

## Abstract

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Isolierung und Identifizierung der extrazellulären Proteine des mucoiden Bakteriums *P. aeruginosa* SG81 im Biofilm entwickelt. Die biochemische Analyse der EPS ergab eine hohe Polysaccharidkonzentration, welche die direkte Analyse der Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-GE) unmöglich machte.

Für die erfolgreiche Durchführung der 2D-GE wurden die, bei 36 °C auf *Pseudomonas*-Isolierungsagar gewachsenen, 24-72 h alten Biofilme mit Kochsalzlösung unter Rühren homogenisiert, die Bakterien durch Zentrifugation entfernt und die EPS-Lösung gegen A. deion. dialysiert. Die Abtrennung des hochmolekularen Alginats erfolgte durch Ultrafiltration mit einer Membran der Porengröße 100 kDa, welche die Lösung so trennte, dass das Alginat im Überstand blieb und die Proteine größtenteils mit dem Filtrat die Membran passierten. Zur Störung intermolekularer Wechselwirkungen wurde vor der Dialyse L-Arginin hinzugesetzt und vorhandene proteolytische Aktivität durch den Zusatz eines Proteaseinhibitors gehemmt. Die isoelektrische Fokussierung dieser Lösung war erfolgreich und mit der anschließenden Gelelektrophorese konnten durch Silberfärbung über 100 verschiedene Proteinspots im Größenbereich zwischen 16 bis 98 kDa und einem isoelektrischen Punkt zwischen 3,5 und 10 angefärbt werden.

Das so dargestellte Sekretom eines mucoiden, im Biofilm gewachsenen *P. aeruginosa*-Stamms unterscheidet sich in weiten Bereichen von den in der Literatur veröffentlichten Sekretomen nichtmucoider Stämme von planktonischen *P. aeruginosa*. Die extrazellulären Proteine unterschieden sich größtenteils auch von den isolierten Proteinen der äußeren Membran dieses, im Biofilm gewachsenen, Bakterienstamms. Im zeitlichen Verlauf, bis das Biofilmalter drei Tage betrug, gab es nur recht geringe Veränderungen in der Zusammensetzung des Sekretoms.

Mit der massenspektrometrischen Untersuchung der aufgetrennten Proteine gelang die Identifikation von Proteinen in 21 unterschiedlichen Spots. Es zeigte sich, dass extrazellulär auch Proteine zu finden sind, deren Lokalisation in der Zelle als cytoplasmatisch, periplasmatisch oder membrangebunden angenommen wird.