2,18	0,41	1,81	1,07	Triggerfaktor, bindet an das ribosomale Protein L23	<i>tig</i>	1800

Transkription und Translation										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
51	0,87	3,92	3,53	1,36	3,05	2,2	5,26	Ribosomales SSU-Protein; Translation, posttranslationale Modifikation	<i>rpsF</i>	4935
52	4,30	3,09	3,11	4,21	5,01	1,56	1,88	„Ribosomales Protein L25“; Translation, posttranslationale Modifikation/Abbau	-	4671
53	0,32	0,74	0,51	0,29	0,32	1,86	2,15	Transkriptionselongationsfaktor GreA; Transkription; RNA-Prozessierung /-Abbau	<i>greA</i>	4755
54	0,55	1,37	2,59	4,92	1,38	2	4,37	Ribosomales LSU-Protein L7/L12; Translation, posttranslationale Modifikation	<i>rplL</i>	4271
55*	2,66	1,80	2,09	3,71	3,13	1,01	0,96	Elongationsfaktor Ts; Translation, posttranslationale Modifikation und Abbau	<i>tsf</i>	3655

ERGEBNISSE

Transkription und Translation										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{MI}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
	0,48	-	0,61	0,88	1,01	0,75	0,76			
56*	9,94	3,0	13,0	11,8	12,3	7,3	2,53	Elongationsfaktor Tu; Translation, posttranslationale Modifikation und Abbau	<i>tufA</i>	4265
	1,34	-	2,28	0	0,42	1,08	2,32			
57	1,44	2,71	4,04	2,08	9,41	0,51	3,06	Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase; (<i>guaAB</i> -Operon); Purinmetabolismus	<i>guaB</i>	3770

Motilität & Anheftung										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{MI}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
58	0,22	0,68	0,13	0,21	0,12	2,6	2,58	Twitching motility-protein PilH; Zweikomponentensystem	<i>pilH</i>	0409
59*	0	0,09	0	0	0	0,48	0	Flagellin, Motilität & Anheftung	<i>fliC</i>	1092
	0,01	0,27	0	0	0,08	0,12	0			
	0,03	0,19	0	0	0	0,12	0			

Zellwand, LPS, Kapseln										
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{MI}							Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁴ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁴
	PAO1	M9	M13	M20	M23	M26	M25			
60	0,91	0,53	0,52	0,69	0,60	0,28	0,46	UDP-N-acetylmuramyl-alanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelat-D-alanyl-D-alanyl-Isomerase; Peptidoglykanbiosynthese	<i>murF</i>	4416

⁴ www.pseudomonas.com

C.3.1.2 Kulturüberstandsproteine

Zur Präzipitation der Kulturüberstandsproteine (KÜP) wurden die Stämme in 1000ml LB-Medium in 2000ml Erlenmeyerkolben angezogen und bei gleicher $OD_{600} = 4,0$ in der logarithmischen Phase geerntet. Die Präzipitation erfolgte wie in Kapitel B.6.1.3 beschrieben. Proteine im Kulturüberstand können Substraten spezifischer Proteinsekretionssysteme oder Zelllysaten (Autolyse) zugeordnet werden.

C.3.1.2.1 Gelauswertung der Kulturüberstandsproteine

Von Patient M wurden die Kulturüberstandsproteine (KÜP) der fünf Isolate M1 (frühester $MutS^+$ -Stamm), M13 (erster *mutS*-Stamm), M20 (*mutS*-Stamm), M23 (später $MutS^+$ -Stamm) und M25 (später *mutS*-Stamm), sowie des Referenzstamms PAO1 verglichen.

Im Folgenden wird der *mutS*-Stamm M25 als Letztisolat von Patient M verwendet, da die *mutS*-Stämme M25 und M26 zeitgleich aus demselben Sputum (0109) isoliert wurden und M25 sowohl im 2-DE-Muster als auch in den phänotypischen Tests größere Unterschiede zum Erstisolat M1 ($MutS^+$) aufweist. Bei der Auswertung der Gele lag der Hauptfokus auf prominenten Unterschieden zwischen M1 ($MutS^+$) und M25 (*mutS*).

Die Auswertung der Gele erfolgte mithilfe der PDQuest Software (BIORAD). Dabei diente das frühe $MutS^+$ -Isolat M1 als Referenz für die Berechnung des Quotienten der entsprechenden Proteinmengen. Ausgehend von dem Mittelwert der densitometrisch (GS 800, BIORAD) gemessenen Mengen der korrespondierenden Spots der Geltriplets von Isolat M1 wird der Quotient mit den jeweiligen Quantitätsmittelwerten der Vergleichsisolate gebildet (ebenfalls aus 3 Gelen errechnet; P_n^{Xi} / P_n^{M1} , siehe Legende Tabelle C-3). Neben einer möglichst genauen Quantifizierung der aufzutragenden Proteinmengen bietet die Software durch Normalisierung der Gesamtquantität im jeweiligen Gel die Möglichkeit, eventuell vorhandene Konzentrationsunterschiede auszugleichen. Im Folgenden werden exemplarische 2-DE-Übersichtsgele (Abbildung C-18 und Abbildung C-19) und anschließend die durch rote Rechtecke gekennzeichneten korrespondierenden Ausschnitte dargestellt (Abbildung C-20 bis Abbildung C-23). Die im KÜP als differentiell analysierten Spots, bei denen ein manuelles Ausstechen möglich war und die Maldi-TOF-MS eine Identifizierung lieferte, sind farblich gekennzeichnet und nummeriert.

Die in den Ausschnitten markierten Proteine mit serieller 2-DE-Nummer (CF-Nr.) sind in der nachfolgenden Tabelle C-3, geordnet nach ihrer Funktion, dargestellt. In der KÜP-

ERGEBNISSE

Fraktion wurden auch zahlreiche Membranproteine, bzw. Membran-assoziierte Proteine nachgewiesen. Neben den Bindeproteinen AotJ und BraC von Aminosäuretransport-Systemen für Arginin und Ornithin, bzw. verzweigte Aminosäuren erwiesen sich vor allem Stressproteine in den *mutS*-Stämmen als stark überproduziert. Das Membranprotein OprH verleiht Schutz gegenüber Polymyxin B und Aminoglykosiden, während die Beta-Lactamase (AmpC) Beta-Lactamantibiotika spaltet. In Übereinstimmung mit den Resistenzbestimmungen zeigte der frühe *mutS*-Stamm M13 keine, der späte MutS⁺-Stamm M23 dagegen eine hohe Produktion der AmpC. Im Gegensatz zum Referenzstamm PAO1, der die Flagellenproteine FliC und FliD sehr stark überproduziert, zeigten die *mutS*-Stämme nur Spuren von FliC.

Erstaunlicherweise waren in der KÜP-Fraktion der *mutS*-Stämme auch cytoplasmatische Proteine wie LpdG, AtpF oder ArcA zu finden, welche im GZL schon als überproduziert in den *mutS*-Stämme identifiziert wurden.

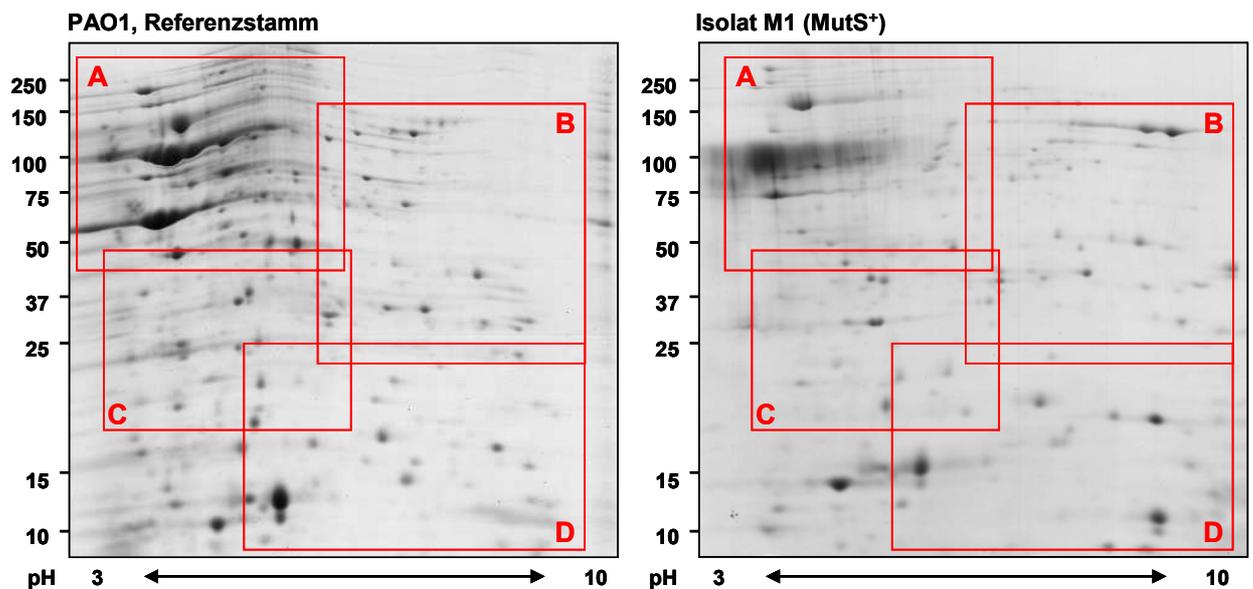


Abbildung C-18: A: Vergleich der Übersichtsgel der KÜP im pH-Bereich 3-10 NL, (12,5 % PAA)
Auf den Übersichtsgelen von PAO1, Isolat M1, M13, M20, M23 und M25 sind vier Bereiche A-D rot gekennzeichnet. Diese sind anschließend vergrößert dargestellt

ERGEBNISSE

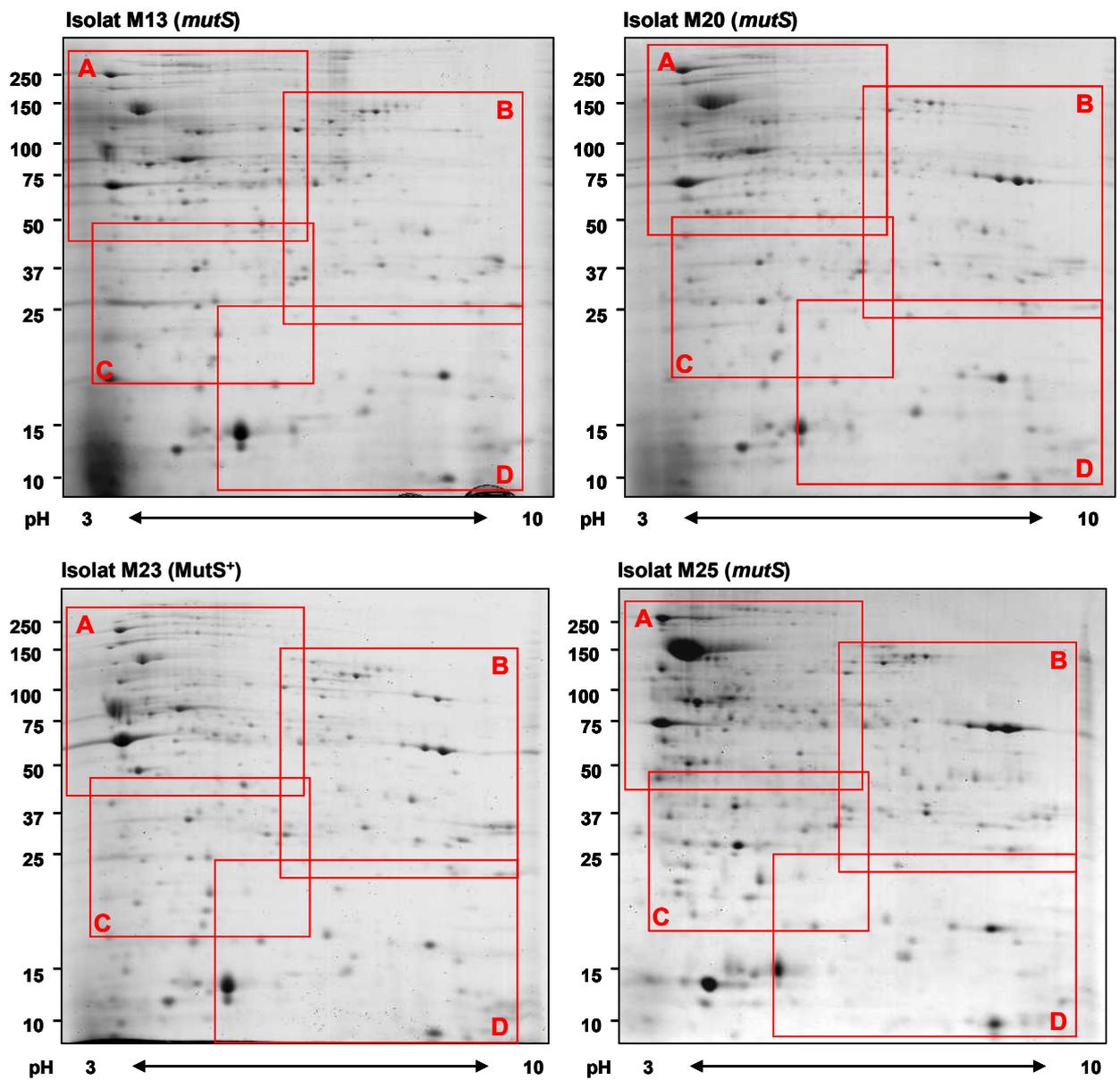


Abbildung C-19: **B:** Vergleich der Übersichtsgel der KÜP im pH-Bereich 3-10 NL, (12,5 % PAA)
Auf den Übersichtsgelen von PAO1, Isolat M1, M13, M20, M23 und M25 sind vier Bereiche A-D rot gekennzeichnet. Diese sind anschließend vergrößert dargestellt

ERGEBNISSE

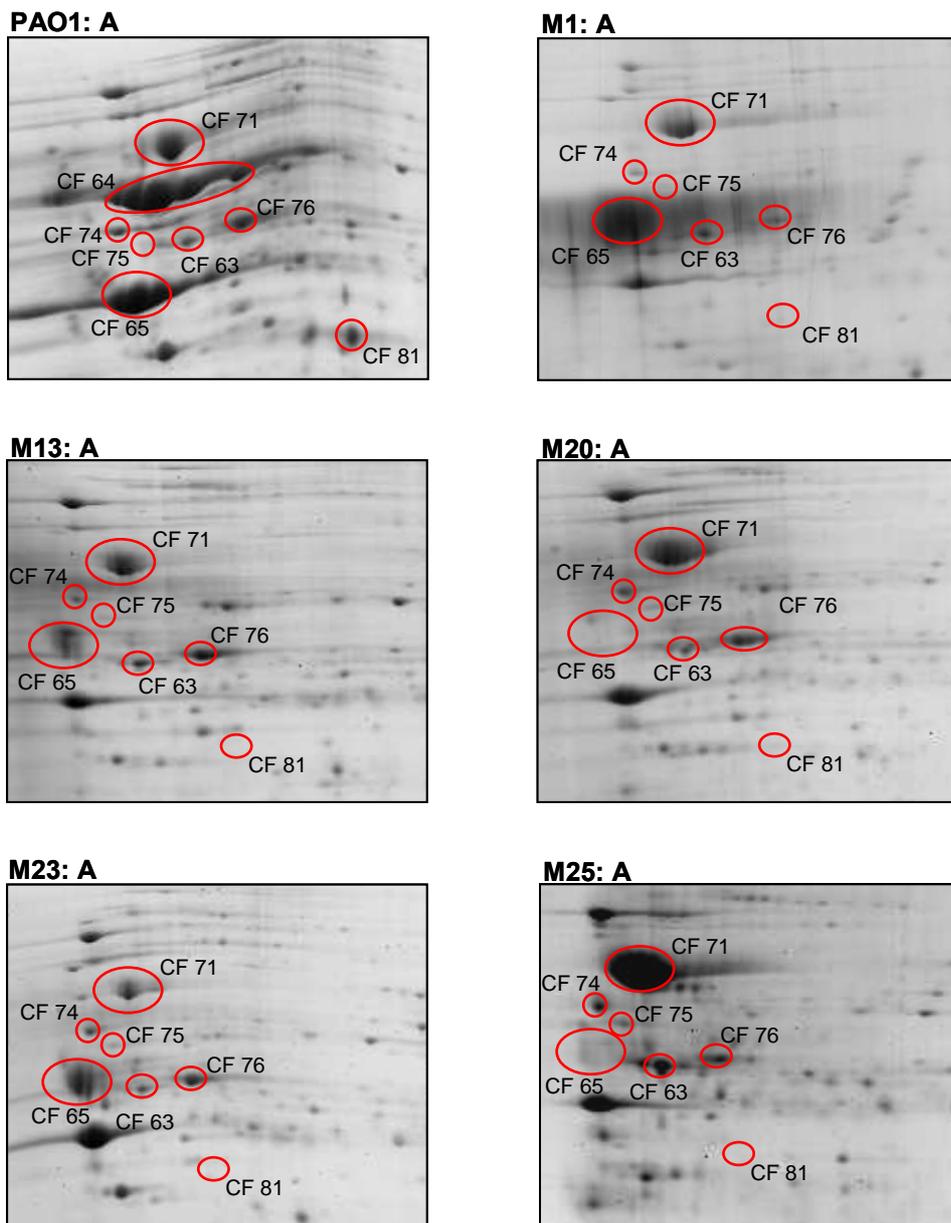


Abbildung C-20: Ausschnitt A der Übersichtsgele des KÜP (Abbildung C-18 und Abbildung C-19) von PAO1 und den 5 *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient M (M1, M13, M20, M23 und M25).

ERGEBNISSE

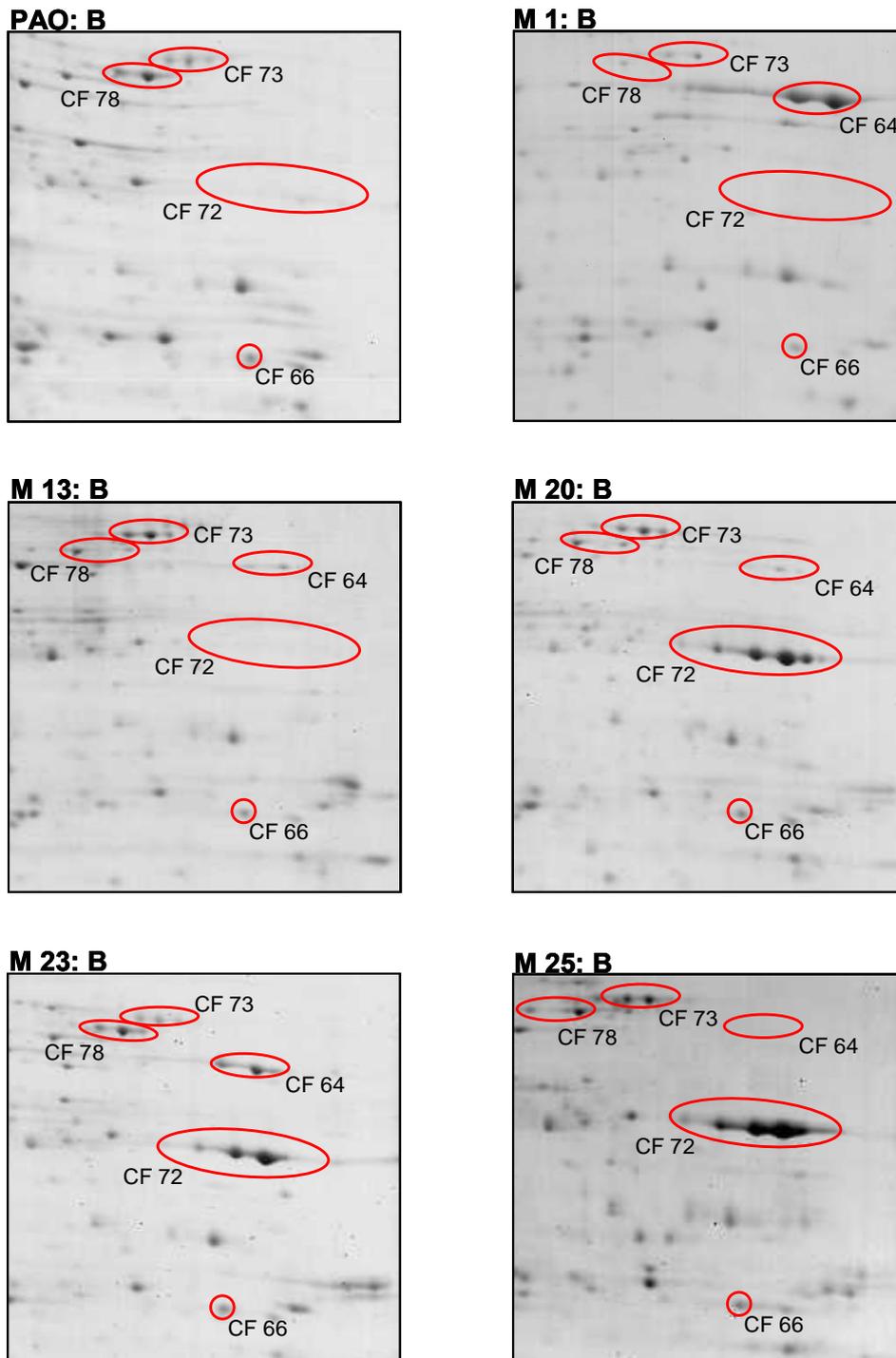


Abbildung C-21: Ausschnitt B der Übersichtsgel des KÜP (Abbildung C-18 und Abbildung C-19) von PAO1 und den 5 *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient M (M1, M13, M20, M23 und M25).

ERGEBNISSE

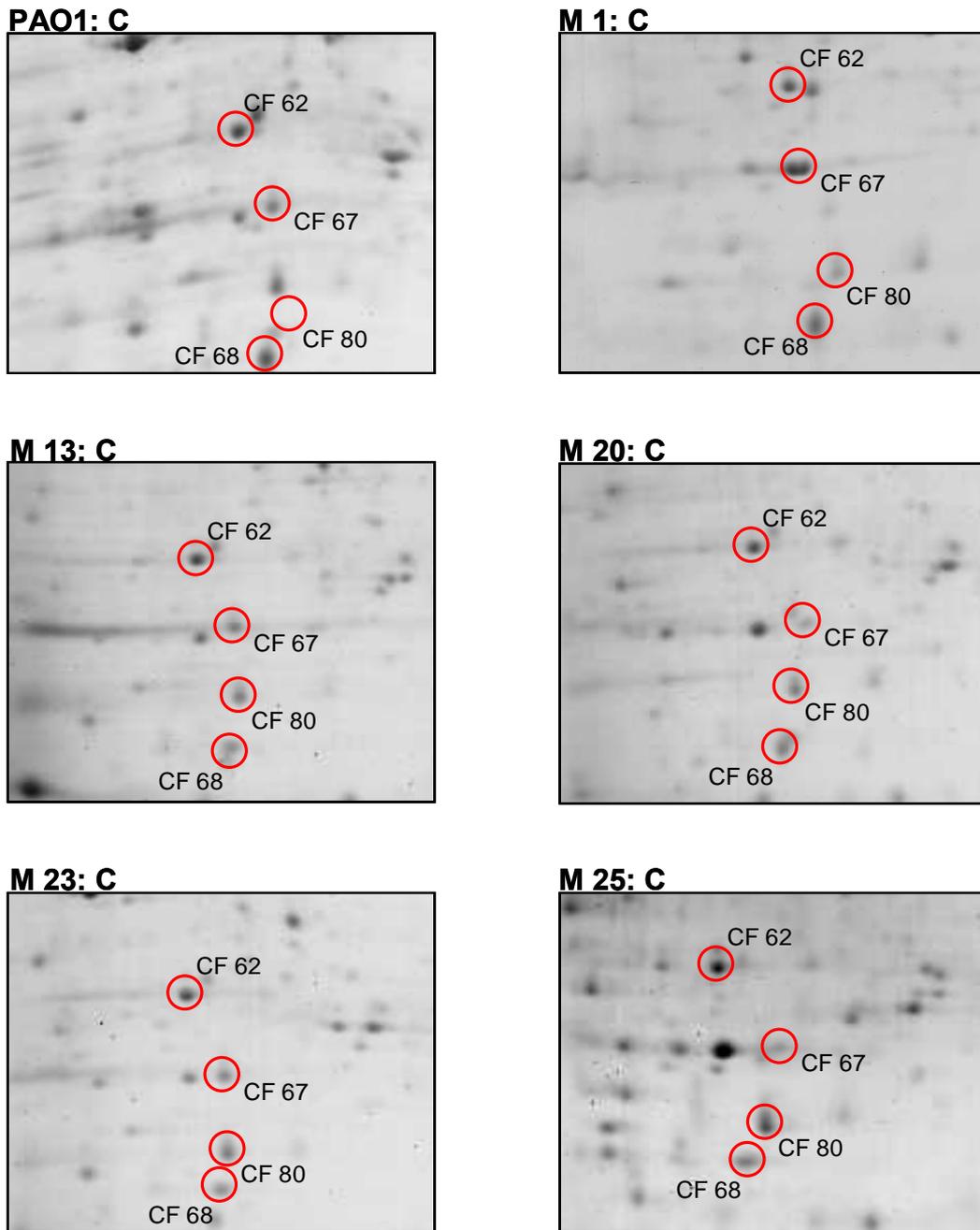


Abbildung C-22: Ausschnitt C der Übersichtsgele des KÜP (Abbildung C-18 und Abbildung C-19) von PA01 und den 5 *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient M (M1, M13, M20, M23 und M25).

ERGEBNISSE

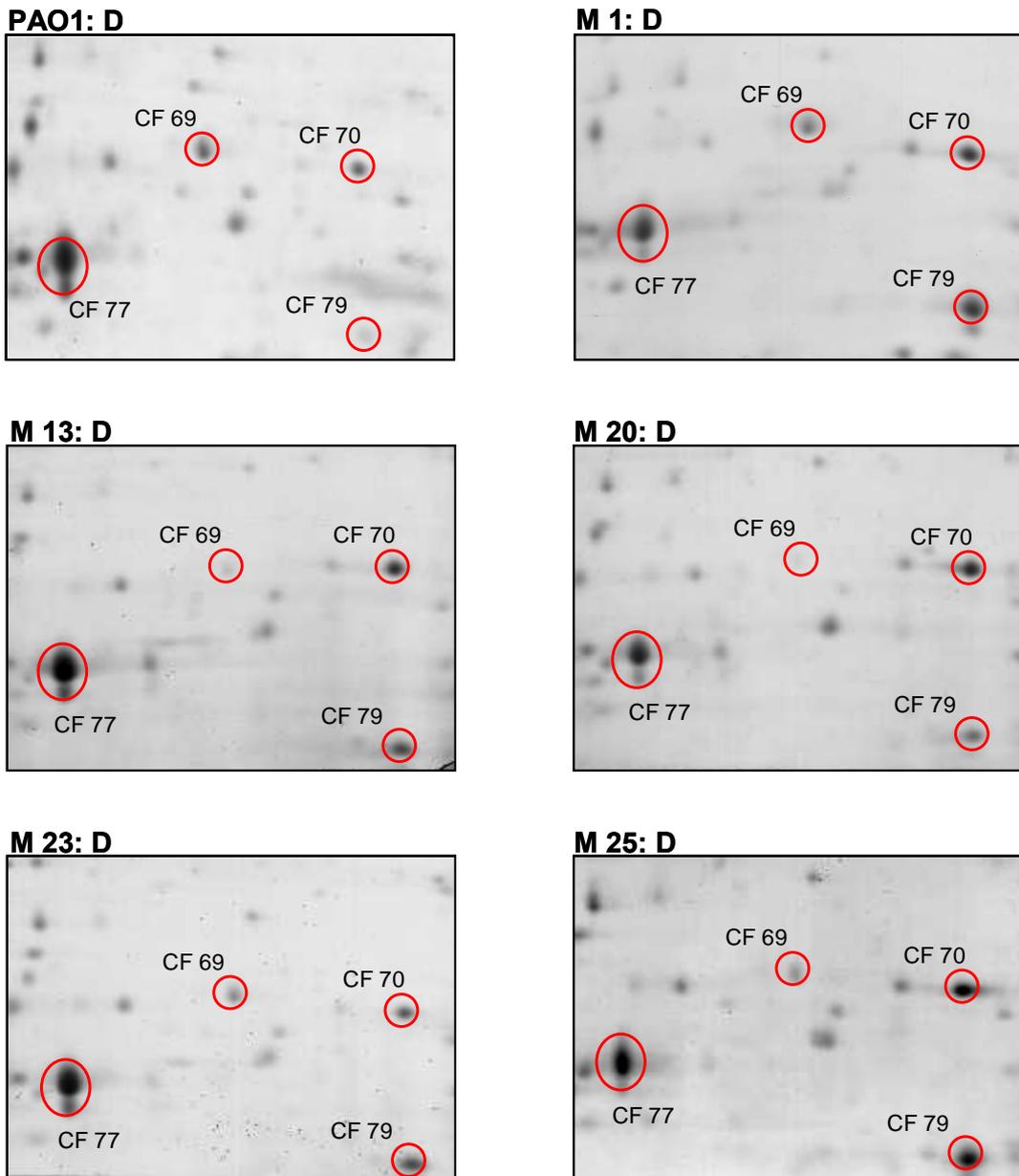


Abbildung C-23: Ausschnitt D der Übersichtsgel des KÜP (Abbildung C-18 und Abbildung C-19) von PAO1 und den 5 *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient M (M1, M13, M20, M23 und M25).

ERGEBNISSE

Tabelle C-3: Identifizierte Proteine aus 2DE-Gelen von Kulturüberstandsproteinen sequentieller *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M und dem Referenzstamm PAO1. Die angefärbten „Proteinspots“ wurden densitometrisch quantifiziert und durch Quotientenbildung auf das Erstisolat M1 bezogen (P_n^{Xi}/P_n^{M1}); P: Protein, n: laufende Nummer (CF-Nr), M1: Bezugsstamm, Xi: Patientenisolate (Mi) bzw. Referenzstamm PAO1, i: Isolatindex. Schwarz: keine differentielle Produktion ($0,5 < x < 2$); Rot: stärker produziert ($x \geq 2$); Grün: schwächer produziert ($x \leq 0,5$). Vorhergesagte Funktionen sind durch Anführungszeichen („“) gekennzeichnet. *: Mehrere Proteinspots durch Isoformen mit leichter Veränderung im pI.

Membranproteine								
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}					Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁵ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁵
	PAO1	M13	M20	M23	M25			
62	1,81	1,92	1,33	2,14	3,72	Arginin/Ornithin-Bindungsprotein AotJ; Arginin-Ornithin-Transportloкус; angrenzend an den Arginin-Ornithin-Abbaulokus	<i>aotJ</i>	0888
63	1,17	2,39	1,39	1,06	2,22	Bindungsprotein verzweigter Aminosäuren ; Angrenzend an das <i>braDEFG</i> -Operon, das für einen ABC-Transporter verzweigter Aminosäuren kodiert.	<i>braC</i>	1074
64*	4,3	-	-	0,12	-	Abschlussprotein der Flagelle, FliD; Motilität und Anheftung	<i>fliD</i>	1094
	5,2	0,06	0,03	0,57	-			
65	400,3	0,01	0,01	1,9	0,01	Flagellin FliC; Motilität und Anheftung	<i>fliC</i>	1092

Toxine								
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}					Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁵ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁵
	PAO1	M13	M20	M23	M25			
81	1697,5	-	-	-	-	Elastase LasB (Zink-Metalloprotease); Abbau der Bindegewebskomponente Elastin; Regulation über LasR/LasI-Quorum Sensing-Regulon	<i>lasB</i>	3724

ERGEBNISSE

Hypothetische Proteine							
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}					Sequenzhomologie oder vorhergesagte („“) Funktion ⁵ des Proteins	Gen-Nr. ⁵
	PAO1	M13	M20	M23	M25		
66	0,88	1,33	1,34	1,84	2,08	47% Ähnlichkeit zu dem Protein PtxB von <i>P. stutzeri</i> ; Phosphat/Phosphonat-Transportsystem des ABC-Typs (Transport und Metabolismus anorganischer Ionen)	3313
67	1,05	0,34	0,26	0,34	0,18	„Periplasmatisches Bindepotein“	0754
68	0,52	0,11	-	0,26	0,46	53% Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Genprodukt MTH993 von <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ; Konserviertes Stressproteinmotiv	3309
69	0,3	0,03	0,02	0,12	0,2	51% Ähnlichkeit zu einem „Protein“ von <i>Aquifex aeolicus</i> ; „Membran- oder Periplasmaprotein“	3785

Wirtsadaption und Schutz								
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}					Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁵ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁵
	PAO1	M13	M20	M23	M25			
70	1,92	6	15,67	2,67	5,37	Protein OprH der äußeren Membran; verleiht Resistenz gegenüber Polymyxin B, Aminoglykosiden und EDTA (induzierbar durch PhoP/Q und einen niedrigen Mg ²⁺ -Spiegel)	<i>oprH</i>	1178
71*	-	9,86	1,33	0,71	2,87	Protein GroEL; Chaperon; Proteinturnover	<i>groEL</i>	4385
	-	0,51	2,93	0,24	2,14			
	3,05	0,12	1,52	0,71	50,7			
72*	0,93	0,79	1989,25	1526,61	1095,05	Beta-Lactamase/Cephalosporinase AmpC	<i>ampC</i>	4110
	0,93	0,79	439,86	141,77	450,84			
	0,93	0,79	4122,04	3733,22	1855,99			
	0,93	0,79	938,3	597,56	1907,45			

ERGEBNISSE

Metabolismus								
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}					Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁵ des Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁵
	PAO1	M13	M20	M23	M25			
73	216	82.9	129,2	93	277,9	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase 3 (Lpd3); Zitronensäurezyklus; Glycin-, Serin- und Threoninmetabolismus; Glycolyse/Glukoneogenese; Pyruvatmetabolismus	<i>lpd3</i>	4829
74	5,31	3,2	3,82	2,47	5,6	Triggerfaktor; Zellteilung; Chaperone und Hitzeschockproteine	<i>tig</i>	1800
75	0,93	1,5	1,97	2,57	3,28	ATP-Synthase, β -Untereinheit; Teil des ATP-Synthaseoperons, oxidative Phosphorylierung	<i>atpF</i>	5558
76	2,73	4,24	2,40	1,66	2,52	Arginindeiminase ArcA; <i>arcCBAD</i> -Operon; Arginin- und Prolinmetabolismus; Arginindeiminase-Abbauweg	<i>arcA</i>	5171
77*	4,67	19,26	12,79	18,02	3,35	Azurinvorläufer; Redoxreaktionen; Energiemetabolismus	<i>azu</i>	4922
	1,91	2,92	0,87	2,25	1,92			
78*	0,52	1,81	2,1	0,66	2,59	Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase GuaB; Teil des konservierten <i>guaAB</i> -Operons. Purinmetabolismus	<i>guaB</i>	3770
	1,98	2,47	2,4	1,76	3,24			
80	1,34	1,69	1,55	1,95	3,14	DNA-Einzelstrang-bindendes Protein Ssb; DNA-Replikation, -Rekombination, -Modifikation und -Reparatur	<i>ssb</i>	4232
79	0,17	0,47	0,32	0,61	0,52	Ribosomales Protein L25; Translation, posttranslationale Modifikation und Abbau	-	4671

⁵ www.pseudomonas.com

C.3.1.3 Membran-assoziierte Proteinfraktion

Zur Extraktion der Membran-assoziierten Proteine (MAP) wurden die Stämme in 1000ml LB-Medium in 2000ml Erlenmeyerkolben angezogen und bei gleicher $OD_{600} = 4,0$ geerntet. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel B.6.1.2.1 beschrieben.

C.3.1.3.1 Gelauswertung der Membran-assoziierten Proteinfraktion

Von Patient M wurde versucht, die Membran-assoziierten Proteine der fünf Isolate M1 ($MutS^+$ -Stamm), M13 (erster *mutS*-Stamm), M20 (*mutS*-Stamm), M23 (später $MutS^+$ -Stamm) und M25 (später *mutS*-Stamm), sowie des Referenzstamms PAO1 mit saurem Glycinpuffer zu extrahieren.

Im Folgenden wird der *mutS*-Stamm M25 als Letztisolat von Patient M verwendet, da die *mutS*-Stämme M25 und M26 zeitgleich aus demselben Sputum (0109) isoliert wurden und M25 sowohl im 2-DE-Muster als auch in den phänotypischen Tests größere Unterschiede zum Erstisolat M1 ($MutS^+$) aufweist. Bei der Auswertung der Gele lag der Hauptfokus auf prominenten Unterschieden zwischen M1 ($MutS^+$) und M25 (*mutS*).

Bei einer Inkubationszeit der Bakterienzellen in saurem Glycinpuffer von 15 Minuten war dies lediglich bei den Isolaten M1, M23, M25 und beim Referenzstamm PAO1 möglich. Eine Verlängerung der Inkubationszeit bei Isolat M13 und M20 hätte die Ergebnisse verfälscht, der Versuch führte darüber hinaus zur Lyse der Isolate. Die „Übergangsisolate“ M13 und M20 scheinen eine veränderte Membranstruktur aufzuweisen.

Die Auswertung der Gele erfolgte mithilfe der PDQuest Software (BIORAD). Dabei diente das frühe $MutS^+$ -Isolat M1 als Basis für die Berechnung des Quotienten unterschiedlich exprimierter Proteine. Ausgehend von dem Mittelwert der densitometrisch (GS 800, BIORAD) gemessenen Quantitäten der korrespondierenden Spots der Geltriplets von Isolat M1 wurde der Quotient mit den jeweiligen Quantitätsmittelwerten der Vergleichsisolate (ebenfalls aus 3 Gelen errechnet) gebildet (P_n^{Xi} / P_n^{M1} , siehe Legende Tabelle C-4). Neben einer möglichst genauen Vermessung der aufzutragenden Proteinmengen bietet die Software durch Normalisierung der Gesamtquantität im jeweiligen Gel die Möglichkeit, eventuell vorhandene Konzentrationsunterschiede auszugleichen. Im Folgenden werden exemplarische 2-DE-Übersichtsgele (Abbildung C-24) und anschließend die durch rote Rechtecke gekennzeichneten Ausschnitte dargestellt (Abbildung C-25 und Abbildung C-26). Die im GZL als differentiell analysierten Spots, bei denen ein manuelles Ausstechen möglich

ERGEBNISSE

war und die Maldi-TOF-MS eine Identifizierung lieferte, sind farblich gekennzeichnet und nummeriert.

Die in Abbildung C-25 und Abbildung C-26 dargestellten Proteine sind in der nachfolgenden Tabelle C-4 nach ihrer Funktion zusammengestellt. Überproduziert im späten *mutS*-Stamm fand sich beispielsweise das Porin OprF, welches vermutlich als Nitratpermease fungiert, und das Protein OprG der äußeren Membran, welches in die Resistenz gegenüber Chinolonen involviert ist. Eine reduzierte Produktion wurde vor allem für Proteine festgestellt, welche für die Virulenz von *P. aeruginosa* eine Rolle spielen, wie beispielsweise für das Peptidoglykan-assoziierte Lipoprotein OprL oder das mutmaßliche TonB-abhängige Rezeptorprotein PA5505. Eine Überproduktion der Serinprotease MucD war einzig bei dem späten MutS⁺-Stamm M23 zu finden, welcher bei Zellkulturversuchen durch seine erhebliche Cytotoxizität aufgefallen war. Ebenfalls konnten im späten *mutS*-Stamm M25 prominente hypothetische Proteine nachgewiesen werden, die Homologien zu Toluoltoleranz-Proteinen und zu osmotischen Schutzproteinen aufweisen.

Eine genauere Besprechung der Proteine erfolgt in Kapitel C.6, zusammen mit den Daten des Transkriptoms.

ERGEBNISSE

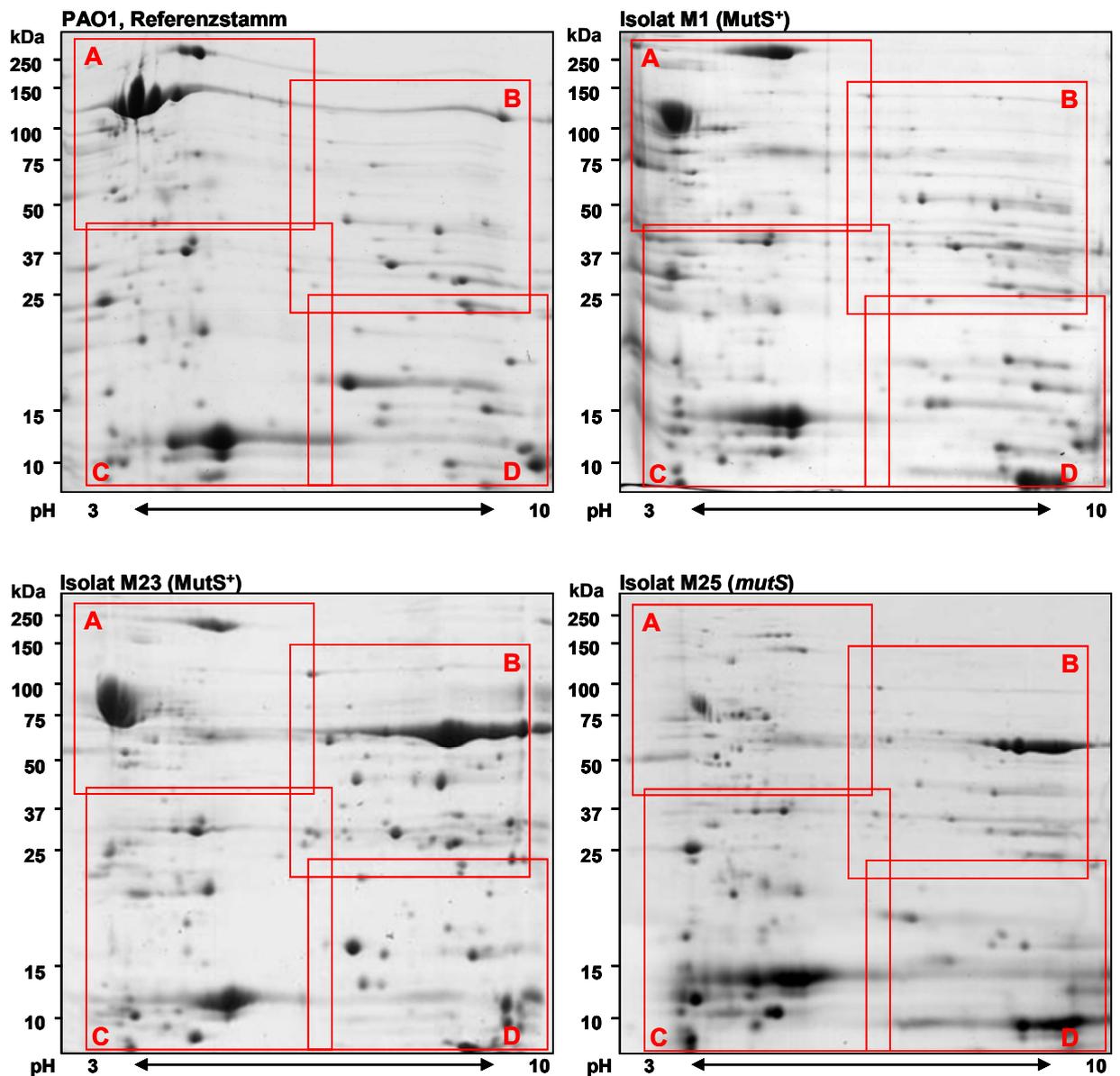


Abbildung C-24: Vergleich der Übersichtsgel der MAP im pH-Bereich 3-10 NL, (12,5 % PAA). Auf den Übersichtsgelen von PAO1, Isolat M1, M23 und M25 sind vier Bereiche A-D rot gekennzeichnet. Diese sind anschließend vergrößert dargestellt.

ERGEBNISSE

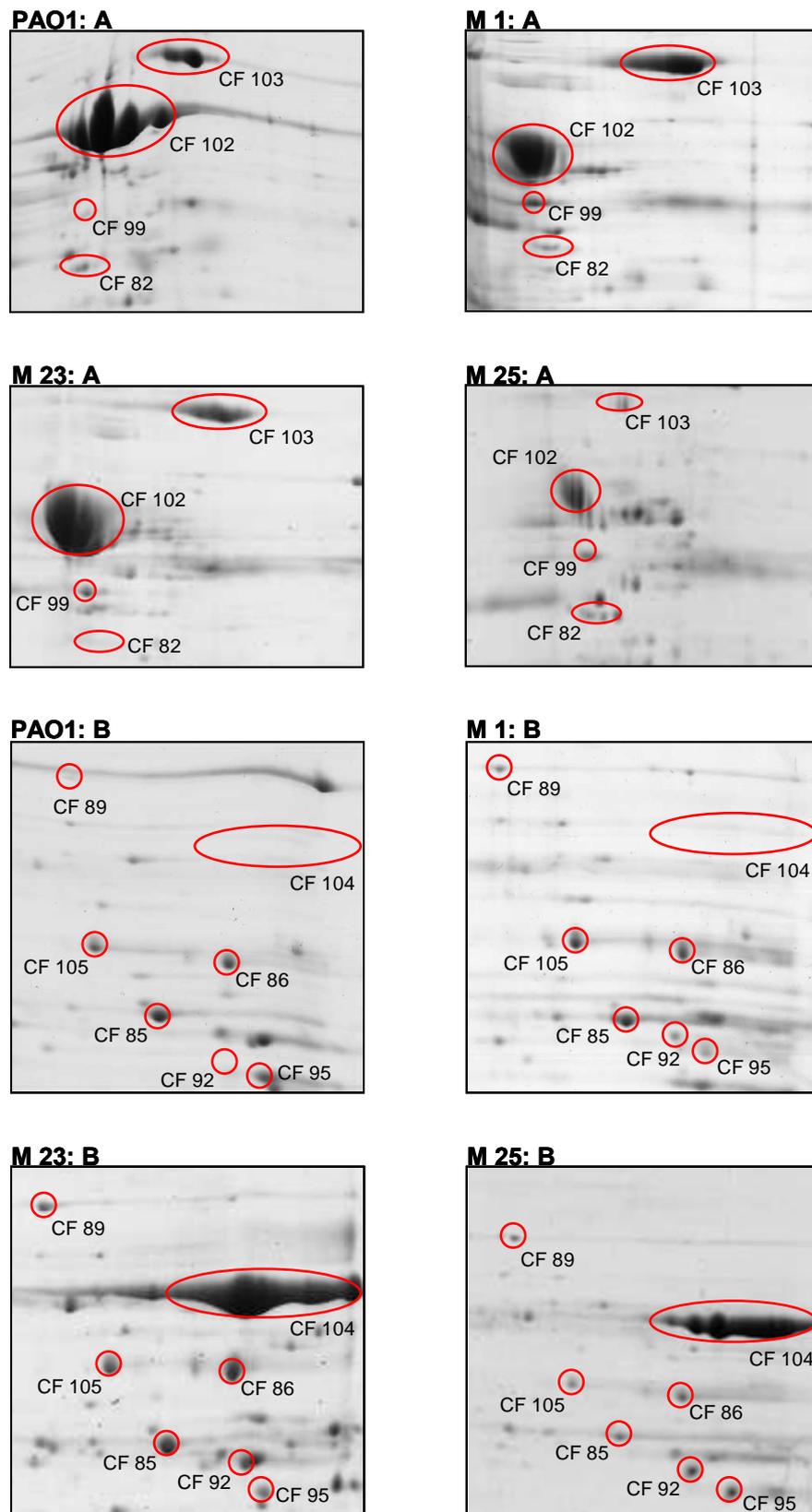


Abbildung C-25: Ausschnitte A und B der Übersichtsgele des MAP (Abbildung C-24) von PAO1 und den 3 *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient M (M1, M23 und M25).

ERGEBNISSE

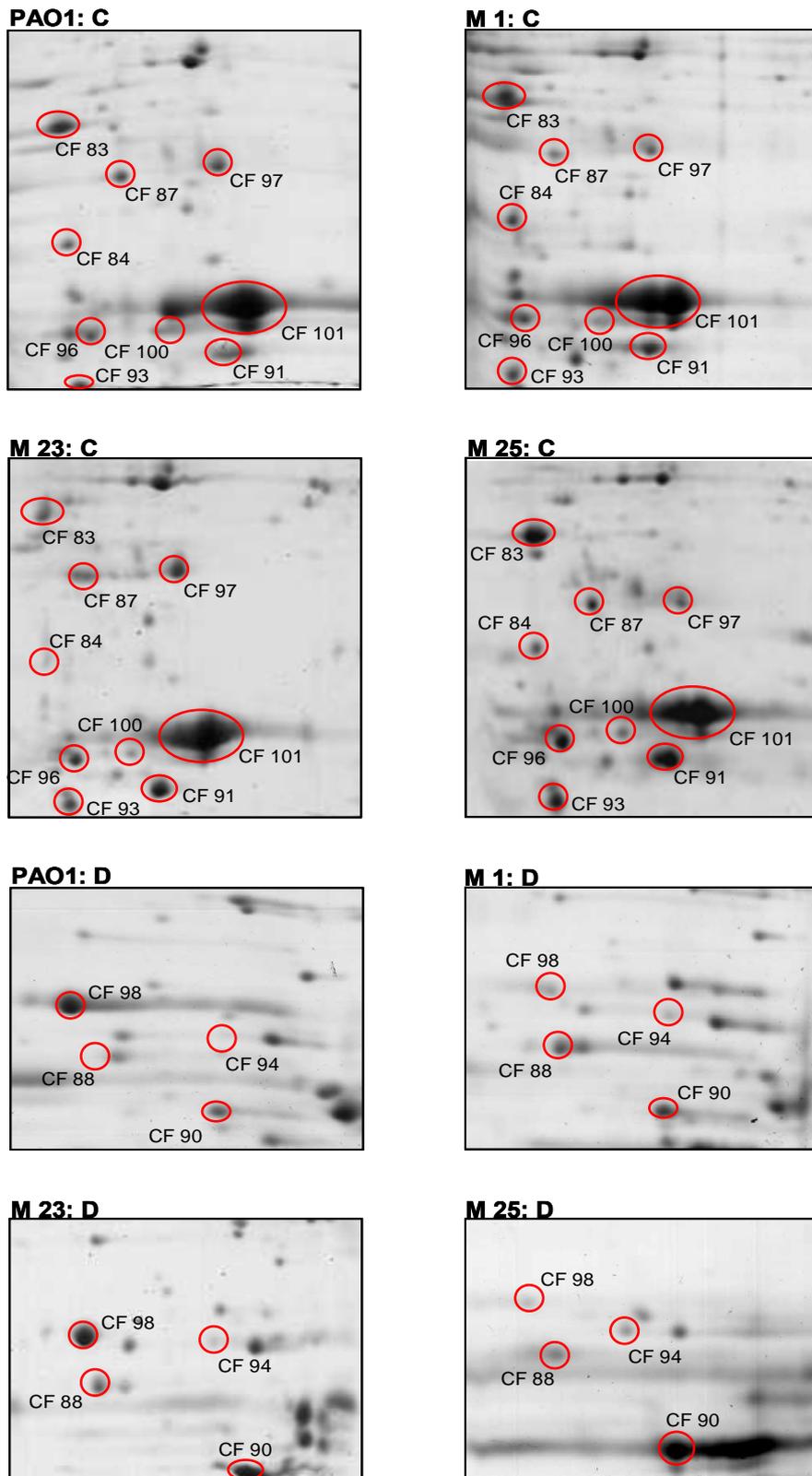


Abbildung C-26: Ausschnitte C und D der Übersichtsgele des MAP (Abbildung C-24) von PAO1 und den 3 *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient M (M1, M23 und M25).

ERGEBNISSE

Tabelle C-4: Identifizierte Proteine aus 2DE-Gelen der Membran-assoziierten Proteinfraction (MAP) der sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M und dem Referenzstamm PAO1. Die angefärbten „Proteinspots“ wurden densitometrisch quantifiziert und durch Quotientenbildung auf das Erstisolat M1 bezogen (P_n^{Xi}/P_n^{M1}); P: Protein, n: laufende Nummer (CF-Nr), M1: Bezugsstamm, Xi: Patientenisolat (Mi) bzw. Referenzstamm PAO1, i: Isolatindex. Schwarz: keine differentielle Produktion ($0,5 < x < 2$); Rot: stärker produziert ($x \geq 2$); Grün: schwächer produziert ($x \leq 0,5$). Vorhergesagte Funktionen sind durch Anführungszeichen („“) gekennzeichnet.
*: Mehrere Proteinspots durch Isoformen mit leichter Veränderung im pI.

Membranproteine						
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}			Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁶ der Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁶
	PAO1	M23	M25			
82*	1,01	0	14,13	Hauptporin der äußeren Membran OprF; Transport kleiner Moleküle; potentielle Nitratpermease	<i>oprF</i>	1777
	1,07	0,04	4,76			
83*	0,01	0,28	2,94	C-Terminus der potentiellen Nitratpermease OprF	<i>oprF</i>	1777
	2,58	0,98	16,3			
	0,02	0,01	4,38			
84	0,46	0,02	2,33	Protein der äußeren Membran OprG; 58% Ähnlichkeit zu OmpW, einem äußeren Membranprotein von <i>Vibrio cholerae</i> ; OmpW-Familie (Dieses Protein könnte in <i>E.coli</i> als Rezeptor für S4-Colicine fungieren)	<i>oprG</i>	4067
85	0,89	1,6	0,07	„TonB-abhängiger Rezeptor“ 66% Ähnlichkeit zu dem mutmaßlichen Protein HP1564 der äußeren Membran von <i>Helicobacter pylori</i> . Der Familie der antigen-wirkenden NLPA-Lipoproteine zugehörig.	-	5505
86 105*	1,22	2,44	0,44	„Protein-bindende Domäne eines ABC-Transporters“ 52% Ähnlichkeit zu dem Glutamin-Bindeprotein GlnH von <i>Bacillus stearothermophilus</i>	-	1342
87	1,7	1,51	2,43	Periplasmatisches Chaperon LolA; Chaperone und Hitzeschockproteine Lipoproteine-prozessierendes Protein der äußeren Membran (Zellwandbiosynthese)	<i>lolA</i>	2614
88	0,12	0,57	0,15	Peptidoglykan-assoziiertes Lipoprotein OprL; OmpA-ähnliche Domäne; Proteine der äußeren Membran und verwandte Lipoproteine (Zellwandbiosynthese)	<i>oprL</i>	0973
89	0,53	5,96	1,09	Serinprotease MucD; Alginatebiosynthese; Zellwand/LPS/Sekretierte Faktoren	<i>mucD</i>	0766

ERGEBNISSE

Hypothetische Proteine					
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}			Sequenzhomologie und vorhergesagte („“) Funktion ⁶ des Proteins	Gen-Nr. ⁶
	PAO1	M23	M25		
90	0,35	3,98	5,25	60% Ähnlichkeit zu dem induzierbaren periplasmatischen Protein OsmY von <i>E.coli</i> . „Phospholipid-Bindedomäne“	4739
91*	-	-	7,22	„Sec-abhängige, N-terminale Signalsequenz“ (Lewenza <i>et al.</i> , 2005)	0388
	1,18	1,16	2,05		
92	0,77	30,18	89,21	„ATPase der AAA+-Klasse [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14]“ „Sec-abhängige, N-terminale Signalsequenz“ (Lewenza <i>et al.</i> , 2005)	0315
94	0,02	0,01	11,97	50% Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Protein YhbN von <i>E.coli</i> . OstA-ähnliches Protein, Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln. „Sec-abhängige, N-terminale Signalsequenz“ (Lewenza <i>et al.</i> , 2005)	4460
93	4,22	4,42	2,79	„Membranprotein“; Funktion unbekannt. „Sec-abhängige, N-terminale Signalsequenz“ (Lewenza <i>et al.</i> , 2005)	2659
95	1,06	0,6	3,3	79% Ähnlichkeit zu dem Toluol-Toleranz-Protein Ttg2D von <i>P. putida</i> . Erhöhte Zellwandfestigkeit durch Veränderungen der Fettsäure- und Phospholipidkomposition, Ausschluss und intrazellulärer Abbau von Toluol.	4453
96	2,12	2,92	2,51	„Mit dem Basalkörper der Flagelle assoziiertes Protein FliL (Zellmotilität und Sekretion)“	5233
97	0,02	1,55	0,26	84% Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Protein YceI von <i>E.coli</i> . Protein unbekannter Funktion.	0423
98	58,89	26,59	0,72	51% Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Protein von <i>Aquifex aeolicus</i> . Protein unbekannter Funktion	3785
99	0,14	2,12	-	Protein unbekannter Funktion und fehlender Homologie	0946

Witrsadaption und Schutz						
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}			Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁶ der Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁶
	PAO1	M23	M25			
100	0,12	2,27	8,04	GroES, Co-Chaperon und Hitzeschockprotein GroES (HSP 10), Proteinturnover	<i>groES</i>	4386

ERGEBNISSE

Wirtsadaption und Schutz						
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}			Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁶ der Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁶
	PAO1	M23	M25			
104*	-	1947,99	870,4	Beta-Lactamase/Cephalosporinase AmpC	<i>ampC</i>	4110
	-	7295,78	5462,2			
	-	5223,61	3847,4			
	-	5341,63	2774,3			

Metabolismus						
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}			Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁶ der Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁶
	PAO1	M23	M25			
101*	1,26	1,53	3,7	Azurinvorläufer; Energiemetabolismus	<i>azu</i>	4922
	2,85	3,4	6,16			

Motilität und Anheftung						
CF-Nr.	P_n^{Xi} / P_n^{M1}			Nachgewiesene oder vorhergesagte („“) Funktion ⁶ der Proteins	Gen	Gen-Nr. ⁶
	PAO1	M23	M25			
102*	3904,88	100,88	0,43	Fagellin FliC; Motilität & Anheftung	<i>fliC</i>	1092
	1405,11	80,75	1,3			
	1289,7	-	-			
103*	36,97	0,01	0,01	Abschlussprotein der Flagelle, FliD; Motilität & Anheftung	<i>fliD</i>	1094
	41,98	1,04	0,01			

⁶ www.pseudomonas.com

C.3.2 Proteomanalyse von Isolaten der Patienten V und P

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die bei den Isolaten von Patient M analysierten Veränderungen im Rahmen der potentiellen Adaption der *mutS*-Stämme an die CF-Lunge auch bei den Patienten V und P in vergleichbarer Weise stattfanden.

Dazu wurde jeweils das Gesamtzelllysate eines frühen MutS⁺-Stamms (V1 bzw. P4) mit dem eines späten *mutS*-Stamms (V43 bzw. P24) verglichen. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden auch hier Mastergele der Isolate aus jeweils 3 Gelen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen erstellt. Bei der Auswertung durch PDQuest diente jeweils der frühe MutS⁺-Stamm (V1 bzw. P4) als Basis für die Berechnung des Quotienten (P_n^{Xi} / P_n^{Xi}) differentiell produzierter Proteine.

Der Vergleich der Quotienten der Proteinspots später *mutS*-Isolate von Patient M (P_n^{M25} / P_n^{M1} und P_n^{M26} / P_n^{M1}) mit den Quotienten korrespondierender Proteinspots der Patienten V (P_n^{V43} / P_n^{V1}) und P (P_n^{P24} / P_n^{P4}) zeigte bei fast allen bei Patient M identifizierten Proteinen eine ähnliche Veränderung der Produktion. Bei einigen Proteinen zeigen die MutS⁺-Isolate der Patienten V und P eine zu dem *mutS*-Isolaten von Patient M vergleichbare Produktion. Beispielsweise produzieren weder V43 (*mutS*) noch V1 (MutS⁺) das Flagellin FliC. Die Katalase A und das Bakterioferritin A konnte weder im Proteinmuster von P24 (*mutS*) noch in dem von P4 (MutS⁺) detektiert werden. Dieses Ergebnis liegt vermutlich daran, dass der Zeitpunkt der Erstisolation eines *P. aeruginosa*-Stamms bei allen Patienten variiert, bzw. diese sich nicht in identischen Krankheitsphasen befanden.

Bei den folgenden exemplarischen Gelen des GZLs der Patienten V (Abbildung C-27) und P (Abbildung C-28) korrespondieren sowohl die Gelausschnitte (Abbildung C-29 bis Abbildung C-31) als auch die CF-Nummern mit denen in Kapitel C.3.1.1 bei der Darstellung des GZLs von Patient M verwendeten.

In Tabelle C-5 sind die Quotienten aller identifizierten Proteinspots der *mutS*-Stämme M25 und M26, sowie die Quotienten der korrespondierenden Proteinspots der *mutS*-Stämme V43 und P24 aufgelistet.

ERGEBNISSE

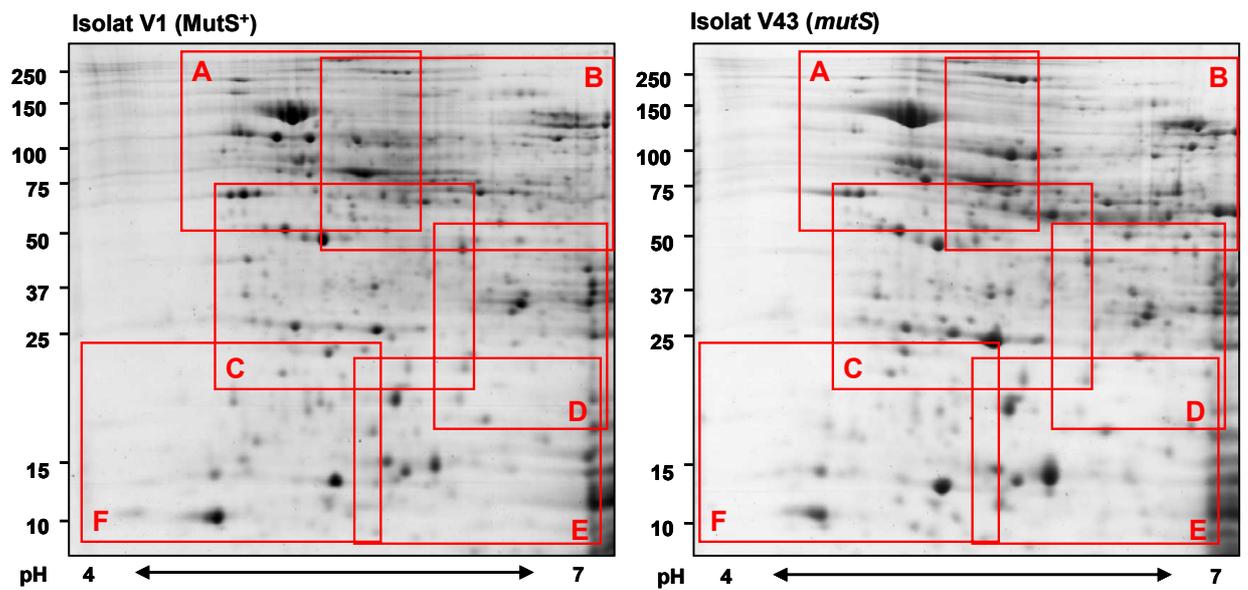


Abbildung C-27: Vergleich der Übersichtsgel des GZLs des *MutS*⁺-Isolats V1 und des späten *mutS*-Isolats V43; pH Bereich 4-7 (12,5% PAA)

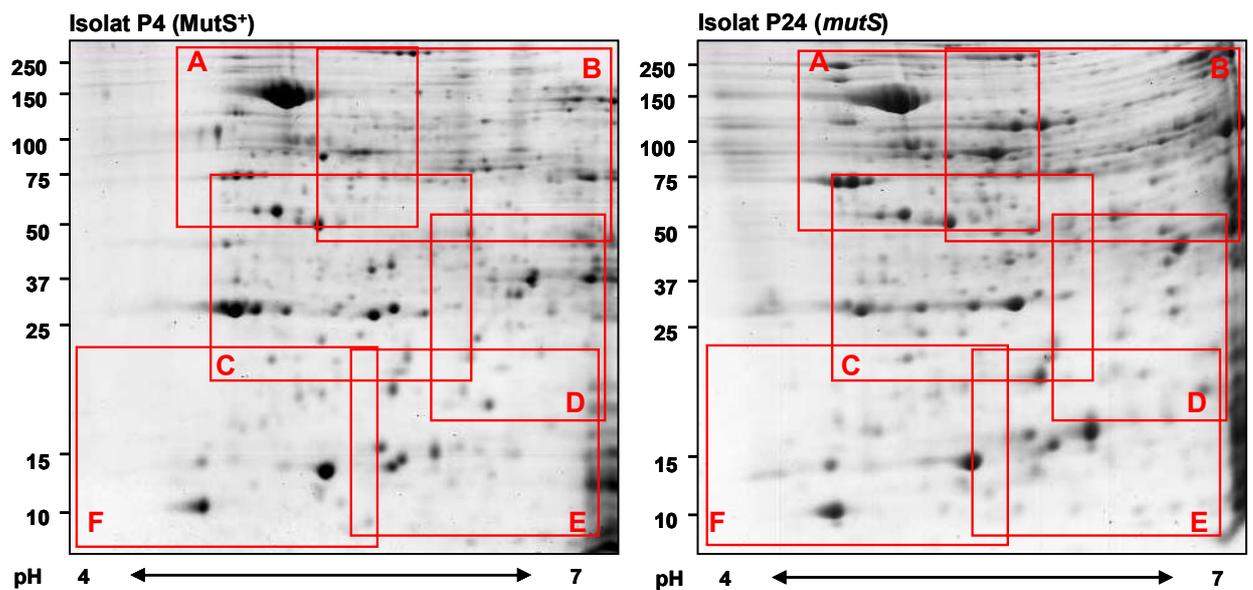


Abbildung C-28: Vergleich der Übersichtsgel des GZLs des *MutS*⁺-Isolats P4 und des späten *mutS*-Isolats P24; pH Bereich 4-7 (12,5% PAA)

ERGEBNISSE

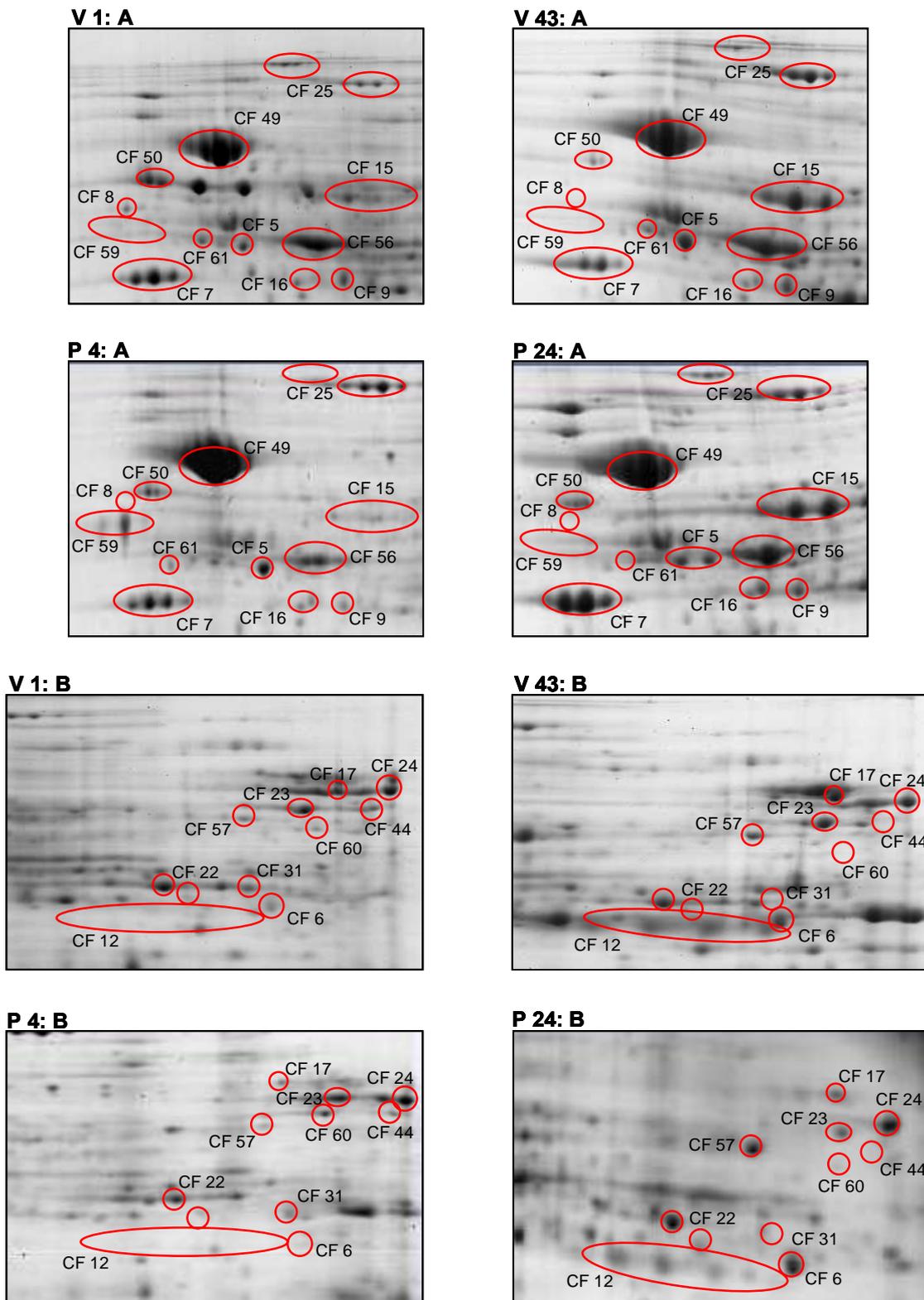


Abbildung C-29: Ausschnitte A und B der Übersichtsgel des GZL der Isolate V1 / V43 und P4 / P24 (Abbildung C-27 und Abbildung C-28)

ERGEBNISSE

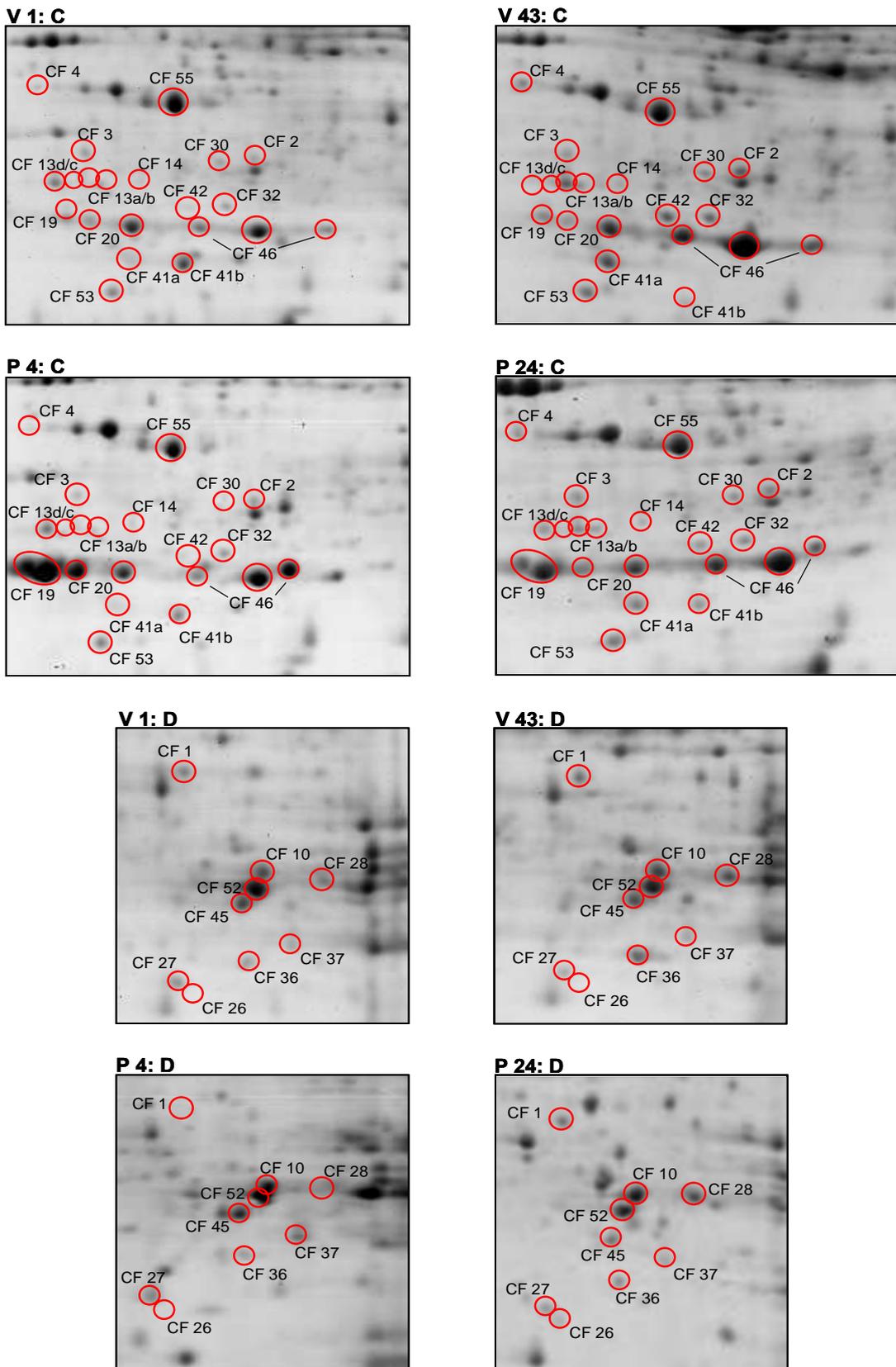


Abbildung C-30: Ausschnitte C und D der Übersichtsgelge des GZL der Isolate V1 / V43 und P4 / P24 (Abbildung C-27 und Abbildung C-28)

ERGEBNISSE

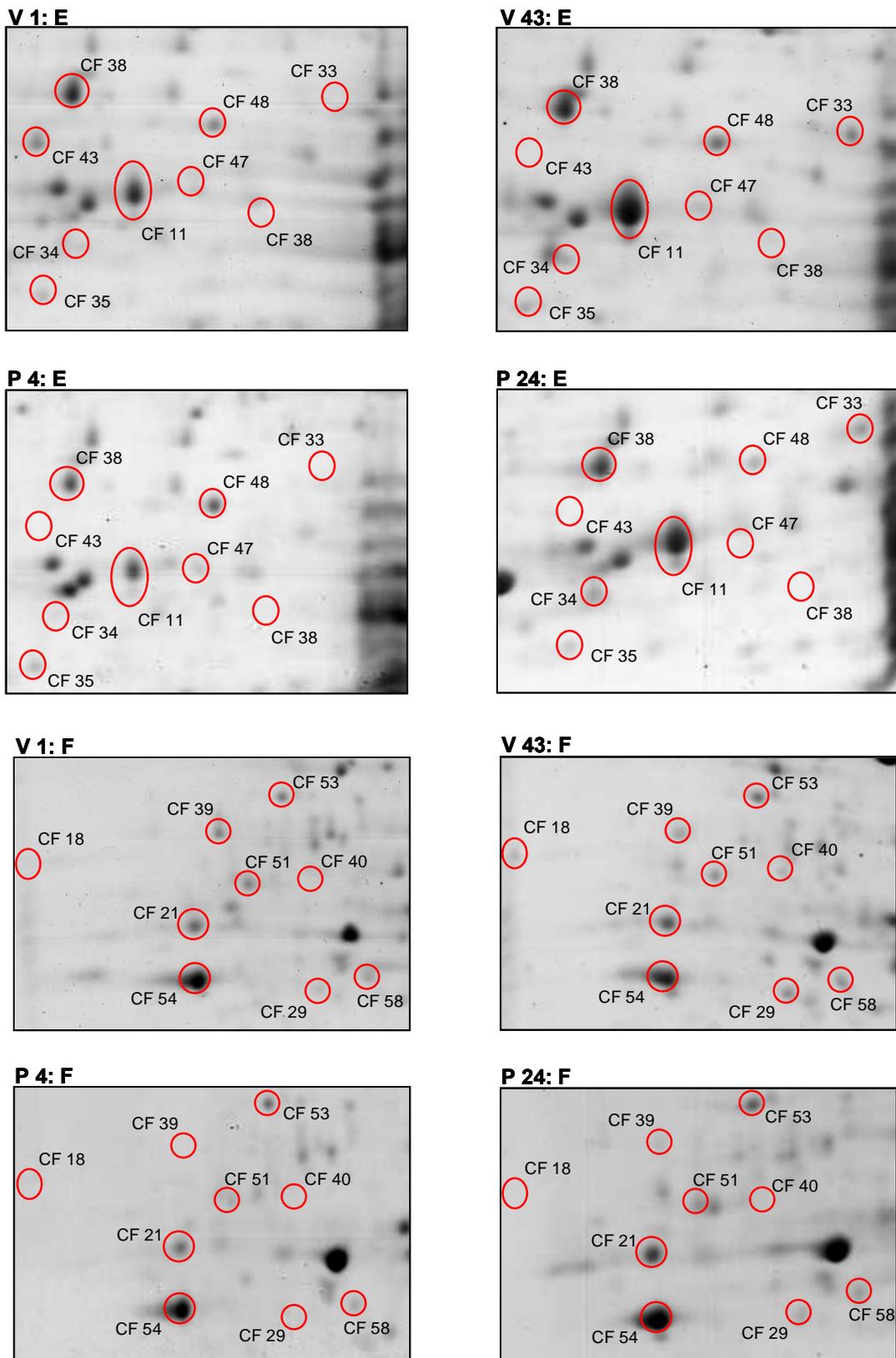


Abbildung C-31: Ausschnitte E und F der Übersichtsgele des GZL der Isolate V1 / V43 und P4 / P24 (Abbildung C-27 und Abbildung C-28)

ERGEBNISSE

Tabelle C-5: Proteinquotienten des GZLs der Isolate von den Patienten M, V und P. (P_n^{Xi}/P_n^{Yi});
P: Protein, n: laufende Nummer (CF-Nr), X: Vergleichsstämme (M26, M25; P24 oder V43),
Y: Bezugsstämme (M1, P4 oder V1). Um den Vergleich korrespondierender Proteinspots
zu erleichtern, wurden die Quotienten der gescatterten Spots zusammengefasst, indem die
Einzelquantitäten addiert und durch die Anzahl der Einzelspots geteilt wurden.

2-DE des GZL						
CF-Nr.	Gen ⁷ -Nr.	Protein	P_n^{M26} / P_n^{M1}	P_n^{M25} / P_n^{M1}	P_n^{P24} / P_n^{P4}	P_n^{V43} / P_n^{V1}
1	1946	RbsB	1,07	2,06	60,72	67,67
2	888	AotJ	2,08	3,38	37,8	89,57
3	5153	/	2,92	3,15	2,56	0,50
4	1260	/	1,15	2,4	120,73	13,98
5	1074	BraC	2,58	2,17	719,67	4,34
6	300	SpuD	3,05	4,97	2,65	2,68
7	1777	OprF	5,2	1,8	7,3	0,43
8	958	OprD	0	0	/	0,27
9	555	Fda	1,82	2,28	86,55	4,19
10	3686	Adk	0,99	2,02	0,53	0,88
11	4922	Azu	1,3	2,9	6,4	5,4
12	4587	CcpR	1,4	3,6	2,1	28,5
13	3120	LeuD	1,0	1,2	0,5	4,8
14	5140	HisF1	1,65	2,27	/	18,51
15	5171	ArcA	1,6	2,0	9,6	8,2
16	5173	ArcC	2,1	4,3	85,9	1,5
17	2888	/	1,77	5,22	3,42	867,99
18	2966	AcpP	104,22	159,77	/	6,78
19	4847	AccB	1,99	2,08	150,35	10,54
20	4031	Ppa	2,5	2,6	0,2	1,41
21	5240	TrxA	1,65	2,43	0,95	1,06
22	1588	SucC	1,3	2,1	165,37	0,63
23	1337	AnsB	0,5	1,7	2,2	5,2
24	4829	LpdG	1,8	1,75	2,08	0,65
25	482	GlcB	2,0	2,2	1,9	4,3
26	5558	AtpF	1,2	2,17	/	0,34
27	5557	AtpH	3,15	2,53	0,66	1,76
28	1049	PdxH	0,91	2,45	216,83	4,23
29	5288	GlnK	4,22	5,54	1,97	81,19
30	1999	AtoD	1,26	0,35	0,47	0,48
31	2001	AtoB	0,49	0,42	0	0,42
32	318	/	1,73	3,13	0,37	1,14
33	2575	/	1,6	2,57	149,34	110,93
34	388	/	8,31	14,4	1,46	7,36

⁷ www.pseudomonas.com

ERGEBNISSE

2-DE des GZL						
CF-Nr.	Gen ⁷ -Nr.	Protein	P _n ^{M26} / P _n ^{M1}	P _n ^{M25} / P _n ^{M1}	P _n ^{P24} / P _n ^{P4}	P _n ^{V43} / P _n ^{V1}
35	3440	/	86,38	180,34	1,16	1,03
36	1677	/	0,37	0,42	1,2	2,08
37	5178	/	0,3	0,31	0,37	0,00
38	3309	/	1,4	0,8	2,26	1,11
39	5339	/	1,78	2,09	6,65	2,94
40	838	BtuE	59,54	115,71	/	/
41	4366	SodB	0,7	0,4	1	243,6
42	2081	/	0,38	9,89	9,94	103,97
43	4235	BfrA	0,12	0	/	0,00
44	4236	KatA	0,01	0,36	/	/
45	139	AhpC	0,71	0,49	0,4	0,8
46	3529	TsaA	0,9	0,9	0,54	2,9
47	3126	IbpA	0,52	0,04	/	/
48	1793	PpiB	1,65	2,62	2	1,74
49	4385	GroEL	0,82	0,8	0,53	0,35
50	1800	Tig	1,81	1,07	0,95	0,32
51	4935	RpsF	2,2	5,26	29,63	14,5
52	4671	/	1,56	1,88	0,93	0,98
53	4755	GreA	1,86	2,15	0,27	0,89
54	4271	RplL	2	4,37	3,25	0,53
55	3655	Tsf	1,0	0,9	0,95	0,3
56	4265	TufA	5,7	2,5	2442,39	1,16
57	3770	GuaB	0,51	3,06	5,74	4,7
58	409	PilH	2,58	2,6	0,09	0,91
59	1092	FliC	0,2	0,0	0	/
60	4416	MurF	0,28	0,46	/	0,00
61	4407	FtsZ	0,52	0,24	0,25	0,72

C.4 Transkriptomanalyse sequentieller CF-Isolate

Die Transkriptomanalyse ist eine sinnvolle Ergänzung zur Proteomanalyse, auch wenn die Halbwertszeiten von Transkript und entsprechendem Protein unterschiedlich sein können. Dabei wird wiederum davon ausgegangen, dass die relativen Veränderungen im Transkriptom unter *in vitro*-Bedingungen auch unter *in vivo*-Bedingungen zutreffen.

Deshalb wurden die Transkripte des Referenzstamms PAO1, sowie 8 sequentieller Isolate von Patient M, nämlich der *MutS*⁺-Stämme M1, M9, M11, M23 und der *mutS*-Stämme M13, M22, M25, M26 analysiert und verglichen.

Die Anzucht der Stämme erfolgte bei 37°C und 300 rpm in LB-Medium in Erlenmeyerkolben, die mit Alufolie verschlossen wurden. Das Medium wurde mit den Stämmen in einer Konzentration von 1:100 beimpft, die Zellen bei einer OD₆₀₀ = 3,0 - 3,5 geerntet, die RNA isoliert und, wie in Kapitel B.5.3.4 beschrieben, weiterbearbeitet. Die Anzuchtbedingungen entsprachen hinsichtlich der Mikroaerobiose denen der Proteomanalyse. Um ein reproduzierbares Ergebnis zu erzielen, wurde jeder Stamm in drei unabhängigen Ansätzen untersucht.

Die Genexpressionsprofile wurden auf der Basis von Oligonukleotid-Arrays erstellt, die 5570 *P. aeruginosa*-Gene, sowie „expressed sequence tags“ (ESIs) repräsentierten. Um die Anzahl fälschlich als differentiell exprimiert erkannter Gene (Fehler 1. Art) zu minimieren, wurde eine stringente statistische Analyse unter Korrektur des Problems multiplen Testens durchgeführt („false discovery rate“; q-Wert; Storey und Tibshirani, 2003). Ein Gen sollte nur dann als tatsächlich differentiell exprimiert angesehen werden, wenn der zugehörige q-Wert unter 5% liegt.

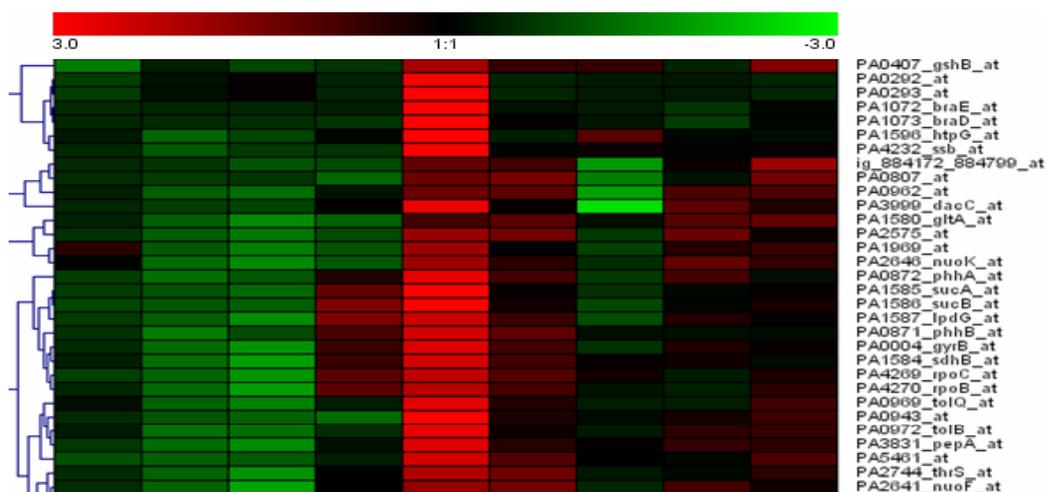


Abbildung C-32: Ausschnitt des Genexpressionsprofils der 8 sequentiellen CF-Isolate von Patient M und des Referenzstamms PAO1. Hierarchisches Cluster-Diagramm der differentiell exprimierten Gene. Jede horizontale Reihe steht für ein Gen, rot bedeutet eine Expression über, grün eine Expression unter dem Mittelwert der jeweiligen Reihe.

C.4.1 Vergleich von Transkriptom- und Proteomdaten

Da die Proteine den Transkripten folgen, ist ein Vergleich der Proteom- mit den Transkriptomdaten sinnvoll. Dabei könnten die Proteomdaten teilweise mit den Transkriptomdaten übereinstimmen. Andererseits könnte dieser Vergleich zusätzlich neue Hinweise zu Unterschieden in den Halbwertszeiten von Transkript und korrespondierendem Protein geben.

M25 wird hier wieder aus den in C.3.1.1.1 genannten Gründen als Letztisolat von Patient M verwendet. Wie bei der Auswertung des Proteoms diente das MutS⁺-Isolat M1 als Bezugsstamm für die Berechnung der Transkriptquotienten. Die Proteomdaten des *mutS*-Stamms M20 können nicht direkt mit den Transkriptomdaten des *mutS*-Stamms M22 verglichen werden und sind hier nur der Vollständigkeit halber aufgezählt.

Widersprüchliche Konzentrationen von Protein und Transkript wurden beispielsweise bei dem Bindungsproteinvorläufer eines ABC-Ribosetransporters RbsB, dem Acylträgerprotein AcpP, dem Biotin-Carboxylträgerprotein AccB und den beiden Transferasen AtoD (CoA-Transferase) und AtoB (Acetyl-CoA-Acetyltransferase) gefunden. Dabei wiesen die Proteine vor allem bei den Stämmen M13 und M25 eine relativ verminderte Konzentration im Vergleich zu M1 auf, während die korrespondierenden Transkripte eine relative Erhöhung zeigten. AtoB und AtoD dienen vor allem dem Abbau von Acetoacetat zu Acetyl-CoA.

Eine erhöhte Proteinkonzentration bei einer verminderten Menge des korrespondierenden Transkripts war nur selten zu finden, wie beispielsweise bei der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase 3 (Lpd 3) in M13.

Eine übereinstimmend erhöhte Konzentration von Protein und korrespondierendem Transkript war beispielsweise bei der Adenylatkinase (*adk*), der Glutaminase-Asparaginase (*ansB*) und der Malatsynthase G (*glcB*), bei Teilen des Argininabbau-Operons (*arcCDAB*), der Succinyl-CoA-Synthetase (*sucCD*) oder der ATPase (*atpCDGAHFEBI*) zu finden.

In der nachfolgenden Tabelle C-6 werden die Quotienten der Proteinmenge der Isolate von Patient M ($P_n^{M_i} / P_n^{M_1}$), zusammen mit dem Quotienten der Transkriptmengen der korrespondierenden Gene dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle C-6: Vergleich von Proteom- und Transkriptomdaten. Auflistung der Quotienten der im Proteom von Patient M als differentiell identifizierten Proteine (P_n^{Mi} / P_n^{M1}), zusammen mit den Quotienten der korrespondierenden Transkripte (T_n^{Mi} / T_n^{M1}). Die Quotienten der gescatterten Proteinspots sind zusammengefasst, indem die Einzelquantitäten addiert und durch die Anzahl der Einzelspots geteilt wurden. Neben den Quotienten der Transkripte ist in Klammern der zugehörige q-Wert angegeben: $q \leq 5$: Das Gen kann als tatsächlich differentiell exprimiert angesehen werden; $q > 5$: Das Gen kann nicht als tatsächlich differentiell exprimiert angesehen werden.

P: Protein; **T:** Transkript; **n:** CF-Nummer; **X:** Patient; **i:** Isolatindex. Schwarz: keine differentielle Produktion ($0,5 < x < 2$); Rot: stärker produziert ($x \geq 2$); Grün: schwächer produziert ($x \leq 0,5$)

CF-Nr.	Gen-Nr. ⁸	Gen	Proteom						Transkriptom					
			P_n^{Mi} / P_n^{M1}						T_n^{Mi} / T_n^{M1}					
			M9	M13	M20	M23	M26	M25	M9	M13	M22	M23	M26	M25
1	1946	<i>rbsB</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	2,1	1,4 (57,8)	2,7 (12,5)	2,0 (4,0)	2,0 (21,8)	1,0 (> 18,4)	1,2 (29,6)
2	888	<i>aotJ</i>	0,2	0,3	0,4	0,3	2,1	3,4	1,0 (> 61,7)	2,0 (1,7)	1,8 (0,9)	2,7 (4,9)	2,1 (0,06)	1,9 (4,7)
3	5153	/	0,6	0,4	0,2	0,3	2,9	3,2	0,9 (43,6)	1,2 (15)	0,9 (10,5)	1,0 (> 29,5)	1,4 (0,4)	1,4 (15,7)
4	1260	/	0,6	0,3	0,5	0,0	1,2	2,4	1,0 (> 61,7)	0,9 (> 20,7)	0,7 (0,9)	0,8 (4,2)	4,9 (0,02)	0,6 (0,8)
5	1074	<i>braC</i>	1,4	0,1	0,7	0,2	2,6	2,2	0,4 (8,9)	1,9 (0,4)	1,1 (18,5)	1,0 (> 29,5)	1,1 (15,9)	1,2 (19,6)
6	300	<i>spuD</i>	0,7	1,9	1,0	0,4	3,1	5,0	1,2 (5,9)	2,3 (0,3)	2,2 (2,5)	1,5 (12,7)	2,3 (0,02)	1,7 (0,7)
7	1777	<i>oprF</i>	0,4	0,5	1,9	2,6	5,2	1,8	0,8 (17,6)	1,1 (3,8)	0,9 (5,9)	1,1 (24,4)	1,4 (0,4)	1,2 (4,7)
8	958	<i>oprD</i>	0,4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9 (49,6)	2,6 (1,7)	0,7 (1,8)	0,4 (1,7)	0,6 (0,4)	0,9 (20,6)
9	555	<i>fda</i>	3,4	1,6	1,4	1,2	1,8	2,3	1,2 (58,6)	2,7 (0,2)	1,9 (1,8)	2,0 (2,8)	2,5 (0,02)	2,0 (6,9)
10	3686	<i>adk</i>	1,9	1,7	3,1	2,1	1,0	2,0	1,0 (> 61,7)	2,2 (0,2)	2,2 (0,9)	3,1 (2,0)	2,6 (0,02)	3,0 (2,4)
11	4922	<i>azu</i>	0,8	1,1	0,6	0,7	1,3	2,9	1,0 (> 61,7)	1,1 (15,6)	1,2 (13,0)	0,7 (8,0)	1,2 (6,0)	1,0 (30,6)
12	4587	<i>ccpR</i>	0,3	0,1	0,1	0,1	1,4	3,6	1,7 (43,6)	2,0 (5,6)	1,6 (18,0)	0,9 (18,6)	1,0 (17,7)	2,1 (0,85)
13	3120	<i>leuD</i>	0,3	0,0	0,2	0,0	1,0	1,2	0,8 (7,9)	1,1 (18,6)	1,4 (1,8)	1,1 (> 29,5)	1,0 (16,9)	1,4 (2,4)
14	5140	<i>hisF1</i>	0,6	0,2	0,1	0,0	1,7	2,3	0,9 (14,0)	1,1 (15,7)	1,1 (9,7)	1,2 (23,8)	1,1 (2,2)	1,4 (0,1)

⁸ www.pseudomonas.com

ERGEBNISSE

CF-Nr.	Gen-Nr. ⁸	Gen	Proteom						Transkriptom					
			P_n^{Mi} / P_n^{M1}						T_n^{Mi} / T_n^{M1}					
			M9	M13	M20	M23	M26	M25	M9	M13	M22	M23	M26	M25
15	5171	<i>arcA</i>	4,1	13,6	3,3	0,9	1,3	2,0	0,5 (20,2)	3,7 (1,7)	4,7 (3,3)	0,6 (16,3)	2,3 (0,4)	4,1 (0,3)
16	5173	<i>arcC</i>	71,0	8,8	3,3	1,3	2,1	4,3	0,7 (35,9)	3,9 (4,6)	4,0 (1,8)	0,8 (19,8)	1,7 (0,6)	5,4 (0,1)
17	2888	/	1,2	1,4	1,1	1,1	1,8	5,2	0,9 (43,6)	0,6 (0,5)	0,5 (0,07)	0,8 (7,9)	0,5 (0,02)	13,4 (0,1)
18	2966	<i>acpP</i>	0,0	0,1	0,1	0,1	104,2	159,8	1,2 (61,4)	3,7 (1,7)	2,6 (3,3)	3,4 (3,2)	4,3 (0,04)	3,0 (0,4)
19	4847	<i>accB</i>	0,6	0,2	0,3	0,0	2,0	2,1	1,5 (43,6)	3,6 (0,9)	3,9 (0,2)	2,7 (4,2)	3,9 (0,02)	1,7 (12,6)
20	4031	<i>ppa</i>	2,2	1,2	2,5	1,3	2,5	2,6	1,0 (54,0)	2,1 (0,7)	1,4 (9,7)	2,2 (3,2)	2,0 (0,02)	1,6 (8,1)
21	5240	<i>trxA</i>	0,8	0,6	0,4	0,3	1,7	2,4	1,2 (35,4)	1,5 (0,9)	1,8 (6,9)	1,9 (3,2)	1,9 (0,02)	1,6 (0,8)
22	1588	<i>sucC</i>	1,7	2,0	2,4	2,4	1,3	2,1	0,7 (18,4)	2,3 (0,9)	1,9 (0,3)	2,2 (2,7)	1,6 (0,1)	1,9 (6,6)
23	1337	<i>ansB</i>	0,5	1,7	2,8	2,8	0,5	1,7	0,9 (35,4)	2,2 (0,06)	2,8 (0,9)	1,3 (21,6)	2,3 (0,06)	2,6 (0,1)
24	4829	<i>lpd3</i>	3,0	12,2	9,5	3,4	1,8	1,8	0,7 (4,1)	0,4 (0,2)	0,5 (0,07)	0,7 (4,2)	2,4 (0,02)	2,2 (0,1)
25	482	<i>glcB</i>	1,4	1,0	2,5	1,3	2,0	2,2	0,8 (26,1)	1,9 (0,2)	3,3 (0,07)	1,6 (17,5)	5,0 (0,02)	4,5 (0,1)
26	5558	<i>atpF</i>	2,2	0,4	2,1	0,6	1,2	2,2	1,2 (57,4)	4,4 (0,5)	3,4 (0,07)	4,1 (2,3)	3,3 (0,02)	2,6 (4,7)
27	5557	<i>atpH</i>	3,2	0,8	1,1	1,3	3,2	2,5	0,7 (20,2)	4,4 (1,7)	3,4 (0,2)	4,1 (3,2)	3,3 (0,04)	2,6 (4,7)
28	1049	<i>pdxH</i>	1,3	0,6	0,2	0,5	0,9	2,5	0,9 (35,4)	1,0 (16,7)	0,9 (0,9)	0,9 (17,5)	0,9 (1,0)	1,2 (4,7)
29	5288	<i>glnK</i>	1,6	1,2	0,8	0,9	4,2	5,5	0,7 (15,8)	1,5 (0,06)	1,6 (1,8)	0,6 (0,6)	1,0 (4,5)	1,1 (4,7)
30	1999	<i>atoD</i>	1,1	0,0	0,3	0,1	1,3	0,4	2,2 (4,4)	2,8 (2,3)	10,8 (0,1)	4,8 (0,7)	1,8 (0,2)	2,0 (2,4)
31	2001	<i>atoB</i>	0,9	0,1	0,0	0,3	0,5	0,4	1,9 (6,5)	2,8 (1,7)	9,8 (0,07)	3,1 (2,0)	2,1 (0,4)	3,6 (4,7)
32	318	/	0,7	0,5	0,5	0,6	1,7	3,1	1,0 (53,0)	1,6 (0,3)	2,0 (0,5)	1,4 (2,9)	1,4 (0,4)	2,0 (0,1)
33	2575	/	0,7	0,1	0,0	0,0	1,6	2,6	1,2 (61,5)	4,8 (0,06)	5,2 (0,3)	2,2 (3,7)	3,6 (0,02)	4,7 (0,1)
34	388	/	5,2	0,7	1,1	0,5	8,3	14,4	0,7 (10,7)	2,1 (0,9)	2,1 (0,2)	1,2 (22,4)	1,5 (0,4)	1,8 (1,1)
35	3440	/	0,0	0,2	0,3	0,3	86,4	180,3	0,9 (43,6)	2,3 (0,4)	1,9 (1,8)	2,8 (2,3)	1,7 (0,2)	0,9 (21,3)
36	1677	/	1,4	0,2	0,3	0,5	0,4	0,4	0,8 (10,1)	2,4 (0,06)	2,5 (0,9)	1,6 (8,0)	2,8 (0,02)	2,4 (4,7)
37	5178	/	3,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	1,1 (20,2)	0,3 (0,2)	0,2 (0,07)	0,4 (0,6)	0,4 (0,02)	0,3 (0,1)
38	3309	/	0,4	0,9	0,1	1,0	1,4	0,8	0,5 (26,1)	0,5 (4,6)	1,1 (23,7)	0,8 (> 29,5)	0,7 (8,6)	1,8 (11,1)

ERGEBNISSE

CF-Nr.	Gen-Nr. ⁸	Gen	Proteom						Transkriptom					
			P_n^{Mi} / P_n^{M1}						T_n^{Mi} / T_n^{M1}					
			M9	M13	M20	M23	M26	M25	M9	M13	M22	M23	M26	M25
39	5339	/	0,4	1,3	0,2	0,4	1,8	2,1	1,0 (> 61,7)	2,9 (0,3)	5,2 (0,2)	2,2 (3,7)	4,9 (0,02)	3,9 (0,1)
40	838	<i>btuE</i>	0,0	8,2	0,3	0,3	59,5	115,7	0,9 (7,9)	1,3 (0,3)	1,5 (0,3)	0,9 (17,5)	1,0 (18,0)	1,1 (4,7)
41	4366	<i>sodB</i>	1,2	0,6	0,1	0,4	0,7	0,4	1,1 (61,2)	3,1 (0,2)	2,4 (0,07)	1,6 (8,0)	2,8 (0,04)	1,7 (6,6)
42	2081	/	0,5	0,1	0,5	0,0	0,4	9,9	0,9 (46,2)	1,7 (0,3)	1,9 (1,8)	1,7 (4,8)	10,3 (0,02)	4,9 (4,7)
43	4235	<i>bfrA</i>	0,3	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	1,0 (> 61,7)	2,9 (0,06)	2,1 (0,3)	1,6 (8,0)	2,2 (0,02)	1,4 (6,6)
44	4236	<i>katA</i>	0,6	0,0	2,1	1,2	0,0	0,4	1,4 (46,2)	2,2 (0,7)	3,1 (2,5)	1,0 (> 29,5)	1,8 (0,09)	2,2 (2,4)
45	139	<i>ahpC</i>	0,4	0,8	0,2	1,5	0,7	0,5	0,9 (35,4)	2,7 (0,06)	2,7 (0,2)	1,3 (12,7)	2,1 (0,04)	2,0 (0,3)
46	3529	<i>tsaA</i>	0,5	0,7	0,9	1,3	0,9	0,9	0,7 (7,1)	1,4 (0,2)	1,3 (0,9)	1,1 (20,7)	1,2 (1,0)	1,7 (0,1)
47	3126	<i>ibpA</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	1,4 (60,2)	2,7 (0,2)	1,4 (11,8)	2,5 (2,3)	1,6 (10,5)	5,4 (8,1)
48	1793	<i>ppiB</i>	1,6	0,7	0,4	0,8	1,7	2,6	1,1 (61,5)	2,7 (0,2)	1,4 (0,3)	2,5 (1,4)	1,6 (0,02)	5,4 (0,1)
49	4385	<i>groEL</i>	0,6	2,0	1,8	2,9	0,8	0,8	1,2 (61,5)	3,9 (0,2)	2,1 (0,9)	2,8 (1,7)	2,3 (0,6)	2,5 (0,4)
50	1800	<i>tig</i>	3,9	3,7	2,2	0,4	1,8	1,1	1,0 (> 61,7)	5,2 (0,5)	3,5 (1,8)	3,9 (2,8)	4,8 (0,06)	3,8 (6,6)
51	4935	<i>rpsF</i>	3,9	3,5	1,4	3,1	2,2	5,3	0,9 (51,9)	5,9 (0,5)	3,5 (1,8)	4,6 (4,8)	7,3 (0,02)	5,9 (2,4)
52	4671	/	3,1	3,1	4,2	5,0	1,6	1,9	0,8 (43,6)	3,9 (0,9)	2,8 (2,5)	4,0 (2,8)	4,5 (0,02)	3,8 (2,4)
53	4755	<i>greA</i>	0,7	0,5	0,3	0,3	1,9	2,2	0,9 (434,6)	2,0 (0,2)	2,2 (0,2)	1,9 (8,0)	1,8 (0,02)	2,1 (0,7)
54	4271	<i>rplL</i>	1,4	2,6	4,9	1,4	2,0	4,4	1,7 (49,6)	12,1 (0,4)	6,8 (0,9)	9,8 (2,7)	13,3 (0,02)	8,1 (1,1)
55	3655	<i>tsf</i>	1,8	1,8	3,2	2,7	1,0	0,9	0,9 (35,4)	4,7 (0,9)	2,8 (3,3)	4,5 (3,7)	5,4 (0,02)	2,8 (8,1)
56	4265	<i>tufA</i>	2,0	10,3	8,8	9,3	5,7	2,5	1,1 (> 61,7)	3,8 (0,3)	3,4 (0,2)	3,3 (3,2)	3,8 (0,06)	3,1 (0,9)
57	3770	<i>guaB</i>	2,7	4,0	2,1	9,4	0,5	3,1	0,7 (35,4)	4,0 (1,7)	7,6 (0,1)	2,9 (8,0)	4,4 (0,02)	3,5 (2,4)
58	409	<i>pilH</i>	0,7	0,1	0,2	0,1	2,6	2,6	0,6 (11,2)	1,1 (19,7)	1,0 (> 24,7)	1,1 (> 29,5)	0,9 (8,5)	0,6 (4,7)
59	1092	<i>fliC</i>	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	1,1 (35,4)	1,0 (17,7)	1,2 (4,2)	0,9 (8,0)	1,0 (17,8)	1,1 (9,7)
60	4416	<i>murF</i>	0,5	0,5	0,7	0,6	0,3	0,5	0,8 (35,4)	1,1 (12,5)	1,3 (1,8)	1,0 (> 29,5)	1,2 (2,2)	1,2 (16,6)
61	4407	<i>ftsZ</i>	0,4	0,1	0,1	0,2	0,5	0,2	0,7 (20,2)	1,8 (0,3)	2,3 (0,9)	0,9 (> 29,5)	1,3 (0,8)	1,2 (14,8)

C.4.2 Globale Auswertung der Transkriptomdaten

Um eine globale und aussagekräftige Auswertung der Transkriptomdaten zu erreichen, wurden im Folgenden die Transkripte mehrerer Stämme zueinander in Bezug gesetzt.

C.4.2.1 Bezug zweier später *mutS*-Stämme auf einen frühen *MutS*⁺-Stamm

Zunächst wurden die Transkripte der beiden späten *mutS*-Isolate M25 und M26 (vgl. C.3.1.1) auf das Transkript des frühen *MutS*⁺-Isolats M1 bezogen ($Q_n = \bar{U}_n / T_n^{M1}$), um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Veränderungen den *mutS*-Isolaten M25 und M26 gemein sind.

Bei dieser Analyse wurde das arithmetische Mittel \bar{U}_n der Menge U_n der jeweiligen Transkriptkonzentrationen eines Gens der Stämme gebildet ($U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; n: CF-Nr.). Bei der statistischen Auswertung der Daten wurde die Bedingung des signifikanten Unterschieds ($Q_n \leq 0,5$; oder $Q_n \geq 2$) mit der Bedingung des niedrigsten (bei dieser Auswertung vorkommenden) q-Werts ($q = 0,037$) verknüpft.

Transkripte, welche beide Bedingungen erfüllen ($Q_n \geq 2$: $n = 294$; $Q_n \leq 0,5$: $n = 534$), wurden zu funktionellen Gruppen zusammengefasst. Das Ergebnis ist in Abbildung C-33 in graphischer Form dargestellt. Eine Auflistung der einzelnen Transkriptwerte dieser Auswertung befindet sich im Anhang.

38 hyperproduzierte Transkripte (z.B. Transkripte der Gene für die Aconitathydratase *AcnA*, die Citratsynthase *GltA*, die Succinatdehydrogenase *SdhB*, die Ketoglutaratdehydrogenase *SucAB* und die Lipoamiddehydrogenase *LpdG*) weisen auf die starke Expression, 17 schwach produzierte Transkripte (z.B. Transkripte der Gene für den Cytochrom c-Oxidase-Komplex [*CoxBA*], die Fumarathydratase *FumC* und für Proteine des periplasmatischen [*NapA*] und cytoplasmatischen Nitratreduktase-Komplexes [*NarIH*]) auf eine abgeschwächte Expression dieser Gene des Energiemetabolismus hin. 27 hyperproduzierte Transkripte (z.B. die Transkripte der Gene für den Argininabbau [*aruC*, *aruG*, *aruD*, *aruB*]) weisen auf die starke Expression, 4 schwach produzierte Transkripte (z.B. das Transkript des Gens für die Leucindehydrogenase *Ldh*) auf eine abgeschwächte Expression von Genen des Aminosäuremetabolismus hin. Für Gene der translationalen / posttranslationalen Modifikation konnten 28 stark produzierte Transkripte (z.B. von ribosomalen SSU- und LSU-Proteinen oder des Elongationsfaktors *Tu*) und 3 schwach produzierte Transkripte (z.B. des *fusA2*-Gens für den Elongationsfaktor *G*) nachgewiesen werden. Die Ergebnis-

ERGEBNISSE

se dieser Auswertung der Transkriptomdaten (\bar{U}_n / T_n^{M1}) sind (zusammen mit der Auswertung P_n^{M25} / P_n^{M1} der Proteomdaten) die Grundlage der in Kapitel C.6 erstellten spekulativen Metabolom-Modelle.

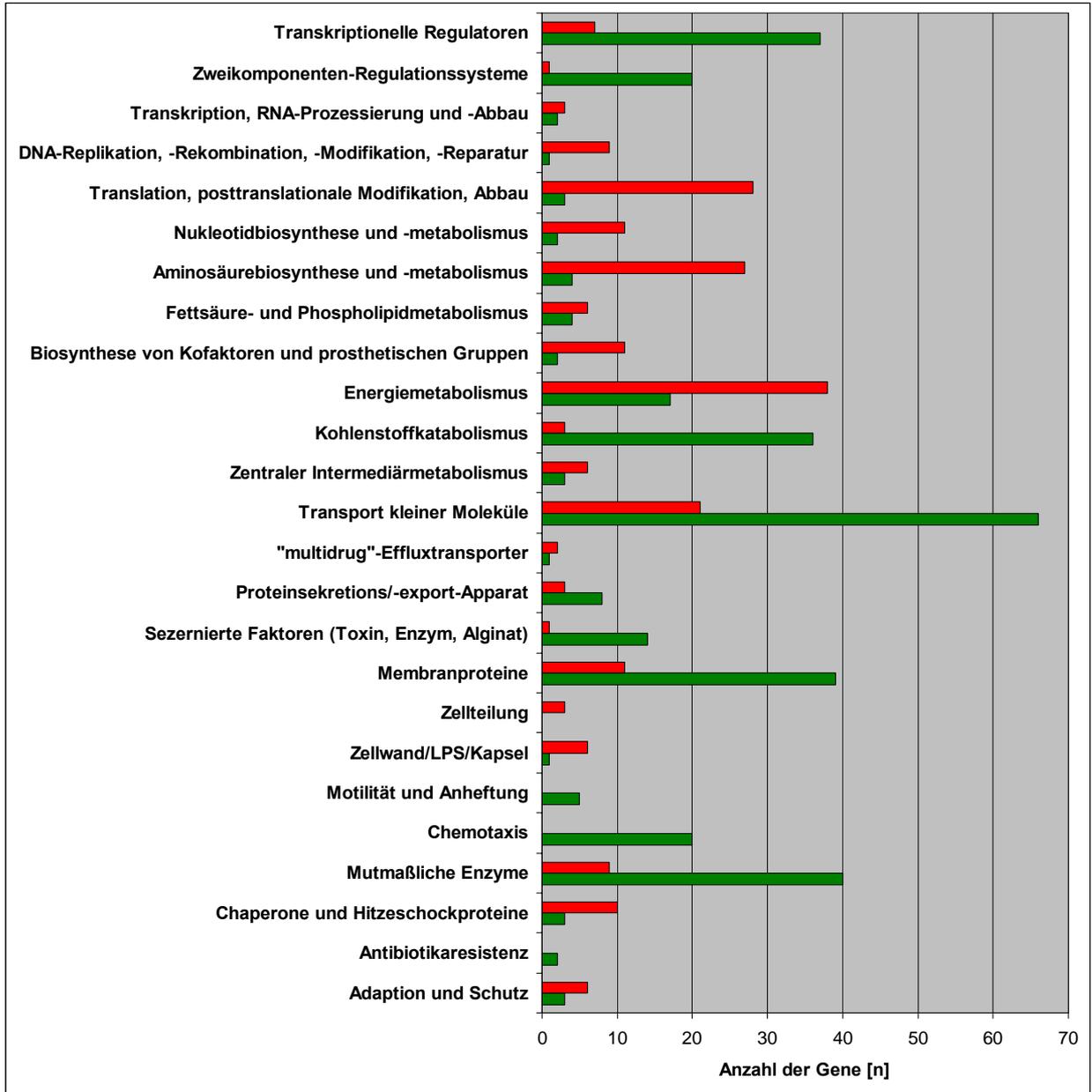


Abbildung C-33: $Q_n = \bar{U}_n / T_n^{M1}$. Einteilung der Gene, deren Transkripte im Vergleich zum frühen $MutS^+$ -Isolat M1 in den späten *mutS*-Isolaten M25 und M26 stärker (rote Balken) oder schwächer (grüne Balken) produziert sind, in funktionelle Gruppen. Die x-Achse beschreibt die Anzahl [n] der jeweiligen Gene. Die Gene der hypothetischen Proteine wurden in dieser Graphik nicht mehr berücksichtigt. **T**: Transkript; **n**: CF-Nummer; **X**: Patient; **i**: Patientenisolat; $U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; \bar{U}_n = arithmetisches Mittel von U_n .

C.4.2.2 Bezug *mutS*- auf MutS⁺-Stämme

Bei dieser Auswertung wurden die Transkripte (T) aller analysierten *mutS*-Isolate (M13, M22, M25, M26) zu den Transkripten der MutS⁺-Isolate M1, M9, M11 und M23 des Patienten M in Bezug gesetzt ($Q_n = \bar{A}_n / \bar{E}_n$), um eine Aussage über Veränderungen treffen zu können, die allen *mutS*-Stämmen gemein sind. Dazu wurden die arithmetischen Mittel \bar{A}_n und \bar{E}_n der Mengen A_n und E_n der jeweiligen Transkriptwerte eines Gens der Stämme gebildet ($A_n = \{T_n^{M13}, T_n^{M22}, T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; $E_n = \{T_n^{M1}, T_n^{M9}, T_n^{M11}, T_n^{M23}\}$; n: CF-Nr). Bei der statistischen Auswertung der Daten wurde die Bedingung des signifikanten Unterschieds ($Q_n \leq 0,5$; oder $Q_n \geq 2$) mit der des niedrigsten (bei dieser Auswertung vorkommenden) q-Werts ($q = 0,089$) verknüpft.

Transkripte, welche beide Bedingungen erfüllen ($Q_n \geq 2$: n = 123; $Q_n \leq 0,5$: n = 140) wurden zu funktionellen Gruppen zusammengefasst. Das Ergebnis ist in Abbildung C-34 in graphischer Form dargestellt. Eine Auflistung der einzelnen Transkriptwerte dieser Auswertung befindet sich im Anhang.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen phänotypischer Tests und der 2-DE kann auf eine Abschwächung der Expression von Virulenz-assoziierten Genen bei *mutS*-Stämmen geschlossen werden. Eine schwache Konzentration wurde bei Transkripten für Gene des Chemotaxisapparats (z.B. für das *pctB*-Gen des Chemotaxis-Transduktors PxtB) und für Gene sezernierter Enzyme wie der Elastase LasB oder der Siderophore Pyochelin festgestellt.

Erhöhte Transkriptmengen von Genen, die für Schutzmechanismen kodieren, wie beispielsweise Chaperone und Hitzeschock-Proteine, von Genen für Resistenzproteine und von Genen, deren Genprodukte für die Adaptation an neues Milieu verantwortlich sind, lassen auf eine erhöhte Expression dieser Gene in den *mutS*-Stämmen schließen. Die deutlichste Erhöhung zeigten Transkripte für Gene des Energiemetabolismus (z.B. Transkripte der Gene für die Aconitathydratase AcnA, die Citratsynthase GltA und für die NADH-Dehydrogenase). Erhöhte Transkriptmengen fanden sich auch bei Genen, die für Proteine des Argininabbaus (z.B. AruE) und des Abbaus aromatischer Aminosäuren wie Phenylalanin (PhhA) kodieren. Bei Transkripten von Genen, die für Proteine des Nukleotidmetabolismus (z.B. für das *purC*-Gen der Phosphoribosylaminoimidazol-Succinocarboxamid-Synthase), oder der translationalen/posttranslationalen Modifikation (z.B. für das *rpmF*-, das *rplQ*- und das *rplT*-Gen der ribosomalen LSU-Proteine L 32, L17 und L20) kodieren, wurde ebenfalls eine erhöhte Konzentration festgestellt.

ERGEBNISSE

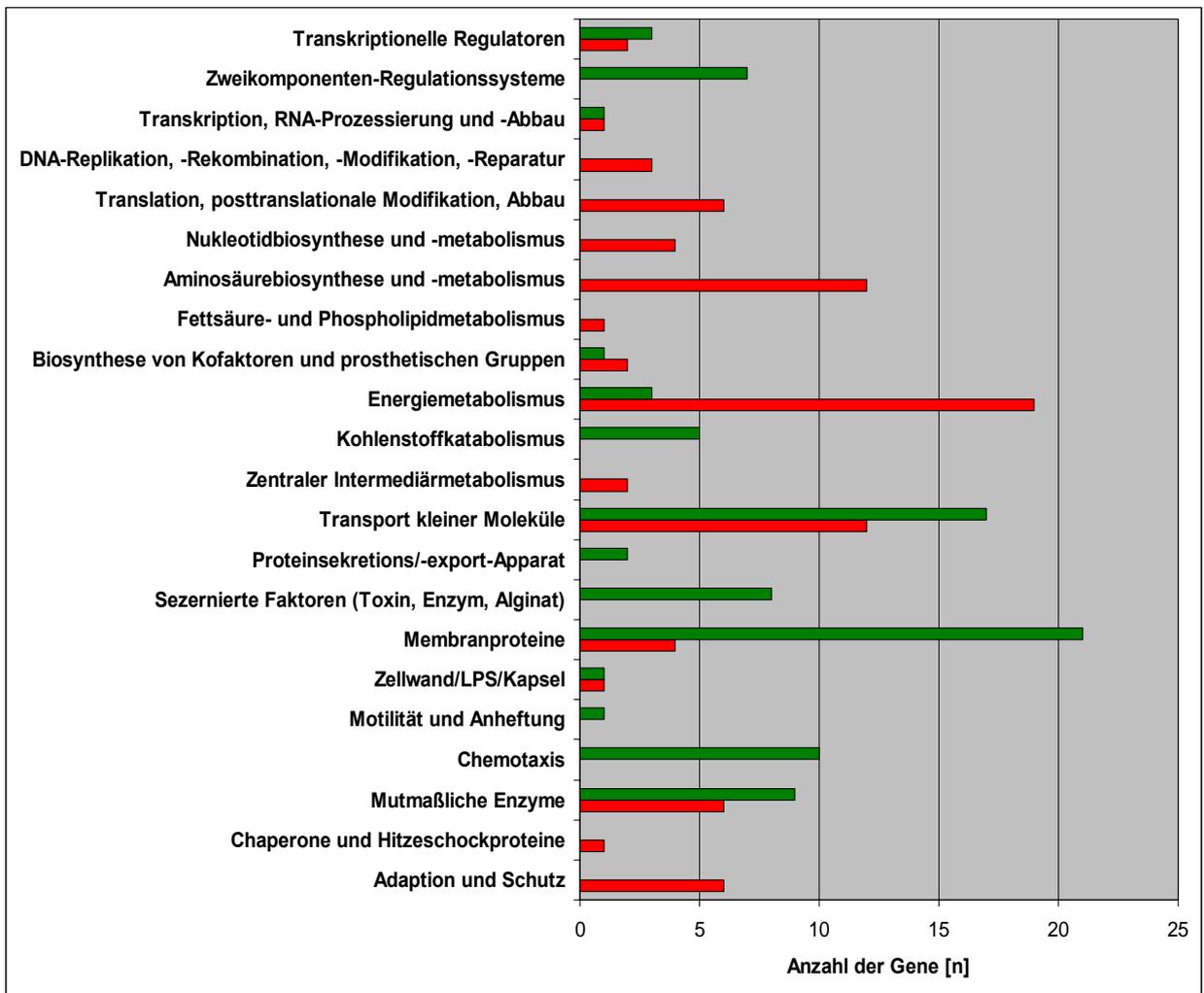


Abbildung C-34: $Q_n = \bar{A}_n / \bar{E}_n$. Einteilung der Gene, deren Transkripte in den *mutS*-Stämmen eine starke (rote Balken) oder schwache (grüne Balken) Konzentration aufweisen, in funktionelle Gruppen. Die x-Achse beschreibt die Anzahl [n] der jeweiligen Gene. Die Gene der hypothetischen Proteine wurden in dieser Graphik nicht mehr berücksichtigt.

T: Transkript; n: CF-Nummer; X: Patient; i: Patientenisolat;
 $A_n = \{T_n^{M13}, T_n^{M20}, T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; $E_n = \{T_n^{M1}, T_n^{M9}, T_n^{M11}, T_n^{M23}\}$;
 \bar{A}_n = arithmetisches Mittel von A_n ; \bar{E}_n = arithmetisches Mittel von E_n .

C.5 Markerproteine der Lungenadaptation

In der nachfolgende Tabelle C-7 ist eine Auflistung der Quotienten der Proteine der Proteomdaten P_n^{M25} / P_n^{M1} , die eine relativ erhöhte Produktion ($P_n^{M25} / P_n^{M1} \geq 2$) zeigten, sowie der prominentesten Quotienten der Proteomdaten P_n^{M13} / P_n^{M1} und P_n^{M20} / P_n^{M1} zusammengestellt. Darüber hinaus sind auch die korrespondierenden Transkriptomdaten T_n^{Mi} / T_n^{M1} , sowie die korrespondierenden Proteomdaten P_n^{P24} / P_n^{P4} des Patienten P und P_n^{V43} / P_n^{V1} des Patienten V dargestellt. Die Proteomdaten des *mutS*-Stamms M20 können nicht direkt mit den Transkriptomdaten des *mutS*-Stamms M22 verglichen werden und sind hier nur der Vollständigkeit halber aufgezählt.

Proteine, wie beispielsweise das ribosomale Protein RpsF, der Polyamintransporter SpuD, das Redoxprotein Azurin, oder metabolische Proteine, wie die Malatsynthese G (GlcB) und Proteine des *arc*-Operons, die eine Hyperproduktion in allen drei späten *mutS*-Stämmen M25, P24 und V43 zeigen, können Indikatoren der Anpassung von *P. aeruginosa* an das besondere Milieu der entzündeten CF-Lunge (Abszess-Milieu) und damit von diagnostischem Wert sein.

ERGEBNISSE

Tabelle C-7: Auflistung der Quotienten der Proteine der Proteomdaten P_n^{M25} / P_n^{M1} mit relativ erhöhter Produktion ($P_n^{M25} / P_n^{M1} \geq 2$), sowie der prominentesten Quotienten der Proteomdaten P_n^{M13} / P_n^{M1} und P_n^{M20} / P_n^{M1} . Sowie die korrespondierenden Transkriptomdaten T_n^{Mi} / T_n^{M1} und die korrespondierenden Proteomdaten P_n^{P24} / P_n^{P4} des Patienten P und P_n^{V43} / P_n^{V1} des Patienten V.

Die Quotienten der gescatterten Proteinspots sind zusammengefasst, indem die Einzelquantitäten addiert und durch die Anzahl der Einzelspots geteilt wurden. Neben den Quotienten der Transkripte ist in Klammern der zugehörige q-Wert angegeben: $q \leq 5$: Das Gen kann als tatsächlich differentiell exprimiert angesehen werden; $q > 5$: Das Gen kann nicht als tatsächlich differentiell exprimiert angesehen werden. **P**: Protein; **T**: Transkript; **n**: CF-Nummer; **X**: Patient; **i**: Iso-
latindex. Schwarz: keine differentielle Produktion ($0,5 < x < 2$); **Rot: stärker produziert** ($x \geq 2$); Grün: schwächer produziert ($x \leq 0,5$); -: Protein konnte nicht detektiert werden.

CF-Nr.	Gen-Nr. ⁹	Gen	Proteom								Transkriptom					
			P_n^{Mi} / P_n^{M1}						P_n^{P24} / P_n^{P4}	P_n^{V43} / P_n^{V1}	T_n^{Mi} / T_n^{M1}					
			M9	M13	M20	M23	M26	M25	P24	V43	M9	M13	M22	M23	M26	M25
35	3440	/	0,0	0,2	0,3	0,3	86,4	180,3	1,2	1,0	0,9 (43,6)	2,3 (0,4)	1,9 (1,8)	2,8 (2,3)	1,7 (0,2)	0,9 (21,3)
18	2966	<i>acpP</i>	0,0	0,1	0,1	0,1	104,2	159,8	-	6,8	1,2 (61,4)	3,7 (1,7)	2,6 (3,3)	3,4 (3,2)	4,3 (0,04)	3,0 (0,4)
40	838	<i>btuE</i>	0,0	8,2	0,3	0,3	59,5	115,7	-	-	0,9 (7,9)	1,3 (0,3)	1,5 (0,3)	0,9 (17,5)	1,0 (18,0)	1,1 (4,7)
34	388	/	5,2	0,7	1,1	0,5	8,3	14,4	1,5	7,4	0,7 (10,7)	2,1 (0,9)	2,1 (0,2)	1,2 (22,4)	1,5 (0,4)	1,8 (1,1)
42	2081	/	0,5	0,1	0,5	0,0	0,4	9,9	9,9	104,0	0,9 (46,2)	1,7 (0,3)	1,9 (1,8)	1,7 (4,8)	10,3 (0,02)	4,9 (4,7)
29	5288	<i>glnK</i>	1,6	1,2	0,8	0,9	4,2	5,5	2,0	81,2	0,7 (15,8)	1,5 (0,06)	1,6 (1,8)	0,6 (0,6)	1,0 (4,5)	1,1 (4,7)
51	4935	<i>rpsF</i>	3,9	3,5	1,4	3,1	2,2	5,3	29,6	14,5	0,9 (51,9)	5,9 (0,5)	3,5 (1,8)	4,6 (4,8)	7,3 (0,02)	5,9 (2,4)
17	2888	/	1,2	1,4	1,1	1,1	1,8	5,2	3,4	868,0	0,9 (43,6)	0,6 (0,5)	0,5 (0,07)	0,8 (7,9)	0,5 (0,02)	13,4 (0,1)
6	300	<i>spuD</i>	0,7	1,9	1,0	0,4	3,1	5,0	2,7	2,7	1,2 (5,9)	2,3 (0,3)	2,2 (2,5)	1,5 (12,7)	2,3 (0,02)	1,7 (0,7)
54	4271	<i>rplL</i>	1,4	2,6	4,9	1,4	2,0	4,4	3,3	0,5	1,7 (49,6)	12,1 (0,4)	6,8 (0,9)	9,8 (2,7)	13,3 (0,02)	8,1 (1,1)
16	5173	<i>arcC</i>	71,0	8,8	3,3	1,3	2,1	4,3	85,9	1,5	0,7 (35,9)	3,9 (4,6)	4,0 (1,8)	0,8 (19,8)	1,7 (0,6)	5,4 (0,1)
12	4587	<i>ccpR</i>	0,3	0,1	0,1	0,1	1,4	3,6	2,1	28,5	1,7 (43,6)	2,0 (5,6)	1,6 (18,0)	0,9 (18,6)	1,0 (17,7)	2,1 (0,85)
2	888	<i>aotJ</i>	0,2	0,3	0,4	0,3	2,1	3,4	37,8	89,6	1,0 (>62)	2,0 (1,7)	1,8 (0,9)	2,7 (4,9)	2,1 (0,06)	1,9 (4,7)
3	5153	/	0,6	0,4	0,2	0,3	2,9	3,2	2,6	0,5	0,9 (43,6)	1,2 (15)	0,9 (10,5)	1,0 (>30)	1,4 (0,4)	1,4 (15,7)
32	318	/	0,7	0,5	0,5	0,6	1,7	3,1	0,4	1,1	1,0 (53,0)	1,6 (0,3)	2,0 (0,5)	1,4 (2,9)	1,4 (0,4)	2,0 (0,1)
57	3770	<i>guaB</i>	2,7	4,0	2,1	9,4	0,5	3,1	5,7	4,7	0,7 (35,4)	4,0 (1,7)	7,6 (0,1)	2,9 (8,0)	4,4 (0,02)	3,5 (2,4)
11	4922	<i>azu</i>	0,8	1,1	0,6	0,7	1,3	2,9	6,4	5,4	1,0 (>62)	1,1 (15,6)	1,2 (13,0)	0,7 (8,0)	1,2 (6,0)	1,0 (30,6)

⁹ www.pseudomonas.com

ERGEBNISSE

			Proteom								Transkriptom					
CF-Nr.	Gen-Nr. ⁹	Gen	P_n^{Mi} / P_n^{M1}						P_n^{P24} / P_n^{P4}	P_n^{V43} / P_n^{V1}	T_n^{Mi} / T_n^{M1}					
			M9	M13	M20	M23	M26	M25	P24	V43	M9	M13	M22	M23	M26	M25
48	1793	<i>ppiB</i>	1,6	0,7	0,4	0,8	1,7	2,6	2,0	1,7	1,1 (61,5)	2,7 (0,2)	1,4 (0,3)	2,5 (1,4)	1,6 (0,02)	5,4 (0,1)
58	409	<i>pilH</i>	0,7	0,1	0,2	0,1	2,6	2,6	0,1	0,9	0,6 (11,2)	1,1 (19,7)	1,0 (>25)	1,1 (>30)	0,9 (8,5)	0,6 (4,7)
20	4031	<i>ppa</i>	2,2	1,2	2,5	1,3	2,5	2,6	0,2	1,4	1,0 (54,0)	2,1 (0,7)	1,4 (9,7)	2,2 (3,2)	2,0 (0,02)	1,6 (8,1)
33	2575	/	0,7	0,1	0,0	0,0	1,6	2,6	149,3	110,9	1,2 (61,5)	4,8 (0,06)	5,2 (0,3)	2,2 (3,7)	3,6 (0,02)	4,7 (0,1)
27	5557	<i>atpH</i>	3,2	0,8	1,1	1,3	3,2	2,5	0,7	1,8	0,7 (20,2)	4,4 (1,7)	3,4 (0,2)	4,1 (3,2)	3,3 (0,04)	2,6 (4,7)
56	4265	<i>tufA</i>	2,0	10,3	8,8	9,3	5,7	2,5	2442,4	1,2	1,1 (>62)	3,8 (0,3)	3,4 (0,2)	3,3 (3,2)	3,8 (0,06)	3,1 (0,9)
28	1049	<i>pdxH</i>	1,3	0,6	0,2	0,5	0,9	2,5	216,8	4,2	0,9 (35,4)	1,0 (16,7)	0,9 (0,9)	0,9 (17,5)	0,9 (1,0)	1,2 (4,7)
21	5240	<i>trxA</i>	0,8	0,6	0,4	0,3	1,7	2,4	1,0	1,1	1,2 (35,4)	1,5 (0,9)	1,8 (6,9)	1,9 (3,2)	1,9 (0,02)	1,6 (0,8)
4	1260	/	0,6	0,3	0,5	0,0	1,2	2,4	120,7	14,0	1,0 (>62)	0,9 (>21)	0,7 (0,9)	0,8 (4,2)	4,9 (0,02)	0,6 (0,8)
9	555	<i>fda</i>	3,4	1,6	1,4	1,2	1,8	2,3	86,6	4,2	1,2 (58,6)	2,7 (0,2)	1,9 (1,8)	2,0 (2,8)	2,5 (0,02)	2,0 (6,9)
14	5140	<i>hisF1</i>	0,6	0,2	0,1	0,0	1,7	2,3	-	18,5	0,9 (14,0)	1,1 (15,7)	1,1 (9,7)	1,2 (23,8)	1,1 (2,2)	1,4 (0,1)
25	482	<i>glcB</i>	1,4	1,0	2,5	1,3	2,0	2,2	1,9	4,3	0,8 (26,1)	1,9 (0,2)	3,3 (0,07)	1,6 (17,5)	5,0 (0,02)	4,5 (0,1)
5	1074	<i>braC</i>	1,4	0,1	0,7	0,2	2,6	2,2	719,7	4,3	0,4 (8,9)	1,9 (0,4)	1,1 (18,5)	1,0 (>30)	1,1 (15,9)	1,2 (19,6)
26	5558	<i>atpF</i>	2,2	0,4	2,1	0,6	1,2	2,2	-	0,3	1,2 (57,4)	4,4 (0,5)	3,4 (0,07)	4,1 (2,3)	3,3 (0,02)	2,6 (4,7)
53	4755	<i>greA</i>	0,7	0,5	0,3	0,3	1,9	2,2	0,3	0,9	0,9 (43,6)	2,0 (0,2)	2,2 (0,2)	1,9 (8,0)	1,8 (0,02)	2,1 (0,7)
22	1588	<i>sucC</i>	1,7	2,0	2,4	2,4	1,3	2,1	165,4	0,6	0,7 (18,4)	2,3 (0,9)	1,9 (0,3)	2,2 (2,7)	1,6 (0,1)	1,9 (6,6)
39	5339	/	0,4	1,3	0,2	0,4	1,8	2,1	6,7	2,9	1,0 (>62)	2,9 (0,3)	5,2 (0,2)	2,2 (3,7)	4,9 (0,02)	3,9 (0,1)
19	4847	<i>accB</i>	0,6	0,2	0,3	0,0	2,0	2,1	150,4	10,5	1,5 (43,6)	3,6 (0,9)	3,9 (0,2)	2,7 (4,2)	3,9 (0,02)	1,7 (12,6)
1	1946	<i>rbsB</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	2,1	60,7	67,7	1,4 (57,8)	2,7 (12,5)	2,0 (4,0)	2,0 (21,8)	1,0 (>18)	1,2 (29,6)
10	3686	<i>adk</i>	1,9	1,7	3,1	2,1	1,0	2,0	0,5	0,9	1,0 (>62)	2,2 (0,2)	2,2 (0,9)	3,1 (2,0)	2,6 (0,02)	3,0 (2,4)
15	5171	<i>arcA</i>	4,1	13,6	3,3	0,9	1,3	2,0	9,6	8,2	0,5 (20,2)	3,7 (1,7)	4,7 (3,3)	0,6 (16,3)	2,3 (0,4)	4,1 (0,3)
52	4671	/	3,1	3,1	4,2	5,0	1,6	1,9	0,9	1,0	0,8 (43,6)	3,9 (0,9)	2,8 (2,5)	4,0 (2,8)	4,5 (0,02)	3,8 (2,4)
7	1777	<i>oprF</i>	0,4	0,5	1,9	2,6	5,2	1,8	7,3	0,4	0,8 (17,6)	1,1 (3,8)	0,9 (5,9)	1,1 (24,4)	1,4 (0,4)	1,2 (4,7)
24	4829	<i>lpd3</i>	3,0	12,2	9,5	3,4	1,8	1,8	2,1	0,7	0,7 (4,1)	0,4 (0,2)	0,5 (0,07)	0,7 (4,2)	2,4 (0,02)	2,2 (0,1)
23	1337	<i>ansB</i>	0,5	1,7	2,8	2,8	0,5	1,7	2,2	5,2	0,9 (35,4)	2,2 (0,06)	2,8 (0,9)	1,3 (21,6)	2,3 (0,06)	2,6 (0,1)
50	1800	<i>tig</i>	3,9	3,7	2,2	0,4	1,8	1,1	1,0	0,3	1,0 (>61,7)	5,2 (0,5)	3,5 (1,8)	3,9 (2,8)	4,8 (0,06)	3,8 (6,6)
55	3655	<i>tsf</i>	1,8	1,8	3,2	2,7	1,0	0,9	1,0	0,3	0,9 (35,4)	4,7 (0,9)	2,8 (3,3)	4,5 (3,7)	5,4 (0,02)	2,8 (8,1)

C.6 Proteom / Transkriptom-basierte Herleitung des Metaboloms

Die Proteom- und Transkriptomdaten der verschiedenen *P. aeruginosa*-Isolate lassen Rückschlüsse auf Veränderungen im Metabolismus im Verlauf der Infektion zu. Um die Veränderungen der metabolischen Wege zu rekonstruieren, wurde auf Datenbanken zurückgegriffen, die eine Zuordnung von Genen, bzw. Proteinen zu metabolischen Wegen erlauben¹⁰. Da weder Enzymaktivitäten oder Metabolitflüsse bestimmt wurden, handelt es sich hierbei um eine reine Spekulation, um die Ergebnisse von Proteom und Transkriptom in ein Metabolom-Modell umsetzen zu können. Hierzu wurden ausschließlich die Daten der Quotienten P_n^{M25} / P_n^{M1} und \bar{U}_n / T_n^{M1} verwendet.

C.6.1 Intermediärmetabolismus

Abbildung C-35 zeigt eine schematische Übersicht über den Intermediärmetabolismus von *P. aeruginosa*. Eine rote Kennzeichnung bedeutet eine erhöhte Konzentration des Proteins selbst in M25 (P_n^{M25} / P_n^{M1}) oder dessen Transkript in den *mutS*-Stämmen M25 und M26 (\bar{U}_n / T_n^{M1}), eine grüne Kennzeichnung hingegen eine diesbezüglich abgeschwächte Konzentration.

Die größten Veränderungen im Metabolismus des späten *mutS*-Stamms zeigen sich im TCA-Zyklus. Bis zum Intermediärmetabolit Fumarat sind im TCA-Zyklus alle Enzyme oder deren Transkripte, die Pyruvat weiter oxidieren, stark überproduziert. Dabei handelt es sich um den Enzymkomplex der Pyruvatdehydrogenase (*aceE*↑, *aceF*↑, *lpdG*↑¹¹), die Citratsynthase (*gltA*↑), die Aconitathydratase I (*acnA*↑), beide Isocitratdehydrogenasen (*idh*↑, *icd*↑), den α -Ketoglutaratdehydrogenase – Enzymkomplex (*sucAB*↑, *lpd3*↑), der Succinyl-CoA Synthetase (*sucCD*↑), sowie der Succinatedehydrogenase (*sdhB*↑). Das Transkript der Fumarathydratase FumC1 ist vermindert (*fumC1*↓¹²), während bei keiner

¹⁰ <http://biocyc.org/expression.html>; <http://www.genome.ad.jp/kegg/genes.html>;

<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>; <http://www.pseudomonas.com/>;

<http://pseudocyc.pseudomonas.com:1555/PSEUDO/server.html>

¹¹ *lpdG*↑ ≈ erhöhter Transkriptwert und/oder erhöhte Proteinkonzentration weisen auf verstärkte Genexpression hin

¹² *fumC1*↓ ≈ verminderter Transkriptwert und/oder verminderte Proteinkonzentration weisen auf eine abgeschwächte Genexpression hin

ERGEBNISSE

der Malatdehydrogenasen eine differentielle Produktion nachweisbar war. Daneben zeigt sich auch bei einem Dicarboxylat-Transporters (PA0119↑, Succinat, Fumarat, Malat) eine verstärkte Produktion des Transkripts.

Der von *P. aeruginosa* zum Glucoseabbau verwendete KDPG-Weg zeigt keine quantitative Enzymveränderung, das Transkript des Proteins zur Aufnahme von Gluconat (PA2322↓) ist vermindert.

Bei drei anaplerotischen Reaktionen des TCA-Zyklus war eine erhöhte Menge der Enzyme oder deren Transkripte festzustellen:

1. Die β -Oxidation von Fettsäuren führt zu einer Erhöhung von Acetyl-CoA, das über den aktivierten Glyoxylatshunt (*glcB*↑) in den TCA-Zyklus eingeschleust wird. Dabei ist zu beachten, dass außer dem Gencluster PA2886-93 (↑) alle aktivierten Gene (*foaAB*↑, *acpP*↑, *accB*↑ und *fabI*↑) zu Enzymen führen, die auch zur Fettsäurebiosynthese dienen können. Das Transkript eines Enzyms hingegen (*atoB*↓), welches nur die Biosynthese katalysiert, weist eine abgeschwächte Produktion auf. Darüber hinaus zeigt auch das Transkript eines Transportproteins für langkettige Fettsäuren (PA1288↑) eine erhöhte Konzentration. Diese Daten sprechen für eine Bevorzugung des Fettsäureabbaus.

Bei einem Wachstum mit Fettsäuren als C- und Energie-Quelle sollten die Isocitratdehydrogenasen phosphoryliert und somit inaktiv vorliegen. Die hierzu notwendige IDH-Kinase/Phosphatase (*aceK*) ist allerdings nicht überproduziert. Außerdem liegt sie bei *P. aeruginosa*, im Gegensatz zu *E. coli*, nicht in einem Operon mit *aceEF* vor, ist also unabhängig von einer Regulation der Pyruvatdehydrogenase.

2. Die CO₂-Fixierung durch die Erhöhung der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (*pep*↑) führt zur Auffüllung von Oxalacetat.
3. Die Überproduktion der Pyruvatcarboxylase PA5435/36 (↑) führt wie PepC zu einer Erhöhung des Oxalacetat-Spiegels. Hierbei handelt es sich nicht um die klassische Pyruvatcarboxylase PA1400, die wie die PepC CO₂ fixiert, sondern um eine Pyruvatcarboxylase, die Methylmalonyl-CoA als Substrat verwendet.

Darüber hinaus sind das Transkript des Enzyms zum Abbau von D-Serin (*dsdA*↑) zu Pyruvat und die Transkripte des *aru*-Operons(↑) zum Abbau von Arginin zu Succinat verstärkt. Succinat kann wiederum in den TCA-Zyklus eingeschleust werden. Auch die Transkripte der Enzyme zum Abbau von Allantoin, einem Abbauprodukt der Purinbasen, zu Glyoxylat (*alc*↑, PA1514↑) zeigen in den Stämmen M25 und M26 eine Verstärkung.

Darüber hinaus weisen in den Stämmen M25 und M26 die Enzyme oder deren Transkripte der Biosynthesewege aller Aminosäuren (außer Tryptophan), zumindest in Teilen, eine erhöhte Produktion auf. Abbildung C-35 zeigt aus Platzgründen nicht die gesamten Syn-

ERGEBNISSE

thesewege, sondern nur das Ausgangsprodukt und die verstärkt produzierten Enzyme oder deren Transkripte. Die Vorprodukte der Aminosäurebiosynthese werden entweder direkt aus dem TCA-Zyklus entnommen oder sind Zwischenprodukte der Gluconeogenese.

Der Syntheseweg der Aspartatfamilie scheint in M25 und M26 von dem bei *P. aeruginosa* klassischen Weg abzuweichen, da hier die Transkripte der von Fumarat ausgehenden Syntheseenzyme erhöht sind (*aspA*↑, *purA*↑, *purB*↑), und nicht die vom klassischen Ausgangsprodukt Oxoglutarat ausgehenden. Dabei ist zu bemerken, dass diese Enzyme auch zum Abbau der Aminosäuren der Aspartatfamilie dienen können.

Sowohl Enzyme oder deren Transkripte für die Synthese von Valin, Leucin und Isoleucin aus Pyruvat (*ilvIHC*↑, *ilvE*↑, *leuD*↑) als auch solche für eine Sulfatgruppenfixierunggekoppelte Synthese von Cystein aus Serin zeigen eine Überproduktion.

Das Transkript von SerC (*serC*↑), einem Enzym, welches die Synthese von Serin und Glycin aus 3-Phosphoglycerat katalysiert, zeigt ebenfalls eine Überproduktion. Die Produktion von 3-Phosphoglycerat läuft über die Gluconeogenese, deren katalysierende Enzyme, bzw. Transkripte eine starke Produktion zeigen (*pgk*↑, *fda*↑). Dabei entstehen auch andere wichtige Grundbausteine, wie beispielsweise Chorismat für die Phenylalanin- und Tyrosinbiosynthese oder PRPP (Ribose-5-Phosphat) für die Histidinbiosynthese (*hisF1*↑).

Enzyme oder deren Transkripte von Aminosäuretransportern zeigen im Allgemeinen eher eine schwache Produktion. Eine Verstärkung zeigen vor allem Enzyme oder Transkripte von Transportern für verzweigte Aminosäuren (*braC*↑, PA5153↑, PA1260↑), sowie die Arginin/Ornithin-Antiporter AotJ(↑) und ArcD (↑).

Auf den hypothetischen Katabolismus in den Stämmen M25 und M26 wird in Kapitel C.6.5 noch einmal dezidiert eingegangen, hier sei nur die abgeschwächte Produktion der Transkripte für die Enzyme des Ethanolabbaus zu Acetat (PA2275↓, PA0219↓, PA4189↓) erwähnt. Außerdem sind die Transkripte der Fructose und Sorbose verwertenden Enzyme (*mtlZ*↓, PA4135↓) nur schwach vorhanden.

Auch die Enzyme und deren Transkripte für den Stoffwechsel der Purin- und Pyrimidinbasen weisen in M25 und M26 eine deutlich veränderte Produktion auf. Dabei sind die Transkripte der Enzyme der *de novo*-Synthese der Purinbasen (ausgehend von PRPP) überproduziert (*purC*↑, *purL*↑, *purF*↑). Die Transkripte der Enzyme der *de novo*-Synthese der Pyrimidinbasen (ausgehend von Glutamin) sind nur schwach vorhanden (PA5541↓). Eine durchgehende Überproduktion der Enzym-Transkripte ist aber bei beiden erst im „salvage pathway“ zu erkennen (Kapitel C.6.3).

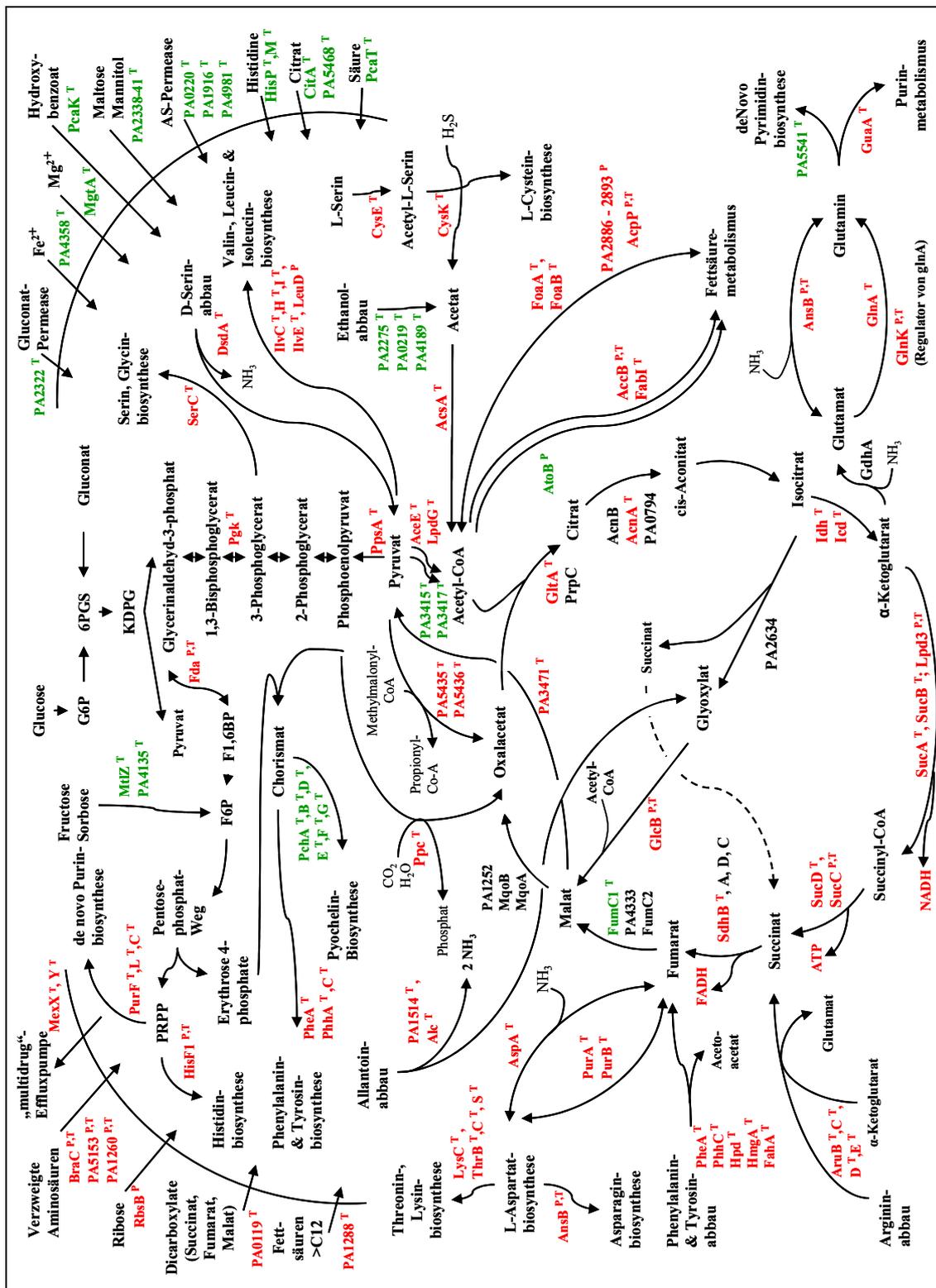


Abbildung C-35: Schematische Darstellung der Metabolismuswege bei *P. aeruginosa* unter Verwendung der Proteomdaten P_n^{M25} / P_n^{M1} (P hochgestellt) und der Transkriptomdaten \bar{U}_n / T_n^{M1} (T hochgestellt).
 P_n^{M25} / P_n^{M1} : siehe auch Tabelle C-2 - Tabelle C-4; \bar{U}_n / T_n^{M1} : siehe Anhang (T: Transkript; n: CF-Nummer; $U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; \bar{U}_n = arithmetisches Mittel von U_n); Rot: Erhöhte Produktion, Grün: Abgeschwächte Produktion

C.6.2 Transkriptions- und Translations-Leistung

Sowohl das Proteom als auch das Transkriptom deuten auf eine Erhöhung fast sämtlicher Proteine der 50S- und der 30S-Untereinheiten des Ribosoms hin, was für eine verstärkte Proteinbiosynthese sprechen könnte (Tabelle C-8).

Ribosomale Untereinheit	Erhöhte Proteinmengen	Erhöhte Transkriptmengen
30S*	S6	S6, S13, S14, S15, S18
50S*	L7, L11, L12, L18, L25	L1, L7, L12, L17, L19, L20, L24, L25, L31, L36

Tabelle C-8: Auflistung der erhöhten Protein- oder Transkriptmengen ribosomalen Proteine.
S*: Svedberg-Einheit.

Darüberhinaus weisen der Transkriptionselongationsfaktor GreA und die Translationselongationsfaktoren EF-Tu und EF-Ts sowohl erhöhte Protein- als auch erhöhte Transkriptmengen auf. Die Transkripte der DNA-Polymerase III (*dnaN*↑, *dnaX*↑, *holC*↑), des Translations-Initiationsfaktors IF-2, sowie der RNA-Polymerase (*rpoA*↑, *rpoC*↑) zeigten in den *mutS*-Stämmen M25 und M26 ebenso erhöhte Mengen wie die Transkripte der am Anfang der Proteinbiosynthese stehenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, welche die jeweils passende Aminosäure auf ihre tRNA übertragen (*ileS*↑, *cysS*↑, *glnS*↑, *argS*↑, *pheT*↑, *alaS*↑, *serS*↑, *thrS*↑, *aspS*↑, *hisS*↑, *glyS*↑).

C.6.3 Purin- und Pyrimidinbasen

Wie in Kapitel C.6.1 erwähnt, weisen die Daten von Proteom und Transkriptom auf einen veränderten Metabolismus der Purin- und Pyrimidinbasen in den *mutS*-Stämmen M25 und M26 hin.

Dabei sind die Transkripte für die Enzyme der *de novo*-Synthese der Purinbasen, ausgehend von PRPP, stärker produziert (*purC*↑, *purL*↑, *purF*↑), die Transkripte der Enzyme der *de novo*-Synthese der Pyrimidinbasen, ausgehend von Glutamin, eher abgeschwächt (PA5541↓). Eine durchgehende Verstärkung der Transkripte ist aber bei beiden Synthesewegen erst im „salvage pathway“ ab den jeweiligen Monophosphaten zu erkennen. Dieser Stoffwechselzweig dient der Wiederverwertung der beim Abbau der Nukleotide entstande-

ERGEBNISSE

nen Purin- und Pyrimidinbasen. Die Inosin-5'-monophosphatdehydrogenase GuaB (↑) wurde auch im Proteom von M25 in erhöhten Mengen gefunden.

Diese Daten könnten vor allem bei den Pyrimidinbasen in den *mutS*-Stämmen M25 und M26 eher auf eine Konversion, als auf eine *de novo*-Synthese schließen lassen. Abbildung C-36 zeigt die Wiederverwertung von Purinbasen, Abbildung C-37 die Wiederverwertung von Pyrimidinbasen.

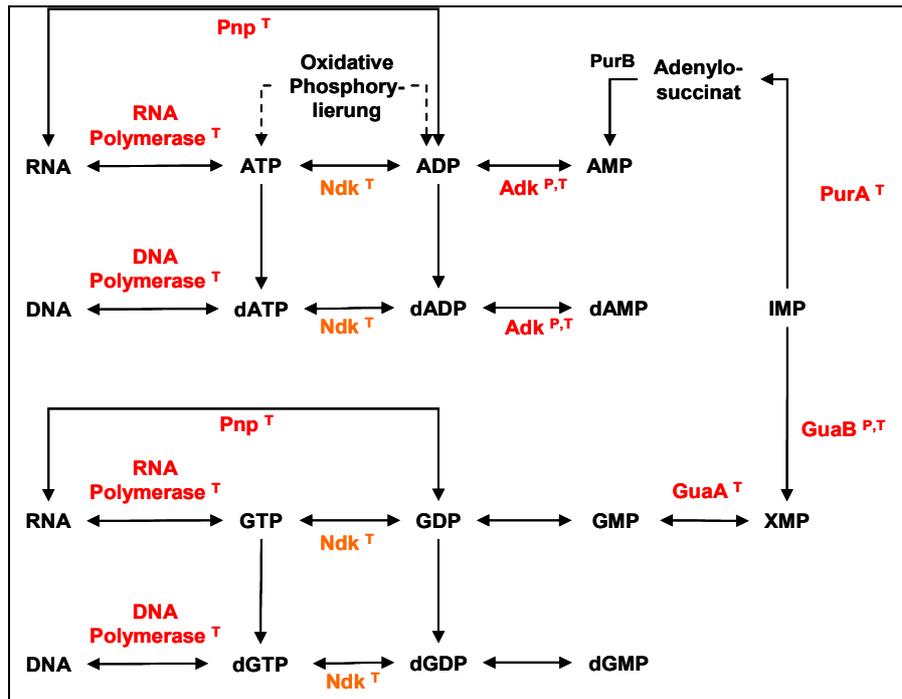


Abbildung C-36: Wiederverwertungsweg der Purinbasen bei *P.aeruginosa*.
P hochgestellt: (P_n^{M25} / P_n^{M1}); **T** hochgestellt: \bar{U}_n / T_n^{M1} (T: Transkript; n: CF-Nummer; $U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; \bar{U}_n = arithmetisches Mittel von U_n);
Rot: Erhöhte Produktion, **Grün:** Abgeschwächte Produktion. Das **Orange** dargestellte Transkript der Nucleosiddiphosphatkinase (*ndk*) zeigte in M25 und M26 selbst keine veränderte Konzentration, dafür das Transkript des positiven Regulators, Rnk.
 AMP/ADP/ATP (Adenosinmono/di/triphosphat), GMP/GDP/GTP (Guanosinmono/di/triphosphat), dAMP/dADP/dATP (Desoxy-Adenosinmono/di/triphosphat), dGMP/dGDP/dGTP (Desoxy-Guanosinmono/di/triphosphat); *ndk* (Nucleosiddiphosphatkinase), *pnp* (Polyribonucleotid-Nucleotidyltransferase); *adk* (Adenylatkinase); *guaA* (GMP-Synthase); *guaB* (Inosine-5'-Monophosphatdehydrogenase); *purA* (Adenylosuccinat-Synthetase) *purB* (Adenylosuccinatlyase).

ERGEBNISSE

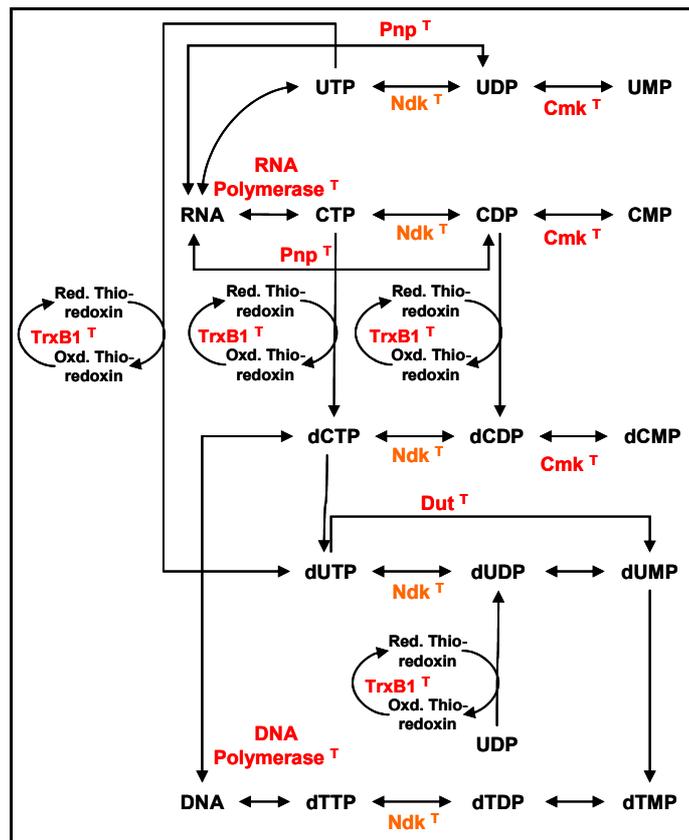


Abbildung C-37: Wiederverwertungswege der Pyrimidinbasen bei *P. aeruginosa*. **P** hochgestellt: (P_n^{M25} / P_n^{M1}); **T** hochgestellt: \bar{U}_n / T_n^{M1} (T: Transkript; n: CF-Nummer; $U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; \bar{U}_n = arithmetisches Mittel von U_n); **Rot:** Erhöhte Produktion, **Grün:** Abgeschwächte Produktion. Das **Orange** dargestellte Transkript der Nucleosiddiphosphatkinase (*ndk*) zeigte in M25 und M26 selbst keine veränderte Konzentration, dafür das Transkript des positiven Regulators, Rnk. UMP/UDP/UTP (Uridinmono/di/triphosphat), CMP/CDP/CTP (Cytosinmono/di/triphosphat), dTMP/dTDP/dTTP (Desoxy-Tyrosinmono/di/triphosphat), *cmk* (Cytidylkinase); *ndk* (Nucleosiddiphosphatkinase), *dut* (Deoxyuridin-5'-triphosphat-nucleotidohydrolase), *trxBI* (Thioredoxinreduktase).

C.6.4 Kofaktoren

Zur Aufnahme, sowie zum Einbau funktioneller Gruppen, wie beispielsweise Wasserstoff, NH_3 oder PO_4 , werden Coenzyme und Prosthetische Gruppen benötigt. In den *mutS*-Stämmen M25 und M26 wurden vor allem erhöhte Transkripte für Enzyme der Biosynthese von Pyridoxin (Vitamin B_6), von Biotin und vom Coenzym A (Pantothemat) nachgewiesen. Dabei wird Pyridoxin bei der Übertragung von Aminogruppen, Biotin bei der Übertragung von Carboxygruppen und Pantothemat bei der Übertragung von Acylgruppen benötigt.

C.6.5 Katabolismus

In den *mutS*-Stämmen M25 und M26 konnten verminderte Transkriptmengen für Enzyme, die den Abbau verschiedener Intermediärmetabolite katalysieren, nachgewiesen werden. In Abbildung C-38 ist der Abbau dieser Verbindungen und der in M25 und M26 abgeschwächten Transkripte (grüne Schrift) für die entsprechenden Enzyme schematisch dargestellt. Vanillat wird durch die Genprodukte des *van*-Operons zu Dihydroxybenzoat und dann ebenso wie Protocatechuat durch die Genprodukte des *pca*-Operons über Zwischenprodukte zu Acetyl-CoA und Succinyl-CoA abgebaut. Auch Anthranilat und Aminobenzoat werden durch die Genprodukte des *ant*-Operons, später durch die Genprodukte des *cat*- und *pca*-Operons, zu Acetyl-CoA und Succinyl-CoA abgebaut. Diese Intermediärmetabolite können dann in den TCA-Zyklus eingeschleust werden

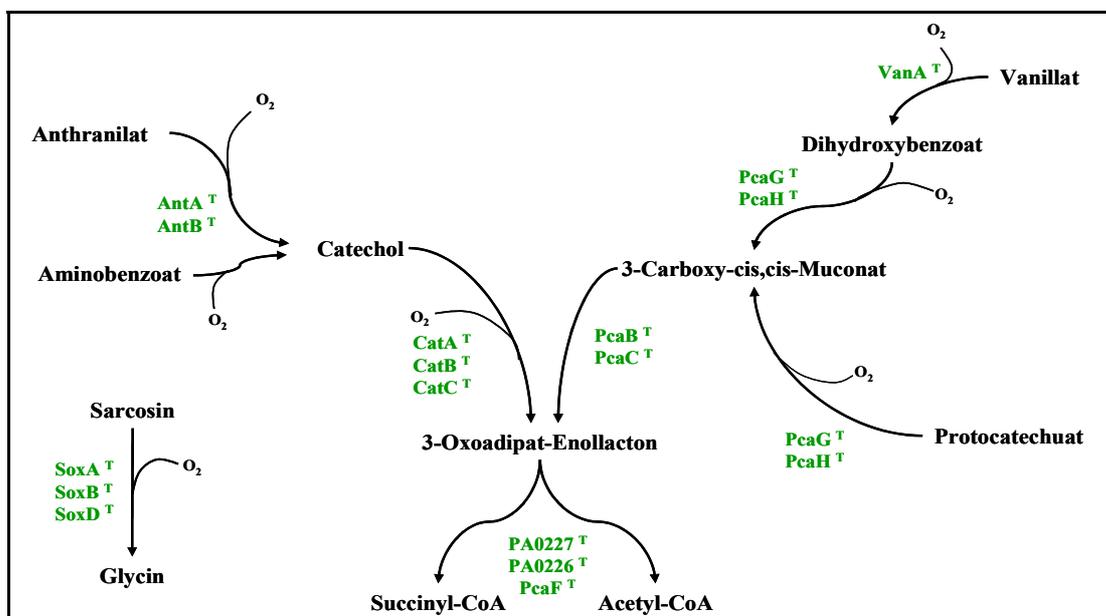


Abbildung C-38: Schematische Darstellung katabolischer Stoffwechselwege bei *P. aeruginosa*
P hochgestellt: (P_n^{M25} / P_n^{M1}); **T** hochgestellt: \bar{U}_n / T_n^{M1} (T: Transkript; n: CF-Nummer; $U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; \bar{U}_n = arithmetisches Mittel von U_n);
Rot: Erhöhte Produktion, **Grün:** Abgeschwächte Produktion.
 AntA/B (Anthranilatdioxygenase); CatA (Catechol-1,2-Dioxygenase); CatB (Muconat-Cycloisomerase I); CatC (Muconolacton-delta-Isomerase), VanA (Vanillat-O-Demethylaseoxygenase); PcaB (3-Carboxy-cis,cis-Muconatcycloisomerase); PcaC (Gamma-Carboxymuconolacton-Decarboxylase); PcaG/H (Protocatechuat-3,4-Dioxygenase); pcaF (Beta-keto adipyl-CoA-Thiolase); SoxBDA (Sarcosinoxidase).

Auch die Transkripte für Enzyme, die für den Abbau anderer potentieller C-Quellen, wie beispielsweise Sarcosin, Malonat, Toluol, Xylen und einiger aromatischer Verbindungen verantwortlich sind, zeigen eine deutliche Verminderung in den *mutS*-Stämmen M25 und

ERGEBNISSE

M26 (Tabelle C-9). Diese organischen Substanzen kommen in der Umwelt vor und werden dort von *P. aeruginosa* genutzt. Es wäre zu prüfen, ob sie auch in der CF-Lunge zur Verfügung stehen.

Tabelle C-9: Liste der bei den *mutS*-Stämmen M25 und M26 abgeschwächten Transkripte für katabolische Enzyme, die am Abbau von Umwelt-Kohlenstoffverbindungen beteiligt sind. \bar{U}_n / T_n^{M1}
T: Transkript; n: CF-Nummer; $U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; \bar{U}_n = arithmetisches Mittel von U_n

Gen-Nr. ¹³	Gen	Protein	\bar{U}_n / T_n^{M1}	Substrat
153	<i>pcaH</i>	Protocatechuat-3,4-Dioxygenase, Beta-Untereinheit	0,41	Protocatechuat
154	<i>pcaG</i>	Protocatechuat-3,4-Dioxygenase, Alpha-Untereinheit	0,28	Protocatechuat
208	<i>mdcA</i>	Malonatdecarboxylase, Alpha-Untereinheit	0,43	Malonat
210	<i>mdcC</i>	Malonatdecarboxylase, Delta-Untereinheit	0,28	Malonat
211	<i>mdcD</i>	Malonatdecarboxylase, Beta-Untereinheit	0,40	Malonat
213		Hypothetisches Protein	0,42	Malonat
214		Mutmaßliche Acyltransferase	0,34	Malonat
226		Mutmaßliche CoA-Transferase, Alpha-Untereinheit	0,24	Styren
227		Mutmaßliche CoA-Transferase, Beta-Untereinheit	0,15	Styren
228	<i>pcaF</i>	Beta-Keto adipyl-CoA-Thiolase	0,25	Protocatechuat
235	<i>pcaK</i>	4-Hydroxybenzoattransporter	0,38	Protocatechuat
1409	<i>aphA</i>	Acetylpolyamin-Aminohydrolase	0,47	Acetylpolyamin
2003	<i>bdhA</i>	3-Hydroxybutyratdehydrogenase	0,36	Hydroxybutyrat
2085		Mutmaßliche Ring-hydrolysierende-Dioxygenase, kleine Untereinheit	0,37	Aromatische Verb.
2086		Mutmaßliche Epoxidhydrolase	0,33	Epoxid
2098		Mutmaßliche Esterase-Deacetylase	0,41	Aromatische Verb.
2344	<i>mtlZ</i>	Fructokinase	0,42	D-Fructose
2507	<i>catA</i>	Catechol 1,2-Dioxygenase	0,03	Catechol
2508	<i>catC</i>	Muconolacton-Deltaisomerase	0,05	Catechol
2509	<i>catB</i>	Muconat-Cycloisomerase I	0,36	Catechol
2512	<i>antA</i>	Anthranilat-Dioxygenase, große Untereinheit	0,08	Anthranilat
2513	<i>antB</i>	Anthranilat-Dioxygenase, kleine Untereinheit	0,02	Anthranilat
2514	<i>antC</i>	Anthranilat-Dioxygenase-Reductase	0,11	Anthranilat
2517	<i>xylY</i>	Toluat-1,2-Dioxygenase, Beta-Untereinheit	0,34	Toluen, Xylen
2518	<i>xylX</i>	Toluat-1,2-Dioxygenase, Beta-Untereinheit	0,49	Toluen, Xylen
3589		Mutmaßliche Acyl-CoA-Thiolase	0,47	Ketone, Aminosäuren
4150		Mutmaßliche Dehydrogenase, E1-Komponente	0,34	Acetoin
4153		2,3-Butanediol-Dehydrogenase	0,48	Acetoin
4901	<i>mdlC</i>	Benzoylformat-Decarboxylase	0,49	Aromatische Verb.
4904	<i>vanA</i>	Vanillat-O-Demethylase-Oxygenase-Untereinheit	0,36	Vanillat
5410		Mutmaßliche Ring-hydrolysierende-Dioxygenase, Alpha-Untereinheit	0,22	Aromatische Verb.
5416	<i>soxB</i>	Sarcosin-Oxidase, Beta-Untereinheit	0,50	Sarcosin
5417	<i>soxD</i>	Sarcosin-Oxidase, Delta-Untereinheit	0,46	Sarcosin
5418	<i>soxA</i>	Sarcosin-Oxidase, Alpha-Untereinheit	0,44	Sarcosin

¹³ www.pseudomonas.com

C.6.6 Stickstoffmetabolismus

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt, weisen die Daten von Proteom und Transkriptom auf eine sehr aktive Aminosäurebiosynthese in den *mutS*-Stämmen M25 und M26 hin. Hierfür werden Aminogruppen benötigt, die durch die Aufnahme und den Abbau Aminogruppen-reicher Verbindungen zugeführt werden müssen. Da sowohl die Transkripte als auch einige Proteine des Abbaus von Arginin und Putrescin in den *mutS*-Stämmen M25 und M26 in erhöhten Mengen zu finden waren, scheint der Bedarf an Aminogruppen hierüber gedeckt zu werden.

Erhöhte Mengen an Transkript und/oder Protein waren beispielsweise für einen ABC-Transporter für Arginin (*aotJ*↑) und Putrescin (*spuD*↑), sowie für einen Arginin-Ornithin-Antiporter (*arcD*↑) zu finden. Putrescin, das nahe mit Kadaverin verwandt ist, entsteht in der Wirtszelle durch die Decarboxylierung von Ornithin. Nach der Aufnahme in die Bakterienzelle kann Putrescin über Agmatin und anschließend unter CO₂-Einbau (PA1818↑) zu Arginin umgewandelt werden.

Für die Bereitstellung von Stickstoff-Verbindungen aus dem Abbau von Arginin favorisieren die *mutS*-Stämme M25 und M26 vermutlich die beiden folgenden Wege, da deren verantwortliche Enzyme oder deren Transkripte in erhöhter Menge vorkommen:

Der eine verläuft, katalysiert durch die vom *aru*-Operon kodierten Enzyme, unter Bildung von freiem und in Form von Glutamin gebundenem NH₃, bis zu Succinat. Succinat könnte anschließend in Succinyl-CoA umgewandelt und entweder in den TCA-Zyklus eingeschleust oder für eine neuerliche Abbaureaktion von Arginin zu Succinylarginin verwendet werden.

Der zweite Abbauweg könnte von den Genprodukten des anaerob regulierten *arc*-Operons ausgeführt werden. Dieser Weg dient dem fermentativen Abbau von Arginin zu Ornithin und liefert neben NH₃ auch Energie in Form von ATP. Das entstandene Ornithin könnte im Austausch mit Arginin wieder aus der Bakterienzelle ausgeschleust werden, wo es durch eukaryotische Ornithindecaboxylasen erneut in Putrescin umgewandelt werden kann.

Sowohl im Transkriptom als auch im Proteom zeigte das Transkript und das entsprechende Protein PA5339 (↑) in den späten *mutS*-Stämmen eine starke Erhöhung. Dieses Protein weist eine 90%ige Ähnlichkeit mit dem positiven Regulator VnfA der Nitrogenase von *Azotobacter vinelandii* auf. Da *P. aeruginosa* chromosomal keine Nitrogenase besitzt, ist anzunehmen, dass PA5339 andere Gene reguliert. Allerdings kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Patientenisolate nicht doch Gene für eine Nitrogenase erworben haben. Darüber hinaus ist die NH₃-Fixierung mit der Aufwendung von 16 ATP verbunden, ein Energiebedarf, der vor allem unter den mikroaeroben bis anaeroben Bedingungen in

ERGEBNISSE

der Lunge für die Erreger sehr ungünstig sein sollte. Am wahrscheinlichsten ist daher, dass PA5339, trotz seiner großen Ähnlichkeit zu VnfA, eine andere Funktion erfüllt.

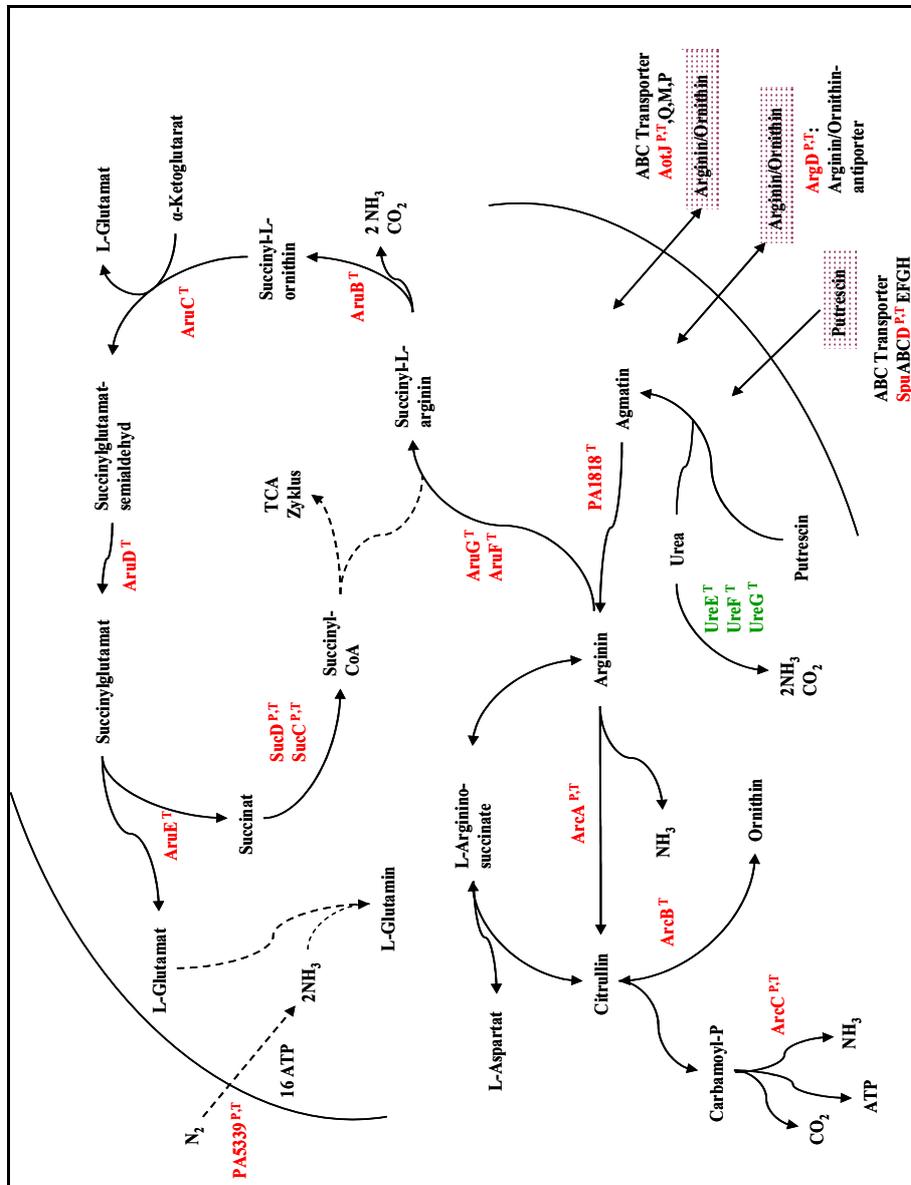


Abbildung C-39: NH_3 -Stoffwechselwege bei *P. aeruginosa*.
P hochgestellt: ($\text{P}_n^{\text{M}25} / \text{P}_n^{\text{M}1}$); **T** hochgestellt: $\bar{\text{U}}_n / \text{T}_n^{\text{M}1}$ (T: Transkript; n: CF-Nummer; $\text{U}_n = \{\text{T}_n^{\text{M}25}, \text{T}_n^{\text{M}26}\}$; $\bar{\text{U}}_n$ = arithmetisches Mittel von U_n);
Rot: Erhöhte Produktion, **Grün:** Abgeschwächte Produktion.

C.6.7 Energiemetabolismus

Die Wege zum Abbau organischer Substanzen und die Speicherung der dabei in Form von ATP konservierten Energie werden in zwei große Gruppen eingeteilt:

1. Die Fermentation oder Substratkettenphosphorylierung, wie beispielsweise der für *P. aeruginosa* typische Entner-Doudoroff-Weg oder die Glykolyse. Die Substrate werden hier bis zum Pyruvat oxidiert und anschließend durch die vorher generierten Reduktionsäquivalente (NADH/NADPH) zu den Fermentationsprodukten reduziert.
2. Die Atmung oder Elektronentransport-gekoppelte Phosphorylierung (ETP). Hierbei können die organischen Katabolite mit einem weitaus höheren Energiegewinn ausgehend vom Pyruvat im TCA-Zyklus bis hin zum CO₂ oxidiert werden. Die dabei generierten Reduktionsäquivalente NADH/NADPH und FADH₂ werden, ausgehend von der in der Cytoplasmamembran gelegenen NADH-Dehydrogenase, oxidiert. Die dabei entstehenden Elektronen werden über verschiedene Komplexe in der CM weiter geleitet, wobei Protonen ausgeschleust werden und somit ein elektrochemisches Membranpotential aufgebaut wird. Die auf dem H⁺-Gradienten beruhende protonenmotorische Kraft wird von der ATPase zur Bildung von Energie in Form von ATP genutzt. Je nach Art und Zusammensetzung des die Bakterienzelle umgebenden Milieus können verschiedene Verbindungen, wie beispielsweise Sauerstoff (O₂), Eisen (Fe³⁺), Nitrat (NO₃⁻), Sulfat (SO₄²⁻) oder auch Wasserstoff (H₂), als terminale Elektronenakzeptoren am Schluss der Atmungskette dienen.

C.6.7.1 Elektronentransport - gekoppelte Phosphorylierung

C.6.7.1.1 Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor

Wie in Kapitel C.6.1 gezeigt, sind die den TCA-Zyklus katalysierenden Enzyme oder deren Transkripte in den späten *mutS*-Stämmen M25 und M26 in erhöhten Mengen vorhanden. Diese Daten könnten auf eine verstärkte Produktion reduzierter Reduktionsäquivalente wie NADH/NADPH und FADH₂ hindeuten. Darüber hinaus weisen auch nahezu alle Transkripte der Enzymkomplexe der ETP eine Verstärkung auf, während dies bei fermentativen Prozessen nur bei dem Abbau von Arginin zu beobachten ist. Die im Verlauf katabolischer Reaktionen gebildeten Reduktionsäquivalente könnten in M25 und M26, statt zur

ERGEBNISSE

Reduktion während fermentativer Prozesse, zum Aufbau eines elektrochemischen Potentials in der CM und somit zu der Produktion von ATP durch die protonenmotorisch angetriebene ATPase dienen. Abbildung C-41 zeigt eine schematische Übersicht der Enzymkomplexe der ETP bei *P. aeruginosa* mit den alternativen terminalen Elektronenakzeptoren Sauerstoff oder Nitrat. Rot gekennzeichnete Proteine symbolisieren eine verstärkte Produktion dieses Proteins oder dessen Transkripts in M25 und M26, grün markierte Proteine hingegen eine verminderte Produktion.

Die Transkripte der am Anfang der Atmungskette stehenden NADH-Dehydrogenase weisen eine starke Überproduktion auf (*nuoABCDEFGHJKLMN*↑; *ndh*↑). Während der dort katalysierten Oxidation von NADH werden zwei Protonen ($2H^+$) aus der Zelle ausgeschleust und die dabei entstehenden Elektronen an den Chinonpool weitergegeben. Sowohl die Transkripte der zu der Übertragung notwendigen Proteine (*nqrF*↑, *nqrE*↑) als auch das Transkript eines Enzyms der Chinonbiosynthese (*ubiH*↑) weisen in M25 und M26 eine Erhöhung auf. Auch die Succinat-Dehydrogenase (*sdhCDAB*), bestehend aus der Cytochrom b-556 Untereinheit (*sdhC*↑), dem hydrophoben Membrananker (*sdhD*), dem Flavoprotein (*sdhA*) und dem Eisenschwefelprotein (*sdhB*), zeigt eine starke Produktion des Transkriptes der Cytochrom b-556 Untereinheit. Da es sich um Teile eines Operons handelt, ist anzunehmen, dass die anderen Transkripte ebenso erhöht sind. Gestützt wird diese Annahme durch die Rohdaten der Mikroarrayanalyse, die auch bei den anderen Untereinheiten eine Erhöhung zeigt. Allerdings variieren die Expressionen im dreifachen Ansatz so stark, dass sie die Anforderungen der statistischen Auswertung nicht erfüllen (q-Wert). Durch die Reduktion von FAD zu FADH₂ werden hier ebenfalls Elektronen an den Chinonpool weitergegeben, wobei das Transkript der Alpha-Untereinheit (*etfA*↑) des Elektronentransferproteins ebenfalls überproduziert war. Im darauf folgenden Chinonkreislauf werden Elektronen des reduzierten Chinons (QH₂) auf den Cytochrom bc1-Komplex übertragen, wobei oxidiertes Semichinon (QH) entsteht und Protonen ausgeschleust werden. Das Transkript der c1-Untereinheit (PA 4429↑) des Cytochrom bc1-Komplexes war in den *mutS*-Stämmen überproduziert.

Unter aeroben Bedingungen würde das Elektron nun durch die klassische Typ aa₃-Cytochrom c-Oxidase auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor übertragen. Allerdings sind sowohl die Transkripte für die Untereinheiten der aa₃ Typus Cytochrom c-Oxidase (*coxAB*↓, *coIII*↓) als auch die Transkripte für deren Assemblierungsproteine (*coxII*↓, *cox15*↓, *cyoE*↓) in M25 und M26 mit einem Quotienten von bis zu 0,06 kaum noch feststellbar. Dagegen erwies sich das Transkript der Cytochrom c-Oxidase vom cbb₃-Typ in M25 und M26 mit einer 7fach höheren Konzentration stark überproduziert. Cytochrom cbb₃-Oxidasen sind Mitglieder einer Eisen-Kupferoxidasefamilie und besitzen eine sehr hohe Sauerstoffaffinität.

C.6.7.1.2 Denitrifikation

Unter anaeroben Bedingungen ist *P. aeruginosa* in der Lage, Nitrat oder Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden.

Stickstoff-Oxide werden in vielen Bakterien nur fakultativ genutzt, da Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor energetisch effizienter ist. Aufgrund des niedrigeren elektrochemischen Potentials des $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ -Paares (+0,43 V) finden hier nur zwei protonenübertragende Prozesse statt, während bei der aeroben Atmung ($1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$; +0,81 V) drei stattfinden können. Bei der Denitrifikation werden die N-Oxide anstelle von Sauerstoff reduziert. Nitrat (NO_3^-) wird über Nitrit (NO_2^-), Stickoxid (NO) und Distickstoffoxid (N_2O) zu molekularem Stickstoff (N_2) reduziert (Abbildung C-40). Dabei ist nur die Reduktion von Stickoxid zu Distickstoffoxid an einen Protonenausstoß gekoppelt.

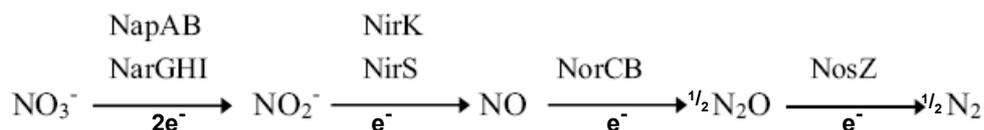


Abbildung C-40: Die Reaktionen der Denitrifikation.
 NapAB, periplasmatische Nitratreduktase; Nar GHI, cytoplasmatische Nitratreduktase; NirK, respiratorische Nitritreduktase (kupferhaltig) NirS, respiratorische Nitritreduktase (ein Hämenzym); NorCB, NO-Reduktase; NosZ, N_2O -Reduktase.

An der Regulation sind neben dem Zwei-Komponenten-System NarXL (Nitratsensor und Transkriptionsregulator) auch die beiden Redox-Transkriptionsregulatoren Anr („*anaerobic regulator of arginine deiminase and nitrate reductase*“) und Dnr („*dissimilatory nitrate respiration regulator*“), sowie IHF („*integration host factor*“) beteiligt.

Das wahrscheinlich als Nitratpermease fungierende Porin OprF, das redox-aktive Azurin, das als Elektronenlieferant für die Nitritreduktase gilt, sowie die Peroxidase CcpR zeigten im *mutS*-Stamm M25 eine starke Überproduktion. Bei CcpR handelt es sich um eine neuartige Peroxidase mit zwei reaktiven Zentren. Das Eine sorgt für die Entgiftung toxischer Peroxide, während das Andere Elektronen für Proteine, die die Nitritreduktase reduzieren (z.B. Azurin), bereitstellt.

Auffallend war hier, dass die hauptsächlich Nitrat-regulierten Gene für die Denitrifikation eine schwache Expression aufwiesen. Eine Induktion scheint hier ohne den Haupttrigger Nitrat nicht möglich zu sein. Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob M25 erst bei Zugabe von Nitrat die Gene für die Denitrifikation induziert oder ob er zur Denitrifikation nicht mehr in der Lage ist.

ERGEBNISSE

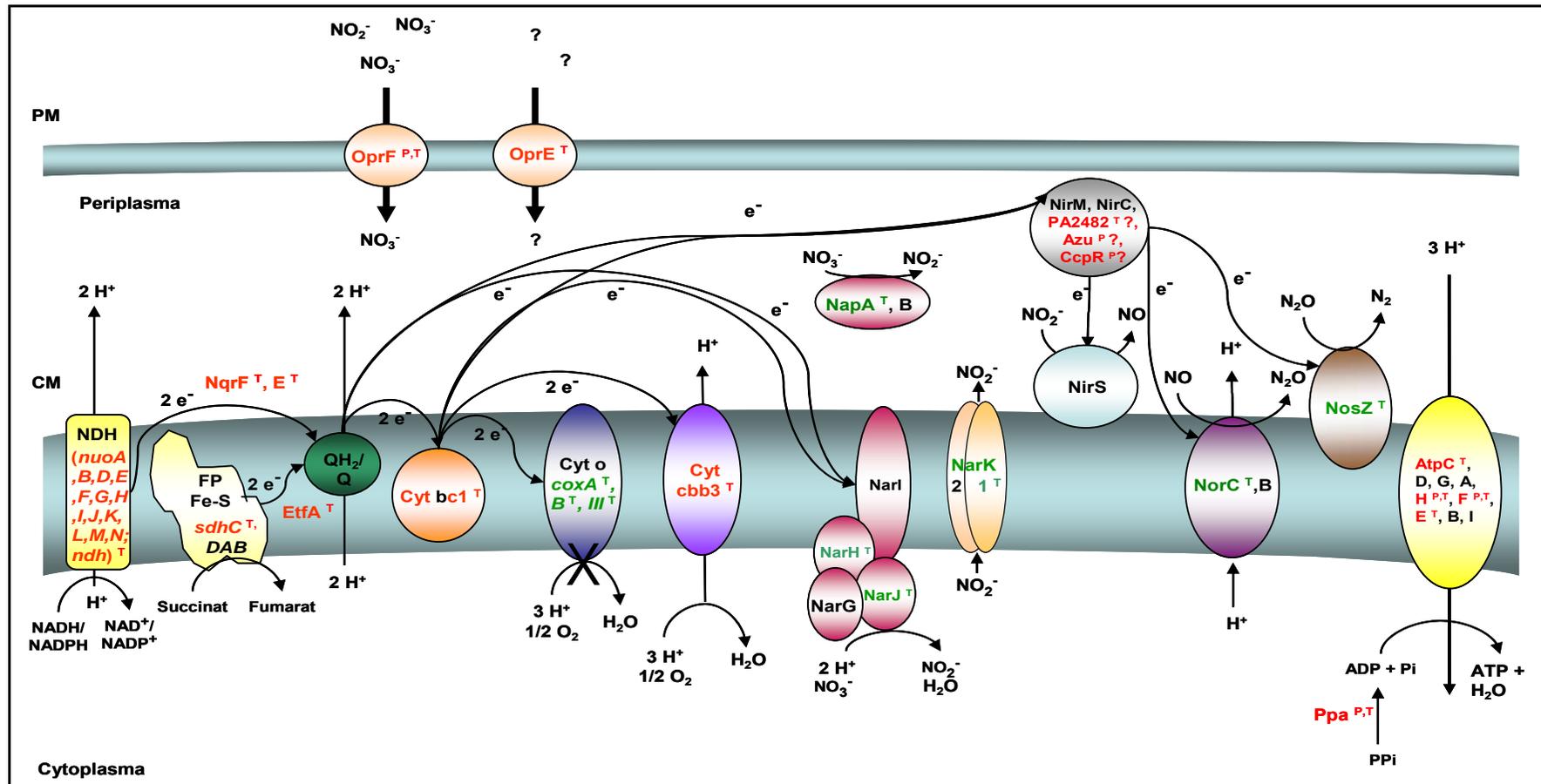


Abbildung C-41: Schematisches Modell der bei *P. aeruginosa* ablaufenden Redox-Reaktionen der ETP mit Elektronen und Protonen-Transfer. NHD: NAD(P)H-Dehydrogenase; FP: Flavoprotein; FE-S: Eisen-Schwefelprotein; QH₂/Q: Chinon/Semichinon; Cyt bc1: Cytochrom bc1-Komplex; Cyt c: Cytochrom c-Oxidase; Cyt cbb3: Cytochrom cbb3-Komplex; NapAB, periplasmatische Nitratreduktase; Nar GHJI, cytoplasmatische Nitratreduktase; NirS, respiratorische Nitritreduktase (ein Hämenzym); NorCB, NO-Reduktase; NosZ, N₂O-Reduktase; CM: Cytoplasmamembran. **P** hochgestellt: (P_n^{M25} / P_n^{M1}); **T** hochgestellt: \bar{U}_n / T_n^{M1} (T: Transkript; n: CF-Nummer; U_n = {T_n^{M25}, T_n^{M26}}; \bar{U}_n = arithmetisches Mittel von U_n). **Rot:** Erhöhte Produktion, **Grün:** Abgeschwächte Produktion.

C.6.7.1.3 Nitrat/Nitrit-Abbau

Ein Nitrat/Nitrit-Assay (Gries-Reaktion) sollte nun zum einen Aufschluss darüber geben, ob der späte *mutS*-Stamm M25 noch in der Lage ist, Nitrat und Nitrit zu reduzieren, und zum anderen, ob Nitrat das anaerobe Wachstum fördert.

Der frühe MutS⁺-Stamm M1 und der späte *mutS*-Stamm M25 wurden hierzu in LB mit 1mM Nitrat (KNO₃) sowohl mikroaerob als anaerob angezogen. Das entstandene Nitrit kann anhand der Gries-Reaktion gemessen werden. Diese wandelt Nitrit in einen violetten Azofarbstoff um, der bei 450nm vermessen werden kann und die äquimolare Konzentration an Nitrit widerspiegelt. Durch die Zugabe einer Nitratreduktase (Messung von Nitrit vor und nach Zugabe der Nitratreduktase) kann auch die Konzentration von Nitrat bestimmt werden.

Das frühe MutS⁺-Isolat M1 wuchs sowohl mikroaerob als auch anaerob sehr viel schneller als M25 (*mutS*) (Abbildung C-42). Damit einhergehend erfolgte auch der Abbau von Nitrat und vor allem von Nitrit sehr viel rascher.

Wie erwartet haben beide Isolate Nitrat sowohl mikroaerob als auch anaerob in Nitrit umgesetzt. Diese Daten sprechen dafür, dass Nitrat den hauptsächlichsten Induktor der Denitrifikation darstellt. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass unter mikroaeroben Zuständen in Anwesenheit von Nitrat aerobe und anaerobe Atmung wahrscheinlich parallel ablaufen können (Abbildung C-43 und Abbildung C-44).

Bei mikroaerobem Wachstum hatte M1 nach 6 h sowohl Nitrat als auch Nitrit verstoffwechselt und eine OD₆₀₀ von 2,84 erreicht. Nach 7 h fing M1 bereits an abzusterben, was eventuell auf den Verbrauch der Elektronenakzeptoren O₂, Nitrat und Nitrit zurückgeführt werden kann. Möglich ist auch die Anhäufung toxischer Zwischenprodukte wie NO, die von M1 entweder gar nicht oder nicht schnell genug abgebaut werden konnten.

Der späte *mutS*-Stamm M25 dagegen hatte nach 8,5 h eine OD₆₀₀ von 4,26 erreicht und befand sich noch im Wachstum, als der mikroaerobe Versuch abgebrochen wurde. Da weder Nitrat noch Nitrit aufgebraucht war, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob M25 Nitrit bis zum Stickstoff abbaut, oder ob die Denitrifikation an diesem Punkt abbricht. Allerdings war nur bei M1 eine starke Gasentwicklung festzustellen, während diese bei M25 überhaupt nicht zu beobachten war. Da das Gas nicht untersucht wurde, kann nur vermutet werden, dass es sich hierbei um Stickstoff gehandelt hat.

ERGEBNISSE

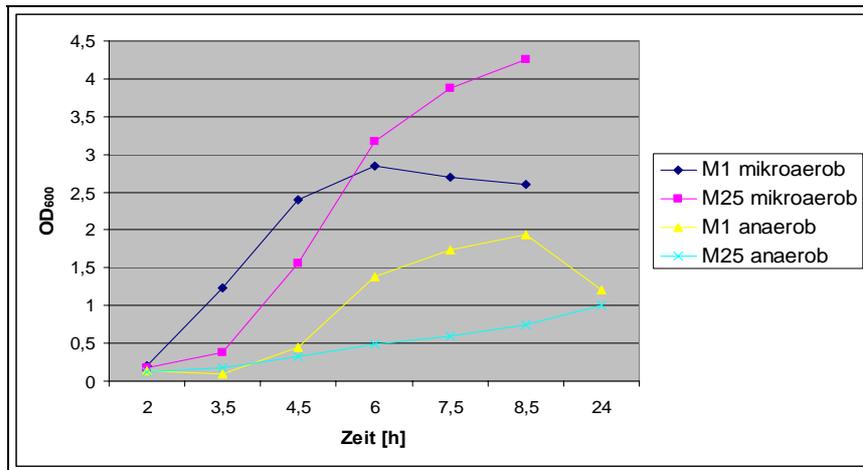


Abbildung C-42: Wachstumskurve (optische Dichte bei 600nm) von M1 (*MutS*⁺) und M25 (*mutS*) in LB mit 1mM Kaliumnitrat (KNO₃) unter mikroaeroben und anaeroben Bedingungen.

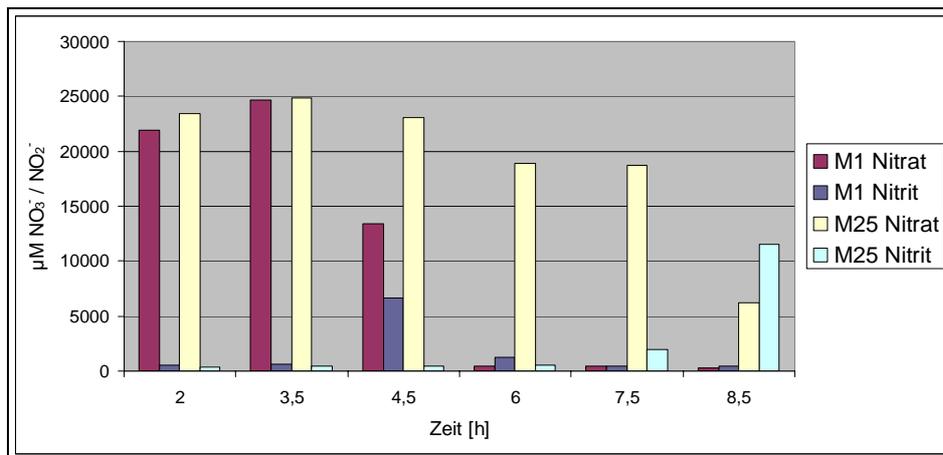


Abbildung C-43: Messung von Nitrat (NO₃⁻) und Nitrit (NO₂⁻) bei mikroaerobem Wachstum von M1 (*MutS*⁺) und M25 (*mutS*) in LB mit 1mM Kaliumnitrat (KNO₃).

Anaerob war bei M1 der gleiche Denitrifikationsprozess mit leichter zeitlicher Verzögerung zu erkennen. M1 hatte sowohl Nitrat als auch Nitrit nach 7h verstoffwechselt und fing nach 8,5h an abzusterben, während M25 nach 24h bei ca. 15µM Nitrit noch im Wachstum begriffen war. Da auch anaerob nach 24h Nitrit nicht aufgebraucht war, kann auch hier keine Aussage darüber getroffen werden, ob M25 Nitrit nur sehr langsam abbaut oder die Denitrifikation an diesem Punkt abbricht.

ERGEBNISSE

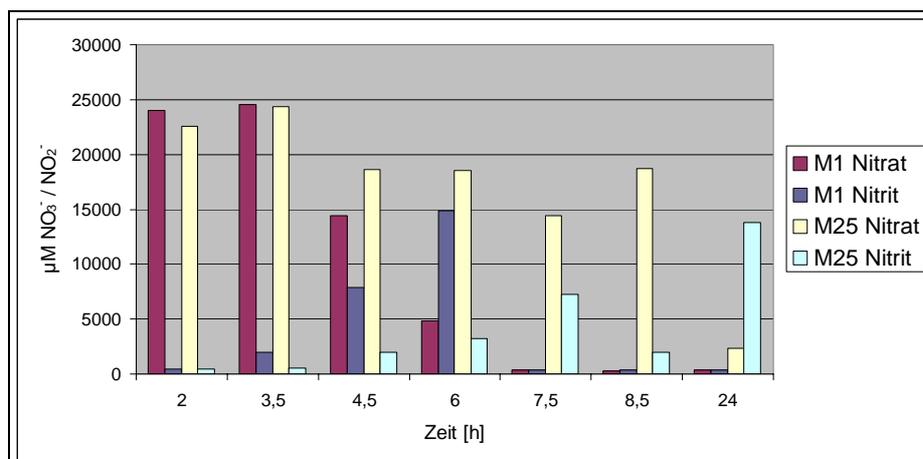


Abbildung C-44: Messung von Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) bei anaerobem Wachstum von M1 (MutS^+) und M25 (mutS) in LB mit 1mM Kaliumnitrat (KNO_3).

C.6.7.2 Expression der anaeroben Regulatoren ANR, DNR und IHF

Da die Sensitivität von Microarrays für die Transkriptomanalyse begrenzt ist, sollte die Expression der transkriptionellen Regulatoren Anr, Dnr und IHF mittels einer reversen PCR-Amplifikationstechnik (RT-PCR) untersucht werden.

Der anaerobe Regulator Anr ist ein O_2 -abhängiger Transkriptionsfaktor. Auf Proteinsequenzbasis weist Anr 51% Sequenzidentität mit Fnr (*fumerate nitrate reduction*) aus *E. coli* auf. Das C-terminale helix-turn-helix-Motiv ist fast identisch zum *E. coli* Fnr, und der N-Terminus enthält vier konservierte Cysteinreste, die in Fnr an der Bildung des [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt sind. Die Integrität dieses Fe-S-Zentrums ist vom Redoxzustand der Zelle abhängig. Unter oxidierenden Bedingungen wird das aktive [4Fe-4S]- zu einem [2Fe-2S]-Zentrum umgebaut oder ganz zerstört. Das Protein liegt dann als inaktives Monomer vor. Unter reduktiven Bedingungen entsteht wieder eine intakte [4Fe-4S]-Struktur und der Regulator geht in seine aktive, DNA-bindende Dimerform über (Sawers *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.*, 1991; Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1996).

Ein zweiter Regulator ist Dnr, der auf Proteinsequenzbasis Ähnlichkeit zu Anr aufweist. Allerdings fehlen der Dnr-Sequenz die konservierten Cysteinreste für die Bildung des O_2 -sensiblen Fe-S-Zentrums (Arai *et al.*, 1995). Das *dnr*-Gen wird von Anr aktiviert und reagiert selbst vermutlich auf N-Oxide.

ERGEBNISSE

Der „integration host factor“ IHF wird als heterodimeres Protein gebildet, kodiert von *ihfAD*. IHF bindet an doppelsträngige DNA und bewirkt eine Veränderung der DNA-Topologie.

Im Folgenden sollte von den 17 Isolaten von Patient M mithilfe der RT-PCR die Expression der Gene für die drei anaeroben Regulatoren Anr, Dnr und IHF analysiert werden. Dabei wurde bei IHF nur das *ihfD*-Gen untersucht. Um ein reproduzierbares Ergebnis zu gewährleisten, wurde die RNA jeweils aus mindestens drei unabhängigen Anzuchten isoliert, in cDNA umgeschrieben und mithilfe des Light-Cyclers amplifiziert, der eine online-Beobachtung des Amplifikationsprozesses anhand der Fluoreszenzzunahme ermöglichte. Wie in der RT-PCR des *ampC*-Gens beschrieben, diente hier das Housekeeping-Gen *rpoD* als Bezugspunkt zur Berechnung der relativen *anr*-Expression.

Auffallend war, dass alle *mutS*-Stämme des Patienten M hinsichtlich *anr* und *dnr* eine starke Expression aufwiesen. Bei *ihfD* zeigten die beiden frühen *mutS*-Stämme M13 und M20 keine Überproduktion. Der späte MutS⁺-Stamm M23, der in einigen Phänotypen, wie beispielsweise hinsichtlich des Motilitätsverlusts und der Überexpression der β -Lactamase, den *mutS*-Stämmen gleicht, zeigt wie die anderen MutS⁺-Stämme keine erhöhte Transkription von *anr*, *dnr* und *ihfD*.

Wie bereits erwähnt, wird *dnr* von Anr aktiviert. Die Regulation von *anr* und *ihfAD* hingegen ist noch nicht geklärt. *anr* gilt als konstitutiv exprimiert, dennoch ist in den *mutS*-Stämmen eine Induktion des *anr*-Genes festzustellen. Im Folgenden sollte durch Sequenzanalyse geklärt werden, ob in den drei anaeroben Regulatoren, sowie deren Promotorbereichen zu Mutationen vorliegen.

ERGEBNISSE

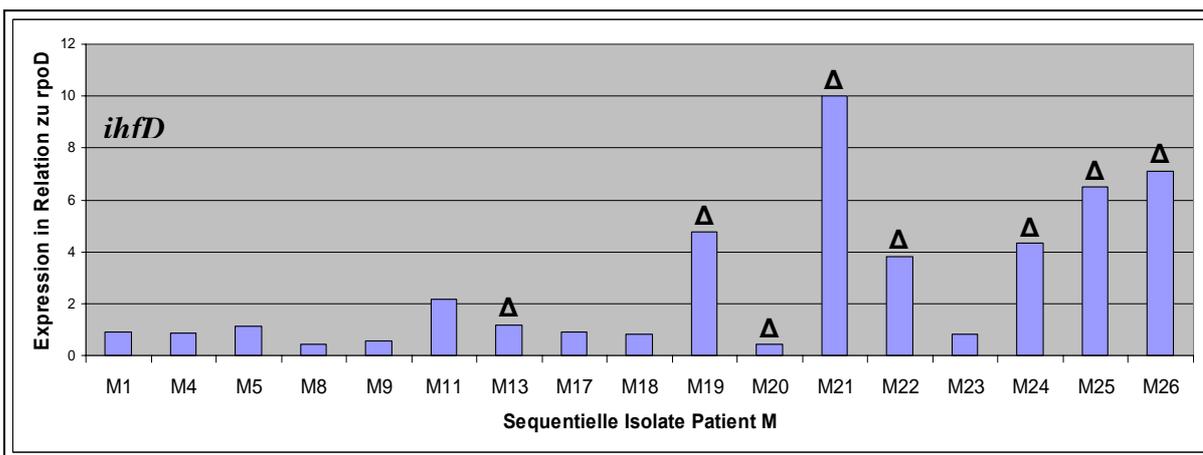
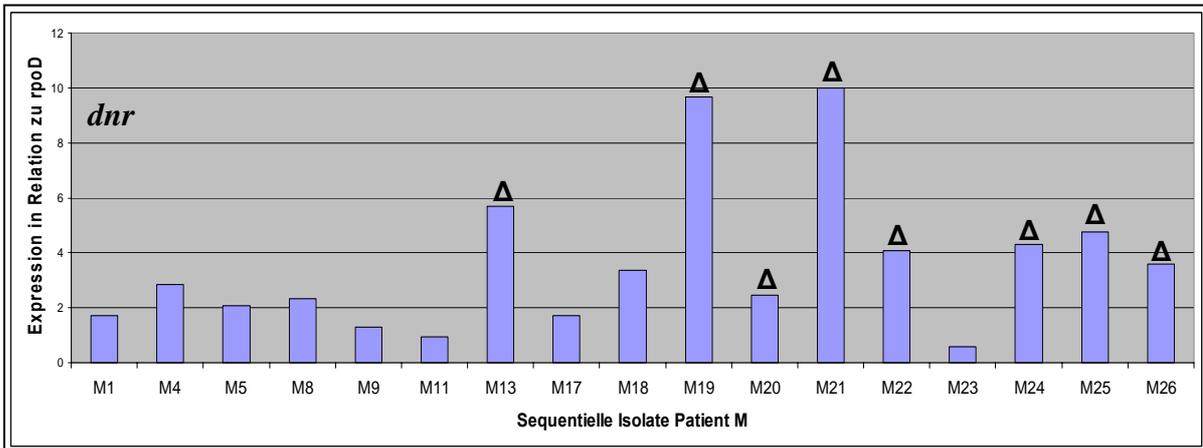
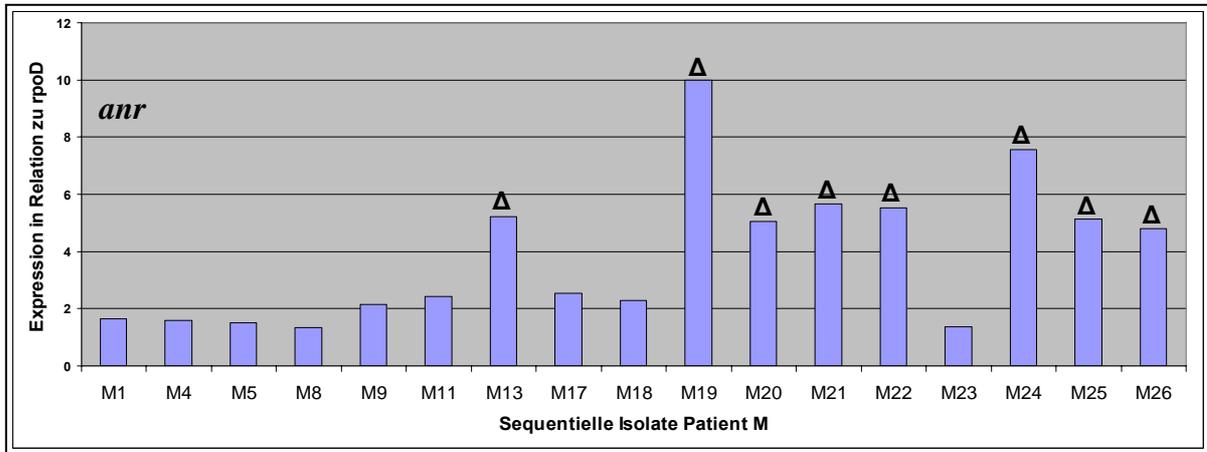


Abbildung C-45: Expression der *anr*-, *dnr* und *ihfD*-Gene in sequentiellen CF-Isolaten von Patient M. Zur Standardisierung der Expression der Gene durch RT-PCR am Light-Cycler diente das „housekeeping“-Gen *rpoD*. Δ: *mutS*-Stämme.

C.6.7.2.1 Sequenzanalyse der anaeroben Regulatoren

Eine Sequenzanalyse der Promotorbereiche (300bp), von *ihfA* und *ihfD* ergab weder bei den *mutS*- noch bei den MutS⁺-Isolaten eine Mutation. Der Promotorbereich von *anr* zeigte ebenfalls keine Mutationen, während im Gen selbst bei allen *P. aeruginosa*-Isolaten vier Basenaustausche zu finden waren, die sich aber als stille Mutationen erwiesen. Nur in der Promotorregion von *dnr* wurde an Position 10 des 14 Nukleotide langen Anr-Bindebereiches bei allen Isolaten von Patient M eine Mutation gefunden (A⇒G). Die Statistik der von Münch erstellten Anr-Konsensussequenz findet bei 7 Anr-Regulons ein A, während G nur 4mal auftritt. Ob dies einen Effekt auf die Effektivität der Anr-Bindung hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

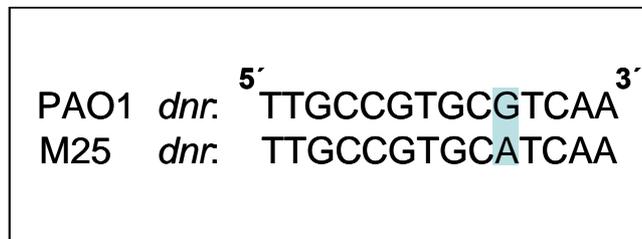


Abbildung C-46: Sequenz der Anr-Bindestelle des *dnr*-Gens von PAO1 und dem *mutS*-Stamm M25.

C.6.7.3 Proteomanalysen von *P. aeruginosa* unter anaeroben Kulturbedingungen

Die vorangegangenen Daten deuten auf eine schnellere oder sogar konstitutive Adaption der späten *mutS*-Isolate an das mikroaerobe bis anaerobe Milieu in der CF-Lunge hin.

Die 2-DE anaerober Kulturen sollte nun klären, inwieweit der früheste MutS⁺-Stamm M1 sich dem späten *mutS*-Stamm M25 unter anaeroben Anzuchtbedingungen in LB mit Nitrat angleicht.

Bei den anaerob regulierten (z.B. *azu*, *arc*-Operon), unter mikroaeroben Bedingungen differentiell exprimierten Genen sollte eine Angleichung stattfinden.

Die Kulturen wurden in 300ml LB mit 100mM KNO₃ bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 angezogen und das Gesamtzelllysate, wie in Kapitel B.6.1.1 beschrieben, extrahiert.

Eine Angleichung der Proteinkonzentrationen fand beispielsweise bei Azurin, OprF und den metabolischen Proteinen GlcB, AnsB oder SucC statt. Tabelle C-10 zeigt eine Auflistung der unter mikroaeroben Anzuchtbedingungen als differentiell identifizierten Proteine und deren Konzentration unter anaeroben Bedingungen. Die vergleichende Abschätzung

ERGEBNISSE

der Proteinmengen (Quantität) im 2 D-Gel unter mikroaeroben und anaeroben Bedingungen ließ teilweise eher auf eine Angleichung von M25 an M1 schließen. Die anaerobe Adaptation des späten *mutS*-Stamms M25 könnte sich auch in der Überproduktion anaerob oder durch Nitrat reprimierter Gene äußern. Ohne diese reprimierenden Faktoren erscheinen die Proteine, für die diese Gene kodieren, dann als überproduziert, während sie anaerob mit Nitrat eine normale Konzentration im 2-DE-Gel aufweisen.

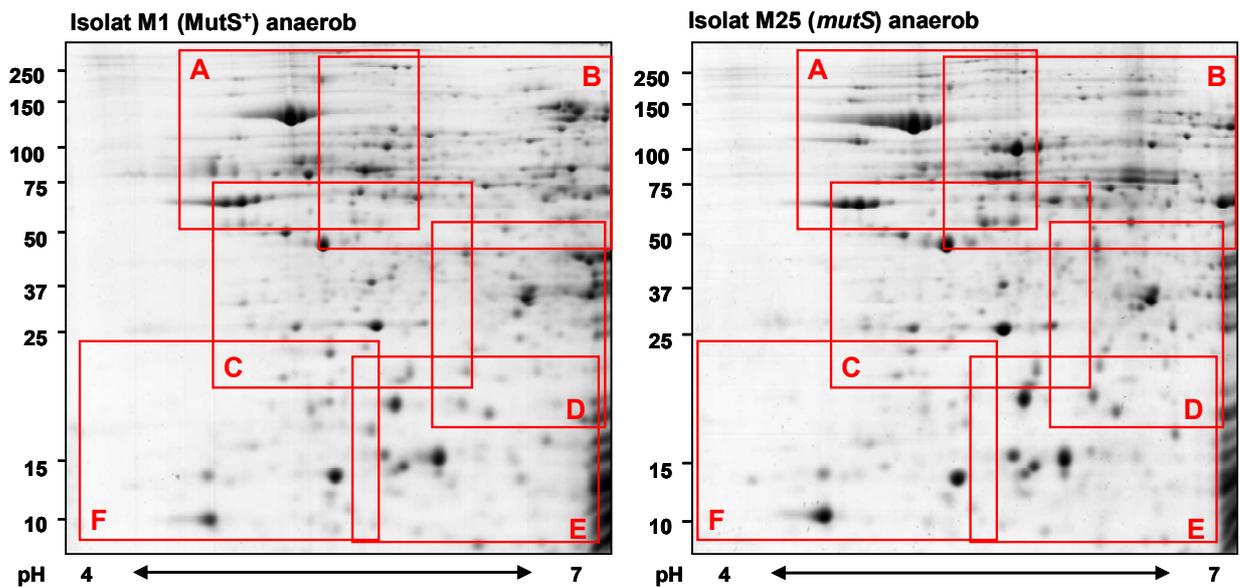


Abbildung C-47: Vergleich des GZL von M1 und M25 unter anaeroben Anzuchtbedingungen mit 100mM KNO₃, im pH Bereich 4-7, (12,5 % PAA); Auf den Übersichtsgelen der Isolate M1 und M25 sind sechs Bereiche (A-F) rot gekennzeichnet. Die korrespondierenden Bereiche sind in Abbildung C-48 und Abbildung C-49 vergrößert dargestellt.

ERGEBNISSE

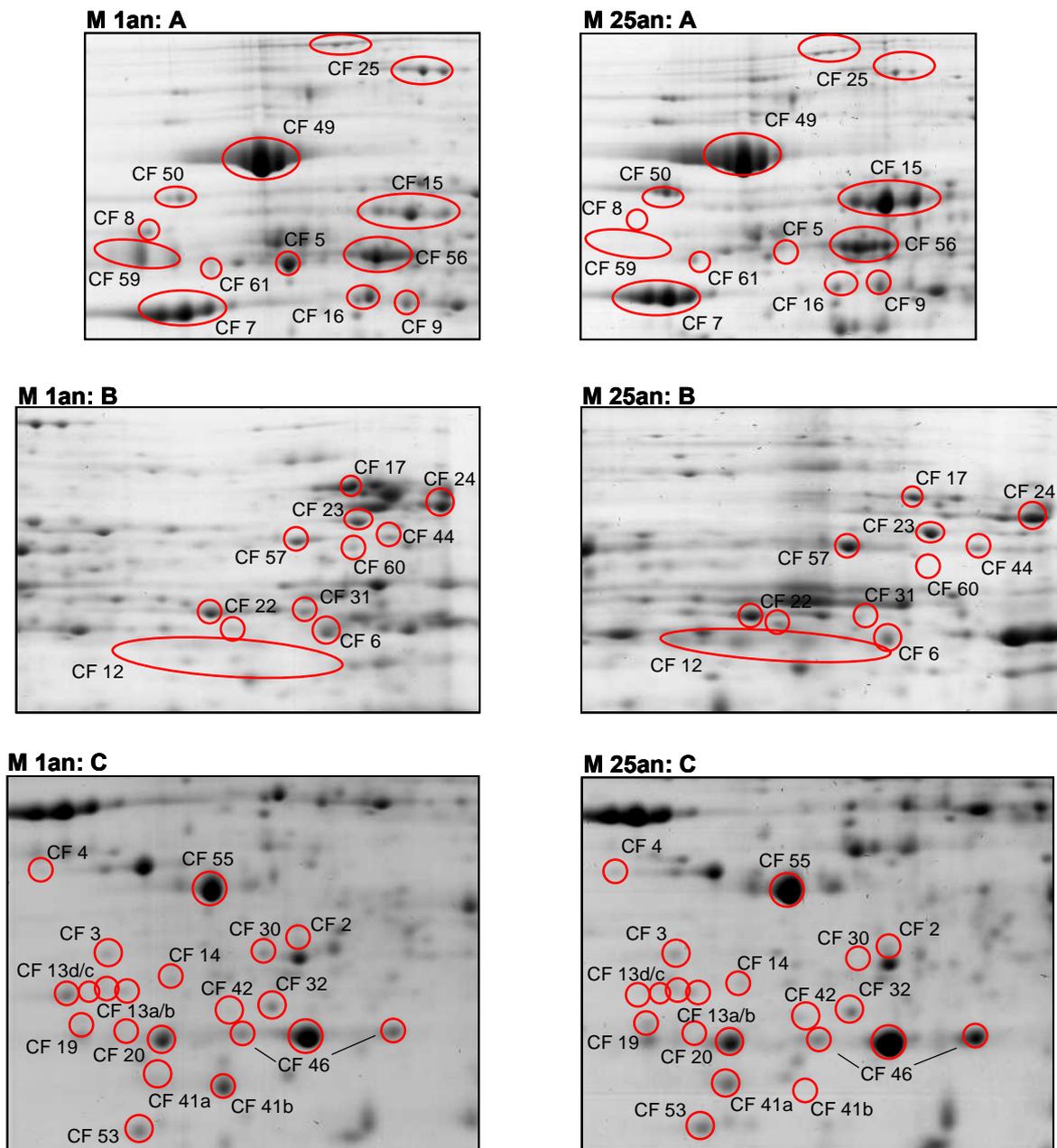


Abbildung C-48: Ausschnitte A - C der Übersichtsgel des GZL von den anaerob angezogenen *P. aeruginosa*-Isolaten M1 und M25 (Abbildung C-47).

ERGEBNISSE

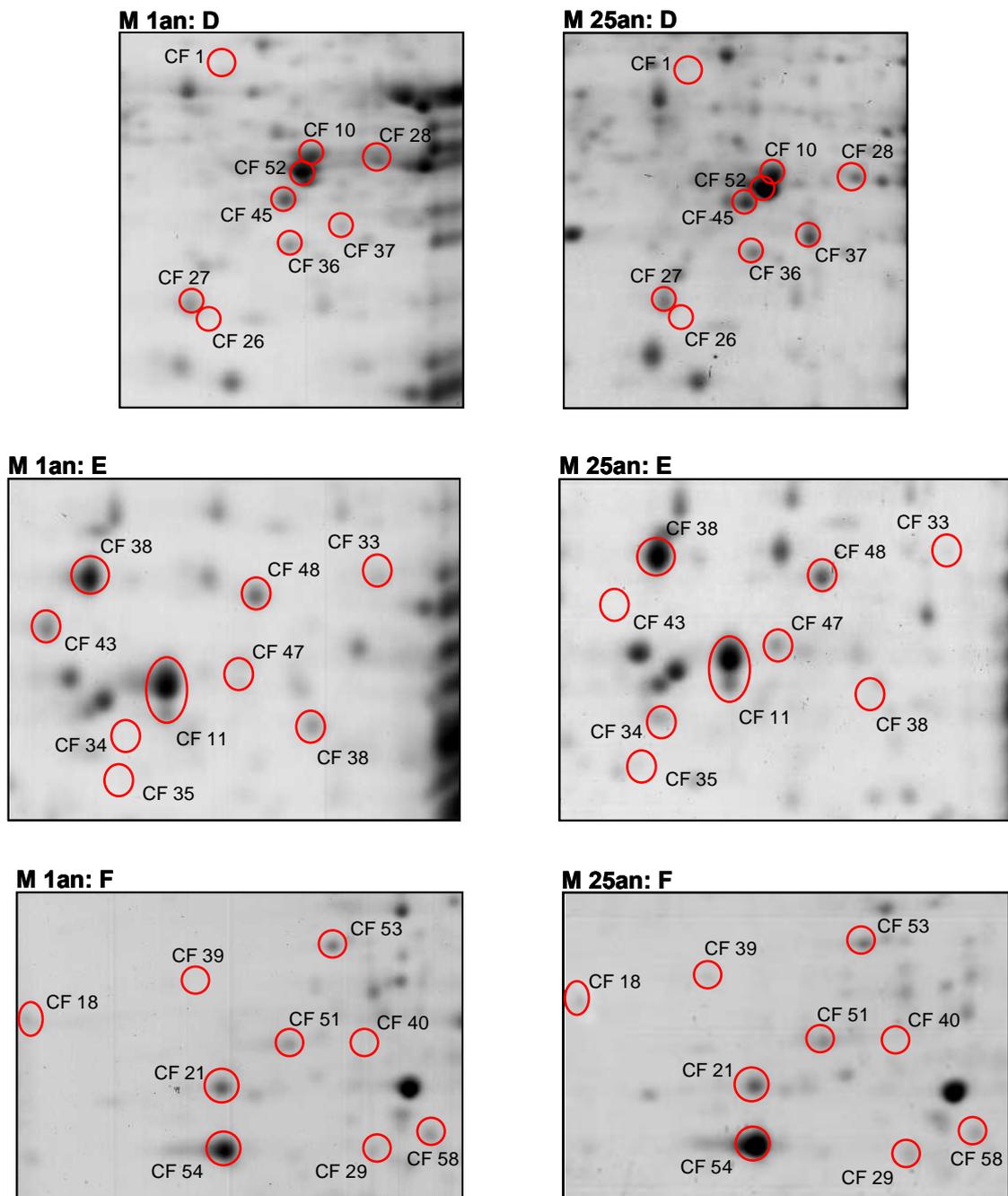


Abbildung C-49: Ausschnitte D - F der Übersichtsgele des GZL von den anaerob angezogenen *P. aeruginosa*-Isolaten M1 und M25 (Abbildung C-47)

ERGEBNISSE

Tabelle C-10: Auflistung der im Proteom mikroaerob angezüchteter *P.aeruginosa* Stämme M1 (*MutS*⁺) und M25 (*mutS*) als differentiell identifizierten Proteine (1-61) und die Quantitäten dieser Proteine in den anaerob angezogenen Stämmen. $P_n^{M_i} / P_n^{M1}$

Die Quotienten der gescatteten Proteinspots sind zusammengefasst, indem die Einzelquantitäten addiert und durch die Anzahl der Einzelspots geteilt wurden. **P**: Protein; **n**: CF-Nummer; **X**: Patient; **i**: Isolatindex. Schwarz: keine differentielle Produktion ($0,5 < x < 2$); Rot: stärker produziert ($x \geq 2$); Grün: schwächer produziert ($x \leq 0,5$); -: Protein konnte nicht detektiert werden. *: Mehrere Proteinspots durch Isoformen mit leichter Veränderung im pI.

CF-Nr.	Gen ¹⁴	anaerob			mikroaerob		
		Quantität		P_n^{M25} / P_n^{M1}	Quantität		P_n^{M25} / P_n^{M1}
		M1	M25		M1	M25	
1	<i>rbsB</i>	-	989,3	206,4	863,1	1775,5	2,06
2	<i>aotJ</i>	298,3	714,4	2,39	736	2485,6	3,38
3	PA5153	476,6	1019,1	2,14	723,7	2277,3	3,15
4	PA1260	131,5	174,9	1,33	624,3	1496,4	2,4
5	<i>braC</i>	13139,5	4057,5	0,31	19952,7	33404,8	2,17
6	<i>spuD</i>	2056,6	2672,2	1,3	1720,4	8543,1	4,97
7*	<i>oprF</i>	41799,7	24972,7	0,6	5823,1	3486,1	0,6
7*	<i>oprF</i>	20111,3	12788,8	0,64	4471,1	15486,9	3,46
7*	<i>oprF</i>	12717,5	24387,9	1,92	4686,2	15652,1	3,34
7*	<i>oprF</i>	3141,1	3120,2	0,99	6154,9	2718,5	0,44
8	<i>oprD</i>	1362,8	-	0	2687,1	-	0
9	<i>fda</i>	2688,3	2869,5	1,07	1513,9	3451,8	2,28
10	<i>adk</i>	4381,5	10974,9	2,5	4324,8	8742,2	2,02
11*	<i>azu</i>	1706,1	2231,8	1,31	35251,9	100837	2,86
11*	<i>azu</i>	55085,9	42774,6	0,78	1395,5	3750,6	2,69
12*	<i>ccpR</i>	263,6	4177,5	15,85	4306,7	16234	3,77
12*	<i>ccpR</i>	58,4	473,4	8,1	9111	35973,8	3,95
12*	<i>ccpR</i>	248,5	4192,7	16,87	7062,1	27156	3,85
12*	<i>ccpR</i>	270,4	811	3	5591,1	18086,7	3,23
12*	<i>ccpR</i>	-	-	-	2545,8	6412	2,52
13*	<i>leuD</i>	197,2	1287,2	6,53	-	954,4	111,07
13*	<i>leuD</i>	1913,2	3227,7	1,69	5767	-	0
13*	<i>leuD</i>	310,3	373	1,2	688,6	5233,4	7,6
13*	<i>leuD</i>	335,3	572,7	1,71	1223,1	3176,9	2,6
14	<i>hisF1</i>	-	623	129,99	377	855,1	2,27
15*	<i>arcA</i>	1794,9	8942,7	4,98	3715,2	4940	1,33
15*	<i>arcA</i>	2160,1	15548,2	7,2	878,6	3901,7	4,44
16*	<i>arcC</i>	1458,8	5024,5	3,44	-	2356,3	274,22
16*	<i>arcC</i>	-	-	-	1344,7	2263,3	1,68
16*	<i>arcC</i>	-	-	-	-	1163	135,34
17	PA2888	5396,3	2497,6	0,46	675,6	3526,3	5,22
18	<i>acpP</i>	187,1	365,6	1,95	21,2	3384,1	159,77
19	<i>accB</i>	168,2	613,2	3,64	705,7	1469,4	2,08
20*	<i>ppa</i>	5630,3	7605,9	1,35	6468,1	14531,9	2,25
20*	<i>ppa</i>	-	-	-	-	2127	247,52
21	<i>trxA</i>	3520,8	4700,3	1,34	6981,8	16933,6	2,43
22*	<i>sucC</i>	3368,2	6175,8	1,83	2570,2	4497,6	1,75
22*	<i>sucC</i>	-	-	-	717,1	2522,2	3,52
23*	<i>ansB</i>	1299,5	-	0	-	557,3	64,86
23*	<i>ansB</i>	3924,2	2918,4	0,74	2412,2	3439	1,43

¹⁴ www.pseudomonas.com

ERGEBNISSE

CF-Nr.	Gen ¹⁴	anaerob			mikroaerob		
		Quantität		P _n ^{M25} / P _n ^{M1}	Quantität		P _n ^{M25} / P _n ^{M1}
		M1	M25		M1	M25	
24	<i>lpdG</i>	7665,2	9915,1	1,29	1090,4	1904,3	1,75
25*	<i>glcB</i>	1079,2	1353,9	1,25	1315	1924,9	1,46
25*	<i>glcB</i>	1966,2	1681,5	0,86	1088,2	2769,6	2,55
25*	<i>glcB</i>	1941	545,9	0,28	-	673,3	78,35
26	<i>atpF</i>	1294,5	1278	0,99	289,6	629,1	2,17
27	<i>atpH</i>	-	163,6	34,13	491,1	1241,5	2,53
28	<i>pdxH</i>	2435,4	1683,4	0,69	3102,6	4496,6	2,45
29	<i>glnK</i>	590,2	390	0,66	310,9	1721,7	5,54
30	<i>atoD</i>	616	-	0,01	1743,3	614,2	0,35
31	<i>atoB</i>	1584,5	-	0	2873,7	1216,6	0,42
32	PA0318	1195,6	1268,4	1,06	1205,1	3775,4	3,13
33	PA2575	3203	1900,7	0,59	3515,2	9026,9	2,57
34	PA0388	381,3	333,8	0,88	155,8	2243,8	14,4
35	PA3440	749,1	783,4	1,05	-	1549,6	180,34
36	PA1677	1717,3	2181,3	1,27	2102	883,7	0,42
37	PA5178	954,7	-	0	1530,5	467,4	0,31
38*	PA3309	19389,9	29557,2	1,52	27505,6	24586,9	0,89
38*	PA3309	-	-	-	4413,4	-	0
39	PA5339	-	63,1	13,17	251,4	526,6	2,09
40	<i>btuE</i>	-	-	-	-	994,3	115,71
41*	<i>sodB</i>	-	3329	694,57	2029,1	2090,7	1,03
41*	<i>sodB</i>	4857,5	-	0	2799,6	-	0
42	PA2081	-	1511,9	315,44	537,2	5313,8	9,89
43	<i>bfrA</i>	3790,2	-	0	3051	-	0
44	<i>katA</i>	1151,5	885	0,77	828,4	300,1	0,36
45	<i>ahpC</i>	3923,1	5445,9	1,39	3809,5	1881,5	0,49
46*	<i>tsaA</i>	1445	6873,8	4,76	7178,8	3162,3	0,44
46*	<i>tsaA</i>	32509,7	42160,5	1,3	20169	24155,5	1,2
46	<i>tsaA</i>	2290,2	5200,5	2,27	3290,7	1422,2	0,43
47	<i>ibpA</i>	-	653,9	136,43	6283,8	265,9	0,04
48	<i>ppiB</i>	4220,5	4163,4	0,99	3755,3	9829,4	2,62
49	<i>groEL</i>	137429,9	77563,1	0,56	33283,3	26717,4	0,8
50	<i>tig</i>	1213,3	3990,9	3,29	2780,1	2988,5	1,07
51	<i>rpsF</i>	369,9	1536,4	4,15	497,2	2613,5	5,26
52	PA4671	17867,3	18738,9	1,05	9138,6	8001,7	1,88
53	<i>greA</i>	2136,6	2146,6	1	3474,5	7472,6	2,15
54	<i>rplL</i>	12507	35924,9	2,87	10703,4	46755,8	4,37
55*	<i>tsf</i>	1756,4	3851,4	2,19	3227,1	2461,9	0,76
55*	<i>tsf</i>	33555,5	22656,2	0,68	14601,4	14036,2	0,96
56*	<i>tufA</i>	18700,3	17809,1	0,95	3726,5	9438,3	2,53
56*	<i>tufA</i>	-	-	-	1257	2922,5	2,32
57	<i>guaB</i>	9103,8	907,5	0,1	690	2111,2	3,06
58	<i>pilH</i>	457	531,7	1,16	1186,5	3081,3	2,6
59*	<i>fliC</i>	3599,8	-	0	5348,7	-	0
59*	<i>fliC</i>	6598,1	-	0	38532	-	0
59*	<i>fliC</i>	-	-	-	19288	-	0
60	<i>murF</i>	1251,9	-	0	447,7	205,2	0,46
61	<i>fisZ</i>	630,5	871,3	1,38	3875,6	919,4	0,24

C.6.7.4 Potentiell Anr-regulierte Gene

Anr ist ein O₂-abhängiger Transkriptionsfaktor, der eine ähnlich DNA-Sequenz-Konsensussequenz wie Fnr aus *E. coli* erkennt (Abbildung C-50).

Eine Analyse der Promotorregionen der im späten *mutS*-Stamm M25 induzierten Gene ergab bei einigen eine potentielle Anr-Bindestelle (Tabelle C-11). Darunter befanden sich die Gene für den IHF (*ihfD* und *ihfA*), für die Isocitratdehydrogenase (*idh*), für die Ketoglutarat-Dehydrogenase (*lpdG*) u. a.

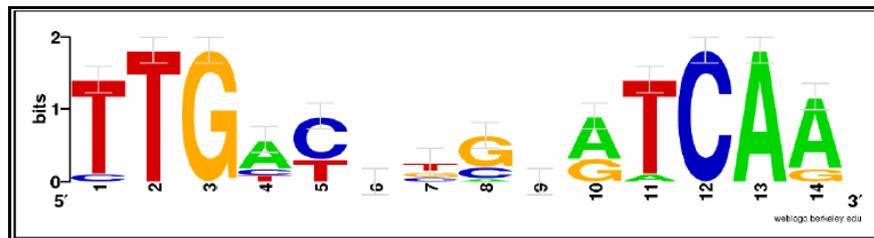


Abbildung C-50: Konsensussequenz der Anr-Bindestelle in *P. aeruginosa* (aus Münch, 2003)
Die Größe der dargestellten Nukleotide gibt die beobachtete Häufigkeit der Nukleotide an der entsprechenden Position an. Das Logo wurde aus den Informationen von 12 Literaturangaben erstellt.

Tabelle C-11: Differenziell exprimierte Gene mit einer potentiellen Anr-Bindestelle.
NTGNNNNNNNNCAN: minimale Anr-Konsensussequenz. P: Proteom; T: Transkriptom.

Gen-Nr	Gen	Anr-Bindestelle	bp strom-aufwärts vom Startkodon	Erhöhte Werte in P oder T	Funktion
3161	<i>ihfD</i>	TTGGACCTGTTCAA	~ 60	/	IHF beta-Untereinheit
1793	<i>ppiB</i>	TTGCCGGCATCCAG	~ 180	P; T	Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase
2886-2893	/	TTGTCGGCATT CAT	~ 130	P	Fettsäureabbau-Operon
2081	/	ATGCGACCTTGCAT	~ 60	P	hypothetisches Protein; Metallo-β-Lactamase-familie
3126	<i>ibpA</i>	CTGGCGCTGTCCAG	~ 190	P	Hitzeschockprotein
1560	<i>accB</i>	TTGAACAACCTTCAA	~ 30	P; T	Biotin-carboxyl-trägerprotein
3120	<i>idh</i>	TTGAGCGAAGGCAT	~ 60	P; T	Isocitratdehydrogenase
5339	/	CTGCGCGCCCTCAA	~ 90	T	90%ige Ähnlichkeit zu dem Nitrogenaseregulator VnfA <i>A. vinalandii</i>
2177	/	TTGCCAATGGCCAA	~ 640	T	49%ige Ähnlichkeit zu

ERGEBNISSE

					FixL (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)
0105-0108	cox-Operon	TTGTTATGTCGCAG	~ 150	T	Cytochrom c Oxidase
1587	<i>lpdG</i>	CTGGTGGCGATCAA	~ 120	P; T	TCA Zyklus, α -Ketoglutaratdehydrogenase
297	<i>spu</i> -Operon	CTGTGGGATGTCAA	~ 180	P; T	Putrescinaufnahme
895	<i>aru</i> -Operon	ATGATCGCCTCCAG	~ 400	P; T	Argininabbau
4429-4431	<i>cytbc1</i>	GTGCGATCCGTCAC	~ 400	T	Ubiquinol-cytochrom c Reduktase
2637-2649	<i>nuo</i> -Operon	TTGAAGCCTTGCAA ATGCGACATTGCAA	~ 280 ~ 295	T	NADH-Dehydrogenase
1585	<i>suc</i> -Operon	CTGAACCCGACCAA	~ 300	P; T	TCA Zyklus, α -Ketoglutaratdehydrogenase
5119	<i>glnA</i>	ATGGAATGATGCAC	~ 240	T	Glutaminsynthetase
1777	<i>oprF</i>	ATGGATGCGCTCAG	~ 360	P	Nitratpermease

Diese Ergebnisse könnten durch entsprechende Promotor-Reporterfusionen überprüft werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

D **Diskussion**

Die Daten von Proteom und Transkriptom sollen anhand von bekannten Reaktionswegen interpretiert werden, auch wenn im Rahmen dieser Arbeit weder Enzymaktivitäten noch Metabolitflüsse bestimmt wurden

D.1 **Der hypermutierende Phänotyp**

Neu erworbene Mutationen können die unterschiedlichsten Auswirkungen auf die Fitness von Bakterien haben. Diese reichen von schädlichen über neutrale bis hin zu nützlichen Mutationen. Die meisten spontan erworbenen Mutationen haben allerdings neutrale oder schädliche Auswirkungen. Bei *E. coli* K-12 beispielsweise konnte man pro Genom und Replikation eine Rate schädlicher Mutationen von mindestens $2-8 \times 10^{-4}$ zeigen (Kibota and Lynch, 1996; Boe *et al.*, 2000), wohingegen die Rate der nützlichen Mutationen nur bei 2×10^{-9} lag (Imhof and Schlotterer, 2001). Ursprünglich ging man davon aus, dass daher alle Organismen die Mutationsrate mit Hilfe von Fehlervermeidungs- und Fehlerkorrekturmechanismen so klein wie möglich halten.

Heute weiß man, dass die Häufigkeit spontaner Mutationen aus dem Gleichgewicht von schädlichem Effekt der Mutationen einerseits und dem metabolischen Aufwand der DNA-Reparaturmechanismen andererseits resultiert (Drake *et al.*, 1998). Daher ist anzunehmen, dass Mutanten eine Reduktion ihrer Fitness aufweisen. Im Widerspruch hierzu steht die Tatsache, dass Stämme mit erhöhter Mutationsrate nicht selten in natürlichen Bakterienpopulationen vorkommen. So fand man Mutatorstämme mit variierender Häufigkeit von 0,1% bis 60% in Populationen von *E. coli* (Matic *et al.*, 1997), *S. enterica* (LeClerc *et al.*, 1996), *N. meningitidis* (Richardson *et al.*, 2002), *H. influenzae* (Watson *et al.*, 2004), *S. aureus* (Prunier *et al.*, 2003), *H. pylori* (Bjorkholm *et al.*, 2001), *S. pneumoniae* (del Campo *et al.*, 2005) und *P. aeruginosa* (Oliver *et al.*, 2000, Hogardt *et al.*, 2006).

Sowohl experimentelle (Mao *et al.*, 1997; LeClerc *et al.*, 1998) als auch theoretische (Boe *et al.*, 2000) Ergebnisse deuten auf ein viel häufigeres Vorkommen von Mutatorstämmen in natürlichen Populationen hin als das Gleichgewicht aus Mutation und Selektion suggeriert. In natürlichen Habitaten scheint es also Bedingungen zu geben, in denen der Mutatorstamm einen eindeutigen Selektionsvorteil besitzt. Demnach spielen hohe Mutationsraten eine besondere Rolle bei der adaptiven Evolution. Mutator-Populationen sind zu einer

schnelleren Anpassung an die sie umgebenden Bedingungen fähig (Taddei *et al.*, 1997). Möglich ist aber auch, dass adaptive Mutationen deshalb so kontrovers diskutiert wurden, weil nicht unterschieden wurde zwischen dem in der mikrobiellen Genetik genutzten Selektionsdruck, der seltene Mutationen mit leicht sichtbaren phänotypischen Veränderungen findet, und zwischen dem Selektionsdruck, der auf natürliche Populationen wirkt und auch die alltäglicheren Mutationen mit leichten Veränderung favorisiert (Roth *et al.*, 2006).

Die Mehrheit der natürlichen Mutatorstämme hat einen Defekt in einer oder mehreren Komponenten des MMR (methyl-directed mismatch repair) Systems, vor allem im *mutS*-Gen (LeClerc *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2003; Matic *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 2002). Neben der Fehlerkorrektur in der neu replizierten DNA ist das MMR System auch eine Barriere für die Rekombination homologer DNA Sequenzen (Matic *et al.*, 1995; Modrich & Lahue, 1996; Rayssiguier *et al.*, 1989).

Ein Beispiel für eine Umgebung, in der eine erhöhte Mutationsfrequenz einen besonderen Vorteil mit sich bringen könnte, ist die chronisch infizierte Lunge von CF-Patienten, in der der Umweltkeim *P. aeruginosa* lebenslang persistiert. Dabei muss sich *P. aeruginosa* sowohl an physiologisch heterogene Gewebereiche der entzündeten CF-Lunge als auch an die Immunabwehr und die wechselnde Antibiotikatherapie anpassen. Im Gegensatz zu akuten *P. aeruginosa*-Infektionen, bei denen Mutatorstämme wahrscheinlich keine Rolle spielen, können bis zu 36% der CF-Patienten mit einem hypermutierenden *P. aeruginosa*-Klon kolonisiert sein (Oliver *et al.*, 2000), und zwar mit einer Prävalenz der Mutatorstämme von 50% (Maciá *et al.*, 2005). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf die Dominanz eines einzigen hypermutierenden Klons während der chronischen *P. aeruginosa*-Pneumonie hin. Sequenzanalysen zufällig isolierter *P. aeruginosa*-Stämme des finalen Stadiums ergaben eine Prävalenz des *mutS*-Genotyps von bis zu 100%. Diese Daten scheinen den Selektionsvorteil des *mutS*-Genotyps in der CF-Lunge zu belegen.

D.1.1 Mutationsloci

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche *P. aeruginosa*-Gene der CF-Isolate sequenziert. Auffallend war hierbei, dass nichtsynonyme Mutationen hauptsächlich in transkriptionellen Regulatoren zu finden waren. Nichtsynonyme Mutationen wurden in *ampD*, dem negativen Regulator der β -Lactamase und in *lasR*, dem zentralen Regulator des QS-Systems (nicht diese Arbeit) gefunden. Die Gene *ampR* und *lasR* gelten bei *P. aeruginosa*-CF-Isolaten bereits als bevorzugte Mutationsorte, da sie die Resistenz und Virulenz von *P. aeruginosa* beeinflussen.

In anderen Regulatoren wie *anr* und *dnr* wurden bisher keine Mutationen beschrieben (Smith *et al.*, 2006). Übereinstimmend damit konnte in dieser Arbeit weder im *anr*-Gen selbst noch in dessen Promotorbereich eine Mutation gefunden werden. Der Promotorbereich von *dnr* dagegen wies in allen Isolaten von Patient M eine Mutation der Anr-Bindestelle auf. Diese Mutation führt zu einer besseren Übereinstimmung mit der bekannten Anr-Konsensussequenz. Es wäre denkbar, dass die anaerobe Aktivierung von *dnr* durch verbesserte Bindung von Anr an die *dnr*-Operatorsequenz begünstigt wird.

D.2 Resistenzmechanismen

Hypermutierende Stämme wurden in natürlichen Bakterienpopulationen mit der Resistenzentwicklung gegen die Immunabwehr des Wirts, wie beispielsweise die Mutationsabhängige Phasenvariation in *N. meningitidis* (Richardson *et al.*, 2002), oder mit der AB-Resistenz bei *P. aeruginosa*-Isolaten chronischer CF-Infektionen (Oliver *et al.*, 2000) assoziiert. Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien belegen, dass Antibiotikatherapien die Selektion auf Mutatorstämme fördern, da so schneller Antibiotikaresistenzen entstehen können (Mao *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 2002).

D.2.1 Die β -Lactamase AmpC

Alle *P. aeruginosa*-Stämme besitzen eine chromosomale Klasse C β -Lactamase AmpC (Ambler, 1980), die induzierbar ist, aber auch durch eine Mutation dereprimiert sein kann. Bei Enterobakterien ist die Regulation der *ampC*-Expression eng mit der Regeneration der Zellwand verbunden. In Abwesenheit eines β -Lactam-Induktors liegt der transkriptionelle Regulator AmpR, gebunden an den Murein-Vorläufer UDP-MurNAc-Pentapeptid vor, wodurch die Expression der β -Lactamase verhindert wird (Jacobs *et al.*, 1997). Bei *P. aeruginosa* ist *ampC* ebenfalls durch AmpR reguliert (Lodge *et al.*, 1993). Da β -Lactame in die Mureinsynthese eingreifen, führen sie zu einer erhöhten Akkumulation von Zellwanddegradationsprodukten im Periplasma. Darunter befinden sich auch (1,6-anhydro)-MurNAc-Tripeptide, welche als Signalmoleküle für die Induktion der β -Lactamase fungieren, indem sie die an AmpR gebundenen UDP-MurNAc-Pentapeptide verdrängen und so die Induktion von *ampC* durch AmpR ermöglichen (Jakobs *et al.*, 1994; Dietz *et al.*, 1997; Votsch und Templin 2000). Diese Signalmoleküle werden von der Transmembran-Permease

AmpG ins Cytoplasma transportiert, wo der Peptidrest dieser Muropeptide durch die N-Acetyl-anhydromuramyl-L-Alanin Amidase AmpD abgespalten wird. AmpD wirkt also als negativer Regulator von *ampC* (Korfmann and Sanders, 1989; Normark, 1995). Die gleiche Funktion von AmpG und AmpD konnte auch bei *P. aeruginosa* nachgewiesen werden (Langae et al., 1996; Langae et al., 1997). Das bei *P. aeruginosa* mit *ampD* im Operon vorliegende *ampE* scheint für die Expression der β -Lactamase keine Rolle zu spielen (Langae et al., 1998).

AmpC vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin, Cephalosporinen der ersten und zweiten Generation und einen schwachen Schutz gegen Imipenem (Livermore et al., 1987). Obwohl die *ampC*-Überproduktion allein für eine Imipenemhydrolyse nicht ausreicht, ist sie doch essentiell für diejenige Imipenemresistenz, die bei *P. aeruginosa* durch den Verlust des Imipenem-spezifischen Porins OprD (D2 Porin) auftritt (Livermore et al., 1992; Zhou et al., 1993).

Wenn *ampC* durch eine Mutation dereprimiert ist, führt dies zur konstitutiven Resistenz gegenüber Ureidopenicillinen und Cephalosporinen der dritten Generation (Livermore et al., 1987).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das erste *mutS*-Isolat M13 noch keine Resistenz gegen β -Lactamantibiotika, das späte *MutS*⁺-Isolat M23 eine geringe und das frühe *MutS*⁺-Isolat M11 sogar eine deutliche Resistenz gegen β -Lactamantibiotika aufwies. Die Resistenz konnte bei den späten *mutS*-Isolaten M19, M22 und M25, ebenso wie bei dem frühen *MutS*⁺-Isolat M11 auf eine konstitutive Derepression des chromosomalen β -Lactamase-Gens *ampC* zurückgeführt werden. Bedingt ist die konstitutive Derepression durch eine zu einem Stopcoden führenden Mutation an Position 130 des *ampD*-Gens. Damit werden die (1,6-anhydro)-MurNac-Peptide im Cytosol nicht durch AmpD degradiert und führen zu einer Aktivierung von AmpR und somit zur Induktion von *ampC*.

Bei zwei Isolaten mit *ampC*-Überexpression wurde an der gleichen Position 130 des *ampD*-Gens ein AA-Austausch gefunden. Unklar ist, inwieweit der Austausch des polaren Glutamins zum unpolaren Tryptophan die Bildung oder die Funktionsfähigkeit der Amidase AmpD beeinflusst. Bei *Enterobacter cloacae* führt die Mutation *ampD05* (ebenfalls eine Nukleotidtransition, A \Rightarrow G, Asp \Rightarrow Gly) an Position 121, einem hochkonservierten Bereich des *ampD*-Gens zu einem hyperinduzierbaren Phänotyp ohne die Interaktionen von AmpD mit dem Peptidoglykan-Metabolismus zu beeinflussen (Kopp et al., 1993).

Darüber hinaus zeigte das Porin OprD, welches ein Eindringen von Imipenem und Meroopenem ermöglicht, sowohl in den Proteomanalysen der hypermutablen Stämme dieser Arbeit als auch in Proteomanalysen Antibiotika-resistenter *P. aeruginosa*-Isolate nosokomialer Wundinfektionen eine schwache Produktion (Peng et al., 2005). Der Verlust von OprD,

zusammen mit der Überexpression der *ampC*, könnte die Imipenem- und Meropenemresistenz der späten *mutS*-Stämme erklären.

Neben der chromosomalen AmpC wurden bei *P. aeruginosa* auch einige Plasmid-kodierte, so genannte „extended-spectrum“ β -Lactamasen (ESBLs) beschrieben. Diese kommen nur recht selten vor und sind äußerst divers (Chen and Livermore, 1993; Livermore 1991). Die Klasse A und D β -Lactamasen, wie PSE-1 und PSE-4, die das Resistenzspektrum kaum erweitern, sind am weitesten verbreitet (Livermore, 1995). Aus Japan wird vermehrt von einer Zink- β -Lactamase berichtet, die Resistenz gegen alle β -Lactame vermittelt (Senda *et al.*, 1995). Obwohl bei hypermutierenden *E. coli* Stämmen ein vermehrtes Auftreten von ESBLs festgestellt wurde (Baquero *et al.*, 2005), konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Anzeichen von ESBLs in den CF-Isolaten gefunden werden.

D.2.2 „Multi-drug“-Effluxpumpen

P. aeruginosa ist für seine ausgeprägte intrinsische Resistenz gegenüber einer Vielzahl antimikrobieller Agenzien bekannt. Neben der geringen unspezifischen Permeabilität der Membran für kleine, hydrophile Moleküle sind vor allem fünf genetisch und phänotypisch unterschiedliche „multidrug-efflux“ Pumpen dafür verantwortlich. Darüber hinaus ist *P. aeruginosa* über die Regulation verschiedener Proteine der äußeren Membran in der Lage, die unspezifische Aufnahme verschiedener Substrate zu steuern.

Das *mexAB-oprM*-Operon, das *mexCD-oprJ*-Operon und das *mexEF-oprN*-Operon verleihen Resistenz gegenüber den verschiedensten antimikrobiellen Agenzien. Das *mexGHI-opmD*-Operon ist verantwortlich für die Resistenz gegen Vanadium und spielt außerdem durch den Export von Homoserinlactonen eine wichtige Rolle beim Quorum-Sensing (Aendekerk *et al.*, 2002). Das fünfte durch Aminoglykoside induzierbare *mexXY*-Operon wurde erst vor kurzem entdeckt, und man nimmt an, dass die *mexXY*-Komponenten sich mit OprM assoziieren (Sobel *et al.*, 2003).

Die Transkriptomanalysen in dieser Arbeit ergaben in den *mutS*-Stämmen eine Repression von Teilen des *mexEF-oprN*-Operons und von MexR, dem Repressors des *mexAB-oprM*-Operons.

Während das *mexGHI-opmD*-Operon keine differentielle Regulation aufwies, war beim *mexXY*-Operon eine deutliche Induktion zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass der adaptierte *mutS*-Phänotyp zum einen durch die Dysregulation des *mexXY*-Operons konstitutiv resistent gegen Aminoglykoside ist, und zum anderen durch die Repression vom MexR auf eine schnelle Induktion des *mexAB-oprM*-Operons eingestellt ist. Unklar ist, ob diesen

Regulationen Mutationen zu Grunde liegen. Darüber hinaus könnte auch eine ribosomale Mutation die Ursache der Aminoglykosidresistenz darstellen.

Da aber die Stämme mit multiplen Resistenzen einen hypermutierenden Genotyp aufweisen, ist davon auszugehen, dass Hypermutabilität auf jeden Fall eine schnelle und umfassende Resistenzentwicklung unterstützt (Oliver *et al.*, 2004; Maciá *et al.*, 2005).

Diese *in vitro*-Ergebnisse zeigen, dass Hypermutabilität ein negativer Faktor hinsichtlich des Erfolgs der Antibiotikatherapie während der Behandlung chronischer Infektionen ist. Nicht nur weil hypermutierende Stämme häufiger Antibiotikaresistenzen aufweisen, sondern auch weil diese während der Antibiotikatherapie extrem schnell Resistenzen entwickeln. Hypermutierende Stämme stellen daher ein Warnsignal dar, da sie schlecht therapierbar sind und darüber hinaus auf eine Progression der Lungenschädigung hindeuten.

D.3 Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren (VF) von *P. aeruginosa* sind für eine akute Infektion verantwortlich. Untersuchungen an *P. aeruginosa*-Isolaten chronischer CF-Infektionen deuten aber auf eine negative Selektion hinsichtlich bekannter VF im Verlauf der chronischen Atemwegsinfektion hin (Luzar *et al.*, 1985).

Neue Studien beschreiben einen kompletten Motilitätsverlust von *P. aeruginosa* während des Wachstums auf Sputum von CF-Patienten. Als Grund für den Verlust der Motilität wurde die Repression des *fliC*-Gens, welches die Flagellenuntereinheit FliC kodiert, angegeben. Unklar ist, welche Komponente des Sputums für die Repression von *fliC* verantwortlich ist (Wolfgang *et al.*, 2004). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten die *mutS*-Isolate der Patienten M, V und P im Vergleich zu den isogenen *MutS*⁺-Isolaten eine deutlich reduzierte Motilität. Darüber hinaus zeigten sowohl FliC und das „Cap“-Protein FliD als auch deren Transkripte bei allen *mutS*-Stämmen eine deutlich abgeschwächte Konzentration in Proteom und Transkriptom. Diese verminderte Produktion scheint auch bei den hier untersuchten *mutS*-Isolaten für den Motilitätsverlust verantwortlich zu sein. Darüber hinaus scheint die von FliC vermittelte Adhärenz, wie beispielsweise an das Zellassoziierte Muc1 Muzin (Lillehoj *et al.*, 2002), nur für die initiale Infektion eine Rolle zu spielen. Da FliC stark immunogen wirkt und von Rezeptoren der Immunabwehr erkannt wird, kann die Repression von FliC auch Teil der Adaption von *P. aeruginosa* in der chronischen Phase der CF-Infektion sein (Wolfgang *et al.*, 2004).

Das Transkriptom ergab außerdem eine vernachlässigbare Expression zahlreicher Komponenten des Chemotaxis-Apparats. Zum einen gilt das Sputum von CF-Patienten als so

nährstoffreich, dass Bakterien offensichtlich nicht auf chemotaktische Reize reagieren müssen. Auf der anderen Seite ist ein Chemotaxisssystem ohne die Möglichkeit der Bewegung nicht sehr sinnvoll.

Die Transkriptomanalyse und die Proteomanalyse der extrazellulären Proteine von PAO1 ergaben eine sehr starke Produktion von FliC und FliD. Im Widerspruch dazu steht die Proteomanalyse des Gesamtzelllysats und der Membran-assoziierten Proteine von PAO1, bei der weder FliC noch FliD zu finden war. Eine mögliche Erklärung wäre die Abscheidung der Flagelle von PAO1 bereits im Waschschrift nach der Probenanzucht für die 2-DE. Dies könnte, wie schon von Luzar vermutet, auf eine generelle Veränderung der Zellwand bei CF Isolaten im Rahmen der Adaptation an die CF Lunge hinweisen. Ein weiterer Hinweis ist die Tatsache, dass es mit dem Protokoll zur Analyse der Oberflächenproteine bei den Übergangsisolaten M13 und M20 nicht möglich war, die gewünschte Proteinfraction zu extrahieren.

Veränderungen in der Oberflächenstruktur sind bei CF-Isolaten nichts Ungewöhnliches. Die Serotypisierung von CF-Isolaten ist aufgrund von Defekten in der O-Antigen Seitenkette des LPS oft unmöglich (Hancock *et al.*, 1983). Lipid A aus *P. aeruginosa*-Isolaten chronischer CF Infektionen, welches vom Immunsystem über den TLR 4/MD-2 Komplex erkannt wird, weist meist modifizierte Strukturen auf (Ernst *et al.*, 2006).

Eisen ist für die Virulenz von *P. aeruginosa* ein bedeutender Faktor und kann durch das wichtigste Siderophor Pyoverdin (pvd) von *P. aeruginosa* sogar dem humanen Eisen-Binde-Protein Transferrin entzogen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Pyoverdin für die Virulenz von *P. aeruginosa* von essentieller Bedeutung ist. Eine Injektion Pyoverdin-negativer *P. aeruginosa*-Mutanten in Mäuse mit Brandwunden erzeugte keine Infektion mehr (Meyer *et al.*, 1996). Darüber hinaus agiert Pyoverdin als Signalmolekül, das die Produktion von drei Virulenzfaktoren reguliert. In die Umgebung sezerniertes Pyoverdin bindet Eisen und wird als Ferri-Pyoverdin-Komplex von dem Rezeptorprotein FpvA in der äußeren Membran gebunden. Diese Bindung vermittelt ein Signal an den periplasmatischen Teil des Transmembran-Anti-Sigma-Faktors FpvR, der die Aktivität des Sigmafaktors PvdS (extracytoplasmatischen Familie (ECF)) kontrolliert. Bei Eisenmangel resultiert dies in der Produktion von Pyoverdin selbst, ExoA und der Endoprotease PrpL (Beare *et al.*, 2003).

Die *mutS*-Stämme der Patienten M, V und P zeigten aber weder eine Pyoverdinproduktion auf Pseudomonas-F-Agar noch eine generelle Aktivität eisenbindender Faktoren im CAS-Assay. So scheint die Eisenaufnahme im mikroaeroben bis anaeroben Milieu der CF-Lunge über Chelat-Komplexe wie Pyoverdin weniger wichtig zu sein. Im Anaeroben ist Eisen kein limitierender Faktor, da es hauptsächlich als lösliches Fe²⁺ vorliegt und somit als Kation über einfache Transportsysteme in die Zelle aufgenommen werden kann. Darü-

DISKUSSION

berhinaus wirkt Fe^{2+} als Cofaktor bei der Fur- (ferric uptake regulator) abhängigen Regulation. Bei hohen Fe^{2+} -Konzentrationen reprimiert der Fe^{2+} ::Fur-Komplex den transkriptionellen Aktivator PvdS der *pvd*-Gene und des Exotoxins A (Visca *et al.*, 2002).

Ein weiterer, den Isolaten chronischer CF-Infektionen gemeinsamer Phänotyp, ist die verringerte proteolytische Aktivität (Luzar *et al.*, 1985). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesamtproteolytische Aktivität der *P. aeruginosa*-Isolate der Patienten M, V und P gemessen. Während alle MutS^+ -Isolate noch eine deutliche Proteolyse zeigten, war dies bei den *mutS*-Isolaten nicht mehr der Fall. Die Messung der Elastaseaktivität erwies sich bereits bei MutS^+ -Isolaten als negativ. Im Proteom konnte der im Referenzstamm PAO1 prominente Elastasespot bei keinem der CF-Isolate detektiert werden. Im Widerspruch dazu stehen die Daten der Proteomanalyse des *P. aeruginosa*-Klons C (Römling *et al.*, 1994; Sri-ramulu *et al.*, 2005), Diese zeigen bei *P. aeruginosa*-Klon C im Vergleich zu PAO1 eine deutliche Induktion der Protease IV und eine unverändert hohe Expression der Elastase. Eine Erklärung hierfür wäre die Mutation in LasR, welche bei Klon C vermutlich nicht zu finden ist.

Hydrogencyanid (HCN), ein weiteres typisches Sekundärmetabolit von *P. aeruginosa*. Cyanid wird aus Glycin mittels oxidativer Decarboxilierung durch ein, aus drei Untereinheiten bestehendes, membrangebundenes Flavoprotein (*hcnABC*) produziert. Die Transkription der *hcn*-Gene unterliegt der direkten Kontrolle durch die Quorum-Sensing Regulatoren LasR und RhIR, sowie dem anaeroben Regulator Anr. Die maximale HCN-Expression findet in der stationären Phase und unter mikroaeroben Bedingungen statt. Der Defekt im QS-Regulator LasR würde erklären, dass die Transkription der *hcn*-Gene bei den CF-Isolaten nicht aktiviert ist. Auffallend war auch die starke und einzig bei Isolat M23 auftretende Überexpression von MucD. Bei MucD, einer Serinprotease, handelt es sich sowohl in Pflanzen, Nematoden, Insekten als auch in Säugetieren um einen wichtigen VF. Darüber hinaus ist MucD für die Produktion eines extrazellulären Toxins essentiell, welches in die Tötung von *C. elegans* involviert ist (Jander *et al.*, 2000; Yorgey *et al.*, 2001). Daher ist es nahe liegend, MucD mit der Cytotoxizität von M23 bei Calu-3 Zellen in Zusammenhang zu bringen, die bei keinem anderen der Isolate von Patient M vorliegt (Hogardt *et al.*, 2006).

D.4 Adaption des Metabolismus

Mithilfe von Proteom und Transkriptom sollte eine globale Analyse der Adaption von *mutS*-Stämmen an die CF-Lunge erfolgen. Die Daten weisen auf einen veränderten Metabolismus der *mutS*-Stämme hin. Dabei scheint die metabolische Veränderung Zwischenstufen mit eigenem Metabolomtyp aufzuweisen. Wir vermuten, dass diese „Übergangsstämme“ sich noch im Prozess der Anpassung an das Habitat CF-Lunge befinden.

Von *P. aeruginosa* ist bekannt, dass anstelle von Glucose organische Säuren, vor allem Zwischenprodukte des TCA-Zyklus als Kohlenstoff und Energiequelle bevorzugt werden. Der späte *mutS*-Stamm M25 scheint jedoch die Verwertung von Glucose noch zu vermindern, da Enzyme für Teile des KDPG-Wegs und Transporter für Glucoseaufnahme nur sehr schwach produziert werden.

Dagegen werden nahezu alle Enzyme des TCA-Zyklus, sowie ein Dicarbonsäuretransporter (Malat, Succinat, etc.) überproduziert.

Neben dem Dicarbonsäuretransporter sind im späten *mutS*-Stamm M25 Enzyme oder deren Transkripte für anaplerotische Reaktionen überproduziert:

1. Die Überproduktion der Malatsynthase G GlcB, einem Enzym des Glyoxylatshunts, deutet auf eine Verwertung von Fettsäuren und Acetat als Energie- und Kohlenstoff-Quelle hin. Für diesen Fall sollten sowohl die NADP^+ abhängige Idh als auch die NAD^+ abhängige Icd inaktiv vorliegen. Die Inaktivierung erfolgt durch Phosphorylierung eines Serinrests im aktiven Zentrum des Enzyms durch die bifunktionale Isocitratdehydrogenasekinase / phosphatase AceK, was die Bindung an das Substrat verhindert (Dean and Koshland, 1993; Muro-Pastor and Florencio, 1994). Anders als bei *E. coli* ist *aceK* bei *P. aeruginosa* nicht Teil des polycistronischen *aceABK*-Operons. Dieses Operon kodiert neben AceK auch für die Malatsynthase (AceB) und für die Isocitratlyase (AceA). Dadurch wird bei *E. coli* (im Gegensatz zu *P. aeruginosa*) der gleichzeitige Ablauf des TCA-Zyklus und des Glyoxylatshunts verhindert (Cortay *et al.*, 1988).

Kinetische Studien ergaben eine stärkere Regulation dieser Enzyme durch die intrazelluläre Konzentration an Isocitrat als durch $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ und somit auch der respiratorischen Produktion an CO_2 . Im Gegensatz zu der intrazellulären Konzentration an Isocitrat wird die $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ - Konzentration konstant gehalten und nicht durch den Mangel an C-Quellen beeinflusst (Roy and Packard, 1998).

Da im späten *mutS*-Stamm M25 sowohl die Transkripte der Isocitratdehydrogenasen als auch die darauf folgenden Enzyme (und deren Transkripte) des TCA-Zyklus stark überproduziert waren, scheint entweder Isocitrat im Überschuss vorhanden zu

sein oder beide Wege notwendig zu sein, da α -Ketoglutarat einen bedeutenden Baustein für die Aminosäurebiosynthese darstellt.

2. Ein zentrales Substrat für anaplerotische Reaktionen scheint Pyruvat darzustellen. Überproduziert sind die Transkripte der Untereinheiten (PA5435/36) einer Transcarboxylase, die die Umwandlung von Pyruvat in Oxalacetat katalysieren. Dabei handelt es sich jedoch nicht um die herkömmliche CO_2 -fixierende Pyruvatcarboxylase (PA1400), sondern um eine, Methylmalonyl-CoA als Donor der Kohlenstoffgruppe verwendende Transcarboxylase. In *E. coli* entsteht Methylmalonyl-CoA aus Succinyl-CoA durch die Methylmalonyl-CoA-Mutase (Haller *et al.*, 2000). Im PAO1-Genom konnte bisher kein homologes Gen für diese Mutase nachgewiesen werden. Im späten *mutS*-Stamm M25 könnte Succinyl-CoA im TCA-Zyklus und durch den Abbau von Arginin durch das *aru*-Operon im Überschuss entstehen. Darüber hinaus ist es denkbar, dass Succinyl-CoA durch die humane Methylmalonyl-CoA-Mutase in Methylmalonyl-CoA umgewandelt und via PA5435/36 verwertet wird.

Die aus der Alpha- (PA5435) und Beta- (PA5436) Untereinheit bestehende Transcarboxylase wurde früher als Oxalacetatdecarboxylase (*oadA*) bezeichnet. Ein zu OadA homologes Protein aus *Legionella pneumophila* erwies sich als essentiell für das intrazelluläre Überleben des Organismus (Jain *et al.*, 1996). Dies ist nicht der erste Fall, in welchem ein „housekeeping“-Protein auch als Virulenzfaktor von Bedeutung ist. Bei *S. pneumoniae* erwies sich eine Pyruvatoxidase-Mutante im Tiermodell als weniger virulent, da der veränderte Kohlenhydratmetabolismus die Adhärenz an die Wirtszelle beeinflusst (Spellerberg *et al.*, 1996). Daher ist es denkbar, dass auch bei *P. aeruginosa* unter bestimmten Bedingungen Enzyme wie die OadA eine Auswirkung auf die Physiologie der Bakterien spielen und einen globalen Effekt auf das Überleben in der Lunge von CF-Patienten ausüben.

Darüber hinaus ist das Transkript der PEP-Synthase (*ppsA*↑) überproduziert, welche die Umwandlung von Pyruvat in Phosphoenolpyruvat (PEP) katalysiert. PEP kann dann unter CO_2 -Fixierung durch die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (*ppc*↑) in Oxalacetat umgewandelt werden.

Der Pyruvatpool muss demnach im adaptierten *mutS*-Stamm wieder aufgefüllt werden. Zum einen scheint der TCA-Zyklus nicht zwingend geschlossen zu sein, da das Transkript der Malatdehydrogenase, die Malat in Pyruvat umwandelt, stark exprimiert ist. Zum anderen ist das Transkript der D-Serindeaminase (*dsdA*), die D-Serin in Pyruvat umwandelt, überproduziert. Uropathogene *E. coli*-Stämme (U-PECs) sind in der Lage, D-Serin als einzige Kohlenstoff-, bzw. Stickstoffquelle zu verwenden. Der intrazelluläre D-Serinspiegel beeinflusst vermutlich direkt oder in-

direkt Uropathogenitäts-assoziierte Regulons. D-Serin kommt hauptsächlich in Liquor vor, wo es als Neurotransmitter fungiert, aber auch in Urin und in geringen Mengen im Serum. D-Serin wirkt bei Bakterien als Wachstumsinhibitor, da es die L-Serin-, sowie die Pantothenatbiosynthese inhibiert (Roesch *et al.*, 2003). Serumkomponenten sind in der CF-Lunge aufgrund vaskulärer Läsionen und Einblutungen im Lungengewebe vermehrt zu finden (Hoiby, 1998). Die Expression der D-Serindeaminase ist also für das Wachstum in Anwesenheit von D-Serin essentiell und liefert der Zelle gleichzeitig Kohlenstoff und Stickstoff. Somit ist es auch bei *P. aeruginosa* wahrscheinlich, dass die D-Serindeaminase einen bedeutenden Faktor für das Wachstum in der CF-Lunge darstellt und D-Serin in der CF-Lunge als wichtiges Substrat genutzt wird.

3. Verstärkt scheint auch der Abbau von Allantoin zu Glyoxylat zu sein. Glyoxylat könnte dann über den Glyoxylatshunt in den Stoffwechselkreislauf eingegliedert werden. Bei Allantoin handelt es sich, neben Harnsäure, um ein Abbauprodukt von Nucleinsäuren, speziell von Purinbasen. Eine Überproduktion von speziellen Nucleotidtransportern konnte nicht festgestellt werden, dafür aber die verstärkte Produktion eines unspezifischen Ribosetransporters. Der späte *mutS*-Stamm M25 könnte sowohl bakterielle als auch humane DNA abbauen, oder diese direkt in die induzierten Wiederverwertungswege der Nucleotide einschleusen.
4. Eine zentrale Rolle im Kohlenstoff- und Energiehaushalt des späten *mutS*-Phänotyps scheint auch Arginin zu spielen. Gleich zwei Argininaufnahmesysteme zeigen eine starke Überproduktion, wobei es sich einmal um AotJ, das Bindeprotein eines ABC Transporters zur Aufnahme von Arginin und Ornithin und zum anderen um ArcD, einem Arginin/Ornithin-Antiporter handelt. Arginin kann auch über zwei bezüglich der Argininaufnahme funktionell analoge Porine aufgenommen werden: über das für Aminosäuren und Peptide spezifische OprD, sowie über das das Glycin-Glutamat spezifische Porin OpdP (Tamber and Hancock, 2006). Bei *P. aeruginosa* ist bekannt, dass für überdurchschnittlich viele Gene (etwa 40%) ein Paralogon existiert (Stover *et al.*, 2000). Sind die Gene einmal dupliziert, behält eine Kopie die originale Funktion, während die andere durch eine Serie von Mutationen funktionelle Divergenzen aufweist, die der Zelle die Adaption an sich verändernde Umgebungen erleichtern (Ohno, 1970).

Ausgehend von der oben erwähnten offensichtlichen funktionellen Redundanz scheint Arginin für die Fitness von *P. aeruginosa* von essentieller Bedeutung zu sein. Verglichen mit dem Referenzstamm PAO1 zeigen die *oprD*- und *opdP*-Gene aller CF-Isolate eine kaum noch vorhandene Expression. Sowohl OprD als auch OpdP werden im Referenzstamm konstitutiv exprimiert, was auf eine Repression in

den CF-Isolaten schließen lässt. Da über OprD auch Imipenem in die Zelle gelangen kann und eine *oprD/opdP*-Doppelmutante eine achtfach erhöhte Antibiotikaresistenz aufweist (Tamber and Hancock, 2006), scheinen CF-Isolate primär den Schutz vor Antibiotika vor die Aufnahme von Arginin zu stellen. Der argininspezifische Wachstumsdefekt einer *oprD/opdP*-Doppelmutante könnte im *mutS*-Stamm durch die Überexpression von *aotJ* und *arcD* ausgeglichen werden.

Abgebaut wird Arginin über die vom *aru*-Operon (↑) kodierten Enzyme, und zum anderen über die Enzyme, die vom anaerob regulierten *arc*-Operon kodiert werden. Während beide Wege Kohlenstoff und Stickstoff liefern, entsteht beim Abbau über die Enzyme des *arc*-Operons zusätzlich ATP (Abbildung C-39).

Eine vergleichende 2-DE-Analyse zwischen dem Klon C, der bei CF-Isolaten als dominant beschrieben wurde, und dem Wundenisolat PAO1 erbrachte gänzlich andere Ergebnisse (Sriramulu *et al.*, 2005). Erstaunlicherweise zeigten die Proteine des *arc*-Operons, ebenso wie AotJ, eine sehr schwache Produktion. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese untersuchten Stämme sich wie die CF-Isolate M1, V1 und P4 in einem frühen noch nicht hoch adaptierten Stadium befinden.

5. Eine weitere Kohlenstoff- und Energiequelle für *P. aeruginosa* in der CF-Lunge scheinen verzweigte und aromatische Aminosäuren zu sein, deren Aufnahme und Abbau mit der stärksten Induktion in den *mutS*-Stämmen aufwies. So können Tyrosin und Phenylalanin zu Fumarat und Acetoacetat abgebaut und vermutlich in den TCA-Zyklus eingeschleust werden.

Neben ABC Transportern für verzweigte Aminosäuren (BraC) ist auch ein mutmaßliches Porin OpdO stark induziert, welches eine 62%ige Homologie zu PhaK von *P. putida* aufweist. Bei PhaK handelt es sich um ein Protein, das zusammen mit der Permease PhaJ für die spezifische Aufnahme von Phenylalanin und Tyrosin verantwortlich ist. *phaK* gehört zu einem 14 Gene umfassenden DNA Fragment, welches den aeroben Abbau von Phenylalanin katalysiert und in drei angrenzenden Operons organisiert ist (Olivera *et al.*, 1998).

Aromatische und verzweigte Aminosäuren wurden als einzige Energie- und Kohlenstoffquellen von PAO1 bei Wachstum auf Sputum von CF-Patienten postuliert (Palmer *et al.*, 2005). Da die späten *mutS*-Stämme die oben erwähnten Überproduktionen auch bei Wachstum auf LB aufweisen, scheint es sich hierbei um eine Adaption mit konstitutiver Expression der Enzyme dieses Metabolismus zu handeln. Die gleiche Studie berichtet von vergleichbaren Wachstumskinetiken von PAO1 bei Wachstum auf CF-Sputum und in LB. Die einzige Limitation läge in der Menge an metabolisierbaren Kohlenstoffverbindungen, da die Zugabe von Glucose zum Sputum die Wachstumsrate zusätzlich stark erhöht hat. So wäre es nicht verwunderlich,

DISKUSSION

dass der *mutS*-Stamm auch andere in der CF-Lunge vorliegende Kohlenstoffquellen (s.o.) nutzt. Aufschluss hierüber könnte eine Analyse ergeben, die die Wachstumsrate der späten *mutS*-Stämme in CF-Sputum unter Zugabe von D-Serin, Arginin, Fettsäuren und Allantoin überprüft.

Die Proteine (oder deren Transkripte), welche die Oxidation von Malat zu Oxalacetat katalysieren, zeigten keine differentielle Produktion. Das Transkript von *fumC1*, welches das Enzym für die Oxidation von Fumarat zu Malat kodiert, zeigte eine abgeschwächte Produktion. Dies lässt vermutlich auf einen nichtzyklischen, verzweigten Stoffwechselweg schließen, wie es beispielsweise bei dem mikroaerophilen Bakterium *Helicobacter pylori* der Fall ist (Pitson *et al.*, 1999). Darüber hinaus stellt ein verzweigter TCA-Zyklus ein Charakteristikum des anaeroben Metabolismus dar.

Bei Sauerstoffmangel verläuft der TCA-Zyklus bei *E. coli* nichtzyklisch, aufgeteilt in den oxidativen und den reduktiven Zweig. Im reduktiven Zweig wird Phosphoenolpyruvat mit CO₂ direkt in Oxalacetat umgewandelt und entgegen der Richtung des aeroben TCA-Zyklus bis zum Succinat fermentiert. Der oxidative Zweig folgt dem aeroben TCA-Zyklus und führt unter Bildung von Reduktionsäquivalenten zur Reduktion von Phosphoenolpyruvat bis zum α -Ketoglutarat (Abbildung D-1).

DISKUSSION

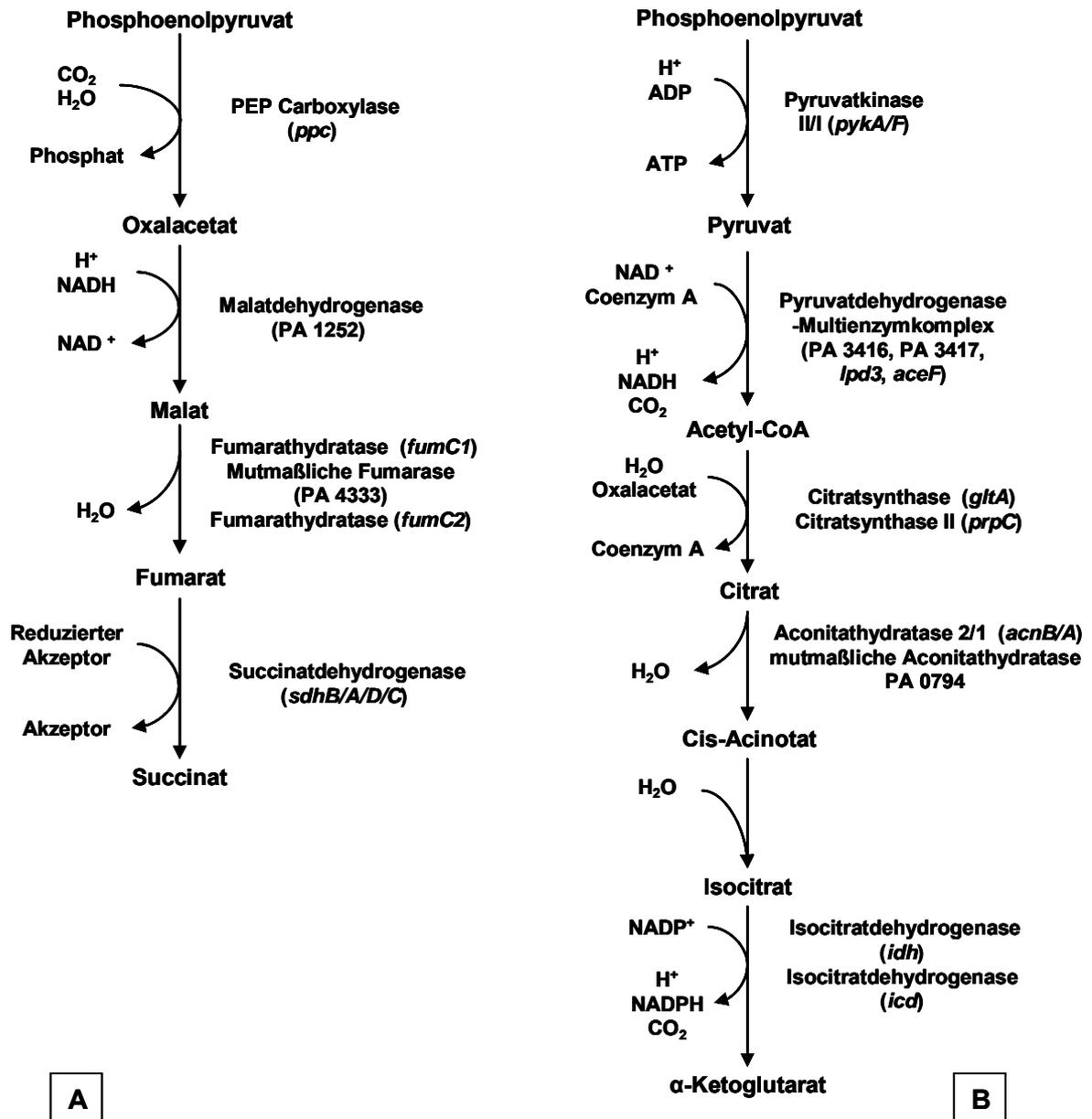


Abbildung D-1: Darstellung des bei *E. coli* unter anaeroben Bedingungen ablaufenden verzweigten TCA Zyklus. A: Reduktiver Zweig; B: Oxidativer Zweig.

Die Daten von Proteom und Transkriptom lassen zwar auf einen verzweigten Verlauf des TCA-Zyklus schließen, doch lässt das Expressionsmuster der Enzyme auf einen zu dem von *E. coli* leicht veränderten Weg schließen.

So wird Pyruvat vermutlich durch die überproduzierte PEP-Synthase (*ppsA*↑) eher in PEP umgewandelt als umgekehrt, da die beiden Pyruvatkinasen (PykA, PykF) keine erhöhte Produktion aufweisen. Pyruvat (aus den oben erwähnten Quellen auffällbar) kann dann, wie während des bekannten anaeroben Metabolismus, weiter bis zum α -Ketoglutarat oxidiert werden. Allerdings zeigen auch der α -Ketoglutarat-Dehydrogenasekomplex (*su-*

DISKUSSION

cA/B↑; *Lpd3*↑, *lpd3*↑), sowie die Succinyl-CoA-Synthetase (*SucD/C*↑, *sucD/C*↑) im späten *mutS*-Stamm eine starke Überproduktion, was darauf schließen lässt, dass α -Ketoglutarat weiter bis zum Succinat oxidiert wird. Beide Schritte sind vorteilhaft, da in dem ersten eine weitere Reduktionsäquivalente und im zweiten Energie in Form von ATP entsteht.

Bei der darauf folgenden Oxidation von Succinat zu Fumarat durch die Succinatdehydrogenase (*sdhB*↑/*A/D/C*) entsteht reduziertes Ubichinon (Ubichinol). Dies ist energetisch günstiger als die fermentative Reduktion von Fumarat zu Succinat. Darüber hinaus besitzt *P. aeruginosa* kein Gen für die Fumaratreduktase, und es ist auch noch nicht geklärt, ob die Succinatdehydrogenase in der Lage ist, die Reaktion in umgekehrter Richtung zu katalysieren.

Das Transkript der Fumarathydratase (*fumC1*↓), die sowohl die Reduktion als auch die Oxidation von Fumarat katalysiert, zeigt im späten *mutS*-Stamm eine schwache Expression. Dies lässt auf eine Unterbrechung des TCA-Zyklus an dieser Stelle schließen.

Das entstandene Fumarat könnte dadurch abgeschöpft werden, dass der späte *mutS*-Stamm Fumarat anstelle von Oxalacetat als Ausgangsstoff für die Biosynthese der Aspartatfamilie verwendet. Normalerweise wird Aspartat durch die Aspartattransaminase (*aspC*) aus Oxalacetat gewonnen. Diese zeigt aber keine erhöhte Produktion. Dagegen sind die Transkripte der Aspartat-Ammoniumlyase (*aspA*↑), der Adenylosuccinatsynthetase (*purA*↑) und der Adenylosuccinatlyase (*purB*↑), die allesamt Fumarat als Ausgangsstoff für die Biosynthese der Aspartatfamilie verwenden, stark exprimiert. Darüber hinaus sind PurA und PurB in der Lage, Fumarat anstelle von Ionosinmonophosphat (IMP) als Ausgangsstoff für die Biosynthese des Purins Adenosin zu verwenden.

Das durch den vermutlich verstärkt ablaufenden Glyoxylatshunt entstandene Malat scheint der *mutS*-Stamm wieder in den Stoffkreislauf einzugliedern, indem Malat durch die mutmaßliche Malatdehydrogenase (PA3471↑), unter Bildung eines weiteren Reduktionsäquivalents, in Pyruvat umgewandelt wird, da deren Transkript eine deutliche Überproduktion aufweist. Abbildung D-2 zeigt die im *mutS*-Stamm vermutlich bevorzugt ablaufenden Stoffwechselwege.

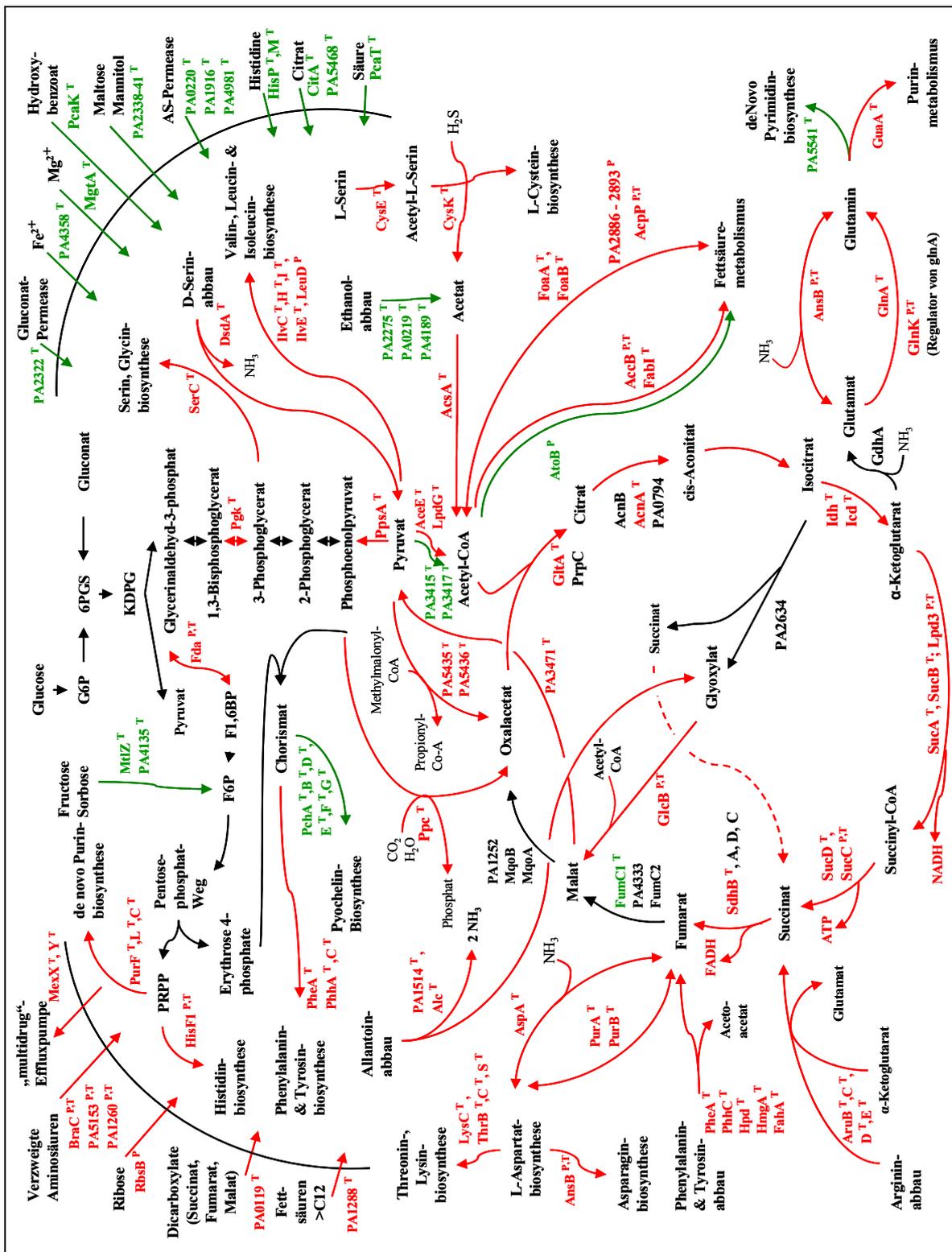


Abbildung D-2

Schematisches Modell der im *mutS*-Stamm unter mikroaeroben Bedingungen vermutlich bevorzugt ablaufenden Stoffwechselwege.

P hochgestellt: (P_n^{M25} / P_n^{M1}); **T** hochgestellt: \bar{U}_n / T_n^{M1} (T: Transkript; n: CF-Nummer; $U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; $\bar{U}_n =$ arithmetisches Mittel von U_n);

Rote Gen-/Proteinnamen: Erhöhte Produktion, **Grüne Gen-/Proteinnamen:** Abgeschwächte Produktion.

D.5 Energiemetabolismus

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* in den sauerstoffarmen Mukus der chronisch infizierten CF-Lunge zu intensivem Wachstum fähig ist (Worlitzsch *et al.*, 2002). Während die Einwanderung von Neutrophilen und die Mukussekretion ansteigen, verbrauchen die metabolisch aktiven Bakterien und die CF-Epithelzellen den vorhandenen Sauerstoff, so dass hier in kurzer Zeit mikroaerobe bis anaerobe Zustände herrschen und im Mukus ein Sauerstoffgradient entsteht.

Unter Sauerstoffmangel ist *P. aeruginosa* zu anaerobem Wachstum in der Lage, indem entweder alternative terminale Elektronenakzeptoren wie Nitrat oder Nitrit verwendet werden (Chamroux, 1972) oder Arginin fermentativ, unter Bildung von ATP, abgebaut wird (Mercenier *et al.*, 1980). Eine mögliche Erklärung für die hohen Bakterientiter (bis zu 10^8 cfu/ml) im anaeroben CF Mukus sind die relativ hohen Konzentrationen an NO_3^- (383 ± 42 μM) und NO_2^- (125 ± 55 μM).

Auch die Fermentation von Pyruvat könnte für *P. aeruginosa* in der CF-Lunge für ein Langzeitüberleben unter anaeroben Bedingungen wichtig sein (Eschbach *et al.*, 2004).

Die hauptsächlichen Regulatoren, die den physiologischen Wechsel von aerobem zu anaerobem Wachstum regulieren, sind Anr und Dnr. Da bei den Anzuchten sowohl für Proteom- als auch Transkriptomanalysen schon nach 3-4 h mikroaerobe bis anaerobe Wachstumsverhältnisse herrschten sollte mit der Überproduktion von Genen, bzw. Proteinen des anaeroben Metabolismus zu rechnen sein. Allerdings fanden die Experimente in LB ohne Zugabe von Nitrat, Nitrit oder Arginin statt.

Bei der Auswertung der Daten von Proteom und Transkriptom wurde jeweils der frühe MutS⁺-Stamm M1 als Bezugsstamm verwendet. Obwohl die Anzuchtbedingungen bei beiden Stämmen gleich waren, zeigten sich Transkripte, bzw. Proteine des mikroaeroben und anaeroben Metabolismus im *mutS*-Stamm M25 überproduziert. Dieses Ergebnis könnte als eine Adaption des *mutS*-Stamms an die mikroaeroben bis anaeroben Zustände - wie sie in der CF-Lunge herrschen - gedeutet werden. Wahrscheinlich können *mutS*-Stämme sich an den in der CF-Lunge herrschenden Sauerstoffgradienten schneller anpassen.

In den *mutS*-Stämmen zeigte nur das Transkript für OprL das als essentiell für das Langzeitüberleben unter anaeroben Bedingungen mittels Pyruvatfermentation beschrieben wird (Schreiber *et al.*, 2006) eine verstärkte Expression, jedoch kein Transkript der anderen die Pyruvatfermentation katalysierenden Enzyme. OprL erwies sich auch in Proteomanalysen von *P. aeruginosa*-Isolaten aus nosokomialen Wundinfektionen als stark überproduziert (Peng *et al.*, 2006).

2-DE Analysen des Klons C sprechen für eine deutlich verminderte Produktion der Enzyme des *arc*-Operons und dem Arginin transportierenden ABC Transporter AotJ (Sriramulu *et al.*, 2005). Auch Transkriptomanalysen von PAO1 bei Wachstum in artifiziellem Sputummedium mit Arginin ergaben keine erhöhte Expression der Gene des *arc*-Operons (Palmer *et al.*, 2005). Die Kontrolle der Expression des *arc*-Operons unterliegt den anaeroben Regulatoren Anr und Dnr. Die Ergebnisse von Palmer *et al* lassen darauf schließen, dass hier die Anr-/Dnr-Regulation von größerer Bedeutung ist als die Substrat-abhängige Regulation. Der späte *mutS*-Stamm M25 zeigte sowohl im Proteom als auch im Transkriptom eine deutliche Überproduktion sowohl der Gene, bzw. Proteine des *arc*-Operons, als auch von AotJ. Wie schon erwähnt spielt Arginin eine zentrale Rolle im Metabolismus des späten *mutS*-Stamms und ist scheinbar auch für die Energiegewinnung in der CF-Lunge essentiell. Darüber hinaus legen diese Ergebnisse eine erhöhte Aktivität der anaeroben Regulatoren Anr, Dnr und IHF im *mutS*-Stamm nahe

Anhand einer RT-PCR konnte eine starke Expression von *anr* und *dnr* in den späten *mutS*-Stämmen festgestellt werden. Der Redox-Regulator Anr ist ein Einkomponenten-Regulationssystem, das sowohl Sensor für den Redoxzustand der Zelle als auch DNA-bindender Transkriptionsfaktor ist. Das Protein weist 51 % Sequenzidentität auf Aminosäureebene zum bekannten Fnr aus *E. coli* auf. Das C-terminale helix-turn-helix-Motiv ist fast identisch zum *E. coli*-Protein und der N-Terminus enthält die vier konservierten Cysteinreste, die in Fnr an der Bildung des [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt sind. Über die Integrität dieses Fe-S-Zentrums wird der Redoxzustand der Zelle gemessen. Unter oxidierenden Bedingungen wird es über ein [3Fe-4S]- zu einem [2Fe-2S]-Zentrum umgebaut oder ganz zerstört. Das Protein liegt dann als Monomer vor. Reduktive Bedingungen führen zur intakten [4Fe-4S]-Struktur, und der Regulator geht in seine aktive, DNA-bindende Dimerform über (Sawers *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.*, 1991; Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1996).

Über die Regulation von *anr* ist wenig bekannt, es gilt allgemein, wie das orthologe *fnr*, als konstitutiv exprimiert. Trotzdem konnte bei den *mutS*-Stämmen eine deutliche Induktion von *anr* festgestellt werden. Als potentiell regulatorisch wirkender Faktor gilt Nitrat, das aber in diesem Fall ausgeschlossen werden kann, da auch die Anzuchten der Stämme für die RT-PCR ohne Nitrat durchgeführt wurden. Bei *E.coli* ist bekannt, dass der transkriptionelle Regulator ArcA des Zweikomponenten-Signaltransduktionssystems ArcAB unter mikroaeroben Umständen als Repressor von *fnr* fungiert (Shalel-Levanon *et al.*, 2005). Die Transkriptomdaten der CF-Isolate weisen aber auf keine differentielle Expression des zu *arcA* orthologen Gens PA4983 hin. Eine Sequenzierung des PA4983-Gens könnte Aufschluss darüber geben, ob es in den *mutS*-Stämmen zu Mutationen gekommen ist, die eventuell zu einem Funktionsverlust des Proteins führen könnten. Die fehlende Re-

pression von *anr* durch PA4983 könnte dessen erhöhte Expression unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen erklären.

Die Sequenzierung des *anr*-Gens und seiner Promoterregion lieferten keinen Aufschluss, da lediglich „Wobble“-Mutationen gefunden wurden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Frage der Regulation von *anr* nicht beantwortet werden und sollte unbedingt im Fokus weiterer Analysen stehen.

Auch über die Funktionalität von ANR kann nur spekuliert werden. Hojeberg *et al* definierten bei *P. fluorescens* einen Sauerstoffpartialdruck von 50×10^2 Pa als den Wert, bei dem Anr in die aktive Dimerform übergeht (Hojeber *et al.*, 1999). 50×10^2 Pa entsprechen einer 24%igen Sättigung der Luft mit Sauerstoff und somit einem Gehalt von 5% O₂ [DO (dissolved oxygen) $\approx 68,5 \mu\text{mol/L}$]. Zum Zeitpunkt der Zellernte der mikroaeroben Kulturanzuchten sowohl für die Proteom- als auch für die Transkriptomanalysen lag der Gehalt an Sauerstoff im Kulturmedium der Stämme bei 0-2%. Demnach ist anzunehmen, dass Anr bereits in seiner aktiven, DNA-bindenden Dimerform vorlag, was die Expression Anr-regulierter Gene erklären würde. Unden *et al* sprechen allerdings von einer Inaktivierung von Fnr bei *E. coli* bereits ab einem DO-Wert von $1 \mu\text{mol/L}$ (Unden *et al.*, 2002). $1 \mu\text{mol/L}$ entsprechen einem Sauerstoffpartialdruck von 10^2 Pa, also einer 0,5%igen Sättigung der Luft und einem Gehalt an Sauerstoff von 0,1%. Die Überexpression von *anr* in den *mutS*-Stämmen M25 und M26 könnte die zu dem *MutS*⁺-Stamm M1 erhöhte Produktion Anr-regulierter Gene erklären, da ein erhöhtes Anr-Gehalt eine raschere Antwort auf gesunkene DO-Werte ermöglicht und vielleicht auch einen höheren DO-Wert toleriert.

Der bei Fnr bekannte Aminosäureaustausch, welcher zu einer höheren Stabilität der aktiven Form des Proteins gegenüber Sauerstoff führt (Bates *et al.*, 1995), konnte bei den *mutS*-Stämmen nicht gefunden werden. Die Überexpression des Proteins in den *mutS*-Stämmen könnte allerdings dazu führen, dass immer ein Teil der Proteine noch als transkriptioneller Regulator wirksam sein kann.

Über den zweiten Regulator Dnr, der auf Aminosäureebene Ähnlichkeit zu Anr aufweist, dem aber die konservierten Cysteinreste für die Bildung des Fe-S-Zentrums fehlen (Arai *et al.*, 1995), weiß man nur wenig. *dnr* wird von Anr aktiviert und reagiert selbst auf N-Oxide wie Nitrit und NO (Rinaldo *et al.*, 2006). Die molekulare und strukturelle Basis der NO-abhängigen Regulation von *dnr* konnte noch nicht geklärt werden, da die Kristallisierung des rekombinanten Dnr wahrscheinlich aufgrund der extremen Mobilität der C-terminalen DNA-bindenden Domäne bisher nicht geglückt ist (Giardina *et al.*, 2006). Da *dnr* von Anr reguliert wird, scheint es folgerichtig, dass *dnr* in den späten *mutS*-Stämmen ebenfalls stark induziert ist. Sequenzanalysen der CF-Isolate von Patient M ergaben darüber hinaus eine Mutation innerhalb des Promotorbereichs von *dnr* im Bereich der Anr-Bindestelle. Ausge-

hend von der von Münch *et al.*, 2003 erstellten Konsensussequenz könnte diese Mutation zu einer leicht verstärkten Bindung von Anr an *dnr* führen.

Neben den beiden O₂-abhängigen Regulatoren Anr und Dnr wird auch IHF eine immer größere Rolle in der anaeroben Regulation zugesprochen. Ebenso wie *anr* und *dnr* zeigt auch *ihfD* eine erhöhte Expression in den späten *mutS*-Stämmen. Diese konstitutiv starke Expression könnte den *mutS*-Stämmen eine sofortige Anpassung an Schwankungen im Sauerstoffpartialdruck ermöglichen.

Die Interpretation der im späten *mutS*-Stamm differentiell produzierten Enzyme oder deren Transkripte der Elektronen-gekoppelten Phosphorylierung (ETP) lässt ebenfalls auf eine erhöhte Anpassungsfähigkeit des *mutS*-Stamms schließen.

Bis auf die der Gene der Cytochrom c-Oxidase zeigten die Transkripte der Enzyme der gesamten Atmungskette eine deutlich erhöhte Produktion. Die deutlich abgeschwächte Produktion der Transkripte der Cytochrom c-Oxidase, die das Elektron terminal auf Sauerstoff überträgt, legte den Schluss nahe, dass der späte *mutS*-Stamm an einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck und an alternative Elektronenakzeptoren adaptiert ist. *P. aeruginosa* kann unter den anaeroben Bedingungen der CF-Lunge via Denitrifikation wachsen (Worlitzsch *et al.*, 2002). Demnach wäre anzunehmen, dass auch die Gene der Denitrifikationsenzyme induziert sind. Gestützt wurde diese Hypothese zum einen durch die Überproduktion von Azurin und der Peroxidase CcpR, denen beiden eine Rolle im Elektronentransfer während der Reduktion von Nitrit zugesprochen wird (Barber *et al.*, 1976; Silvestrini *et al.*, 1982; Zannoni, 1989). Zum anderen zeigte auch OprF eine deutliche Erhöhung. Das Porin OprF scheint für die Denitrifikation von essentieller Bedeutung zu sein, da es spezifisch Nitrat in den periplasmatischen Raum transportiert (Yoon *et al.*, 2002).

Neben dem Elektronentransfer während der Denitrifikation wurde Azurin auch eine wichtige Rolle bei der Antwort auf oxidativen Stress zugeteilt (Vijgenboom *et al.*, 1997). Möglicherweise kann die Cytochrom c Peroxidase die für die Reduktion von Wasserstoffperoxid notwendigen Elektronen nicht nur über Cytochrom c, sondern auch über Azurin geliefert bekommen.

Bis auf die Gene des Nitratreduktasekomplexes (NIR), deren Transkripte nicht differentiell produziert waren, zeigten die Transkripte der übrigen Proteinkomplexe der Denitrifikation (NAR; NAP; NOR; NOS) eine verminderte Konzentration.

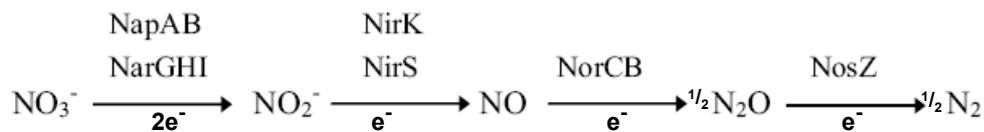


Abbildung D-3: Denitrifikation bei *P. aeruginosa*.
 NapAB, periplasmatische Nitratreduktase; Nar GHI, cytoplasmatische Nitratreduktase;
 NirK, respiratorische Nitritreduktase (kupferhaltig) NirS, respiratorische Nitritreduktase
 (ein Hämenzym); NorCB, NO-Reduktase; NosZ, N₂O-Reduktase.

Keine differentielle Konzentration zeigte das Transkript für das Gen des Cytochrom C *snr-1*, das kürzlich als essentiell sowohl für die Assimilation als auch für die respiratorische Reduktion von Nitrat/Nitrit beschrieben wurde (Kerschen *et al.*, 2001). Auch das Transkript für das Gen des als essentiell befundenen Nitrat/Nitrit-Transporters *NarK2* zeigte keine differentielle Expression, während das Transkript von *narK1* in verminderter Menge vorlag (Sharma *et al.*, 2006).

Da die Gene der anaeroben Regulatoren *Anr* und *Dnr* in den *mutS*-Stämmen eine starke Expression aufweisen, wäre zu erwarten gewesen, dass dies auch bei den von ihnen regulierten Genen der Fall ist. Allerdings wurden die Stämme sowohl für die Proteom- als auch für die Transkriptomanalysen mikroaerob ohne Zusatz von Nitrat oder Nitrit angezüchtet. Bei *P. aeruginosa* unterliegt die Expression der *nar*-Gene, neben *Anr* und *Dnr*, auch der Kontrolle durch das Zweikomponenten-Regulationssystem *NarXL*. Der membrangebundene Sensor *NarX* wird bei Anwesenheit von Nitrat aktiviert, und es kommt zur Autophosphorylierung. Aktiviertes *NarX* phosphoryliert daraufhin den eigentlichen Transkriptionsregulator *NarL*. *NarL* induziert zum einen die Transkription der *nar*-Gene und zum anderen - zusammen mit *Anr* - auch die Transkription von *dnr* (Krieger, 2001). Eine Aktivierung der *nar*-Gene ist ohne die Anwesenheit von Nitrat vermutlich nicht möglich.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass der *mutS*-Stamm zur Denitrifikation nicht mehr in der Lage ist und unter den mikroaeroben Bedingungen der CF-Lunge stattdessen effektiv den Restsauerstoff oder andere terminale Elektronenakzeptoren wie Sulfat, Wasserstoff oder organische Verbindungen nutzt.

Um diese Fragen zu klären, wurden mit Hilfe des Gries-Assays die Umwandlung von Nitrat in Nitrit, sowie der Abbau von Nitrit gemessen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Chen *et al.*, 2003) deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass bei Vorhandensein von Nitrat die Denitrifikation auch mikroaerob abläuft. Dies war sowohl bei den frühen *MutS*⁺-Stämmen als auch bei den späten *mutS*-Stämmen der Fall. Auffallend war hierbei, dass der *MutS*⁺-Stamm M1 seine bei mikroaerobem Wachstum in LB übliche OD₆₀₀ von 8 bei weitem nicht erreichte, sondern nach sechs Stunden bei einer

DISKUSSION

OD₆₀₀ von 2,8 abzusterben begann. Auch der *mutS*-Stamm M25 zeigte ein verlangsamtes Wachstum, hatte nach 8,5 Stunden mit einer OD₆₀₀ von 4,26 fast seine übliche OD erreicht und starb auch dann noch nicht ab. Eine mögliche Erklärung für das langsamere Wachstum wäre die Tatsache, dass die vorhandenen Elektronen zwischen aerober und anaerober Atmung aufgeteilt werden müssen.

Über den wachstumslimitierenden Faktor bei dem frühen MutS⁺-Stamm M1 kann nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit ist die Anhäufung toxischen NOs durch die schnelle Umsetzung von Nitrat und Nitrit, das auch bei Wachstumsversuchen anaerober *P. aeruginosa*-Kulturen mit reichlich Nitrat und Glucose als der wahrscheinlichste limitierende Faktor gilt (Chen *et al.*, 2005).

Alle Denitrifizierer halten ein stabiles Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen an Nitrit und Stickoxid unter der für die Zelle toxischen Konzentration aufrecht. Gewahrt wird dieses Gleichgewicht durch die Kontrolle der Expression der die Denitrifikation katalysierenden Genkluster durch zwei transkriptionelle Regulatoren. Sowohl Dnr, ein Mitglied der CRP (cAMP receptor protein) Superfamilie als auch Anr, ein Mitglied der Fnr (fumarat reductase regulator) Superfamilie, reagieren auf den Redoxzustand der Zelle (Rinaldo *et al.*, 2006). Dieses Gleichgewicht ist in den *mutS*-Stämmen durch die konstitutiv starke Expression der beiden Regulatoren gestört. Der späte *mutS*-Stamm scheint die daraus eventuell resultierende Gefahr einer für die Zelle toxischen Konzentration an Stickoxid zu vermeiden. Entweder durch sein sehr langsames Wachstum, das mit einer geringen Umsetzung von Nitrat und Nitrit zu NO einhergeht, oder indem er die Denitrifikation nach der Reduktion von Nitrat zu Nitrit abbricht. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass der *mutS*-Stamm M25 weder mikroaerob noch anaerob Nitrit weiter umgesetzt hat. Allerdings wurden die Analysen nur 24h durchgeführt und sollten, bevor eine endgültige Aussage getroffen wird, über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Vielleicht ist auch die nur beim Nitritreduktasekomplex nicht vorhandene Repression ein Hinweis darauf, dass dieser durch eine Mutation funktionsunfähig ist, und eine Regulation somit nicht mehr notwendig ist. Eine Sequenzierung der Gene dieses Enzymkomplexes, insbesondere von *nirS*, ist daher zukünftig erforderlich. Auch die Beobachtung, dass nur der frühe MutS⁺-Stamm M1 eine extreme Gasbildung aufweist, nicht aber der späte *mutS*-Stamm M25, könnte mit der unterbrochenen Denitrifikation erklärt werden, da kein molekularer Stickstoff mehr gebildet wird. Eine Gaschromatographische Analyse könnte Aufschluß über das von dem frühen MutS⁺-Stamm gebildete Gas geben.

Kürzlich wurde zwischen der Aktivität der beiden Enzymkomplexe NIR/NOR und dem, bei CF-Isolaten vorherrschenden mukoiden Phänotyp, eine Verbindung beschrieben (Yoon *et al.*, 2006). So erwiesen sich mukoide Stämme als sehr viel sensitiver gegenüber Stickoxid als non-mukoide Stämme. Für 84% (USA) der mukoiden CF-Isolate ist eine Mutation

DISKUSSION

in dem Gen des Anti-Sigmafaktors MucA für die Alginatüberproduktion verantwortlich (Boucher *et al.*, 1997). MucA ist ein Transmembranprotein der Cytoplasmamembran. Da die katalytischen Enzyme des NIR- und des NOR-Enzymkomplexes sich im periplasmatischen Raum befinden, wird spekuliert, dass der periplasmatische Teil von MucA eine essentielle regulatorische Rolle für die Aktivität von NIR und NOR spielt.

Zwar wurden fast alle Isolate der Patienten P, M und V als non-mukoid eingestuft, jedoch muss diese Bewertung nicht den *in vivo*-Zustand der Zellen widerspiegeln, da der mukoide Phänotyp unter aeroben Bedingungen nicht stabil ist. Zukünftig sollte eine Sequenzierung des *mucA*-Gens vorgenommen werden. Sollte eine Mutation in *mucA* vorhanden sein und somit die Aktivität des NIR und NOR Enzymkomplexes eingeschränkt sein, wäre dies eine Erklärung für das langsame Wachstum der *mutS*-Stämme.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der späte *mutS*-Stamm zumindest zur Nitratreduktion fähig ist. Ob diese danach abgebrochen wird, oder nur sehr langsam verläuft, konnte nicht geklärt werden.

Da Stickoxid auch durch drei verschiedene NO-Synthasen des Lungenepithels gebildet wird, ist davon auszugehen, dass der *mutS*-Stamm ein funktionstüchtiges NOR-System besitzt. Die Reduktion von Stickoxid zu Distickstoffoxid mit extern produziertem NO würde weitere Energie in Form zusätzlichen ATPs liefern, da diese Reaktion an einen Protonenausstoß gekoppelt ist.

Demnach ist Nitrat der entscheidende Induktor der Enzyme der Denitrifizierung, und somit war bei den Anzuchtbedingungen der Analysen nicht mit einer Induktion dieser Enzyme zu rechnen.

Darüber hinaus lässt die unvollständige Umstellung des späten *mutS*-Stamms auf anaeroben Metabolismus eventuell darauf schließen, dass es in der CF-Lunge von Vorteil ist, schnell zwischen aerobem und anaerobem Metabolismus zu wechseln oder beide parallel ablaufen zu lassen. Gestützt wird diese Annahme auch durch die Transkriptomdaten die auf eine starke Expression des Gens einer Cytochrom *cbb₃*-Oxidase im späten *mutS*-Stamm M25 hindeuten. Cytochrom *cbb₃*-Oxidasen sind Mitglieder einer Eisen / Kupfer-Oxidasefamilie, die eine wichtige Rolle bei Sauerstofflimitation spielt. Cytochrom *cbb₃*-Oxidasen besitzen eine Sauerstoffaffinität, die fast die bei Wurzelknollen gemessene erreicht (Preisig *et al.*, 1996), und werden unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck induziert. Durch deren Überexpression ist der späte *mutS*-Stamm in der Lage, den in der CF-Lunge kaum vorhandenen Sauerstoff effektiv zu nutzen. *P. aeruginosa* besitzt zwei Cytochrom *cbb₃*oxidasen, die *cbb₃-1* und die *cbb₃-2*. Erstaunlicherweise wird zwar *cbb₃-2* als Anr reguliert beschrieben, nicht aber die im *mutS*-Stamm überproduzierte *cbb₃-1* (PA1552). Darüber hinaus wird den *cbb₃*-Oxidasen NO-Reduktase-Aktivität zugeschrieben (Forte *et al.*, 2001). Abbildung D-4 zeigt die im *mutS*-Stamm vermutlich bevorzugt ablaufenden Redox-

DISKUSSION

Reaktionen der Elektronen-gekoppelten Phosphorylierung (ETP) unter mikroaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von Nitrat.

NAD(P)H wird durch die NADH-Dehydrogenase (\uparrow) oxidiert und gibt Elektronen an den Chinonpool weiter. Ebenfalls aufgefüllt wird der Chinonpool durch die Succinatdehydrogenase (\uparrow) und gibt die Elektronen an das Cytochrom bc1 (\uparrow) weiter. Ist Sauerstoff vorhanden, so gibt das Cytochrom bc1 die Elektronen an die Cytochrom cbb3 I-Oxidase (\uparrow) weiter, die die Elektronen terminal auf Sauerstoff überträgt.

Ist Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor vorhanden, so bekommt Azurin (\uparrow) Elektronen, sowohl aus dem Chinonpool als auch von dem Cytochrom bc1. Azurin kann diese entweder direkt an die Nitritreduktase (NirM) oder zuerst an die Cytochrom c551-Peroxidase (\uparrow) weitergeben. Da die Cytochrom c551-Peroxidase große Ähnlichkeit mit dem Cytochrom c551 (NirM) aufweist, welches Elektronen sowohl an das Cytochrom cbb3-I als auch an die Nitritreduktase weitergeben kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die Peroxidase dazu in der Lage ist. Ob Azurin und CcpR auch in der Lage sind, Elektronen an die Nitratreduktase weiterzugeben, wurde noch nicht untersucht.

Auch der Verlauf der ETP verdeutlicht die enge Vernetzung von mikroaerobem und anaerobem Atmung. So ist entweder die Fähigkeit, schnellst möglich von mikroaerobem zu anaerobem Metabolismus umzuschalten, oder die Fähigkeit zu parallelem Ablauf in der Lunge von CF-Patienten ein essentieller Evolutionsvorteil.

DISKUSSION

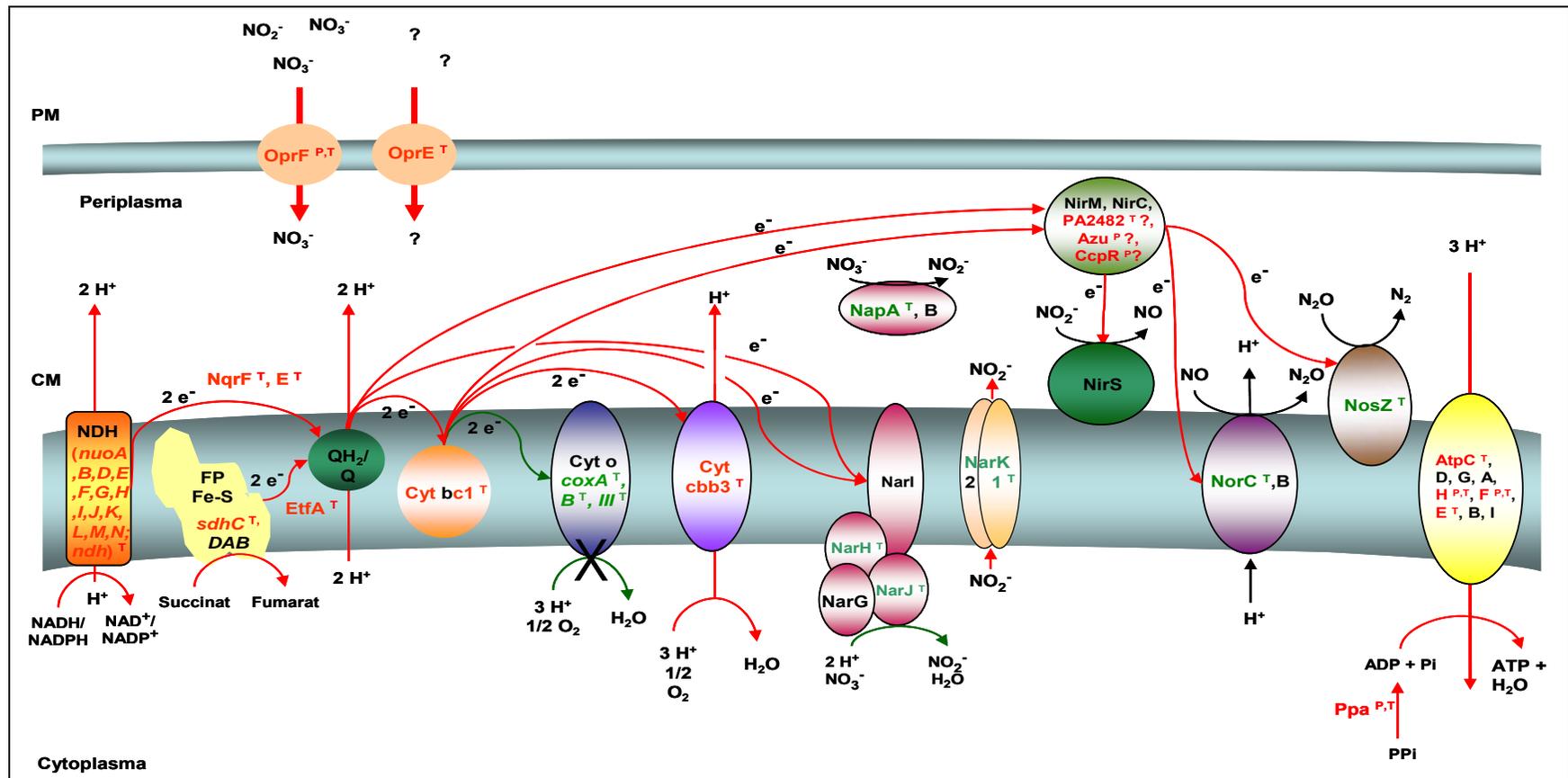


Abbildung D-4: Schematisches Modell der im *mutS*-Stamm unter mikroaeroben Bedingungen und bei Anwesenheit von Nitrat vermutlich bevorzugt ablaufenden Redox-Reaktionen der ETP mit Elektronen und Protonen-Transfer.

NHD: NAD(P)H-Dehydrogenase; FP: Flavoprotein; FE-S: Eisen-Schwefelprotein; Q_{H2}/Q: Chinon/Semichinon; Cyt bc1: Cytochrom bc1-Komplex; Cyt o: Cytochrom c-Oxidase; Cyt cbb3: Cytochrom cbb3-Komplex; NapAB, periplasmatische Nitratreduktase; Nar GHJI, cytoplasmatische Nitratreduktase; NirS, respiratorische Nitritreduktase (ein Hämezym); NorCB, NO-Reduktase; NosZ, N₂O-Reduktase; CM: Cytoplasmamembran; PM: Periplasmamembran. **P** hochgestellt: (P_n^{M25} / P_n^{M1}); **T** hochgestellt: \bar{U}_n / T_n^{M1} (T: Transkript; n: CF-Nummer; $U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\}$; $\bar{U}_n = \text{arithmetisches Mittel von } U_n$); **Rote Markierung**: Erhöhte Produktion, **Grüne Markierung**: Abgeschwächte Produktion.

D.6 Regulatorische Netzwerke

Es existieren bei *E. coli* zahlreiche Berichte über die deutlich reduzierte Aktivität der Enzyme des TCA-Zyklus unter anaeroben Bedingungen. So ist beispielsweise das für die Succinatdehydrogenase (dem einzigen membrangebundenen Enzym des TCA-Zyklus) kodierende *sdhCDAB*-Operon unter anaeroben Bedingungen durch die Bindung von Fnr 10-fach reprimiert (Nam *et al.*, 2005). Bei der unter anaeroben Bedingungen die Fermentation von Fumarat zu Succinat katalysierenden Fumaratreduktase hingegen bewirkt Fnr eine Geninduktion. Eine anaerobe Repression des *sdhCDAB*-Operons durch Anr konnte bei *P. aeruginosa* bisher nicht gefunden werden. Vielleicht auch weil die Succinatdehydrogenase beide Wege katalysiert und eine anaerobe Repression demnach nicht sinnvoll ist. Beide Enzyme werden aber auch stark über Substrate wie Glucose reguliert.

Microarrayanalysen haben gezeigt, dass 18% des Genoms von *P. aeruginosa* eine Nitrat-abhängige Expression zeigen (Filiatrault *et al.*, 2005). Neben den gesamten Genen, die für die Enzymkomplexe der Denitrifikation kodieren, sind auch viele andere Enzyme des zentralen Metabolismus betroffen. So wird das Gen der Cytochrom C-Oxidase in Anwesenheit von Nitrat auch in aerober Umgebung fast fünffach reprimiert, ebenso wie die ATPase, Teile der Purinsynthese - Enzymkomplexe und ribosomale Proteine. In dieser Arbeit wurden, außer dem Gen der Cytochrom C Oxidase, alle o.g. Gene im *mutS*-Stamm stark exprimiert gefunden. Neben der Annahme, dass der *mutS*-Stamm an anaerobe Bedingungen angepasst ist, ist es ebenso wahrscheinlich, dass er auch an die von Nitrat ausgehende Repression vieler Gene angepasst ist.

Obwohl die Ergebnisse von Transkriptom und Proteom der Isolate der drei Patienten M, V und P in dieser Arbeit recht gut übereinstimmen, ist es schwierig, die Daten zu verallgemeinern. Die Bedingungen, an die der jeweilige Klon sich angepasst hat, können von Patient zu Patient und infiziertem Ort in der CF-Lunge recht unterschiedlich sein.

In dieser Arbeit wurde eine Liste von Markergenen erstellt, die übereinstimmend bei den Isolaten von allen drei Patienten CF-spezifisch exprimiert waren. Diese Liste soll einen Anhaltspunkt darstellen, um Aussagen über den Grad der bereits erfolgten Anpassung von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge zu ermöglichen und neue Therapiestrategien zu entwickeln.

E Zusammenfassung

Die Zystische Fibrose (CF) beruht auf einer Mutation im Gen des „Cystic Fibrosis Transmembran Conductance Regulator“ (CFTR), das einen cAMP-abhängigen, epithelialen Chloridkanal kodiert. Die CFTR-Dysfunktion führt zu der Sekretion eines hyperosmolaren, hochviskosen Mukus im Respirationstrakt, welche mit einer Beeinträchtigung der lokalen Immunabwehr und der Förderung chronischer Pneumonien einhergeht. Diese werden hauptsächlich von *P. aeruginosa* als Leitkeim verursacht. Die resultierende Inflammation der CF-Lunge führt zu einer fortschreitenden Zerstörung des Lungengewebes bis hin zum Funktionsverlust der Lunge und zum Tod der Patienten.

Die chronische Infektion der CF-Lunge wurde vermehrt mit dem Auftreten hypermutierender Stämme (*mutS*-Stämme) in Verbindung gebracht, was vermutlich auf deren Fähigkeit, sich schnell an die wechselnden Bedingungen der entzündeten CF-Lunge anzupassen, zurückzuführen ist. In der Vorarbeit zu dieser Doktorarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass bei den hier untersuchten CF-Patienten M, V und P jeweils ein unterschiedlicher *P. aeruginosa*-Klon mit Patienten-spezifischer Mutation im *mutS*-Gen persistiert (17-bp Deletion, 8-bp Insertion, 1-bp-Insertion). Die vorkommenden sequentiellen *MutS*⁺- und *mutS*-Isolate dieser Patienten sollten im Rahmen dieser Arbeit mittels Transkriptom- und Proteomanalyse detailliert charakterisiert werden, um den Mechanismus der Anpassung an das besondere *P. aeruginosa*-Habitat der CF-Lunge besser zu verstehen. Die Anzucht der Stämme fand dabei unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen statt, wie sie auch in der Lunge von CF-Patienten vorherrschen.

Sequenzanalysen des *mutS*-Gens sequentieller isogener *P. aeruginosa*-Isolate zeigten, dass bei allen Patienten der Δ *mutS*-Genotyp im finalen Stadium der Erkrankung einen Großteil der *P. aeruginosa*-Varianten repräsentiert. Der späte hypermutierende Phänotyp zeichnete sich durch den Verlust zahlreicher bekannter Virulenzfaktoren wie dem Pigment Pyocyanin, der Elastase LasB, den Siderophoren Pyochelin und Pyoverdin, der Flagelle und jeglicher proteolytischer Aktivität aus. In der CF-Lunge findet also eine negative Selektion hinsichtlich virulenzassoziiierter Faktoren statt. Als auffällig erwies sich die Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen, wie beispielsweise die Derepression des β -Lactamase-Gens *ampC* durch Mutationen im Gen des negativen Regulators AmpD. Neben der Verifizierung dieser phänotypischen Daten deuteten Proteom- und Transkriptomanalysen auf ein stark verändertes Expressionsmuster zahlreicher metabolischer Faktoren hin (Enzyme, Transportproteine u.a.), was als ausgeprägte Anpassung des gesamten Metabolismus des späten *mutS*-Phänotyps an das Habitat CF-Lunge zu werten ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Abbau von Glucose und Gluconat über den KDPG-Weg scheint für *P. aeruginosa* in der CF-Lunge keine große Rolle zu spielen. Im *mutS*-Stamm ist eine starke Fokussierung auf den TCA-Zyklus und die Aufnahme von Dikarbonsäuren festzustellen. Zusätzlich scheinen anaplerotische Reaktionen des TCA-Zyklus benötigt zu werden, wie die Einschleusung von zusätzlichem Acetyl-CoA durch den Abbau von Fettsäuren über den Glyoxylatshunt, die CO₂-Fixierung über die Phosphoenolpyruvatcarboxylase und die Methylmalonyl-CoA-abhängige Pyruvatcarboxylase. Der Pyruvatpool könnte zusätzlich über den Abbau von D-Serin aufgefüllt werden. Bevorzugt scheinen auch verzweigte und aromatische Aminosäuren (hauptsächlich Phenylalanin) und Arginin über Fumarat, bzw. Succinat in den TCA-Zyklus eingeschleust zu werden. Die schwache Expression des Gens der Fumarathydratase lässt auf einen verzweigten Verlauf des TCA-Zyklus schließen, was einen Marker für anaerobes Wachstum darstellt. Fumarat scheint für die Biosynthese der Aspartatfamilien verwendet zu werden, während Malat möglicherweise anstatt in Oxalacetat durch das Protein PA3471 in Pyruvat umgewandelt wird.

Sehr schwach exprimiert zeigten sich vor allem die Gene katabolischer Enzyme, die am Abbau von Umwelt-Kohlenstoffen beteiligt sind.

Die Überproduktion der Ribosomen, verschiedener Faktoren der Transkription und Translation, sowie der tRNAs und Biosynthesewege sämtlicher Aminosäuren (außer Tryptophan) lässt auf eine starke biosynthetische Aktivität schließen.

Neben dem verzweigten TCA-Zyklus deutete die Überproduktion anaerob regulierter Proteine, wie des *arc*-Operons oder Teilen der Denitrifikation, sowie die kaum noch erkennbare Expression des Gens der Cytochrom c-Oxidase auf eine Adaption des späten *mutS*-Stamms an die sauerstoffarme CF-Lunge hin. Darüber hinaus ist der *mutS*-Stamm durch die Induktion einer O₂-hochaffinen Cytochrom cbb3-Oxidase wahrscheinlich in der Lage, den in der CF-Lunge verfügbaren Restsauerstoff effektiv zu nutzen. Aerobe Atmung und Denitrifikation könnten unter diesen Bedingungen parallel ablaufen, wobei ein verlangsamtes Wachstum wichtig zu sein scheint, um die rasche Anhäufung toxischen NO₂⁻/NO durch die Denitrifikation zu vermeiden. Der späte *mutS*-Stamm scheint prinzipiell auf eine schnelle Reaktion auf Umgebungsverhältnisse vorbereitet zu sein. Auf der einen Seite werden die Hauptenzyme der Denitrifikation in Abwesenheit ihres dominanten Regulators Nitrat kaum noch exprimiert. Auf der anderen Seite werden die anaeroben Regulatoren Anr, Dnr und IHF überexprimiert. Der DNA-bindende Transkriptionsfaktor Anr liegt unter aeroben Bedingungen als inaktives Monomer vor, das sich jedoch in Abwesenheit von O₂ in die aktive Dimerform umwandelt. Die Anr-Überexpression in den *mutS*-Stämmen könnte zu einer schnelleren Reaktion auf einen gesunkenen Sauerstoffpartialdruck und zu einer erhöhten O₂-Toleranz führen und so auch den parallelen Ablauf von aerober und anaerober Atmung zu ermöglichen.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Untersuchung der sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolate von Patient M wurden verschiedene Metabolomtypen charakterisiert, die eine Aussage über den Grad der Anpassung von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge ermöglichen könnten. Die Definition von Markerproteinen der Lungenadaptation soll diese Aussage erleichtern, um adäquate Therapieansätze und neue Targets für Impfstoffe zu entwickeln.

F Literaturverzeichnis

- Adair FW, Geftic SG, Gelzer J. Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. I. Growth in benzalkonium chloride solution. *Appl. Microbiol* 1969; **18**: 299-302.
- Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; **30**: 627-34.
- Aebersold RH, Leavitt J, Saavedra RA, Hood LE, Kent SB. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 1987; **84**: 6970-4.
- Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 2002; **148**: 2371-81.
- Aertsen A, Michiels CW. Diversify or die: generation of diversity in response to stress. *Crit Rev. Microbiol.* 2005; **31**: 69-78.
- Ambler RP, The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1980; **289**: 321-331.
- Andersen DH. Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am. J Dis. Child.* 1938; **56** :344-399.
- Andersen JS, Mann M. Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS Lett* 2000; **480**: 25-31.
- Anonymous. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium: population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum. Mutat.* 1994; **4**: 167-177.

LITERATURVERZEICHNIS

- Anonymous. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium: worldwide survey of the delta F508 mutation-report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC). *Am. J Hum. Genet.* 1990; **47**: 354-359.
- Arai H, Igarashi Y, Kodama T. Structure and ANR-dependent transcription of the *nir* genes for denitrification from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994; **58**: 1286-91.
- Arai H, Igarashi Y, Kodama T. Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett.* 1995; **371**: 73-6.
- Arai H, Kodama T, Igarashi Y. Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 1997; **25**: 1141-8.
- Arai H, Kodama T, Igarashi Y. The role of the *nirQOP* genes in energy conservation during anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; **62**: 1995-9.
- Bachmann BJ, Low KB, Taylor AL. Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* 1976; **40**: 116-67.
- Backhed F, Normark S, Schweda EK, Oscarson S, Richter-Dahlfors A. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect* 2003; **5**: 1057-63.
- Baltimore RS, Christie CD, Smith GJ. Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am. Rev. Respir. Dis* 1989; **140**: 1650-61.
- Barton HA, Johnson Z, Cox CD, Vasil AI, Vasil ML. Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression

LITERATURVERZEICHNIS

- of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol. Microbiol.* 1996; **21**: 1001-17.
- Bateman A, Bycroft M. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol. Biol.* 2000; **299**: 1113-9.
- Bates DM, Lazazzera BA, Kiley PJ. Characterization of FNR mutant proteins indicates two distinct mechanisms for altering oxygen regulation of the *Escherichia coli* transcription factor FNR. *J Bacteriol.* 1995; **177**: 3972-8.
- Beare PA, For RJ, Martin LW, Lamont IL. Siderophore-mediated cell-signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol. Microbiol.* 2003; **47**: 195-207.
- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1951; **62**: 293-300.
- Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 2001; **98**: 14607-12.
- Blonder J, Goshe MB, Xiao W. Global analysis of the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome. Res* 2004; **3**: 434-44.
- Blum H, Gross HJ, Beier H. The expression of the TMV-specific 30-kDa protein in tobacco protoplasts is strongly and selectively enhanced by actinomycin. *Virology* 1989; **169**: 51-61.
- Boe L, Danielsen M, Knudsen S, Petersen JB, Maymann J, Jensen PR. The frequency of mutators in populations of *Escherichia coli*. *Mutat. Res* 2000; **448**: 47-55.
- Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J Respir. Crit Care Med* 1995; **152**: 2111-8.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; **13**: 257-61.
- Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V. 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.* 1997; **65**: 3838-46.
- Bradford HF, Ward HK. On glutaminase activity in mammalian synaptosomes. *Brain Res* 1976; **110**: 115-25.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; **72**: 248-54.
- Brown EW, LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. Phylogenetic evidence for horizontal transfer of *mutS* alleles among naturally occurring *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol.* 2001; **183**: 1631-44.
- Bryan R, Kube D, Perez A, Davis P, Prince A. Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.* 1998; **19**: 269-77.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; **39**: 1211-33.
- Calcott PH, Bhatti AR, Ingram JM. The effect of temperature on the cytochrome pattern and respiration of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 1975; **56**: 318-21.
- Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999; **43**: 1379-82.

LITERATURVERZEICHNIS

- Cattoir V. [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol. Biol. (Paris)* 2004; **52**: 607-16.
- Chamroux S. [Study of nitrate reducing marine bacteria. I. Isolation]. *Ann Inst. Pasteur (Paris)* 1972; **122**: 475-81.
- Chao L, Vargas C, Spear BB, Cox EC. Transposable elements as mutator genes in evolution. *Nature* 1983; **303**: 633-5.
- Chen F, Xia Q, Ju LK. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol* 2003; **69**: 6715-22.
- Chen F, Xia Q, Ju LK. Correlation of denitrification-accepted fraction of electrons with NAD(P)H fluorescence for *Pseudomonas aeruginosa* performing simultaneous denitrification and respiration at extremely low dissolved oxygen conditions. *Biotechnol. Prog.* 2004; **20**: 1593-8.
- Chen F, Xia Q, Ju LK. Competition between oxygen and nitrate respirations in continuous culture of *Pseudomonas aeruginosa* performing aerobic denitrification. *Biotechnol. Bioeng.* 2006; **93**: 1069-78.
- Chen YT, Chang HY, Lu CL, Peng HL. Evolutionary analysis of the two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Mol. Evol.* 2004; **59**: 725-37.
- Chopra I, O'Neill AJ, Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist. Updat.* 2003; **6**: 137-45.
- Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob. Agents Chemother* 2005; **49**: 2276-82.
- Clark, J. D. and O. Maaløe. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1967; **23**: 99-112.

LITERATURVERZEICHNIS

- Coleman FT, Mueschenborn S, Meluleni G. Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 2003; **100**: 1949-54.
- Comolli JC, Donohue TJ. Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* *cbb3* cytochrome oxidases. *Mol. Microbiol.* 2004; **51**: 1193-203.
- Cooper M, Tavankar GR, Williams HD. Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2003; **149**: 1275-84.
- Cortay JC, Bleicher F, Rieul C, Reeves HC, Cozzone AJ. Nucleotide sequence and expression of the *aceK* gene coding for isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1988; **170**: 89-97.
- Cox EC. Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.* 1976; **10**: 135-56.
- Cunningham L, Pitt M, Williams HD. The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome bd quinol oxidases. *Mol. Microbiol.* 1997; **24**: 579-91.
- Dawson KJ. The dynamics of infinitesimally rare alleles, applied to the evolution of mutation rates and the expression of deleterious mutations. *Theor. Popul. Biol.* 1999; **55**: 1-22.
- de Visser JA. The fate of microbial mutators. *Microbiology* 2002; **148**: 1247-52.
- Dean AM, Koshland DE, Jr. Kinetic mechanism of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry* 1993; **32**: 9302-9.
- del CR, Morosini MI, de la Pedrosa EG. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43**: 2207-14.

LITERATURVERZEICHNIS

- Denamur E, Lecointre G, Darlu P. Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell* 2000; **103**: 711-21.
- Denamur E, Bonacorsi S, Giraud A. High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Bacteriol.* 2002; **184**: 605-9.
- Denamur E, Matic I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol. Microbiol* 2006; **60**: 820-7.
- Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B. The signal molecule for beta-lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; **41**: 2113-20.
- DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998; **101**: 2598-605.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 1998; **148**: 1667-86.
- Drumm ML, Collins FS. Molecular biology of cystic fibrosis. *Mol. Genet. Med* 1993; **3**: 33-68.
- Dunne WM, Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002; **15**: 155-66.
- Eisenberg D, Marcotte EM, Xenarios I, Yeates TO. Protein function in the post-genomic era. *Nature* 2000; **405**: 823-6.
- Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat. Genet.* 1992; **2**: 240-8.
- Epelman S, Stack D, Bell C. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol.* 2004; **173**: 2031-40.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ernst RK, Adams KN, Moskowitz SM. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J Bacteriol.* 2006; **188**: 191-201.
- Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, Schobert M. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol.* 2004; **186**: 4596-604.
- Favero MS, Carson LA, Bond WW, Petersen NJ. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* 1971; **173**: 836-8.
- Filiatrault MJ, Wagner VE, Bushnell D, Haidaris CG, Iglewski BH, Passador L. Effect of anaerobiosis and nitrate on gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2005; **73**: 3764-72.
- Forte E, Urbani A, Saraste M, Sarti P, Brunori M, Giuffre A. The cytochrome *cbb3* from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity. *Europ. J. Biochem.* 2001; **268**: 6486-6491.
- Funchain P, Yeung A, Stewart JL, Lin R, Slupska MM, Miller JH. The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness. *Genetics* 2000; **154**: 959-70.
- Galimand M, Gamper M, Zimmermann A, Haas D. Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1991; **173**: 1598-606.
- Gallati S. Genetics of cystic fibrosis. *Semin. Respir. Crit Care Med* 2003; **24**: 629-38.
- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J Respir. Crit Care Med* 2003; **168**: 918-51.
- Gill JF, Deretic V, Chakrabarty AM. Alginate production by the mucoid *Pseudomonas aeruginosa* associated with cystic fibrosis. *Microbiol Sci.* 1987; **4**: 296-9.

LITERATURVERZEICHNIS

- Giraud A, Matic I, Radman M, Fons M, Taddei F. Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; **46**: 863-5.
- Glickman BW, Radman M. *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1980; **77**: 1063-7.
- Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988; **9**: 531-46.
- Gorg A, Postel W, Gunther S. Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations. *Electrophoresis* 1988; **9**: 37-46.
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; **21**: 1037-53.
- Grebe TA, Seltzer WK, DeMarchi J. Genetic analysis of Hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am. J Hum. Genet.* 1994; **54**: 443-6.
- Green J, Bennett B, Jordan P, Ralph ET, Thomson AJ, Guest JR. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. *Biochem. J* 1996; **316 (Pt 3)**: 887-92.
- Guina T, Wu M, Miller SI. Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. *J Am. Soc Mass Spectrom.* 2003; **14**: 742-51.
- Guina T, Purvine SO, Yi EC. Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2003; **100**: 2771-6.
- Gutierrez O, Juan C, Perez JL, Oliver A. Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; **48**: 3573-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- Haller T, Buckel T, Retey J, Gerlt JA. Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate to propionate by *Escherichia coli*. *Biochemistry* 2000; **39**: 4622-9.
- Hamase K, Morikawa A, Zaitso K. D-Amino acids in mammals and their diagnostic value. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; **781**: 73-91.
- Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M, Jr. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr.* 1998; **132**: 255-9.
- Hancock RE, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun.* 1983; **42**: 170-7.
- Hanna SL, Sherman NE, Kinter MT, Goldberg JB. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* 2000; **146 (Pt 10)**: 2495-508.
- Harding RA, Royt PW. Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen. Microbiol.* 1990; **136**: 1859-67.
- Hasegawa N, Arai H, Igarashi Y. Activation of a consensus FNR-dependent promoter by DNR of *Pseudomonas aeruginosa* in response to nitrite. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; **166**: 213-7.
- Hassett DJ, Sokol PA, Howell ML. Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol.* 1996; **178**: 3996-4003.
- Hassett DJ. Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J Bacteriol.* 1996; **178**: 7322-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B. 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.* 2002; **54**: 1425-43.
- Hill ID, MacDonald WB, Bowie MD. Cystic fibrosis in Cape Town. *S. Afr. Med. J.* 1988; **73**:147-9.
- Hirche TO, Atkinson JJ, Bahr S, Belaaouaj A. Deficiency in neutrophil elastase does not impair neutrophil recruitment to inflamed sites. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; **30**: 576-84.
- Hogardt M, Schubert S, Adler K, Gotzfried M, Heesemann J. Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Int J Med Microbiol* 2006; **296**: 313-20.
- Hoiby N, Koch C, Frederiksen B. [Cystic fibrosis]. *Nord. Med* 1998; **113**: 328-30.
- Hojberg O, Schnider U, Winteler HV, Sorensen J, Haas D. Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; **65**: 4085-93.
- Hollsing AE, Granstrom M, Vasil ML, Wretling B, Strandvik B. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1987; **25**: 1868-74.
- Hong CS, Kuroda A, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kato J. The aerotaxis transducer gene *aer*, but not *aer-2*, is transcriptionally regulated by the anaerobic regulator ANR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biosci. Bioeng.* 2004; **97**: 184-90.
- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; **80**: 225-36.
- Imalzumi Y. Incidence and mortality rates of cystic in Japan, 1969-1992. *Am. J Med. Genet.* 1995; **58**: 161-168

LITERATURVERZEICHNIS

- Imhof M, Schlotterer C. Fitness effects of advantageous mutations in evolving *Escherichia coli* populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 2001; **98**: 1113-7.
- Imundo L, Barasch J, Prince A, Al Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 1995; **92**: 3019-23.
- Irie Y, Mattoo S, Yuk MH. The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 2004; **186**: 5692-8.
- Ishii C, Inoue H. Epistasis, photoreactivation and mutagen sensitivity of DNA repair mutants *upr-1* and *mus-26* in *Neurospora crassa*. *Mutat. Res* 1989; **218**: 95-103.
- Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* 1994; **13**: 4684-94
- Jacobs C, Frere JM, Normark S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell.* 1997; **88**: 823-32
- Jain B, Brand BC, Luck PC, Di Berardino M, Dimroth P, Hacker J. An oxaloacetate decarboxylase homologue protein influences the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett.* 1996; **145**: 273-9.
- Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol.* 2000; **182**: 3843-5.
- Juhas M, Wiehlmann L, Huber B. Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2004; **150**: 831-41.
- Karlowsky JA, Hoban DJ, Zelenitsky SA, Zhanel GG. Altered *denA* and *anr* gene expression in aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob. Chemother* 1997; **40**: 371-6.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kerschen EJ, Irani VR, Hassett DJ, Rowe JJ. *snr-1* gene is required for nitrate reduction in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 2001; **183**: 2125-31.
- Khoroshilova N, Beinert H, Kiley PJ. Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 1995; **92**: 2499-503.
- Kibota TT, Lynch M. Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*. *Nature* 1996; **381**: 694-6.
- Kim K, Lee S, Lee K, Lim D. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J Bacteriol.* 1998; **180**: 3692-6.
- Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol* 1997; **24**: 895-904.
- Kopp U, Wiedemann B, Lindquist S, Normark S. Sequences of wild-type and mutant *ampD* genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; **37**: 224-8.
- Korfmann G, Sanders CC. *ampG* is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1289; **33**: 1946-51
- Kraemer R, Aebi C, Casaulta AC, Gallati S. Early detection of lung disease and its association with the nutritional status, genetic background and life events in patients with cystic fibrosis. *Respiration* 2000; **67**: 477-90.
- Krieger R. Transkriptionelle Kontrolle der Denitrifikation in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Universität Freiburg.
- Krieger R, Rompf A, Schobert M, Jahn D. The *Pseudomonas aeruginosa hemA* promoter is regulated by Anr, Dnr, NarL and Integration Host Factor. *Mol. Genet. Genomics* 2002; **267**: 409-17.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kubesch P, Dork T, Wulbrand U. Genetic determinants of airways' colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Lancet* 1993; **341**: 189-93.
- Kulasekara HD, Ventre I, Kulasekara BR, Lazdunski A, Filloux A, Lory S. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial *cup* genes. *Mol. Microbiol.* 2005; **55**: 368-80.
- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol. Biol.* 1970; **47**: 69-85.
- Langae TY, Huletsky. Characterization of the *ampD* gene encoding a regulator of cephalosporinase expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology.* 1996; abstr. A-37, p. 139.
- Langae TY, Huletsky A. Identification of the *ampG* gene encoding a signal transducer for induction of the chromosomal AmpC β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology.* 1997; abstr. A-3, p. 1.
- Langae TY, Dargis M, Huletsky A. An *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* encodes a negative regulator of AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; **42**: 3296-300.
- Lazazzera BA, Beinert H, Khoroshilova N, Kennedy MC, Kiley PJ. DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol. Chem.* 1996; **271**: 2762-8.
- Lazazzera BA, Grossman AD. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol* 1998; **6**: 288-94.
- LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* 1996; **274**: 1208-11.

LITERATURVERZEICHNIS

- LeClerc JE, Payne WL, Kupchella E, Cebula TA. Detection of mutator subpopulations in *Salmonella typhimurium* LT2 by reversion of his alleles. *Mutat. Res* 1998; **400**: 89-97.
- Levy DD, Sharma B, Cebula TA. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; **48**: 2355-63.
- Lewenza S, Gardy JL, Brinkman FSL, Hancock REW. Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* exported proteins using a consensus computational strategy combined with a laboratory-based PhoA fusion screen. *Genome Research* 2005; **15**: 321-329.
- Li B, Tsui HC, LeClerc JE, Dey M, Winkler ME, Cebula TA. Molecular analysis of *mutS* expression and mutation in natural isolates of pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 2003; **149**: 1323-31.
- Lillehoj EP, Kim BT, Kim KC. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am. J. Physiol. Lung Cell Moll. Physiol.* 2001; **282**: 751-56
- Livermore DM, Yang YJ. Beta-lactamase lability and inducer power of newer beta-lactam antibiotics in relation to their activity against beta-lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1987; **155**: 775-82.
- Livermore DM. Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. *Drugs* 1987; **34**: 64-88.
- Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1992; **36**: 2046-8.
- Livermore DM. Bacterial resistance to carbapenems. *Adv. Exp. Med Biol.* 1995; **390**: 25-47.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lodge J, Busby S, Piddock L. Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa ampR* gene and its role at the chromosomal *ampC* beta-lactamase promoter. *FEMS Microbiol Lett.* 1993; **111**: 315-20.
- Lorenz E, Chemotti DC, Vandal K, Tessier P. *aeruginosa*. Toll-like receptor 2 represses nonpilus adhesin-induced signaling in acute infections with the *Pseudomonas aeruginosa pilA* mutant. *Infect Immun.* 2004; **72**: 4561-9.
- Lu CD, Winteler H, Abdelal A, Haas D. The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator ANR during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1999; **181**: 2459-64.
- Lu CD, Yang Z, Li W. Transcriptome analysis of the ArgR regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2004; **186**: 3855-61.
- Luthi E, Baur H, Gamper M. The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. *Gene* 1990; **87**: 37-43.
- Luzar MA, Thomassen MJ, Montie TC. Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition. *Infect Immun.* 1985; **50**: 577-82.
- Macia MD, Borrell N, Perez JL, Oliver A. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; **48**: 2665-72.
- Macia MD, Blanquer D, Togoeres B, Sauleda J, Perez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob. Agents Chemother* 2005; **49**: 3382-6.
- Malhotra S, Silo-Suh LA, Mathee K, Ohman DE. Proteome analysis of the effect of mucoid conversion on global protein expression in *Pseudomonas aeruginosa* strain

LITERATURVERZEICHNIS

- PAO1 shows induction of the disulfide bond isomerase, *dsbA*. *J Bacteriol.* 2000; **182**: 6999-7006.
- Mao EF, Lane L, Lee J, Miller JH. Proliferation of mutators in A cell population. *J Bacteriol.* 1997; **179**: 417-22.
- Marmur J, Anderson WF, Marthews L. The effects of ultraviolet light on the biological and physical chemical properties of deoxyribonucleic acids. *J Cell Comp Physiol* 1961; **58(3)Pt 2**: 33-55.
- Matic I, Rayssiguier C, Radman M. Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell* 1995; **80**: 507-15.
- Matic I, Radman M, Taddei F. Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1997; **277**: 1833-4.
- Matsushita K, Yamada M, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M. Membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. A KCN-insensitive alternate oxidase chain and its energetics. *J Biochem. (Tokyo)* 1983; **93**: 1137-44.
- Mercenier A, Simon JP, Vander WC, Haas D, Stalon V. Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1980; **144**: 159-63.
- Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 1996; **64**: 518-23.
- Miller JH, Michaels M. Finding new mutator strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene* 1996; **179**: 129-32.
- Miller JH. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu. Rev. Microbiol* 1996; **50**: 625-43.
- Miller JH, Suthar A, Tai J, Yeung A, Truong C, Stewart JL. Direct selection for mutators in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1999; **181**: 1576-84.

LITERATURVERZEICHNIS

- Miller JH, Yeung A, Funchain P. Temporary and permanent mutators lacking the mismatch repair system: the enhancement of mutators in cell populations. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2000; **65**: 241-52.
- Miller K, O'Neill AJ, Chopra I. *Escherichia coli* mutators present an enhanced risk for emergence of antibiotic resistance during urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; **48**: 23-9.
- Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 1996; **65**: 101-33.
- Morales MM, Capella MA, Lopes AG. Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz. J Med Biol. Res* 1999; **32**: 1021-8.
- Muir A, Soong G, Sokol S. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; **30**: 777-83.
- Munch R, Hiller K, Barg H. PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 266-9.
- Muro-Pastor MI, Florencio FJ. NADP(+)-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: purification and characterization of the enzyme and cloning, sequencing, and disruption of the *icd* gene. *J Bacteriol.* 1994; **176**: 2718-26.
- Nam TW, Park YH, Jeong HJ, Ryu S, Seok YJ. Glucose repression of the *Escherichia coli* *sdhCDAB* operon, revisited: regulation by the CRP*cAMP complex. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 6712-22.
- Nasr SZ. Cystic fibrosis in adolescents and young adults. *Adolesc. Med* 2000; **11**: 589-603.
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.* 1970; **104**: 313-22.

LITERATURVERZEICHNIS

- Negri MC, Morosini MI, Baquero MR, Campo RR, Blazquez J, Baquero F. Very low cefotaxime concentrations select for hypermutable *Streptococcus pneumoniae* populations. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; **46**: 528-30.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988; **9**: 255-62.
- Neuhoff V, Stamm R, Pardowitz I, Arold N, Ehrhardt W, Taube D. Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* 1990; **11**: 101-17.
- Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother* 1985; **27**: 619-24.
- Nilsson AI, Kugelberg E, Berg OG, Andersson DI. Experimental adaptation of *Salmonella typhimurium* to mice. *Genetics* 2004; **168**: 1119-30.
- Nilsson I, Lindgren S, Eriksson S, Wadstrom T. Serum antibodies to *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* in patients with chronic liver disease. *Gut* 2000; **46**: 410-4.
- Normark S. beta-Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb. Drug Resist.* 1995; **1**: 111-4.
- Norregaard-Madsen M, McFall E, Valentin-Hansen P. Organization and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* K-12 D-serine tolerance locus. *J Bacteriol.* 1995; **177**: 6456-61.
- Notley-McRobb L, Seeto S, Ferenci T. Enrichment and elimination of *mutY* mutators in *Escherichia coli* populations. *Genetics* 2002; **162**: 1055-62.

LITERATURVERZEICHNIS

- Nouwens AS, Cordwell SJ, Larsen MR. Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis* 2000; **21**: 3797-809.
- Nouwens AS, Willcox MD, Walsh BJ, Cordwell SJ. Proteomic comparison of membrane and extracellular proteins from invasive (PAO1) and cytotoxic (6206) strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics*. 2002; **2**: 1325-46.
- Nouwens AS, Walsh BJ, Cordwell SJ. Application of proteomics to *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 2003; **83**: 117-40.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol. Chem.* 1975; **250**: 4007-21.
- O'Neill AJ, Chopra I. Insertional inactivation of *mutS* in *Staphylococcus aureus* reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low. *J Antimicrob. Chemother* 2002; **50**: 161-9.
- Oh H, Stenhoff J, Jalal S, Wretling B. Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb. Drug Resist.* 2003; **9**: 323-8.
- Ohman DE, Burns RP, Iglewski BH. Corneal infections in mice with toxin A and elastase mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect. Dis.* 1980; **142**: 547-55.
- Ohno S. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1999; **10**: 517-22.
- Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; **288**: 1251-4.
- Oliver A, Baquero F, Blazquez J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol. Microbiol.* 2002; **43**: 1641-50.

LITERATURVERZEICHNIS

- Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blazquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; **48**: 4226-33.
- Olivera ER, Minambres B, Garcia B, Muniz C, Moreno MA, Ferrandez A, Diaz E, Garcia JL, Luengo JM. Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; **95**: 6419-24.
- Palma M, Zurita J, Ferreras JA. *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect Immun*. 2005; **73**: 2958-66.
- Palmer KL, Mashburn LM, Singh PK, Whiteley M. Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J Bacteriol*. 2005; **187**: 5267-77.
- Patzold R, Schieber A, Bruckner H. Gas chromatographic quantification of free D-amino acids in higher vertebrates. *Biomed. Chromatogr*. 2005; **19**: 466-73.
- Peng X, Xu C, Ren H, Lin X, Wu L, Wang S. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. *J Proteome. Res* 2005; **4**: 2257-65.
- Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 1997; **94**: 12088-93.
- Pilewski JM, Frizzell RA. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev*. 1999; **79**: S215-S255.
- Pitson SM, Mendz GL, Srinivasan S, Hazell SL. The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori*. *Eur. J Biochem*. 1999; **260**: 258-67.

LITERATURVERZEICHNIS

- Preisig O, Zufferey R, Thony-Meyer L, Appleby CA, Hennecke H. A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol.* 1996; **178**: 1532-8.
- Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* 2003; **187**: 1709-16.
- Quadroni M, James P, Dainese-Hatt P, Kertesz MA. Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcription-PCR for characterization of the sulfate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J Biochem.* 1999; **266**: 986-96.
- Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* 1999; **79**: S3-S22.
- Ray A, Williams HD. The effects of mutation of the *anr* gene on the aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997; **156**: 227-32.
- Rayssiguier C, Thaler DS, Radman M. The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 1989; **342**: 396-401.
- Read RR, Costerton JW. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J Microbiol* 1987; **33**: 1080-90.
- Richardson AR, Yu Z, Popovic T, Stojiljkovic I. Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2002; **99**: 6103-7.
- Riedel K, Arevalo-Ferro C, Reil G. Analysis of the quorum-sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* H111 by proteomics. *Electrophoresis.* 2003; **24**: 740-50.

LITERATURVERZEICHNIS

- Rietsch A, Wolfgang MC, Mekalanos JJ. Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 2004; **72**: 1383-90.
- Rinaldo S, Giardina G, Brunori M, Cutruzzola F. N-oxide sensing and denitrification: the DNR transcription factors. *Biochem. Soc Trans.* 2006; **34**: 185-7.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; **245**: 1066-73.
- Roesch PL, Redford P, Batchelet S. Uropathogenic *Escherichia coli* use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* 2003; **49**: 55-67.
- Romling U, Wingender J, Muller H, Tummeler B. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; **60**: 1734-8.
- Rosenberg SM, Thulin C, Harris RS. Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature. *Genetics* 1998; **148**: 1559-66.
- Roth JR, Kugelberg E, Reams AB, Kofoed E, Andersson DI. Origin of Mutations Under Selection: The Adaptive Mutation Controversy. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006; **60**: 477-501.
- Roy SO, Packard TT. NADP-Isocitrate dehydrogenase from *Pseudomonas nautica*: kinetic constant determination and carbon limitation effects on the pool of intracellular substrates. *Appl. Environ. Microbiol* 1998; **64**: 4958-64.
- Rubenstein RC. Novel, mechanism-based therapies for cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 2005; **17**: 385-92.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; **239**: 487-91.

LITERATURVERZEICHNIS

- Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1.76-1.81 & A.2. 2006. ., Plainview, NY.
- Sawers RG. Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* 1991; **5**: 1469-81.
- Schaaper RM, Dunn RL. *Escherichia coli mutT* mutator effect during *in vitro* DNA synthesis. Enhanced A.G replicational errors. *J Biol. Chem.* 1987; **262**: 16267-70.
- Schlichtman D, Kavanaugh-Black A, Shankar S, Chakrabarty AM. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarboxylic acid cycle. *J Bacteriol.* 1994; **176**: 6023-9.
- Schreiber K, Boes N, Eschbach M. Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J Bacteriol.* 2006; **188**: 659-68.
- Schroeder TH, Zaidi T, Pier GB. Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. *Infect Immun.* 2001; **69**: 719-29.
- Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 1987; **160**: 47-56.
- Segers P, Vancanneyt M, Pot B. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int J Syst. Bacteriol.* 1994; **44**: 499-510.
- Shalel-Levanon S, San KY, Bennett GN. Effect of ArcA and FNR on the Expression of Genes Related to the Oxygen Regulation and the Glycolysis Pathway in *Escherichia coli* Under Microaerobic Growth Conditions. *Metab. Eng.* 2005; **7**: 364-74
- Shapiro JA. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol* 1998; **52**: 81-104.

LITERATURVERZEICHNIS

- Sharma V, Noriega CE, Rowe JJ. Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol* 2006; **72**: 695-701.
- Sherman NE, Stefansson B, Fox JW, Goldberg JB. *Pseudomonas aeruginosa* and a proteomic approach to bacterial pathogenesis. *Dis Markers* 2001; **17**: 285-93.
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 2006; **103**: 8487-92.
- Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996; **85**: 229-36.
- Sniegowski PD, Gerrish PJ, Lenski RE. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* 1997; **387**: 703-5.
- Sobel ML, McKay GA, Poole K. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother* 2003; **47**: 3202-7.
- Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, Prince A. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J Clin Invest* 2004; **113**: 1482-9.
- Spellerberg B, Cundell DR, Sandros J. Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1996; **19**: 803-13.
- Sriramulu DD, Nimtz M, Romling U. Proteome analysis reveals adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung environment. *Proteomics* 2005; **5**: 3712-21.
- Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *PNAS* 2003; **100**: 9440-45.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL *et al.* Complete genome sequence of PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; **406**: 959-64.

LITERATURVERZEICHNIS

- Stuhrmann M, von der HH, Fabel H. [Mucoviscidosis. Also a disease in adulthood?]. *Internist (Berl)* 1999; **40**: 476-85.
- Stutts MJ, Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC. Oxygen consumption and ouabain binding sites in cystic fibrosis nasal epithelium. *Pediatr. Res* 1986; **20**: 1316-20.
- Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 1981; **78**: 6613-7.
- Suh SJ, Runyen-Janecky LJ, Maleniak TC. Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2002; **148**: 1561-9.
- Taddei F, Radman M, Maynard-Smith J, Toupance B, Gouyon PH, Godelle B. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* 1997; **387**: 700-2.
- Taddei F, Matic I, Godelle B, Radman M. To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends Microbiol* 1997; **5**: 427-8.
- Tamber S, Hancock RE. Involvement of two related porins, OprD and OpdP, in the uptake of arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **260**: 23-9.
- Tanabe K, Kondo T, Onodera Y, Furusawa M. A conspicuous adaptability to antibiotics in the *Escherichia coli* mutator strain, dnaQ49. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; **176**: 191-6.
- Tanaka MM, Bergstrom CT, Levin BR. The evolution of mutator genes in bacterial populations: the roles of environmental change and timing. *Genetics* 2003; **164**: 843-54.
- Tannenbaum E, Deeds EJ, Shakhnovich EI. Equilibrium distribution of mutators in the single fitness peak model. *Phys. Rev. Lett.* 2003; **91**: 138105.
- Tennant I, Harding H, Nelson M, Roye-Green K. Microbial isolates from patients in an intensive care unit, and associated risk factors. *West Indian Med J* 2005; **54**: 225-31.

LITERATURVERZEICHNIS

- Townsend JP, Nielsen KM, Fisher DS, Hartl DL. Horizontal acquisition of divergent chromosomal DNA in bacteria: effects of mutator phenotypes. *Genetics* 2003; **164**: 13-21.
- Travis ER, Travis JM. Mutators in space: the dynamics of high-mutability clones in a two-patch model. *Genetics* 2004; **167**: 513-22.
- Travis JM, Travis ER. Mutator dynamics in fluctuating environments. *Proc. Biol. Sci.* 2002; **269**: 591-7.
- Trout L, Gatzky JT, Ballard ST. Acetylcholine-induced liquid secretion by bronchial epithelium: role of Cl⁻ and. *Am. J Physiol* 1998; **275**: L1095-L1099.
- Tsui LC, Durie P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp. Pract. (Minneap.)* 1997; **32**: 115-9, 134.
- Tümmler B, Koopmann U, Grothues D, Weissbrodt H, Steinkamp G, von der HH. Nosocomial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* by cystic fibrosis patients. *J Clin. Microbiol.* 1991; **29**: 1265-7.
- Tümmler B, Storrs T, Dziadek V. Geographic distribution and origin of CFTR mutations in Germany. *Hum. Genet.* 1996; **97**: 727-31.
- Tümmler B, Kiewitz C. Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol. Med Today* 1999; **5**: 351-8.
- Tulchin N, Ornstein L, Davis BJ. A microgel system for disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1976; **72**: 485-490
- Uden G, Achebach S, Holighaus, Tran H-Q, Wackwitz B, Zeuner Y. Control of FNR Funktion of *Escherichia coli* by O₂ and Reducing Conditions. *J. Mol. Microbiol.* 2002; **4**: 263-268
- Vander WC, Pierard A, Kley-Raymann M, Haas D. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol.* 1984; **160**: 928-34.

LITERATURVERZEICHNIS

- Venturi V. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol. Microbiol.* 2003; **49**: 1-9.
- Verhoogt HJ, Smit H, Abee T. *arcD*, the first gene of the *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, encodes an arginine-ornithine exchanger. *J Bacteriol.* 1992; **174**: 1568-73.
- Vijgenboom E, Busch JE, Canters GW. *In vivo* studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that *azu* expression is under control of *rpoS* and ANR. *Microbiology* 1997; **143**: 2853-63.
- Vilain S, Cosette P, Hubert M, Lange C, Junter GA, Jouenne T. Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. *Anal. Biochem.* 2004; **329**: 120-30.
- Vilain S, Cosette P, Hubert M, Lange C, Junter GA, Jouenne T. Proteomic analysis of agar gel-entrapped *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics.* 2004; **4**: 1996-2004.
- Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 2002; **45**: 1177-90.
- von Gotz F, Haussler S, Jordan D. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J Bacteriol.* 2004; **186**: 3837-47.
- Voss T, Haberl P. Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: consequences for comprehensive data analysis. *Electrophoresis* 2000; **21**: 3345-50.
- Votsch W, Templin MF. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in muropeptide recycling and beta-lactamase induction. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 39032-38.

LITERATURVERZEICHNIS

- Watson ME, Jr., Burns JL, Smith AL. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* 2004; **150**: 2947-58.
- Wehmhoner D, Haussler S, Tummeler B. Inter- and intracolonial diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* proteome manifests within the secretome. *J Bacteriol.* 2003; **185**: 5807-14.
- Welsh MJ, Smith AE. Cystic fibrosis. *Sci. Am.* 1995; **273**: 52-9.
- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993; **73**: 1251-4.
- Winteler HV, Schneidinger B, Jaeger KE, Haas D. Anaerobically controlled expression system derived from the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*: application to lipase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; **62**: 3391-8.
- Winteler HV, Haas D. The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. *Microbiology* 1996; **142**: 685-93.
- Wisotzkey JD, Jurtshuk P, Jr., Fox GE. PCR amplification of 16S rDNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematics. *Curr. Microbiol* 1990; **21**: 325-7.
- Wolfgang MC, Jyot J, Goodman AL, Ramphal R, Lory S. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 2004; **101**: 6664-8.
- Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; **109**: 317-25.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with

LITERATURVERZEICHNIS

- the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 1992; **36**: 1251-75.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiol Immunol.* 1995; **39**: 897-904.
- Yamano Y, Nishikawa T, Komatsu Y. Cloning and nucleotide sequence of anaerobically induced porin protein E1 (OprE) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* 1993; **8**: 993-1004.
- Yang H, Wolff E, Kim M, Diep A, Miller JH. Identification of mutator genes and mutational pathways in *Escherichia coli* using a multicopy cloning approach. *Mol. Microbiol.* 2004; **53**: 283-95.
- Ye RW, Haas D, Ka JO. Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol.* 1995; **177**:3606-9.
- Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell* 2002; **3**: 593-603.
- Yorgey P, Rahme LG, Tan MW, Ausubel FM. The roles of *mucD* and alginate in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in plants, nematodes and mice. *Mol. Microbiol* 2001; **41**: 1063-76.
- Zar H, Saiman L, Quittell L, Prince A. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *J Pediatr.* 1995; **126**: 230-3.
- Zhao B, Yeo CC, Poh CL. Proteome investigation of the global regulatory role of sigma54 in response to gentisate induction in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867. *Proteomics.* 2005; **5**: 1868-76.

LITERATURVERZEICHNIS

Zhou XY, Kitzis MD, Gutmann L. Role of cephalosporinase in carbapenem resistance of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1993; **37**: 1387-9.

Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 1991; **10**: 214-28.

Zimmermann A, Reimann C, Galimand M, Haas D. Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1991; **5**: 1483-90.

Zinder SH, Brock TD. Dimethyl sulfoxide as an electron acceptor for anaerobic growth. *Arch. Microbiol.* 1978; **116**: 35-40.

G Anhang

Liste der Transkriptomdaten (Kapitel C.4.2.1):

$$Q_n = \bar{U}_n / T_n^{M1}$$

$$(U_n = \{T_n^{M25}, T_n^{M26}\})$$

Significant Genes List							
Input Parameters							
Imputation Engine		10-Nearest Neighbor Imputer					
Data Type		Two Class, unpaired data					
Data in log scale?		FALSCH					
Number of Permutations		100					
Blocked Permutation?		FALSCH					
RNG Seed		1234567					
(Delta, Fold Change)		(2,25930, 2,00000)					
(Upper Cutoff, Lower Cutoff)		(3,59397, -3,07141)					
Computed Quantities							
Computed Exchangeability Factor S0		0,070719096					
S0 percentile		0					
False Significant Number (Median, 90 percentile)		(0,31017, 7,44407)					
False Discovery Rate (Median, 90 percentile)		(0,03746, 0,89904)					
Pi0Hat		0,31017					
294 Positive Significant Genes							
Row	Gene Name	Gene ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	Fold Change	q-value (%)
609	PA0594_surA_at	PA0594 /GENE=surA /DEF=peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SurA /FUNCTION=Adaptation, protection; Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	20,32300454	163,8283333	8,061226038	4,31323	0,037460084

ANHANG

3816	PA3812_iscA_at	PA3812 /GENE=iscA /DEF=probable iron-binding protein IscA /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	15,03173227	308,8183333	20,54442747	3,33035	0,037460084
4665	PA4669_ipk_at	PA4669 /GENE=ipk /DEF=isopentenyl monophosphate kinase /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	14,83577297	82,49833333	5,560770813	2,97585	0,037460084
1023	PA1008_bcp_at	PA1008 /GENE=bcp /DEF=bacterioferritin comigratory protein /FUNCTION=Adaptation, protection	14,17716382	158,0666667	11,14938564	2,25929	0,037460084
5547	PA5553_atpC_at	PA5553 /GENE=atpC /DEF=ATP synthase epsilon chain /FUNCTION=Energy metabolism	14,14999829	168,745	11,92544314	3,09162	0,037460084
2563	PA2557_at	PA2557 /DEF=probable AMP-binding enzyme /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	13,90250695	52,135	3,750043082	2,13386	0,037460084
567	PA0552_pgk_at	PA0552 /GENE=pgk /DEF=phosphoglycerate kinase /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Energy metabolism	12,9024466	201,3666667	15,60685914	2,70659	0,037460084
1807	PA1793_ppiB_at	PA1793 /GENE=ppiB /DEF=peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	12,30596374	477,3633333	38,7912189	3,19400	0,037460084
2618	PA2612_serS_at	PA2612 /GENE=serS /DEF=seryl-tRNA synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Translation, post-translational modification, degradation	12,1747264	120,74	9,917265988	2,04764	0,037460084
2186	PA2177_at	PA2177 /DEF=probable sensor/response regulator hybrid /FUNCTION=Two-component regulatory systems	12,08477179	23,17166667	1,917426913	2,26806	0,037460084
2120	PA2111_at	PA2111 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	11,47118728	1408,445	122,7811007	10,27056	0,037460084
977	PA0962_at	PA0962 /DEF=probable dna-binding stress protein /FUNCTION=Adaptation, protection	11,44974994	840,495	73,40728002	4,32795	0,037460084
989	PA0974_at	PA0974 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	10,48610688	152,8483333	14,57627078	3,13993	0,037460084
985	PA0970_tolR_at	PA0970 /GENE=tolR /DEF=ToIR protein /FUNCTION=Transport of small molecules	10,16306878	273,6633333	26,92723422	3,52955	0,037460084
5004	PA5009_waaP_at	PA5009 /GENE=waaP /DEF=lipopolysaccharide core biosynthesis protein WaaP /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	10,10807117	65,56166667	6,48607094	2,01321	0,037460084
986	PA0971_tolA_at	PA0971 /GENE=tolA /DEF=ToIA protein /FUNCTION=Transport of small molecules; Membrane proteins	10,04420817	234,9883333	23,39540653	4,27753	0,037460084
2121	PA2112_at	PA2112 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,977094381	1406,891667	141,0121638	9,53092	0,037460084
5429	PA5435_at	PA5435 /DEF=probable transcarboxylase subunit /FUNCTION=Central intermediary metabolism	9,902418923	435,5333333	43,98251949	4,13913	0,037460084
83	PA0068_at	PA0068 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,814257272	114,2583333	11,64207644	2,01995	0,037460084
5143	PA5148_at	PA5148 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,791308844	298,9816667	30,53541375	2,65129	0,037460084
4682	PA4686_at	PA4686 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,779591227	113,5683333	11,6127894	3,32357	0,037460084

ANHANG

3807	PA3803_at	PA3803 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,690234315	186,2283333	19,21814554	2,79751	0,037460084
3168	PA3163_cmk_at	PA3163 /GENE=cmk /DEF=cytidylate kinase /FUNCTION=Nucleotide bio-synthesis and metabolism	9,611813599	68,16166667	7,091446995	4,09123	0,037460084
2620	PA2614_loIA_at	PA2614 /GENE=loIA /DEF=periplasmic chaperone LoIA /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins	9,500040147	228,755	24,07937193	2,87085	0,037460084
3805	PA3801_at	PA3801 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,485726816	276,4666667	29,14554383	2,47880	0,037460084
4737	PA4741_rpsO_at	PA4741 /GENE=rpsO /DEF=30S ribosomal protein S15 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	9,438070638	486,275	51,5227125	2,26331	0,037460084
3073	PA3068_at	PA3068 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,421968323	634,4083333	67,33288752	4,27172	0,037460084
1601	PA1587_lpdG_at	PA1587 /GENE=lpdG /DEF=lipoamide dehydrogenase-glc /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Energy metabolism	9,403767369	174,8516667	18,59378904	3,11864	0,037460084
117	PA0102_at	PA0102 /DEF=probable carbonic anhydrase /FUNCTION=Central intermediary metabolism	9,321921286	317,1666667	34,02374435	2,47705	0,037460084
5159	PA5164_rmIC_at	PA5164 /GENE=rmIC /DEF=dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	9,321865796	197,6766667	21,20569755	2,71629	0,037460084
2715	PA2710_at	PA2710 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	9,318207318	73,17	7,852368755	2,55957	0,037460084
1576	PA1562_acnA_at	PA1562 /GENE=acnA /DEF=aconitate hydratase 1 /FUNCTION=Energy metabolism	9,281659977	70,82666667	7,630818931	2,98784	0,037460084
136	PA0121_at	PA0121 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,270758517	1202,44	129,70244	15,29434	0,037460084
4555	PA4559_lspA_at	PA4559 /GENE=lspA /DEF=prolipoprotein signal peptidase /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus; Translation, post-translational modification, degradation	9,216284518	85,60333333	9,288269385	3,02819	0,037460084
1019	PA1004_nadA_at	PA1004 /GENE=nadA /DEF=quinolinate synthetase A /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	9,130791631	119,6566667	13,10474179	2,43090	0,037460084
1354	PA1339_at	PA1339 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	9,089681933	231,3783333	25,45505278	3,42019	0,037460084
5165	PA5170_arcD_at	PA5170 /GENE=arcD /DEF=arginine/ornithine antiporter /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Membrane proteins; Transport of small molecules	9,059982395	1752,403333	193,4223773	5,32692	0,037460084
2651	PA2645_nuoJ_at	PA2645 /GENE=nuoJ /DEF=NADH dehydrogenase I chain J /FUNCTION=Energy metabolism	9,024124138	114,26	12,6616166	4,25465	0,037460084
1547	PA1533_at	PA1533 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	9,004340567	352,39	39,13556994	3,08137	0,037460084
5556	PA5562_spoOJ_at	PA5562 /GENE=spoOJ /DEF=chromosome partitioning protein Spo0J /FUNCTION=Cell division	8,932450212	158,3116667	17,72320729	2,63062	0,037460084
885	PA0870_phhC_at	PA0870 /GENE=phhC /DEF=aromatic amino acid aminotransferase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	8,820120479	631,5233333	71,60030691	4,36998	0,037460084

ANHANG

497	PA0482_glcB_at	PA0482 /GENE=glcB /DEF=malate synthase G /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Central intermediary metabolism	8,804871663	856,5816667	97,28496899	4,77088	0,037460084
3813	PA3809_fdx2_at	PA3809 /GENE=fdx2 /DEF=ferredoxin [2Fe-2S] /FUNCTION=Energy metabolism	8,701298147	200,53	23,04598654	2,52498	0,037460084
4534	PA4538_ndh_at	PA4538 /GENE=ndh /DEF=NADH dehydrogenase /FUNCTION=Energy metabolism	8,639635087	83,22666667	9,633122908	2,57865	0,037460084
2649	PA2643_nuoH_at	PA2643 /GENE=nuoH /DEF=NADH dehydrogenase I chain H /FUNCTION=Energy metabolism	8,594055443	267,0733333	31,0765197	4,24341	0,037460084
5333	PA5339_at	PA5339 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	8,526415433	654,2416667	76,7311506	4,38576	0,037460084
3842	PA3838_at	PA3838 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	8,462554785	126,5133333	14,94978013	3,06440	0,037460084
4824	PA4829_lpd3_at	PA4829 /GENE=lpd3 /DEF=dihydrolipoamide dehydrogenase 3 /FUNCTION=Energy metabolism	8,447335536	96,59166667	11,43457203	2,29589	0,037460084
2208	PA2199_at	PA2199 /DEF=probable dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	8,428054572	108,5216667	12,87624157	5,91716	0,037460084
3172	PA3167_serC_at	PA3167 /GENE=serC /DEF=3-phosphoserine aminotransferase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	8,373620136	103,595	12,37159058	2,97801	0,037460084
1979	PA1969_at	PA1969 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	8,360115669	138,0383333	16,51153391	4,50707	0,037460084
678	PA0663_at	PA0663 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	8,302156317	43,41833333	5,229765819	2,50288	0,037460084
1823	PA1809_at	PA1809 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	8,274025669	38,17166667	4,613433435	2,32326	0,037460084
2647	PA2641_nuoF_at	PA2641 /GENE=nuoF /DEF=NADH dehydrogenase I chain F /FUNCTION=Energy metabolism	8,21088019	158,4816667	19,30142238	3,76872	0,037460084
3051	PA3046_at	PA3046 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	8,20995923	152	18,51409925	2,65842	0,037460084
2206	PA2197_at	PA2197 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	8,208968578	140,2616667	17,08639342	10,30529	0,037460084
4556	PA4560_ileS_at	PA4560 /GENE=ileS /DEF=isoleucyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Translation, post-translational modification, degradation	8,153860267	141,945	17,40831893	2,77817	0,037460084
915	PA0900_at	PA0900 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	8,132743301	455,4933333	56,00734174	3,44206	0,037460084
3171	PA3166_pheA_at	PA3166 /GENE=pheA /DEF=chorismate mutase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	8,104534885	94,74666667	11,69057423	2,51611	0,037460084
4691	PA4695_ilvH_at	PA4695 /GENE=ilvH /DEF=acetolactate synthase isozyme III small subunit /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	8,103884503	333,475	41,15001884	4,74131	0,037460084
3944	PA3940_at	PA3940 /DEF=probable DNA binding protein /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	8,055629136	308,7233333	38,32392581	4,09870	0,037460084
3207	PA3202_at	PA3202 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical,	7,996988568	183,1616667	22,90383	2,59165	0,037460084

ANHANG

		unclassified, unknown					
3974	PA3970_amn_at	PA3970 /GENE=amn /DEF=AMP nucleosidase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	7,90526728	73,40333333	9,285370214	2,52352	0,037460084
1822	PA1808_at	PA1808 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	7,878363525	29,49833333	3,744220896	2,01976	0,037460084
319	PA0304_potI_at	PA0304 /GENE=potI /DEF=polyamine transport protein PotI /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	7,850399024	33,72833333	4,296384583	2,07518	0,037460084
3806	PA3802_hisS_at	PA3802 /GENE=hisS /DEF=histidyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	7,770333673	124,53	16,0263388	3,16687	0,037460084
330	PA0315_at	PA0315 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,727730208	309,465	40,0460409	2,77344	0,037460084
1832	PA1818_at	PA1818 /DEF=probable Orn/Arg/Lys decarboxylase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	7,721788251	149,605	19,37439815	3,84258	0,037460084
2119	PA2110_at	PA2110 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,655076104	491,9333333	64,26237005	6,12644	0,037460084
2581	PA2575_at	PA2575 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,641423985	147,7683333	19,3378006	4,14222	0,037460084
5005	PA5010_waaG_at	PA5010 /GENE=waaG /DEF=UDP-glucose:(heptosyl) LPS alpha 1,3-glucosyltransferase WaaG /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	7,63084488	96,24833333	12,6130638	2,31355	0,037460084
3535	PA3531_bfrB_at	PA3531 /GENE=bfrB /DEF=bacterioferritin /FUNCTION=Transport of small molecules; Adaptation, protection	7,575246791	245,41	32,39630427	6,61536	0,037460084
1594	PA1580_gltA_at	PA1580 /GENE=gltA /DEF=citrate synthase /FUNCTION=Energy metabolism	7,563362235	1156,16	152,8632325	5,65424	0,037460084
4003	PA4000_at	PA4000 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,546922727	114,6766667	15,1951558	2,08209	0,037460084
3625	PA3621_fdxA_at	PA3621 /GENE=fdxA /DEF=ferredoxin I /FUNCTION=Energy metabolism	7,510015134	130,015	17,31221545	3,29101	0,037460084
886	PA0871_phhB_at	PA0871 /GENE=phhB /DEF=pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	7,476260592	934,9583333	125,0569482	5,59718	0,037460084
1820	PA1806_fabI_at	PA1806 /GENE=fabI /DEF=NADH-dependent enoyl-ACP reductase /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	7,461270608	90,91166667	12,1844752	3,08354	0,037460084
3210	PA3205_at	PA3205 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,45053373	283,1733333	38,00712051	3,99369	0,037460084
987	PA0972_tolB_at	PA0972 /GENE=tolB /DEF=TolB protein /FUNCTION=Transport of small molecules	7,393334806	445,2616667	60,22474003	3,82276	0,037460084
4460	PA4464_ptsN_at	PA4464 /GENE=ptsN /DEF=nitrogen regulatory IIA protein /FUNCTION=Transport of small molecules	7,345689526	285,57	38,87586032	2,06974	0,037460084
5423	PA5429_aspA_at	PA5429 /GENE=aspA /DEF=aspartate ammonia-lyase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	7,342369482	267,2583333	36,39946668	3,10561	0,037460084
4660	PA4664_hemK_at	PA4664 /GENE=hemK /DEF=probable methyl transferase /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	7,291019022	108,455	14,87514978	2,79939	0,037460084
2711	PA2706_at	PA2706 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,277989768	116,9366667	16,06716558	2,06668	0,037460084

ANHANG

608	PA0593_pdxA_at	PA0593 /GENE=pdxA /DEF=pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxA /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	7,226604083	52,925	7,323633534	2,35612	0,037460084
2207	PA2198_at	PA2198 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,206040144	116,5983333	16,18063888	7,66784	0,037460084
154	PA0139_ahpC_at	PA0139 /GENE=ahpC /DEF=alkyl hydroperoxide reductase subunit C /FUNCTION=Adaptation, protection	7,182462288	990,9133333	137,962901	2,00924	0,037460084
1544	PA1530_at	PA1530 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,124071131	62,235	8,735875718	2,48793	0,037460084
3985	PA3981_at	PA3981 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,072133583	88,86333333	12,56527925	2,10134	0,037460084
1809	PA1795_cysS_at	PA1795 /GENE=cysS /DEF=cysteinyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Translation, post-translational modification, degradation	7,020237792	92,31666667	13,15007688	3,61767	0,037460084
2650	PA2644_nuoI_at	PA2644 /GENE=nuoI /DEF=NADH Dehydrogenase I chain I /FUNCTION=Energy metabolism	7,017948015	167,3383333	23,84433925	3,54791	0,037460084
1789	PA1775_at	PA1775 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	7,014074088	93,62	13,34744955	2,68888	0,037460084
438	PA0423_at	PA0423 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	7,008140414	164,9016667	23,53001751	3,04373	0,037460084
2652	PA2646_nuoK_at	PA2646 /GENE=nuoK /DEF=NADH dehydrogenase I chain K /FUNCTION=Energy metabolism	6,958667302	207,1433333	29,76767308	4,80522	0,037460084
1817	PA1803_lon_at	PA1803 /GENE=lon /DEF=Lon protease /FUNCTION=Adaptation, protection; Translation, post-translational modification, degradation	6,88030496	351,725	51,12055382	3,59002	0,037460084
5013	PA5018_msrA_at	PA5018 /GENE=msrA /DEF=peptide methionine sulfoxide reductase /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	6,864479432	149,2633333	21,74430484	2,38365	0,037460084
1372	PA1357_at	PA1357 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	6,819230336	37,885	5,55561231	2,25752	0,037460084
135	PA0120_at	PA0120 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	6,802143026	1351,7	198,716786	13,86721	0,037460084
4002	PA3999_dacC_at	PA3999 /GENE=dacC /DEF=D-ala-D-ala-carboxypeptidase /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	6,774106226	288,0583333	42,52344497	2,29715	0,037460084
4572	PA4576_at	PA4576 /DEF=probable ATP-dependent protease /FUNCTION=Putative enzymes	6,743872786	65,39333333	9,696703275	2,28617	0,037460084
3836	PA3832_holC_at	PA3832 /GENE=holC /DEF=DNA polymerase III, chi subunit /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	6,742883205	33,20833333	4,924945654	2,72990	0,037460084
5003	PA5008_at	PA5008 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes; Hypothetical, unclassified, unknown	6,738282069	83,81666667	12,43887771	2,24517	0,037460084
3820	PA3816_cysE_at	PA3816 /GENE=cysE /DEF=O-acetylserine synthase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	6,702548091	81,00166667	12,08520485	2,66888	0,037460084
3464	PA3460_at	PA3460 /DEF=probable acetyltransferase /FUNCTION=Putative enzymes	6,661004921	248,265	37,27140318	3,34759	0,037460084
2189	PA2180_at	PA2180 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified,	6,65761947	15,97833333	2,400007	2,20926	0,037460084

ANHANG

		unknown					
1028	PA1013_purC_at	PA1013 /GENE=purC /DEF=phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	6,655258225	146,7816667	22,05499196	4,26859	0,037460084
5255	PA5260_hemC_at	PA5260 /GENE=hemC /DEF=porphobilinogen deaminase /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	6,610545673	86,55333333	13,09322068	2,26917	0,037460084
2646	PA2640_nuoE_at	PA2640 /GENE=nuoE /DEF=NADH dehydrogenase I chain E /FUNCTION=Energy metabolism	6,586802762	285,0233333	43,27187919	2,65014	0,037460084
918	PA0903_alaS_at	PA0903 /GENE=alaS /DEF=alanyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Transcription, RNA processing and degradation	6,519547596	65,23333333	10,00580675	2,19958	0,037460084
19	PA0004_gyrB_at	PA0004 /GENE=gyrB /DEF=DNA gyrase subunit B /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	6,481862019	128,44	19,81529376	3,26326	0,037460084
913	PA0898_aruD_at	PA0898 /GENE=aruD /DEF=succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	6,40488123	89,48	13,97059474	2,31389	0,037460084
887	PA0872_phhA_at	PA0872 /GENE=phhA /DEF=phenylalanine-4-hydroxylase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	6,356491168	1260,27	198,2650438	14,68322	0,037460084
2174	PA2165_at	PA2165 /DEF=probable glycogen synthase /FUNCTION=Energy metabolism	6,342654161	29,38	4,632130218	2,54469	0,037460084
2118	PA2109_at	PA2109 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	6,32502714	154,8883333	24,48816897	2,06506	0,037460084
2654	PA2648_nuoM_at	PA2648 /GENE=nuoM /DEF=NADH dehydrogenase I chain M /FUNCTION=Energy metabolism	6,273226483	101,11	16,11770279	3,87817	0,037460084
1390	PA1375_pdxB_at	PA1375 /GENE=pdxB /DEF=erythronate-4-phosphate dehydrogenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers; Carbon compound catabolism	6,173691288	45,385	7,351355596	2,11038	0,037460084
1357	PA1342_at	PA1342 /DEF=probable binding protein component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	6,126970152	479,575	78,27278216	2,16102	0,037460084
1603	PA1589_sucD_at	PA1589 /GENE=sucD /DEF=succinyl-CoA synthetase alpha chain /FUNCTION=Energy metabolism	6,112454904	1091,44	178,5600086	2,23698	0,037460084
517	PA0502_at	PA0502 /DEF=probable biotin biosynthesis protein bioH /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	5,996021845	68,91166667	11,49289787	2,54418	0,037460084
4239	PA4242_rpmJ_at	PA4242 /GENE=rpmJ /DEF=50S ribosomal protein L36 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	5,908842918	1253,556667	212,1492624	2,10786	0,037460084
919	PA0904_lysC_at	PA0904 /GENE=lysC /DEF=aspartate kinase alpha and beta chain /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	5,891469927	126,73	21,51076074	3,16966	0,037460084
4001	PA3998_at	PA3998 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,86468149	139,02	23,70461213	2,46198	0,037460084
4999	PA5004_at	PA5004 /DEF=probable glycosyl transferase /FUNCTION=Putative enzymes	5,857159857	80,88333333	13,80930951	2,31732	0,037460084
902	PA0887_acsA_at	PA0887 /GENE=acsA /DEF=acetyl-coenzyme A synthetase /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Central intermediary metabo-	5,815398682	919,0066667	158,0298647	4,87756	0,037460084

ANHANG

		lism					
2673	PA2667_at	PA2667 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Transcriptional regulators	5,804661478	409,5433333	70,5542149	2,07449	0,037460084
1214	PA1199_at	PA1199 /DEF=probable lipoprotein /FUNCTION=Membrane proteins	5,769087464	166,2	28,8087156	2,04395	0,037460084
1352	PA1337_ansB_at	PA1337 /GENE=ansB /DEF=glutaminase-asparaginase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	5,742385359	266,0316667	46,32772795	2,46908	0,037460084
1598	PA1584_sdhB_at	PA1584 /GENE=sdhB /DEF=succinate dehydrogenase (B subunit) /FUNCTION=Energy metabolism	5,730960884	438,9933333	76,6003018	3,18444	0,037460084
1353	PA1338_ggt_at	PA1338 /GENE=ggt /DEF=gamma-glutamyltranspeptidase precursor /FUNCTION=Adaptation, protection; Amino acid biosynthesis and metabolism; Central intermediary metabolism	5,730940124	99,24	17,3165306	2,17918	0,037460084
2028	PA2018_at	PA2018 /DEF=RND multidrug efflux transporter /FUNCTION=Antibiotic resistance and susceptibility; Membrane proteins; Transport of small molecules	5,714543409	92,39833333	16,16897917	3,59473	0,037460084
3000	PA2995_nqrE_at	PA2995 /GENE=nqrE /DEF=Na+-translocating NADH:quinone oxidoreductase subunit Nqr5 /FUNCTION=Energy metabolism	5,668558711	78,98166667	13,93328899	2,09737	0,037460084
1600	PA1586_sucB_at	PA1586 /GENE=sucB /DEF=dihydrolipoamide succinyltransferase (E2 subunit) /FUNCTION=Energy metabolism	5,665628448	316,72	55,90200679	2,88147	0,037460084
63	PA0048_at	PA0048 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	5,657710704	88,48166667	15,63912885	2,99074	0,037460084
2622	PA2616_trxB1_at	PA2616 /GENE=trxB1 /DEF=thioredoxin reductase 1 /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	5,652407837	215,4066667	38,10883306	2,17614	0,037460084
306	PA0291_oprE_at	PA0291 /GENE=oprE /DEF=outer membrane porin OprE precursor /FUNCTION=Membrane proteins	5,649353078	92,31	16,33992401	2,15769	0,037460084
4739	PA4743_rbfA_at	PA4743 /GENE=rbfA /DEF=ribosome-binding factor A /FUNCTION=Adaptation, protection; Translation, post-translational modification, degradation	5,641660838	161,7516667	28,67093065	2,79957	0,037460084
3804	PA3800_at	PA3800 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,64093727	57,28	10,15434089	2,26679	0,037460084
17	PA0002_dnaN_at	PA0002 /GENE=dnaN /DEF=DNA polymerase III, beta chain /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	5,623551026	180,69	32,13094345	2,16522	0,037460084
5158	PA5163_rmlA_at	PA5163 /GENE=rmlA /DEF=glucose-1-phosphate thymidyltransferase /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	5,621762434	131,5733333	23,40428556	2,02961	0,037460084
880	PA0865_hpd_at	PA0865 /GENE=hpd /DEF=4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	5,591376773	920,52	164,6320821	7,17965	0,037460084
2648	PA2642_nuoG_at	PA2642 /GENE=nuoG /DEF=NADH dehydrogenase I chain G /FUNCTION=Energy metabolism	5,562031197	245,3966667	44,11997308	3,75592	0,037460084
1588	PA1574_at	PA1574 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,549085713	187,465	33,78304277	6,18432	0,037460084
3475	PA3471_at	PA3471 /DEF=probable malic enzyme /FUNCTION=Central intermediary metabolism	5,473389881	306,4016667	55,98023772	3,29646	0,037460084

ANHANG

4461	PA4465_at	PA4465 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,46123911	140,3933333	25,70723063	2,26858	0,037460084
2770	PA2765_at	PA2765 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,454969219	52,88	9,693913546	2,13024	0,037460084
5064	PA5069_tatB_at	PA5069 /GENE=tatB /DEF=translocation protein TatB /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	5,450649637	71,25833333	13,07336521	2,42232	0,037460084
4247	PA4250_rpsN_at	PA4250 /GENE=rpsN /DEF=30S ribosomal protein S14 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	5,394493316	1453,285	269,4015758	3,85922	0,037460084
2122	PA2113_at	PA2113 /DEF=probable porin /FUNCTION=Transport of small molecules	5,393442492	834,9566667	154,8095985	6,01717	0,037460084
2655	PA2649_nuoN_at	PA2649 /GENE=nuoN /DEF=NADH dehydrogenase I chain N /FUNCTION=Energy metabolism	5,374832629	74,50833333	13,86244716	3,65532	0,037460084
5522	PA5528_at	PA5528 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	5,359517368	307,6566667	57,40380067	3,11788	0,037460084
1026	PA1011_at	PA1011 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,329679605	161,315	30,26729784	2,47427	0,037460084
1355	PA1340_at	PA1340 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=	5,312316789	83,28333333	15,67740341	3,62475	0,037460084
2019	PA2009_hmgA_at	PA2009 /GENE=hmgA /DEF=homogentisate 1,2-dioxygenase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	5,275406044	459,0833333	87,02331716	4,94978	0,037460084
1780	PA1766_at	PA1766 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,249599715	48,545	9,24737173	2,14619	0,037460084
5044	PA5049_rpmE_at	PA5049 /GENE=rpmE /DEF=50S ribosomal protein L31 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	5,235683081	383,535	73,25405187	8,92755	0,037460084
2746	PA2741_rplT_at	PA2741 /GENE=rplT /DEF=50S ribosomal protein L20 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	5,234629126	553,98	105,8298471	3,42025	0,037460084
3815	PA3811_hscB_at	PA3811 /GENE=hscB /DEF=heat shock protein HscB /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins	5,220380478	45,86833333	8,786396609	2,74007	0,037460084
4690	PA4694_ilvC_at	PA4694 /GENE=ilvC /DEF=ketol-acid reductoisomerase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	5,220177098	406,17	77,80770505	4,56592	0,037460084
3817	PA3813_iscU_at	PA3813 /GENE=iscU /DEF=probable iron-binding protein IscU /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	5,204617958	208,415	40,04424565	6,05004	0,037460084
980	PA0965_ruvC_at	PA0965 /GENE=ruvC /DEF=Holliday junction resolvase RuvC /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	5,159147486	45,69666667	8,857406537	2,30215	0,037460084
134	PA0119_at	PA0119 /DEF=probable dicarboxylate transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	5,151218569	572,7566667	111,1885778	14,05577	0,037460084
910	PA0895_aruC_at	PA0895 /GENE=aruC /DEF=N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	5,132921794	165,8883333	32,31850006	4,51309	0,037460084
1546	PA1532_dnaX_at	PA1532 /GENE=dnaX /DEF=DNA polymerase subunits gamma and tau /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	5,127822899	45,65166667	8,902738562	2,84850	0,037460084
5114	PA5119_glnA_at	PA5119 /GENE=glnA /DEF=glutamine synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	5,114860391	252,9566667	49,45524361	2,41773	0,037460084

ANHANG

2972	PA2967_fabG_at	PA2967 /GENE=fabG /DEF=3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	5,109518804	296,5583333	58,04036441	5,56314	0,037460084
591	PA0576_rpoD_at	PA0576 /GENE=rpoD /DEF=sigma factor RpoD /FUNCTION=Transcriptional regulators	5,109462838	407,495	79,75300201	3,84411	0,037460084
516	PA0501_bioF_at	PA0501 /GENE=bioF /DEF=8-amino-7-oxononanoate synthase /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	5,106501235	70,175	13,74228591	2,51982	0,037460084
5315	PA5321_dut_at	PA5321 /GENE=dut /DEF=deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	5,101873276	54,02	10,5882677	2,18352	0,037460084
2621	PA2615_ftsK_at	PA2615 /GENE=ftsK /DEF=cell division protein FtsK /FUNCTION=Cell division	5,097257843	129,575	25,4205308	2,34647	0,037460084
2636	PA2630_at	PA2630 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,086643125	42,84666667	8,423367948	2,27381	0,037460084
2460	PA2453_at	PA2453 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,048397105	30,96333333	6,133299876	2,26622	0,037460084
2018	PA2008_fahA_at	PA2008 /GENE=fahA /DEF=fumarylacetoacetase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	5,041022531	835,745	165,7887849	4,69303	0,037460084
4710	PA4714_at	PA4714 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,030311985	111	22,06622578	2,79157	0,037460084
2653	PA2647_nuoL_at	PA2647 /GENE=nuoL /DEF=NADH dehydrogenase I chain L /FUNCTION=Energy metabolism	5,009290394	93,06666667	18,57881243	4,12269	0,037460084
5334	PA5340_at	PA5340 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,934548782	143,2783333	29,03575173	2,16452	0,037460084
4069	PA4067_oprG_at	PA4067 /GENE=oprG /DEF=outer membrane protein OprG precursor /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,915556747	596,94	121,4389398	2,90836	0,037460084
2179	PA2170_at	PA2170 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,907807776	24,33666667	4,958765253	2,51442	0,037460084
912	PA0897_aruG_at	PA0897 /GENE=aruG /DEF=arginine/ornithine succinyltransferase All subunit /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	4,862541012	126,2966667	25,97338847	3,08755	0,037460084
4937	PA4942_hflK_at	PA4942 /GENE=hflK /DEF=protease subunit HflK /FUNCTION=Cell division; Translation, post-translational modification, degradation	4,858569066	185,2616667	38,13091141	2,51622	0,037460084
988	PA0973_oprL_at	PA0973 /GENE=oprL /DEF=outer membrane protein OprL precursor /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,850999563	503,4016667	103,772771	2,38996	0,037460084
3283	PA3278_at	PA3278 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,819890752	212,815	44,15349039	5,09365	0,037460084
3923	PA3919_at	PA3919 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,787911464	191,335	39,96210068	3,04563	0,037460084
1815	PA1801_clpP_at	PA1801 /GENE=clpP /DEF=ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins	4,786653019	445,5283333	93,07721524	2,93950	0,037460084
5709	ig_1117390_1118158_at	Intergenic region between PA1112 and PA1113, 1117390-1118158, (+) strand	4,777077477	57,13833333	11,96093922	2,36597	0,037460084
979	PA0964_at	PA0964 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,761651629	338,1966667	71,02507555	2,92961	0,037460084

ANHANG

3767	PA3763_purL_at	PA3763 /GENE=purL /DEF=phosphoribosylformylglycinamide synthase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	4,755926025	60,77333333	12,77844378	2,01340	0,037460084
2971	PA2966_acpP_at	PA2966 /GENE=acpP /DEF=acyl carrier protein /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	4,723967557	1178,35	249,4407478	3,63839	0,037460084
3824	PA3820_secF_at	PA3820 /GENE=secF /DEF=secretion protein SecF /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	4,668886281	231,7566667	49,6385332	6,58450	0,037460084
2185	PA2176_at	PA2176 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,66229129	23,79666667	5,104071193	2,45427	0,037460084
1208	PA1193_at	PA1193 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,642464167	31,71	6,830424288	2,02921	0,037460084
3239	PA3234_at	PA3234 /DEF=probable sodium:solute symporter /FUNCTION=Membrane proteins: Transport of small molecules	4,636021819	246,2816667	53,12349171	2,73320	0,037460084
1243	PA1228_at	PA1228 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,622041924	86,105	18,62921224	2,48133	0,037460084
914	PA0899_aruB_at	PA0899 /GENE=aruB /DEF=succinylarginine dihydrolase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	4,600185041	133,3366667	28,98506592	4,26326	0,037460084
2173	PA2164_at	PA2164 /DEF=probable glycosyl hydrolase /FUNCTION=Putative enzymes	4,593828696	27,80666667	6,053048233	2,44952	0,037460084
3691	PA3687_ppc_at	PA3687 /GENE=ppc /DEF=phosphoenolpyruvate carboxylase /FUNCTION=Central intermediary metabolism: Energy metabolism	4,589206863	162,4216667	35,39209966	2,18593	0,037460084
4234	PA4237_rplQ_at	PA4237 /GENE=rplQ /DEF=50S ribosomal protein L17 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	4,580658916	638,1683333	139,3180206	6,39966	0,037460084
2169	PA2160_at	PA2160 /DEF=probable glycosyl hydrolase /FUNCTION=Putative enzymes	4,562474055	34,10833333	7,475841599	2,98497	0,037460084
1585	PA1571_at	PA1571 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,538862527	290,6666667	64,03953963	2,43698	0,037460084
4930	PA4935_rpsF_at	PA4935 /GENE=rpsF /DEF=30S ribosomal protein S6 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	4,527091791	1083,903333	239,4259678	6,56295	0,037460084
2801	PA2796_tal_at	PA2796 /GENE=tal /DEF=transaldolase /FUNCTION=Carbon compound catabolism: Energy metabolism	4,523934757	126,5166667	27,96606791	2,83926	0,037460084
3837	PA3833_at	PA3833 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,508685667	47,61666667	10,561097	2,23690	0,037460084
515	PA0500_bioB_at	PA0500 /GENE=bioB /DEF=biotin synthase /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	4,50327129	183,3833333	40,72224867	3,10222	0,037460084
2029	PA2019_at	PA2019 /DEF=RND multidrug efflux membrane fusion protein precursor /FUNCTION=Antibiotic resistance and susceptibility: Transport of small molecules	4,501579377	183,9033333	40,85306909	5,20607	0,037460084
317	PA0302_potG_at	PA0302 /GENE=potG /DEF=polyamine transport protein PotG /FUNCTION=Transport of small molecules	4,444528516	70,66	15,89819927	2,14435	0,037460084
4229	PA4232_ssb_at	PA4232 /GENE=ssb /DEF=single-stranded DNA-binding protein /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	4,444144175	190,14	42,78439054	3,31624	0,037460084
5613	Pae_AF241171cgs21_at	AF241171 /GENE= /PROD= /FEATURE=cgs21 /DEFINITION=No significant similarity	4,437749894	31,77166667	7,159409031	3,59008	0,037460084

ANHANG

1529	PA1515_alc_at	PA1515 /GENE=alc /DEF=allantoicase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	4,419969794	63,61166667	14,39187814	2,13376	0,037460084
5218	PA5223_ubiH_at	PA5223 /GENE=ubiH /DEF=ubiH protein /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers; Energy metabolism	4,376972891	88,63833333	20,25105833	2,00748	0,037460084
1599	PA1585_sucA_at	PA1585 /GENE=sucA /DEF=2-oxoglutarate dehydrogenase (E1 subunit) /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Energy metabolism	4,360848804	131,4683333	30,14741837	3,43130	0,037460084
4262	PA4265_tufA_s_at	PA4265 /GENE=tufA /DEF=elongation factor Tu /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	4,339055113	642,0183333	147,9627054	3,46456	0,037460084
2714	PA2709_cysK_at	PA2709 /GENE=cysK /DEF=cysteine synthase A /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	4,262687798	289,0566667	67,81089312	2,70713	0,037460084
5455	PA5461_at	PA5461 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,243218857	321,5516667	75,78012765	5,00222	0,037460084
1784	PA1770_ppsA_at	PA1770 /GENE=ppsA /DEF=phosphoenolpyruvate synthase /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Central intermediary metabolism; Energy metabolism	4,2289769	82,495	19,5070822	2,36808	0,037460084
137	PA0122_at	PA0122 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,227343861	350,33	82,87236892	3,98035	0,037460084
3835	PA3831_pepA_at	PA3831 /GENE=pepA /DEF=leucine aminopeptidase /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate); Transcription, RNA processing and degradation	4,213350206	108,125	25,66247635	3,75735	0,037460084
4249	PA4252_rplX_at	PA4252 /GENE=rplX /DEF=50S ribosomal protein L24 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	4,203666793	2043,026667	486,010611	7,83843	0,037460084
2644	PA2638_nuoB_at	PA2638 /GENE=nuoB /DEF=NADH dehydrogenase I chain B /FUNCTION=Energy metabolism	4,198351548	101,5933333	24,19838648	2,94412	0,037460084
1522	PA1507_at	PA1507 /DEF=probable transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,197175502	54,54666667	12,99604142	2,40996	0,037460084
1303	PA1288_at	PA1288 /DEF=probable outer membrane protein /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,192874153	629,95	150,2430021	2,03104	0,037460084
4693	PA4697_at	PA4697 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,192781663	70,28	16,76214161	2,16306	0,037460084
4667	PA4671_at	PA4671 /DEF=probable ribosomal protein L25 /FUNCTION=Adaptation, protection; Translation, post-translational modification, degradation	4,190055754	1843,223333	439,9042498	4,13026	0,037460084
3774	PA3770_guaB_at	PA3770 /GENE=guaB /DEF=inosine-5'-monophosphate dehydrogenase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	4,182012841	176,2783333	42,15155238	3,99555	0,037460084
4268	PA4271_rplL_at	PA4271 /GENE=rplL /DEF=50S ribosomal protein L7 / L12 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	4,172811547	1588,078333	380,5775351	10,66376	0,037460084
3783	PA3779_at	PA3779 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,165862715	50,91833333	12,22275836	2,23120	0,037460084
970	PA0955_at	PA0955 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,156434124	83,65666667	20,12702816	2,06172	0,037460084

ANHANG

3773	PA3769_guaA_at	PA3769 /GENE=guaA /DEF=GMP synthase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Nucleotide biosynthesis and metabolism	4,153673582	331,9416667	79,9152028	4,41469	0,037460084
1610	PA1596_htpG_at	PA1596 /GENE=htpG /DEF=heat shock protein HtpG /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins	4,148936933	598,8933333	144,348623	2,91636	0,037460084
3579	PA3575_at	PA3575 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,146947307	171,305	41,30869947	2,85368	0,037460084
4929	PA4934_rpsR_at	PA4934 /GENE=rpsR /DEF=30S ribosomal protein S18 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	4,127530365	1169,068333	283,2367614	5,26974	0,037460084
2125	PA2116_at	PA2116 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,121101938	355,8633333	86,35149983	6,86556	0,037460084
3463	PA3459_at	PA3459 /DEF=probable glutamine amidotransferase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	4,114609973	149,9083333	36,43318183	2,14065	0,037460084
2181	PA2172_at	PA2172 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,099241817	17,65333333	4,306487424	2,40926	0,037460084
1566	PA1552_at	PA1552 /DEF=probable cytochrome c /FUNCTION=Energy metabolism	4,09016721	447,0083333	109,288523	6,90864	0,037460084
2956	PA2951_etfA_at	PA2951 /GENE=etfA /DEF=electron transfer flavoprotein alpha-subunit /FUNCTION=Energy metabolism	4,068575947	660,6	162,3663927	2,43426	0,037460084
5046	PA5051_argS_at	PA5051 /GENE=argS /DEF=arginyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	4,049227828	116,3433333	28,73222705	2,38487	0,037460084
2488	PA2482_at	PA2482 /DEF=probable cytochrome c /FUNCTION=Energy metabolism	4,047344056	52,58333333	12,99205914	2,73925	0,037460084
1819	PA1805_ppiD_at	PA1805 /GENE=ppiD /DEF=peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	4,046190732	127,8783333	31,60462317	2,10919	0,037460084
4697	PA4701_at	PA4701 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,034219305	86,15833333	21,35687895	2,21321	0,037460084
2999	PA2994_nqrF_at	PA2994 /GENE=nqrF /DEF=Na+-translocating NADH:quinone oxidoreductase, subunit Nqr6 /FUNCTION=Energy metabolism	4,022877352	47,76666667	11,87375664	2,52560	0,037460084
2172	PA2163_at	PA2163 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,014426301	31,025	7,728377027	2,39188	0,037460084
4740	PA4744_infB_at	PA4744 /GENE=infB /DEF=translation initiation factor IF-2 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	4,009525334	228,5083333	56,99136788	2,99664	0,037460084
1527	PA1513_at	PA1513 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,00184028	99,46166667	24,8539821	3,96223	0,037460084
4933	PA4938_purA_at	PA4938 /GENE=purA /DEF=adenylosuccinate synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Nucleotide biosynthesis and metabolism	4,001798556	171,9283333	42,9627656	2,03116	0,037460084
4568	PA4572_fkIB_at	PA4572 /GENE=fkIB /DEF=peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkIB /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	3,995322997	81,42	20,37882796	2,16021	0,037460084
2629	PA2623_icd_at	PA2623 /GENE=icd /DEF=isocitrate dehydrogenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Carbon compound catabolism; Energy metabolism	3,977879935	831,5233333	209,0368103	2,33201	0,037460084

ANHANG

3746	PA3742_rplS_at	PA3742 /GENE=rplS /DEF=50S ribosomal protein L19 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	3,958886556	747,7083333	188,8683403	6,46105	0,037460084
2955	PA2950_at	PA2950 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,949236936	258,3983333	65,42993939	3,64725	0,037460084
3018	PA3013_foaB_at	PA3013 /GENE=foaB /DEF=fatty-acid oxidation complex beta-subunit /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Fatty acid and phospholipid metabolism	3,928108176	117,9816667	30,03523869	2,14958	0,037460084
958	PA0943_at	PA0943 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,922516103	229,0316667	58,38896786	3,88865	0,037460084
2835	PA2830_htpX_at	PA2830 /GENE=htpX /DEF=heat shock protein HtpX /FUNCTION=Adaptation, protection	3,920254876	137,14	34,98241934	3,18341	0,037460084
4526	PA4530_at	PA4530 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,920059085	43,22833333	11,02746984	2,18575	0,037460084
1044	PA1029_at	PA1029 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,90819399	97,59166667	24,97103954	2,20941	0,037460084
2030	PA2020_at	PA2020 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	3,891615622	367,425	94,41451462	5,74750	0,037460084
581	PA0566_at	PA0566 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,888868341	49,35	12,69006705	2,08358	0,037460084
978	PA0963_aspS_at	PA0963 /GENE=aspS /DEF=aspartyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Transcription, RNA processing and degradation	3,886512293	153,4466667	39,48184262	3,45057	0,037460084
4696	PA4700_mrcB_at	PA4700 /GENE=mrcB /DEF=penicillin-binding protein 1B /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	3,879894179	55,39333333	14,27702169	2,05921	0,037460084
4235	PA4238_rpoA_at	PA4238 /GENE=rpoA /DEF=DNA-directed RNA polymerase alpha chain /FUNCTION=Transcription, RNA processing and degradation	3,874247049	1570,355	405,3316632	4,37861	0,037460084
984	PA0969_tolQ_at	PA0969 /GENE=tolQ /DEF=TolQ protein /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	3,855863282	147,555	38,26769499	4,94638	0,037460084
3173	PA3168_gyrA_at	PA3168 /GENE=gyrA /DEF=DNA gyrase subunit A /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	3,853078613	76,68333333	19,90183462	2,42844	0,037460084
23	PA0008_glyS_at	PA0008 /GENE=glyS /DEF=glycyl-tRNA synthetase beta chain /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Translation, post-translational modification, degradation	3,835777479	80,82833333	21,07221646	2,13539	0,037460084
64	PA0049_at	PA0049 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,827170687	302,01	78,91208016	10,31076	0,037460084
5489	PA5495_thrB_at	PA5495 /GENE=thrB /DEF=homoserine kinase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	3,80529806	219,6633333	57,72565772	2,69080	0,037460084
3814	PA3810_hscA_at	PA3810 /GENE=hscA /DEF=heat shock protein HscA /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins	3,782418558	38,755	10,24608975	2,37836	0,037460084
3113	PA3108_purF_at	PA3108 /GENE=purF /DEF=amidophosphoribosyltransferase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Nucleotide bio-synthesis and metabolism	3,78159696	102,5983333	27,13095404	2,13737	0,037460084

ANHANG

4692	PA4696_ilvI_at	PA4696 /GENE=ilvI /DEF=acetolactate synthase large subunit /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	3,779895335	150,7166667	39,8732381	3,31824	0,037460084
3690	PA3686_adk_at	PA3686 /GENE=adk /DEF=adenylate kinase /FUNCTION=Nucleotide bio-synthesis and metabolism	3,771886055	221,4266667	58,70449516	2,78412	0,037460084
5227	PA5232_at	PA5232 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,770341922	147,6933333	39,17239772	2,72653	0,037460084
2026	PA2016_at	PA2016 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	3,75987064	850,8283333	226,2919166	5,50094	0,037460084
4531	PA4535_at	PA4535 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,759468108	83,97166667	22,33604974	2,70501	0,037460084
3537	PA3533_at	PA3533 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,735929123	199,8083333	53,48290258	2,41281	0,037460084
4266	PA4269_rpoC_at	PA4269 /GENE=rpoC /DEF=DNA-directed RNA polymerase beta* chain /FUNCTION=Transcription, RNA processing and degradation	3,735142406	680,9583333	182,3112105	4,20074	0,037460084
4928	PA4933_at	PA4933 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	3,735067164	542,9733333	145,3717723	9,00491	0,037460084
4381	PA4385_groEL_at	PA4385 /GENE=groEL /DEF=GroEL protein /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins	3,72860952	1105,773333	296,5645309	2,37421	0,037460084
2744	PA2739_pheT_at	PA2739 /GENE=pheT /DEF=phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	3,723407298	37,11166667	9,967125189	2,29414	0,037460084
922	PA0907_at	PA0907 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,722434552	107,415	28,85611513	2,70979	0,037460084
4671	PA4675_at	PA4675 /DEF=probable TonB-dependent receptor /FUNCTION=Transport of small molecules	3,719428059	117,26	31,52635248	3,90319	0,037460084
4554	PA4558_at	PA4558 /DEF=probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FkpP-type /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	3,710301686	384,6083333	103,6595851	2,50787	0,037460084
519	PA0504_bioD_at	PA0504 /GENE=bioD /DEF=dethiobiotin synthase /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	3,693552778	56,58333333	15,31948688	2,18731	0,037460084
3739	PA3735_thrC_at	PA3735 /GENE=thrC /DEF=threonine synthase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	3,681418658	102,03	27,71485927	2,60458	0,037460084
1307	PA1292_at	PA1292 /DEF=probable 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase /FUNCTION=Putative enzymes	3,680144723	34,57833333	9,395916719	2,10674	0,037460084
2630	PA2624_idh_at	PA2624 /GENE=idh /DEF=isocitrate dehydrogenase /FUNCTION=Energy metabolism	3,679820136	889,1483333	241,6282048	10,24719	0,037460084
2973	PA2968_fabD_at	PA2968 /GENE=fabD /DEF=malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	3,6779956	67,045	18,22867868	4,19871	0,037460084
1215	PA1200_at	PA1200 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,673148232	158,4766667	43,14464232	3,57379	0,037460084
5552	PA5558_atpF_at	PA5558 /GENE=atpF /DEF=ATP synthase B chain /FUNCTION=Energy	3,66397385	849,22	231,7756716	2,98046	0,037460084

ANHANG

		metabolism					
4270	PA4273_rplA_at	PA4273 /GENE=rplA /DEF=50S ribosomal protein L1 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	3,662872523	1045,233333	285,3589162	6,56459	0,037460084
5553	PA5559_atpE_at	PA5559 /GENE=atpE /DEF=atp synthase C chain /FUNCTION=Energy metabolism	3,660155762	687,445	187,8185096	2,57922	0,037460084
5268	PA5274_rnk_at	PA5274 /GENE=rnk /DEF=nucleoside diphosphate kinase regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	3,650831394	160,2066667	43,88224199	2,47520	0,037460084
4238	PA4241_rpsM_at	PA4241 /GENE=rpsM /DEF=30S ribosomal protein S13 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	3,641433758	1023,766667	281,1438391	6,95467	0,037460084
4425	PA4429_at	PA4429 /DEF=probable cytochrome c1 precursor /FUNCTION=Energy metabolism	3,624367439	245,6083333	67,76584811	2,71442	0,037460084
2645	PA2639_nuoD_at	PA2639 /GENE=nuoD /DEF=NADH dehydrogenase I chain C,D /FUNCTION=Energy metabolism	3,61888247	114,1733333	31,54933444	4,09665	0,037460084
2180	PA2171_at	PA2171 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,615141722	40,005	11,06595621	3,71896	0,037460084
2749	PA2744_thrS_at	PA2744 /GENE=thrS /DEF=threonyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Translation, post-translational modification, degradation	3,601138611	118,8316667	32,99835955	4,25923	0,037460084
4231	PA4234_uvrA_at	PA4234 /GENE=uvrA /DEF=excinuclease ABC subunit A /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	3,598738391	68,87333333	19,1381884	2,74348	0,037460084
3291	PA3286_at	PA3286 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,596487913	168,9983333	46,98982381	3,02936	0,037460084
5430	PA5436_at	PA5436 /DEF=probable biotin carboxylase subunit of a transcarboxylase /FUNCTION=Central intermediary metabolism	3,593965913	458,5716667	127,5948848	3,24061	0,037460084
534 Negative Significant Genes							
Row	Gene Name	Gene ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	Fold Change	q-value (%)
1775	PA1761_at	PA1761 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-44,39295378	-879,9033333	19,82078817	0,11870	0,037460084
195	PA0180_at	PA0180 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-43,04272313	-94,095	2,186083806	0,23750	0,037460084
4322	PA4326_at	PA4326 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-40,29132525	-399,8683333	9,924427426	0,06408	0,037460084
4920	PA4925_at	PA4925 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-38,23096467	-100,6933333	2,63381618	0,18756	0,037460084
4856	PA4861_at	PA4861 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-36,95499697	-123,6216667	3,345194881	0,17349	0,037460084
1773	PA1759_at	PA1759 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-35,66755604	-43,35666667	1,215577165	0,40966	0,037460084
3530	PA3526_at	PA3526 /DEF=probable outer membrane protein /FUNCTION=Membrane proteins	-32,16894907	-357,16	11,10263189	0,07142	0,037460084
3728	PA3724_lasB_at	PA3724 /GENE=lasB /DEF=elastase LasB /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation; Secreted Factors (toxins, enzymes,	-28,12483159	-144,875	5,151141955	0,16537	0,037460084

ANHANG

		alginate)					
125	PA0110_at	PA0110 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-26,99032178	-220,4083333	8,166198801	0,15575	0,037460084
1622	PA1608_at	PA1608 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-25,88132236	-88,49833333	3,419389941	0,20520	0,037460084
2300	PA2292_at	PA2292 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-24,63753421	-129,815	5,268993191	0,14408	0,037460084
4838	PA4843_at	PA4843 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	-23,81137967	-175,6266667	7,375745089	0,17792	0,037460084
2305	PA2297_at	PA2297 /DEF=probable ferredoxin /FUNCTION=Energy metabolism	-23,07591097	-132,64833333	5,748346555	0,25893	0,037460084
126	PA0111_at	PA0111 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-21,89956174	-338,06	15,4368386	0,12969	0,037460084
4907	PA4912_at	PA4912 /DEF=probable permease of ABC branched chain amino acid transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-21,78319627	-49,20666667	2,258927756	0,29049	0,037460084
4097	PA4095_at	PA4095 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-21,21034821	-28,94166667	1,364506908	0,43259	0,037460084
2304	PA2296_at	PA2296 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-20,54212103	-42,14666667	2,051719324	0,37129	0,037460084
538	PA0523_norC_at	PA0523 /GENE=norC /DEF=nitric-oxide reductase subunit C /FUNCTION=Energy metabolism	-20,26792199	-38,54833333	1,901938114	0,31664	0,037460084
193	PA0178_at	PA0178 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis; Two-component regulatory systems	-20,22246052	-202,6416667	10,02062368	0,15754	0,037460084
3312	PA3307_r_at	PA3307 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-19,74948548	-402,3666667	20,37352655	0,14844	0,037460084
3878	PA3874_narH_at	PA3874 /GENE=narH /DEF=respiratory nitrate reductase beta chain /FUNCTION=Energy metabolism	-19,73970115	-54,66666667	2,76937661	0,30458	0,037460084
4976	PA4981_at	PA4981 /DEF=probable amino acid permease /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-19,51319706	-71,66333333	3,672557251	0,26227	0,037460084
1489	PA1474_at	PA1474 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-19,14778871	-49,84666667	2,603259698	0,29312	0,037460084
1484	PA1469_at	PA1469 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-19,04809742	-44,77666667	2,350715963	0,39173	0,037460084
4306	PA4310_pctB_at	PA4310 /GENE=pctB /DEF=chemotactic transducer PctB /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-18,44660481	-123,025	6,669248964	0,14718	0,037460084
2883	PA2878_at	PA2878 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-18,33911442	-30,835	1,681378898	0,37699	0,037460084
1042	PA1027_at	PA1027 /DEF=probable aldehyde dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-18,26308265	-115,52833333	6,325784947	0,25432	0,037460084
1056	PA1041_at	PA1041 /DEF=probable outer membrane protein /FUNCTION=Membrane proteins	-18,13720466	-1001,9333333	55,24188276	0,11537	0,037460084
2517	PA2511_at	PA2511 /DEF=probable transcriptional regulator	-18,06293954	-63,87333333	3,536153858	0,40283	0,037460084

ANHANG

		/FUNCTION=Transcriptional regulators					
5096	PA5101_at	PA5101 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-18,01300389	-218,9433333	12,15473747	0,25974	0,037460084
194	PA0179_at	PA0179 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis; Two-component regulatory systems	-16,76717214	-820,725	48,94832553	0,06935	0,037460084
5663	Pae_M57501cds_g_at	M57501 /GENE=flaA /PROD=flagellin /FEATURE=cds /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa flagellin (flaA) gene, complete cds.	-16,45531962	-2576,185	156,5563635	0,02200	0,037460084
5859	ig_5458499_5457716_at	Intergenic region between PA4913 and PA4914, 5457716-5458499, (-) strand	-16,30249394	-81,35333333	4,990238526	0,23631	0,037460084
2931	PA2926_hisP_at	PA2926 /GENE=hisP /DEF=histidine transport protein HisP /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Transport of small molecules	-16,29549537	-71,675	4,398454812	0,21766	0,037460084
1231	PA1216_at	PA1216 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-16,14976564	-22,30833333	1,381340994	0,45193	0,037460084
191	PA0176_at	PA0176 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-15,72693765	-350,9716667	22,316593	0,17871	0,037460084
2303	PA2295_at	PA2295 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-15,65312664	-33,60333333	2,14674896	0,31793	0,037460084
1693	PA1679_at	PA1679 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-15,4851038	-74,02166667	4,780185373	0,27725	0,037460084
190	PA0175_at	PA0175 /DEF=probable chemotaxis protein methyltransferase /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis; Transcriptional regulators	-15,46553516	-89,34333333	5,776931249	0,23367	0,037460084
2095	PA2086_at	PA2086 /DEF=probable epoxide hydrolase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-15,45268126	-56,22666667	3,638634987	0,32783	0,037460084
3889	PA3885_at	PA3885 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-15,38681484	-57,72166667	3,75137202	0,45111	0,037460084
399	PA0384_at	PA0384 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-15,26599197	-143,2416667	9,383056598	0,19747	0,037460084
4891	PA4896_at	PA4896 /DEF=probable sigma-70 factor, ECF subfamily /FUNCTION=Transcriptional regulators	-15,23374889	-80,83166667	5,306091575	0,35997	0,037460084
4794	PA4799_at	PA4799 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-15,15773055	-27,89166667	1,840095163	0,44472	0,037460084
2887	PA2882_at	PA2882 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-15,13411403	-85,18333333	5,628564259	0,24821	0,037460084
3908	PA3904_i_at	PA3904 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-15,05107883	-69,325	4,605982121	0,19271	0,037460084
2527	PA2521_czcB_at	PA2521 /GENE=czcB /DEF=RND divalent metal cation efflux membrane fusion protein CzcB precursor /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-15,01025089	-22,03666667	1,468107817	0,46200	0,037460084
2378	PA2371_at	PA2371 /DEF=probable ClpA/B-type protease /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	-14,77206584	-38,035	2,574792206	0,46930	0,037460084

ANHANG

2130	PA2121_at	PA2121 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-14,54770134	-20,085	1,380630488	0,49942	0,037460084
3876	PA3872_narl_at	PA3872 /GENE=narl /DEF=respiratory nitrate reductase gamma chain /FUNCTION=Energy metabolism	-14,20054189	-76,78833333	5,407422755	0,37043	0,037460084
4819	PA4824_at	PA4824 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-14,18439445	-51,89333333	3,6584807	0,43767	0,037460084
1473	PA1458_at	PA1458 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Chemotaxis; Two-component regulatory systems	-14,17623331	-221,8483333	15,64931449	0,40776	0,037460084
2340	PA2333_at	PA2333 /DEF=probable sulfatase /FUNCTION=Putative enzymes	-14,13488503	-68,74333333	4,863381145	0,29313	0,037460084
4629	PA4633_at	PA4633 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-14,0839138	-356,64	25,32250659	0,14626	0,037460084
5841	ig_4889111_4888194_at	Intergenic region between PA4421 and PA4422, 4888194-4889111, (-) strand	-14,07954984	-33,14	2,353768435	0,45099	0,037460084
2013	PA2003_bdHA_at	PA2003 /GENE=bdhA /DEF=3-hydroxybutyrate dehydrogenase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-14,07222113	-86,28	6,131228268	0,35630	0,037460084
4905	PA4910_at	PA4910 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-13,99200533	-179,8366667	12,85281576	0,21739	0,037460084
3223	PA3218_at	PA3218 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-13,93294315	-65,57666667	4,70659113	0,26582	0,037460084
4195	PA4193_at	PA4193 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-13,83509007	-74,36	5,374739134	0,20032	0,037460084
4569	PA4573_at	PA4573 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-13,77689673	-327,6333333	23,78135946	0,22752	0,037460084
250	PA0235_pcaK_at	PA0235 /GENE=pcaK /DEF=4-hydroxybenzoate transporter PcaK /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Membrane proteins; Transport of small molecules	-13,72332409	-61,90666667	4,511054776	0,38266	0,037460084
2334	PA2327_at	PA2327 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-13,59308128	-107,0766667	7,877291723	0,31338	0,037460084
4855	PA4860_at	PA4860 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-13,55927713	-25,215	1,859612409	0,46282	0,037460084
4851	PA4856_at	PA4856 /DEF=probable sensor/response regulator hybrid /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-13,55346552	-325,8633333	24,04280534	0,32505	0,037460084
4980	PA4985_at	PA4985 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-13,32749157	-53,91666667	4,045522475	0,31147	0,037460084
2289	PA2280_at	PA2280 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-13,27859172	-44,64	3,361802287	0,29068	0,037460084
4899	PA4904_vanA_at	PA4904 /GENE=vanA /DEF=vanillate O-demethylase oxygenase subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-13,23393744	-46,30833333	3,499210538	0,35902	0,037460084
4888	PA4893_ureG_at	PA4893 /GENE=ureG /DEF=urease accessory protein UreG /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	-13,21752654	-73,78833333	5,582612837	0,34336	0,037460084
4778	PA4782_at	PA4782 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-13,19014445	-201,9716667	15,31231651	0,38541	0,037460084

ANHANG

2096	PA2087_at	PA2087 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-13,11364496	-25,01666667	1,907682169	0,44465	0,037460084
2081	PA2072_at	PA2072 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-13,05642393	-39,01666667	2,988311874	0,37530	0,037460084
258	PA0243_at	PA0243 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-13,04760762	-72,02	5,519785857	0,40348	0,037460084
2868	PA2863_lipH_at	PA2863 /GENE=lipH /DEF=lipase modulator protein /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-13,02471917	-53,265	4,089531553	0,28711	0,037460084
2292	PA2283_at	PA2283 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-13,0145603	-30,00166667	2,305238592	0,40930	0,037460084
2321	PA2313_at	PA2313 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-12,9277398	-61,26833333	4,739291963	0,21685	0,037460084
255	PA0240_at	PA0240 /DEF=probable porin /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-12,86082303	-26,54	2,063631537	0,45774	0,037460084
4880	PA4885_irlR_at	PA4885 /GENE=irlR /DEF=two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	-12,83551424	-67,90333333	5,290269797	0,31258	0,037460084
2066	PA2057_at	PA2057 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-12,8212443	-30,70166667	2,394593375	0,39742	0,037460084
2567	PA2561_at	PA2561 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-12,77056688	-59,65666667	4,671418835	0,31976	0,037460084
3626	PA3622_rpoS_at	PA3622 /GENE=rpoS /DEF=sigma factor RpoS /FUNCTION=Transcriptional regulators	-12,75317166	-922,2666667	72,31665123	0,43079	0,037460084
3354	PA3349_at	PA3349 /DEF=probable chemotaxis protein /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-12,70381297	-272,1416667	21,42204606	0,12716	0,037460084
364	PA0349_at	PA0349 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-12,59134271	-38,50333333	3,057921163	0,31517	0,037460084
2930	PA2925_hisM_at	PA2925 /GENE=hisM /DEF=histidine transport system permease HisM /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Membrane proteins; Transport of small molecules	-12,54174327	-21,84666667	1,741916271	0,47438	0,037460084
3744	PA3740_at	PA3740 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-12,53828216	-76,425	6,095332598	0,21771	0,037460084
3927	PA3923_at	PA3923 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-12,51802503	-368,9083333	29,4701706	0,05437	0,037460084
412	PA0397_at	PA0397 /DEF=probable cation efflux system protein /FUNCTION=Transport of small molecules	-12,43256188	-21,88	1,759894719	0,46958	0,037460084
4772	PA4776_at	PA4776 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	-12,42149749	-148,6266667	11,96527768	0,26335	0,037460084
5535	PA5541_at	PA5541 /DEF=probable dihydroorotase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	-12,41058358	-29,895	2,408831124	0,41398	0,037460084
189	PA0174_at	PA0174 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-12,39801268	-52,37833333	4,224736228	0,34456	0,037460084
2288	PA2279_arsC_at	PA2279 /GENE=arsC /DEF=ArsC protein /FUNCTION=Transport of small	-12,3884169	-24,25	1,957473679	0,36623	0,037460084

ANHANG

		molecules: Adaptation, protection					
791	PA0776_at	PA0776 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-12,3500384	-62,945	5,096745288	0,26409	0,037460084
4799	PA4804_at	PA4804 /DEF=probable amino acid permease /FUNCTION=Membrane proteins: Transport of small molecules	-12,23327401	-26,39166667	2,157367411	0,47403	0,037460084
168	PA0153_pcaH_at	PA0153 /GENE=pcaH /DEF=protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-12,20377946	-48,45833333	3,970764425	0,41232	0,037460084
2298	PA2289_at	PA2289 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-12,11190037	-20,82666667	1,719520969	0,44576	0,037460084
4810	PA4815_at	PA4815 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-12,09837714	-43,74	3,615360927	0,47084	0,037460084
1872	PA1858_str_at	PA1858 /GENE=str /DEF=streptomycin 3'-phosphotransferase /FUNCTION=Antibiotic resistance and susceptibility	-12,06561002	-29,16666667	2,417338751	0,46395	0,037460084
4859	PA4864_ureD_at	PA4864 /GENE=ureD /DEF=urease accessory protein /FUNCTION=Central intermediary metabolism	-12,05564566	-28,1	2,330858156	0,40696	0,037460084
1451	PA1436_at	PA1436 /DEF=probable RND efflux transporter /FUNCTION=Membrane proteins: Transport of small molecules	-11,97943677	-39,535	3,300238631	0,37809	0,037460084
4215	PA4218_at	PA4218 /DEF=probable transporter /FUNCTION=Membrane proteins: Transport of small molecules	-11,85030858	-356,4566667	30,07994807	0,25395	0,037460084
4221	PA4224_at	PA4224 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-11,73774173	-806,0566667	68,67221016	0,24820	0,037460084
401	PA0386_at	PA0386 /DEF=probable oxidase /FUNCTION=Putative enzymes	-11,70298571	-68,605	5,862179249	0,30423	0,037460084
3224	PA3219_at	PA3219 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-11,69806699	-93,945	8,030813989	0,30948	0,037460084
4793	PA4798_at	PA4798 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-11,69621936	-50,19166667	4,291272687	0,31607	0,037460084
230	PA0215_at	PA0215 /DEF=probable transporter /FUNCTION=Membrane proteins: Transport of small molecules	-11,6373838	-95,39833333	8,197575587	0,26046	0,037460084
393	PA0378_at	PA0378 /DEF=probable transglycosylase /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	-11,60337898	-43,25166667	3,727506164	0,41560	0,037460084
3881	PA3877_narK1_at	PA3877 /GENE=narK1 /DEF=nitrite extrusion protein 1 /FUNCTION=Membrane proteins: Transport of small molecules	-11,57569491	-25,51833333	2,204475285	0,41382	0,037460084
4354	PA4358_at	PA4358 /DEF=probable ferrous iron transport protein /FUNCTION=Membrane proteins: Transport of small molecules	-11,55873447	-119,36	10,32639	0,30910	0,037460084
5321	PA5327_at	PA5327 /DEF=probable oxidoreductase /FUNCTION=Putative enzymes	-11,49424678	-25,57333333	2,22488118	0,46540	0,037460084
4801	PA4806_at	PA4806 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-11,46288897	-23,06	2,01170927	0,45885	0,037460084
2074	PA2065_pcoA_at	PA2065 /GENE=pcoA /DEF=copper resistance protein A precursor /FUNCTION=Adaptation, protection	-11,43075623	-26,965	2,358986531	0,43311	0,037460084
2076	PA2067_at	PA2067 /DEF=probable hydrolase /FUNCTION=Putative enzymes	-11,42382438	-49,43666667	4,327505834	0,37380	0,037460084
3995	PA3991_at	PA3991 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-11,38209544	-15,53	1,364423632	0,49752	0,037460084

ANHANG

813	PA0798_at	PA0798 /DEF=probable methyltransferase /FUNCTION=Putative enzymes	-11,30257009	-32,41833333	2,868226702	0,44029	0,037460084
411	PA0396_pilU_at	PA0396 /GENE=pilU /DEF=twitching motility protein PilU /FUNCTION=Motility & Attachment	-11,28497076	-65,765	5,827662419	0,40568	0,037460084
3433	PA3428_at	PA3428 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-11,25670347	-56,735	5,040107891	0,32195	0,037460084
2347	PA2340_at	PA2340 /DEF=probable binding-protein-dependent maltose/mannitol transport protein /FUNCTION=Transport of small molecules	-11,25164834	-29,795	2,648056454	0,34252	0,037460084
1893	PA1879_at	PA1879 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-11,2410032	-39,67	3,529044454	0,40510	0,037460084
4773	PA4777_at	PA4777 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-11,19956036	-39,86666667	3,55966354	0,42228	0,037460084
398	PA0383_at	PA0383 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-11,19913363	-26,675	2,381880677	0,42395	0,037460084
2037	PA2027_at	PA2027 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-11,17648642	-34,77833333	3,111741206	0,46390	0,037460084
2392	PA2385_at	PA2385 /DEF=probable acylase /FUNCTION=Putative enzymes	-11,14786467	-18,06666667	1,620639216	0,48863	0,037460084
3574	PA3570_mmsA_at	PA3570 /GENE=mmsA /DEF=methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Carbon compound catabolism	-11,11223577	-1359,27	122,3219187	0,16668	0,037460084
1882	PA1868_xqhA_at	PA1868 /GENE=xqhA /DEF=secretion protein XqhA /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	-11,0528585	-49,20333333	4,451638764	0,45491	0,037460084
3255	PA3250_at	PA3250 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,98668644	-86,86833333	7,906690865	0,32058	0,037460084
2315	PA2307_at	PA2307 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-10,8967831	-19,32166667	1,773153277	0,49384	0,037460084
4854	PA4859_at	PA4859 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-10,71481864	-166,1216667	15,50391773	0,25977	0,037460084
4924	PA4929_at	PA4929 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-10,67213342	-104,6866667	9,809347629	0,18209	0,037460084
1652	PA1638_at	PA1638 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,54912703	-32,89666667	3,118425493	0,49740	0,037460084
1894	PA1880_at	PA1880 /DEF=probable oxidoreductase /FUNCTION=Putative enzymes	-10,43506492	-87,28666667	8,364745919	0,34812	0,037460084
2291	PA2282_at	PA2282 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,35040411	-83,025	8,021425937	0,26814	0,037460084
2084	PA2075_at	PA2075 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,3499435	-88,13	8,515022332	0,21259	0,037460084
5026	PA5031_at	PA5031 /DEF=probable short chain dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-10,34425516	-52,94833333	5,118622126	0,31000	0,037460084
2271	PA2262_at	PA2262 /DEF=probable 2-ketogluconate transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-10,33692582	-15,26166667	1,47642219	0,46891	0,037460084
234	PA0219_at	PA0219 /DEF=probable aldehyde dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-10,31354317	-37,05166667	3,592525484	0,46527	0,037460084

ANHANG

5173	PA5178_at	PA5178 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,29572801	-1749,951667	169,9687157	0,36805	0,037460084
2269	PA2260_at	PA2260 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,28801179	-63,77833333	6,19928657	0,31654	0,037460084
3390	PA3385_at	PA3385 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,28696053	-2765,513333	268,836779	0,27531	0,037460084
486	PA0471_at	PA0471 /DEF=probable transmembrane sensor /FUNCTION=Membrane proteins; Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	-10,28314508	-50,58166667	4,918890695	0,49536	0,037460084
2068	PA2059_at	PA2059 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-10,26756251	-25,75333333	2,508222698	0,44545	0,037460084
4516	PA4520_at	PA4520 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-10,24757159	-31,18333333	3,042997362	0,35089	0,037460084
254	PA0239_at	PA0239 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-10,24038901	-81,725	7,980653852	0,35741	0,037460084
1715	PA1701_at	PA1701 /DEF=conserved hypothetical protein in type III secretion /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Protein secretion/export apparatus	-10,23607939	-94,88333333	9,269499553	0,21150	0,037460084
2658	PA2652_at	PA2652 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-10,23173156	-69,165	6,759852875	0,27508	0,037460084
4227	PA4230_pchB_at	PA4230 /GENE=pchB /DEF=salicylate biosynthesis protein PchB /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-10,22855905	-601,7866667	58,8339632	0,16945	0,037460084
4820	PA4825_mgtA_at	PA4825 /GENE=mgtA /DEF=Mg(2+) transport ATPase, P-type 2 /FUNCTION=Transport of small molecules	-10,19864667	-29,84166667	2,926041819	0,40853	0,037460084
3397	PA3392_nosZ_at	PA3392 /GENE=nosZ /DEF=nitrous-oxide reductase precursor /FUNCTION=Energy metabolism	-10,13498316	-31,97833333	3,155242868	0,39826	0,037460084
4133	PA4131_at	PA4131 /DEF=probable iron-sulfur protein /FUNCTION=Putative enzymes	-10,07390497	-24,38	2,420114154	0,45966	0,037460084
4217	PA4220_i_at	PA4220 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,01148375	-419,98	41,94982589	0,20221	0,037460084
392	PA0377_at	PA0377 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-10,00940788	-175,35	17,51851879	0,32756	0,037460084
4893	PA4898_at	PA4898 /DEF=probable porin /FUNCTION=Membrane proteins	-9,992008078	-115,925	11,60177205	0,21904	0,037460084
3926	PA3922_at	PA3922 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Transcriptional regulators	-9,967532411	-819,425	82,20941415	0,08483	0,037460084
229	PA0214_at	PA0214 /DEF=probable acyl transferase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-9,951727054	-43,4	4,361052083	0,33653	0,037460084
1710	PA1696_pscO_at	PA1696 /GENE=pscO /DEF=translocation protein in type III secretion /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	-9,948988924	-19,49666667	1,959663119	0,44690	0,037460084
1147	PA1132_at	PA1132 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,915867883	-44,17	4,454476453	0,42279	0,037460084
4305	PA4309_pctA_at	PA4309 /GENE=pctA /DEF=chemotactic transducer PctA /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-9,885877083	-119,6933333	12,10750774	0,18570	0,037460084

ANHANG

4818	PA4823_at	PA4823 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,881581995	-82,66333333	8,365394668	0,20590	0,037460084
2920	PA2915_at	PA2915 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,849521767	-70,755	7,183597506	0,48368	0,037460084
4603	PA4607_at	PA4607 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,814907004	-2351,178333	239,5517688	0,30851	0,037460084
4586	PA4590_pra_at	PA4590 /GENE=pra /DEF=protein activator /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Transport of small molecules	-9,732527264	-27,975	2,874381878	0,43534	0,037460084
4857	PA4862_at	PA4862 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-9,72904404	-23,17666667	2,38221418	0,43167	0,037460084
4812	PA4817_at	PA4817 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,678436786	-155,8116667	16,09884634	0,29465	0,037460084
2268	PA2259_ptxS_at	PA2259 /GENE=ptxS /DEF=transcriptional regulator PtxS /FUNCTION=Transcriptional regulators; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-9,672313652	-79,85833333	8,256383757	0,49258	0,037460084
1424	PA1409_aphA_at	PA1409 /GENE=aphA /DEF=acetylpolymine aminohydrolase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-9,664118431	-25,07666667	2,594821954	0,46928	0,037460084
448	PA0433_at	PA0433 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,653601722	-49,31833333	5,108801332	0,32656	0,037460084
5411	PA5417_soxD_at	PA5417 /GENE=soxD /DEF=sarcosine oxidase delta subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-9,649253613	-25,225	2,614191834	0,46024	0,037460084
2884	PA2879_at	PA2879 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-9,648842865	-57,89166667	5,999855887	0,48832	0,037460084
4833	PA4838_at	PA4838 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,58767764	-54,61	5,695852745	0,29179	0,037460084
1466	PA1451_at	PA1451 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,480411456	-43,84	4,624271869	0,42202	0,037460084
208	PA0193_at	PA0193 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Putative enzymes	-9,474091663	-28,95666667	3,056405584	0,36845	0,037460084
2932	PA2927_at	PA2927 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,431681055	-44,145	4,680501783	0,35068	0,037460084
4197	PA4195_at	PA4195 /DEF=probable binding protein component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-9,420316015	-52,83	5,608092119	0,41147	0,037460084
2085	PA2076_at	PA2076 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-9,415970117	-108,3216667	11,50403679	0,23428	0,037460084
2285	PA2276_at	PA2276 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-9,409291413	-63,785	6,778937669	0,31266	0,037460084
167	PA0152_pcaQ_at	PA0152 /GENE=pcaQ /DEF=transcriptional regulator PcaQ /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Transcriptional regulators	-9,407201904	-68,43166667	7,274391192	0,36614	0,037460084
235	PA0220_at	PA0220 /DEF=probable amino acid permease /FUNCTION=Transport of small molecules	-9,374798103	-50,805	5,419316709	0,34835	0,037460084
127	PA0112_at	PA0112 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-9,358214287	-128,5233333	13,7337455	0,26150	0,037460084

ANHANG

4114	PA4112_at	PA4112 /DEF=probable sensor/response regulator hybrid /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-9,340219726	-111,6733333	11,9561784	0,33873	0,037460084
4883	PA4888_at	PA4888 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,331757521	-35,24	3,776351874	0,46655	0,037460084
1189	PA1174_napA_at	PA1174 /GENE=napA /DEF=periplasmic nitrate reductase protein NapA /FUNCTION=Energy metabolism	-9,327937324	-46,80833333	5,018079744	0,49938	0,037460084
224	PA0209_at	PA0209 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-9,270676386	-116,0183333	12,51454894	0,25281	0,037460084
2099	PA2090_at	PA2090 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,25176752	-32,17166667	3,477353554	0,39512	0,037460084
2872	PA2867_at	PA2867 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-9,171181454	-380,0133333	41,43559205	0,13987	0,037460084
4086	PA4084_at	PA4084 /DEF=probable fimbrial biogenesis usher protein /FUNCTION=Motility & Attachment; Chaperones & heat shock proteins	-9,169075986	-25,14666667	2,742551889	0,39372	0,037460084
2279	PA2270_at	PA2270 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-9,125031032	-98,18833333	10,7603287	0,49708	0,037460084
3593	PA3589_at	PA3589 /DEF=probable acyl-CoA thiolase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-9,111336996	-19,34666667	2,123361991	0,46971	0,037460084
4356	PA4360_at	PA4360 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,060493676	-499,2633333	55,10332562	0,31610	0,037460084
1969	PA1959_bacA_at	PA1959 /GENE=bacA /DEF=bacitracin resistance protein /FUNCTION=Adaptation, protection; Antibiotic resistance and susceptibility; Cell wall / LPS / capsule	-9,034759432	-23,93666667	2,649397236	0,49533	0,037460084
2926	PA2921_at	PA2921 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-9,018204841	-53,93166667	5,980310674	0,42471	0,037460084
4109	PA4107_at	PA4107 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,01603933	-72,60166667	8,052501105	0,33701	0,037460084
4840	PA4845_dipZ_at	PA4845 /GENE=dipZ /DEF=thiol:disulfide interchange protein DipZ /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	-9,013762741	-30,16	3,345994438	0,49014	0,037460084
4858	PA4863_at	PA4863 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-9,005752904	-86,37333333	9,590906419	0,49569	0,037460084
3913	PA3909_at	PA3909 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,980597123	-67,28333333	7,492077911	0,37982	0,037460084
2295	PA2286_at	PA2286 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Membrane proteins	-8,949683116	-68,43333333	7,646453226	0,31658	0,037460084
2331	PA2324_at	PA2324 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-8,932636371	-27,68166667	3,098935803	0,36617	0,037460084
207	PA0192_at	PA0192 /DEF=probable TonB-dependent receptor /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-8,92927189	-43,68166667	4,891962884	0,44825	0,037460084
325	PA0310_at	PA0310 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,90200264	-39,28333333	4,412864714	0,49576	0,037460084
1620	PA1606_at	PA1606 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,899471958	-79,93	8,981431749	0,36856	0,037460084

ANHANG

4896	PA4901_mdIC_at	PA4901 /GENE=mdIC /DEF=benzoylformate decarboxylase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-8,886003571	-15,58	1,753319124	0,49350	0,037460084
4839	PA4844_at	PA4844 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-8,87891063	-122,8866667	13,84028647	0,20231	0,037460084
4780	PA4784_at	PA4784 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-8,853706233	-158,4283333	17,89401288	0,21838	0,037460084
5751	ig_2250595_2251275_at	Intergenic region between PA2075 and PA2076, 2250595-2251275, (+) strand	-8,852452593	-39,67833333	4,482185351	0,36075	0,037460084
4868	PA4873_at	PA4873 /DEF=probable heat-shock protein /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins	-8,829786964	-59,86	6,779325508	0,46121	0,037460084
2343	PA2336_at	PA2336 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,818553156	-86,92333333	9,856870146	0,23731	0,037460084
5858	ig_5457716_5458499_i_at	Intergenic region between PA4913 and PA4914, 5457716-5458499, (+) strand	-8,817670456	-22,005	2,495557087	0,39502	0,037460084
4785	PA4789_at	PA4789 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,817632247	-75,68	8,582802943	0,49901	0,037460084
4106	PA4104_at	PA4104 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,799708579	-61,97	7,042278667	0,35390	0,037460084
4228	PA4231_pchA_at	PA4231 /GENE=pchA /DEF=salicylate biosynthesis isochorismate synthase /FUNCTION=Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate); Transport of small molecules	-8,767771505	-191,1833333	21,80523674	0,34608	0,037460084
5653	Pae_L81176cds3_at	L81176 /GENE=fliD /PROD=flagellar cap /FEATURE=cds3 /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa flagellin (fliC) gene, partial cds; FlaG (flaG), flagellar cap (fliD), FliS (fliS), and FleQ (fleQ) genes, complete cds; and unknown genes.	-8,748100122	-1265,318333	144,6392149	0,29089	0,037460084
4394	PA4398_at	PA4398 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-8,742309642	-75,28833333	8,611949979	0,34785	0,037460084
4906	PA4911_at	PA4911 /DEF=probable permease of ABC branched-chain amino acid transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-8,715205224	-46,15333333	5,295725361	0,37608	0,037460084
4218	PA4221_fptA_at	PA4221 /GENE=fptA /DEF=Fe(III)-pyochelin receptor precursor /FUNCTION=Transport of small molecules	-8,677350618	-671,665	77,40438638	0,25699	0,037460084
2333	PA2326_at	PA2326 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-8,670157852	-33,36833333	3,848641963	0,40470	0,037460084
450	PA0435_at	PA0435 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,669117073	-83,23666667	9,601516044	0,36430	0,037460084
2523	PA2517_xylY_at	PA2517 /GENE=xylY /DEF=toluate 1,2-dioxygenase beta subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-8,658719605	-46,20333333	5,336046834	0,34036	0,037460084
3467	PA3463_at	PA3463 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,638754049	-267,9116667	31,01276702	0,29641	0,037460084
2793	PA2788_at	PA2788 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-8,632055099	-83,695	9,695837091	0,26045	0,037460084
2372	PA2365_at	PA2365 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,588101993	-35,87166667	4,176902731	0,41877	0,037460084
188	PA0173_at	PA0173 /DEF=probable methyltransferase /FUNCTION=Adaptation, protecti-	-8,57445638	-45,65333333	5,324341429	0,40019	0,037460084

ANHANG

		on: Chemotaxis					
803	PA0788_at	PA0788 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,523541285	-62,94333333	7,384645798	0,33980	0,037460084
2925	PA2920_at	PA2920 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-8,511957697	-46,895	5,509308395	0,35162	0,037460084
4588	PA4592_at	PA4592 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,499943586	-58,83166667	6,921418486	0,47739	0,037460084
41	PA0026_at	PA0026 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,495919109	-23,06333333	2,714636643	0,49386	0,037460084
349	PA0334_at	PA0334 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-8,442952286	-101,9883333	12,07970031	0,43778	0,037460084
223	PA0208_mdcA_at	PA0208 /GENE=mdcA /DEF=malonate decarboxylase alpha subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-8,435129672	-56,54166667	6,70311766	0,42611	0,037460084
4890	PA4895_at	PA4895 /DEF=probable transmembrane sensor /FUNCTION=Transcriptional regulators; Membrane proteins	-8,419308874	-29,68333333	3,525625889	0,39570	0,037460084
4041	PA4039_at	PA4039 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,388962519	-20,23666667	2,412296708	0,43272	0,037460084
4829	PA4834_at	PA4834 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-8,381312861	-74,48333333	8,88683367	0,20841	0,037460084
192	PA0177_at	PA0177 /DEF=probable purine-binding chemotaxis protein /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-8,370480482	-35,61	4,254236071	0,30090	0,037460084
4032	PA4030_at	PA4030 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,360231375	-81,375	9,733582284	0,40637	0,037460084
4832	PA4837_at	PA4837 /DEF=probable outer membrane protein /FUNCTION=Membrane proteins	-8,343154794	-42,115	5,047850728	0,42369	0,037460084
4327	PA4331_at	PA4331 /DEF=probable ferredoxin reductase /FUNCTION=Energy metabolism	-8,31253778	-19,665	2,365703534	0,49809	0,037460084
233	PA0218_at	PA0218 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-8,304795416	-21,405	2,577426526	0,46110	0,037460084
226	PA0211_mdcD_at	PA0211 /GENE=mdcD /DEF=malonate decarboxylase beta subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-8,261946391	-50,43166667	6,104090281	0,39764	0,037460084
4877	PA4882_at	PA4882 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,25627352	-62,01333333	7,511056069	0,35434	0,037460084
2934	PA2929_at	PA2929 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-8,242320717	-45,16	5,479039405	0,38948	0,037460084
2351	PA2344_mtlZ_at	PA2344 /GENE=mtlZ /DEF=fructokinase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-8,229808533	-79,80666667	9,69726894	0,41995	0,037460084
4852	PA4857_at	PA4857 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-8,195921862	-21,16666667	2,58258522	0,42377	0,037460084
2075	PA2066_at	PA2066 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,19586168	-125,8883333	15,35998755	0,29293	0,037460084
2356	PA2349_at	PA2349 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,186832666	-22,985	2,807557078	0,49242	0,037460084

ANHANG

2284	PA2275_at	PA2275 /DEF=probable alcohol dehydrogenase (Zn-dependent) /FUNCTION=Putative enzymes	-8,184712993	-46,62333333	5,696391965	0,36705	0,037460084
1481	PA1466_at	PA1466 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,128746515	-52,31666667	6,436006655	0,49716	0,037460084
4170	PA4168_at	PA4168 /DEF=probable TonB-dependent receptor /FUNCTION=Transport of small molecules	-8,126377106	-52,17666667	6,420655353	0,39671	0,037460084
5389	PA5395_at	PA5395 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,120482799	-27,59166667	3,39778648	0,49112	0,037460084
2129	PA2120_at	PA2120 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,1182841	-25,69833333	3,1654883	0,41270	0,037460084
2867	PA2862_lipA_at	PA2862 /GENE=lipA /DEF=lactonizing lipase precursor /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-8,115025897	-434,0466667	53,48678762	0,07992	0,037460084
4634	PA4638_at	PA4638 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,111184037	-49,55166667	6,109054663	0,39529	0,037460084
4821	PA4826_at	PA4826 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,101352879	-55,09833333	6,801127436	0,29458	0,037460084
2341	PA2334_at	PA2334 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-8,062935026	-40,55166667	5,029392713	0,47734	0,037460084
4910	PA4915_at	PA4915 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-8,033281468	-224,24	27,91387317	0,32185	0,037460084
1317	PA1302_at	PA1302 /DEF=probable heme utilization protein precursor /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-8,029708644	-33,34	4,152080913	0,42865	0,037460084
2108	PA2099_at	PA2099 /DEF=probable short-chain dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-8,01798798	-60,96333333	7,603320619	0,34565	0,037460084
2373	PA2366_at	PA2366 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-8,004280266	-69,54166667	8,688059932	0,29628	0,037460084
2094	PA2085_at	PA2085 /DEF=probable ring-hydroxylating dioxygenase small subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-8,00137708	-37,81833333	4,726478074	0,36896	0,037460084
2924	PA2919_at	PA2919 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-7,978958956	-19,065	2,389409459	0,43338	0,037460084
2510	PA2504_at	PA2504 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,967368048	-125,1216667	15,70426594	0,32834	0,037460084
2313	PA2305_at	PA2305 /DEF=probable non-ribosomal peptide synthetase /FUNCTION=	-7,905587643	-89,00833333	11,25891425	0,23266	0,037460084
1037	PA1022_at	PA1022 /DEF=probable acyl-CoA dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-7,89435844	-39,15666667	4,960082186	0,46016	0,037460084
2105	PA2096_at	PA2096 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-7,862622609	-63,72166667	8,104378124	0,34885	0,037460084
2345	PA2338_at	PA2338 /DEF=probable binding protein component of ABC malto-se/mannitol transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-7,848877922	-61,865	7,882018375	0,30846	0,037460084
2358	PA2351_at	PA2351 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-7,845029176	-24,66333333	3,143816649	0,49571	0,037460084

ANHANG

361	PA0346_at	PA0346 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,830037811	-52,36333333	6,687494314	0,46773	0,037460084
3446	PA3442_at	PA3442 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-7,741125582	-48,23166667	6,230575406	0,48275	0,037460084
4321	PA4325_at	PA4325 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,70003814	-285,48	37,07514103	0,31080	0,037460084
2101	PA2092_at	PA2092 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-7,690805595	-38,925	5,061238321	0,34107	0,037460084
4155	PA4153_at	PA4153 /DEF=2,3-butanediol dehydrogenase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-7,644302961	-30,23666667	3,955451114	0,47636	0,037460084
466	PA0451_at	PA0451 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-7,644000289	-53,50833333	7,000043343	0,42931	0,037460084
2914	PA2909_i_at	PA2909 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	-7,611618513	-77,87333333	10,2308508	0,42585	0,037460084
1928	PA1916_at	PA1916 /DEF=probable amino acid permease /FUNCTION=Transport of small molecules	-7,589684127	-18,02666667	2,375153744	0,48520	0,037460084
2660	PA2654_at	PA2654 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-7,561036052	-138,75666667	18,35154147	0,36751	0,037460084
4815	PA4820_at	PA4820 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,522446915	-19,87166667	2,641649305	0,42340	0,037460084
22	PA0007_at	PA0007 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-7,517764447	-43,56666667	5,795162508	0,46412	0,037460084
4644	PA4648_at	PA4648 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,513401824	-38,34666667	5,103768914	0,44543	0,037460084
4897	PA4902_at	PA4902 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-7,509404377	-63,42166667	8,445632102	0,40602	0,037460084
4581	PA4585_rtcA_at	PA4585 /GENE=rtcA /DEF=RNA 3'-terminal phosphate cyclase /FUNCTION=Transcription, RNA processing and degradation	-7,505877503	-44,88166667	5,979536256	0,46307	0,037460084
2500	PA2494_mexF_at	PA2494 /GENE=mexF /DEF=RND multidrug efflux transporter MexF /FUNCTION=Antibiotic resistance and susceptibility; Membrane proteins; Transport of small molecules	-7,492771488	-24,90833333	3,324315091	0,41807	0,037460084
4050	PA4048_at	PA4048 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,488181791	-26,10666667	3,486382595	0,44505	0,037460084
2927	PA2922_at	PA2922 /DEF=probable hydrolase /FUNCTION=Putative enzymes	-7,485617375	-95,06666667	12,69990996	0,23859	0,037460084
150	PA0135_at	PA0135 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,478308376	-29,72	3,9741608	0,36739	0,037460084
2370	PA2363_at	PA2363 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,477949298	-51,02833333	6,823840508	0,46801	0,037460084
3573	PA3569_mmsB_at	PA3569 /GENE=mmsB /DEF=3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-7,459895331	-658,0883333	88,21683203	0,16813	0,037460084
123	PA0108_colIII_at	PA0108 /GENE=colIII /DEF=cytochrome c oxidase, subunit III /FUNCTION=Energy metabolism	-7,446576757	-927,955	124,6149782	0,06972	0,037460084

ANHANG

236	PA0221_at	PA0221 /DEF=probable aminotransferase /FUNCTION=Putative enzymes	-7,44133796	-39,94333333	5,367762296	0,37569	0,037460084
2528	PA2522_czcC_at	PA2522 /GENE=czcC /DEF=outer membrane protein precursor CzcC /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-7,435582742	-18,26833333	2,456879839	0,49716	0,037460084
2280	PA2271_i_at	PA2271 /DEF=probable acetyltransferase /FUNCTION=Putative enzymes	-7,421697184	-71,995	9,700611359	0,46838	0,037460084
122	PA0107_at	PA0107 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Energy metabolism	-7,41945843	-295,91	39,88296488	0,15926	0,037460084
4791	PA4795_at	PA4795 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,376929573	-71,28166667	9,662782593	0,48039	0,037460084
772	PA0757_at	PA0757 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-7,360576264	-67,7	9,19764942	0,43788	0,037460084
2335	PA2328_at	PA2328 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,356833723	-52,755	7,170883832	0,43828	0,037460084
865	PA0850_at	PA0850 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,350158924	-38,63166667	5,255895425	0,44838	0,037460084
2886	PA2881_at	PA2881 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	-7,343126356	-44,79	6,099581817	0,35433	0,037460084
4373	PA4377_at	PA4377 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,338236463	-619,0483333	84,35927849	0,21881	0,037460084
2312	PA2304_at	PA2304 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,338121405	-56,58833333	7,711555889	0,41963	0,037460084
3436	PA3431_at	PA3431 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-7,337173882	-41,79666667	5,696562101	0,40076	0,037460084
5214	PA5219_at	PA5219 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-7,317019299	-22,64166667	3,094383893	0,47661	0,037460084
2904	PA2899_at	PA2899 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-7,289657875	-100,3383333	13,76447771	0,45929	0,037460084
4216	PA4219_at	PA4219 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-7,282620774	-118,55	16,27848046	0,41862	0,037460084
4795	PA4800_at	PA4800 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,230010178	-32,18666667	4,451814849	0,44490	0,037460084
1708	PA1694_pscQ_at	PA1694 /GENE=pscQ /DEF=translocation protein in type III secretion /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	-7,216035083	-97,17166667	13,46607459	0,32252	0,037460084
5404	PA5410_at	PA5410 /DEF=probable ring hydroxylating dioxygenase, alpha-subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-7,189660528	-146,3183333	20,35121585	0,21629	0,037460084
4771	PA4775_at	PA4775 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,172026714	-44,88	6,257645404	0,42028	0,037460084
3910	PA3906_at	PA3906 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,133641802	-55,12166667	7,727002307	0,31591	0,037460084
225	PA0210_mdcC_at	PA0210 /GENE=mdcC /DEF=malonate decarboxylase delta subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-7,095237501	-61,735	8,700906769	0,28053	0,037460084
4784	PA4788_at	PA4788 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-7,092720416	-137,0916667	19,32850283	0,30255	0,037460084

ANHANG

2080	PA2071_fusA2_at	PA2071 /GENE=fusA2 /DEF=elongation factor G /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	-7,090606532	-68,465	9,655732509	0,36823	0,037460084
201	PA0186_at	PA0186 /DEF=probable binding protein component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-7,074830844	-21,72	3,070038066	0,43072	0,037460084
3423	PA3418_ldh_at	PA3418 /GENE=ldh /DEF=leucine dehydrogenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	-7,071588491	-212,6316667	30,06844458	0,33000	0,037460084
4813	PA4818_at	PA4818 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-7,003275652	-76,96666667	10,99009528	0,36864	0,037460084
5175	PA5180_at	PA5180 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,997247622	-71,10666667	10,16209094	0,42731	0,037460084
3875	PA3871_at	PA3871 /DEF=probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PpiC-type /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	-6,988042372	-23,25833333	3,328304566	0,46409	0,037460084
4776	PA4780_at	PA4780 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,97060847	-119,0333333	17,07646238	0,49221	0,037460084
165	PA0150_at	PA0150 /DEF=probable transmembrane sensor /FUNCTION=Membrane proteins; Transcriptional regulators	-6,968165558	-39,245	5,632041844	0,47666	0,037460084
3928	PA3924_at	PA3924 /DEF=probable medium-chain acyl-CoA ligase /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	-6,966655268	-63,84166667	9,163890592	0,36045	0,037460084
767	PA0752_at	PA0752 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-6,944437652	-21,915	3,155763087	0,49236	0,037460084
2921	PA2916_at	PA2916 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-6,943196609	-100,3	14,44579574	0,28354	0,037460084
801	PA0786_at	PA0786 /DEF=probable transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-6,918505959	-21,85666667	3,15915991	0,42843	0,037460084
5412	PA5418_soxA_at	PA5418 /GENE=soxA /DEF=sarcosine oxidase alpha subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-6,891529365	-82,605	11,98645404	0,43856	0,037460084
5655	Pae_L81176cids5_at	L81176 /GENE= /PROD=unknown /FEATURE=cids5 /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa flagellin (fliC) gene, partial cds; FlaG (flaG), flagellar cap (fliD), FliS (fliS), and FleQ (fleQ) genes, complete cds; and unknown genes.	-6,876606918	-456,7316667	66,41817282	0,20647	0,037460084
1984	PA1974_at	PA1974 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,86551891	-41,84333333	6,094708045	0,39669	0,037460084
5374	PA5380_at	PA5380 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-6,848074528	-274,88	40,13975007	0,44784	0,037460084
5132	PA5137_at	PA5137 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,799790102	-53,69833333	7,897057487	0,44569	0,037460084
4351	PA4355_at	PA4355 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-6,794358917	-69,35666667	10,20797805	0,46949	0,037460084
340	PA0325_at	PA0325 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-6,754450385	-33,07333333	4,896524728	0,40768	0,037460084
2107	PA2098_at	PA2098 /DEF=probable esterase/deacetylase /FUNCTION=Carbon com-	-6,720301733	-67,34333333	10,02087942	0,41452	0,037460084

ANHANG

		pound catabolism					
3572	PA3568_at	PA3568 /DEF=probable acetyl-coa synthetase /FUNCTION=Putative enzymes	-6,709292309	-483,13	72,00908498	0,15684	0,037460084
4816	PA4821_at	PA4821 /DEF=probable transporter /FUNCTION=Transport of small molecules; Membrane proteins	-6,70044535	-48,06166667	7,172906301	0,46586	0,037460084
4830	PA4835_at	PA4835 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Membrane proteins: Hypothetical, unclassified, unknown	-6,693765664	-28,56333333	4,267154658	0,49091	0,037460084
1499	PA1484_at	PA1484 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-6,662191146	-22,02833333	3,306469726	0,48444	0,037460084
3915	PA3911_at	PA3911 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,651730824	-59,25833333	8,908708861	0,47818	0,037460084
1633	PA1619_at	PA1619 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-6,644503674	-83,92166667	12,63023858	0,46904	0,037460084
4809	PA4814_fadH2_at	PA4814 /GENE=fadH2 /DEF=2,4-dienoyl-CoA reductase FadH2 /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	-6,638531975	-67,58166667	10,18021257	0,36779	0,037460084
4085	PA4083_at	PA4083 /DEF=probable pili assembly chaperone /FUNCTION=Motility & Attachment; Chaperones & heat shock proteins	-6,634167299	-23,29333333	3,511116359	0,49211	0,037460084
3884	PA3880_at	PA3880 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,620185747	-89,885	13,5774136	0,44204	0,037460084
2097	PA2088_at	PA2088 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,579920944	-25,63	3,895183577	0,38409	0,037460084
4292	PA4296_at	PA4296 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	-6,562397943	-137,015	20,87880089	0,27657	0,037460084
244	PA0229_pcaT_at	PA0229 /GENE=pcaT /DEF=dicarboxylic acid transporter PcaT /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-6,562290089	-20,85	3,177244486	0,45811	0,037460084
121	PA0106_coxA_at	PA0106 /GENE=coxA /DEF=cytochrome c oxidase, subunit I /FUNCTION=Energy metabolism	-6,525260279	-433,6466667	66,45660834	0,10792	0,037460084
2382	PA2375_i_at	PA2375 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-6,518942782	-72,32	11,0938234	0,43125	0,037460084
4465	PA4469_at	PA4469 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,483857738	-72,34666667	11,15796638	0,44925	0,037460084
1964	PA1954_at	PA1954 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,477969737	-33,43833333	5,161853897	0,37530	0,037460084
153	PA0138_at	PA0138 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-6,460699064	-48,13	7,449658237	0,35884	0,037460084
4853	PA4858_at	PA4858 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,456543396	-14,895	2,306961959	0,49966	0,037460084
4360	PA4364_at	PA4364 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,451630845	-28,22833333	4,375379499	0,43716	0,037460084
379	PA0364_at	PA0364 /DEF=probable oxidoreductase /FUNCTION=Putative enzymes	-6,451187016	-22,42	3,475329415	0,44647	0,037460084
5462	PA5468_at	PA5468 /DEF=probable citrate transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-6,443666023	-42,87	6,653044998	0,31988	0,037460084

ANHANG

2294	PA2285_at	PA2285 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,441507066	-71,95833333	11,17104004	0,32741	0,037460084
5353	PA5359_at	PA5359 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,440596048	-132,8533333	20,62749043	0,40332	0,037460084
1980	PA1970_at	PA1970 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,432380384	-19,95166667	3,10175479	0,49064	0,037460084
2941	PA2936_at	PA2936 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown: Membrane proteins	-6,417497314	-33,04333333	5,148943851	0,34928	0,037460084
4879	PA4884_at	PA4884 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,391212374	-54,26666667	8,490825135	0,47146	0,037460084
4881	PA4886_at	PA4886 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-6,354932651	-24,98666667	3,931853891	0,45440	0,037460084
362	PA0347_glpQ_at	PA0347 /GENE=glpQ /DEF=glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, periplasmic /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	-6,321889988	-49,57833333	7,842327757	0,36725	0,037460084
2877	PA2872_at	PA2872 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,320603311	-85,06666667	13,45863084	0,42585	0,037460084
2353	PA2346_at	PA2346 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-6,318974808	-29,09833333	4,604913648	0,40299	0,037460084
4463	PA4467_at	PA4467 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown: Membrane proteins	-6,30438052	-33,18666667	5,264064655	0,44064	0,037460084
4029	PA4027_at	PA4027 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,296626008	-46,78833333	7,430699119	0,41324	0,037460084
2355	PA2348_at	PA2348 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-6,293615095	-47,78333333	7,592350757	0,33696	0,037460084
2329	PA2322_at	PA2322 /DEF=gluconate permease /FUNCTION=Transport of small molecules	-6,280595299	-49,22666667	7,837898212	0,40607	0,037460084
241	PA0226_at	PA0226 /DEF=probable CoA transferase, subunit A /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-6,259236148	-148,815	23,7752653	0,23509	0,037460084
4908	PA4913_at	PA4913 /DEF=probable binding protein component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-6,204697498	-85,80166667	13,82850118	0,20937	0,037460084
3095	PA3090_at	PA3090 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,20194262	-45,80833333	7,386126596	0,43281	0,037460084
2102	PA2093_at	PA2093 /DEF=probable sigma-70 factor, ECF subfamily /FUNCTION=Transcriptional regulators	-6,18654025	-29,34666667	4,743631413	0,41377	0,037460084
4817	PA4822_at	PA4822 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown: Membrane proteins	-6,185612419	-44,71666667	7,229141375	0,35539	0,037460084
5215	PA5220_at	PA5220 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,177962614	-31,34166667	5,073139581	0,49329	0,037460084
3096	PA3091_at	PA3091 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,15393341	-25,14166667	4,085462905	0,47821	0,037460084
4587	PA4591_at	PA4591 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,153042464	-114,8716667	18,66908401	0,25326	0,037460084
2104	PA2095_at	PA2095 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified,	-6,15189165	-19,18666667	3,118823893	0,46486	0,037460084

ANHANG

		unknown					
3455	PA3451_at	PA3451 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-6,114095858	-40,72833333	6,661382856	0,29106	0,037460084
4904	PA4909_at	PA4909 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-6,095778687	-39,96833333	6,556723167	0,31608	0,037460084
4225	PA4228_pchD_at	PA4228 /GENE=pchD /DEF=pyochelin biosynthesis protein PchD /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-6,095130532	-306,59	50,30080954	0,26614	0,037460084
4357	PA4361_at	PA4361 /DEF=probable oxidoreductase /FUNCTION=Putative enzymes	-6,093054553	-65,44166667	10,74037104	0,45281	0,037460084
2314	PA2306_at	PA2306 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-6,04607454	-31,79333333	5,25850833	0,36926	0,037460084
2302	PA2294_at	PA2294 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-6,01867127	-42,87666667	7,12394227	0,44434	0,037460084
2317	PA2309_at	PA2309 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,9733582	-44,465	7,443886422	0,33654	0,037460084
4466	PA4470_fumC1_at	PA4470 /GENE=fumC1 /DEF=fumarate hydratase /FUNCTION=Energy metabolism	-5,972950037	-67,44333333	11,29146116	0,46486	0,037460084
3453	PA3449_at	PA3449 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,972942255	-19,69666667	3,297648935	0,46253	0,037460084
4797	PA4802_at	PA4802 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,951746246	-74,36	12,49381222	0,39212	0,037460084
2332	PA2325_at	PA2325 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-5,945052536	-46,82333333	7,876016747	0,39227	0,037460084
4359	PA4363_iciA_at	PA4363 /GENE=iciA /DEF=inhibitor of chromosome initiation IciA /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	-5,941127976	-23,46	3,948745103	0,45573	0,037460084
2525	PA2519_xylS_at	PA2519 /GENE=xylS /DEF=transcriptional regulator XylS /FUNCTION=Transcriptional regulators	-5,936552593	-59,87666667	10,0861006	0,39106	0,037460084
3430	PA3425_at	PA3425 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,893298842	-51,04	8,660684171	0,48118	0,037460084
4831	PA4836_at	PA4836 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,883116914	-42,64666667	7,248991868	0,33987	0,037460084
380	PA0365_at	PA0365 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-5,871148982	-60,27	10,26545233	0,42932	0,037460084
4320	PA4324_at	PA4324 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,852216745	-52,95	9,047853541	0,39736	0,037460084
4380	PA4384_at	PA4384 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,830425888	-63,21666667	10,84254699	0,48250	0,037460084
4042	PA4040_at	PA4040 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,820398774	-49,61	8,523470972	0,39151	0,037460084
2520	PA2514_antC_at	PA2514 /GENE=antC /DEF=anthranilate dioxygenase reductase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-5,812942599	-182,2483333	31,35216463	0,10885	0,037460084
1888	PA1874_at	PA1874 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,807331682	-50,64833333	8,721446632	0,42486	0,037460084

ANHANG

3483	PA3479_rhIA_at	PA3479 /GENE=rhIA /DEF=rhamnosyltransferase chain A /FUNCTION=Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-5,804373366	-24,56166667	4,231579383	0,41971	0,037460084
1438	PA1423_at	PA1423 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	-5,750300113	-17,93833333	3,119547325	0,46654	0,037460084
2078	PA2069_at	PA2069 /DEF=probable carbamoyl transferase /FUNCTION=Putative enzymes	-5,741447128	-41,45833333	7,220885677	0,37048	0,037460084
5866	ig_5563964_5563286_at	Intergenic region between PA5125 and PA5126, 5563286-5563964, (-) strand	-5,740820366	-39,03166667	6,798970213	0,39495	0,037460084
4876	PA4881_at	PA4881 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,740764394	-63,43666667	11,05021254	0,25932	0,037460084
3072	PA3067_at	PA3067 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-5,717854195	-81,28666667	14,21628882	0,33542	0,037460084
2086	PA2077_at	PA2077 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,654683157	-26,54	4,693454835	0,49614	0,037460084
4892	PA4897_at	PA4897 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,648627958	-31,91333333	5,649749563	0,44178	0,037460084
3422	PA3417_at	PA3417 /DEF=probable pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit /FUNCTION=Energy metabolism	-5,63800365	-82,335	14,60357338	0,32977	0,037460084
1706	PA1692_at	PA1692 /DEF=probable translocation protein in type III secretion /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	-5,63083611	-115,5883333	20,52773888	0,27318	0,037460084
4065	PA4063_at	PA4063 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,618019832	-58,8	10,46632119	0,39740	0,037460084
5690	Pae_tRNA_Gly_s_at	tRNA_Glycine, 4785688-4785761 (-) strand	-5,590632586	-325,1016667	58,15114151	0,30085	0,037460084
5840	ig_4888194_4889111_at	Intergenic region between PA4421 and PA4422, 4888194-4889111, (+) strand	-5,586300663	-32,115	5,748884984	0,42453	0,037460084
4782	PA4786_at	PA4786 /DEF=probable short-chain dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-5,58437987	-33,84166667	6,060058136	0,49785	0,037460084
883	PA0868_at	PA0868 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,557289845	-59,18166667	10,64937556	0,46246	0,037460084
1917	PA1905_s_at	PA1905 /DEF=probable pyridoxamine 5'-phosphate oxidase /FUNCTION=Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-5,494189062	-62,27833333	11,33530948	0,38422	0,037460084
400	PA0385_at	PA0385 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,486345683	-39,12666667	7,131644436	0,35984	0,037460084
4171	PA4169_at	PA4169 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,485536299	-27,79333333	5,066657446	0,46814	0,037460084
3420	PA3415_at	PA3415 /DEF=probable dihydrolipoamide acetyltransferase /FUNCTION=Energy metabolism	-5,475910373	-55,90833333	10,20987005	0,44725	0,037460084
228	PA0213_at	PA0213 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-5,470579585	-34,32	6,273558307	0,42281	0,037460084
4148	PA4146_at	PA4146 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,459943807	-35,16166667	6,439931968	0,43339	0,037460084

ANHANG

2348	PA2341_at	PA2341 /DEF=probable ATP-binding component of ABC maltose/mannitol transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-5,458467341	-31,76166667	5,81878844	0,46848	0,037460084
5761	ig_2568284_2568929_at	Intergenic region between PA2425 and PA2426, 2568284-2568929, (+) strand	-5,451279695	-13,00833333	2,386289837	0,47814	0,037460084
796	PA0781_at	PA0781 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,42917732	-42,32	7,79491947	0,42035	0,037460084
2307	PA2299_at	PA2299 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-5,426942154	-30,41666667	5,604752327	0,47111	0,037460084
169	PA0154_pcaG_at	PA0154 /GENE=pcaG /DEF=protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-5,406121486	-212,1383333	39,2403933	0,27603	0,037460084
3727	PA3723_at	PA3723 /DEF=probable FMN oxidoreductase /FUNCTION=Putative enzymes	-5,390000613	-443,2116667	82,22850023	0,33337	0,037460084
4226	PA4229_pchC_at	PA4229 /GENE=pchC /DEF=pyochelin biosynthetic protein PchC /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-5,379635518	-181,36	33,7123211	0,32573	0,037460084
4865	PA4870_at	PA4870 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,374122268	-54,26333333	10,09715273	0,46563	0,037460084
1777	PA1763_at	PA1763 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,344051535	-16,63666667	3,113118681	0,46489	0,037460084
4191	PA4189_at	PA4189 /DEF=probable aldehyde dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-5,317747641	-40,9	7,691226203	0,44296	0,037460084
4219	PA4222_at	PA4222 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-5,310880007	-139,7766667	26,31892765	0,39391	0,037460084
2301	PA2293_at	PA2293 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,310535533	-56,06833333	10,55794335	0,41384	0,037460084
1281	PA1266_at	PA1266 /DEF=probable oxidoreductase /FUNCTION=Putative enzymes	-5,299424043	-34,16666667	6,447241509	0,47274	0,037460084
4043	PA4041_at	PA4041 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-5,294772013	-48,72666667	9,202788438	0,33494	0,037460084
2283	PA2274_at	PA2274 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,292053928	-71,31333333	13,47554925	0,25018	0,037460084
1883	PA1869_at	PA1869 /DEF=probable acyl carrier protein /FUNCTION=Fatty acid and phospholipid metabolism	-5,23899386	-31,89833333	6,088637281	0,42126	0,037460084
1190	PA1175_napD_at	PA1175 /GENE=napD /DEF=NapD protein of periplasmic nitrate reductase /FUNCTION=Energy metabolism	-5,226168632	-57,74666667	11,04952227	0,35792	0,037460084
256	PA0241_at	PA0241 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-5,214625796	-90,54	17,3627032	0,28538	0,037460084
4393	PA4397_panE_at	PA4397 /GENE=panE /DEF=ketopantoate reductase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	-5,206215251	-44,34	8,51674352	0,43453	0,037460084
2866	PA2861_ligT_at	PA2861 /GENE=ligT /DEF=2'-5' RNA ligase /FUNCTION=Transcription, RNA processing and degradation	-5,19677055	-16,285	3,133676933	0,45693	0,037460084
5208	PA5213_gcvP1_at	PA5213 /GENE=gcvP1 /DEF=glycine cleavage system protein P1 /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,18806697	-35,15166667	6,77548437	0,48699	0,037460084
4898	PA4903_at	PA4903 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins;	-5,172913508	-26,025	5,031013946	0,48927	0,037460084

ANHANG

		Transport of small molecules					
2296	PA2287_at	PA2287 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,164077898	-44,66166667	8,64852691	0,38859	0,037460084
2070	PA2061_at	PA2061 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-5,126964892	-15,88666667	3,098649396	0,46683	0,037460084
4387	PA4391_at	PA4391 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,122090004	-43,005	8,395986788	0,42198	0,037460084
1868	PA1854_at	PA1854 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,121094683	-37,95666667	7,411826771	0,36385	0,037460084
1937	PA1925_at	PA1925 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,111002022	-17,205	3,3662675	0,48529	0,037460084
3356	PA3351_at	PA3351 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,071544055	-713,7866667	140,7434617	0,36974	0,037460084
2515	PA2509_catB_at	PA2509 /GENE=catB /DEF=muconate cycloisomerase I /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-5,044187374	-49,75666667	9,864159077	0,35548	0,037460084
206	PA0191_at	PA0191 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-4,95020867	-26,54666667	5,362736894	0,43745	0,037460084
2948	PA2943_at	PA2943 /DEF=phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	-4,946753039	-67,07	13,5583886	0,45189	0,037460084
128	PA0113_at	PA0113 /DEF=probable cytochrome c oxidase assembly factor /FUNCTION=Energy metabolism	-4,909037542	-107,825	21,96459063	0,28813	0,037460084
2412	PA2405_at	PA2405 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,895169509	-35,585	7,269411189	0,39731	0,037460084
2380	PA2373_at	PA2373 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,884749842	-51,20333333	10,48228364	0,39706	0,037460084
253	PA0238_at	PA0238 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,880132273	-216,3216667	44,3270089	0,13646	0,037460084
2414	PA2407_at	PA2407 /DEF=probable adhesion protein /FUNCTION=Motility & Attachment	-4,873929423	-48,24833333	9,899267952	0,47005	0,037460084
179	PA0164_at	PA0164 /DEF=probable gamma-glutamyltranspeptidase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	-4,867718993	-30,79833333	6,327056549	0,42885	0,037460084
2318	PA2310_at	PA2310 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-4,854092295	-29,15833333	6,006958987	0,45133	0,037460084
4377	PA4381_at	PA4381 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	-4,842205974	-61,78833333	12,76036866	0,46541	0,037460084
4371	PA4375_at	PA4375 /DEF=probable RND efflux transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-4,841029693	-27,67166667	5,716070428	0,43074	0,037460084
197	PA0182_at	PA0182 /DEF=probable short-chain dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-4,83770336	-31,82	6,577501272	0,45501	0,037460084
3904	PA3900_at	PA3900 /DEF=probable transmembrane sensor /FUNCTION=Transcriptional regulators; Membrane proteins	-4,831501746	-54,17666667	11,21321476	0,47957	0,037460084
4222	PA4225_pchF_at	PA4225 /GENE=pchF /DEF=pyochelin synthetase /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-4,829801061	-73,01833333	15,11829005	0,40684	0,037460084

ANHANG

5028	PA5033_at	PA5033 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,829148908	-43,685	9,046107468	0,43494	0,037460084
4040	PA4038_at	PA4038 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-4,817585886	-35,665	7,403085455	0,30287	0,037460084
5506	PA5512_at	PA5512 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-4,800200692	-51,66	10,76205003	0,47757	0,037460084
1078	PA1063_at	PA1063 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,793660836	-20,48	4,272308931	0,49420	0,037460084
5107	PA5112_estA_at	PA5112 /GENE=estA /DEF=esterase EstA /FUNCTION=Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate); Fatty acid and phospholipid metabolism	-4,782029739	-178,0983333	37,24325089	0,41237	0,037460084
4676	PA4680_at	PA4680 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,771167739	-68,875	14,43566937	0,26300	0,037460084
3411	PA3406_hasD_at	PA3406 /GENE=hasD /DEF=transport protein HasD /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	-4,767888109	-25,73666667	5,397917502	0,49460	0,037460084
3416	PA3411_r_at	PA3411 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,744949132	-43,365	9,139191758	0,46518	0,037460084
3258	PA3253_at	PA3253 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-4,733581549	-15,80333333	3,338557321	0,45165	0,037460084
2431	PA2424_at	PA2424 /DEF=probable non-ribosomal peptide synthetase /FUNCTION=Adaptation, protection	-4,721021287	-30,71666667	6,506360552	0,44903	0,037460084
3666	PA3662_at	PA3662 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,655665277	-328,7116667	70,60466058	0,42056	0,037460084
5476	PA5482_at	PA5482 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-4,640093752	-820,9716667	176,9299739	0,44329	0,037460084
3990	PA3986_at	PA3986 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,636964666	-68,86833333	14,85202892	0,48386	0,037460084
1344	PA1329_at	PA1329 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,62147377	-24,195	5,235342924	0,45466	0,037460084
4378	PA4382_at	PA4382 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,60804586	-46,01333333	9,985433029	0,34547	0,037460084
2072	PA2063_at	PA2063 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,590518742	-29,23833333	6,369287433	0,47779	0,037460084
2873	PA2868_i_at	PA2868 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-4,571843612	-65,42333333	14,31005495	0,27969	0,037460084
4361	PA4365_at	PA4365 /DEF=probable transporter /FUNCTION=Transport of small molecules; Membrane proteins	-4,570911535	-22,21833333	4,860810182	0,48632	0,037460084
252	PA0237_at	PA0237 /DEF=probable oxidoreductase /FUNCTION=Putative enzymes	-4,559389106	-141,5516667	31,04619136	0,32078	0,037460084
1191	PA1176_napF_at	PA1176 /GENE=napF /DEF=ferredoxin protein NapF /FUNCTION=Energy metabolism	-4,549881039	-25,17	5,532012768	0,41560	0,037460084
203	PA0188_at	PA0188 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-4,532799583	-93,23333333	20,5685982	0,31047	0,037460084
3534	PA3530_at	PA3530 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,503474982	-457,4533333	101,577856	0,19188	0,037460084

ANHANG

2989	PA2984_at	PA2984 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-4,475526696	-46,34833333	10,35595059	0,37690	0,037460084
4777	PA4781_at	PA4781 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	-4,453347221	-78,78666667	17,6915616	0,45532	0,037460084
1205	PA1190_at	PA1190 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-4,418944607	-338,9183333	76,69666933	0,21874	0,037460084
2524	PA2518_xylX_at	PA2518 /GENE=xylX /DEF=toluate 1,2-dioxygenase alpha subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-4,416329387	-15,78333333	3,573857824	0,49461	0,037460084
5390	PA5396_at	PA5396 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,405424488	-237,6383333	53,94221011	0,16068	0,037460084
2320	PA2312_at	PA2312 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-4,375992201	-39,10833333	8,937020802	0,41446	0,037460084
2514	PA2508_catC_at	PA2508 /GENE=catC /DEF=muconolactone delta-isomerase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-4,352795034	-569,7166667	130,8852501	0,05449	0,037460084
242	PA0227_at	PA0227 /DEF=probable CoA transferase, subunit B /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-4,342094005	-178,02	40,99865175	0,15431	0,037460084
1705	PA1691_pscT_at	PA1691 /GENE=pscT /DEF=translocation protein in type III secretion /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	-4,327892185	-17,89666667	4,135192353	0,48025	0,037460084
341	PA0326_at	PA0326 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-4,308092727	-76,91	17,85244768	0,42643	0,037460084
2688	PA2682_at	PA2682 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-4,293944192	-83,915	19,54263871	0,42762	0,037460084
2519	PA2513_antB_at	PA2513 /GENE=antB /DEF=anthranilate dioxygenase small subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-4,279994809	-898,2133333	209,8631829	0,02397	0,037460084
4798	PA4803_at	PA4803 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,234850682	-44,85333333	10,5914793	0,48510	0,037460084
1915	PA1903_s_at	PA1903 /DEF=phenazine biosynthesis protein PhzE /FUNCTION=Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-4,213002011	-47,42166667	11,25602754	0,46376	0,037460084
4030	PA4028_i_at	PA4028 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,208768474	-64,77666667	15,39088383	0,47300	0,037460084
4223	PA4226_pchE_at	PA4226 /GENE=pchE /DEF=dihydroaeruginosic acid synthetase /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-4,178438956	-273,4033333	65,43193193	0,31811	0,037460084
4433	PA4437_at	PA4437 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,173985086	-40,21333333	9,634278156	0,49761	0,037460084
4903	PA4908_at	PA4908 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,145536941	-43,34833333	10,45662696	0,45258	0,037460084
2100	PA2091_at	PA2091 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-4,129487336	-59,40666667	14,38596654	0,43892	0,037460084
1862	PA1848_at	PA1848 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-4,125317371	-21,54666667	5,223032492	0,47016	0,037460084
3994	PA3990_at	PA3990 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical,	-4,088011136	-36,02166667	8,811538293	0,47817	0,037460084

ANHANG

		unclassified, unknown					
2087	PA2078_at	PA2078 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,072919929	-31,755	7,796617795	0,44299	0,037460084
4073	PA4071_at	PA4071 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,066659971	-29,57666667	7,272962794	0,48947	0,037460084
138	PA0123_at	PA0123 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-4,061446667	-52,03	12,8107062	0,43261	0,037460084
2062	PA2053_cynT_at	PA2053 /GENE=cynT /DEF=carbonate dehydratase /FUNCTION=Central intermediary metabolism	-4,059213299	-55,67	13,7144801	0,30716	0,037460084
4376	PA4380_at	PA4380 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Two-component regulatory systems	-4,048451762	-42,17166667	10,41673932	0,49525	0,037460084
5398	PA5404_at	PA5404 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,033798915	-19,58166667	4,854398318	0,49488	0,037460084
4084	PA4082_at	PA4082 /DEF=probable adhesin /FUNCTION=Motility & Attachment	-4,018816418	-18,47	4,595880498	0,44390	0,037460084
326	PA0311_at	PA0311 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,986438652	-75,34	18,89907423	0,41050	0,037460084
5656	Pae_L81176cids6_at	L81176 /GENE= /PROD=unknown /FEATURE=cds6 /DEFINITION=Pseudomonas aeruginosa flagellin (fliC) gene, partial cds; FlaG (flaG), flagellar cap (fliD), FliS (fliS), and FleQ (fleQ) genes, complete cds; and unknown genes.	-3,982779833	-178,715	44,87192551	0,19345	0,037460084
3602	PA3598_at	PA3598 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,973544237	-22,70166667	5,713203456	0,48035	0,037460084
1559	PA1545_at	PA1545 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,936337226	-52,835	13,42237643	0,21938	0,037460084
3713	PA3709_at	PA3709 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-3,933973572	-43,465	11,04862532	0,47700	0,037460084
3054	PA3049_rmf_at	PA3049 /GENE=rmf /DEF=ribosome modulation factor /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	-3,915563317	-2962,338333	756,5548285	0,33850	0,037460084
1315	PA1300_at	PA1300 /DEF=probable sigma-70 factor, ECF subfamily /FUNCTION=Transcriptional regulators	-3,913884136	-29,7	7,588369754	0,45574	0,037460084
439	PA0424_mexR_at	PA0424 /GENE=mexR /DEF=multidrug resistance operon repressor MexR /FUNCTION=Transcriptional regulators	-3,912345815	-88,415	22,59897366	0,44536	0,037460084
1913	PA1901_s_at	PA1901 /DEF=phenazine biosynthesis protein PhzC /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-3,899484717	-78,58166667	20,15180784	0,40052	0,037460084
175	PA0160_at	PA0160 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,880017286	-40,58	10,45871629	0,46668	0,037460084
4213	PA4211_g_at	PA4211 /DEF=probable phenazine biosynthesis protein /FUNCTION=Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	-3,823166685	-21,05166667	5,506342882	0,41442	0,037460084
603	PA0588_at	PA0588 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,757273623	-527,6783333	140,4418167	0,42421	0,037460084
5410	PA5416_soxB_at	PA5416 /GENE=soxB /DEF=sarcosine oxidase beta subunit	-3,696802159	-18,34666667	4,962847856	0,49597	0,037460084

ANHANG

		/FUNCTION=Carbon compound catabolism					
176	PA0161_at	PA0161 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,695688889	-40,64	10,99659663	0,28501	0,037460084
249	PA0234_at	PA0234 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,652898389	-22,21	6,080103423	0,48860	0,037460084
5809	ig_3648915_3649704_at	Intergenic region between PA3284 and PA3285, 3648915-3649704, (+) strand	-3,647052746	-22,30666667	6,116354278	0,49265	0,037460084
2354	PA2347_at	PA2347 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-3,596594006	-32,05833333	8,913525763	0,49833	0,037460084
5470	PA5476_citA_at	PA5476 /GENE=citA /DEF=citrate transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-3,586054696	-30,4	8,477282858	0,45743	0,037460084
5391	PA5397_at	PA5397 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,54873185	-58,95166667	16,61203753	0,42869	0,037460084
4152	PA4150_at	PA4150 /DEF=probable dehydrogenase E1 component /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-3,486481049	-146,6233333	42,05482011	0,33519	0,037460084
5868	ig_5774806_5775619_at	Intergenic region between PA5169 and PA5170, 5774806-5775619, (+) strand	-3,46211974	-19,995	5,775363507	0,47844	0,037460084
120	PA0105_coxB_at	PA0105 /GENE=coxB /DEF=cytochrome c oxidase, subunit II /FUNCTION=Energy metabolism	-3,454640684	-299,3266667	86,64480449	0,10418	0,037460084
243	PA0228_pcaF_at	PA0228 /GENE=pcaF /DEF=beta-ketoadipyl CoA thiolase PcaF /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Fatty acid and phospholipid metabolism	-3,418453979	-61,25833333	17,91989411	0,25377	0,037460084
3911	PA3907_at	PA3907 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,41294465	-33,89333333	9,930818342	0,42453	0,037460084
5415	PA5421_fdhA_at	PA5421 /GENE=fdhA /DEF=glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase /FUNCTION=Central intermediary metabolism	-3,317491273	-415,7983333	125,3351702	0,16083	0,037460084
4035	PA4033_at	PA4033 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,315756529	-27,645	8,337463791	0,36720	0,037460084
2518	PA2512_antA_at	PA2512 /GENE=antA /DEF=anthranilate dioxygenase large subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-3,299428314	-447,1383333	135,5199419	0,07694	0,037460084
4894	PA4899_at	PA4899 /DEF=probable aldehyde dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	-3,282694574	-57,45333333	17,50188208	0,49869	0,037460084
4350	PA4354_at	PA4354 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,277015919	-40,91166667	12,4844272	0,47448	0,037460084
2942	PA2937_at	PA2937 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,249146215	-78,985	24,3094631	0,49645	0,037460084
338	PA0323_at	PA0323 /DEF=probable binding protein component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	-3,200224575	-13,42	4,193455704	0,49625	0,037460084
2513	PA2507_catA_at	PA2507 /GENE=catA /DEF=catechol 1,2-dioxygenase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	-3,155677459	-874,29	277,0530294	0,03206	0,037460084
4566	PA4570_at	PA4570 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,071414883	-128,31	41,77553502	0,28217	0,037460084

Liste der Transkriptomdaten (Kapitel C.4.2.2)

$$Q_n = \bar{A}_n / \bar{E}_n$$

$(A_n = \{T_n^{M13}, T_n^{M22}, T_n^{M25}, T_n^{M26}\}; E_n = \{T_n^{M1}, T_n^{M9}, T_n^{M11}, T_n^{M23}\}; n: \text{CF-Nr})$

Significant Genes List

Input Parameters

Imputation Engine	10-Nearest Neighbor Imputer
Data Type	Two Class, unpaired data
Data in log scale?	FALSCH
Number of Permutations	100
Blocked Permutation?	FALSCH
RNG Seed	1234567
(Delta, Fold Change)	(2,19566, 2,00000)
(Upper Cutoff, Lower Cutoff)	(3,57282, -3,31712)

Computed Quantities

Computed Exchangeability Factor S0	0,068593371
S0 percentile	0
False Significant Number (Median, 90 percentile)	(0,00000, 0,30576)
False Discovery Rate (Median, 90 percentile)	(0,00000, 0,11626)
Pi0Hat	0,30576

123 Positive Significant Genes

Row	Gene Name	Gene ID	Score(d)	Numerator(r)	Denomina- tor(s+s0)	Fold Change	q-value (%)
822	PA0807_at	PA0807 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unc-	6,657302564	300,6691667	45,16381279	6,82015	0,089666484

ANHANG

		lassified, unknown							
2206	PA2197_at	PA2197 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	5,702484327	125,3208333	21,97653271	5,17945	0,089666484		
2207	PA2198_at	PA2198 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,099352283	107,5658333	21,09401888	4,75568	0,089666484		
2012	PA2002_at	PA2002 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Membrane proteins; Hypothetical, unclassified, unknown	3,83681875	171,5116667	44,70152953	4,61858	0,089666484		
3464	PA3460_at	PA3460 /DEF=probable acetyltransferase /FUNCTION=Putative enzymes	5,076464335	330,8975	65,18267009	4,47694	0,089666484		
1648	PA1634_kdpB_at	PA1634 /GENE=kdpB /DEF=potassium-transporting ATPase, B chain /FUNCTION=Transport of small molecules	3,73333477	241,9775	64,81537684	4,24675	0,089666484		
2758	PA2753_at	PA2753 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,911337814	357,2075	91,32616946	4,11220	0,089666484		
5165	PA5170_arcD_at	PA5170 /GENE=arcD /DEF=arginine/ornithine antiporter /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Membrane proteins; Transport of small molecules	5,423951769	1813,003333	334,258749	3,74775	0,089666484		
5440	PA5446_i_at	PA5446 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,527658746	274,0466667	60,52723538	3,44283	0,089666484		
1576	PA1562_acnA_at	PA1562 /GENE=acnA /DEF=aconitate hydratase 1 /FUNCTION=Energy metabolism	3,961392462	103,9208333	26,23341018	3,40020	0,089666484		
2123	PA2114_at	PA2114 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,316612174	381,0008333	88,26385554	3,33221	0,089666484		
1647	PA1633_kdpA_at	PA1633 /GENE=kdpA /DEF=potassium-transporting ATPase, A chain /FUNCTION=Transport of small molecules	3,720287905	142,6808333	38,35209451	3,26916	0,089666484		
5010	PA5015_aceE_at	PA5015 /GENE=aceE /DEF=pyruvate dehydrogenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Energy metabolism	4,450916482	337,8308333	75,90140922	3,26825	0,089666484		
1588	PA1574_at	PA1574 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,680026431	142,6975	38,77621606	3,22660	0,089666484		
3535	PA3531_bfrB_at	PA3531 /GENE=bfrB /DEF=bacterioferritin /FUNCTION=Transport of small molecules; Adaptation, protection	4,90765059	148,69	30,29759297	3,18504	0,089666484		
497	PA0482_glcB_at	PA0482 /GENE=glcB /DEF=malate synthase G /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Central intermediary metabolism	6,006212125	568,525	94,65616401	3,11236	0,089666484		
2208	PA2199_at	PA2199 /DEF=probable dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	5,210193519	83,33833333	15,99524721	3,08480	0,089666484		
1594	PA1580_gltA_at	PA1580 /GENE=gltA /DEF=citrate synthase /FUNCTION=Energy metabolism	8,930365413	912,9708333	102,2321922	3,05005	0,089666484		
1585	PA1571_at	PA1571 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,048528017	433,9933333	107,197809	3,03726	0,089666484		
1649	PA1635_kdpC_at	PA1635 /GENE=kdpC /DEF=potassium-transporting ATPase, C chain	4,001342527	138,4483333	34,60047032	3,00330	0,089666484		

ANHANG

		/FUNCTION=Transport of small molecules							
3283	PA3278_at	PA3278 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,464079404	169,5183333	37,97386157	2,95711	0,089666484		
5896	ig_884172_884799_at	Intergenic region between PA0826 and PA0827, 884172-884799, (+) strand PA3459 /DEF=probable glutamine amidotransferase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	6,070267295	96,33416667	15,86983933	2,92325	0,089666484		
3463	PA3459_at	PA1200 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,055843609	208,8908333	51,50367062	2,88876	0,089666484		
1215	PA1200_at	PA2575 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,317235331	128,0758333	29,66616909	2,87036	0,089666484		
2581	PA2575_at	PA1969 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	8,340475371	139,4266667	16,71687289	2,82747	0,089666484		
1979	PA1969_at	PA0962 /DEF=probable dna-binding stress protein /FUNCTION=Adaptation, protection	7,847612415	114,8466667	14,63459975	2,80987	0,089666484		
977	PA0962_at	PA2016 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	7,274404101	714,0241667	98,15569176	2,80933	0,089666484		
2026	PA2016_at	PA5016 /GENE=aceF /DEF=dihydrolipoamide acetyltransferase /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Energy metabolism	4,227354211	729,43	172,5500073	2,76915	0,089666484		
5011	PA5016_aceF_at	PA4605 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,056852269	266,4341667	52,68774971	2,76285	0,089666484		
4601	PA4605_at	PA2453 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,318137647	205,2616667	47,53476694	2,75416	0,089666484		
2460	PA2453_at	PA0943 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,212726197	47,60833333	11,30107467	2,73716	0,089666484		
958	PA0943_at	PA2646 /GENE=nuoK /DEF=NADH dehydrogenase I chain K /FUNCTION=Energy metabolism	5,564247843	227,6041667	40,90474995	2,73712	0,089666484		
2652	PA2646_nuoK_at	PA2643 /GENE=nuoH /DEF=NADH dehydrogenase I chain H /FUNCTION=Energy metabolism	7,35917569	164,75	22,38701819	2,70046	0,089666484		
2649	PA2643_nuoH_at	PA2754 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	6,533383041	239,5016667	36,65813946	2,66154	0,089666484		
2759	PA2754_at	PA0872 /GENE=phhA /DEF=phenylalanine-4-hydroxylase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	3,619534147	266,3891667	73,59763878	2,64479	0,089666484		
887	PA0872_phhA_at	PA0969 /GENE=tolQ /DEF=TolQ protein /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,248503414	1057,98	249,0241615	2,61408	0,089666484		
984	PA0969_tolQ_at	PA2647 /GENE=nuoL /DEF=NADH dehydrogenase I chain L	4,411271649	138,2675	31,34413634	2,57211	0,089666484		
2653	PA2647_nuoL_at		5,291844754	88,9675	16,8121901	2,57133	0,089666484		

ANHANG

		/FUNCTION=Energy metabolism							
956	PA0941_at	PA0941 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,268068217	42,12666667	9,870195255	2,53430	0,089666484		
1355	PA1340_at	PA1340 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=PA3813 /GENE=iscU /DEF=probable iron-binding protein IscU	6,245119175	66,27	10,61148685	2,52289	0,089666484		
3817	PA3813_iscU_at	/FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers PA1178 /GENE=oprH /DEF=outer membrane protein H1 precursor	5,280231381	165,3708333	31,31886113	2,51993	0,089666484		
1193	PA1178_oprH_at	/FUNCTION=Adaptation, protection; Membrane proteins	3,822991026	600,1883333	156,9944395	2,50817	0,089666484		
2488	PA2482_at	PA2482 /DEF=probable cytochrome c /FUNCTION=Energy metabolism PA1516 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,192816633	50,2275	9,672496365	2,49784	0,089666484		
1530	PA1516_at	PA5461 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,083130138	47,36083333	11,59914863	2,49066	0,089666484		
5455	PA5461_at	PA2744 /GENE=thrS /DEF=threonyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Translation, post-translational modification, degradation	5,779159844	286,6508333	49,60077954	2,46817	0,089666484		
2749	PA2744_thrS_at	PA2649 /GENE=nuoN /DEF=NADH dehydrogenase I chain N	4,699805498	113,9166667	24,23859173	2,45660	0,089666484		
2655	PA2649_nuoN_at	/FUNCTION=Energy metabolism PA5505 /DEF=probable TonB-dependent receptor /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	5,990534065	66,21	11,05243694	2,44582	0,089666484		
5499	PA5505_at	PA2970 /GENE=rpmF /DEF=50S ribosomal protein L32	4,444143608	177,9316667	40,03733505	2,42914	0,089666484		
2975	PA2970_rpmF_at	/FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation PA2645 /GENE=nuoJ /DEF=NADH dehydrogenase I chain J	3,846355932	158,3666667	41,17317	2,42757	0,089666484		
2651	PA2645_nuoJ_at	/FUNCTION=Energy metabolism PA0887 /GENE=acsA /DEF=acetyl-coenzyme A synthetase	5,721315218	91,15083333	15,93179712	2,42331	0,089666484		
902	PA0887_acsA_at	/FUNCTION=Carbon compound catabolism; Central intermediary metabolism PA3919 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,626635332	521,7208333	112,7646326	2,42207	0,089666484		
3923	PA3919_at		4,058548526	136,4425	33,61854592	2,42139	0,089666484		
2122	PA2113_at	PA2113 /DEF=probable porin /FUNCTION=Transport of small molecules PA5306 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,236862411	522,2966667	123,2743988	2,40590	0,089666484		
5300	PA5306_at	PA2659 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	6,306686464	160,6433333	25,47190736	2,39261	0,089666484		
2665	PA2659_at	PA0905 /GENE=csrA /DEF=carbon storage regulator	4,324181311	91,67916667	21,20150847	2,38610	0,089666484		
920	PA0905_csrA_at	/FUNCTION=Transcriptional regulators	4,119469889	176,0508333	42,73628357	2,38256	0,089666484		

ANHANG

3773	PA3769_guaA_at	PA3769 /GENE=guaA /DEF=GMP synthase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Nucleotide biosynthesis and metabolism	4,051151272	304,515	75,16752142	2,38046	0,089666484
2647	PA2641_nuoF_at	PA2641 /GENE=nuoF /DEF=NADH dehydrogenase I chain F /FUNCTION=Energy metabolism	5,861393302	143,4766667	24,47825274	2,37856	0,089666484
2121	PA2112_at	PA2112 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,875552473	780,0683333	201,2792599	2,37679	0,089666484
2810	PA2805_at	PA2805 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,651728452	227,4616667	62,28876809	2,35749	0,089666484
2452	PA2445_gcvP2_at	PA2445 /GENE=gcvP2 /DEF=glycine cleavage system protein P2 /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Central intermediary metabolism	3,713070879	237,6616667	64,0067681	2,34290	0,089666484
4263	PA4266_fusA1_at	PA4266 /GENE=fusA1 /DEF=elongation factor G /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	3,572958315	502,6716667	140,6878061	2,32675	0,089666484
2654	PA2648_nuoM_at	PA2648 /GENE=nuoM /DEF=NADH dehydrogenase I chain M /FUNCTION=Energy metabolism	5,103506132	88,55583333	17,35195982	2,30824	0,089666484
2650	PA2644_nuoI_at	PA2644 /GENE=nuoI /DEF=NADH Dehydrogenase I chain I /FUNCTION=Energy metabolism	6,350626908	142,5066667	22,43977937	2,28770	0,089666484
3576	PA3572_at	PA3572 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,867523127	404,6791667	104,6352286	2,28358	0,089666484
3774	PA3770_guaB_at	PA3770 /GENE=guaB /DEF=inosine-5'-monophosphate dehydrogenase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	3,609645878	162,0316667	44,88852152	2,28089	0,089666484
2645	PA2639_nuoD_at	PA2639 /GENE=nuoD /DEF=NADH dehydrogenase I chain C,D /FUNCTION=Energy metabolism	4,30530332	101,5666667	23,59105947	2,27659	0,089666484
4069	PA4067_oprG_at	PA4067 /GENE=oprG /DEF=outer membrane protein OprG precursor /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,145600323	642,5283333	154,9904196	2,27624	0,089666484
464	PA0449_at	PA0449 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,343349312	282,6191667	52,89176323	2,26696	0,089666484
4461	PA4465_at	PA4465 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,844210114	160,9216667	33,21938208	2,26672	0,089666484
3362	PA3357_dsdA_at	PA3357 /GENE=dsdA /DEF=D-serine dehydratase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	4,110254996	56,02333333	13,63013569	2,25189	0,089666484
4736	PA4740_pnp_at	PA4740 /GENE=pnp /DEF=polyribonucleotide nucleotidyltransferase /FUNCTION=Transcription, RNA processing and degradation	4,10265568	172,9541667	42,1566371	2,24841	0,089666484
5333	PA5339_at	PA5339 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,935135083	452,6641667	91,72275105	2,24446	0,089666484

ANHANG

1547	PA1533_at	PA1533 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	6,839061568	310,2533333	45,36489842	2,24310	0,089666484
2629	PA2623_icd_at	PA2623 /GENE=icd /DEF=isocitrate dehydrogenase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Carbon compound catabolism; Energy metabolism	7,052778324	784,9641667	111,2985735	2,24226	0,089666484
4002	PA3999_dacC_at	PA3999 /GENE=dacC /DEF=D-ala-D-ala-carboxypeptidase /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	5,766934633	298,3616667	51,73661323	2,23800	0,089666484
2538	PA2532_tpx_at	PA2532 /GENE=tpx /DEF=thiol peroxidase /FUNCTION=Adaptation, protection	4,394486387	219,8241667	50,02272104	2,23392	0,089666484
2119	PA2110_at	PA2110 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,771071024	282,9591667	75,03416533	2,23343	0,089666484
5013	PA5018_msrA_at	PA5018 /GENE=msrA /DEF=peptide methionine sulfoxide reductase /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	5,678433582	182,1908333	32,08469919	2,23001	0,089666484
4092	PA4090_at	PA4090 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,882907068	153,5916667	39,55584411	2,22999	0,089666484
1817	PA1803_lon_at	PA1803 /GENE=lon /DEF=Lon protease /FUNCTION=Adaptation, protection; Translation, post-translational modification, degradation	6,192499371	292,81	47,28462329	2,22421	0,089666484
4691	PA4695_ilvH_at	PA4695 /GENE=ilvH /DEF=acetolactate synthase isozyme III small subunit /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	5,3370787	231,4541667	43,36720136	2,22303	0,089666484
1528	PA1514_at	PA1514 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,933881887	29,5125	5,9815984	2,22032	0,089666484
983	PA0968_at	PA0968 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,229450304	73,5525	17,39055781	2,22015	0,089666484
4234	PA4237_rplQ_at	PA4237 /GENE=rplQ /DEF=50S ribosomal protein L17 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	3,672013743	422,53	115,0676521	2,20646	0,089666484
1028	PA1013_purC_at	PA1013 /GENE=purC /DEF=phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism	5,426971068	105,2158333	19,38757956	2,20231	0,089666484
916	PA0901_aruE_at	PA0901 /GENE=aruE /DEF=succinylglutamate desuccinylase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	3,972343858	99,84083333	25,1339856	2,18565	0,089666484
3619	PA3615_at	PA3615 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,463597552	101,3716667	22,71075416	2,18000	0,089666484
2648	PA2642_nuoG_at	PA2642 /GENE=nuoG /DEF=NADH dehydrogenase I chain G /FUNCTION=Energy metabolism	5,132917442	202,9516667	39,53924234	2,16731	0,089666484
2644	PA2638_nuoB_at	PA2638 /GENE=nuoB /DEF=NADH dehydrogenase I chain B	5,443717414	96,96083333	17,81151113	2,16318	0,089666484

ANHANG

		/FUNCTION=Energy metabolism							
4001	PA3998_at	PA3998 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	6,649252316	129,9908333	19,54969178	2,15459	0,089666484		
987	PA0972_tolB_at	PA0972 /GENE=tolB /DEF=TolB protein /FUNCTION=Transport of small molecules	5,942173523	338,0141667	56,8839273	2,12354	0,089666484		
1806	PA1792_at	PA1792 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,274795079	85,53416667	20,00895133	2,10711	0,089666484		
1809	PA1795_cysS_at	PA1795 /GENE=cysS /DEF=cysteinyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Translation, post-translational modification, degradation	4,62219781	68,93666667	14,91426146	2,10213	0,089666484		
4200	PA4198_at	PA4198 /DEF=probable AMP-binding enzyme /FUNCTION=Putative enzymes	3,967952882	182,5791667	46,01344122	2,09668	0,089666484		
330	PA0315_at	PA0315 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,903458419	260,8891667	44,19259833	2,09235	0,089666484		
4229	PA4232_ssb_at	PA4232 /GENE=ssb /DEF=single-stranded DNA-binding protein /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	3,743920967	180,3283333	48,16563569	2,08627	0,089666484		
4531	PA4535_at	PA4535 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	6,286731978	73,03333333	11,61705853	2,07687	0,089666484		
3835	PA3831_pepA_at	PA3831 /GENE=pepA /DEF=leucine aminopeptidase /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate); Transcription, RNA processing and degradation	4,600910559	82,785	17,99317742	2,07199	0,089666484		
1085	PA1070_braG_at	PA1070 /GENE=braG /DEF=branched-chain amino acid transport protein BraG /FUNCTION=Transport of small molecules	4,239757245	180,7733333	42,63766129	2,07063	0,089666484		
1808	PA1794_glnS_at	PA1794 /GENE=glnS /DEF=glutaminyl-tRNA synthetase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	3,737190311	92,33416667	24,70684097	2,06976	0,089666484		
2610	PA2604_at	PA2604 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,702228646	280,87	59,73125111	2,06969	0,089666484		
19	PA0004_gyrB_at	PA0004 /GENE=gyrB /DEF=DNA gyrase subunit B /FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair	4,357513874	117,0066667	26,85170261	2,05863	0,089666484		
281	PA0266_gabT_at	PA0266 /GENE=gabT /DEF=4-aminobutyrate aminotransferase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Carbon compound catabolism; Central intermediary metabolism	3,577403308	333,3	93,16813659	2,05770	0,089666484		
4178	PA4176_ppiC2_at	PA4176 /GENE=ppiC2 /DEF=peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C2 /FUNCTION=Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	4,346099441	94,3675	21,71314791	2,05603	0,089666484		
3836	PA3832_holC_at	PA3832 /GENE=holC /DEF=DNA polymerase III, chi subunit	5,600223252	29,18416667	5,21125058	2,04672	0,089666484		

ANHANG

609	PA0594_surA_at	/FUNCTION=DNA replication, recombination, modification and repair PA0594 /GENE=surA /DEF=peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SurA /FUNCTION=Adaptation, protection; Chaperones & heat shock proteins; Translation, post-translational modification, degradation	4,846056222	102,58	21,167728	2,04335	0,089666484
3019	PA3014_faoA_at	PA3014 /GENE=faoA /DEF=fatty-acid oxidation complex alpha-subunit /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Fatty acid and phospholipid metabolism	5,478017092	117,8566667	21,51447589	2,03794	0,089666484
1354	PA1339_at	PA1339 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	5,35594045	168,0133333	31,36952976	2,03300	0,089666484
2801	PA2796_tal_at	PA2796 /GENE=tal /DEF=transaldolase /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Energy metabolism PA4538 /GENE=ndh /DEF=NADH dehydrogenase /FUNCTION=Energy metabolism	5,310488	106,405	20,03676498	2,03202	0,089666484
4534	PA4538_ndh_at	PA2741 /GENE=rpIT /DEF=50S ribosomal protein L20 /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation	7,344977219	74,79583333	10,18326281	2,03177	0,089666484
2746	PA2741_rpIT_at	PA4756 /GENE=carB /DEF=carbamoylphosphate synthetase large subunit /FUNCTION=Nucleotide biosynthesis and metabolism; Amino acid biosynthesis and metabolism	4,163686109	382,235	91,80206912	2,03097	0,089666484
4752	PA4756_carB_at	PA1546 /GENE=hemN /DEF=oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	3,633175601	133,0366667	36,61718598	2,02713	0,089666484
1560	PA1546_hemN_at	PA4463 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown PA1597 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,784697827	81,30916667	21,48366141	2,02543	0,089666484
4459	PA4463_at	PA1414 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown PA3295 /DEF=probable HIT family protein /FUNCTION=Putative enzymes	4,357186163	1187,78	272,6025365	2,02386	0,089666484
1611	PA1597_at	PA1414 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown PA1337 /GENE=ansB /DEF=glutaminase-asparaginase /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	3,979264162	25,35833333	6,37261873	2,01824	0,089666484
1429	PA1414_at	PA3981 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown PA1808 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	3,688000578	1647,236667	446,6476162	2,01228	0,089666484
3300	PA3295_at	PA2709 /GENE=cysK /DEF=cysteine synthase A /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	3,896365234	43,5175	11,1687425	2,00828	0,089666484
1352	PA1337_ansB_at	PA3981 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown PA1808 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	5,601324059	225,7033333	40,29463944	2,00778	0,089666484
3985	PA3981_at	PA2709 /GENE=cysK /DEF=cysteine synthase A /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	3,572820291	112,7791667	31,56586604	2,00748	0,089666484
1822	PA1808_at	PA2709 /GENE=cysK /DEF=cysteine synthase A /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	5,995062204	36,35	6,063323243	2,00667	0,089666484
2714	PA2709_cysK_at	PA2709 /GENE=cysK /DEF=cysteine synthase A /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism	6,271941878	240,4875	38,34338785	2,00613	0,089666484

ANHANG

4602 PA4606_at [PA4606 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Adaptation, protection](#) 7,076967392 193,6758333 27,36706595 2,00502 0,089666484

140 Negative Significant Genes

Row	Gene Name	Gene ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	Fold Change	q-value (%)
4227	PA4230_pchB_at	PA4230 /GENE=pchB /DEF=salicylate biosynthesis protein PchB /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	5,972787847	-503,345	84,27304182	0,14801	0,089666484
3530	PA3526_at	PA3526 /DEF=probable outer membrane protein /FUNCTION=Membrane proteins	-5,2889162	-176,1733333	33,30991203	0,20066	0,089666484
4221	PA4224_at	PA4224 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	5,833476694	-672,475	115,2785955	0,21286	0,089666484
4225	PA4228_pchD_at	PA4228 /GENE=pchD /DEF=pyochelin biosynthesis protein PchD /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	5,164997415	-345,5775	66,90758431	0,21587	0,089666484
4322	PA4326_at	PA4326 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,182059251	-168,6941667	40,33758408	0,22060	0,089666484
4217	PA4220_i_at	PA4220 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,139824129	-212,3233333	51,28800807	0,23951	0,089666484
4223	PA4226_pchE_at	PA4226 /GENE=pchE /DEF=dihydroaeruginic acid synthetase /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	4,797420123	-279,29	58,21670666	0,24153	0,089666484
4226	PA4229_pchC_at	PA4229 /GENE=pchC /DEF=pyochelin biosynthetic protein PchC /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	5,001425441	-237,1466667	47,41581564	0,24364	0,089666484
4228	PA4231_pchA_at	PA4231 /GENE=pchA /DEF=salicylate biosynthesis isochorismate synthase /FUNCTION=Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate); Transport of small molecules	5,556154425	-249,6183333	44,92645709	0,24962	0,089666484
2300	PA2292_at	PA2292 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,597264404	-57,73666667	16,05015928	0,26828	0,089666484
4222	PA4225_pchF_at	PA4225 /GENE=pchF /DEF=pyochelin synthetase /FUNCTION=Transport of small molecules; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	3,406661401	-99,4625	29,1964737	0,27749	0,089666484
4195	PA4193_at	PA4193 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,716768645	-47,04916667	9,974872674	0,28254	0,089666484

ANHANG

193	PA0178_at	PA0178 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis; Two-component regulatory systems	4,817504762	-104,86	21,76645487	0,28636	0,089666484
3908	PA3904_i_at	PA3904 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,084785975	-42,93166667	8,443161006	0,28956	0,089666484
4818	PA4823_at	PA4823 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,389991891	-45,21666667	10,29994309	0,30065	0,089666484
4215	PA4218_at	PA4218 /DEF=probable transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	5,012704406	-203,3208333	40,56110572	0,30473	0,089666484
4218	PA4221_fptA_at	PA4221 /GENE=fptA /DEF=Fe(III)-pyochelin receptor precursor /FUNCTION=Transport of small molecules	4,299805902	-387,3016667	90,0742209	0,30782	0,089666484
2931	PA2926_hisP_at	PA2926 /GENE=hisP /DEF=histidine transport protein HisP /FUNCTION=Amino acid biosynthesis and metabolism; Transport of small molecules	4,434649024	-42,86583333	9,666116328	0,31424	0,089666484
791	PA0776_at	PA0776 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,5540592	-48,0725	13,52608308	0,31677	0,089666484
3728	PA3724_lasB_at	PA3724 /GENE=lasB /DEF=elastase LasB /FUNCTION=Translation, post-translational modification, degradation; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	3,566755612	-62,5625	17,54045043	0,31759	0,089666484
2927	PA2922_at	PA2922 /DEF=probable hydrolase /FUNCTION=Putative enzymes	4,135447636	-62,28666667	15,06165043	0,31940	0,089666484
4856	PA4861_at	PA4861 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	3,700875427	-55,63583333	15,03315484	0,32067	0,089666484
4839	PA4844_at	PA4844 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	4,076947393	-60,0725	14,73467627	0,33391	0,089666484
4219	PA4222_at	PA4222 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	5,633551137	-135,5225	24,05631842	0,33428	0,089666484
4780	PA4784_at	PA4784 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	-4,59809799	-97,79	21,26748934	0,33585	0,089666484
4829	PA4834_at	PA4834 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,313567511	-38,55666667	8,938463712	0,34467	0,089666484
191	PA0176_at	PA0176 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	4,362821965	-166,8766667	38,2497081	0,34577	0,089666484
230	PA0215_at	PA0215 /DEF=probable transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,565765815	-55,15083333	12,07920764	0,35302	0,089666484
1715	PA1701_at	PA1701 /DEF=conserved hypothetical protein in type III secretion /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Protein secretion/export	4,112265415	-59,81666667	14,54591585	0,35531	0,089666484

ANHANG

		apparat							
3312	PA3307_r_at	PA3307 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,7940644	-161,7141667	42,62293667	0,35780	0,089666484		
4838	PA4843_at	PA4843 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	4,557180148	-92,06166667	20,20145434	0,36046	0,089666484		
399	PA0384_at	PA0384 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,08762717	-76,51	18,71746048	0,36118	0,089666484		
4924	PA4929_at	PA4929 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,100286481	-45,08416667	10,99536993	0,36329	0,089666484		
4893	PA4898_at	PA4898 /DEF=probable porin /FUNCTION=Membrane proteins	4,004247042	-57,03916667	14,24466724	0,36564	0,089666484		
224	PA0209_at	PA0209 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	-4,98650253	-62,56	12,54586749	0,36735	0,089666484		
4313	PA4317_at	PA4317 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,906628571	-102,8991667	20,97146038	0,36744	0,089666484		
3744	PA3740_at	PA3740 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,681387873	-40,7125	7,165942708	0,37208	0,089666484		
4920	PA4925_at	PA4925 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,514540241	-40,1125	11,41329939	0,37626	0,089666484		
4306	PA4310_pctB_at	PA4310 /GENE=pctB /DEF=chemotactic transducer PctB /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	5,250429035	-69,57416667	13,25113933	0,37692	0,089666484		
2313	PA2305_at	PA2305 /DEF=probable non-ribosomal peptide synthetase /FUNCTION=	3,603909122	-41,04333333	11,38855946	0,37907	0,089666484		
4040	PA4038_at	PA4038 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,100567524	-24,77916667	6,04286273	0,37914	0,089666484		
4220	PA4223_at	PA4223 /DEF=probable ATP-binding component of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	-4,74265824	-137,4966667	28,99147687	0,38172	0,089666484		
4772	PA4776_at	PA4776 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	5,014924314	-92,5875	18,46239229	0,38189	0,089666484		
1706	PA1692_at	PA1692 /DEF=probable translocation protein in type III secretion /FUNCTION=Protein secretion/export apparatus	3,423461391	-87,28916667	25,49734222	0,38302	0,089666484		
4854	PA4859_at	PA4859 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,493083985	-91,60333333	20,38762988	0,38427	0,089666484		
2872	PA2867_at	PA2867 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	4,310266598	-181,9883333	42,22205963	0,38482	0,089666484		
2084	PA2075_at	PA2075 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,560227259	-39,185	11,00631986	0,38746	0,089666484		

ANHANG

3433	PA3428_at	PA3428 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	5,110698457	-38,94333333	7,619963037	0,38940	0,089666484
3223	PA3218_at	PA3218 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,873915416	-35,83166667	9,249470579	0,38941	0,089666484
2085	PA2076_at	PA2076 /DEF=probable transcriptional regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators	3,918870559	-51,07916667	13,0341551	0,39057	0,089666484
4587	PA4591_at	PA4591 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,907928377	-60,9375	15,59330011	0,39077	0,089666484
203	PA0188_at	PA0188 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	3,795202108	-60,93416667	16,05557884	0,39154	0,089666484
4812	PA4817_at	PA4817 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,293813972	-87,65416667	20,41405781	0,39384	0,089666484
3910	PA3906_at	PA3906 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,979677006	-38,71916667	7,775437367	0,39716	0,089666484
401	PA0386_at	PA0386 /DEF=probable oxidase /FUNCTION=Putative enzymes	4,801392091	-45,24083333	9,422440925	0,39734	0,089666484
225	PA0210_mdcC_at	PA0210 /GENE=mdcC /DEF=malonate decarboxylase delta subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	4,075093424	-31,68	7,7740549	0,39879	0,089666484
2343	PA2336_at	PA2336 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,737011931	-40,17916667	10,75168274	0,39973	0,089666484
5859	ig_5458499_5457716_at	Intergenic region between PA4913 and PA4914, 5457716-5458499, (-) strand	3,993970827	-37,315	9,342832388	0,40309	0,089666484
5173	PA5178_at	PA5178 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,442084385	-1226,145	276,0292002	0,40954	0,089666484
2887	PA2882_at	PA2882 /DEF=probable two-component sensor /FUNCTION=Two-component regulatory systems	4,009023924	-40,94416667	10,21300133	0,40975	0,089666484
4778	PA4782_at	PA4782 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,480160318	-169,9616667	31,01399536	0,41103	0,089666484
2291	PA2282_at	PA2282 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,540137891	-39,55916667	11,17447057	0,41134	0,089666484
190	PA0175_at	PA0175 /DEF=probable chemotaxis protein methyltransferase /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis; Transcriptional regulators	4,404058083	-41,12166667	9,337221692	0,41263	0,089666484
5096	PA5101_at	PA5101 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,58949689	-112,7858333	24,57477062	0,41732	0,089666484
4216	PA4219_at	PA4219 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	5,673194236	-86,76833333	15,29444079	0,41765	0,089666484

ANHANG

5462	PA5468_at	PA5468 /DEF=probable citrate transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	4,873063234	-29,53333333	6,060527417	0,41870	0,089666484
2921	PA2916_at	PA2916 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	3,942070798	-54,225	13,75546072	0,41899	0,089666484
256	PA0241_at	PA0241 /DEF=probable MFS transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,450487827	-60,97916667	13,70168149	0,41974	0,089666484
4629	PA4633_at	PA4633 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	3,726174271	-147,9416667	39,70336755	0,43009	0,089666484
5690	Pae_tRNA_Gly_s_at	tRNA_Glycine, 4785688-4785761 (-) strand	-3,38538817	-183,7491667	54,2771338	0,43368	0,089666484
2305	PA2297_at	PA2297 /DEF=probable ferredoxin /FUNCTION=Energy metabolism	3,554152534	-62,11833333	17,47767794	0,43415	0,089666484
3878	PA3874_narH_at	PA3874 /GENE=narH /DEF=respiratory nitrate reductase beta chain /FUNCTION=Energy metabolism	4,080567816	-32,055	7,85552439	0,44131	0,089666484
4976	PA4981_at	PA4981 /DEF=probable amino acid permease /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,170873812	-34,20666667	8,201319006	0,44420	0,089666484
2340	PA2333_at	PA2333 /DEF=probable sulfatase /FUNCTION=Putative enzymes	3,787675337	-33,85916667	8,939300139	0,44450	0,089666484
4106	PA4104_at	PA4104 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,138072426	-40,64166667	9,821400516	0,44496	0,089666484
4851	PA4856_at	PA4856 /DEF=probable sensor/response regulator hybrid /FUNCTION=Two-component regulatory systems	4,686790161	-174,4016667	37,21132388	0,44732	0,089666484
5026	PA5031_at	PA5031 /DEF=probable short chain dehydrogenase /FUNCTION=Putative enzymes	4,086724027	-28,58583333	6,994803941	0,44830	0,089666484
4821	PA4826_at	PA4826 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,740735074	-26,88166667	7,186199006	0,45008	0,089666484
4378	PA4382_at	PA4382 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,681260934	-30,51083333	8,288147427	0,45019	0,089666484
4833	PA4838_at	PA4838 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,074393735	-28,3875	6,967294239	0,45031	0,089666484
2873	PA2868_i_at	PA2868 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,925113396	-36,58916667	7,429101367	0,45195	0,089666484
3224	PA3219_at	PA3219 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,299232259	-52,9475	12,31557097	0,45255	0,089666484
4152	PA4150_at	PA4150 /DEF=probable dehydrogenase E1 component /FUNCTION=Carbon compound catabolism	3,413666629	-82,85166667	24,27057931	0,45310	0,089666484
195	PA0180_at	PA0180 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, pro-	-	-43,1425	9,689141006	0,45314	0,089666484

ANHANG

		tection; Chemotaxis	4,452665099					
229	PA0214_at	PA0214 /DEF=probable acyl transferase /FUNCTION=Carbon compound catabolism	4,907283212	-27,10833333	5,524102066	0,45514	0,089666484	
1147	PA1132_at	PA1132 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	6,934054702	-40,44666667	5,833046955	0,45654	0,089666484	
250	PA0235_pcaK_at	PA0235 /GENE=pcaK /DEF=4-hydroxybenzoate transporter PcaK /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Membrane proteins; Transport of small molecules	4,030824174	-56,6425	14,05233708	0,45656	0,089666484	
2294	PA2285_at	PA2285 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,939456582	-42,3075	10,73942538	0,45894	0,089666484	
150	PA0135_at	PA0135 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,270541709	-20,14166667	4,716419611	0,46062	0,089666484	
2295	PA2286_at	PA2286 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Membrane proteins	4,565428383	-37,13666667	8,134322467	0,46154	0,089666484	
4197	PA4195_at	PA4195 /DEF=probable binding protein component of ABC transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	4,060929246	-43,7725	10,77893688	0,46463	0,089666484	
4043	PA4041_at	PA4041 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	3,730666386	-27,84666667	7,464260748	0,46526	0,089666484	
4086	PA4084_at	PA4084 /DEF=probable fimbrial biogenesis usher protein /FUNCTION=Motility & Attachment; Chaperones & heat shock proteins	-3,54476775	-17,80083333	5,021720629	0,46618	0,089666484	
4321	PA4325_at	PA4325 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,416450853	-142,3491667	32,23157495	0,46626	0,089666484	
2334	PA2327_at	PA2327 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	4,049906713	-52,3225	12,91943339	0,46630	0,089666484	
235	PA0220_at	PA0220 /DEF=probable amino acid permease /FUNCTION=Transport of small molecules	4,456373074	-31,29083333	7,021591956	0,46891	0,089666484	
2289	PA2280_at	PA2280 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,715139063	-20,095	5,408949613	0,46928	0,089666484	
2932	PA2927_at	PA2927 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,737180867	-27,39166667	5,782271658	0,46932	0,089666484	
1917	PA1905_s_at	PA1905 /DEF=probable pyridoxamine 5'-phosphate oxidase /FUNCTION=Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	3,405089928	-39,00333333	11,45442093	0,46932	0,089666484	
167	PA0152_pcaQ_at	PA0152 /GENE=pcaQ /DEF=transcriptional regulator PcaQ /FUNCTION=Carbon compound catabolism; Transcriptional regulators	4,617472829	-41,42333333	8,970996661	0,46996	0,089666484	
4793	PA4798_at	PA4798 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,061617451	-25,7325	6,335530195	0,47085	0,089666484	

ANHANG

4784	PA4788_at	PA4788 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,38532173	-72,00833333	21,27075034	0,47129	0,089666484
2332	PA2325_at	PA2325 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Putative enzymes	3,725552893	-32,58333333	8,745905444	0,47278	0,089666484
5178	PA5183_at	PA5183 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	5,578399852	-110,9641667	19,89175563	0,47426	0,089666484
192	PA0177_at	PA0177 /DEF=probable purine-binding chemotaxis protein /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	3,904042522	-17,6	4,508147619	0,47473	0,089666484
4114	PA4112_at	PA4112 /DEF=probable sensor/response regulator hybrid /FUNCTION=Two-component regulatory systems	4,566562506	-61,49916667	13,46727798	0,47499	0,089666484
254	PA0239_at	PA0239 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	-5,15934248	-48,89083333	9,476175215	0,47614	0,089666484
2934	PA2929_at	PA2929 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	5,036741315	-30,56916667	6,069234998	0,47632	0,089666484
1622	PA1608_at	PA1608 /DEF=probable chemotaxis transducer /FUNCTION=Adaptation, protection; Chemotaxis	4,112025745	-37,3675	9,087370147	0,47794	0,089666484
2883	PA2878_at	PA2878 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,696962231	-20,15416667	4,290893917	0,47810	0,089666484
169	PA0154_pcaG_at	PA0154 /GENE=pcaG /DEF=protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit /FUNCTION=Carbon compound catabolism	4,012539165	-115,0466667	28,6717866	0,47849	0,089666484
380	PA0365_at	PA0365 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,663559958	-44,8575	9,618724838	0,48016	0,089666484
2886	PA2881_at	PA2881 /DEF=probable two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	3,915233064	-27,1975	6,946585185	0,48024	0,089666484
3876	PA3872_narI_at	PA3872 /GENE=narI /DEF=respiratory nitrate reductase gamma chain /FUNCTION=Energy metabolism	3,879930487	-51,63666667	13,30865768	0,48063	0,089666484
3467	PA3463_at	PA3463 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,662660778	-128,2875	35,02576618	0,48120	0,089666484
4041	PA4039_at	PA4039 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,317121611	-16,4175	4,949321105	0,48193	0,089666484
400	PA0385_at	PA0385 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,06954114	-23,35666667	5,739385808	0,48234	0,089666484
3889	PA3885_at	PA3885 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-5,84448636	-45,96666667	7,864962605	0,48312	0,089666484
4109	PA4107_at	PA4107 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,466398257	-40,46666667	11,67398079	0,48359	0,089666484

ANHANG

4831	PA4836_at	PA4836 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,967187244	-24,09083333	6,072522382	0,48419	0,089666484
2303	PA2295_at	PA2295 /DEF=probable permease of ABC transporter /FUNCTION=Membrane proteins; Transport of small molecules	3,683800326	-16,19916667	4,397406274	0,48419	0,089666484
4813	PA4818_at	PA4818 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	4,011618021	-41,68166667	10,39023817	0,48420	0,089666484
189	PA0174_at	PA0174 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-4,31660619	-28,10166667	6,510129817	0,48501	0,089666484
2345	PA2338_at	PA2338 /DEF=probable binding protein component of ABC maltose/mannitol transporter /FUNCTION=Transport of small molecules	3,728068665	-29,88333333	8,015767953	0,48502	0,089666484
4356	PA4360_at	PA4360 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,815198311	-257,39	67,46438298	0,48593	0,089666484
1868	PA1854_at	PA1854 /DEF=conserved hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	-3,56720052	-23,72416667	6,650640056	0,48613	0,089666484
393	PA0378_at	PA0378 /DEF=probable transglycosylase /FUNCTION=Cell wall / LPS / capsule	5,427928061	-31,79166667	5,857053798	0,48641	0,089666484
1693	PA1679_at	PA1679 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	5,586562372	-37,27083333	6,671514762	0,48766	0,089666484
2269	PA2260_at	PA2260 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,089756281	-30,485	7,453989408	0,48943	0,089666484
208	PA0193_at	PA0193 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Putative enzymes	4,060622038	-18,24083333	4,492127847	0,48954	0,089666484
4581	PA4585_rtcA_at	PA4585 /GENE=rtcA /DEF=RNA 3'-terminal phosphate cyclase /FUNCTION=Transcription, RNA processing and degradation	-7,23052753	-39,34916667	5,442087939	0,49004	0,089666484
364	PA0349_at	PA0349 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins	3,742327999	-17,90083333	4,783341635	0,49036	0,089666484
4888	PA4893_ureG_at	PA4893 /GENE=ureG /DEF=urease accessory protein UreG /FUNCTION=Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	3,726012026	-40,47	10,86147863	0,49077	0,089666484
2075	PA2066_at	PA2066 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,390444972	-54,5325	16,08417197	0,49342	0,089666484
3913	PA3909_at	PA3909 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	4,578763612	-42,87666667	9,364245526	0,49402	0,089666484
4877	PA4882_at	PA4882 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,884150369	-34,15166667	8,792570685	0,49503	0,089666484
2095	PA2086_at	PA2086 /DEF=probable epoxide hydrolase /FUNCTION=Carbon compound	3,897440233	-26,51916667	6,804252299	0,49777	0,089666484

ANHANG

4880	PA4885_irlR_at	catabolism PA4885 /GENE=irlR /DEF=two-component response regulator /FUNCTION=Transcriptional regulators; Two-component regulatory systems	3,711858407	-	-33,29666667	8,970349355	0,49807	0,089666484
2941	PA2936_at	PA2936 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown; Membrane proteins PA4040 /DEF=hypothetical protein /FUNCTION=Hypothetical, unclassified, unknown	3,805498112	-	-18,09416667	4,754743304	0,49837	0,089666484
4042	PA4040_at		3,924306022	-	-31,22916667	7,957882615	0,49943	0,089666484

DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank:

Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit, dieses interessante Thema an seinem Lehrstuhl zu bearbeiten und für die Motivation durch die konstruktiven Anregungen, Gespräche und Korrekturen.

Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer für seine Bereitschaft, diese Arbeit am Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu vertreten und für seine nette Unterstützung.

Dr. Michael Hogardt für die Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Wolfgang Höll für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Dr. Axel Imhof und den Mitarbeitern Jörg Regula und Lars Israel des Zentrallabors für Proteinanalytik des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU München für die zuverlässige Identifizierung der Proteine per Maldi-TOF.

Dr. Reinhard Hoffmann für die Möglichkeit, in Kooperation mit der Affymetrix Facility der TUM Microarray-Analysen durchzuführen, für die Auswertung der Daten und die geduldige Hilfe bei statistischen Fragen.

Den beiden guten Geistern in unserer Arbeitsgruppe. Der immer hilfsbereiten Kristin für die viele Arbeit an den Transkriptomen. Der Moni, unserem Laborsonnenschein, deren unerschütterlich gute Laune einen auch an trüben Tagen zum Lachen gebracht hat.

Unserer EDV Herrn Raschner, Herrn Szepaniak und Frau Kühn, für die geduldige Hilfe bei allen Computerproblemen und Speicherplatzlimitationen.

DANKSAGUNG

Allen Laborkolleginnen und -kollegen für die schöne Zeit. Vor allem meinen Labormädels Christine, Moni, Krischtl, KvE, KL, KS, Anela, Tina, Leoni und Isabel für die vielen Aufmunterungen und die vergnüglichen Morgende, Mittage und Abende.

Allen meinen lieben Freunden, auf die ich mich schon seit Jahren verlassen kann und denen ich in dieser Zeit zu oft abgesagt habe.

Johannes für das geduldige Korrekturlesen und dafür, dass du nach 7 wunderschönen Jahren schon ein bisschen mit meinen Launen umzugehen weisst.

Nicht zuletzt meinen Eltern, die mich in jeder Situation unterstützt haben, und mir das alles erst ermöglicht haben. Ihr seid immer für mich da gewesen und ich weiß, dass ihr das auch immer sein werdet. Danke!

LEBENS LAUF

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christina Marion Hoboth
Geburtsdatum: 17.12.1974
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

09/1981 - 07/1985 Grundschule Neuried
09/1985 – 07/1994 Gymnasium Fürstenried-West
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Promotion:

10/1994 - 03/1995 Volkswirtschaftslehre, Universität Würzburg
10/1995 - 05/2002 Studium der Biologie, Technische Universität München
Abschluss: Vordiplom, Hauptdiplom (Dipl. Biol.)
Abgabe der Diplomarbeit: Mai 2002
Thema der Diplomarbeit: „Identifizierung Quorum-Sensing-regulierter Phänotypen von *Burkholderia cepacia* mittels 2D-Gelelektrophorese“
seit 10/2002 Promotion in der AG Dr. M. Hogardt im Rahmen des Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ am Lehrstuhl für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der LMU München (Prof. Dr. Dr. Heesemann).

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich an keiner Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

München, den

Christina Hoboth