

Quorum Quenching und Anti-Biofilm Strategien aus Metagenom -
Isolierung und Charakterisierung Quorum Sensing inhibierender
Proteine aus Genbanken direkt isolierter Umwelt-DNA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Christina Schipper
aus Kassel

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. W. STREIT
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. B. BISPING
Tag der Disputation: 29. Mai 2009

Hamburg, den 15. Mai 2009



J. Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Abkürzungen	VI
I. Einleitung	1
1. Quorum Sensing	1
1.1 Vorkommen von QS-Systemen	1
1.1.1 Gram-negative QS-Systeme.....	1
1.1.1.1 Quorum Sensing bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.1.2 Gram-positive QS-Systeme	8
1.1.3 Autoinducer 2 QS-Systeme	9
1.2 Anti-Quorum Sensing-Systeme	11
1.2.1 Chemische Inaktivierung von AHLs	12
1.2.2 Enzymatische Inaktivierung von AHLs.....	12
1.2.3 QS Inhibition durch Blockierung des AHL-Rezeptorproteins.....	14
1.2.4 QS-Repression durch Small RNAs	15
1.2.5 Unspezifischer Abbau von AHLs durch <i>Variovorax paradoxus</i>	15
2. Metagenomik und Quorum Sensing	16
3. Intention dieser Arbeit	16
II. Material und Methoden	17
1. Bakterienstämme, Vektoren und Primer	17
2. Medien und Zusätze	22
2.1 Medien.....	22
2.1.1 LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; Sambrook et al., 2001).....	22
2.1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AT)-Medium	22
2.1.3 mAPM Medium (modifiziert nach Chakrabarty, 1981).....	23
2.1.4 ABt-Medium (Clark und Maaløe, 1967)	23
2.1.5 TY-Medium	24
2.1.6 PBS.....	24
2.1.7 Schwärm-Agar für <i>E. coli</i>	24
2.1.8 Schwärm- und Schwimm-Agar für <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.2 Antibiotika und andere Medienzusätze.....	26
3. Zellanzucht	27
3.1 Zellanzucht allgemein.....	27
3.1.1 Bestimmung der Zelldichte	27
3.2 Motilitätstest	27

3.2.1 Schwärmtestes mit <i>E. coli</i> XL1 blue.....	27
3.2.2 Motilitätstest mit <i>P. aeruginosa</i> PAO1	28
3.3 Anzucht von Biofilmen in Durchflusszellen	28
3.3.1 Vorbereitung der <i>P.aeruginosa</i> PAO1-Zellen	28
3.3.2 Vorbereiten der Durchflusszellen und Biofilmanzucht.....	28
3.3.3 CLSM und Bildanalyse der Biofilme.....	29
4. Stammhaltung	29
4.1 Anlegen von Glycerin-Stammkulturen	29
4.2 Anlegen von Agar-Stammplatten.....	29
5. Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA.....	30
5.1 Behandlung von Geräten und Lösungen	30
5.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	30
5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	31
5.4. Isolierung von DNA	31
5.4.1 Schnelle Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> („Cracking“)......	31
5.4.2 Plasmid-DNA-Isolierung mit Kits.....	32
5.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse.....	32
5.4.4 Isolierung von DNA durch Extraktion aus Agarosegelen	33
5.5. Enzymatische Modifikation von DNA.....	34
5.5.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	34
5.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten	34
5.6. Transformationsverfahren	35
5.6.1 Transformation durch Hitzeschock	36
5.6.1.1 Herstellung hitzekompetenter Zellen.....	36
5.6.1.2 Hitzeschock.....	37
5.6.2 Transformation durch Elektroporation.....	37
5.6.2.1 Herstellung elektrokompeter Zellen	37
5.6.2.2 Herstellung schneller Epozellen.....	38
5.6.2.3 Elektroporation.....	38
5.6.3 Konjugation.....	38
5.6.4 Aufnahme von Plasmid-DNA bei <i>B. subtilis</i>	39
5.6.5 Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> Klone durch X-Gal-Test.....	40
5.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
5.7.1 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40

5.7.1.1 PCR mit der KOD HiFi DNA Polymerase	41
5.7.2 Kolonie-PCR	43
5.8. Transposonmutagenese	43
6. Proteinbiochemische Methoden	44
6.1 Standardtechniken	44
6.1.1 Quantitative Proteinbestimmung (nach Bradford)	44
6.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
6.1.3 Molekularmassenbestimmung von Proteinen in SDS-Gelen	46
6.1.4 Coomassiefärbung	47
6.2 Zellernte und Gewinnung von Zell-Rohextrakten	47
6.2.1 Zellausschluss mit Ultraschall	47
6.2.2 Zellausschluss mit der „French Pressure Cell“	48
6.3 Proteinaufreinigung	48
6.3.1 Aufreinigung von His-tag-Proteinen mit Hilfe von Protino-Säulen	48
6.3.2 Aufreinigung von His-tag-Proteinen mit Hilfe von Protino-Säulen unter denaturierenden Bedingungen	49
6.3.3 Aufreinigung von His-tag-Proteinen mit dem Qiagen-NiNTA-Kit	50
6.3.4 Umpuffern von Proteinen durch Dialyse	50
6.3.5 Rückfaltung von Proteinen aus <i>inclusion bodies</i>	51
6.3.6 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	51
6.4 Immunologische Methoden	52
6.4.1 Western Blot (Towbin et al., 1992)	52
6.4.1.1 Transfer	52
6.4.1.2 Detektion	53
6.5 Nachweis von Enzymaktivitäten	54
6.5.1 ONPG Test	54
6.5.2 Violacein-Assay	55
6.5.3 Pyocyanin-Nachweis	55
7. Nachweis der AHL-Spaltung durch Massenspektroskopie	55
III. Experimente und Ergebnisse	57
1. Sequenzanalyse der QQ-Klone Bio1-Bio9	58
1.1 Sequenzanalyse des Inserts Bio1	59
1.2 Sequenzanalyse des Inserts Bio2	59
1.3 Sequenzanalyse des Inserts Bio3	60

1.4 Sequenzanalyse des Inserts Bio4	61
1.5 Sequenzanalyse des Inserte Bio5	62
1.6 Sequenzanalyse des Inserte Bio6	63
1.7 Sequenzanalyse des Inserte Bio7	64
1.8 Sequenzanalyse des Inserte Bio8	65
1.9 Sequenzanalyse des Inserte Bio9	65
2. Identifizierung der potentiellen QQ-ORFs durch Subklonierung	67
2.1 Klonierung des QQ-ORFs aus Bio1	68
2.2 Klonierung des QQ-ORFs aus Bio4	68
2.3 Klonierung des QQ-ORFs aus Bio7	73
2.4 Klonierung des QQ-ORFs aus Bio8	73
2.5 Klonierung des QQ-ORFs aus Bio9	73
2.6 Subklonierung weiterer potentieller QQ-ORFs	73
3. Inhibierung QS-gesteuerten Schwärmens bei <i>E. coli</i> K12	74
4. Inhibierung QS-gesteuerter Phänotypen bei <i>P.aeruginosa</i> PAO1	77
4.1 Motilitätstest	79
4.2 Inhibition der Pyocyaninbildung	81
4.3 Inhibition der Biofilmbildung	83
5. Komplementation der <i>P. aeruginosa</i> PAO1-Klone durch AHL-Zugabe	85
5.1 Schwärmkomplemetation durch 3-Oxo-C ₁₂ -Zugabe	85
5.2 Komplementation der Pyocyaninproduktion durch AHL-Zugabe	86
6. Klonierung, heterologe Expression und Aufreinigung der QQ-Gene	
<i>bpiB01</i>, <i>bpiB04</i>, <i>bpiB05</i> und <i>bpiB09</i>	87
6.1 Klonierung, Überexpression und Aufreinigung von BpiB01	87
6.2 Klonierung, Überexpression und Aufreinigung von BpiB04	89
6.3 Klonierung, Überexpression und Aufreinigung von BpiB05	90
6.4 Klonierung, Überexpression und Aufreinigung von BpiB09	92
7. Biochemische Charakterisierung der Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05	
und BpiB09	93
7.1 Wirkung der Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 auf die Autoinducer- abhängige Violacein-Synthese von <i>Chromobacterium violaceum</i>	93
7.2 ONPG-Test auf Abbau von AHLs durch BpiB01, BpiB04 und BpiB05	94
8. Aufklärung des Mechanismus von BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09	
bei der Inaktivierung von AHLs durch HPLC-MS-Analyse	96

9. Aufklärung der Wirkung von BpiB01 und BpiB04 auf AI-2 bei <i>E. coli</i>	102
IV. Diskussion.....	103
1. Sequenzanalyse der Klone Bio1-9	104
2. Identifizierung der QQ-ORFS von Bio4 durch Subklonierung.....	108
3. Identifizierung der Spaltmechanismen von BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 durch HPLC-MS.....	109
4. Inhibition QS-gesteuerter Phänotypen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1	111
5. Inhibition der QS-gesteuerten Violaceinproduktion bei <i>C. violaceum</i>	114
6. Schwärminhibition von <i>E. coli</i> K12 durch <i>bpiB01-bpiB07</i>	115
7. Ausblick	116
V. Zusammenfassung	118
VI. Literaturverzeichnis	120
VII. Anhang	134
Danksagung	

Abkürzungen

A	Ampere
A.	<i>Agrobacterium</i>
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Äq.	Äquivalent
AHL	N-acyliertes Homoserinlacton
AI	Autoinducer
AI-1	Autoinducer-1
AI-2	Autoinducer-2
AI-3	Autoinducer-3
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
B.	<i>Bacillus</i>
bidest	bidestiliert
bp	Basenpaare
bpi	biofilm phenotype inhibiting
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
c	zenti- ($1 \cdot 10^{-2}$), Konzentration
C.	<i>Chromobacterium</i>
C ₄ -HSL	N-Butyryl-Homoserinlacton
C ₆ -HSL	N-Hexanoyl-Homoserinlacton
C ₁₂ -HSL	N-Dodecanoyl-Homoserinalcton
°C	Grad Celsius

CLSM	Konfokale Laserscan-Mikroskopie (engl. Confocal Laser Scanning Microscopy)
Cm	Chloramphenicol
<i>D.</i>	<i>Delisea</i>
Da	Dalton
DAD	ESI-Massenspektroskopie-Diode Detektor
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DNAse	Desoxyribunuklease
dNTP	Desoxyribonuklosid-5`-triphosphat
ds	doppelsträngig, Doppelstrang
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-Cup	Eppendorfreaktionsgefäß
EHEC	Enterohaehämorrhagische <i>Escherichia coli</i> Stämme
engl.	englisch
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
g	Gramm, Physikalisches Formelzeichen für Fallbeschleunigung
Gm	Gentamycin
G ₂ L	Göttingen Genomics Laboratory
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
HRMS	Hochauflösungs-Massenspektroskopie (engl. high resolution mass spectroscopy)

HS	Homoserin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
LSM	Laserscan-Mikroskop
m	milli- ($1 \cdot 10^{-3}$), Meter
M	Molar (mol/l), molekulare Masse
max.	maximal
MCS	Multi-Klonierungs-Stelle (engl. multiple cloning site)
MHF	5-Methyl-4-Hydroxy-3-Furanon
μ	mikro- ($1 \cdot 10^{-6}$)
min	Minute
mod.	modifiziert
MS	Massenspektroskopie
mPa	Megapascal
N	Stickstoff
n	nano- ($1 \cdot 10^{-9}$)
Na	Natrium
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazolin
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)

o.a.	oben angegeben
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
P	Phosphat
p	pico- ($1 \cdot 10^{-12}$)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PQS	Pseudomonas Quinolone Signal
Psi	Pferdestärken
pSK ⁺	pBluescriptSK ⁺
QS	Quorum Sensing
QQ	Quorum Quenching
QSI	Quorum Sensing Inhibition
R, r	Resistenz, resistent
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl. Sodium-Dodecylsulfate)
SG	Sammelgel
Sp	Spectinomycin
Std.	Stunden

SV	Säulenvolumen
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _{anneal}	Anlagerungstemperatur
Tc	Tetrazyklin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Trenngel
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
usw.	und so weiter
ÜN	Über Nacht
V	Volumen, Volt
V.	<i>Vibrio</i>
VK	Vorkultur
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
3-Oxo-C ₈ -HSL	N-3-Oxo-Octanoyl-Homoserinlacton
3-Oxo-C ₁₂ -HSL	N-3-Oxo-Dodecanoyl-Homoserinlacton

Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren

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

I. Einleitung

1. Zell-Zell-Kommunikation: Quorum Sensing

Der Begriff Quorum Sensing (QS) beschreibt die Kommunikation zwischen Bakterien mit Hilfe bestimmter Signalmoleküle, so genannter Autoinducer (AI). Über diese AI-Moleküle sind Bakterien in der Lage, die Expression diverser Gene in Abhängigkeit von der Zelldichte zu regulieren. Hierbei werden die AI-Moleküle von den Zellen kontinuierlich produziert und in das umgebende Medium abgegeben. Somit steigt die Konzentration der Signalmoleküle in Abhängigkeit von der Zelldichte. Bei einer hohen Zelldichte und der damit verbundenen hohen Konzentration der AI-Moleküle binden diese an die in den Zellen ebenfalls exprimierten Rezeptorproteine. Diese Autoinducer-Rezeptorprotein-Komplexe interagieren mit spezifischen Ziel-DNA-Sequenzen und kontrollieren auf diesem Weg die Expression bestimmter Gene.

Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien besitzen Quorum-Sensing-Kommunikationssysteme, um verschiedene physiologische Aktivitäten zu regulieren. Diese Prozesse schließen Symbiose, Virulenz, Konjugation, Antibiotika-Produktion, Motilität, Sporulation und Biofilmbildung ein.

Im Allgemeinen kann man zwei Quorum-Sensing-Systeme unterscheiden: Gram-negative Bakterien nutzen vor allem N-acylierte Homoserinlactone (AHLs), Gram-positive Bakterien verwenden prozessierte Oligopeptide als Autoinducer (Miller et al. 2001). Zusätzlich existiert ein weiteres spezieübergreifendes QS-System, das Autoinducer-2 (AI-2) System, mit Furanosylborat als Signalmolekül. Es wurde sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien detektiert (Xavier und Bassler, 2003).

Bei enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-Stämmen (EHEC) wurde ein weiteres Autoinducer-Molekül, welches als Autoinducer-3 Molekül (AI-3) bezeichnet wird, detektiert. AI-3 aktiviert dort Virulenz-Gene sowie Flagellen- und Motilitätsgene (Sperandio et al., 2003, Henke und Bassler, 2004, Kendall et al., 2007). Seine genaue Struktur ist bislang nicht bekannt.

1.1.1 Vorkommen von QS-Systemen

1.1.1 Gram-negative QS-Systeme

AHLs bestehen im Allgemeinen aus einem Homoserinlacton-Anteil, der über eine Peptidbindung mit einer Kohlenwasserstoffkette, die am dritten Kohlenstoffatom noch

eine Oxo- oder Hydroxygruppe tragen kann, verbunden ist. Die Grundstruktur von AHLs ist in Abbildung 1 dargestellt.

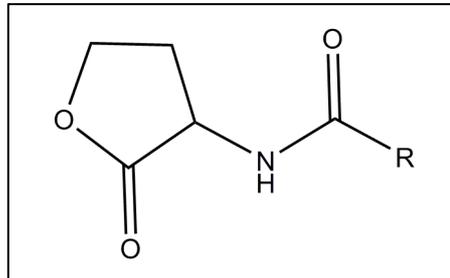


Abbildung 1: Allgemeine Struktur von AHLs. N-Acyl-Homoserinlactone sind aus zwei Bestandteilen zusammengesetzt. Zum einen aus Homoserinlacton, dessen Struktur in der o.a. Abbildung dargestellt ist, zum anderen aus einer Kohlenwasserstoffkette, in der Abbildung mit „R“ gekennzeichnet. Diese kann noch eine oder mehrere Oxo-Gruppen oder eine Hydroxygruppe am dritten Kohlenstoffatom tragen. Diese AHLs werden dann als 3-Oxo- bzw. 3- Hydroxy-AHLs bezeichnet.

Quorum Sensing wurde erstmals vor über 30 Jahren bei dem Gram-negativen marinen Bakterium *Vibrio fischeri* entdeckt, bei dem die Biolumineszenz über QS reguliert wird (Nealson et al., 1970). Das Quorum Sensing System von *Vibrio fischeri* wird als LuxRI-System bezeichnet und ist in der folgenden Abbildung 2 dargestellt.

Während des Wachstums von *Vibrio fischeri* wird das AHL-Signalmolekül N-3-Oxo-Hexanoyl-L-Homoserinlacton (3-Oxo-C₆-HSL) über das LuxI-Protein konstitutiv in geringen Mengen synthetisiert. AHLs sind in der Lage, frei aus der Zelle in das Medium zu diffundieren. Bei niedriger Zelldichte wird das Molekül ins Medium abgegeben, um einen Konzentrationsausgleich zu erreichen, diffundiert daher nicht in größeren Mengen in die Zelle zurück. Bei hoher Zelldichte wird hingegen viel 3-Oxo-C₆-HSL von den Zellen ins Medium abgegeben und diffundiert in die Zellen zurück. Ist eine bestimmte AHL-Konzentration in der Zelle erreicht, bindet das 3-Oxo-C₆-HSL an seinem Rezeptorprotein LuxR. Dieser LuxR-3-Oxo-C₆-HSL-Komplex bindet an der sogenannten *lux*-Box, die in der LuxI-Promotorregion lokalisiert ist und die Transkription des Lux-Operons aktiviert. Auf diesem Weg wird die Expression des *luxICDABE*-Operons initiiert. Da LuxI, das für die 3-Oxo-C₆-HSL-Synthese kodiert, das erste Gen auf diesem Operon ist, findet eine positive Feedback-Regulation statt. Zusätzlich zu dem *luxI*-Gen befinden sich weitere Gene auf dem Lux-Operon,

luxCDAB und *luxE*, die für Biolumineszenz Gene kodieren, die dann ebenfalls exprimiert werden. Auf diese Weise wird Biolumineszenz erzeugt.

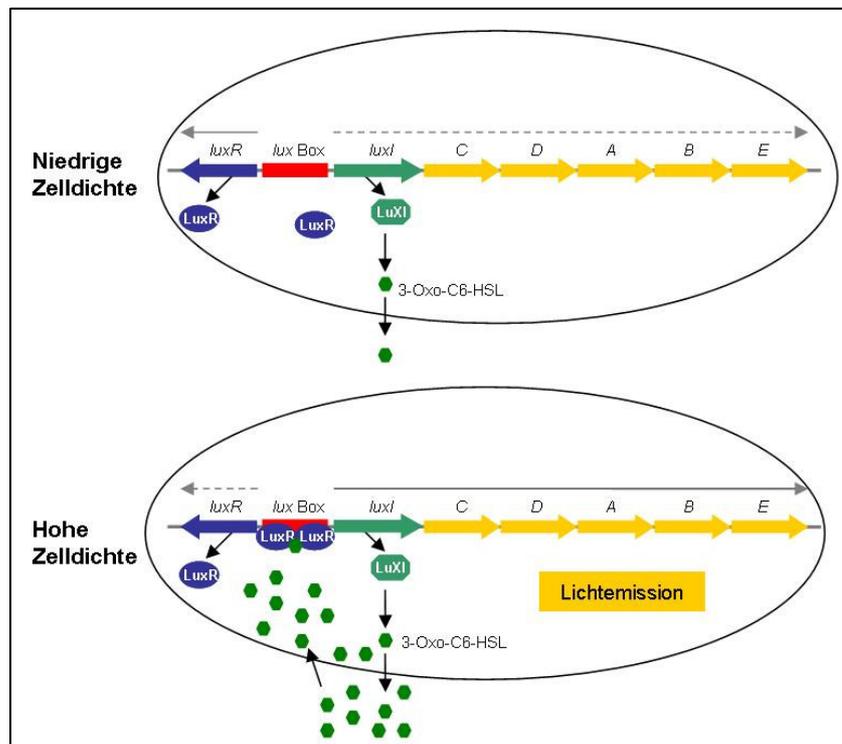


Abbildung 2: Das LuxRI-System von *Vibrio fischeri*. Das Quorum-Sensing-Molekül 3-Oxo-C₆-HSL wird von *Vibrio fischeri* in geringem Maße konstitutiv exprimiert und kann aus der Zelle in das umgebende Medium diffundieren. Ab einer bestimmten Konzentration in der Zelle bindet der Botenstoff an das LuxR-Protein. Der entstandene 3-Oxo-C₆-HSL-LuxR-Komplex bindet anschließend an der *lux*-Box und initiiert die Expression des *luxICDABE*-Operons, sodass Biolumineszenz entsteht.

Später wurden auf AHL basierende Quorum-Sensing-Systeme auch bei anderen Gram-negativen Bakterien entdeckt, deren Quorum-Sensing-Regulations-Proteine als LuxR/I-Homologe bezeichnet werden. In der folgenden Tabelle 1 sind einige bekannte auf AHL basierende Regulationssysteme aufgeführt (Eberl, 1999).

Tabelle 1: Auswahl Gram-negativer AI-1 Quorum-Sensing-Systeme

Organismus	LuxRI-Homolog	Autoinducer	Phänotyp
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxR/LuxI	N-(3-Oxo-Hexanoyl)-Homoserinlacton	<i>luxICDABE</i> Biolumineszenz (Engebrecht et al., 1981 Eberhard et al., 1983)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tral/TraR	N-(3-Oxo-Octanoyl)-Homoserinlacton	<i>tra, trb</i> Ti-Plasmid Konjugation (Piper et al., 1993, Zhang et al., 1993)
<i>Burkholderia cepacia</i>	CepI/CepR	N-Octanoyl-Homoserinlacton	Protease- und Siderophore-Produktion (Lewenza et al., 1999)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Cvii/CvriR	N-Hexanoyl-Homoserinlacton	Violacein-Pigmente, Hydrogencyanid, Antibiotika, Exoproteasen, Chitinolytische Enzyme (McClellan et al., 1997, Chernin et al., 1998)
<i>Erwinia carotovora</i>	ExpI/ExpR (a) CarI/CarR (b)	N-(3-Oxo-Hexanoyl)-Homoserinlacton	(a) Exoenzym-Synthese (b) Carbapensynthese (Jones et al., 1993, Pirhonen et al., 1993, Bainton et al., 1992)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/LasR (a)	N-(3-Oxo-Dodecanoyl)-Homoserinlacton	<i>lasA, lasB, aprA, toxA</i> Exoprotease, Virulenzfaktoren, Biofilmbildung (De Kievit und Iglewski, 2000, Pearson et al., 1994, Davies et al., 1998)
	RhlI/RhlR (b)	N-Butyryl-Homoserinlacton	<i>lasB, rhlAB</i> (Rhamnolipide), <i>rpo</i> (Stationäre Phase) (Pearson et al., 1994, Latifi et al., 1996, De Kievit und Iglewski, 2000)

1.1.1.1 Quorum Sensing bei *Pseudomonas aeruginosa*

Das Gram-negative Bakterium *P. aeruginosa* ist opportunistisch pathogen und löst akute und chronische Infektionen in immunsuppressiven Wirten (Dérnevaud et al., 2004) sowie chronische Lungeninfektionen bei Patienten mit Cystischer Fibrose aus (Eberl et al., 2004, Winstanley et al., 2008). Häufig führt hierbei die über QS-gesteuerte Biofilmbildung zu Komplikationen (Murray et al., 2007, Mayaud et al., 2007).

Ein Schema der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* ist in Abbildung 3 dargestellt. Bei der Biofilmbildung heften sich zunächst frei im Medium befindliche Zellen auf eine Oberfläche an. Nach der Anheftung und Wachstum auf der Oberfläche als Monolayer kommt es zur Bildung von Mikrokolonien. Nach der Bildung der Mikrokolonien erfolgt die Ausbildung eines Biofilms, in dem die *P. aeruginosa*-Zellen durch die Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) gegenüber äußeren Einflüssen wie Austrocknung oder Behandlung mit Antibiotika gut geschützt sind (Costerton et al., 1999).

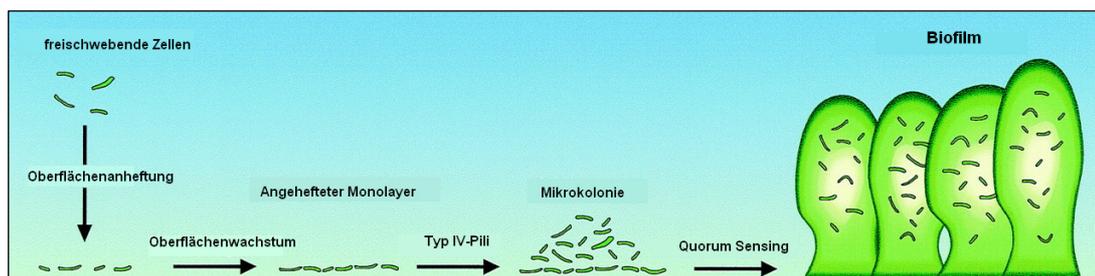


Abbildung 3: Biofilmbildung bei *Pseudomonas aeruginosa* (nach Parsek et al., 2000).

Frei schwebende Zellen heften sich an eine Oberfläche an und wachsen auf dieser, bis sie einen Monolayer auf der Oberfläche bilden. Nach der Bildung von Mikrokolonien mit Hilfe von Typ-IV-Pili werden über die Expression bestimmter Gene Biofilme gebildet. Dabei werden die Zellen in eine Exopolysaccharid-Matrix (EPS) eingebettet, die die Zellen gegenüber äußeren Einflüssen schützt.

P. aeruginosa besitzt neben den AHL-Autoinducer-Molekülen 3-Oxo-C₁₂-HSL, (LasI/LasR –System) und C₄-HSL (RhII/RhIR-System) (Abbildung 4) ein weiteres Quorum-Sensing-Molekül, das als PQS (Pseudomonas-Quinolon-Signal) bezeichnet wird (Abbildung 5).

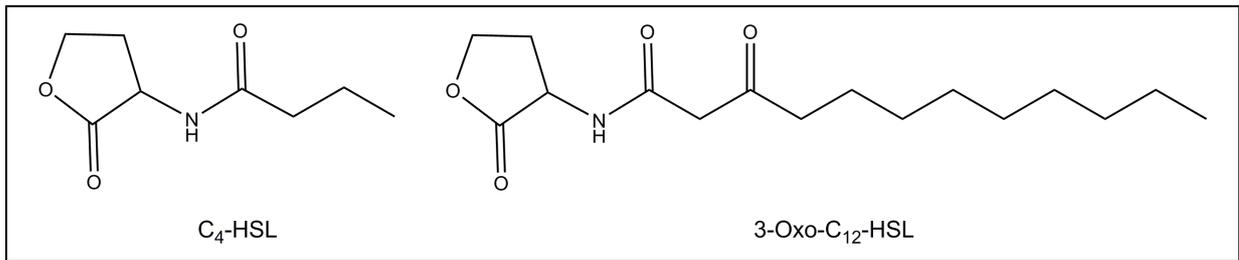


Abbildung 4: Die AHL-Autoinducer-Moleküle aus *P. aeruginosa*

PQS benötigt für seine Expression das Quorum-Sensing-Protein LasR (Pesci et al., 1999). Es reguliert die Produktion diverser Virulenzfaktoren und ist auch an der Entwicklung von Biofilmen beteiligt (Dubern und Diggle, 2008).

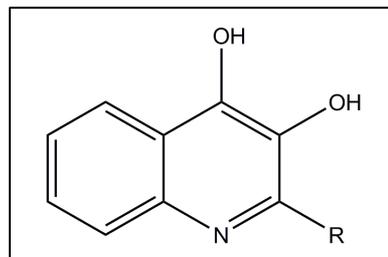


Abbildung 5: PQS aus *Pseudomonas aeruginosa*. R steht für eine Kohlenwasserstoffkette, die in ihrer Länge von C₅H₁₁ bis C₁₁H₂₃ variieren kann.

Beide QS-Systeme, LasI/LasR und RhII/RhIR, kontrollieren in hierarchischer Abfolge die Produktion einer Vielzahl von Virulenzfaktoren und die Biofilmbildung. Dabei ist das LasR-System dem RhIR-System übergeordnet. Das LasI/LasR-System reguliert neben der Produktion von Virulenzfaktoren die Transkription des *rhlI*-Gens und verbindet dadurch beide Systeme (Smith und Iglewski, 2003a). Ebenso wird die Bildung von PQS durch das LasI/LasR-System kontrolliert. Eine schematische Abbildung der Kontrollkaskade der QS-Signalmoleküle von *P. aeruginosa* ist in Abbildung 6 zu sehen.

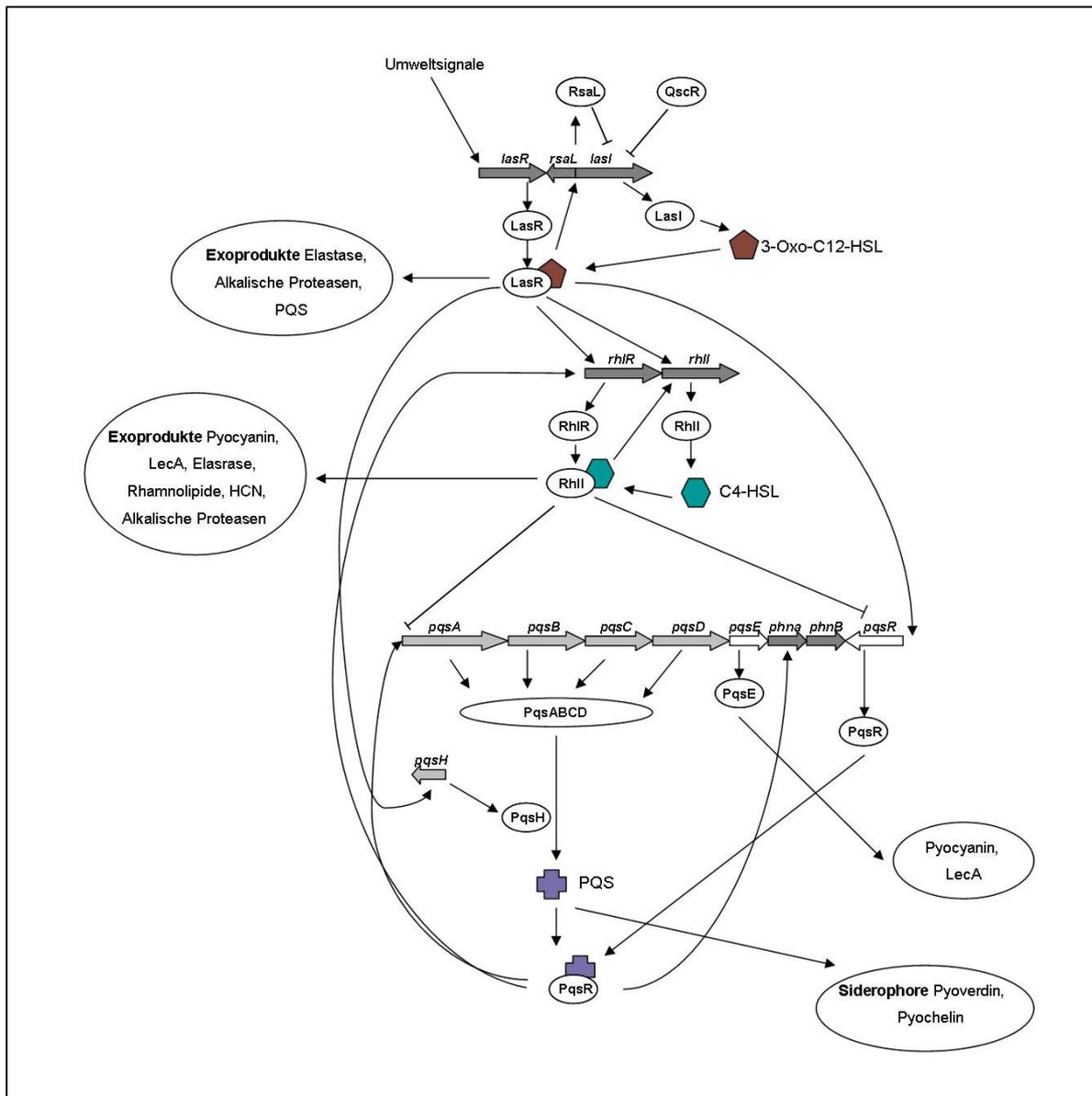


Abbildung 6: Genregulation bei *P. aeruginosa* über die QS-Systeme LasR/LasI und RhIR/RhII (nach Dubern und Diggle, 2008). LasI reguliert die Synthese des AHL-Signalmoleküls *N*-(3-Oxo-Dodecanoyl)-L-Homoserinlacton (3-Oxo-C₁₂-HSL), während RhII den AHL-Autoinducer *N*-(Butyryl)-L-Homoserinlacton (C₄-HSL) bildet. Das RhIR/RhII-System wird dabei erst aktiviert, wenn das LasR/LasI bereits aktiv ist. Auf diesem Weg wird eine teils positive, teils negative Feedback-Regulation erreicht. Diese Regulation der Abfolge der Genexpression kann für die richtige Reihenfolge bei der Induktion von Genen der frühen und späten Ereignisse in einem Infektionsprozess oder für die exakte Ausbildung der *P. aeruginosa*-Biofilme wichtig sein.

1.1.3 Gram-positive QS-Systeme

Gram-positive Bakterien nutzen statt AHL-Autoinducern prozessierte sekretierte Peptide als Quorum-Sensing-Moleküle. Im Allgemeinen werden diese Peptide über ABC-Transporter sekretiert. Gram-positive Bakterien nutzen ein Zwei-Komponenten-adaptives-Protein für die Detektion von Autoinducern. Der Signalmechanismus ist eine Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungs-Kaskade (Miller et al., 2001). Ein generelles Modell für Quorum Sensing in Gram-positiven Bakterien ist in der folgenden Abbildung 7 zu sehen.

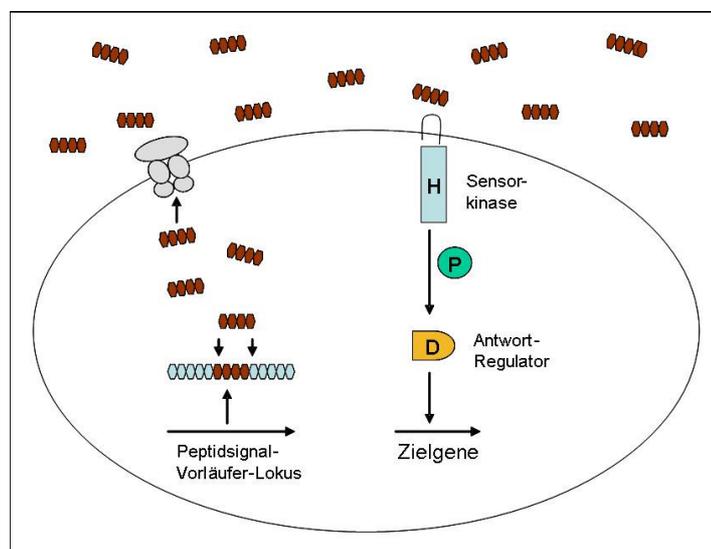


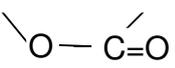
Abbildung 7: Allgemeines Quorum-Sensing-Modell für Gram-positive Bakterien (nach Miller et al., 2001). Zunächst wird in den Gram-positiven Zellen ein Signalpeptid-Vorläufer-Protein synthetisiert, aus dem durch Spaltung das Signalpeptid hervorgeht. Über einen ABC-Transporter (grau dargestellt) wird das prozessierte Signalpeptid dann aus der Zelle heraustransportiert. Bei einer hohen Konzentration des Signalpeptids im Medium wird es von einem Histidin-Sensorkinase-Komplex eines 2-Komponenten-Signalsystems detektiert. Die Sensorkinase autophosphoryliert einen konservierten Histidinrest (H), die Phosphatgruppe (P) wird dann an einen konservierten Arspartat-Rest (D) des Antwort-Regulator-Proteins weitergegeben. Dieser aktiviert dann die Transkription der Zielgene.

Bei diesem Quorum-Sensing-System steigt die Konzentration von sekretierten Autoinducern wie bei AHL in Abhängigkeit zur Zelldichte. Die Zwei-Komponenten-Sensor-Kinasen sind die Detektoren für die sekretierten Peptidsignale. Eine Interaktion des Oligopeptids mit dem Peptid-Liganden initiiert eine

Phosphorylierungskette, die in der Phosphorylierung eines Regulator-Proteins mündet. Durch die Phosphorylierung wird der Regulator aktiviert, bindet an die DNA und verändert die Transkription von Quorum Sensing kontrollierten Zielgenen (Miller et al., 2001).

Die Autoinducer-Moleküle unterscheiden sich bei Gram-positiven Bakterien sehr stark untereinander. Sie zeigen in ihrem Aufbau sehr unterschiedliche Strukturen, sowohl in der Abfolge der Aminosäuren als auch in deren Vorkommen. In der folgenden Tabelle 2 sind einige Autoinducer-Moleküle aufgeführt (Taga et al., 2003).

Tabelle 2: Gram-positive Quorum-Sensing-Moleküle.

Struktur/AS-Abfolge	Bezeichnung / (<i>Organismus</i>)
ADPITRQWGD	ComX (<i>Bacillus subtilis</i>) (Magnuson et al., 1994)
QNSPNIFGQWM 	GBAP (<i>Enterococcus faecalis</i>) (Nakayama et al., 2001)
EMRLSKFFRDFILQRKK	CSP (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) (Håvarstein et al., 1996)
ERGNMT	CSF (<i>Bacillus subtilis</i>) (Solomon et al., 1996)

1.1.3 Autoinducer-2 QS-Systeme

Viele Bakterien besitzen mehrere Quorum-Sensing-Systeme, so auch das Meeresbakterium *Vibrio harveyi* (Abbildung 8). Dieses Bakterium produziert neben einem AHL-Autoinducer ein weiteres Quorum-Sensing-Molekül, das sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien vorkommt. Es gehört eigentlich zu den Zwei-Komponenten-Systemen der Gram-positiven Bakterien und wird als Autoinducer-2-Molekül (AI-2) bezeichnet. Die Struktur des AI-2 Moleküls von *V. harveyi* ist in Abbildung 9 dargestellt.

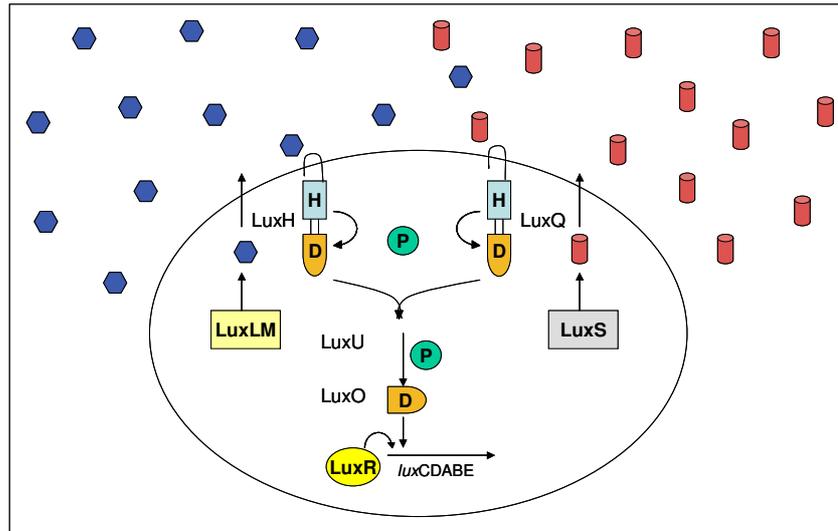


Abbildung 8: Das Quorum-Sensing-System von *Vibrio harveyi* (nach Freeman und Bassler, 2004). *V. harveyi* nutzt sein Quorum-Sensing-System zur Zelldichte-abhängigen Lichtproduktion. Als Autoinducer-1 dient N-(3-Hydroxybutanoyl)-Homoserinlacton, synthetisiert über LuxLM, und als Autoinducer-2 das in Abbildung 9 gezeigte Molekül, das über LuxS synthetisiert wird. Ein bekanntes 2-Komponenten-Sensorkinase-System detektiert beide Autoinducer. Bei Kontakt mit den Autoinducern wird auch hier eine Phosphorylierungskette in Gang gesetzt, die in der Transkriptionsaktivierung des *luxCDABE*-Operons mündet.

AI-2 ist der einzige bekannte Spezies-unspezifische Autoinducer. Da er weit verbreitet ist, vermutet man, dass er als universelles Quorum-Sensing-Signal für die Interaktion zwischen verschiedenen Arten agiert. So kontrolliert AI-2 Virulenz-Gene in *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* und *Streptococcus pyogenes*, Biofilmbildung zwischen *Porphyromonas gingivales* und *Streptococcus gordonii* oder Antibiotikaproduktion in *Photobacterium luminescens* (Taga et al., 2001). Weitere AI-2-Moleküle wurden inzwischen auch in anderen Organismen identifiziert. So weicht die Struktur des in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* produzierten AI-2-Moleküls etwas von dem in *V. harveyi* ab. Das dort als AI-2 fungierende Molekül TMHF (Tri-Hydroxymethylfuranon) bindet kein Bor (Xavier et al., 2007).

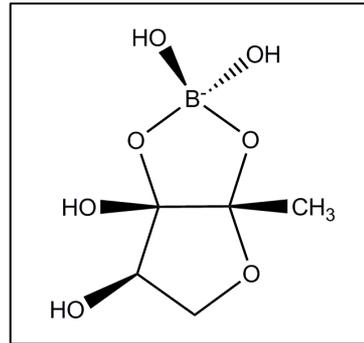
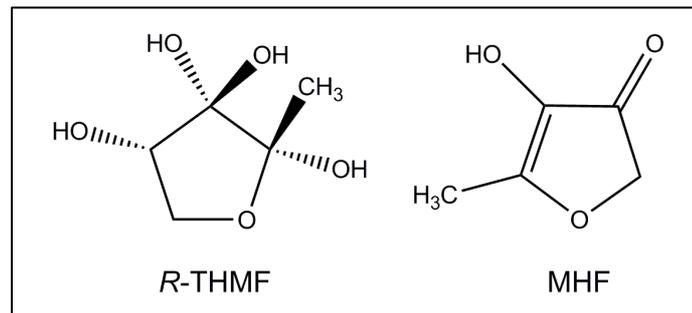


Abbildung 9: Struktur des AI-2-Moleküls aus *V. harveyi* (Furanosylboratdiester). In der folgenden Abbildung 8 ist das Quorum-Sensing-System von *Vibrio harveyi* dargestellt, das als Hybrid-Homoserinlacton-2-Komponenten-Quorum-Sensing-System bezeichnet wird.

Für *E. coli* wurde auch 5-Methyl-4-Hydroxy-3-Furanon (MHF) als AI-2 wirksam identifiziert (Winzer et al., 2002). Beide Moleküle, THMF und MHF sind in Abbildung 10 dargestellt.



14

Abbildung 10: Das AI-2 Molekül *R*-THMF und MHF aus *E. coli*

QS ist in *E. coli* an vielen Zellprozessen beteiligt, unter anderem auch an Schwärmen und Biofilmbildung (Ren et al., 2004a).

1.2 Anti-Quorum-Sensing-Systeme

Quorum Sensing ruft häufig Phänotypen der Bakterien hervor, die sich auf andere Organismen in der Umgebung nachteilig auswirken, wie beispielsweise die Bildung von Biofilmen auf Oberflächen anderer Organismen. Daher haben einige

Organismen Strategien entwickelt, um Quorum Sensing entgegenzuwirken. Diese Prozesse werden auch als „Quorum Sensing Inhibition“ (QSI) oder „Quorum Quenching“ (QQ) bezeichnet (Dong et al., 2001).

Die Inhibition von Quorum Sensing kann dabei auf mehreren Wegen erfolgen. Zum einen kann die Inhibition durch die Spaltung des Signalmoleküls erfolgen, enzymatisch oder chemisch, des weiteren durch die Produktion von Molekülen, die an das AHL-Rezeptorprotein binden und so eine Signalweiterleitung verhindern oder auf Transkriptionsebene mit sogenannten Small RNAs.

1.2.1 Chemische Inaktivierung von AHLs

Die Meeresalge *Laminaria digitata* beugt der Bildung von Biofilmen auf ihrer Oberfläche durch die Produktion von Haloperoxidasen vor. Diese Haloperoxidasen katalysieren die Oxidation von Bromiden bzw. Chloriden mit Wasserstoffperoxid, produzieren auf diesem Weg die antimikrobiellen Komponenten Hyperbromsäure (HOBr) oder Hyperchlorige Säure (HOCl). Diese Säuren reagieren mit der 3-Oxo-Gruppe von 3-Oxo-Acyl-Homoserinlactonen und inaktivieren auf diesem Weg diese Quorum-Sensing-Moleküle. AHLs ohne diese 3-Oxo-Gruppe können hingegen nicht inaktiviert werden (Borchardt et al., 2001).

1.2.2 Enzymatische Inaktivierung von AHLs

Es sind zwei Mechanismen bekannt, mit denen AHLs gespalten und somit inaktiviert werden können. Zum einen kann das Quorum-Sensing-Molekül am Lactonring gespalten werden, zum anderen kann eine Hydrolyse der Peptidbindung stattfinden.

Als Beispiel eines die Peptidbindung spaltenden Enzyms gilt die Acyl-Homoserinlacton-Acylase (AiiD) aus dem Bakterium *Ralstonia eutropha* (Lin et al., 2003). Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 11 dargestellt.

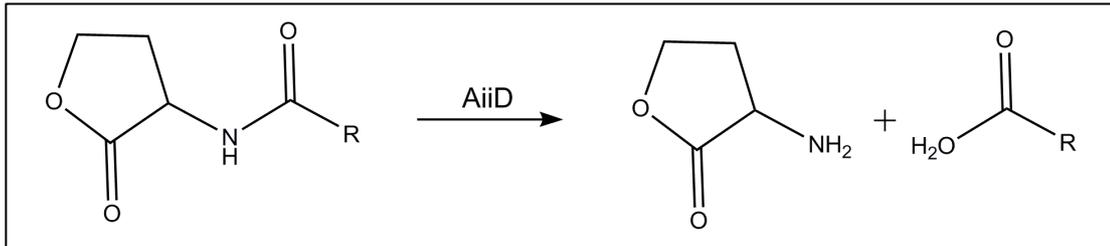


Abbildung 11: AHL-Spaltung durch AiiD. Das durch AiiD codierte Enzym Acyl-HSL-Acylase spaltet das AHL-Molekül, indem es die Peptidbindung hydrolysiert. So in seine Bestandteile zerlegt, ist das Quorum-Sensing-Molekül nicht mehr aktiv und somit wirkungslos.

AHL-Lactonring spaltende Enzyme (*AiiA*) wurden erstmals bei einer Reihe von Unterarten von *Bacillus thuringensis* beschrieben (Lee et al., 2002). Der Mechanismus ist in der folgenden Abbildung 12 zu sehen.

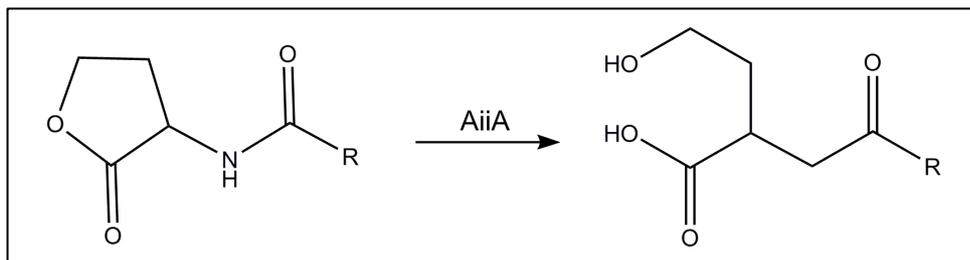


Abbildung 12: AHL-Spaltung durch AiiA. AiiA spaltet den Lactonring des N-Acyl-Homoserinlactons und sorgt auf diesem Wege für eine Inaktivierung des Quorum-Sensing-Signalmoleküls.

Ein weitere enzymatischer Inaktivierungs von AHLs wurde für eine Oxidoreduktase aus *Rhodococcus erythropolis* beschrieben (Uroz et al., 2005), hierbei wird, wie bei der chemischen Inaktivierung durch Haloperoxidasen, die 3-Oxo-Gruppe der Acyl-Kette des AHL-Moleküls in eine Hydroxygruppe umgewandelt und das AHL-Molekül inaktiviert.

1.2.3 QS Inhibition durch Blockierung des AHL-Rezeptorproteins

Die marine Riesenalge *Delisea pulchra* wirkt der Besiedelung ihrer Oberfläche durch Mikroorganismen wie beispielsweise *Serratia liquefaciens* (Rasmussen et al., 2000) entgegen, indem sie halogenierte Furanone produziert.

Diese sind, wie in Abbildung 13 zu sehen, den AHLs in ihrer Struktur sehr ähnlich. Sie besetzen statt der AHLs die Bindestelle des Regulatorproteins und verhindern auf diesem Weg die Aktivierung der Genexpression der AHL-regulierten Gene.

Halogenierte Furanone inhibieren unter anderem das Schwärmverhalten von *E. coli* (Ren et al., 2001), Biofilmbildung und Schwärmen bei *Bacillus subtilis* (Ren et al., 2002) und Quorum Sensing bei *Pseudomonas aeruginosa* (Hentzer et al., 2002; Wu et al., 2004).

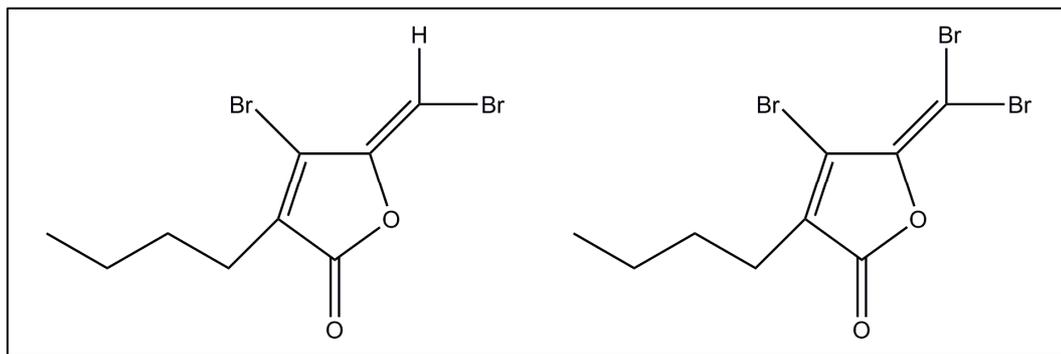


Abbildung 13: Halogenierte Furanone aus *Delisea pulchra*. *Delisea pulchra* produziert zwei verschiedene halogenierte Furanone. Zum einen 4-Bromo-5-(bromomethylen)-3-butyl-2(5H)-Furanon (links), zum anderen 4-Bromo-5-(dibromomethylen)-3-butyl-2(5H)-Furanon.

Neben halogenierten Furanonen aus *D. pulchra* wurden inzwischen eine Reihe synthetischer Strukturen entwickelt, die demselben Inhibitionsmechanismus folgen.

So wurden beispielsweise weitere Furanonderivate entwickelt (Estephane et al., 2008, Martinelli et al., 2004, Wu et al., 2004, Hjelmgaard et al., 2003), die ebenfalls als Quorum Sensing inhibierend getestet wurden, oder bereits bekannte AHL-Moleküle modifiziert (Geske et al., 2008, Janssens et al., 2007, Geske et al., 2007a, Geske et al., 2007b, Pomaniek und Semmelhack, 2007, Kim et al., 2007, Morohoshi et al., 2007, Muh et al., 2006).

1.2.4 QS-Repression durch Small RNAs

Auf genetischer Ebene des Organismus kann die QS Aktivität durch den Einsatz regulatorischer RNAs, sogenannter Small RNAs, deren Vorhandensein bestimmte QS-Gene reprimiert, herunterreguliert werden. Inzwischen wurden solche RNAs unter anderem bereits in *Vibrio cholerae*, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens* identifiziert (Tu et al., 2008, Svenningsen et al., 2008, Kay et al., 2006, Valverde et al., 2003).

1.2.5 Unspezifischer Abbau von AHLs durch *Variovorax paradoxus*

Neben der spezifischen Inaktivierung von AHLs können diese auch unspezifisch abgebaut werden und dienen dabei als N- bzw. C-Quelle. So ist beispielsweise das Bakterium *Variovorax paradoxus* in der Lage, Homoserinlacton als Abbauprodukt von diversen AHLs als N-Quelle zu verwenden (Leadbetter et al., 2000). Der hypothetische Abbauweg von AHLs bei diesem Bakterium ist in Abbildung 14 am Beispiel von C₄-HSL zu sehen.

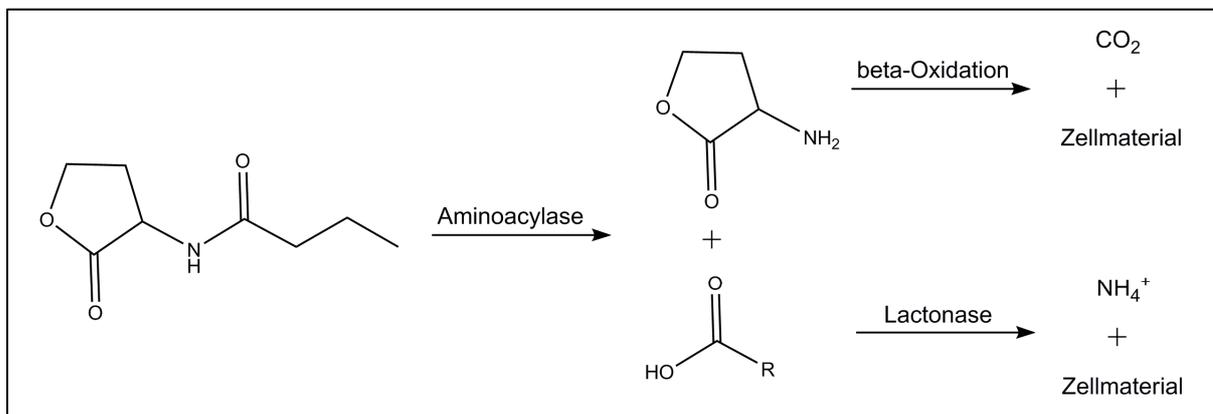


Abbildung 14: Hypothetischer Abbauweg von AHLs bei *Variovorax paradoxus*

Zunächst wird das AHL-Molekül durch eine Aminoacylase in Homoserinlacton und die Kohlenwasserstoffkette gespalten. Die Kohlenwasserstoffkette wird dann über β -Oxidation in Zellmaterial und CO₂ gespalten. Eine Lactonase spaltet das Homoserinlacton in NH₄⁺ und α -Ketobutyrat, das dann über mehrere Stufen zu Butyrat umgesetzt wird.

2. Metagenomik und Quorum Sensing

Viele ursprüngliche Untersuchungen bezogen auf die Untersuchung von Quorum Sensing Signalen beruhen auf der Analyse von Reinkulturen (Pearson et al., 1994, Pearson et al., 1995; Eberhard et al., 1981). Es ist jedoch bekannt, dass nur ein sehr geringer Teil der in der Umwelt vorkommenden Bakterien über die Kultivierung von Reinkulturen erfasst werden kann, bislang sind etwa 6400 Arten bekannt (Oren, 2004). Dies entspricht nur etwa 1 % der tatsächlich vorhandenen Bakterien und Archea (Amann et al., 1995, Pace 1997). Mit dem Einsatz der Metagenomik, bei der Gesamt-DNA direkt aus einer Umweltprobe isoliert und zur Erstellung von Genbanken verwendet wird, ist hingegen der Zugriff auf das genetische Material von nicht kultivierbaren Organismen möglich (Steele et al., 2009, Hugenholtz 2008, Handelsmann 2004). Mit Hilfe dieser Technik wurden bereits viele neue biologisch aktive Moleküle identifiziert (Elend et al., 2006, Williamson et al., 2005, Voget et al., 2003). Die hohe Anzahl AHL-abbauender Bakterien im Erdreich (d'Angelo-Picard, 2005) und die dortige hohe genomische Diversität (Curtis, 2005) machen es zum idealen Habitat für die Verwendung von Metagenomik zur Identifizierung neuer Anti-Quorum Sensing Mechanismen.

3. Intention dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neun Klone, die bereits in einer vorhergehenden Arbeit (Diplomarbeit Schipper, 2004) aus einer metagenomischen Genbank über den Abbau von AHL-Molekülen auf Quorum Quenching Aktivität gescreent worden waren, näher charakterisiert werden. Es sollten für die QQ-Aktivität verantwortlichen Gene isoliert und durch in vivo Expression in verschiedenen bakteriellen Wirten getestet werden. Dabei sollte ihre Wirksamkeit auf Quorum Sensing-typische Phänotypen wie insbesondere Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* und deren mögliche Inhibition überprüft werden.

Im Weiteren sollten die Quorum Sensing inhibierenden Proteine überexprimiert, aufgereinigt und in vitro auf ihren Wirkmechanismus zum Abbau von Autoinducer-Molekülen getestet werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Bakterienstämme, Vektoren und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren, rekombinanten Plasmide und Primer sind in den folgenden Tabellen 3-5 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<u><i>E. coli</i></u>		
DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Gibco Bethesda Research Laboratories, Eggenstein
XL1 blue	<i>recA-</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR1</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lacF</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, Tn10 (Tc), Tc ^R	Bullock et al., 1987
HB101	F- <i>hsdS20</i> (rB-mB) <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Strr), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-ql</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , λ - mit Plasmid pRK2013	Boyer et al., 1969, Figurski et al., 1979
BL21-CodonPlus –RIL	F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+</i> TetR <i>gal endA</i> , Hte [<i>argU ileY leuW</i> CamR], (pRIL tRNA accessory vector), Cm ^R	Fa. Stratagene, La Jolla, USA
<u><i>A. tumefaciens</i></u> NTL4 (pCF218)(pCF372)	Reporterstamm zur AHL-Detektion, Tc ^R , Sp ^R	Fuqua und Winans., 1996
<u><i>P. aeruginosa</i></u> PAO1	Nicht mukoider Wildtyp	Holloway et al., 1979
<u><i>C. violaceum</i></u>	Wildtyp, DSM Nr.30191, QS- induzierte Violacein-Produktion	Kimmel and Maier, 1969
<u><i>Bacillus subtilis</i></u>		
W168	<i>B. subtilis</i> Wildtyp	Buu et al., 1981
TEB1030	<i>B. subtilis</i> Sekretionsstamm, DB430, Δ <i>lipA</i> Δ <i>lipB</i>	Eggert et al., 2003

Tabelle 4: Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBK-CMV	High copy Vektor, Kan ^R	Fa. Stratagene, La Jolla, USA
pBBR1MCS-5	Broad host range low copy Vektor, Gm ^R	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBluescriptSK ⁺ (pSK ⁺)	<i>E. coli</i> Kloniervektor, Amp ^R	Fa. MBI Fermentas, Hilden, Deutschland
pTZ19R-Cm	<i>E. coli</i> Kloniervektor, $\Delta bla-cat$, Cm ^R	Larbig <i>et al.</i> , 2002
pET21a+	His-tag-Expressionsvektor, Amp ^R	Fa. Novagen, Darmstadt, Deutschland
pET19b	His-tag-Expressionsvektor, Amp ^R	Fa. Novagen, Darmstadt, Deutschland
pBio1-pBKCMV	pBK-CMV mit 3,2 kb Insert Bio1	Diplomarbeit Schipper, 2004
pBio2-pBKCMV	pBK-CMV mit 3,1 kb Insert Bio2	Diplomarbeit Schipper, 2004
pBio3-pBKCMV	pBK-CMV mit 3,3 kb Insert Bio3	Diplomarbeit Schipper, 2004
pBio4-pBKCMV	pBK-CMV mit 2,2 kb Insert Bio4	Diplomarbeit Schipper, 2004
pBio5-pBKCMV	pBK-CMV mit 3,1 kb Insert Bio5	Diplomarbeit Schipper, 2004
pBio6-pBKCMV	pBK-CMV mit 5,5 kb Insert Bio6	Diplomarbeit Schipper, 2004
pBio7-pBKCMV	pBK-CMV mit 4,0 kb Insert Bio7	Diplomarbeit Schipper, 2004
pBio8-pBKCMV	pBK-CMV mit 4,2 kb Insert Bio8	Diplomarbeit Schipper, 2004
pBio9-pBKCMV	pBK-CMV mit 1,7 kb Insert Bio9	Diplomarbeit Schipper, 2004
pB4-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 2.2 kb Insert Bio4	diese Arbeit
pB7-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 4.0 kb Insert Bio7	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pB9-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 1.7 kb Insert Bio9	diese Arbeit
pB1H1-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 1.2 kb Insert mit <i>bpiB01</i>	diese Arbeit
pB4A1-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 2.0 kb Insert mit <i>bpiB02</i> und <i>bpiB03</i>	diese Arbeit
pB4A2-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 1.1 kb Insert aus Bio4 mit <i>bpiB02</i>	diese Arbeit
pB4B1-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 0.8 kb insert aus Bio4 mit <i>bpiB03</i>	diese Arbeit
pB4TM02-pBKCMV	Knockout Mutante von pBio4-pBKCMV mit EZ:TN <TET-1> Transposon in ORF <i>bpiB02</i>	Diplomarbeit Schipper, 2004
pB4TM03-pBKCMV	Knockout Mutante von pBio4-pBKCMV mit EZ:TN <TET-1> Transposon in ORF <i>bpiB03</i>	Diplomarbeit Schipper, 2004
pB6-Oxi-pSK ⁺	pSK ⁺ mit <i>ord01</i> aus Bio6	diese Arbeit
pB6-Pep-pSK ⁺	pSK ⁺ mit <i>pep01</i> aus Bio6	diese Arbeit
pB7-pSK ⁺	pSK ⁺ mit vollständigem 4.0 kb Insert Bio7	Diplomarbeit Schipper, 2004
pB7mS-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 0.5 kb Insert mit <i>bpiB04</i> aus Bio7	diese Arbeit
pB7mSTM1-pBKCMV	Knockout Kontrolle von Bio7-pBKCMV mit EZ:TN <TET-1> Transposon in ORF <i>bpiB04</i>	Diplomarbeit Schipper, 2004
pB7mSTM2-pBKCMV	Knockout Kontrolle von pBio7-pBKCMV mit EZ:TN <TET-1> Transposon in ORF <i>bpiB04</i>	Diplomarbeit Schipper, 2004
pB8H9-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 1.9 kb Insert mit <i>orf01</i> aus Bio8	diese Arbeit
pB8H10-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 1.8 kb Insert mit <i>bpiB05</i> aus Bio8	diese Arbeit
pORF5-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 0.8 kb Insert <i>bpiB06</i> aus Bio9	diese Arbeit
pORF1-pSK ⁺	pSK ⁺ mit 0.6 kb Insert mit <i>bpiB07</i> aus Bio9	diese Arbeit
pB1H1- pBBR	pBBR1MCS-5 mit 1,3 kb Insert mit <i>bpiB01</i> aus Bio1	diese Arbeit
pB1H1-TM-pBBR	Knockout Kontrolle von pB1H1-pBBR mit EZ:TN<TET-1>Transposon in ORF <i>bpiB01</i>	diese Arbeit
pB4-pBBR	pBBR1MCS-5 mit vollständigem Insert Bio4	diese Arbeit
pB7mS-pBBR	pBBR1MCS-5 mit <i>bpiB04</i>	diese Arbeit
pB7mSTM-pBBR	Knockout Mutante pB7mS-pBBR mit EZ:TN <TET-1> Transposon in ORF <i>bpiB04</i>	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pB8H10-pBBR	pBBR1MCS-5 mit 1,8 kb Insert mit <i>bpiB05</i> aus Bio 8	diese Arbeit
pB8H10-TM-pBBR	Knockout Kontrolle von B8H10- pBBR mit EZ:TN <TET-1> Transposon in ORF <i>bpiB05</i>	diese Arbeit
pORF5-pBBR	pBBR1MCS-5 mit <i>bpiB06</i>	diese Arbeit
pORF5-TM-pBBR	Knockout Kontrolle von pORF5-pBBR mit EZ:TN <TET-1> Transposon in ORF <i>bpiB06</i>	diese Arbeit
pORF1-pBBR	pBBR1MCS-5 mit <i>bpiB07</i>	diese Arbeit
pORF1-TM-pBBR	Knockout Kontrolle von pORF1-pBBR mit EZ:TN <TET-1> Transposon in ORF <i>bpiB07</i>	diese Arbeit
p007-pBBR	pBBR1-MCS5 mit 2 kb Cellulase-Gen, als experimentelle Kontrolle	diese Arbeit
pB1-pET21a	pET21a mit in <i>NdeI</i> -und <i>NotI</i> -Schnittstelle von pET21a kloniertem ORF <i>bpiB01</i>	diese Arbeit
pB1-pET19b	pET19b mit in die <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> -Schnittstelle von pET19b kloniertem ORF <i>bpiB01</i>	diese Arbeit
pB7-pET21a	pET21a mit in <i>NdeI</i> -und <i>NotI</i> -Schnittstelle von pET21a kloniertem ORF <i>bpiB04</i>	diese Arbeit
pB7-pET19b	pET21a mit in <i>NdeI</i> -und <i>XhoI</i> -Schnittstelle von pET19b kloniertem ORF <i>bpiB04</i>	diese Arbeit
pB8-pET21a	pET21a mit in <i>NdeI</i> -und <i>NotI</i> -Schnittstelle von pET21a kloniertem ORF <i>bpiB05</i>	diese Arbeit
pB9-pET19b	pET19b mit in <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> -Schnitt-stelle kloniertem ORF <i>bpiB09</i> aus Bio5	diese Arbeit
pB1-pDG148-Stu	<i>bpiB01</i> aus pET19 mit His-tag kloniert mit <i>StuI</i> und <i>SwaI</i> in die <i>StuI</i> - und <i>SwaI</i> -Schnittstellen von pDG148-Stu	diese Arbeit
pB7-pDG148-Stu	<i>bpiB04</i> aus pET19 mit His-tag kloniert mit <i>StuI</i> und <i>SwaI</i> in die <i>StuI</i> - und <i>SwaI</i> -Schnittstellen von pDG148-Stu	diese Arbeit

Tabelle 5: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Referenz
Abi_for	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	G ₂ L
Abi_rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	G ₂ L
pBK-CMV_T7mut	GCTCCTTGAATTCTTTGGATC	diese Arbeit
pBK-CMV_T3	CTGCAGGTCGACACTAG	diese Arbeit
T7 Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	G ₂ L
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	G ₂ L
007Ndelfor	GGCATATGGCCACTAGGACACCCAAG	J. Pottkämper
007BamHlrev	GGATCCGGCGAAGTTGTCTGAAGTGTG	J. Pottkämper
B1H1_for	GGGGACTCGAGAAATGAAAAATTTGACC	diese Arbeit
B1H1_rev	TCGAGTCGAAGCTTTTCAGAGCAGGAT	diese Arbeit
B4A1_for	GAGAAGGTACCGTGGTGCAGCACTACGTGG	diese Arbeit
B4A1_rev	CCTGCAAGCTTAGAGGGCGGATGCC	diese Arbeit
B4A2_rev	TAAGCTTGGGCGTTGGTGAGCTGGATGA	diese Arbeit
B4B1_for	CCGGTAACCATGGCCGCCAGAA	diese Arbeit
B4B1_rev	TAGGCGGCCTGAAGCTTCAAGCCAAATC	diese Arbeit
B6_Oxi_for	AAGCCGCGATTCATATGGCACATGGAAAGC	diese Arbeit
B6_Oxi_rev	ACTCGAGCGGATTCATGCCCTCACCGCAT	diese Arbeit
B6_Pep_for	ACGGCTACCACCGGTGAAG	diese Arbeit
B6_Pep_rev	TCAGTGCGGAGAAGTTTACGGAG	diese Arbeit
B7mS_for	GCAGGTACCATATCTCTCGTCATGGCGTTG	diese Arbeit
B7mS_rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	diese Arbeit
B8H9_for	CTGACGGTACCTATGACAACCAGAAAA	diese Arbeit
B8H10_for	CGGAGGGTACCCAATGTTTCGATTACTTG	diese Arbeit
B8H10_rev	GTTGCAAGCTTGTAGCTCTAAAGAAGGGTG	diese Arbeit
Bio9_ORF1_for	GATTCTCGAGACCAGGATCAACCATGGGAA	diese Arbeit
Bio9_ORF1_rev	GACGCTTACGCCTGCAGCCTGCATTCACAA	diese Arbeit
Bio9_ORF5_rev	GCTCCTTGAATTCTTTGGATC	diese Arbeit
B1_Ndel_for	GAGGGGACTTGACATATGAAAAATTTGAC	diese Arbeit
B1_NotI_rev	CATTTCGAGTCGAGCGGCCGCGAGCAGGATG	diese Arbeit
B7_Ndel_for	CAGCAGGTACATATGCTCTCGTCATGGCG	diese Arbeit
B7_NotI_rev	ACACTGCGGCCGCAAAAAGCAGCGCTA	diese Arbeit
B7_XhoI_rev	ACACTCGAGGATCAAAAAGCAGCGCTA	diese Arbeit
B8_Ndel_for	CGGAGCGTCTCATATGTTTCGATTACTTGC	diese Arbeit
B8_NotI_rev	GGGCGGCCGCAAGAAGGGTGCCTCGAAATA	diese Arbeit
BCS5-DH_XhoI_rev	ACCTGCTTTTGTCTCGAGAGCGAACTACTTC	diese Arbeit
pET19b_Stul_for	AAATAATTTTAGTAGGCCTTTAAGAAGGAGA	diese Arbeit
pET19b_SwaI_rev	ATTTAAATCAAAAACCCCTCAAGACCCGT	diese Arbeit

2. Medien und Zusätze

2.1 Medien

Alle Medien bzw. Medienbestandteile wurden, so weit nicht anders angegeben, autoklaviert. Für Agarplatten wurden, mit Ausnahme des Schwärm-Agars, 1,5% (w/v) Agar pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugegeben. Antibiotika wurden nach Abkühlen auf 60-55°C zugegeben.

2.1.1 LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; Sambrook et al., 2001)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
ad 1 L H ₂ O _{bidest}	

2.1.2 *Agrobacterium tumefaciens* (AT)-Medium

20 x AT-Puffer

KH ₂ PO ₄	214 g
ad 1 L H ₂ O _{bidest}	
pH 7,0	

20 x AT-Salzlösung

(NH ₄) ₂ SO ₄	40 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,2 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,024 g
ad 1 L H ₂ O _{bidest}	

50%ige Glucoselösung

Glucose	50 g
ad 100 mL H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert	

Alle Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert, die Glucoselösung sterilfiltriert. Zur Herstellung des AT-Mediums wurden 50 mL 20 x AT-Puffer, 50 mL 20 x AT-Salzlösung, 10 mL 50%ige Glucoselösung und 890 mL autoklaviertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zusammengefügt.

2.1.3 mAPM Medium (modifiziert nach Ohman und Chakrabarty, 1981)

Das für Durchflusszellenversuche verwendete mAPM Medium besteht aus insgesamt drei Lösungen, die getrennt voneinander autoklaviert werden. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf insgesamt 1 L Medium.

Lösung 1

Natriumgluconat (10 mM) 2,18 g

Lösung 2

KNO_3 (10mM) 1,01 g

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1mM) 246 mg

Lösung 3

NaH_2PO_4 14,9 mg

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ 64,0 mg

2.1.4 ABt-Medium (Clark und Maaløe, 1967)

Lösung A

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g

Na_2HPO_4 , 6 g

KH_2PO_4 , 3 g

NaCl 3 g

Na_2SO_4 11 mg

ad 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Lösung B

MgCl_2 0,2 g

CaCl_2 0,01 g

ad 800 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Die Lösungen A and B wurden getrennt voneinander autoklaviert und nach dem Abkühlen zusammengefügt. Anschließend wurden noch folgende Bestandteile zugegeben:

Thiamin	2,5 mg
Glukose	1 mM
FeCl ₃ x 7H ₂ O	0,5 mg

2.1.5 TY-Medium

Trypton	5 g
Hefeextrakt	3 g
CaCl ₂ x 3 H ₂ O	0,27 g
ad 1 L H ₂ O _{bidest}	

2.1.6 PBS

NaCl	137 mM
K ₂ HPO ₄	0,7 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
pH 7,2	

2.1.7 Schwärm-Agar für *E. coli*

Als Basis des Schwärmagars diente LB-Agar mit 0,4% Eiken-Agar (Fa. Eiken, Tokyo, Japan). Als Zusätze wurden 0,4% (w/v) Glucose beigefügt.

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Eiken Agar	4 g
ad 1 L H ₂ O _{bidest}	

2.1.8 Schwärm- und Schwimmagar Agar für *Pseudomonas aeruginosa*

Für die Schwärm- und Schwimmagar-Ansätze wurden alle Lösungen getrennt voneinander autoklaviert bzw. sterilfiltriert und anschließend gemäß Pipettierschema aus Tabelle 6 zusammengefügt. Die Platten konnten nach 1 h Trocknungszeit verwendet werden.

Lösung 1

Glucose 4 g
ad 100 mL H₂O_{bidest}

Lösung 2

MgSO₄ × 7 H₂O 2 g
ad 100 mL H₂O_{bidest}

Lösung 3

CaCl₂ × 2 H₂O .2 g
ad 100 mL H₂O_{bidest}

Lösung 4a

Na₂HPO₄ 7 g
KH₂PO₄ 3 g
NaCl 0,5 g
ad 100 mL H₂O_{bidest}

Lösung 4b

Na₂HPO₄ 7 g
KH₂PO₄ 3 g
NaCl 0,5 g
NH₄Cl 1 g
ad 100 mL H₂O_{bidest}

Lösung 6

Natriumglutamat Monohydrat 5 g
ad 100 mL H₂O_{bidest}

Tabelle 6: Pipettierschema für Schwärm und Schwimagar

Medienbestandteil	Swarming	Swimming
Agar + H ₂ O _{bidest}	0,5 % in 77 mL	0,3 % in 78 mL
Lösung 1	10 mL	10 mL
Lösung 2	1 mL	1 mL
Lösung 3	1 mL	1 mL
Lösung 4a	10 mL	-
Lösung 4b	-	10 mL
Lösung 6	1 mL	-

2.2 Antibiotika und andere Medienzusätze

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und anderen Zusätze sind in ihrer Endkonzentration für die verschiedenen Bakterienstämme der folgenden Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Antibiotika und andere Medienzusätze

Antibiotikum/ Medienzusatz	Endkonzentration im Medium [$\mu\text{g mL}^{-1}$]				Lösungsmittel
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	
Ampicillin	100				EtOH (50%)
Chloramphenicol	25				EtOH
Gentamycin	10	50			H ₂ O
Kanamycin	25		100	2,5	H ₂ O
Spectinomycin			50		H ₂ O
Tetracyclin	5		4,5		EtOH
IPTG	100				H ₂ O
X-Gal	50		60		DMF

Alle Antibiotika und anderen oben aufgeführten Zusätze wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert,

die Lagerung erfolgt bei -20°C. Die Zugabe zu den Medien erfolgte nach dem Autoklavieren der Medien und nach dem Abkühlen auf mindestens 60-55°C.

3. Zellanzucht

3.1 Zellanzucht allgemein

Die Anzucht aller Bakterien in Flüssigmedium erfolgte, falls nicht anders angegeben, in Reagenzgläsern als 5 mL-Kulturen oder in Erlenmeyerkolben in Volumina von 30 mL bis 250 mL auf dem Schüttler, gegebenenfalls unter dem Zusatz selektiver Antibiotika.

Im Allgemeinen erfolgte die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* und *Chromobacterium violaceum* bei 30°C, die der verwendeten *E. coli*- und *P. aeruginosa*-Stämme bei 37°C.

3.1.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mit Hilfe photometrischer Messungen in Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt (Pharmacia Biotec; Ultraspec 3000). Hierzu wurde die optische Dichte (OD) einer Flüssigkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen, unbeimpftes Medium diente als Referenzwert. Um Meßungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die gemessenen Proben ab einer OD₆₀₀ von 0,8 verdünnt. Bei *E. coli* entspricht eine OD₆₀₀ von 0,1 etwa einer Zellkonzentration von 1×10^8 Zellen mL⁻¹.

3.2 Motilitätstests

3.2.1 Schwärmtestes mit *E. coli* XL1 blue

In 6-Well-Platten wurden pro Well 4 mL *E. coli* Schwärmagar (I.2.1.6) pipettiert. Um die Klone auf ihre Schwärmaktivität zu testen, wurden von 5 mL ÜN-Kulturen 500 µL in ein Eppendorf-Cup überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 10 µL LB-Medium resuspendiert. Pro Napf wurde dann 1 µL der jeweiligen Zellsuspension in der Mitte des Napfes aufgetragen. Die Platten wurden anschließend luftdicht verschlossen und bei 37°C ÜN (16 h) inkubiert.

3.2.2 Motilitätstest mit *P. aeruginosa* PAO1

Der *Pseudomonas* Schwärm- bzw. Schwimmagar wurde zu je 20 mL in Petrischalen gegossen und bis zum Erkalten ca. 1 h bei RT aufbewahrt. Die Zusammensetzung ist in Abschnitt I.2.1.7 beschrieben.

500 μL einer PAO1 ÜN Kultur wurden abzentrifugiert und in 10 μL LB aufgenommen. 1 μL der Zellsuspension wurde auf eine Schwimm- oder Schwärmagarplatte aufgetragen und die Platte für 48 h bei 37°C inkubiert.

3.3 Anzucht von Biofilmen in Durchflusszellen

3.3.1 Vorbereitung der *P.aeruginosa* PAO1-Zellen

Eine ÜN Kultur des entsprechenden *P. aeruginosa*-Klons wurde auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Diese Zellen wurden am nächsten Tag von der Agarplatte abgenommen und in 5 mL LB-Medium resuspendiert. Nach Messung der Zelldichte wurden jeweils 6×10^8 Zellen abgenommen, abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 6 mL mAPM bzw. ABt-Medium aufgenommen.

3.3.2 Vorbereiten der Durchflusszellen und Biofilmanzucht

Zur Anzucht von Biofilmen auf Glas unter kontinuierlichen Bedingungen wurden 2-Kanal-Durchflusszellen aus V10A-Stahl verwendet, wobei jeder Kanal die Ausmaße 3 mm x 8 mm x 54 mm besaß. Als Substratum wurden Deckgläschen aus Borosilikatglas (24 mm x 60 mm; Dicke 0,17 mm Fa. Marienfeld „Superior“) mit Additiv-freiem Silikon an der an der Unter- und Oberseite der Durchflusszellen befestigt. Für die Zu- und Abläufe wurden Tygon-Schläuche (Innendurchmesser: 3,17 mm) verwendet. Nach dem Autoklavieren der Durchflusszellen und der Schläuche wurden die Biofilm Experimente mit mAPM bzw. ABt-Medium durchgeführt. Mit Hilfe einer Mehrkanal-Peristaltikpumpe (Fa. Ismatec, IPC-N) wurde eine Durchflussgeschwindigkeit von 20 mL h⁻¹ (8,33 cm h⁻¹) eingestellt. Dies entsprach bei den Ausmaßen der Durchflusszelle einer Reynoldszahl von 1.

Zur Inokulation der Durchflusszellen wurden für jeden Kanal 6 mL Medium mit den PAO1-Zellen (siehe I.3.2.1) gemischt. Nach Einbringen dieser Suspension in die Durchflusszelle und einer Standzeit von 1 h wurde der Fluss wieder angestellt und die Biofilmentwicklung mit dem CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) im

Phasenkontrast-Modus verfolgt. Nach 72h wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 (Fa. Molecular Probes Inc., Oregon, USA) durch Zugabe von 5 mL Färbelösung (15 μ L SYTO 9 pro mL Medium) gefärbt und mit dem CLSM dokumentiert.

3.3.3 CLSM und Bildanalyse der Biofilme

Die Aufnahmen der Biofilme erfolgten mit einem LSM 510 Konfokalen Laserscanmikroskop (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland). Die Bilder wurden mit einem Zeiss LD Achroplan 40x/0.60 NA Objektiv aufgenommen.

Die Entwicklung der ungefärbten Biofilme in den Durchflusszellen wurde mit dem Durchlichtdetektor des CLSM-Systems visualisiert, der nicht-konfokale einzelne *image-slices* aufnahm. Dreidimensionale *image stacks* des 72 h alten gefärbten Biofilms wurden bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm aufgenommen unter Einsatz eines Argon-Lasers in Kombination mit einem Detektionsfilter LP 505 nm. Die digitale Bildauswertung und Bildanalyse erfolgte mit Zeiss LSM Software (Version 3.2). Dreidimensionale Rekonstruktionen wurden mit der Zeiss AxioVision Software (Version 3.1) ausgeführt. Die Quantifizierung der Biofilm-Parameter der erhaltenen *image stacks* erfolgte mit dem COMSTAT Programm.

4. Stammhaltung

4.1 Anlegen von Glycerin-Stammkulturen

Für Glycerin-Stammkulturen wurden von allen verwendeten Bakterienstämmen und Klonen frische ÜN-Kulturen 750 μ L Kultur mit 750 μ L 66%igem Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

4.2 Anlegen von Agar-Stammpplatten

Für alle verwendeten Bakterienstämme wurden LB- oder TY-Agarplatten mit den selektiven Antibiotika angelegt. Hierzu wurde von jedem Stamm aus einer Flüssig- oder Glycerinkultur mit einer ausgeglühten Impföse etwas Bakteriensuspension entnommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Es folgte eine ÜN-Inkubation bei der optimalen Wachstumstemperatur (30°C oder 37°C). Die Platten wurden anschließend mit Parafilm umwickelt, um Flüssigkeitsverlust vorzubeugen, und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

5. Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA

5.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nicht hitzestabile Geräte wurden mit Ethanol (70%) gespült, Lösungen sterilfiltriert.

5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegelelektrophoresen wurden zur Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA verwendet. Hierfür wurden 0,8%ige oder 1,7%ige Agarosegele verwendet, die mit TAE-Puffer als Lösungsmittel für die Agarose gegossen wurden. Dieser Puffer wurde ebenfalls als Laufpuffer während der Elektrophorese verwendet. Die Elektrophorese wurde in der Regel bei 100 Volt für 1 Stunde in einer Gelelektrophoresekammer (Fa. Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Vor der Auftragung der DNA wurden die Proben zur Beschwerung und Markierung der Lauffront bei etwa 500 bp mit 10x Loading Dye-DNA-Ladepuffer vermischt. Für die Größenbestimmung der aufgetragenen DNA wurde als Vergleich ein Marker aufgetragen, entweder GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder oder GeneRuler™ 100 bp Ladder der Firma MBI Fermentas. Nach der Elektrophorese wurden die Gele etwa 10 min in einem Wasserbad mit $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ethidiumbromid gefärbt und danach etwa 5 min in einem Wasserbad entfärbt, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend konnte das Gel unter UV-Licht bei 254 nm in einer Gel-Dokumentationsanlage von BioRad (GelDoc 1000, Fa. BioRad, München) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert werden.

TAE-Puffer (1 x)

Tris-HCl (pH 8,2)	40 mM
EDTA	2 mM
Eisessig	20 mM
pH 8,2	

Der TAE-Puffer wurde als 50-fach konzentrierte Lösung hergestellt und vor Gebrauch verdünnt.

Loading Dye-DNA-Ladepuffer

Glycerin	30 %
EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %

Zur Herstellung des Ladepuffers wurden zunächst Glycerin und EDTA in H₂O_{bidest} unter Erwärmen gelöst, dann wurden die Farbstoffe zugegeben.

5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA kann über die Abschätzung auf einem Agarosegel über die Auftragung von Vergleichs-DNA einer definierten Konzentration oder über photometrische Messung erfolgen. Die photometrische Messung erfolgte mit Hilfe einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke bei 260 nm. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei dieser Wellenlänge 50 µg mL⁻¹ doppelsträngiger DNA. Zur Reinheitsbestimmung der DNA konnte das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ gemessen werden. Bei DNA mit hohem Reinheitsgrad liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0.

5.4 Isolierung von DNA

5.4.1 Schnelle Plasmidisolierung aus *E. coli* („Cracking“)

Mit dieser Methode wurde Plasmid-DNA aus einzelnen Kolonien oder aus ÜN-Kulturen isoliert, um die Größe des Plasmids bestimmen zu können. Für weitergehende Arbeiten wie z. B. Sequenzierung ist diese Methode nicht geeignet.

Für die Isolierung wurde zunächst eine gut gewachsene Kolonie von Platte oder ein Teil von einem Pellet einer abzentrifugierten ÜN-Kultur mit einer gelben Spitze abgenommen und in 25 µL 10 mM EDTA pH 8,0 resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 25 µL frisch angesetzttem Cracking-Puffer. Anschließend wurde gemischt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 70°C, dann das Abkühlen auf Eis.

Anschließend wurden 2 µL „Cracking-Farbe“ zugegeben, dann folgte eine Inkubation 5 min auf Eis. Im Anschluss wurde dann noch für 10 min mit 13.000 rpm bei 4°C (Eppendorf Mikro-Kühlzentrifuge 5415R, Fa. Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert.

Danach wurden 15-20 µL Überstand direkt auf Agarosegel ohne Zusatz von Loading Dye aufgetragen und das Gel 1 h bei 100 V laufen gelassen, anschließend gefärbt.

Cracking-Puffer

2 N NaOH	100 µL
10% SDS	50 µL
Sucrose	0,2 g
ad 1 mL steriles H ₂ O	

Cracking-Farbe

4M KCl	1,5 µL
0,4% Bromphenolblau	0,5 µL

5.4.2 Plasmid-DNA-Isolierung mit Kits

Für Ligationen, Elektroporationen und Sequenzierungen wurden fertige Kits zur Plasmidisolierung für den Erhalt besonders sauberer Plasmid-DNA verwendet. Hierfür wurden das „QiaSpin Miniprep“-Kit der Firma MBI Fermentas (Hilden, Deutschland), das „Wizard® Plus SV Minipreps“-Kit der Firma Promega (Madison, USA) oder das „High Yield Plasmid Mini Kit“ der Firma Südlabor (Gauting, Deutschland) verwendet. Für den Erhalt größerer DNA Mengen wurde das „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) eingesetzt.

5.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

5 mL einer ÜN-Kultur wurden in einem Eppendorf-Cup für 5 min bei 13.000 rpm (Minispin®-Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert, das Pellet in 200 µL P1-Puffer (mit RNase) resuspendiert. Es wurden 200 µL P2-Puffer hinzugefügt und die Lösung geschwenkt. Es folgte 1 min Inkubation bei RT, Zugabe von 200 µL Chloroform und eine Inkubation 1 min bei RT. Anschließend wurden 150 µL P3-Puffer zugegeben, 5-10 min bei RT inkubiert, anschließend gevortext. Nach 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4°C (Eppendorf Mikro-Kühlzentrifuge 5415R, Fa. Eppendorf, Hamburg) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues E-Cup überführt. Dann wurden 2-3 V EtOH (96%) zur Fällung der DNA zugegeben und 15 min bei -70°C. 30 min inkubiert. Dann wurde bei einer Temperatur von 4°C bei 13.000 rpm für 30 min zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen. Es folgte die Zugabe von 100 µL EtOH (70%) zum Waschen des Pellets und die Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme der getrockneten DNA in 20 μL H_2O

P1-Puffer (Resuspendieren)

EDTA (10 mM) 0,74 g

Tris-HCl (50 mM) 1,21 g

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ad 200 mL

pH 8,0 sterilfiltriert

Zur Entfernung der RNA konnte RNaseA in einer Endkonzentration von 1 mg mL^{-1} zugefügt werden. Hierzu wurde zunächst eine RNaseA-Stammlösung wie folgt hergestellt: 10 mL TE-Puffer (10 mM Tris HCl (pH 8,0) + 1 mM EDTA) wurden mit einer entsprechenden Menge RNaseA zusammenpipettiert. Anschließend wurde die Lösung bei 15 min 90°C inkubiert. Es folgte Abkühlung auf RT. Die Stammlösung konnte bei -20°C gelagert werden.

P2-Lösung (Lyse)

NaOH (200 mM) 4,0 g

SDS 5,0 g

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 500 mL

P3-Puffer (Neutralisation und Präzipitierung)

Kaliumacetat (3,2 M) 62,73 g

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 200 mL

pH 5,5 (Einstellen mit Eisessig)

5.4.4 Isolierung von DNA durch Extraktion aus Agarosegelen

Hierfür wurde das „Qiagen Gel Extraction Kit“ verwendet. Zunächst wurde das DNA-Fragment mit einem scharfen sauberen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Diese wurde in ein zuvor abgewogenes Eppendorf-Cup überführt, dieses wird dann erneut gewogen. Anschließend wurden zu 1 V Gel (100 mg entsprechen 100 μL) 3 V QG-Puffer hinzugefügt. Um die DNA zu lösen, wurde der Ansatz mindestens 10 min, bis zur vollständigen Auflösung des Gels, bei 50°C inkubiert. Für Fragmente unter 1 kb wurden anschließend 1 V Isopropanol zugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung in eine Qiaquick-Säule überführt und für

1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Minispin®-Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Hamburg). Der Durchlauf wurde verworfen. Um alle Agarosereste aus der Säule vollständig zu entfernen, wurden 500 µL QG-Puffer zugefügt und die Säule erneut für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen. Um die Säule zu waschen, wurden 750 µL PE-Puffer zugefügt, es wurde erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, zur Entfernung des restlichen Waschpuffers wurde erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in einem sauberen 1,5 mL Eppendorf-Cup platziert. Zum Eluieren der DNA wurden 50 µL H₂O zugefügt. Nach 1 min Inkubation bei RT wurde die Säule 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die eluierte DNA konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

5.5 Enzymatische Modifikation von DNA

5.5.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für eine Restriktionsverdau wurde das Restriktionsenzym mit dem zugehörigen Puffer, H₂O_{bidest} und der zu verdauenden DNA wie folgt zusammengefügt:

H ₂ O _{bidest}	14,5 - 12,5 µL
10 x Puffer	2 µL
DNA	3-5 µL
Restriktionsenzym	0,5 µL
	Σ 20 µL

Um die DNA vollständig zu schneiden, wurde der Ansatz für 2 bis 4 h oder ÜN bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Zur Kontrolle konnte im Anschluss ein Teil des Verdaus auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Für alle Verdaue wurden Restriktionsenzyme der Firma MBI Fermentas (Hilden, Deutschland) verwendet.

5.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden unter Verwendung des angegebenen Fermentas-Protokolls für T4-Ligase (Fa. MBI Fermentas) durchgeführt. Hierbei wurde zwischen „*blunt end*“ und „*sticky end*“-Ligationen unterschieden.

„*Blunt end*“-Ligationen wurden mit PCR-Produkten oder *Sma*I- bzw. *Eco*RV-, *Stu*I- und *Swa*I-geschnittenen DNA-Fragmenten und Plasmiden durchgeführt, „*sticky*“

end–Ligationen mit allen anderen mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Fragmenten und Plasmiden. Die Ansätze erfolgten immer im Vektor-Insert-Verhältnis 1:1 – 1:3. Die Ligation konnte ÜN bei 16°C oder für 1 h bei 22°C durchgeführt werden.

Ligation mit “blunt ends”

H ₂ O _{bidest}	2 µL
10x T4 Ligase Puffer	2 µL
PEG 4000	2 µL
DNA (Insert + Vektor)	10 µL
T4 Ligase	4 µL
	Σ 20 µL

Ligation mit “sticky ends”

H ₂ O _{bidest}	7 µL
10x T4 Ligase Puffer	2 µL
DNA (Insert + Vektor)	10 µL
T4-Ligase	1 µL
	Σ 20 µL

5.6 Transformationsverfahren

Um DNA in eine Zelle zu transportieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Transformationsverfahren verwendet. Zum einen die Transformation per Hitzeschock, zum anderen die Transformation durch Elektroporation. Die Elektroporation weist eine wesentlich höhere Transformationsrate auf, dafür muss die DNA jedoch eine höhere Reinheit aufweisen. Bei der Transformation mit Hitzeschock ist eine höhere Konzentration an Salzen möglich, hier kann direkt mit alkalischer Lyse aufgereinigte DNA verwendet werden. Eine weitere Methode der DNA-Übertragung ist die Konjugation, bei der mit Hilfe eines Helferplasmids eine DNA-Übertragung stattfinden kann.

5.6.1 Transformation durch Hitzeschock

5.6.1.1 Herstellung hitzekompetenter Zellen

Eine Hauptkultur (250 mL SOB-Medium, in 1 L Erlenmeyerkolben) wurde mit 1 mL einer exponentiell wachsenden *E. coli*-LB-Vorkultur angeimpft und bei 18 °C im Schüttler (Thermotron, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 etwa 24 h angezogen. Nach 10 minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C, GSA-Rotor, Sorvall® RC-6TM Plus Superspeed Zentrifuge, Fa. Thermo, USA) geerntet, in 80 mL eiskaltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert, weitere 10 min auf Eis gestellt und nochmals für 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 mL kaltem TB-Puffer aufgenommen, mit 1,4 mL DMSO (Endkonzentration: 7 % (v/v)) versetzt, sorgfältig gemischt, erneut 10 min auf Eis gestellt und in Aliquots à 200 µL auf vorgekühlte Eppendorf-Cups aufgeteilt. Die Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

SOB-Medium (nach Hanahan, 1983)

Trypton	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Die Magnesiumsalze wurden aus getrennt autoklavierten Stammlösungen (1 M MgCl₂ bzw. 1 M MgSO₄) zugegeben.

TB-Puffer

Pipes-Puffer	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH	6,7

Die MnCl₂-Lösung wurde getrennt von den restlichen Bestandteilen des TB-Puffers autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

5.6.1.2 Hitzeschock

Zunächst wurden die Trafozellen 10 min auf Eis aufgetaut. Dann wurden 6 µL Ligationsansatz hinzupipettiert bzw. zwischen 2 und 4 µL Plasmid DNA. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis, dann der Hitzeschock 90 sec bei 42°C. Danach wurden die Zellen für weitere 3 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 800 mL LB und Inkubation für 60 min bei 37°C auf dem Schüttler (Thermotron, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz). Dann konnten die Zellen auf Selektions-Agarplatten ausplattiert werden.

5.6.2 Transformation durch Elektroporation

Durch kurze elektrische Impulse wird die Zellmembran für DNA passierbar gemacht. Die Transformationseffizienz bei dieser Methode liegt bei ca. 10^9 - 10^{10} Transformanten pro µg eingesetzter DNA. Entscheidende Parameter sind die Stärke des elektrischen Feldes, die Dauer des Pulses und die Konzentration an DNA. Dabei musste ein Kompromiss zwischen der Erhöhung der Transformationseffizienz und dem Absinken der Lebensfähigkeit der Zellen durch höhere Feldstärken und längere Pulszeiten gefunden werden.

Für die Elektroporation wurden 2 verschiedene Geräte verwendet, zum einen das Gene Pulser Xcell Electroporation System (Fa. Biorad), zum anderen der Elektroporator 2510 (Fa. Eppendorf).

5.6.2.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Alle Lösungen und Gefäße mussten eisgekühlt verwendet werden. Vornehmliche Aufgabe der Zellpräparation war die Beseitigung von Salzen, um die Ionenstärke der Suspension zu verringern. Die Zellpellets sollten nur äußerst vorsichtig resuspendiert werden.

500 mL LB-Medium wurden mit 2,5 mL Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 unter starkem Schütteln (Thermotron, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10–15 min auf Eis gelagert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 5.000 rpm für 20 min bei 4 °C. Das Pellet wurde in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die Zellen wurden mit 500 mL sterilem H_2O_{bidest} gewaschen und erneut bei 5.000 rpm für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 40 mL 10 % Glycerin gut gemischt und

abermals abzentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, 4°C). In ca. 1 Volumen Glycerin (10%ig) wurden die Zellen resuspendiert und aliquotiert (60 µL). Eine Lagerung erfolgte bei -70 °C

5.6.2.2 Herstellung schneller Epozellen

Zur schnellen Herstellung von Zellen für die Elektroporation konnte auch eine 5 mL ÜN Kultur direkt eingesetzt werden. Alle Zentrifugationsschritte fanden für 30 sec bei 4°C und 13.000 rpm (Eppendorf Mikro-Kühlzentrifuge 5415R, Fa. Eppendorf, Hamburg) statt. Dazu wurden 5 mL einer ÜN-Kultur 1 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und zweimal mit kaltem H₂O_{bidest} gewaschen (1 min bei 13.000 rpm und 4°C), anschließend erfolgte noch einmaliges Waschen (1 min bei 13.000 rpm und 4°C) mit 10%igem kaltem Glycerin. Danach wurden die Zellen erneut für 1 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und in 120 µL 10%igem kaltem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden in 3 Portionen zu je 40 µL aufgeteilt und bis zur Elektroporation auf Eis gelagert.

5.6.2.3 Elektroporation

Die eingefrorenen elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis ca. 10 min aufgetaut, 0,5-1 µg DNA-Lösung zugegeben. Bei den schnellen Epozellen wurden die Zellen direkt mit der DNA vermischt. Es folgte die Überführung in sterile vorgekühlte Elektroporations-Küvette und Inkubation auf Eis für 10 min. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω (2 mm Elektrodenabstand) im GenePulser Xcell™ (BioRad, München). Bei dem Eppendorf Gerät erfolgte die Elektroporation bei 1800 Volt unter den eingestellten Parametern. Die optimale Entladungszeit liegt bei etwa 5 Millisekunden. Es folgte ein sofortiger Zusatz von 1 mL LB-Medium ohne Antibiotikum und die Überführung in 1,5 mL Eppendorf-Cup, anschließend Inkubation für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler. Es wurden je 50 µL auf einer Selektions-Agarplatte ausplattiert und die Platten ÜN bei 37°C inkubiert.

5.6.3 Konjugation

Je 500 µL LB-Übernachtskultur des Donorstammes, des Helferstammes *E. coli* HB101-pRK2013 sowie des Rezipientenstammes wurden 2 min bei 13.000 rpm

(Eppendorf Mikro-Kühlzentrifuge 5415R, Fa. Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend einmal mit 500 μ L PBS gewaschen und Rezipienten- und Helferstamm in je 50 μ L PBS resuspendiert, anschließend mit Donorstamm gemischt und für 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. 50 μ L PBS wurden abgenommen und die Zellen in den verbleibenden 50 μ L resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf eine LB-Agarplatte aufgetropft und zur Konjugation über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der ÜN Inkubation wurden die Zellen des Konjugationsansatzes von der Platte abgekratzt und einmal mit 1 mL PBS gewaschen. Zur Selektion wurden die Zellen anschließend auf entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert.

5.6.4 Aufnahme von Plasmid-DNA bei *B. subtilis*

Bacillus subtilis ist in der Lage, unter bestimmten Umgebungsbedingungen DNA direkt aus dem Medium ohne Hitze- oder Elektroschock aufzunehmen. Das hier beschriebene Verfahren wurde nach Spizizen (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961; Young & Spizizen, 1961) modifiziert. Hierfür wurden 5 mL PARIS-Medium mit 100 μ L ÜN-Kultur des verwendeten *B. subtilis* Stammes beimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zu $OD_{600} = 1,0$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zu 500 μ L portioniert, pro Ansatz wurde dann 1 μ g Plasmid-DNA zugegeben. Die Ansätze wurden 4-6 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Selektionsagarplatten ausplattiert.

PARIS-Medium

K ₂ HPO ₄	60 mM
KH ₂ PO ₄	40 mM
Na ₃ -Citrat	3 mM
Glukose	1 % (w/v)
Casamino Acids	0,1 % (w/v)
L-Tryptophan	20 mg L ⁻¹
MgSO ₄	3 mM
Kalium-Glutamat	20 mM
Fe(III)NH ₄ -Citrat	2,2 mg L ⁻¹

5.6.5 Selektion rekombinanter *E. coli* Klone durch X-Gal-Test

Die *E. coli* Stämme XL1 blue und DH5 α sind durch eine Deletion im *lacZ*-Gen gekennzeichnet und können daher keine aktive β -Galaktosidase mehr bilden. Durch Transformation mit Plasmiden wie pBlueskriptSK+, die über die α - Untereinheit der β -Galaktosidase verfügen, kann das aktive Enzym auf X-Gal- und IPTG-haltigen Platten sichtbar gemacht werden, indem die β -Galaktosidase das Glucoseanalogon X-Gal spaltet, wonach durch Luftoxidation ein blauer Farbstoff entsteht. Das auf dem Plasmid befindliche *lacZ*-Gen wird durch IPTG induziert. Soll in die Multiklonierungsstelle des Plasmids ein Insert ligiert werden, kann der Erfolg der Insertion nach Transformation anhand der Kolonienfarbe sichtbar gemacht werden. Plasmide mit einer Insertion in der Multiklonierungsstelle können keine aktive β -Galaktosidase bilden und erscheinen weiß (Blau/Weiß-Selektion).

5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

5.7.1 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Herstellung spezifischer DNA-Fragmente für Klonierungen oder Sequenzierungen verwendet. Als Enzyme wurden die *Pfu*-DNA-Polymerase (Fa. MBI Fermentas), die KOD HiFi DNA Polymerase (Fa. Novagen) und die *Taq*-DNA-Polymerase (Fa. MBI Fermentas) eingesetzt. Die *Taq*-Polymerase wurde aufgrund der fehlenden Korrekturlesefähigkeit nur für quantitative Analysen wie Kolonie-PCR eingesetzt.

Für alle mit der *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase durchgeführten PCRs wurden folgende Ansätze pipettiert:

DNA	0,5 – 1 μ g
Oligonukleotide	je 100 pmol
dNTP-Gemisch	200 μ M
DNA Polymerase	1 U
Reaktionspuffer (10x)	10 μ L
MgSO ₄ oder MgCl ₂	1,5 mM
H ₂ O _{bidest}	ad 100 μ L

Die Temperaturzyklen wurden den jeweiligen Anforderungen in Bezug auf die Annealingtemperatur der Primer und die Dauer der Kettenverlängerung angepasst. Sie wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Initialdenaturierung 95 °C 2 min

Anschließend 35 Zyklen

Denaturierung 95 °C 1 min

Hybridisierung T_{anneal} 1 min

Kettenverlängerung 72 °C x min

Ende der Zyklen

Kettenverlängerung 72 °C 10 min

Die Anlagerungstemperatur (T_{anneal}) richtete sich dabei nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer. Die Berechnung des Schmelzpunktes T_m erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times [\text{GC \%}] - (650 / \text{bp-Länge}_{\text{Primer}})$$

Die Anlagerungstemperatur T_{anneal} für die PCR wird wie folgt berechnet:

$$T_{\text{anneal}} = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Als T_m wird immer der niedrige T_m -Wert beider verwendeter Primer gewählt.

Für die Elongation wurde entsprechend der zu erwartenden Fragmentlänge eine Zeit von ca. 1 min pro kb für die *Taq*-Polymerase gewählt, für die *Pfu*-Polymerase wurde von 500 bp pro min ausgegangen.

Die Temperaturzyklen wurden mit dem "Thermocycler Primus" (Fa. MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

5.7.1.1 PCR mit der KOD HiFi DNA Polymerase

Diese KOD-HiFi-Polymerase (Fa. Novagen) besitzt eine Korrekturlesefähigkeit und extrem kurze Hybridisierungs- und Verlängerungszeiten. Dadurch wichen das

Pipettierschema und die Temperaturzyklen extrem von den anderen verwendeten Polymerasen ab. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sah wie folgt aus:

DNA	0,5 – 1 µg
Oligonukleotide	0,4 µM
dNTP-Gemisch	200 µM
DNA Polymerase	1 U
Reaktionspuffer (10x)	5 µL
MgCl ₂	1 mM
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µL

Die in der Arbeit verwendeten Temperaturzyklen für PCRs mit der KOD-HiFi-Polymerase wurden in 2 Gruppen unterteilt, die Parameter wichen dabei für PCR-Fragmente von 1-2 kb im Vergleich zu PCR-Fragmenten von 3-4 kb Größe ab:

Fragmentgröße 1-2 kb

Initialdenaturierung	98 °C	5 min
anschließend 25 Zyklen		
Denaturierung	98 °C	15 sec
Hybridisierung	T _m - 5 °C	2 sec
Kettenverlängerung	72 °C	20 sec

Fragmentgröße 3-4 kb

Initialdenaturierung	98 °C	5 min
anschließend 25-30 Zyklen		
Denaturierung	98 °C	15 sec
Hybridisierung	T _m - 5 °C	5 sec
Kettenverlängerung	72 °C	40 sec

5.7.2 Kolonie-PCR

Für Kolonie-PCRs (20 µL pro Ansatz) wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Hierfür wurde zunächst ein Mastermix angesetzt:

H ₂ O _{bidest}	325 µL
<i>Taq</i> Polymerase Enhancer (5x)	100 µL
<i>Taq</i> Polymerase Puffer (10x) mit MgSO ₄	50 µL
dNTPs	10 µL
forward Primer	5 µL
reverse Primer	5 µL
<i>Taq</i> Polymerase	5 µL
	Σ 500 µL

Aus diesem Master Mix wurden 25 PCR Ansätze angesetzt. Für jede Reaktion wurde Koloniematerial von einer Agar-Platte entnommen und mit dem PCR-Ansatz gemischt.

5.8 Transposonmutagenese

Die Transposonmutagenese wurde angewandt, um AQS-Gene gezielt detektieren zu können. Hierzu wurde das „EZ::TNTM <TET-1> Insertion Kit“ der Firma Epicentre® (Cat. No. EZI921T) verwendet. Zunächst musste berechnet werden, wie viel µMol 2 µg der eingesetzten Ziel-DNA entsprechen, damit die gleiche Menge Transposon zugegeben werden kann. Die Berechnung für die Konzentration der Ziel-DNA erfolgt nach folgender Formel:

$$\mu\text{mol Ziel-DNA} = \mu\text{g Ziel-DNA} / (\text{Anzahl bp Ziel-DNA} \times 660)$$

Hierfür wurde auf Eis zunächst folgender Ansatz pipettiert:

Reaktionspuffer	1 µL
DNA	0,2 µg
Transposon	x µL
Transposase	1 µL
steriles H ₂ O	2- 2,5 µL
	Σ 10 µL

Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 37°C, dann die Zugabe von 1 µL Stopp-Mix. Anschließend wurde nochmals für 10 min bei 70°C inkubiert.

Der Transposonmutagenese-Ansatz konnte nun bei -20°C gelagert werden.

6. Proteinbiochemische Methoden

6.1 Standardtechniken

6.1.1 Quantitative Proteinbestimmung (nach Bradford)

Für eine quantitative Proteinbestimmung wurde die „Roti®-Quant“-Lösung der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet, der auf der colorimetrischen Methode von Bradford (1976, mod.) basiert. Der anionisch vorliegende Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet dabei an positiv geladene Aminosäuren der Proteine. Maximal können Proteinmengen von 1-10 µg bestimmt werden.

Für die Proteinmessung wurden 800 µL des Probenpuffers (mit Protein) mit 200 µL der unverdünnten Färbelösung versetzt, der Ansatz gut gemischt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach nochmaligem Durchmischen erfolgte die Messung der OD bei 595 nm gegen eine Nullprobe ohne Protein. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit BSA im Bereich von 0-20 µg Protein pro Ansatz erstellt wurde.

6.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) werden alle Proteine durch Einlagerung des amphipatischen, negativ geladenen SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert und mit einer identischen Ladungsdichte versehen. Dies folgt aus der Einlagerung eines SDS-Moleküls pro 2 Aminosäuren, so dass die negative Gesamtladung der Größe des Proteins proportional ist. Durch die identische Ladungsdichte ist nun eine Auftrennung der Proteine nach der Masse in einem Polyacrylamid-Netzwerk möglich. Für die Elektrophorese wurde eine „Mini Protean 3“-Apparatur (Fa. BioRad, München) verwendet. Es wurden ausschließlich diskontinuierliche Gele gegossen, die aus einem Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel bestanden, was zu einer besseren Auftrennung der Proben führte. Für die Trennleistung in einem bestimmten Molekularmassenbereich ist der Vernetzungsgrad des SDS-Gels entscheidend. Für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden 12%ige Trenngele verwendet.

Für ein Gel wurden je eine große und eine kleine Glasplatte mit 70%igem (v/v) Ethanol gereinigt, zusammengesetzt und in die Gel-Apparatur eingesetzt. Danach wurde das Trenngel zwischen die senkrecht stehenden Glasplatten gegossen und vorsichtig mit H₂O überschichtet, um eine gerade Geloberfläche zu erhalten und die Polymerisation des Acrylamids unter Luftabschluss zu gewährleisten. Nach Polymerisation des Trenngels für 30 min wurde das Wasser mit saugfähigem Papier entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Das Pipettierschema für die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel findet sich in Tabelle 8. Sofort danach wurde der Kamm luftblasenfrei eingesetzt und das Gel konnte nach dem Auspolymerisieren und Ziehen des Kammes für die Elektrophorese verwendet werden. Die Elektrophorese wurde mit 30 mA pro SDS Gel durchgeführt.

Tabelle 8: Pipettierschema für SDS-Gele (ausreichend für 2 Gele):

Lösung	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
TP	2,0 mL	-
SP	-	960 µL
H ₂ O	3,6 mL	2,64 mL
AA	4,8 mL	400 µL
APS	120 µL	60 µL
Temed	12 µL	8 µL

Trenngel (TG) - Stammlösung

Tris 8,2g
 SDS 0,4g
 ad 100 mL H₂O_{bidest}
 pH 8,8

Sammelgel (SG)- Stammlösung

Tris 6,1 g
 SDS 0,4 g
 ad 100 mL H₂O_{bidest}
 pH 6,8

Acrylamid-Stammlösung (AA)

40% (w/v) Fertiglösung (Fa. BioRad, München)

Ammoniumpersulfat (APS)

10% (w/v) in H₂O_{bidest}

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Fertiglösung (Fa. BioRad)

Die Proben wurden, sofern nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:4 mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt, vor dem Auftragen mindestens 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Nach dem Auftragen wurde die Elektrophorese bei 30 mA pro Gel durchgeführt bis die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte. Als Laufpuffer diente 1 x SDS Elektrophorese-Puffer.

4 x Probenpuffer

Glycerin	7,5 mL
β-Mercaptoethanol	2,5 mL
SDS	1,2 g
Bromphenolblau (2%)	0,5 mL
Tris	0,4g
H ₂ O _{bidest} ad 50 mL	

10 x Elektrophorese-Puffer

Tris	0,3 g L ⁻¹
Glycin	144,1 g L ⁻¹
SDS	10,0 g L ⁻¹
pH 8,4	
H ₂ O _{bidest} ad 1 L	

6.1.3 Molekularmassenbestimmung von Proteinen in SDS-Gelen

Bei der Elektrophorese von Proteinen wurden Marker mit definierten Molekularmassen auf ein SDS-Gel mit aufgetragen. Die Wanderungstrecken der verschiedenen Proteine konnten gegen den dekadischen Logarithmus ihrer

Molekülmassen aufgetragen werden. Aus der so erhaltenen Eichgerade konnte die Molekularmasse eines mit aufgetragenen unbekanntes Proteins ermittelt werden. Verwendet wurden die Protein Molecular Weight Marker #SM 0431 bzw. #SM 0441 und #SM 0661 der Firma MBI Fermentas.

6.1.4 Coomassiefärbung

Nach Beendigung der SDS-Gelelektrophorese wurde das SDS Gel mit einer Coomassie-Färbelösung versetzt und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde das Gel mit der Färbelösung für 15 min auf einer Laborwippe leicht geschwenkt. Die Färbelösung wurde abgegossen und das SDS-Gel mit Wasser überschichtet. Zum Entfärben wurde das Wasser dann kurz aufgeköcht und anschließend wieder abgegossen. Dieser Vorgang wurde so lang wiederholt, bis das Gel ausreichend entfärbt war. Anschließend konnte das SDS-Gel in Wasser aufbewahrt werden.

SDS Färbelösung

H ₂ O	500 mL
Ethanol (96%)	400 mL
Essigsäure	100 mL
10 Coomassie Tabletten (Fa. Gerbu, 25 mg Dye pro Tablette)	

6.2 Zellernte und Gewinnung von Zell-Rohextrakten

Die Methode zur Gewinnung des Zellextraktes richtete sich nach der Größe der Hauptkultur. Bei Volumina bis zu 30 mL erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall und bei größeren Volumina mit Hilfe der French Pressure Cell. Bei Bedarf wurde zum vor Zellaufschluss zusätzlich 5 mg mL⁻¹ Lysozym (Fa. Roth, Deutschland) zu den resuspendierten Zellen zugegeben und für 20-30 min bei 37°C inkubiert.

6.2.1 Zellaufschluss mit Ultraschall

Die aufzuschließenden Zellen wurden in einer entsprechenden Puffermenge aufgenommen, der Zellaufschluss erfolgte unter Verwendung einer Ultraschall-Sonde (Ultraschallprozessor UP200s, Fa. Dr. Hielscher GmbH) bei einer Amplitude von 50

und einem Zyklus von 0,5 für jeweils 5 min in einem Eiswasserbad. Anschließend wurde zur Entfernung der Zelltrümmer 30 min bei 10.000 g abzentrifugiert.

6.2.2 Zellaufschluss mit der „French Pressure Cell“

Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in einer adäquaten Puffermenge erfolgte der Aufschluss der Zellen in der French Pressure Cell (Fa. American Instrument Company, Silver Spring, USA) mit 100 Psi (= 6,9 MPa). Jede Kultur wurde dreimal aufgeschlossen, um ausreichend Rohextrakt zu erhalten. Anschließend wurde der Rohextrakt in Eppendorf-Cups überführt und zur Entfernung der Zellreste 30 min bei 10.000 g abzentrifugiert.

6.3 Proteinaufreinigung

Zur Proteinaufreinigung wurden zwei verschiedene His-tag-Aufreinigungssysteme eingesetzt. Zum einen wurde das His-tag-Aufreinigungssystem „Protino“ der Firma Macherey & Nagel, zum anderen das Ni-NTA-Kit der Firma Qiagen eingesetzt.

6.3.1 Aufreinigung von His-tag-Proteinen mit Hilfe von Protino-Säulen

Hierfür wurde das abzentrifugierte Pellet einer Proteininduktion zunächst in dem 1/2000 Volumen 1 x LEW-Puffer (d.h. bei einer 200 mL Kultur Aufnahme des Pellets in 1 mL 1 x LEW) aufgenommen. Die Zellen wurden im Anschluss mit French Press oder Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer wie bereits beschrieben abzentrifugiert. Vor der Aufreinigung wurde der gewonnene Rohextrakt durch eine 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und anschließend auf eine zuvor mit 1xLEW Puffer gemäß Protino-Handbuch äquilibrierten Protino-Säule gegeben. Diese wurde nach Durchlaufen des Rohextraktes zweimal mit 1 x LEW-Puffer gewaschen. Es folgte die Elution des his-getaggten Proteins mit 1 x Elutionspuffer gemäß Protino-Handbuch. Im Anschluß wurde das aufgereinigte Protein zur Weiterverwendung gegen einen entsprechenden Puffer dialysiert (siehe II.6.3.4).

1 x LEW-Puffer

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

pH 8,0

1 x Elutionspuffer

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 250 mM

pH 8,0

6.3.2 Aufreinigung von His-tag-Proteinen mit Hilfe von Protino-Säulen unter denaturierenden Bedingungen

Um Proteine aus *inclusion bodies* aufzureinigen, wurden die Zellpellets in das entsprechende Volumen 1 x LEW-Puffer mit 1 mg mL⁻¹ Lysozym aufgenommen (z.B. in 2 mL 1 x LEW-Puffer bei einer 200 mL Kultur) und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen, bei 4°C für 30 min bei 10.000 g abzentrifugiert (Eppendorf Mikro-Kühlzentrifuge 5415R, Fa. Eppendorf, Hamburg) und der Überstand verworfen. Die *inclusion bodies* wurden einmal mit 1 mL 1 x LEW Puffer für gewaschen, 1 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und dann in 0,5 mL 1 x LEW Puffer mit 2 M Harnstoff resuspendiert, anschließend auf Eis für 60 min inkubiert. Danach wurde die Lösung für 30 min bei RT bei 10.000 g (Minispin®-Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit denaturierendem LEW-Puffer äquilibrierten Protino 150 Säule gegeben, gemäß Handbuch gewaschen und das Protein mit denaturierendem Elutionspuffer eluiert. Im Anschluss wurde das aufgereinigte Protein zur Weiterverwendung gegen einen entsprechenden Puffer mit abnehmendem Harnstoffgehalt zur Rückfaltung des Proteins dialysiert (siehe II.6.3.5).

Denaturierender LEW-Puffer

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Harnstoff 2 M

pH 8,0

Denaturierender Elutionspuffer

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 250 mM

Harnstoff 2 M

pH 8,0

6.3.3 Aufreinigung von His-tag-Proteinen mit dem Qiagen-NiNTA-Kit

Bei dieser Aufreinigung wurde das abzentrifugierte Pellet einer Proteininduktion zunächst in dem 1/1000 Volumen Qiagen-Puffer aufgenommen, beispielsweise erfolgte bei einer 200 mL Kultur die Aufnahme des Pellets in 2 mL Qiagen-Puffer mit 10 mM Imidazol. Die Zellen wurden im Anschluss per French Press oder Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer wie bereits beschrieben abzentrifugiert. Vor der Aufreinigung wurde der gewonnene Rohextrakt durch eine 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und anschließend mit Qiagen-Ni-NTA-Säulenmaterial gemäß Handbuch gemischt und für 1 h unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Lösung auf eine Qiagen-Säule gegeben. Diese wurde nach Durchlaufen des Rohextraktes zweimal mit Qiagen-Puffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. Es folgte gemäß Qiagen-Handbuch die Elution des His-tag Proteins mit Qiagen-Puffer, der verschiedene Imidazol-Konzentrationen enthielt.

Qiagen-Puffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
pH 8,0	

Imidazol-Stammlösung

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	2M
pH 8,0	

6.3.4 Umpuffern von Proteinen durch Dialyse

Zur Dialyse wurden verschiedene Puffer wie 100mM Tris oder 100 mM Kaliumphosphatpuffer eingesetzt.

Hierzu wurde zunächst der Dialyseschlauch (Fa. Medicell International Ltd., London, UK) zurechtgeschnitten und in H₂O_{bidest} für 10 min gekocht. Anschließend wurden die Proteinansätze ÜN bei 4°C, nachdem sie in den Dialyseschlauch gefüllt wurden, unter leichtem Rühren dialysiert.

Zur Herstellung eines 0,1 M Kaliumphosphatpuffers von pH 5,8 bis pH 8,0 wurden die angegebenen 1 M Stammlösungen wie in Tabelle 9 zu sehen zusammengefügt und mit 900 mL H₂O_{bidest} gemischt, bevor sie autoklaviert wurden.

Tabelle 9: Herstellung von 1 L eines 0,1 M Kaliumphosphatpuffers

gewünschter pH	Volumen 1M K ₂ HPO ₄ [mL]	Volumen 1M KH ₂ PO ₄ [mL]
5,8	8,5	91,5
6,0	13,2	86,8
6,2	19,2	80,8
6,4	27,8	72,2
6,6	38,1	61,9
6,8	49,7	50,3
7,0	61,5	38,5
7,2	71,7	28,3
7,4	80,2	19,8
7,6	86,6	13,4
7,8	90,8	9,2
8,0	94,0	6,0

6.3.5 Rückfaltung von Proteinen aus *inclusion bodies*

Zur Gewinnung von Proteinen aus *inclusion bodies* wurden diese gemäß II.11.3.2 aufgereinigt. Um eine Rückfaltung des Proteins zu erreichen, wurde nun der Harnstoff schrittweise aus der Probe heraus dialysiert. Hierfür wurde das Protein für je 1-4 h in 1 x LEW-Puffer pH 8,0 mit abnehmendem Harnstoffgehalt (2 M, 1 M, 0,5 M und schließlich ohne Harnstoff) dialysiert, dann umgepuffert (siehe II.6.3.4) und anschließend für weitere Tests verwendet.

6.3.6 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Bei geringer Proteinkonzentration nach der Aufreinigung konnte das Volumen der aufgereinigten Proteine konnten mit Hilfe von Zentrifugation durch Vivaspin6 Säulen (Fa. Satorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland) verringert werden. Das Aufkonzentrieren erfolgte gemäß Handbuch.

6.4 Immunologische Methoden

6.4.1 Western Blot (Towbin et al., 1979)

6.4.1.1 Transfer

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE konnten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran oder Nylonmembran übertragen werden. Der Transfer erfolgt dabei elektrophoretisch unter Verwendung einer Wet-Blot-Kammer.

Zunächst konnte das Gel für 15 min in Transfer-Puffer äquilibriert werden (optional). Die Nylonmembran, 4 Whatman-Papiere, die auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten waren und 2 Schwämme wurden in Transfer-Puffer angefeuchtet. Der Aufbau der einzelnen Lagen („Sandwich“) für die Wetblot-Kammer erfolgte nach folgendem Aufbau:

Kathode (+) -Schwamm

-2 Whatman-papiere

- Membran

-SDS-Gel

-2 Whatman-Papiere

Anode (-) -Schwamm

In diesem Aufbau wurde das „Sandwich“ in der Kammer befestigt und mit 1L Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte ÜN bei 4 °C, 12 V (konstant), 500 mA und 150 W unter Anschluss an das Netzgerät PowerPac basic (Fa. Biorad).

Transfer-Puffer (1L)

Tris	50 mM
Glycin	380 mM
SDS	0,1% (w/v)
Methanol	200 mL

Am nächsten Tag würde die Membran zunächst auf einem Whatman-Papier luftgetrocknet, dann erfolgte die Detektion.

6.4.1.2 Detektion

Die Membran wurde zunächst 3 x 5 min in 20 mL PBST gewaschen und anschließend 1 h in 20 mL PBST+ 5% Milchpulver geblockt. Es folgte 2 x Waschen mit 20 mL PBST + 2,5% Milchpulver. Danach wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper (Anti-His-tag-AK (Fa. Abcam Inc., Cambridge, USA) der 1:1000 verdünnt wurde (10 µL AK in 10 mL PBST + 2,5 % Milchpulver) 1,5 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran 6 x 5 min mit 20 mL PBST + 2,5 % Milchpulver gewaschen, es folgte die Inkubation für 1,5 h bei RT mit dem Sekundärantikörper (Fa. Sigma-Aldrich, Deutschland) der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt war. Der AK wurde hierbei 1:10.000 in PBST + 2,5% Milchpulver verdünnt (2 µL in 20 mL). Es folgte erneutes Waschen der Membran für 8 x 5 min in 20 mL PBST + 2,5 % Milchpulver. Zur Entwicklung wurde die Membran im Anschluss zunächst 2 x 5 min in 20 mL H₂O_{bidest} inkubiert und anschließend bei 37°C auf dem Schüttler 5 min mit 9 mL H₂O_{bidest} + 1 mL CDP Star Lösung (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit der VersaDoc (Fa. Biorad).

10x PBS Puffer

Na ₂ HPO ₄	63,2 mm
KH ₂ PO ₄	11,7 mM
NaCl	68 mM

PBST Puffer

1 x PBS + 0,3 % TWEEN-20

Blocking-Puffer

PBST + 5 % Milchpulver

Wasch- und Inkubationspuffer

PBST + 2,5 % Milchpulver

Primärantikörper

Anti-His-tag AK – Anti-mouse (Fa. Abcam)

Sekundärantikörper

Anti-rabbit-AK, AP-Konjugiert (Alkalische Phosphatase) (Fa. Sigma-Aldrich)

6.5 Nachweis von Enzymaktivitäten

6.5.1 ONPG Test

5×10^{-12} M 3-Oxo-C₈-HSL (Fa. Sigma-Aldrich, Deutschland) wurden mit 100 μ L Rohextrakt ($c = 10 \mu\text{g RE } \mu\text{L}^{-1}$) bzw. 100 μ L Proteineluat (dialysiert auf pH 7,0) versetzt und für 2 h bei 30°C inkubiert.

Eine Reagenzglas mit 5 mL AT-Medium wurde zunächst mit 1×10^7 Zellen mL^{-1} beimpft, mit dem vorher inkubierten 3-Oxo-C₈-HSL-Rohextrakt-bzw. Proteingemisch versetzt und ÜN (16 h) bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst die Absorption bei 600 nm gemessen, um die Zellzahl bestimmen zu können. Die β -Galactosidase-Konzentration wurde mit Hilfe von ONPG (Fa. Sigma-Aldrich) bestimmt. Dieses zunächst farblose Substrat wird von β -Galactosidase zu Galactose und *ortho*-Nitrophenol, einem gelben Farbstoff, umgesetzt. Bei 420 nm kann dann die ONPG-Umsatzrate in Form von *ortho*-Nitrophenol gemessen werden.

Für die ONPG-Analyse wurden von einem Ansatz zunächst die Zelldichte bei 600 nm photometrisch bestimmt und dann 1 mL Zellsuspension mit 20 μ L Toluol versetzt und 3 min auf höchster Stufe gevortext. 800 μ L Zellen wurden abgenommen und 200 μ L ONPG-Lösung (mit 4 mg mL^{-1} ONPG in Z-Puffer) zugefügt, anschließend gemischt. Die Lösung wurde 20 min bei RT inkubiert. Es erfolgte dann die Messung der optischen Dichte bei 420 nm. Über die Berechnung $\text{OD}_{600}/\text{OD}_{420}$ konnte dann die Zellmenge ins Verhältnis zur im Medium befindlichen β -Galaktosidasekonzentration gesetzt werden, um so bestimmen zu können, wie viel β -Galaktosidase (und somit welche AHL-Menge) von den Bakterien im Verhältnis zu den anderen Ansätzen produziert wurde.

Z-Puffer

Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	16.1 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5.5 g
KCl	0.75 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.246 g
β – Mercaptoethanol	2.7 mL
ad 100 mL H ₂ O _{bidest}	
pH 7.0.	

Der Puffer wurde nicht autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

6.5.2 Violacein-Assay

Für den Nachweis der QS gesteuerten Violacein-Produktion bzw. deren Inhibition wurde LB Medium einprozentig mit *C. violaceum* (Wildtyp) aus einer ÜN-Kultur beimpft. Anschließend wurden je 50 µL dieses Ansatzes mit je 50 µL Rohextrakt einer induzierten Kultur ($c = 10 \mu\text{g Protein } \mu\text{L}^{-1}$) in 96-Well-Mikrotiterplatten gemischt und ÜN bei 30 °C inkubiert.

6.5.3 Pyocyanin-Nachweis

Für die Messung des Pyocyanin-Gehaltes einer *P. aeruginosa* PAO1 Kultur wurden zunächst die Zellen einer ÜN-Kultur abzentrifugiert und der Überstand für die Messungen der Pyocyanin-Konzentration bei OD₆₉₀, dem Absorptionsmaximum von Pyocyanin, verwendet. Der Extinktionskoeffizient ϵ beträgt bei dieser Wellenlänge von 690 nm $= 4,31 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Konzentration an Pyocyanin eines Ansatzes lässt sich dann nach folgender Formel berechnen:

$$\epsilon = E (\text{Extinktion}) / ((c (\text{Konzentration}) \times d (\text{Schichtdicke Kuvette, 1 cm}))$$

Daraus ergibt sich die Konzentration $c = \text{OD}_{690} / (4,31 \text{ M}^{-1})$,

Bei 1 mL Volumen entspricht die errechnete Summe demnach einer Pyocyanin-Konzentration in µMol.

7. Nachweis der AHL-Spaltung durch Massenspektroskopie

Für den Nachweis des Spaltungsmechanismus der BpiB-Proteine für AHLs wurden die Substrate 3-Oxo-C₈-L-Homoserinlacton (21 µmol; Endkonzentration 10,5 mM in 1 ml Endvolumen) bzw. C₁₂-DL-Homoserinlacton (7,1 µmol; Endkonzentration 3,5 mM in 1 ml Endvolumen) (beide Fa. Sigma-Aldrich) mit den aufgereinigten Proteinen oder deren Rohextrakten ($c = 20 \mu\text{g mL}^{-1}$) in jeweils 1 mL 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) oder 100 mM Tris-Puffer (pH 7,0) vermischt und für 20 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die AHL-Protein-Lösungen mit je 2 bis 2,5 Volumina Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum konzentriert. Die erhaltenen Extrakte wurden dann in 110 µL Methanol (LC-MS-Methanol, Fa. Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und nach

dem folgenden angegebenen Protokoll per HPLC-MS in Göttingen in der Arbeitsgruppe von S. Grond von Melanie Quitschau analysiert.

Die HPLC-MS-DAD (high performance liquid chromatography – ESI-mass spectrometry-diode array detector) Analysen der erhaltenen Extrakte wurden unter Verwendung einer Grom Supersphere-100 RP-18 endcapped, 4 μm (100 \times 2 mm) Säule, einer Flux instruments Pumpe Rheos 4000, einem PDA Detektor Marke Finnigan Surveyor und dem Massenspektrometer Finnigan LC-Q unter Verwendung des Software-Pakets Finnigan Xcalibur durchgeführt. Als Standardprogramm wurde ein Gradientenprogramm mit Lösungsmittel A (0,05 % HCOOH in H₂O) und B (0,05 % HCOOH in MeOH), Programm: 20 % B zu 100 % B in 20 min, 10 min 100 % B, zu 20 % B in 2 min, 8 min 20 % B (Programmdauer: 40 min); Flussrate: 300 $\mu\text{L min}^{-1}$; Massendetektion: positive und negative Ionen, angegeben werden die Quotienten aus Masse zu Ladung. HPLC-MS-Tandem Analyse wurde am Finnigan LC-Q Spektrometer (Stoßenergie: 25%) durchgeführt; HRMS (High Resolution MS) wurde am Bruker APEX IV 7T Spektrometer gemessen; korrekte HRMS = vorgewählter Ionen-Peak stimmt bei $R \gg 10000$ mit einer Fehlerbreite von ± 2 ppm mit der exakten Masse überein.

Zur chemischen Analyse der Lactonase-Spaltprodukte wurde das 3-Oxo-C₈-L-Homoserin ausgehend vom entsprechenden Homoserinlactone unvollständig hydrolysiert. Hierzu wurden 5,8 mg 3-Oxo-C₈-L-Homoserinlacton in 60 μL DMSO gelöst und mit 36 μL 1 N NaOH (1,5 Äq.) für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 mL H₂O die Reaktion gequench, mit 39 μL 1 M NaH₂PO₄ der pH-Wert des Reaktionsgemischs auf 6,5 eingestellt und mit Ethylacetat (3 \times 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zur vollständigen Hydrolyse wurden 12,1 mg 3-Oxo-C₈-L-Homoserinlacton in 100 μL Dioxan mit 74,4 μL 1 N NaOH (1,5 Äq.) für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und das Reaktionsgemisch wie oben beschrieben aufgearbeitet. 2,4 mg C₁₂-DL-Homoserinlacton wurden zur vollständigen Hydrolyse in 150 μL Dioxan mit 12,7 μL 1 N NaOH (1,5 Äq.) für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und das Reaktionsgemisch wie oben beschrieben aufgearbeitet.

III. Experimente und Ergebnisse

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit dienten neun Metagenom-Fosmid-Klone, die mit dem Vektor pBK-CMV aus einer Metagenom-Genbank, erstellt aus Bodenproben, hergestellt wurden.

Diese neun Klone mit potentiellen Quorum Quenching-Genen waren zuvor mit Hilfe des AHL-Reporterstammes *A. tumefaciens* NTL4 durch ihre Fähigkeit, 3-Oxo-C₈-HSL abzubauen, identifiziert worden (Abbildung 15). Die Inserts dieser Klone, die im Folgenden als Bio1-9 bezeichnet werden, wurden vollständig sequenziert. Die Sequenzen sind als NCBI GeneBank-Einträge unter den Bezeichnungen EF530726 - EF530734 abgelegt.

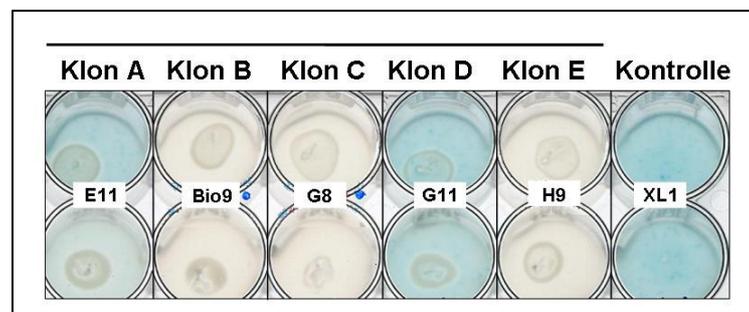


Abbildung 15: Nachweis von AHL-Abbau bei Bio9 mit dem QS-Reporterstamm *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (Diplomarbeit Schipper, 2004). Abgebildet ist der Ausschnitt aus einer Screening-Platte inklusive des Klons Bio9, welcher als Klon B gekennzeichnet ist. Weiße Näpfe stehen für die Klone mit erfolgreichem AHL-Abbau, blauen Näpfe für Klone ohne AHL-Abbau.

In einem weiteren QS-Testsystem, bei welchem in einem *E. coli*-Reporterstamm ein Promotor zur QS-Detektion mit einem letalen Gen fusioniert wurde, wurden alle Klone ebenfalls als positiv, also QS inhibierend, getestet (Nancy Weiland Universität Kiel, noch nicht veröffentlicht). Hierbei wurden Rohextrakte der bei 37°C ÜN angezogenen Klone Bio1-9 mit 3-Oxo-C₈-HSL vermischt und mit dem Reporterstamm NW-AHL.1 auf LB Platten gegeben. Bei Abbau des 3-Oxo-C₈-HSL war der Reporterstamm in der Lage, auf der Agarplatte zu wachsen. Dies war für alle getesteten Klone, Bio1-9, der Fall. Kontrollen, bestehend aus Rohextrakten der Leervektorkontrollen, führten im Gegensatz dazu nicht zu Zellwachstum des Reporterstammes.

1. Sequenzanalyse der QQ-Klone Bio1 – Bio9

Alle neun untersuchten Klone, die im folgenden als Bio1-Bio9 bezeichnet werden, wurden vollständig sequenziert und mittels der Programme Clone Manager (Fa. Sci-Ed Software, NC, USA) und des NCBI ORF Finders (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf) auf vorhandene ORFs untersucht, welche dann mit BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in einer Online-Datenbank auf Ähnlichkeiten mit bereits bekannten Sequenzen überprüft wurde.

Alle neun Klone inklusive der potentiellen QQ-ORFs sind in Abbildung 16 dargestellt, die zugehörigen BlastX-Ergebnisse sind auf Seite 66 in Tabelle 10 zu finden.

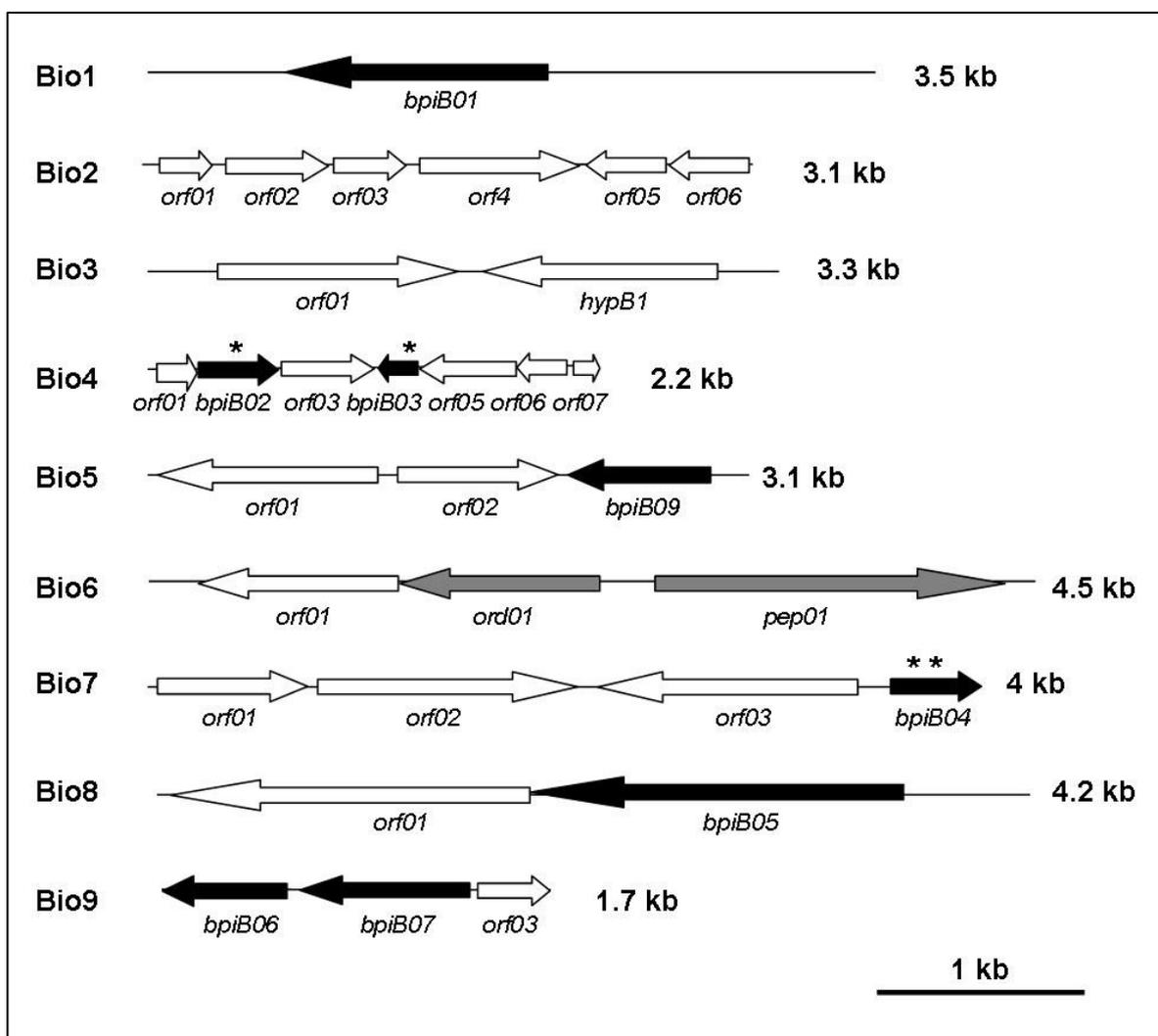


Abbildung 16: Inserts der Klone Bio1-Bio9. Verifizierte QQ-Gene sind schwarz, potentielle QQ-ORFs grau dargestellt. Die Sterne symbolisieren Transposon-Insertionen.

1.1 Sequenzanalyse des Inserts Bio1

Die Sequenzanalyse für den Klon Bio1, der eine Größe von 3,5 kb besitzt, ergab mit Hilfe der Programme ORF Finder und Clone Manager übereinstimmend einen ORF von 1,2 kb Größe. Weitere vollständige ORFs konnten nicht detektiert werden.

Eine BlastX-Analyse des ORFs *bpiB01* ergab die höchste Übereinstimmung der Sequenz mit dem hypothetischen Protein Lferr_2087 aus dem Bakterium *Thiobacillus ferrooxidans*, der E- Wert betrug $3e^{-88}$. Eine Untersuchung des ORFs auf konservierte Domänen mit Hilfe der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) ergab keinen Hinweis auf eine Funktion die im Zusammenhang mit QS steht. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit der RCSB-Datenbank ([www.rcsb.org/pdb/search/advSearch.do?st=Sequence Query](http://www.rcsb.org/pdb/search/advSearch.do?st=Sequence+Query)) ergab eine sehr schwache Ähnlichkeit zu einer Hydrolase mit einem E- Wert von 5,6.

Überprüfungen der Sequenz von *bpiB01* auf Sekretionssequenzen unter Verwendung des CBS SignalP 3.0-Server Programms (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) erbrachte sowohl für den Gram-positiven als auch für den Gram-negativen Signalpeptid-Sequenz-Abgleich ein positives Ergebnis. Demnach codieren sowohl bei der Gram-positiven als auch bei der Gram-negativen Überprüfung die Aminosäuren 1-26 das Sekretionssignal des Proteins, ab AS 27 beginnt das eigentliche Protein BpiB01. Demnach handelt es sich bei *bpiB01* in dem ursprünglichen Organismus vermutlich um ein sekretiertes Protein.

Da keine weitere Informationen über den Abgleich mit verschiedenen Datenbanken erhalten werden konnten, kann an dieser Stelle keine daraus abgeleitete Funktion des Proteins BpiB01 bestimmt werden. Da jedoch kein weiterer ORF auf dem Insert Bio1 zu detektieren war, ist an dieser Stelle davon auszugehen, dass es sich bei *bpiB01* um den für die Quorum Quenching Aktivität verantwortlichen ORF handelt.

1.2 Sequenzanalyse des Inserts Bio2

Das Insert von Bio2 mit einer Größe von 3,1 kb ergab nach Überprüfung mit den Programmen ORF Finder und Clone Manager das Vorhandensein von insgesamt 5 vollständigen ORFs. Der Abgleich der Sequenzen der einzelnen ORFs mit BlastX von NCBI ergab unter anderem Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen und auch zu einer Eisen/Quecksilber-Permease .

Der erste auf dem Insert befindliche ORF, *orf01*, mit einer Größe von 353 bp zeigte die größte Übereinstimmung mit einer Glyoxylase aus *Schizosaccharomyces pombe*. Konservierte Domänen konnten nicht detektiert werden.

Der zweite auf dem Insert Bio1 befindliche ORF *orf02* zeigt bei einer Größe von 497 bp die größte Übereinstimmung einem hypothetischen Protein aus *Beijerinckia indica* mit einem E- Wert von $6e^{-24}$. Die Überprüfung auf konservierte Domänen ergab mit einem E-Wert von $2e^{-24}$ eine Übereinstimmung der AS Sequenz von *orf02* mit der Tpd Superfamilie, die in Hochaffinitäts- Fe^{2+} -Transport involviert ist.

Der dritte 317 bp große ORF *orf03* zeigt die größte Übereinstimmung mit einem hypothetischen Protein aus einem marinen gamma-Proteobacterium, konservierte Domänen wurden nicht gefunden.

Das vierte ORF *orf04*, 830 bp groß, zeigte beim Vergleich mit einem hypothetischen Protein aus einer *Bradyrhizobium* Spezies den höchsten E-Wert mit $1e^{-55}$. Das hypothetische Protein weist eine Hochaffinitäts- Fe^{2+}/Pb^{2+} -Permease-Domäne auf, die zur FTR1 Superfamilie gehört.

Bei ORF *orf05* zeigte sich beim Abgleich mit BlastX wiederum die höchste Übereinstimmung mit einem hypothetischen Protein, das in diesem Fall aus *Mesorhizobium loti* stammt. Auch im Fall von *orf05* konnte eine konservierte Domäne mit einem E-Wert von $9e^{-07}$ detektiert werden. Es handelt sich um die COG4316 Superfamilie, der jedoch keine Funktion zugeordnet werden kann.

1.3 Sequenzanalyse des Inserts Bio3

Bei Bio3 handelt es sich um ein 3,3 kb großes Insert, auf dem nach der Überprüfung der Sequenz auf mögliche ORFs mit den Programmen Clone Manager und ORF Finder 2 ORFs zugeordnet wurden.

Orf01 wies den höchsten Grad an Übereinstimmung nach dem BlastX-Abgleich mit einem E- Wert von $2e^{-29}$ zu einem Antwort-regulierenden Übertragungs-Protein aus einem *Acidobacterium* auf, während *hypB1* ein hohes Maß an Übereinstimmung mit *YmAe* aus *Verrucomicrobium spinosum* zeigt.

Beide ORFs besitzen ebenfalls konservierte Domänen. Die zu *orf01* zugehörige konservierte Domäne ist der REC-Superfamilie zugeordnet mit einem E-Wert von $1e^{-29}$. Die REC-Superfamilie umfasst eine Signal-Übertragungs-Domäne, die ein Signal von einem Sensorpartner in ein 2-Komponenten-System überträgt. Beispiele dafür sind CheY, OmpR, NtrC und PhoB. *HypB1*, welches im BlastX die größte

Übereinstimmung mit YmAE zeigte, das zu den Zink-abhängigen Hydrolasen gehört, besitzt als konservierte Domäne einen Bereich, der mit der konservierten Domäne der Metallo- β Lactamase-Superfamilie übereinstimmt (AS 66-195/281). Hier ist das charakteristische Motiv für die Zink-Bindestelle, das auch in beschriebenen Lactonasen zu finden ist, HXHX~DH, jedoch nur zum Teil vorhanden. Der ~DH-Anteil dieses Motivs fehlt bei *hypB1*, der E- Wert ist mit 0.01 ebenfalls sehr gering.

1.4 Sequenzanalyse des Inserts Bio4

Bei Bio4 handelt es sich von allen in dieser Arbeit untersuchten Klonen Bio1-9 um den Klon mit dem kleinsten Insert bei einer Größe von 2,2 kb. Mit den Programmen Clone Manager und ORF Finder konnten mehrere kleine ORFs detektiert werden, die eine Größe zwischen 158 bp und 374 bp aufwiesen.

Keiner dieser ORFs wies nach der BlastX-Analyse jedoch große Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinen auf, die E- Werte für alle BlastX Ergebnisse lagen zwischen 2.6 und 0.016.

Auch die Suche nach konservierten Domänen ergab für keinen ORF auf Bio4 eine Übereinstimmung mit einer bekannten Hydrolase

Der ORF *orf06* zeigte nach der BlastX-Analyse keine relevante Übereinstimmung mit bekannten Sequenzen. Daher wurde hier die tBlastX-Analyse zusätzlich verwendet. Hier ergaben sich größere Übereinstimmungen mit den Sequenzen von *bpiB02* und *bpiB03* mit E-Werten zwischen $2e^{-18}$ und 0.007. Eine weitere Übereinstimmung zeigte sich mit einer 2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase aus *Deinococcus geothermalis*, wenn auch mit einem geringeren E- Wert, der bei 1,5 lag.

Da mit Transposonmutagenese (Diplomarbeit Schipper, 2004) auf zwei Positionen des Inserts bereits die Quorum Sensing inhibierenden Aktivitäten des Klons Bio4 aufgehoben werden konnten, können an dieser Stelle die möglichen QQ-ORFs bestimmt werden. Die Stellen der erfolgreichen Transposoninsertion waren zum einen Base 515, so dass hier *bpiB02* als QQ-ORF bestimmt werden kann, zum anderen die Transposonmutagenese bei Transposon-Insertion an Base 1149, so dass hier *bpiB03* als weiterer QQ-ORF auf Bio4 in Frage kommt.

1.5 Sequenzanalyse des Inserts Bio5

Das Insert des Klons Bio5 besitzt eine Größe von 3,1 kb. Die Überprüfung auf vorhandene ORFs ergab insgesamt drei ORFs mit einer Größe zwischen 1,2 und 0,7 kb. Der erste ORF, *orf01*, weist der BlastX Analyse nach eine sehr hohe Übereinstimmung mit einem Teil eines Chromosomensegrationsprotein aus einem Acidobakterium auf. Die Überprüfung des ORFs *orf01* auf konservierte Domänen ergab einen E-Wert von $3e^{-36}$ für eine Übereinstimmung mit der Smc-Multidomäne, die Chromosomen-Segregations ATPasen umfasst, die an der Zellteilung und der Chromosomen-Partitionierung beteiligt sind. Desweiteren weist ein weiter Teil des ORFs *orf01* Übereinstimmungen mit der P-Loop-NTPase Superfamilie auf, hierbei inklusive der ATP-Bindestelle.

Der zweite auf dem Insert von Bio5 befindlich ORF *orf02* zeigt Übereinstimmungen (E-Wert: $4e^{-30}$) mit einem hypothetischen Protein aus *Hyphomonas neptunium*, Überprüfungen auf konservierte Domänen erbrachte keine Ergebnisse, so dass keine Aussage über die Funktion des Proteins getroffen werden kann.

BpiB09, der dritte ORF auf dem Insert Bio5, besitzt der BlastX Analyse gemäß Übereinstimmungen mit einer Kurz-Ketten Dehydrogenase aus einem Acidobacterium (E-Wert $4e^{-56}$), etwas schwächer waren die Übereinstimmungen mit einer Oxidoreduktase aus *Zymomonas mobilis* mit einem E-Wert von $1e^{-28}$. Dieser ORF wies nach der Überprüfung auf konservierte Domänen mit dem Prosite-Programm (www.expasy.ch/prosite) ebenfalls eine Übereinstimmung mit einer Kurz-Ketten-Dehydrogenase auf, hier sind auch die für den katalytischen Mechanismus notwendigen Aminosäuren Tyrosin und Lysin vorhanden (Abbildung 17). Von dieser großen Enzymfamilie sind die meisten bekannten Enzyme NAD- oder NADP-abhängige Oxidoreduktasen.

Somit kommt auf dem Insert Bio5 der ORF *bpiB09* mit hoher Wahrscheinlichkeit als QQ ORF in Frage, da er Ähnlichkeiten zu Oxidoreduktasen besitzt, von denen bekannt ist, dass auch sie als QQ Enzyme agieren (Uroz et al., 2005).

```

MSSLGQVAVVTGASRGIGAAIARKLGS LGARVVL TARDVEKLRAVER
EIVAAGGEAESHACDLSHSDAIAAFATGVLA AHGRCDVLVNNAGVGW
FGGPLHTMKPAEWDALIAVNLKAPYLLLRAFAPAMIAAKRGHIINISLA
GKNPVADGAAYTASKWGLNGLMTSAAEELRQHQVVRVSLVAPGSVR
TEFGVGLSAKKSALGAIEPDDIADVALLATQADQSFISEVLVRPTLKK

```

Abbildung 17: Aminosäuresequenz von *bpiB09* auf Bio5 mit Dehydrogenase-Motiv.

Das konservierte Motiv der Kurzketten-Dehydrogenase-Familie ist unterstrichen, die konservierten katalytischen Aminosäuren Y (Tyrosin) und K (Lysin) sind rot markiert.

1.6 Sequenzanalyse des Inserts Bio6

Das 5,5 kb große Insert des Klons Bio6 weist insgesamt drei ORFs auf. Auch hier wurden die einzelnen ORFs mit BlastX überprüft. Der erste ORF *orf01* wies demnach die größte Übereinstimmung mit dem konservierte hypothetischen Protein Tbd_0236 aus *Thiobacillus denitrificans* auf, der E- Wert liegt bei $4e^{-91}$. Die Überprüfung des ORFs auf konservierte Domänen ergab eine Übereinstimmung mit der CC1-like Superfamilie, spezifisch mit der Nondulin-21_like_2 Familie, die mit der Nondulin-21 Familie eng verwandt ist, welche möglicherweise in die symbiontische Stickstoff-Fixierung involviert ist. Ein weiterer Bereich weist Übereinstimmungen mit der Ferritin-like Superfamilie auf, hierbei sind die Metall-Bindungsmotive auf *orf01* zu finden. Diese Familie umfasst Di-Eisen-Carboxylat-Proteine, die unter anderem in Eisenregulation, Mono-Oxygenierung und der Produktion von reaktiven Radikalen eine Rolle spielen. Diese Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie O_2 -abhängige Oxidation-Hydroxylation innerhalb von Di-Eisen-Zentren katalysieren.

Der zweite ORF auf Bio6, *ord01*, weist nach der BlastX Analyse die eine sehr große Übereinstimmung mit einer Aldo/Keto-Reduktase aus *Burkholderia ubonensis* auf (E-Wert: $2e^{-124}$). Eine etwas schwächere Übereinstimmung mit einem E-Wert von $1e^{-117}$ zeigte sich für eine Oxidoreduktase als Aldo/Keto-Reduktase-Familienprotein aus *Burkholderia oklahomensis* EO147. Dieser ORF weist gleich zwei konservierte Domänen der Aldo/Keto-Reduktase-Superfamilie auf, die E- Werte liegen hierbei bei $2e^{-68}$ bzw. $3e^{-65}$. Die Aldo/Keto-Reduktase-Familie umfasst eine Reihe von Kalium-Kanal- β -Ketten-Regulierungs-Domänen, von denen Oxidoreduktase-Aktivität dokumentiert werden konnte.

Der dritte ORF auf Bio6 trägt die Bezeichnung *pep01* und zeigte nach der BlastX-Analyse eine hohe Übereinstimmung mit einer Peptidase, der Domäne des aktiven Zentrums des S9-Prolyl-Oligopeptidase-Proteins, aus *Lepothrix cholodnii*. Die Aminosäuresequenz des ORFs weist Übereinstimmungen mit einer konservierten Domäne der Esterase-Lipase-Superfamilie auf, die carbizyklische Ester aufspalten. Als weitere konservierte Domäne ist die DAP2-Superfamilie zu finden. Sie umfasst Dipeptidyl-Aminopeptidasen/Acylaminoacyl-Peptidasen, welche im Aminosäure-Transport und Aminosäure-Metabolismus agieren.

1.7 Sequenzanalyse des Inserts Bio7

Die Untersuchung des 4 kb Großen Inserts von Bio7 auf vorhandene ORFs ergab insgesamt 4 Ergebnisse. Der erste ORF *orf01* auf dem Insert Bio7 weist nach der Überprüfung mit BlastX eine sehr hohe Übereinstimmung mit einem ATP-Bindungs-Protein aus *Nitrobacter hamburgensis* auf, ebenso wie der dritte ORF *orf03* mit einer Transposase aus dem gleichen Organismus. Der Überprüfung auf konservierte Domänen zufolge besitzt der ORF *orf01* eine konservierte Domäne der P-Loop-NTPase-Superfamilie, spezifisch hier der AAA+ Superfamilie. Mitglieder dieser Familie fungieren als molekulare Chaperone, als ATPase-Untereinheiten von Proteasen, als Helikasen oder Nukleinsäurestimulierende ATPasen. Auf der Aminosäuresequenz von *orf01* sind in der konservierten Domäne eine ATP-Bindestelle, ein WalkerA-Motiv, ein WalkerB-Motiv und zwei Arginin-Finger Bereiche zu finden.

Der ORF *orf02* zeigt übereinstimmend mit dem BlastX-Ergebnis eine konservierte Domäne der Transposase-Mutator-Familie.

Der ORF *orf03* zeigt nach der Überprüfung mit BlastX eine sehr schwache Ähnlichkeit zu dem Genprodukt KIAA1522 aus *Equus caballus*. Konservierte Domänen konnten hier nicht gefunden werden.

Der fünfte ORF auf Bio7, *bpiB04*, zeigte eine ebenfalls sehr geringe Übereinstimmung mit einem hypothetischen Protein aus *Aspergillus nidulans*, auch hier wurden keine konservierten Domänen detektiert. Vorherige Untersuchungen mit Transposonmutagenese hatten jedoch bereits den ORF *bpiB04* als verantwortlichen QQ ORF bestimmt, da Transposoninsertionen an zwei Stellen des ORFs *bpiB04* die QQ-Aktivität ausgeschaltet hatten.

1.8 Sequenzanalyse des Inserts Bio8

Auf dem 4,2 kb großen Insert des Klons Bio8 wurden insgesamt 2 vollständige ORFs gefunden, beide mit einer Größe zwischen 1,7 und 1,8 kb. Der ORF *orf01* besitzt der BlastX Analyse nach eine gute Übereinstimmung mit einem hypothetischen Protein aus *Methylobacterium chloromethanicum*, der E-Wert liegt bei $3e^{-71}$. Die Überprüfung auf konservierte Domänen ergab eine Übereinstimmung mit der SIR2-Superfamilie. Sir2-Proteine (Silent Regulator 2) werden auch als Sirtuine bezeichnet und regulieren Gene Silencing, DNA-Reparatur, metabolische Enzyme und die Lebensdauer der Zellen.

Der ORF *bpiB05* besitzt die höchste Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein aus *Bacteroides fragilis* mit einem E-Wert von $3e^{-33}$. Als konservierte Domäne konnte ein Ausschnitt aus der konservierten Domäne der thrS-Superfamilie detektiert werden, welche Threonyl-tRNA-Synthetasen umfasst.

Der Vergleich der Sequenz von *bpiB05* mit der RCBS-Datenbank ergab eine schwache Übereinstimmung mit einer Hydrolase. Innerhalb dieser Sequenzähnlichkeit konnten insgesamt zwei Calciumbindestellen der Hydrolase, einer Neopullulanase, detektiert werden.

1.9 Sequenzanalyse des Inserts Bio9

Die ORF-Analyse des Inserts von Bio9 erbrachte insgesamt 3 ORFs.

Der erste auf dem Insert von Bio9 befindliche ORF *bpiB06* zeigte nach der BlastX-Analyse die größte Übereinstimmung zu einem Histidin-Triaden-Protein. Die Überprüfung auf konservierte Domänen ergab eine Übereinstimmung mit einem Teil einer konservierten Domäne der AHS1-Superfamilie, welche die erste Untereinheit des Enzyms Allophanat-Hydrolase darstellt.

Der zweite auf dem Insert von Bio9 befindliche ORF *bpiB07* weist ebenso wie der dritte ORF *orf03* eine Übereinstimmung mit Genen aus dem Bakterium *Xanthomonas campestris* auf. Während *bpiB07* Ähnlichkeiten zu einer Dienlacton-Hydrolase zeigt, besitzt *orf03* Übereinstimmungen mit einem MiaB-Familien RNA-Modifizierungsenzym, *orf03* besitzt im Gegensatz zu *bpiB07* jedoch keine konservierten Domänen. Bei der bei *bpiB07* gefundenen konservierten Domäne handelt es sich um eine konservierte Domäne der Esterase-Lipase-Superfamilie, die Carboxylester spalten.

Auch bei diesem Insert konnte durch die Sequenzanalyse kein ORF gefunden werden, der mit bereits bekannten AHL-Acylasen oder AHL-Lactonasen übereinstimmt, lediglich *bpiB07* weist Ähnlichkeiten mit einer Hydrolase auf, die möglicherweise auch AHL-Moleküle spalten kann.

Die BlastX-Ergebnisse für die potentiellen und verifizierten QQ-ORFs der Klone Bio1 bis Bio9 sind in Tabelle 10 verzeichnet, die BlastX-Ergebnisse für die übrigen ORFs sind im Anhang hinterlegt.

Tabelle 10: BlastX Ergebnisse für die potentiellen und verifizierten QQ-ORFS auf Bio1-9

ORF	Größe [AA]	Organismus	Identität [%]	Ähnlichkeit [AA/AA _{total}]	Funktion	E-Wert	Accession Nummer
<i>bpiB01</i>	400	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 53993	47	46-395/397	Hypothetisches Protein Lferr2087	3e-88	YP_002220505.1
<i>hypB1</i>	385	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM4136	47	83-351/352	YmAE	6e-87	ZP_02928094.1
<i>bpiB02</i>	102	<i>Canorhabditis briggsae</i> AF16	35	149-216/226	Hypothetisches Protein CBG17656	0.23	XP_001671434.1
<i>bpiB03</i>	52	<i>Musa accuminata</i>	36	106-160/648	Protein-Kinase-Familien-Protein	2.6	ABF70054.1
<i>bpiB09</i>	239	<i>Acidobacterium Ellin</i> 345	54	11-243/244	Kurz-Ketten-Dehydrogenase SDR	4e-56	YP_591337.1
<i>ord01</i>	685	<i>Burkholderia ubonensis</i> Bu	71	1-320/232	Aldo/Keto-Reduktase	2e-124	ZP_02377181.1
<i>pep01</i>	610	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-1	44	41-640/668	Peptidase	1e-140	YP_001792183.1
<i>bpiB04</i>	135	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	29	154-217/260	Hypothetisches Protein AN8367.2	2.0	XP_681636.1
<i>bpiB05</i>	587	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	25	99-568/578	Hypothetisches Protein BF0633	3e-33	YP_097916.1
<i>bpiB06</i>	175	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW	57	38-138/147	Histidin Triaden Protein	7e-23	YP_002296789.1
<i>bpiB07</i>	224	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10	56	1-215/220	Dienlacton-Hydrolase	8e-59	YP_364619.1

2. Identifizierung der potentiellen QQ ORFs durch Subklonierung

Im Anschluss an die Sequenzanalyse wurden die bereits identifizierten QQ ORFs und die potentiellen QQ ORFs (gemäß Sequenzanalyse mit Clone Manager, NCBI ORF Finder und Sequenzabgleich mit der NCBI Datenbank) in die Vektoren pBluescriptSK⁺ (pSK⁺) und pBBR1-MCS5 subkloniert. Die Richtung und Korrektheit der Inserts wurde über Sequenzierung mit dem Primerpaar Abi_for/rev überprüft.

Hierfür wurden alle Inserts zunächst mit den in Tabelle 5 aufgeführten Primern mit der KOD-HiFi-DNA-Polymerase (Fa. Novagen) oder der Pfu-DNA-Polymerase (Firma MBI Fermentas) per PCR nach dem in II.5.7 angegebenen Protokollen amplifiziert. Beide Polymerasen wurden aufgrund ihrer Korrektur-Lesefähigkeit ausgewählt. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel auf die korrekte Größe überprüft und anschließend über Gel-Extraktion (II.5.4.4) aufgereinigt.

Für die Ligation der PCR-Produkte in die Vektoren pSK⁺ und pBBR1MCS-5 wurden beide Plasmide zunächst blunt end geschnitten. Der Vektor pSK⁺ wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verdaut, der Vektor pBBR1MCS-5 mit dem Restriktionsenzym *SmaI*. Die Verdauungen erfolgten wie unter II.5.5.1 beschrieben und wurden anschließend per Gel-Extraktion aufgereinigt.

Es erfolgte dann die blunt end Ligation wie in II.5.5.2 beschrieben. Nach der Ligation wurden 2 - 4 µL aller Ligationsansätze mit Hitzeschock (II.5.6.1.2) in *E. coli* XL1 blue transformiert und über Blau-Weiß-Selektion (II.5.6.5) die Insert-haltigen Klone selektiert. Zusätzlich konnte eine Auswahl positiver, d. h. Insert-haltiger Klone über Kolonie-PCR erreicht werden (II.5.7.2). Nach der Selektion wurden die Insert-haltigen Klone in LB-Flüssigmedium als 5 mL Kulturen mit dem entsprechenden Antibiotikum (II.2.2) angeimpft und ÜN auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Aus den Flüssigkulturen wurden dann wie in II.5.4 beschrieben die Plasmide isoliert, zur Kontrolle auf Vorhandensein des Inserts mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen. Bei Vorhandensein des Inserts wurden diese Plasmide anschließend noch einmal sequenziert und bei Sequenzkorrektheit des Inserts anschließend für weitere Tests eingesetzt.

2.1 Klonierung des QQ ORFs aus Bio1

Da sich nach der Sequenzanalyse auf dem Insert von Bio1-pBKCMV nur ein vollständiger ORF befand, wurde dieser mit den in Tabelle 4 aufgeführten Primern B1H1_for und B1H1_rev als Insert B1H1 per PCR amplifiziert und zu weiteren Tests sowohl in den *E. coli* Kloniervektor pBluescriptSK⁺ (pSK⁺) als auch in den broad host range Vektor pBBR1MCS-5 kloniert, um weitere QS Phänotyp-Test in verschiedenen Organismen zu testen, so dass die Konstrukte pB1H1-pSK⁺ und pB1H1-pBBR entstanden. Die Konstrukte sind in Abbildung 22 und Abbildung 24 dargestellt.

2.2 Klonierung der QQ ORFs aus Bio4

Durch Transposonmutagenese waren bereits zwei potentielle QQ-ORFs zuvor (Diplomarbeit Schipper, 2004) identifiziert worden. Da diese unabhängig voneinander die QQ-Aktivität des ORFs nach Transposoninsertion aufgehoben hatte, liegt möglicherweise ein Operon zugrunde, bei dem die Expression mehrere Gene im Zusammenwirken die QQ-Aktivität ergeben. Daher wurden insgesamt vier Konstrukte subkloniert, wie die Abbildungen 27-30 zeigt. Zum einen wurde mit den Primern pBKCMV_T7mut und pBKCMV_T3 das gesamte Insert per PCR amplifiziert, welches im Folgenden als Insert B4 bezeichnet wird, und in die Vektoren pSK⁺ und pBBR1-MCS5 kloniert. Des Weiteren wurden mit dem Primerpaar B4A1_for + B4A1_rev ein 1,1 kb großes Insert, B4A1, mit dem Primerpaar B4A1_for und B4A2_rev das 2,0 kb großes Insert B4A2 und mit dem Primerpaar B4B1_for + B4B1_rev das Insert B4B1 mit einer Größe von 823 bp per PCR amplifiziert und in den Vektor pSK⁺ ligiert, so dass die Konstrukte pB4-pSK⁺, pB4A1-pSK⁺, pB4A2-pSK⁺, pB4B1-pSK⁺ und pB4-pBBR entstanden.

Die Entstehung der pSK⁺-Konstrukte ist auf den folgenden Abbildungen 18 - 21 dargestellt.

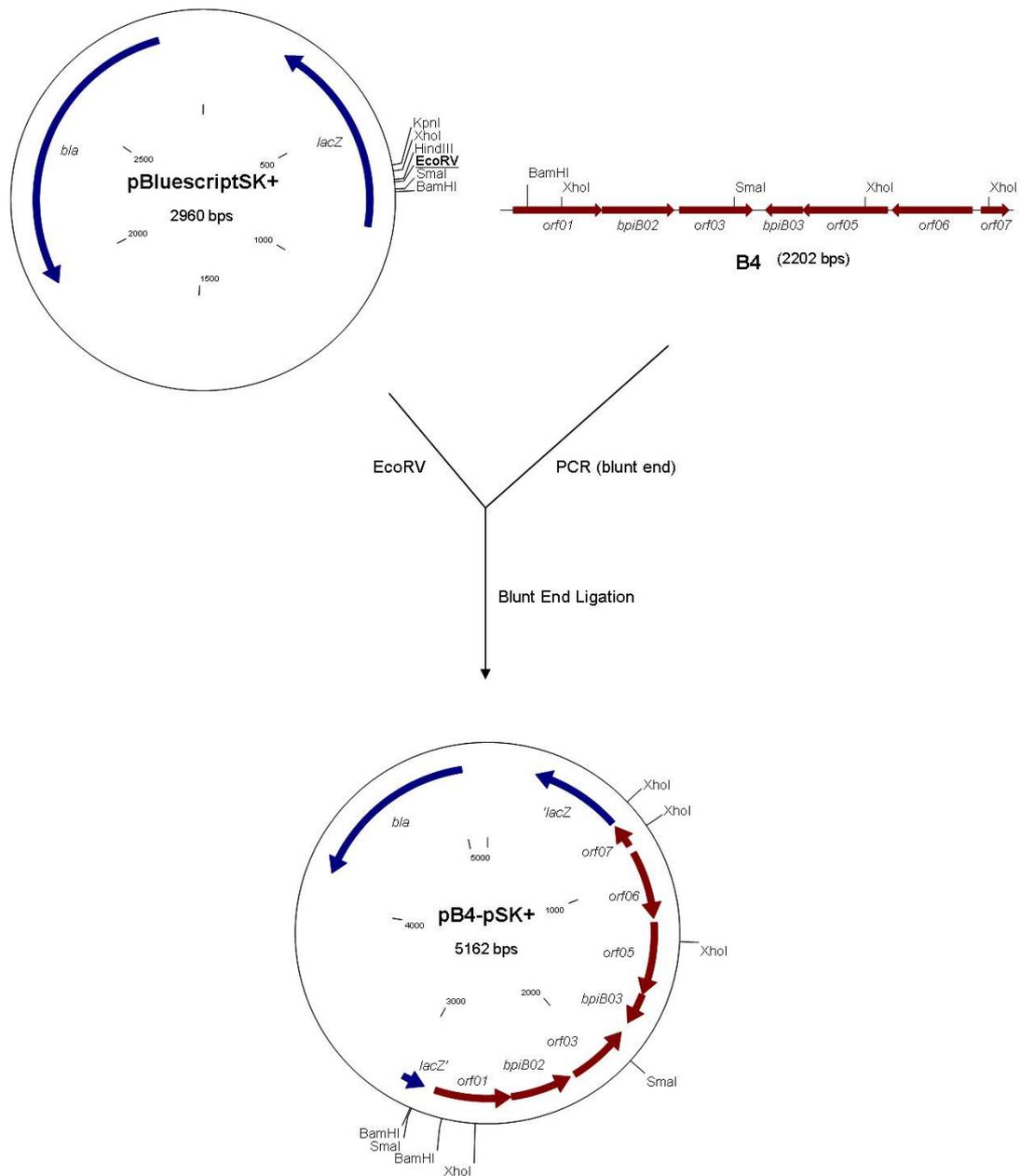


Abbildung 18: Klonierung des PCR-Produktes B4 in pSK⁺. Der Vektor pSK⁺ wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV glatt (blunt end) geschnitten und nach Aufreinigung mit dem ebenfalls zuvor aufgereinigten PCR-Produkt B4, welches das gesamte Insert Bio4 umfasst, ligiert. Es entstand dadurch das Konstrukt 5,2 kb große Konstrukt pB4-pSK⁺. Die Gene des Vektors sind blau markiert, die Gene des Inserts sind rot dargestellt.

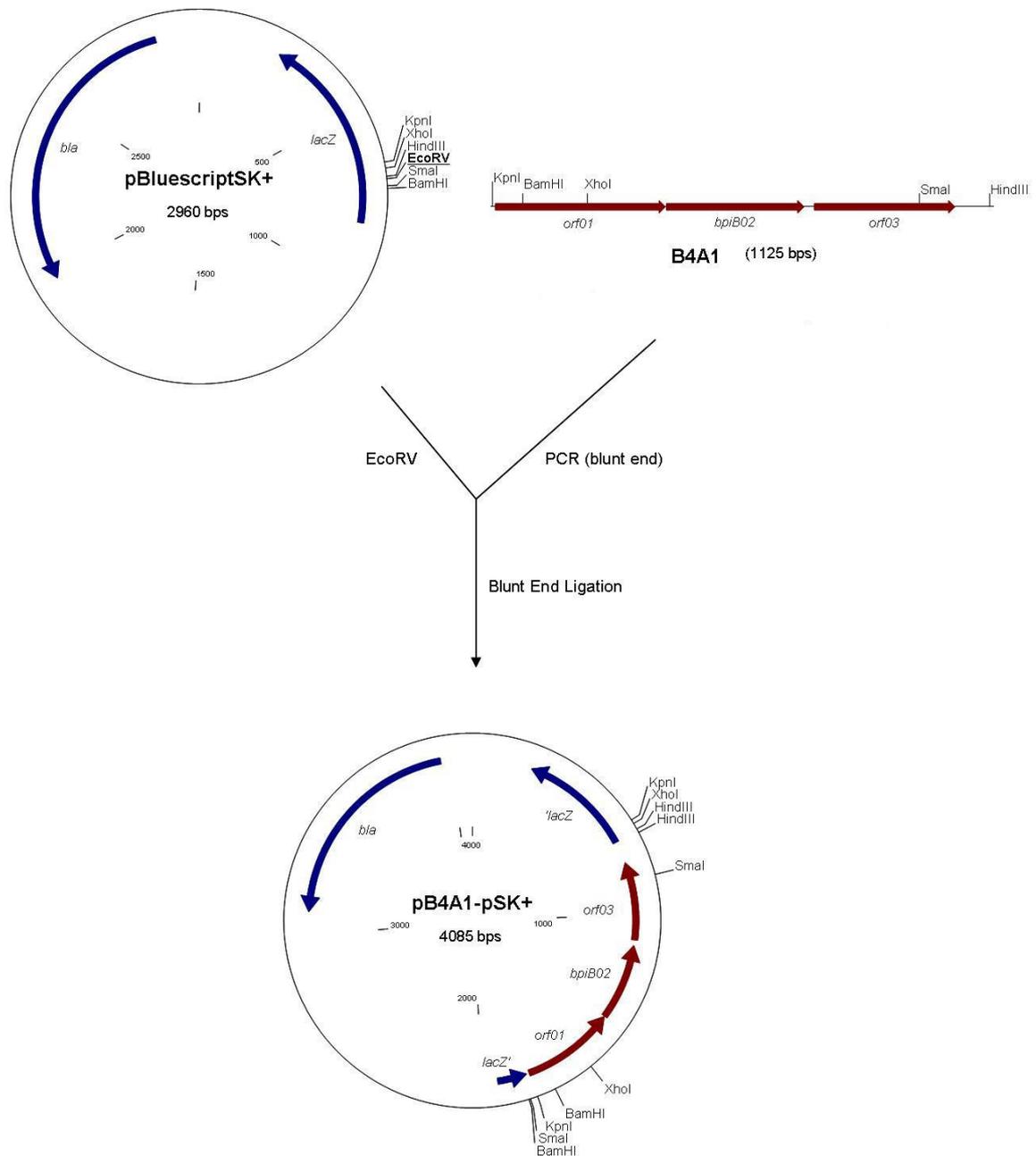


Abbildung 19: Klonierung des Konstrukts B4A1 in pSK⁺. Der Vektor pSK⁺ wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV glatt (blunt end) geschnitten und nach Aufreinigung mit dem ebenfalls zuvor aufgereinigten PCR-Produkt B4A1 ligiert. Es entstand das Konstrukt pB4A1-pSK⁺ mit einer Größe von 4,1 kb. Die Gene des Vektors sind blau markiert, die Gene des Inserts sind rot dargestellt.

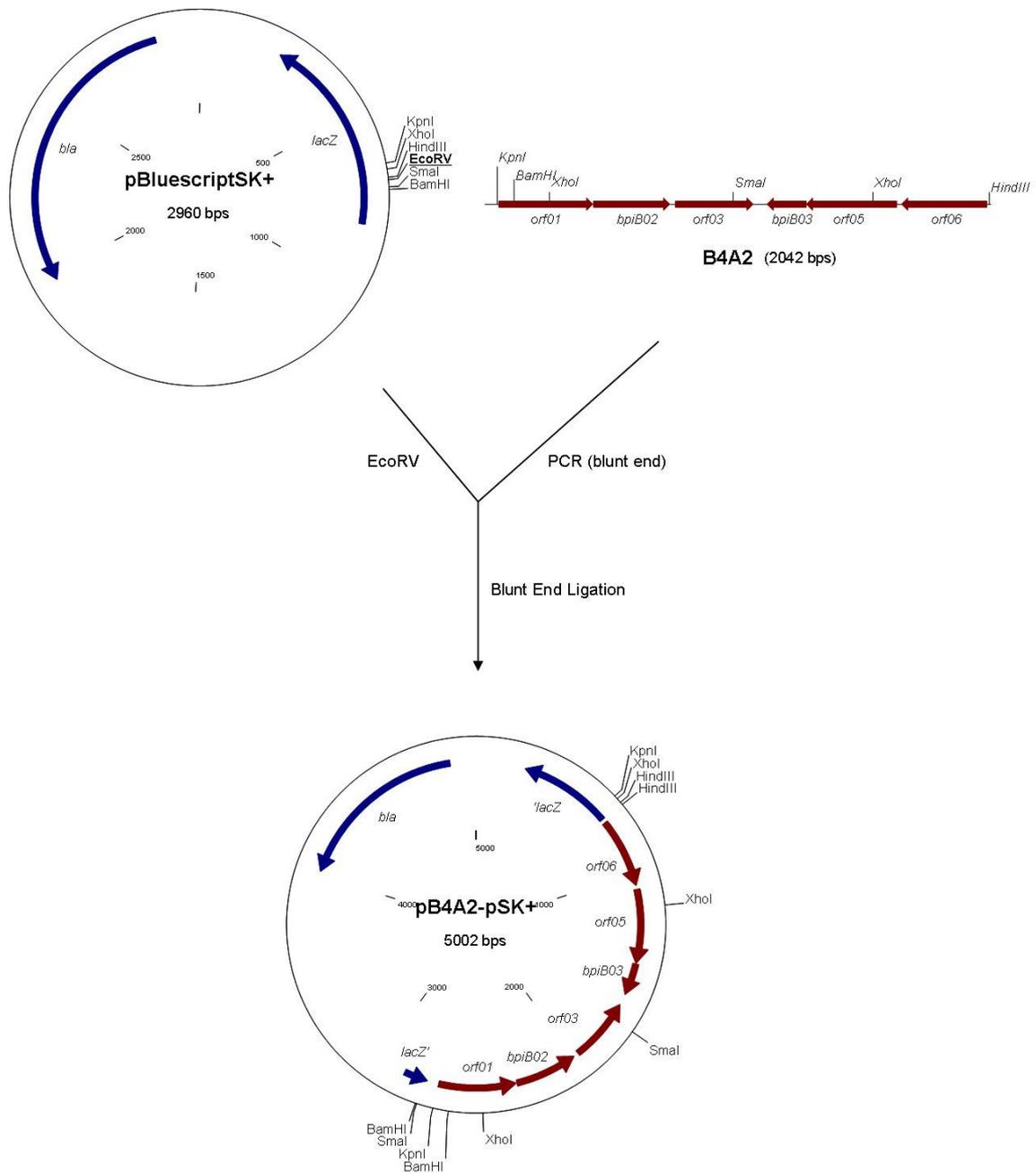


Abbildung 20: Klonierung des Konstrukts B4A2 in pSK⁺. Der Vektor pSK⁺ wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV glatt (blunt end) geschnitten und nach Aufreinigung mit dem ebenfalls zuvor aufgereinigten PCR-Produkt B4A2 ligiert. Es entstand das 5,2 kb große Konstrukt pB4A2-pSK⁺. Die Gene des Vektors sind blau markiert, die Gene des Inserts sind rot dargestellt.

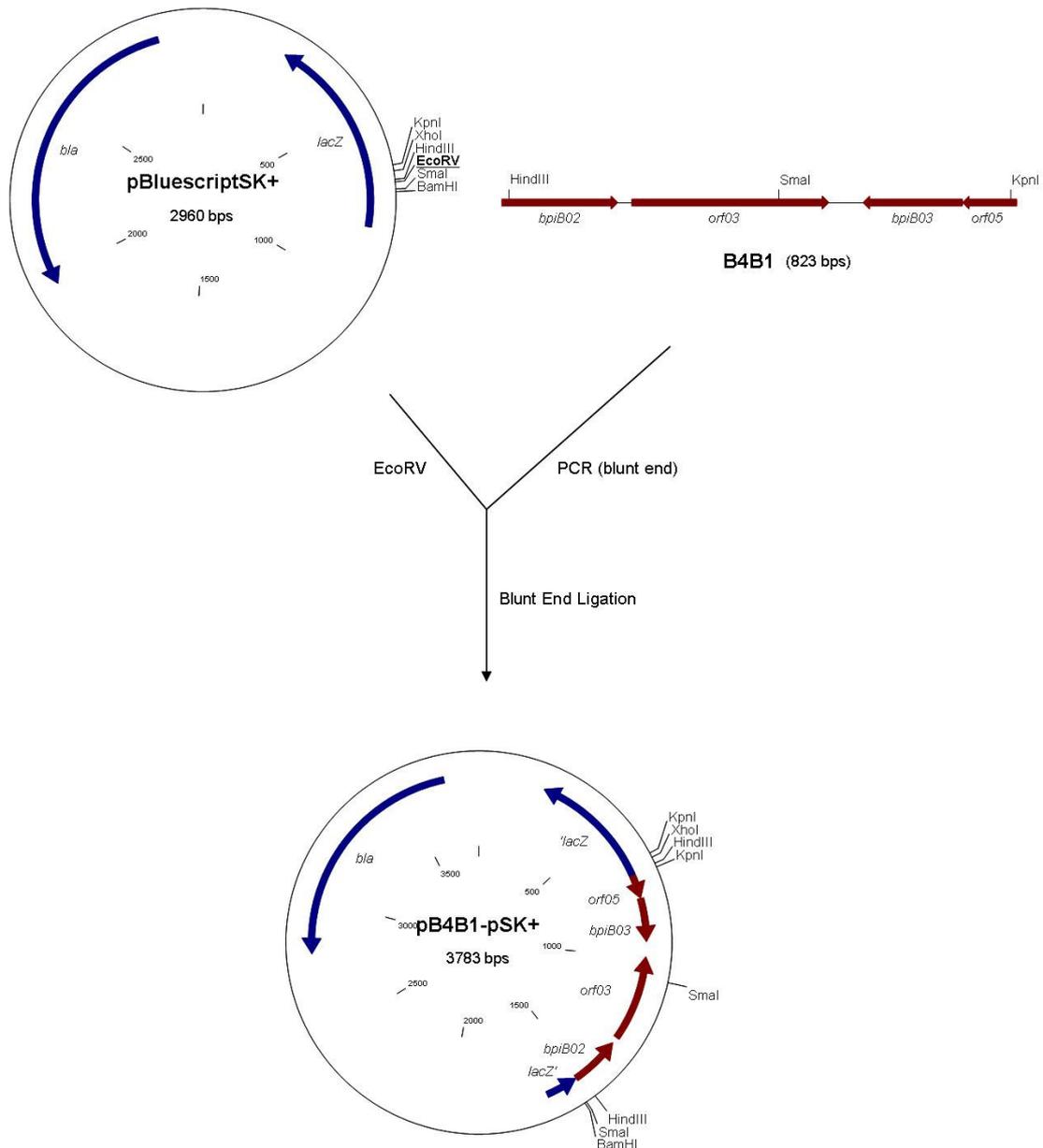


Abbildung 21: Klonierung des Konstrukts B4B1 in pSK⁺. Der Vektor pSK⁺ wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV glatt (blunt end) geschnitten und nach Aufreinigung mit dem ebenfalls zuvor aufgereinigten PCR-Produkt B4A1 ligiert, so dass das Konstrukt pB4B1-pSK⁺ mit einer Größe von 3,8 kb entstand. Die Gene des Vektors sind blau markiert, die Gene des Inserts sind rot dargestellt.

2.3 Klonierung des QQ ORFs aus Bio7

Da zuvor bereits der ORF *bpiB04* (Diplomarbeit C. Schipper, 2004) als QQ-ORF identifiziert worden war, wurde er mit den Primern B7mS_for und B7mS_rev aus dem Insert Bio7 als PCR-Produkt amplifiziert und in die Vektoren pSK⁺ und pBBR1-MCS5 kloniert (siehe Abbildung 22 und 24). Auch hier wurde zusätzlich das gesamte Insert mit den Primern pBKCMV_T7mut und pBKCMV_T3 per PCR amplifiziert und ebenfalls in beide Vektoren kloniert. Es entstanden die Konstrukte pB7-pSK⁺, pB7-pBBR, pB7mS-pSK⁺ und pB7mS-pBBR.

2.4 Klonierung der potentiellen QQ ORFs aus Bio8

Auf dem Insert von Bio8 befinden sich laut Sequenzanalyse zwei potentielle QQ-ORFs. Der erste auf dem Insert befindliche ORF, *hyp09*, wurde mit den Primern B8H9_for und pBKCMV_T7mut per PCR amplifiziert und anschließend als Insert B8H9 subkloniert (pB8H9-pSK⁺), der zweite ORF *bpiB05* wurde mit dem Primerpaar B8H10_for/rev als Insert B8H10 subkloniert und in die Vektoren pSK⁺ und pBBR1-MCS5 kloniert (siehe Abbildungen 22 und 24) als Konstrukte pB8H10-pSK⁺ und pB8H10-pBBR.

2.5 Klonierung der potentiellen QQ ORFs auf Bio9

Auf dem Insert Bio9 befinden sich insgesamt zwei potentielle QQ-ORFs, die Ähnlichkeiten zu Hydrolasen aufweisen. Beide wurden per PCR amplifiziert und in die Vektoren pSK⁺ und pBBR1-MCS5 kloniert (siehe Abbildungen 22 und 24). Für die Amplifizierung des Inserts ORF-1, der den ORF *bpiB06* enthielt, wurden die Primer Bio9_ORF1-for und Bio9_ORF1_rev verwendet, für die Amplifizierung des Inserts ORF-5 mit dem ORF *bpiB07* wurden die Primer Bio9_ORF5_rev und pBKCMV_T3 verwendet. Es entstanden die Konstrukte pB9-pSK⁺, pB9-pBBR, pORF1-pSK⁺, pORF1-pBBR, pORF5-pSK⁺ und pORF5-pBBR.

2.6 Subklonierung weitere potentieller QQ-ORFs

Auf dem Insert Bio6 befanden sich ebenfalls zwei potentielle QQ-ORFs, von denen einer Ähnlichkeiten zu einer Oxidoreduktase und einer Ähnlichkeiten zu einer Peptidase aufwies. Der Oxidoreduktase-ähnliche ORF, *ord01*, wurde mit dem

Primerpaar B6_Oxi_for/rev, der ORF mit den Übereinstimmungen zu einer Peptidase, *pep01*, mit dem Primerpaar B6_Pep_for/rev per PCR amplifiziert. Beide Inserts wurden in den Vektor pSK⁺ kloniert. Die Konstrukte wurden als pB6_Oxi-pSK⁺ und pB6_Pep-pSK⁺ bezeichnet.

3. Inhibierung des QS-gesteuerten Schwärmens bei *E. coli* K12

Es ist bekannt, dass Schwärmen bei *E. coli* QS gesteuert ist und durch AI-1 inhibierende Substanzen wie halogenierte Furanone unterdrückt werden kann (Ren et al., 2001). Da die Ursprungsklone Bio1, Bio4, Bio7, Bio8 und Bio9 in *E. coli* XL1 blue bereits als schwärminhibierend getestet worden waren (Diplomarbeit Schipper, 2004), wurde die Schwärminhibition als erstes Auswahlkriterium für die Bestimmung der QQ-ORFs nach der Subklonierung verwendet.

Hierfür wurden die in II.2 beschriebenen pSK⁺-Konstrukte der Klone Bio1, Bio4, Bio6, Bio7, Bio8 und Bio9 per Hitzeschock in *E. coli* XL1 blue transformiert und diese Klone im Anschluss auf ihre Schwärmfähigkeit auf *E. coli*-Schwärmagar (II.3.2.1) getestet. Dazu wurde 1 µL einer frischen *E. coli* LB-37°C-ÜN-Kultur, die mit dem entsprechenden pSK⁺-Konstrukt transformiert worden war, in die Mitte eines mit 4 mL Schwärmagar gefüllten Napfes einer 6-Well-Platte pipettiert und für 16 h bei 37°C inkubiert, danach ausgewertet.

Hierbei zeigte sich, dass der herausklonierte ORF aus dem Insert von Bio1, *bpiB01*, das Schwärmen in *E. coli* XL1 blue wie das Ursprungskonstrukt ebenfalls inhibierte (Abbildung 23 A).

Für Bio4 konnte der QQ-ORF an dieser Stelle nicht bestimmt werden, da zwar das gesamte Insert in dem pSK⁺-Vektor das Schwärmen in *E. coli* XL1 blue inhibierte (Abbildung 23 B), alle subklonierten Fragmente in pSK⁺ allein jedoch keine Schwärminhibition bewirkten. Dieses Ergebnis legt die Schlussfolgerung nahe, dass das gesamte Insert von Bio4 für die QQ-Aktivität notwendig ist und vermutlich ein ganzes Operon inklusive des ORFs *orf07* diese Aktivität bedingt.

Wie die der Einsatz von Transposonmutagenese (Diplomarbeit C. Schipper, 2004) bei Bio7 bereits gezeigt hatte (Abbildung 23 I), ist der ORF *bpiB04* bei Bio7 für die QQ-Aktivität verantwortlich und bedingt Schwärminhibition bei *E. coli* XL1 blue (Abbildung 23 C).

Für Bio8 zeigte sich, dass nur das Konstrukt pB8H10-pSK⁺, welches den ORF *bpiB05* beinhaltet, Schwärmen in *E. coli* XL1 blue inhibierte (Abbildung 23 D), während mit dem Konstrukt pB8H9-pSK⁺ keine Schwärminhibition erreicht wurde.

Bei Bio9 zeigten alle pSK⁺-Konstrukte, pBio9-pSK⁺, pORF1-pSK⁺ und pORF5-pSK⁺, Schwärm-Inhibition bei *E. coli* XL1 blue (Abbildung 23 E und F).

Für die beiden pSK⁺-Konstrukte aus Bio6 konnte hingegen keine Schwärminhibition in *E. coli* XL1 blue festgestellt werden.

Alle Kontrollen, *E. coli* XL1 blue ohne Vektor und mit dem Vektor pSK⁺, zeigten hingegen uneingeschränktes Schwärmen über den gesamten Napf der 6-Well-Platte.

Die schwärminhibierenden pSK⁺-Konstrukte sind in Abbildung 22 dargestellt.

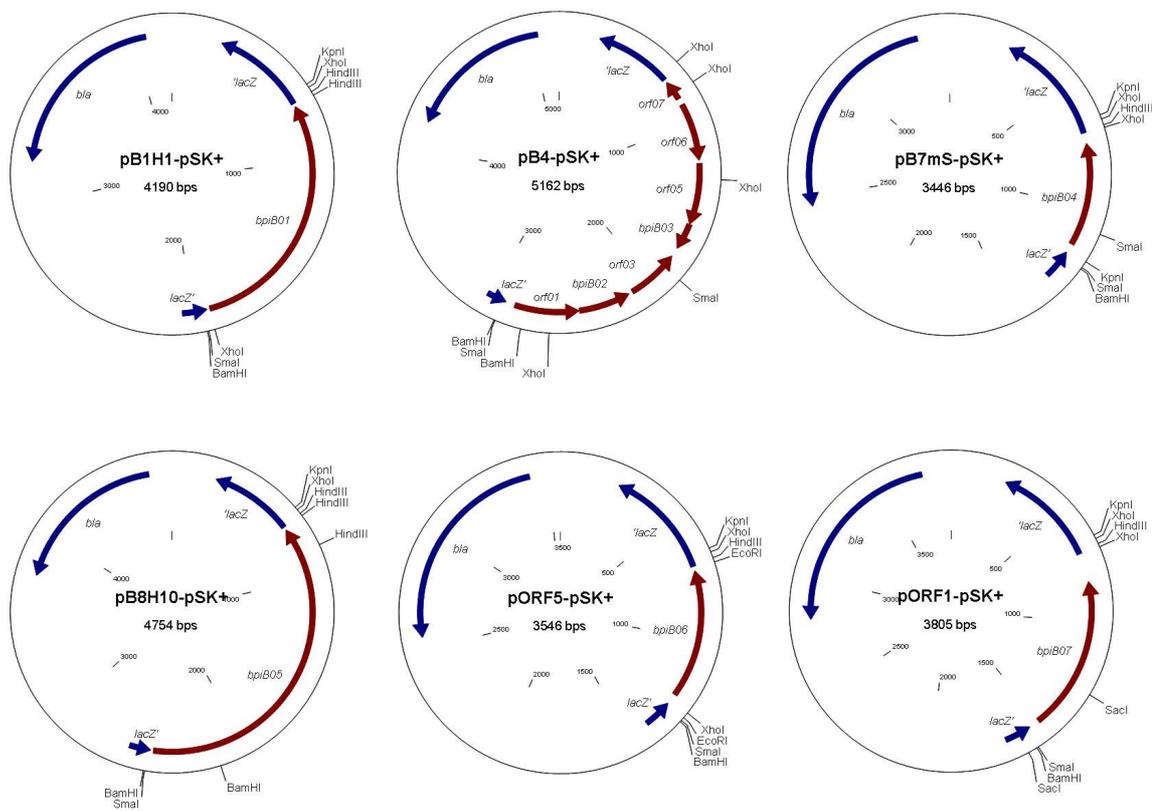


Abbildung 22: Schwärminhibierende pSK⁺-Konstrukte pB1H1-pSK⁺, pB4-pSK⁺, pB7mS-pSK⁺, pORF5-pSK⁺ und pORF1-pSK⁺. Die Inserts sind rot gekennzeichnet, während die Vektor-Gene in blau gehalten sind. Die Quorum Quenching ORFS *bpiB01-bpiB07* sind in den Konstrukten vermerkt. Die Klonierung erfolgte bei pSK⁺ durch Klonierung in die *EcoRV*-Schnittstelle, die Konstruktion ist in den Abbildungen 18 - 21 am Beispiel von Bio4 dargestellt.

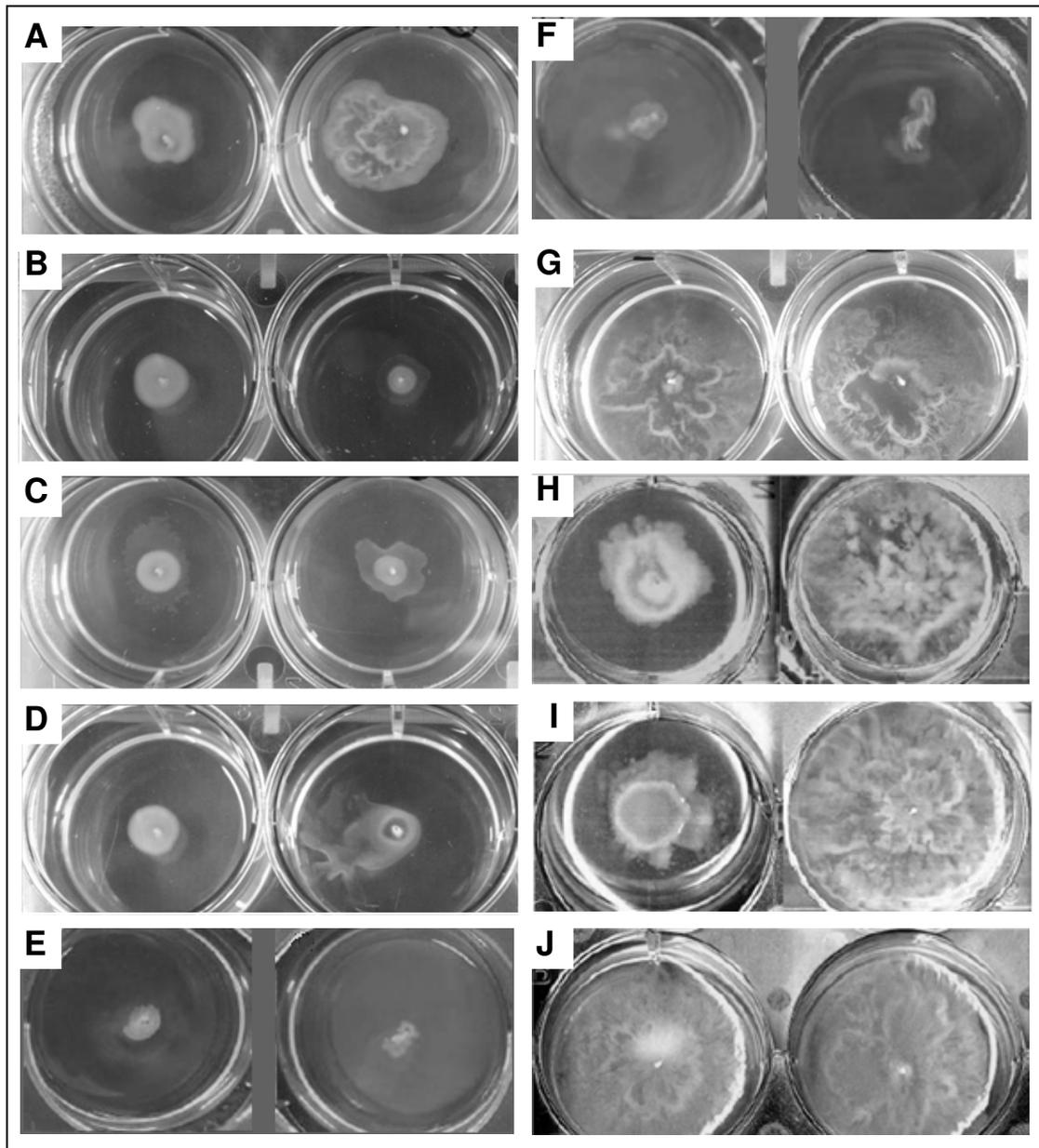


Abbildung 23: Schwärmtests mit verschiedenen *E. coli* XL1 blue Klonen in 6-Well-Platten nach ÜN Inkubation bei 37°C. Die Anordnung stellt sich wie folgt dar:

A. links: pBio1-pBKCMV, rechts: pB1H1-pSK⁺; **B.** links: pBio4-pBKCMV, rechts: pB4-pSK⁺; **C.** links: pBio7-pBKCMV, rechts: pB7mS-pSK⁺; **D.** links: pBio8-pBKCMV, rechts: pB8H10-pSK⁺; **E.** links: pBio9-pBK-CMV, rechts: pBio9-pSK⁺; **F.** links: pORF1-pSK⁺, rechts: pORF5-pSK⁺; **G.** links: *E. coli* XL1 blue, rechts: *E. coli* XL1 blue mit pSK⁺; **H.** links: pBio4-pBKCMV, rechts: pBio4 Knockout Mutante; **I.** links: pBio7-pBKCMV, rechts: pB7mS Knockout Mutante; **J.** links: *E. coli* XL1 blue, rechts: *E. coli* XL1 blue mit pBK-CMV (Leervektor).

4. Inhibierung QS-gesteuerter Phänotypentypen bei *P. aeruginosa* PAO1

Es ist bekannt, dass Quorum Sensing eine Reihe von Genen in *P. aeruginosa* kontrolliert und dabei auch verschiedene Phänotypen beeinflusst. So ist Motilität, Schwärmen und Schwimmen, direkt bzw. indirekt über QS gesteuert, ebenso Virulenzfaktoren wie die Produktion von Pyocyanin. Auch Biofilmbildung wird über QS gesteuert. Die Beeinträchtigung des QS-Systems, sei es über die Erzeugung von QS-Knockout-Mutanten, über Zugabe AHL-spaltender Enzyme oder chemischer Komponenten wie halogener Furanone, bewirkt eine deutliche Reduktion der gebildeten Biofilme (Kim et al., 2008, Hentzer et al., 2002).

Alle in *E. coli* XL1 blue erfolgreich als schwärminhibierend getesteten pSK⁺-Konstrukte wurden als pBBR1MCS-5-Konstrukte auf Inhibition QS-gesteuerter Phänotypen in *P. aeruginosa* getestet. Dafür wurden diese bereits als QS-inhibierend identifizierten ORFs in den broad host range Vektor pBBR1-MCS5 kloniert und wie in II.5.6.2 beschrieben in *P. aeruginosa* PAO1 transformiert, um die Wirkung der jeweiligen ORFs auf das QS System von *P. aeruginosa* mit Hilfe der Untersuchung QS gesteuerter Phänotypen, Motilität, Biofilmbildung und Pyocyaninbildung, untersuchen zu können. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 zu finden und entsprechen den für die pSK⁺-Konstrukte verwendeten Primern. Die mit der KOD HiFi-DNA-Polymerase (Fa. Novagen) oder mit der Pfu-DNA-Polymerase (Fa. MBI Fermentas) per PCR amplifizierten PCR-Produkte wurden zunächst wie beschrieben aufgereinigt und anschließend in den mit dem Restriktionsenzym *Sma*I geschnittenen pBBR1MCS-5 kloniert. Die Korrektheit und Insertionsrichtung des Inserts wurden anschließend über Sequenzierung überprüft. Als Kontrolle wurden das Cellulase-Gen *cel5A* (Voget et al., 2005) mit dem Primerpaar 007Ndelfor und 007BamHIrev ebenfalls blunt end in den *Sma*I-verdauten Vektor pBBR1MCS-5 kloniert. Diese Kontrolle wurde gewählt, um auszuschließen, dass lediglich das Vorhandensein eines Inserts bestimmte Phänotypen (Wachstum, Motilität) bedingen könnte. Zusätzlich wurden Knockout-Mutanten der *bpiB*-ORFs mittels Transposonmutagenese (II.5.8) erzeugt, wobei die *bpiB*-Gene durch die Insertion eines Transposons inaktiviert wurden. Die Ergebnisse der Klonierungen und Transposonmutagenesen wurden mittels Sequenzierung überprüft. Wachstumstests mit den verwendeten Medien zeigten keine Wachstumsinhibition bei den erstellten Klonen. Die im Weiteren getesteten *bpiB*-haltigen pBBR1MCS-5-Konstrukte und das *cel5A*-Kontrollkonstrukt sind in Abbildung 24 zu sehen.

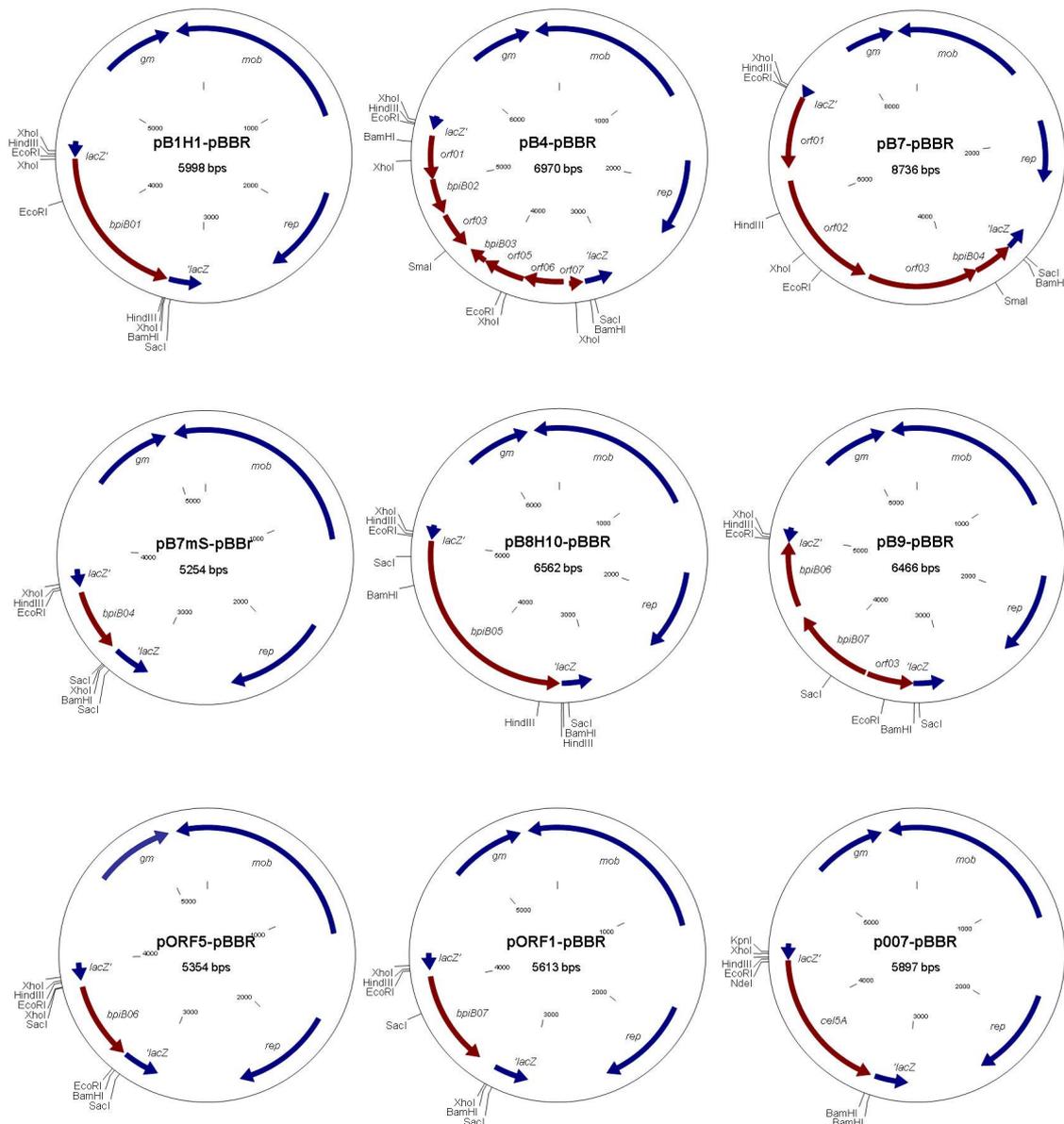


Abbildung 24: Schwärminhibierende pBBR1MCS-5-Konstrukte pB1H1-pBBR, pB4-pBBR, pB7-pBBR, pB7mS-pBBR, pB9-pBBR, pORF5-pBBR pORF1-pBBR und die *ce15A*-haltige Kontrolle p007-pBBR. Die Inserts sind rot gekennzeichnet, während die Vektor-Gene in blau gehalten sind. Die Quorum Quenching ORFS *bpiB01*-*bpiB07* sind in den Konstrukten vermerkt. Die Klonierung erfolgte bei dem Vektor pBBR1MCS-5 durch Klonierung in die *SmaI*-Schnittstelle mit dem jeweiligen aufgereinigten blunt end PCR-Produkt.

4.1 Motilitätstests

Es ist bekannt, dass Motilität in *P. aeruginosa* über Quorum Sensing gesteuert wird (Shrout et al., 2006; Verstraeten et al., 2008). Daher wurde Motilität in Form von Schwärmen und Schwimmen bei *P. aeruginosa* PAO1 als weiteres Kriterium für die Wirkung der ORFs *bpiB01-bpiB07* in vivo gewählt.

Hierfür wurden die pBBR1-MCS5-Konstrukte, wie in Material und Methoden unter II.5.6.2 beschrieben, in *P. aeruginosa* PAO1 transformiert und auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden als 5 mL-LB-Flüssigkulturen ÜN bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 500 µL dieser ÜN Kulturen wurden anschließend abgenommen, abzentrifugiert und in 10 µL PBS resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 1 µL in die Mitte einer mit 20 mL Schwärm- bzw. Schwimmagar (II.3.2.2) befüllten Petrischale pipettiert. Die Platten wurden dann für 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend ausgewertet.

Die Auswertung nach 48h Inkubation bei 37°C ergab, dass alle *bpiB*-haltigen Konstrukte des Vektors pBBR1MCS-5 in *P. aeruginosa* PAO1, pB1H1-pBBR mit *bpiB01*, pB4-pBBR mit *bpiB02* und *bpiB03*, pB7-pBBR mit dem gesamten Insert Bio7 und folglich mit *bpiB04*, pB7mS-pBBR mit *bpiB04*, pB9-pBBR mit dem gesamten Insert Bio9 und somit inklusive der ORFs *bpiB06* und *bpiB07*, pORF5-pBBR mit *bpiB06* und pORF1-pBBR mit *bpiB07* sowohl das Schwärmen (Abbildung 25 A) als auch das Schwimmen deutlich inhibierten (Abbildung 25 B). Das Cellulase-Gen-beinhaltenende Konstrukt p007-pBBR zeigte in *P. aeruginosa* PAO1 hingegen keinerlei Einschränkung der Motilitäts-Phänotypen, die mit diesem Konstrukt transformierten *P. aeruginosa*-Klone entsprachen den Motilitätsphänotypen des PAO1-Wildtyp-Stammes ohne Plasmid (Abbildung 25). Hier hatten sich die Bakterien nach 48 stündiger Inkubation bei 37°C über die gesamte Agarplatte verteilt. Einen dem Wildtyp entsprechenden Schwärm- und Schwimmpheotyp zeigten ebenfalls die Knockout-Konstrukte der *bpiB*-Gene bei Expression in *P. aeruginosa* PAO1, pB1H1-TM-pBBR mit einem Transposon in *bpiB01*, pB7mS-TM-pBBR mit einer Transposoninsertion in *bpiB04* sowie pB8H10-TM-pBBR mit einem inaktivierten *bpiB05*-Gen und den ebenfalls mit Transposonmutagenese ausgeschalteten Genen *bpiB06* in pORF5-TM-pBBR und *bpiB07* in pORF1-TM-pBBR. Dieses Ergebnis zeigt, dass die in den *bpiB*-Knockout-Konstrukten ausgeschalteten *bpiB*-Gene für die veränderten Motilitätstypen verantwortlich sind, da bei ihrer Inaktivierung die dem Wildtyp entsprechenden Motilitätsphänotypen zu beobachten waren.

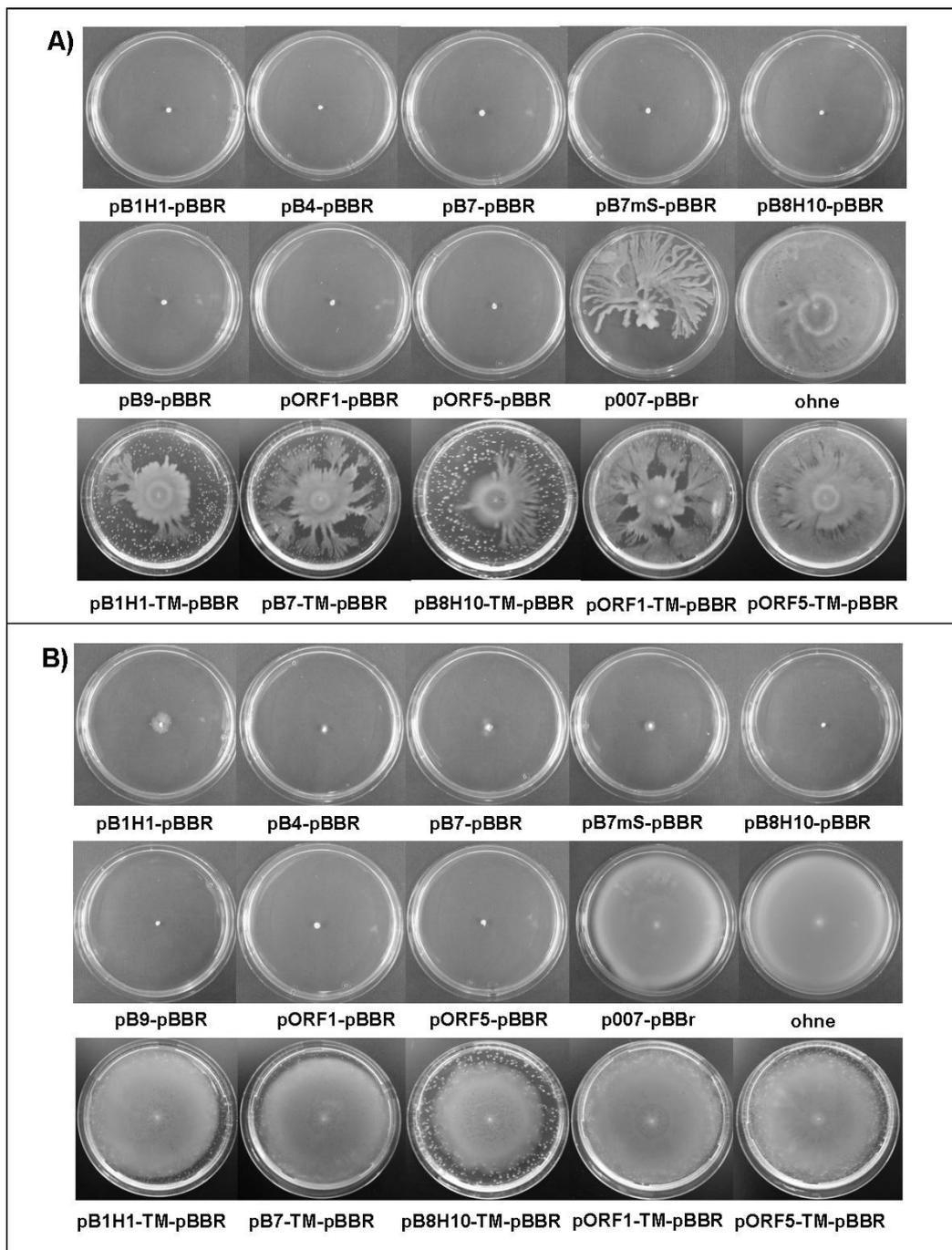


Abbildung 25: Motilitätsphänotypen der verschiedenen PAO1-Klone. A) Schwärmphänotypen nach 48h Inkubation bei 37°C; **B)** Schwimmphänotypen nach 48h Inkubation bei 37°C. Angezeigt sind die verschiedenen pBBR1-MCS5-Konstrukte, die Transposon-beinhaltenen Knockout-Kontrollen der *bpiB*-Gene (pB1H1-TM-pBBR, pB7mS-TM-pBBR, pB8H10-TM-pBBR, pORF1-TM-pBBR, pORF5-TM-pBBR), die *cel5A*-Gen beinhaltenende Kontrolle (p007-pBBR) und der Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 ohne Plasmid (ohne).

4.2 Inhibition der Pyocyaninbildung

Auch die Pyocyaninbildung, die bei *P. aeruginosa* über das QS gesteuerte RpoS-System gesteuert wird (Whiteley et al., 2000), war bei den *bpiB*-Konstrukten in *P. aeruginosa* PAO1 im Vergleich zu den Kontrollen stark inhibiert, wie Abbildung 26 am Beispiel der Konstrukte pB1H1-pBBR, pB7mS-pBBR, pB8H10-pBBR1-MCS5 in *P. aeruginosa* PAO1 und der Kontrollen, des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 ohne Vektor und mit dem *cel5A*-haltigem Vektor pBBR1MCS-5, p007-pBBR, zeigt. Bei den in der Abbildung gezeigten Klonen wurde eine 5 mL-LB-ÜN Kultur mit 2 mL Chloroform extrahiert, der Farbstoff Pyocyanin verblieb dabei in der Chloroform-Phase und ist anhand der Blaufärbung zu erkennen.

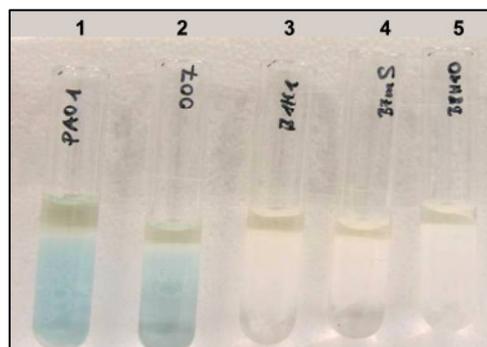


Abbildung 26: Pyocyaninbildung bei einer 16 h Kultur am Beispiel verschiedener *P. aeruginosa* PAO1-Klone nach Extraktion mit Chloroform. 1. PAO1 ohne Vektor, 2. PAO1 mit Cellulase-Gen *cel5a* in p007-pBBR, 3. PAO1 mit Konstrukt pB1H1-pBBR, 4. PAO1 mit Konstrukt pB7mS-pBBR, 5. PAO1 mit Konstrukt pB8H10-pBBR.

Die übrigen Messungen der Pyocyaninbildung für alle in III.4.1 bereits auf Motilität getesteten *P. aeruginosa* PAO1-Klone, die in Abbildung 27 als Graphik zu sehen sind, wurden mit zellfreien Überständen von PAO1-ÜN Kulturen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 5 mL LB mit den verschiedenen PAO1-Klonen von einer Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur beimpft und ÜN bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Zelldichte bei OD₆₀₀ gemessen, die Kulturen bei 13.000 rpm für 2 min abzentrifugiert und die Überstände anschließend sterilfiltriert. Die Pyocyaninkonzentration konnte anschließend bei 690 nm photometrisch bestimmt werden, da Pyocyanin bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum besitzt. Mit Hilfe des bekannten Extintionskoeffizienten ϵ , der für Pyocyanin bei 690 nm bei 4,31

$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ beträgt, ließ sich die Konzentration an Pyocyanin eines Ansatzes dann wie in II.6.5.3 beschrieben berechnen.

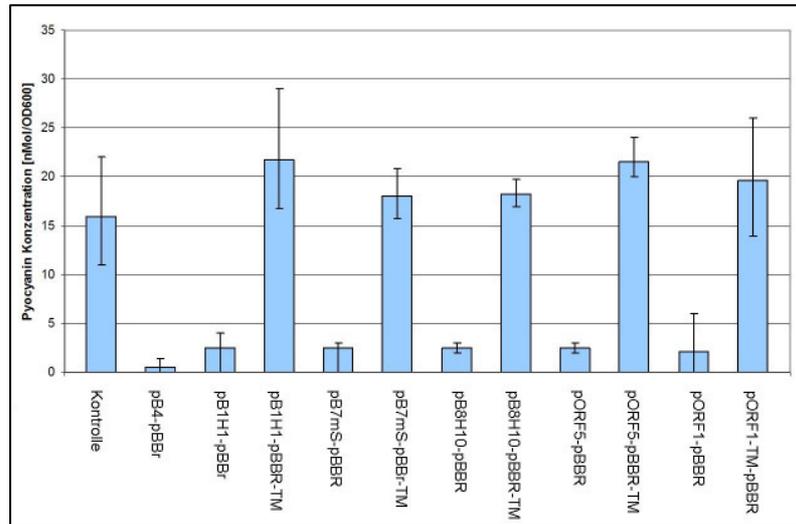


Abbildung 27: Pyocyaninbildung im Verhältnis zur Zelldichte verschiedener *P.aeruginosa* PAO1-Klone. Die Pyocyaninkonzentrationen (in nMol) wurden berechnet und durch die gemessene Zelldichte (Extinktion bei OD_{600}) dividiert, um das Verhältnis zwischen Zelldichte und produzierter Pyocyaninmenge darzustellen.

Die gemessenen Zelldichten aller Kulturen lagen im Durchschnitt bei etwa 2,2-2,4 bei der Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm, es waren keine nennenswerten Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Klonen feststellbar.

Bei der Pyocyaninbildung zeigten sich hingegen deutliche Unterschiede. Der *P.aeruginosa* PAO1 Klon mit dem *ceI5A*-haltigen Vektor produzierte eine durchschnittliche Pyocyaninmenge von 35 nMol mL^{-1} und auch die gemessenen Pyocyaninmengen bei den *bpiB*-Knockout-Mutanten lagen zwischen 71 nMol mL^{-1} und 43 nMol mL^{-1} (pB1H1-TM-pBBR: 71 nMol mL^{-1} , pB7mS-TM-pBBR: 43 nMol mL^{-1} , pB8H10-TM-pBBR: 56 nMol mL^{-1} ; pORF5-TM-pBBR: 65 nMol mL^{-1} , pORF1-TM-pBBR: 63 nMol mL^{-1}).

Die *P. aeruginosa* PAO1-Klone mit den aktiven *bpiB*-Genen in den pBBR1MCS-5-Konstrukten zeigten hingegen nur eine sehr geringe Pyocyaninproduktion, sie lag bei 2 nMol mL^{-1} für die Konstrukte pB1H1-pBBR und pB4-pBBR, bei 5 nMol mL^{-1} für pB7mS-pBBR, bei 7 nMol für pB8H10-pBBR und pORF5-pBBR sowie bei 18 nMol mL^{-1} für pORF1-pBBR. Somit beeinflussen die *bpiB*-Gene nicht nur die Motilität von *P. aeruginosa* PAO1, sondern auch die QS-gesteuerte Pyocyaninbildung.

4.3 Inhibition der Biofilm-Bildung

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob auch die Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* PAO1 durch die *bpiB*-Gene beeinflusst wurde. Biofilmbildung ist ebenso wie Motilität durch QS beeinflusst und stellt sowohl in industriellen als auch in medizinischen Bereichen häufig Probleme dar, da unter anderem mit der Biofilmbildung eine höhere Resistenz der Organismen gegenüber chemischen Agenzien und Antibiotika einhergeht (Rao et al., 2008; Bonifait et al., 2008, Pumbwe et al., 2008).

Für die Biofilmtests wurden wie in II.3.3 beschrieben zur Anzucht von Biofilmen auf Borosilikatglas unter kontinuierlichen Bedingungen 2-Kanal-Durchflusszellen aus V10A-Stahl verwendet. Die Bedingungen sind in Material und Methoden unter II.3.3.2 beschrieben. Als Nährmedien wurden mAPM-Medium (II.2.1.3) bzw. ABt-Medium (II.2.1.4) verwendet. Zur Erzeugung der Biofilme in den Durchflussskammern wurde eine ÜN Kultur des entsprechenden *P. aeruginosa*-Klons auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Diese Zellen wurden am nächsten Tag von der Agarplatte abgenommen und in 5 mL LB-Medium resuspendiert. Nach photometrischer Messung der Zelldichte wurden jeweils 6×10^8 Zellen abgenommen, abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 6 mL mAPM- bzw. ABt-Medium aufgenommen, in die Durchflusszelle gegeben und für 1 h ohne Durchfluss inkubiert. Anschließend wurde der Durchfluss mit den in II.3.3.2 angegebenen Parametern angeschaltet und die Biofilmentwicklung für 72 h mit dem Durchlichtmikroskop dokumentiert. Im Anschluss wurden die Biofilme mit SYTO9, einem DNA-anfärbenden Farbstoff, eingefärbt und die Biofilme mit einem konfokalen Laserscanmikroskop analysiert.

In den allen durchgeführten Versuchen in beiden Medien zeigte sich, dass die *bpiB*-tragenden *P. aeruginosa* PAO1-Klone eine deutlich verringerte Biofilmbildung zeigten, die kaum über die Adhärenz an die Oberfläche hinausging (Abbildung 28), während die Knockout-Mutanten der *bpiB*-Gene und die *cel5A*-Kontrolle eine deutliche kompakte Biofilmbildung zeigten, die dem Wildtyp entsprach (Abbildung 28). Dieses Ergebnis zeigt, dass die *bpiB*-Gene auch die Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* PAO1 inhibieren. Zur Kontrolle wurden Wachstumstests aller untersuchten Klone mit allen verwendeten Medien (LB, ABt, mAPM) durchgeführt, hierbei zeigte sich, dass keine nennenswerten Unterschiede in der Zellzahl nach ÜN Inkubation bei 37 °C messbar waren, die beobachteten Phänotypen also nicht auf Wachstumsunterschiede zurückzuführen sind.

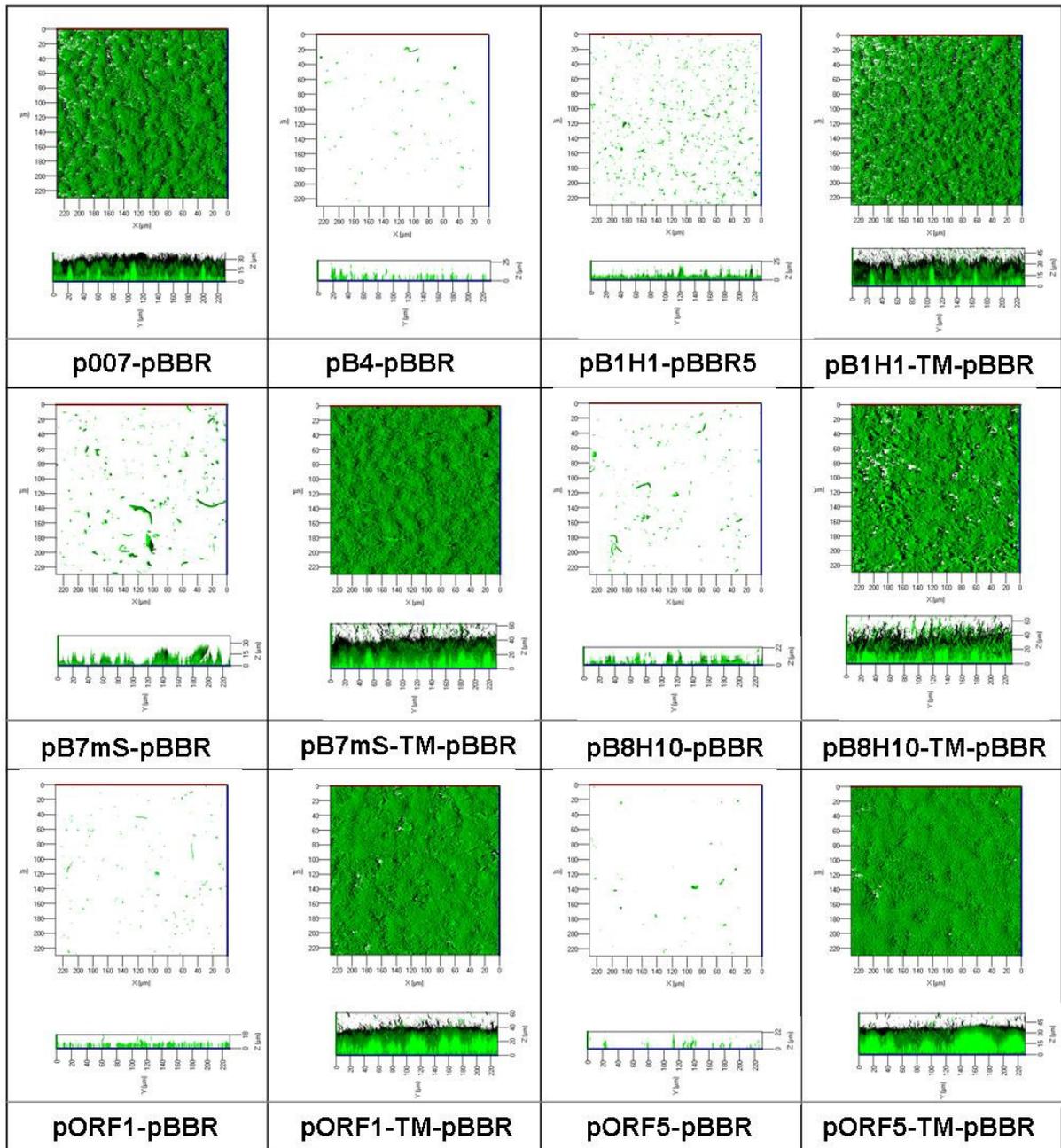


Abbildung 28: *P.aeruginosa* PAO1-Biofilmbilder nach SYTO9-Färbung nach 72 h Anzucht in mAPM-Medium. Alle Biofilme wurden für 72 h in mAPM-Medium angezogen, das Wachstum wurde über Durchlichtmikroskopie über diesen Zeitraum beobachtet. Nach Beendigung der Anzucht wurden die Biofilme mit dem Farbstoff SYTO9 eingefärbt und mit Hilfe des LSM 510 Konfokalen Laserscanmikroskop (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht, Die Quantifizierung der Biofilm-Parameter erfolgte mit dem COMSTAT Programm. Die Abbildungen zeigen in den quadratischen Feldern die Sicht von oben auf die gefärbten Biofilme, während die darunter befindlichen Bilder die Dicke und Struktur der Biofilme von der Seite zeigen. Für in ABt-Medium angezogene Biofilme zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie für die in mAPM-Medium erzeugten Biofilme.

5. Komplementation der *P. aeruginosa* Klone durch AHL-Zugabe

5.1 Schwärmkomplementation durch 3-Oxo-C₁₂-HSL Zugabe

Nach der Aufklärung des Spaltmechanismus von AHLs durch die Proteine Bpi01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 (III.8) wurden Komplementationsversuche der *P. aeruginosa* PAO1 Klonen, die mit Konstrukten pB1H1-pBBR, pB4-pBBR, pB7mS-pBBR, pB8H10-pBBR, pORF5-pBBR und pORF1-pBBR transformiert worden waren, unter dem exogenen Zusatz seiner natürlichen AHL-Moleküle 3-Oxo-C₁₂-L-HSL (für Motilität, Biofilmbildung) und C₄-HSL (für Pyocyaninbildung) angesetzt.

Dabei wurde versucht, die Motilität der schwärminhibierten *P. aeruginosa* PAO1-Klone mit dem exogenen Zusatz von 3-Oxo-C₁₂-L-HSL wiederherzustellen. Dazu wurde Schwärmagar in kleine Petrischalen gegossen und nach dem Erkalten jeweils 10 µL einer 10%igen 3-Oxo-C₁₂-L-HSL-Lösung (Fa. Cayman Chemicals Ltd., 10 mg 3-Oxo-C₁₂-L-HSL gelöst in 1 mL Ethanol) in die Mitte der Platte aufgetropft. 500 µL von ÜN Kulturen der aller PAO1-Klone wurden anschließend abgenommen, abzentrifugiert und in 10 µL PBS resuspendiert. 1 µL dieser Zellsuspensionen wurden anschließend auf die Platte pipettiert und diese wie bereits in den Motilitätstests unter III.3.2 beschrieben für 48 h bei 37°C inkubiert. Es zeigte sich, dass für alle Klone eine teilweise Komplementation des Schwärmens nach Zusatz von 0,3 µM 3-Oxo-C₁₂-L-HSL erreicht werden konnte (Abbildung 29).

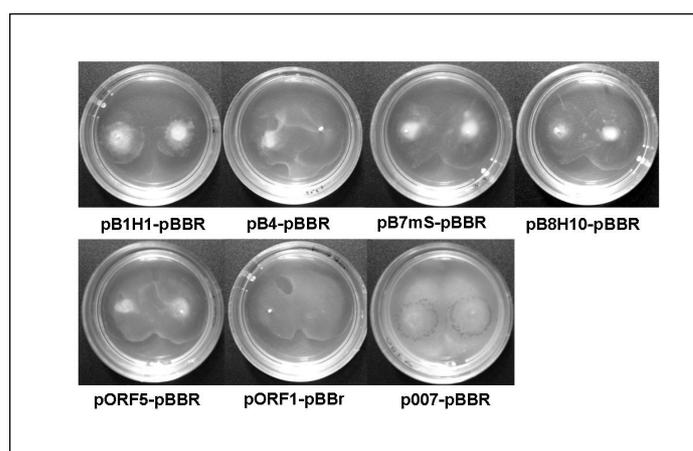


Abbildung 29: Schwärmphänotypen nach der Komplementation mit 3-Oxo-C₁₂-HSL und 48 h Inkubation bei 37°C. Durch Zugabe von 3-Oxo-C₁₂-HSL konnte eine teilweise Komplementation des Schwärmens der *bpiB*-haltigen Klone im Vergleich zum Wildtyp (p007-pBBR) erreicht werden.

5.2 Komplementation der Pyocyaninproduktion durch AHL Zugabe

In einem zweiten Ansatz konnte die Pyocyaninbildung für die *P. aeruginosa* PAO1-Klone, die die Konstrukte pB1H1-pBBR, pB7mS-pBBR und pORF1-pBBR trugen, mit dem Zusatz von C₄-HSL und kleinen Mengen 3-Oxo-C₁₂-L-HSL komplementiert werden (Abbildung 30). Dafür wurden für die Komplementation von *bpiB01* (aus pB1H1-pBBR) 5 mL LB mit 34 nM 3-Oxo-C₁₂-L-HSL und 1,7 mM C₄-HSL versetzt. Für die Komplementation von *bpiB04* (in pB7mS-pBBR) bzw. *bpiB07* (in pORF1-pBBR) wurden 2,3 mM C₄-HSL und 68 nM 3-Oxo-C₁₂-L-HSL in einer 5 mL LB-Kultur verwendet. Diese Kulturen wurden anschließend einprozentig mit *P. aeruginosa* PAO1-ÜN-Kulturen, die die Konstrukte pB1H1-pBBR, pB7mS-pBBR und pORF1-pBBR trugen, angeimpft und ÜN für 16 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde zunächst die Zelldichte der Kulturen bei OD₆₀₀ bestimmt, die Kulturen anschließend abzentrifugiert und sterilfiltriert, um die Pyocyaninkonzentration durch die Messung der Absorption bei 420 nm bestimmen zu können. Die Pyocyaninkonzentrationen der Kulturen, denen C₄-HSL und 3-Oxo-C₁₂-L-HSL zugesetzt worden waren, entsprachen annähernd denen der Knockout-Kontrollen.

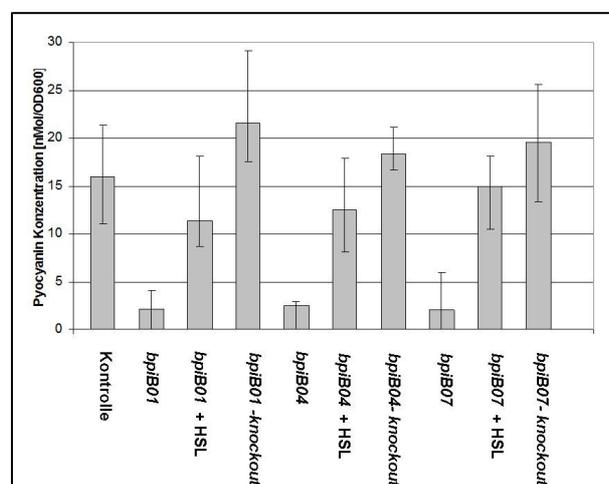


Abbildung 30: Pyocyaninproduktion nach der Komplementation mit 3-Oxo-C₁₂-HSL und C₄-HSL. Bei den PAO1-Klonen, die die Konstrukte pB1H1-pBBR (mit *bpiB01*), pB7mS (mit *bpiB04*) und pORF1-pBBR (mit *bpiB07*) trugen, konnte die Zugabe von 3-Oxo-C₁₂-HSL und C₄-HSL die Pyocyaninproduktion auf das Niveau der Kontrolle, *P. aeruginosa* PAO1 mit p007-pBBR, und der jeweiligen Knockout-Mutanten gebracht werden.

6. Klonierung, heterologe Expression und Aufreinigung der QQ Gene *bpiB01*, *bpiB04*, *bpiB05* und *bpiB09*

Zur genaueren Charakterisierung wurden die potentiellen Quorum Quenching Gene *bpiB01*, *bpiB04*, *bpiB05* und *bpiB09* in pET-Expressionsvektoren kloniert. Während sich *bpiB01* und *bpiB05* über den C-terminalen 6 x His-tag-Expressionsvektor pET21a überexprimieren und aufreinigen ließen, wurde *bpiB04* zusätzlich in pET19b, einen N-terminalen 10 x His-tag-Vektor, kloniert und überexprimiert. *BpiB09* wurde ausschließlich in pET19b-Vektor kloniert und überexprimiert.

BpiB01, *bpiB04* und *bpiB05* wurden ausgewählt, weil sie bereits in vorher in verschiedenen Tests mit QS-inhibierten Phänotypen in Verbindung gebracht werden konnten, *bpiB09* wurde wegen seiner Sequenzähnlichkeit zu Oxidoreduktasen (III.1.5) für die Überexpression und Aufreinigung ausgewählt.

Die Überexpressionen erfolgten unter Verwendung des Schüttelinkubators Thermotron (Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz), das Abzentrifugieren der Zellen in der Sorvall® RC-6TM Plus Superspeed Zentrifuge (Fa. Thermo, USA). Nach der Überexpression wurden die Proteine mit Resin-haltigen Protino-Säulen (Fa. Macherey und Nagel) oder Ni-NTA-Säulen der Firma Qiagen aufgereinigt.

6.1 Klonierung, Überexpression und Aufreinigung von *BpiB01*

Der ORF *bpiB01* aus dem Insert Bio1 wurde mit Hilfe der Primer B1_NdeI_for und B1_NotI_rev per PCR mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Die Primer enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NdeI* bzw. *NotI*, die somit in das PCR Produkt eingefügt wurden. Der Einbau der *NotI*-Schnittstelle in das PCR-Produkt bewirkte gleichzeitig eine Überschreibung des Stopp-Codons in der Sequenz von *bpiB01*, sodass sich beim Klonieren in den C-terminalen His-tag-Vektor pET21a der Histidin-tag unmittelbar an das *bpiB01*-Gen anschloss. Bei der Expression wurde somit der His-tag direkt an das *BpiB01*-Protein angehängt.

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend blunt end in den *E. coli* Vektor pTZ19R-Cm, der mit dem Restriktionsenzym *SmaI* geschnitten war, ligiert. Aus diesem Konstrukt konnte das mit einer *NdeI*-Schnittstelle am N-terminalen Teil (also am Start-Codon) und am C-terminalen Teil mit einer *NotI*-Schnittstelle versehene Gen *bpiB01* dann mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *NotI* herausgeschnitten und aufgereinigt werden. Danach wurde es in den ebenfalls mit *NdeI* und *NotI* verdauten

Vektor pET21a kloniert. Es entstand das Konstrukt pB1-pET21a. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Für die Ligation in den Vektor pET19b wurde statt des Primers B1_NotI_rev der Primer B1_XhoI_rev für die PCR verwendet, der forward Primer blieb gleich. Auch hier wurde das PCR-Produkt blunt end in dem *SmaI*-verdauten Vektor pTZ19R-Cm kloniert und anschließend mit *NdeI* und *XhoI* herausgeschnitten. Der Vektor pET19b wurde ebenfalls mit *NdeI* und *XhoI* verdaut und aufgereinigt, das *NdeI*- und *XhoI*-geschnittene *bpiB01*-Insert anschließend hinein ligiert. So wurde das Konstrukt pB1-pET19b hergestellt. Die Korrektheit der Konstrukte wurde anschließend mittels Sequenzierung überprüft. Für die Überexpression wurden die Konstrukte pB1-pET21a und pB1-pET19b zunächst mit Elektroporation (II.5.6.2) in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus –RIL (BL21 pRIL) transformiert. Dieser *E. coli* Stamm besitzt ein zusätzliches Plasmid, das für seltene tRNAs codiert und somit auch für die Expression heterologer Gene gut geeignet ist. Die beste Überexpression der Proteine war bei einer Induktionstemperatur von 30°C unter dem Zusatz von 6 % Ethanol bei dreistündiger Inkubation auf dem Schüttler bei 150 rpm zu erreichen. Zuvor wurde eine 200 mL Kultur LB mit einer ÜN-Kultur transformierter *E. coli* BL21-Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 auf dem Schüttler bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach Erreichen der genannten OD wurden die Zellen mit 25 µM IPTG induziert und wie beschrieben unter Zusatz von Ethanol inkubiert. Nach der Induktion wurden die Zellen für 15 min bei 6.000 rpm in GSA-Zentrifugenbechern abzentrifugiert und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Für den Zellaufschluss und die anschließende Aufreinigung wurden die eingefrorenen Zellpellets in 1 mL 1x LEW-Puffer pro 200 mL-Kultur aufgenommen, per Ultraschall (II.6.2.1) oder mit der French Pressure Cell (II.6.2.2) aufgeschlossen und 30 min bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und über eine Protino-Säule gemäß Handbuch (II.6.3.1) aufgereinigt. Zur Kontrolle wurden jeweils 15 µL Eluat mit 5 µL 4x SDS-Probenauftragspuffer vermischt, für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf ein SDS-Gel (II.6.1.2) zur Überprüfung der Proteingröße und Qualität der Aufreinigung aufgetragen. Nach dem Laufenlassen des SDS-Gels wurde dieses mit einer Coomassie-Färbelösung (II.6.1.4) gefärbt, mit H₂O entfärbt und anschließend ausgewertet. Zur Kontrolle auf Vorhandensein des His-tags wurden zusätzlich Western-Blots durchgeführt. Es zeigte sich, dass die

beste Proteinaufreinigung von BpiB01 mit dem in pET21a klonierten *bpiB01*-Gen möglich war (Abbildung 31), das Protein besaß eine Größe von ca. 45 KiloDalton (kDa), was den Berechnungen gemäß der Aminosäureanzahl entsprach.

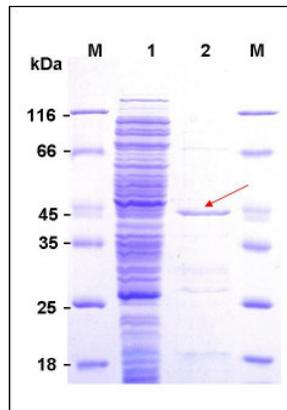


Abbildung 31: Aufreinigung des Proteins BpiB01 mit N-terminalem His-tag. M. Proteinmarker #SM0431 (Fa. Fermentas); 1. Rohextrakt von BpiB01-Kultur; 2. Proteineluat BpiB01. Der rote Pfeil markiert das Protein BpiB01 mit einer Größe von etwa 45 KDa.

6.2 Klonierung Überexpression und Aufreinigung von BpiB04

Für die Klonierung von *bpiB04* aus Bio7 wurden für das pET21a-Konstrukt die Primer B7-NdeI_for und B7_NotI_rev, für das pET19b-Konstrukt die Primer B7-NdeI_for und B7-XhoI_rev eingesetzt (Tabelle 5). In beiden Fällen wurde das blunt end PCR-Produkt in den mit *Sma*I-geschnittenen Vektor pTZ19R-Cm ligiert. Aus diesen Konstrukten wurde das jeweilige Insert dann mit *Nde*I und *Not*I (für pET21a) bzw. mit *Nde*I und *Xho*I (für pET19b) herausgeschnitten und in die mit denselben Restriktionsenzymen verdauten pET-Vektoren ligiert. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung überprüft und anschließend in *E. coli* BL21 pRIL transformiert.

Bei der Überexpression zeigte sich, dass trotz des Einsatzes unterschiedlichster Induktionsbedingungen (Temperaturvariationen von 30 °C bis 19 °C, verschiedene Zusätze wie Ethanol, Glucose und Glycerin einzeln und in Kombination, verschiedene IPTG-Mengen) das Protein zum Großteil in Form von unlöslichen *inclusion bodies* vorlag. Die beste Induktion zur Expression löslichen BpiB04-Proteins unter Verwendung des Konstrukts pB7-pET19b zeigte sich bei einer 30 °C-Vorkultur (VK), dem Animpfen der Hauptkultur mit Zellen dieser ÜN-Kultur auf eine Zelldichte von $OD_{600} = 0,1$, dem Wachstum dieser Kultur bei 20 °C und 150 rpm bis zu $OD_{600} = 0,7$

und anschließender Induktion bei 20°C und 150 rpm für sechs Stunden mit 5 µM IPTG unter Zusatz von 3 % Ethanol, 1 % Glukose und 0,4 % Glycerin. Hierbei zeigte sich im Rohextrakt zwar Aktivität jedoch nur eine sehr geringe Ausbeute bei der Aufreinigung. Daher wurde für die Untersuchung des aufgereinigten Proteins Bpi04-Protein aus *inclusion bodies* gewonnen. Hierfür wurden die Zellen zunächst aufgeschlossen, der dadurch gewonnene Rohextrakt jedoch verworfen und die *inclusion bodies* aus dem erhaltenen Pellet gewonnen. Die Aufreinigung und Rückfaltung von Proteinen aus *inclusion bodies* ist in II.6.3.2. und II.6.3.5 beschrieben. Auf diesem Weg gewonnenes BpiB04-Protein ist in Abbildung 32 zu sehen.

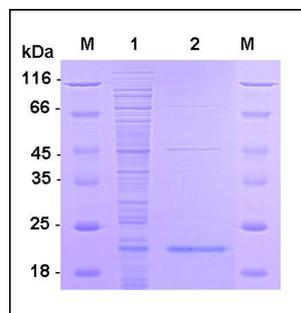


Abbildung 32: Aufreinigung des Proteins BpiB04 mit C-terminalem His-tag. M. Proteinmarker #SM0431 (Fa. Fermentas); **1.** Rohextrakt von BpiB04-Kultur aus inclusion bodies; **2.** Proteineluat BpiB04 aus inclusion bodies. Das Protein BpiB04 ist mit einer Größe von etwa 20 kDa auf dem Gel zu sehen.

Es besitzt eine Größe von ca. 20 kDa, was in etwa der berechneten Größe gemäß der Aminosäureanzahl unter Einbeziehung des His-tags aus dem Konstrukt pB7-pET19b entspricht. Die Aufreinigung erfolgte unter Verwendung von Protino-Säulen der Firma Macherey & Nagel.

6.3 Klonierung, Überexpression und Aufreinigung von BpiB05

BpiB05 wurde ausschließlich in pET21a kloniert. Hierfür wurde das Gen *bpiB05* mit den Primern B8-NdeI_for und B8-NotI_rev aus dem Insert mit Hilfe der KOD-HiFi-DNA-Polymerase per PCR amplifiziert und ebenfalls in den *SmaI*-verdauten Vektor pTZ19R-Cm ligiert. Aus diesem Konstrukt wurde *bpiB05* mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *NotI* herausgeschnitten und in den Vektor pET21a kloniert, der ebenfalls mit *NdeI* und *NotI* geschnitten worden war. Das Konstrukt wurde durch

Sequenzierung überprüft, danach gemäß Protokoll in den *E. coli* Überexpressionsstamm BL21 pRIL transformiert.

Die optimalen Überexpressionsbedingungen für lösliches Protein BpiB05 lagen bei einer Induktion der Hauptkultur für 6 Stunden bei 19°C und 150 rpm unter Einsatz von 25 µM IPTG ohne weitere Zusätze. Die mit pB8-pET21a transformierten *E. coli* BL21 Zellen wurden zuvor bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 bei 37°C und 150 rpm angezogen, bevor die Induktion folgte. Nach der Induktion wurden die Zellen wie in II.6.3.3 beschrieben mit Qiagen-Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Im Gegensatz zu dem Protino-System wird hier bereits während der Aufreinigung Imidazol zugegeben, um unspezifische Bindungen *E. coli* eigener Proteine aus dem Rohextrakt an die Ni-NTA-Matrix, an die der His-tag des überexprimierten Proteins bindet, zu unterbinden.

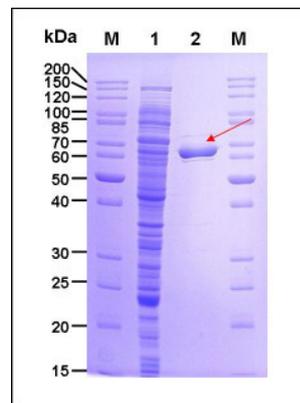


Abbildung 33: Aufreinigung des Proteins BpiB05 mit einem N-terminalem His-tag. M. Proteinmarker #SM0661 (Fa. Fermentas); 1. Rohextrakt von BpiB05-Kultur; 2. Protein-eluat BpiB05. Der rote Pfeil markiert das Protein BpiB05 mit einer Größe von etwa 60 kDa.

Die induzierten Zellen wurden gemäß Protokoll in Qiagen-Lysispuffer (Qiagen-Puffer mit 10 mM Imidazol) resuspendiert und per Ultraschall oder French Pressure Cell aufgeschlossen. Nach der Abzentrifugation der Zelltrümmer wurde der Rohextrakt mit Ni-NTA-Säulenmaterial (1 mL NiNTA-Lösung, entspricht 0,5 mL NiNTA-Säulenmaterial, pro 2 mL Rohextrakt) vermischt und für 1 h auf Eis unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das Rohextrakt-Säulenmaterial-Gemisch auf eine Säule (Ni-NTA-Spin column) aufgetragen und das Protein gemäß Handbuch zunächst gewaschen (Qiagen-Puffer mit 20 mM Imidazol) und anschließend mit steigender Imidazol-Konzentration (Qiagen_Puffer mit 50 mM, 100 mM und 200 mM Imidazol) aufgereinigt. Die Proteineluate wurden gesammelt und anschließend auf ein SDS-

Gel zur Kontrolle aufgetragen. BpiB05 besitzt demnach eine Größe von etwa 60 kDa (Abbildung 33).

6.4 Klonierung Überexpression und Aufreinigung von BpiB09

Das Gen *bpiB09* wurde mit den Primern BCS5-DH_NdeI_for und BCS5-DH_XhoI_rev aus dem Insert Bio5 per PCR amplifiziert. Auch hier erfolgte zunächst eine blunt end Ligation in den mit *SmaI* verdauten Vektor pTZ19R-Cm, das Herausschneiden des Inserts mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* und eine anschließenden Ligation in den mit *NdeI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pET19b. Das entstandene Konstrukt B9-pET19b wurde nach der Überprüfung durch Sequenzierung in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 pRIL transformiert.

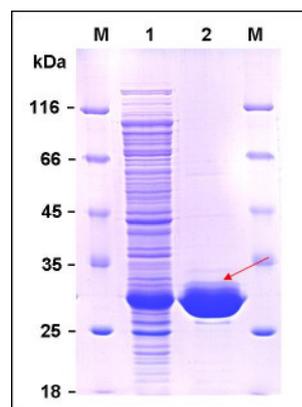


Abbildung 34: Aufreinigung des Proteins BpiB09 mit einem C-terminalem His-tag. M. Proteinmarker #SM0431 (Fa. Fermentas); **1.** Rohextrakt von BpiB09-Kultur; **2.** Proteineluat BpiB09. Der rote Pfeil markiert das Protein BpiB09 mit einer Größe von etwa 28 kDa.

Für die Überexpression wurde eine 200 mL Hauptkultur zunächst mit 2×10^{10} Zellen aus einer ÜN Kultur mit frisch mit pB9-pET19b transformierten *E. coli* BL21 Zellen beimpft, was einer OD_{600} von 0,1 entsprach. Die Zellen wurden bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 inkubiert und anschließend mit 25 μ M IPTG und 6 % Ethanol versetzt. Alternativ war auch die Induktion mit 25 μ M IPTG unter Zusatz von 3% Ethanol, 1% Glucose und 0,4% Glycerin erfolgreich. Es folgte eine dreistündige Induktion bei 30°C und 150 rpm, bevor die Zellen abzentrifugiert und bei -20°C bis zur Weiterverwendung eingefroren wurden. Dann wurden die Zellen wie bereits beschrieben aufgeschlossen und mit dem Protino-Kit aufgereinigt. Die

Überprüfung auf dem SDS-Gel zeigte, dass BpiB09 eine Größe von etwa 28 kDa besitzt (Abbildung 34).

7. Biochemische Charakterisierung der Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09

Nach der Überexpression der Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 wurden diese in Form von Rohextrakten in ihrer Wirksamkeit auf die QS-Systeme von *C. violaceum* (II.11.5.2) und *A. tumefaciens* (II.11.5.1) getestet. Die Rohextrakte wurden verwendet, da die von den aufgereinigten Proteinen benötigten Cofaktoren, die in Form von Metallen vorlagen und bei den aufgereinigten Proteinen zugesetzt werden mussten, die QS-Systeme beider genannten Bakterienstämme in Vortests deutlich inhibiert hatten, sodass nur bei der Verwendung von Rohextrakten reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden konnten.

7.1 Wirkung der Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 auf die Autoinducer-abhängige Violacein-Biosynthese von *C. violaceum*

Es ist bekannt, dass bei dem Bakterium *C. violaceum* die Produktion des violetten Farbstoffes Violacein über Quorum Sensing gesteuert wird. Als AI-1 Signalmolekül fungiert hierbei C₆-HSL (McClellan et al., 1997). Daher wurde die Wirkung der Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 auf dieses System in einem *C. violaceum* Wildtyp-Stamm untersucht.

Hierfür wurden Pellets induzierter Kulturen dieser BpiB-Proteine in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0 oder in 100 mM Tris-Puffer mit pH 7,0 aufgenommen und per Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Rohextrakte direkt weiterverwendet. Hierfür wurden zunächst die Proteinkonzentrationen der Rohextrakte nach Bradford bestimmt und auf eine Proteinkonzentration von 10 µg Protein µL⁻¹ eingestellt. Anschließend wurde LB-Medium mit einer *C. violaceum* ÜN-Kultur einprozentig angeimpft und zu je 50 µL in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Rohextrakte von BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09, sowie der Rohextrakt einer *E. coli* BL21-Kultur mit dem jeweiligen Leervektor wurden als 50 µL Volumen jeweils hinzu pipettiert und mit den *C.*

violaceum-Zellen vermischt. Die Ansätze wurden anschließend ÜN bei 30°C für etwa 16 h inkubiert.

Die Auswertung zeigte, dass alle BpiB-Protein-haltigen Ansätze *C. violaceum* in der Pyocyaninproduktion inhibierten, während die Rohextrakte der Leervektorkontrollen keine Beeinflussung der Violaceinproduktion zeigten (Abbildung 35).

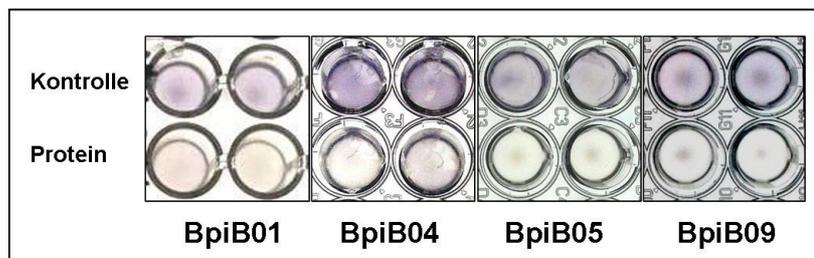


Abbildung 35: Inhibition der Violaceinproduktion bei *C. violaceum* durch die Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 nach Inkubation für 16 h bei 30°C. Während die Kontrollen in Form von Rohextrakten Leervektorhaltiger *E. coli* BL21-Zellen eine dem Wildtyp entsprechende Violacein-Produktion zeigen (obere Reihe), ist die Violacein-Produktion nach dem Zusatz der BpiB-Proteine deutlich inhibiert (untere Reihe).

Das Wachstum des *C. violaceum*-Stammes war ebenfalls nicht beeinträchtigt, so dass davon auszugehen ist, dass die beobachtete Inhibition der Violaceinproduktion auf die Inhibition des QS-Systems von *C. violaceum* durch die Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 zurückzuführen ist.

7.2 ONPG Tests auf AHL-Abbau durch BpiB01, BpiB04 und BpiB05

Der AHL-Reporterstamm *A. tumefaciens* NTL4 wurde bereits zum Screening nach AHL-inaktivierenden Klonen eingesetzt (Diplomarbeit Schipper, 2004). Er zeichnet sich dadurch aus, dass sein QS-System mit den Genen *traI* und *traR* auf Plasmiden lokalisiert ist (Fuqua et al., 1994). Hierbei wurde der *traI*-Promoter mit dem *lacZ*-Gen aus *E. coli* fusioniert, so dass der QS-Aktivität entsprechend β -Galaktosidase produziert wird. β -Galaktosidase ist in der Lage, in wässriger Lösung das Substrat ONPG in einen gelben ebenfalls wasserlöslichen Farbstoff umzusetzen. Die Konzentration dieses gelben Farbstoffes kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt werden.

Als AHL Molekül wurde in diesem Test 3-Oxo-C₈-L-Homoserinlacton (3-OxoC₈-HSL, Fa. Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 6 pM eingesetzt.

Für die ONPG Tests in Flüssigkultur wurden 5 μL einer 10^{-11} M 3-Oxo- C_8 -HSL-Lösung zu 100 μL Rohextrakt ($c = 10 \mu\text{g Protein } \mu\text{L}^{-1}$) pipettiert und bei 30°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung zu 5 mL AT-Medium gegeben, das mit 1×10^7 Zellen mL^{-1} des Reporterstammes *A. tumefaciens* NTL4 beimpft war. Nach 17 h Inkubation bei 30°C wurde 1 mL Zellsuspension mit 20 μL Toluol vermischt und für 3 min mit einem Vortex-Gerät auf höchster Stufe aufgeschlossen. 800 μL dieser Lösung wurden mit 200 μL Z-Puffer (mit 4 mg ONPG mL^{-1}) vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Direkt nach dieser Inkubation wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen. Von der gleichen Kultur war zuvor die Zelldichte durch photometrische Messung bei 600 nm bestimmt worden.

Mit Hilfe dieses Testsystems wurden die Proteine BpiB01, BpiB04 und BpiB05 auf den Abbau von C_8 -HSL untersucht. Als Kontrolle wurde Rohextrakt einer *E. coli* BL21-Leervektorkontrolle verwendet. Um den ONPG-Umsatz der einzelnen Ansätze mit der Zelldichte ins Verhältnis setzen zu können, wurde die gemessenen Werte der ONPG-Messungen (OD_{420}) durch die Zelldichte-Messungen (OD_{600}) geteilt. Der so erhaltene $\text{OD}_{420}/\text{OD}_{600}$ -Wert der Leervektorkontrolle wurde als 100% β -Galaktosidase-Aktivität (entsprechend der QS-Aktivität) gesetzt, die erhaltenen Werte für die Proteine BpiB01, BpiB04 und BpiB05 wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 36).

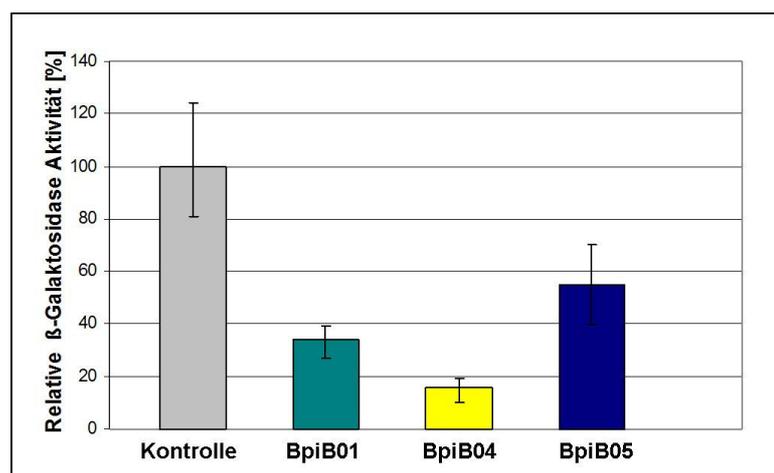


Abbildung 36: Graphik zur AHL Inaktivierung durch die Proteine BpiB01, BpiB04 und BpiB05. die Bestimmung des Maßes der Inaktivierung erfolgte über die β -Galaktosidase-Aktivität bei einer eingesetzten 3-Oxo- C_8 -HSL-Konzentration von 6 pM. 100% β -Galaktosidase-Aktivität entsprechen 100% aktiver AHLs im Testsystem.

In den Tests zeigte sich, dass alle getesteten BpiB-Proteine eine geringere β -Galaktosidase-Aktivität als die Kontrolle zeigten, woraus folgt, dass weniger aktives AHL in der Lösung vorhanden war und demzufolge zuvor von den BpiB-Proteinen abgebaut worden sein musste (Abbildung 36). Den deutlichsten Abbau zeigte das Protein BpiB04 in diesem Test, weniger als 20 % der AHLs waren nach der Inkubation noch nachweisbar, es folgte BpiB01 mit durchschnittlich 34 % und BpiB05 mit etwas über 50 %. Die Zelldichten waren für alle Proben vergleichbar.

8. Aufklärung des Mechanismus von BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 bei der Inaktivierung von AHLs durch HPLC-MS-Analyse

Viele Phänotypen, die durch die BpiB-Proteine inhibiert wurden, Motilität, Pyocyaninbildung und Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* PAO1, Verringerung der aktiven AHLs im ONPG Test unter Zuhilfenahme des AHL-Reporterstammes *A. tumefaciens* NTL4 und Inhibition der Violacein-Produktion bei *C. violaceum* weisen darauf hin, dass die Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 in der Lage sind, AHLs abzubauen. Um die Art der Spaltung bestimmen und nachweisen zu können, wurden diese Proteine mit C₈-HSLs und C₁₂-HSLs als Substrate inkubiert und anschließend HPLC-MS Analysen (high performance liquid chromatography – ESI-mass spectrometry) zum Auffinden möglicher Reaktionsprodukte durchgeführt.

Die HPLC-MS Analysen, die in Zusammenarbeit mit Melanie Quitschau aus der Arbeitsgruppe von S. Grond der Universität Göttingen durchgeführt wurden, ergaben, dass alle getesteten BpiB-Proteine, BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 in der Lage waren, 3-Oxo-C₈-HSL und C₁₂-HSL durch die Spaltung des Lactonringes zu inaktivieren.

Hierfür wurden die Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 mit den Substraten 3-Oxo-C₈-L-Homoserinlacton (3-Oxo-C₈-HSL, $M = 241,21 \text{ g mol}^{-1}$) und C₁₂-DL-Homoserinlacton (C₁₂-HSL, $M = 283,41 \text{ g mol}^{-1}$) inkubiert und die erhaltenen Extrakte mittels HPLC-MS auf ein mögliches Spaltprodukt des jeweiligen Substrats analysiert. Die Detektion der Massen der γ -Hydroxycarbonsäuren 3-Oxo-C₈-HS ($M = 259,21 \text{ g mol}^{-1}$) und C₁₂-HS ($M = 301,41 \text{ g mol}^{-1}$) belegten die QQ-Aktivität der Proteine als Lactonasen.

Für die HPLC-MS Analysen wurden 21 μmol 3-Oxo-C₈-L-HSL bzw. 7,1 μmol C₁₂-DL-HSL (Fa. Sigma-Aldrich) mit den aufgereinigten Proteinen BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 oder deren Rohextrakten ($c = 20 \mu\text{g mL}^{-1}$) in jeweils 1 mL 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) oder 100 mM Tris-Puffer (pH 7,0) vermischt und für 20 h bei 30°C inkubiert. Vor der Zugabe des jeweiligen AHLs wurde bei der Dialyse der Proteine BpiB01, BpiB04 und BpiB09 ZnCl₂, bei BpiB05 CaCl₂ als benötigter Cofaktor in einer Endkonzentration von 2 mM zugefügt. Nach der Inkubation wurden die AHL-Protein-Lösungen mit je 2 bis 2,5 Volumina Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum konzentriert. Die erhaltenen Extrakte wurden dann in 110 μL Methanol aufgenommen und wie in II.7 beschrieben per HPLC-MS analysiert. Als Kontrollen wurden Rohextrakte der Leervektorkontrolle von *E. coli* BL21-Zellen bzw. Eluate aus deren Aufreinigungen, ebenfalls in 1 mL 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) oder 100 mM Tris-Puffer (pH 7,0), mit den gleichen AHL-Mengen inkubiert und anschließend wie bereits beschrieben extrahiert und analysiert.

Die Untersuchungen der Extrakte nach der enzymatischen Spaltung ergaben für jedes der BpiB-Proteine bei der Verwendung des 3-Oxo-C₈-L-Homoserinlactons ein Gemisch aus 3-Oxo-C₈-HSL und einer noch polareren Verbindung mit Retentionszeiten von 8.3 min und 7.4 min. ESI-MS-Analysen der polareren Komponente zeigten Massenpeaks von 260.1 [M+H]⁺, 282.1 [M+Na]⁺ und 540.1 [2M+Na]⁺ (Abbildung 35). Diese Massenzunahme von 18 stimmt mit der Spaltung des Lactonrings von 3-Oxo-C₈-HSL ($M = 241 \text{ g mol}^{-1}$) überein, bei der die γ -Hydroxycarbonsäuren 3-Oxo-C₈-HS ($M = 259.21 \text{ g mol}^{-1}$) erhalten wird. Das Substrat 3-Oxo-C₈-HSL wurde in der ESI-MS mit Massen von 242.1 [M+H]⁺ und 264.1 [M+Na]⁺ detektiert. (Abbildung 37). Tandem MS des Massenpeaks 260.1 [M+H]⁺ zeigte die charakteristischen Tochterionen von 242 und 102 des Reaktionsprodukts 3-Oxo-C₈-HS ($M = 259.21 \text{ g/mol}$) (Abbildung 39). Zusätzlich bestätigte die aus der HRMS des [M+H]⁺-Ion bei m/z von 260.1 erhaltene Summenformel C₁₂H₂₁NO₅ die γ -Hydroxycarbonsäure 3-Oxo-C₈-HS.

Zur weiteren Verifizierung der Lactonase-Aktivität wurde das 3-Oxo-C₈-L-Homoserinlacton unvollständig und vollständig alkalisch hydrolysiert. Hierzu wurde das 3-Oxo-C₈-L-Homoserinlacton in DMSO gelöst und mit 1 N NaOH für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die vollständige Hydrolyse erfolgte mit 1 N NaOH in

Dioxan für 24 h bei Raumtemperatur. HPLC-MS-Analysen zeigten, dass sowohl die Retentionszeiten als auch die Massenspektren des synthetischen Reaktionsprodukts mit denen des enzymatischen Spaltprodukts übereinstimmten. (Abbildung 37 und 38). Die Analyse der Kontrollen, in denen 3-Oxo-C₈-HSL mit Rohextrakten bzw. Eluaten der Leervektorkontrollen von *E. coli* BL21 inkubiert worden waren, ergaben hingegen keine signifikanten Massenpeaks der γ -Hydroxycarbonsäure 3-Oxo-C₈-HS (Abbildung 37 C), so dass eine unspezifische Spaltung *E. coli* eigene Proteine bei den stattgefundenen Analysen der BpiB-Proben ausgeschlossen werden kann.

Übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Retentionszeiten und Massenspektren des synthetischen Reaktionsprodukts mit denen des enzymatischen Spaltprodukts zeigten auch die HPLC-MS Analysen der mit BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 inkubierten C₁₂-HSL-Ansätze. Zur Überprüfung der Retentionszeiten und Massenaddukte wurde C₁₂-DL-Homoserinlacton vollständig in Dioxan mit 1 N NaOH für 24 h bei Raumtemperatur hydrolysiert. Die Massenspektren des synthetischen und enzymatischen Spaltprodukts wiesen Massen von 284 [M-H₂O+H]⁺, 302 [M+H]⁺, 324 [M+Na]⁺ und 625 [2M+Na]⁺ bei einer Retentionszeit von 17.3 min auf (Abbildung D Anhang). In den Negativkontrollen mit Rohextrakten bzw. Eluaten von *E. coli* BL21-Leervektorkontrollen wurden diese Massenaddukte hingegen nicht in signifikanten Mengen detektiert.

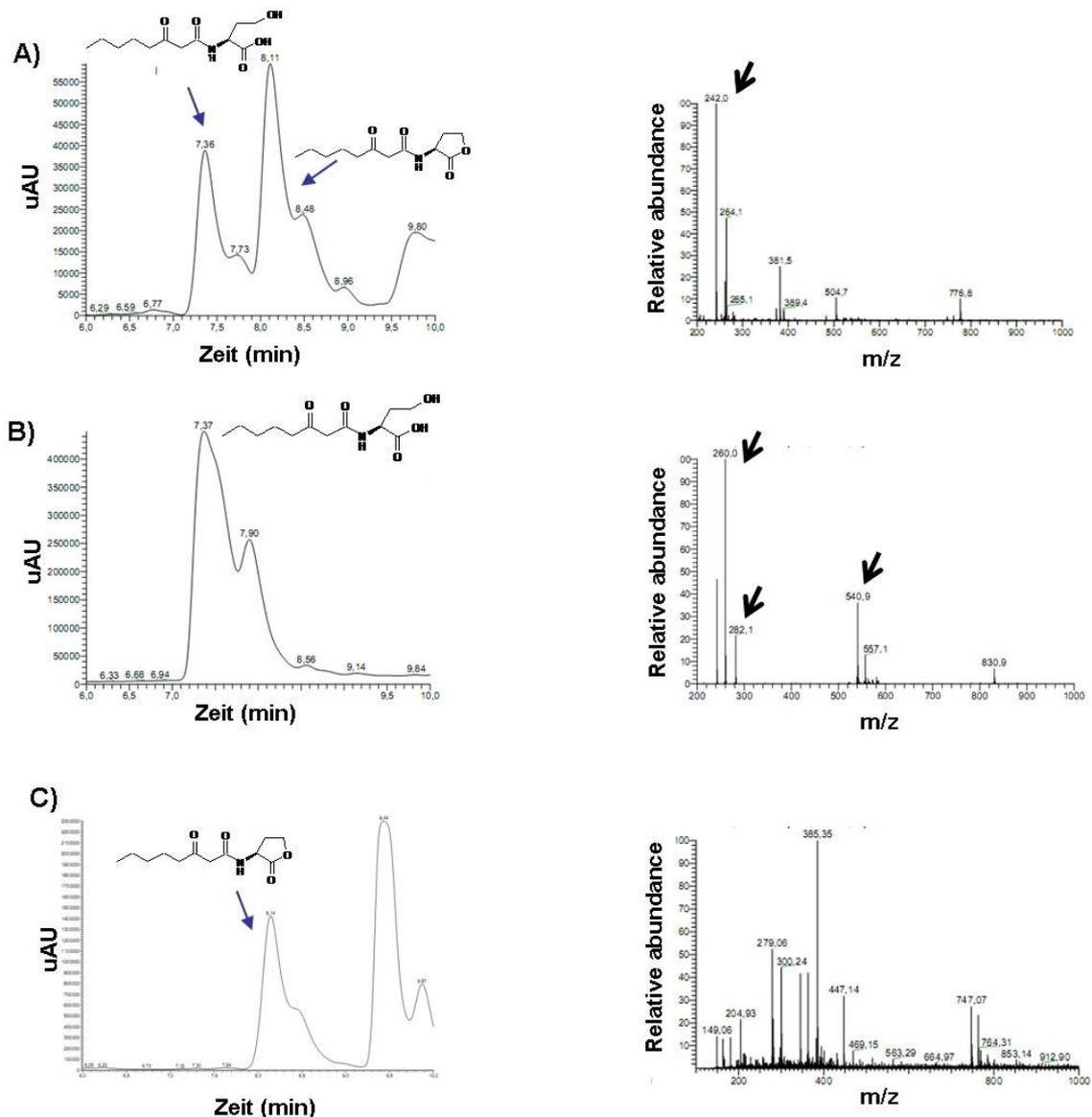


Abbildung 37: HPLC-MS-Analyse der alkalischen Hydrolyse und der Negativkontrolle für die Spaltung von 3-Oxo-C₈-HSL. **A:** HPLC-UV-Chromatogramm der unvollständigen Hydrolyse von 3-Oxo-C₈-HSL bei 252 nm zeigt das Spaltprodukt mit dem geöffneten Lactonring (7,36 min) und das Substrat 3-Oxo-C₈-HSL (8,25 min) (linke Spalte). Das Massenspektrum des Substrats wurde [M+H]⁺-Ion bei m/z 242 detektiert (schwarzer Pfeil) (rechte Spalte). **B** links: UV-Chromatogramm des Spaltprodukts nach vollständiger Hydrolyse bei 252 nm mit dem geöffneten Lactonring (7,36 min). Das Massenspektrum des Spaltprodukts zeigt die Massen-Addukte: [M+H]⁺-Ion bei m/z 260,1, [M+Na]⁺-Ion bei m/z 282,1 und [2M+Na]⁺-Ion bei m/z 540,1 (schwarzer Pfeil) (rechte Spalte). **C:** HPLC-UV Chromatogramm der Kontrolle des Leervektor-Rohextrakts bei 252 nm weist nur das Substrat auf (7,3 min) (linke Spalte). Es wurden keine signifikanten Mengen des Spaltprodukts mit dem geöffneten Lactonringes detektiert (rechte Spalte).

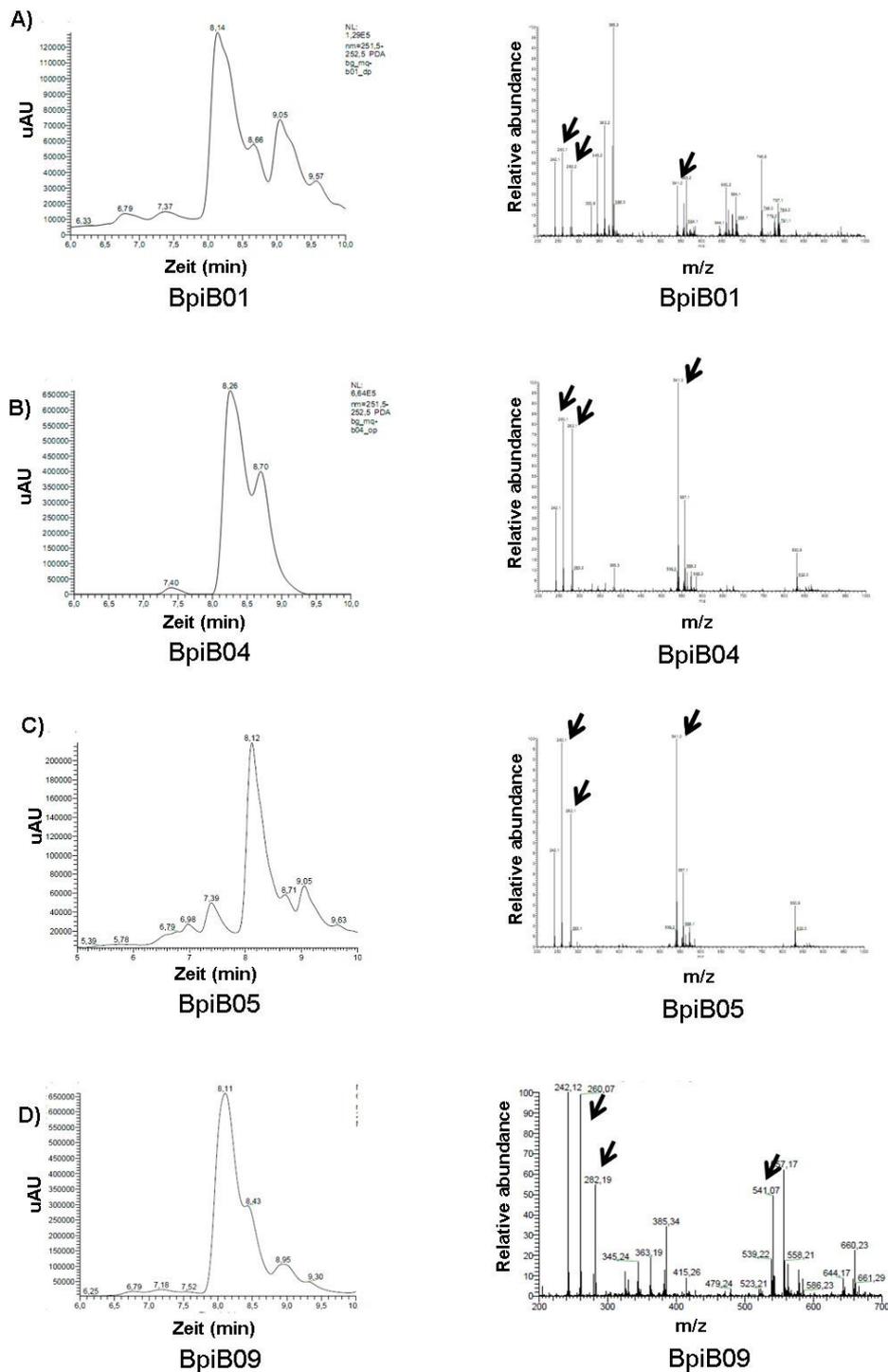


Abbildung 38: HPLC-MS-Profile der Spaltung von 3-Oxo-C₈-HSL durch BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09. Nach der Inkubation von 3-Oxo-C₈-HSL mit den einzelnen rekombinaten BpiB-Proteinen war für alle Proben Spaltprodukt im HPLC-UV Chromatogramm bei einer mit der chemischen Verseifung übereinstimmenden Retentionszeit von 7,3 min zu finden (linke Spalte), im Massenspektrum konnten ebenfalls übereinstimmend mit der chemischen Verseifung Produktmassen des gespaltenen Lactonrings bei m/z 260, 282 und 541 detektiert werden.

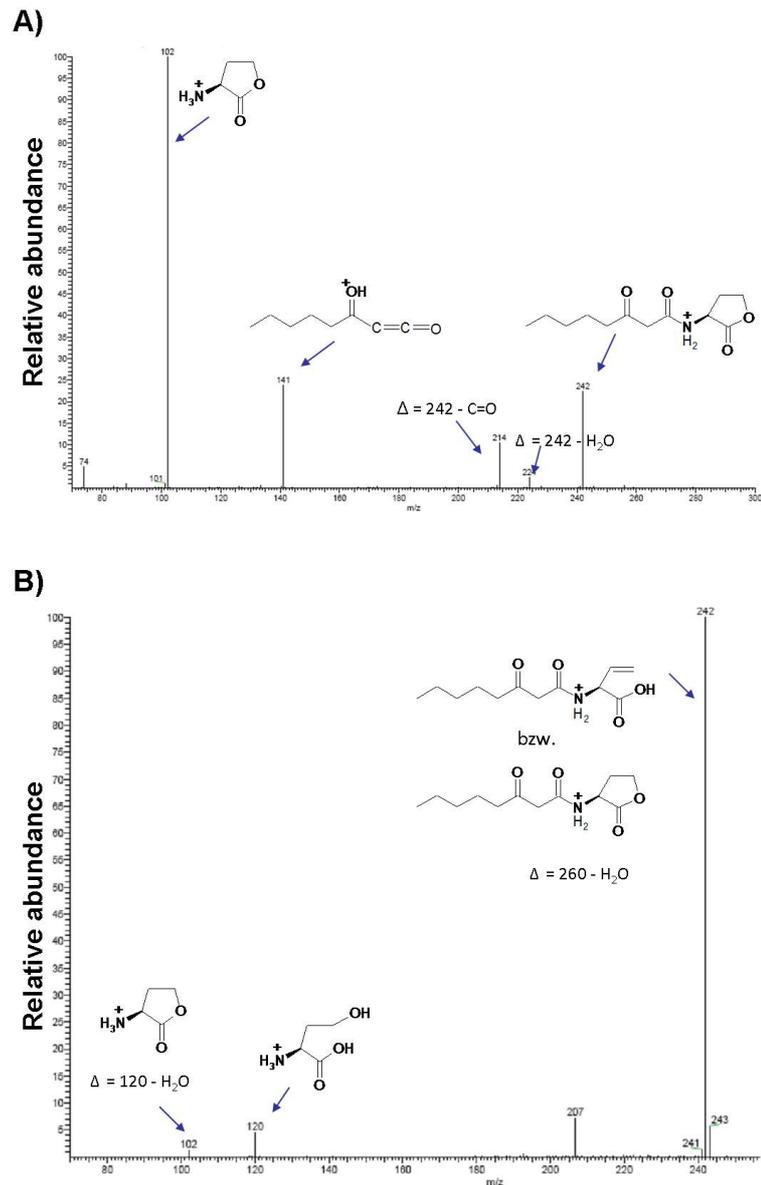


Abbildung 39: HPLC-Tandem Massenspektrometrie Profil von A) dem ungespaltenen Substrat 3-Oxo-C₈-HSL und B) N-(3-Oxo-C₈)-L-Homoserin mit dem geöffneten Lactonring nach Inkubation mit BpiB04. Die charakteristischen Fragmente sind jeweils mit Pfeilen gekennzeichnet. A) Tandem Massenspektrometrie des ungespaltenen Substrats 3-Oxo-C₈-HSL bei mit einem Molekulargewicht von 242 g/mol. Die Analyse zeigt die charakteristischen Fragmente bei 224 (Substrat nach Eliminierung von H₂O), 214 (Substrat ohne C=O-Gruppe), 141 (Acyl-Kette) und 102 (Lactonring). B) Tandem Massenspektrometrie des Spaltproduktes N-(3-Oxo-C₈)-L-Homoserin mit einem Molekulargewicht von 260 g mol⁻¹. Die Analyse zeigt die charakteristischen Fragmente von 242 (Produkt nach der Eliminierung von H₂O) und von 120, welches aus dem N-(3-Oxo-C₈)-L-Homoserin mit dem geöffneten Lactonring entstanden ist und in Abbildung A) nicht detektiert wurde. Somit stellt das Fragment von 120 g mol⁻¹ den ultimativen Beweis für den gespaltenen Lactonring dar.

9. Aufklärung der Wirkung von BpiB01 und BpiB04 auf AI-2 bei *E. coli*

Wie bereits in III.3 beschrieben, wird durch die in den Konstrukten pB1H1-pSK⁺, pB4-pSK⁺, pB7mS-pSK⁺, pB8H10-pSK⁺, pORF5-pSK⁺ und pORF1-pSK⁺ enthaltenen *bpiB*-Gene *bpiB01*, *bpiB02*, *bpiB03*, *bpiB04*, *bpiB05*, *bpiB06* und *bpiB07* Schwärmen in *E. coli* XL1 blue inhibiert. Schwärmen wird in *E. coli* über ein AI-2 QS-System gesteuert. In Zusammenarbeit mit Nancy Weiland aus der Arbeitsgruppe von R. Schmitz-Streit der Universität Kiel wurden die Rohextrakte von BpiB01 und BpiB04 positiv auf den Abbau von MHF, welches bei *E. coli* als AI-2 Molekül fungiert, getestet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die BpiB-Proteine möglicherweise auch in der Lage sind, MHF abzubauen und auf diesem Wege Schwärmen zu inhibieren. MHF kann technisch nicht über HPLC-MS analysiert werden, daher wären zur genauen Analyse des Spaltmechanismus von MHF NMR Analysen notwendig, die hohe Substrat und Proteinmengen erfordern.

Erste Tests von BpiB01 und BpiB05 mit MHF im NMR (durchgeführt von Manfred Zähres aus der Arbeitsgruppe von Prof. C. Mayer der Universität Duisburg-Essen) zeigten einen leichten Abbau von MHF (10% von 1,5 mg MHF mit BpiB01 bzw. 7% von 2,5 mg MHF mit BpiB05 nach 24 h Inkubation bei 30°C). Zur Entschlüsselung des Spaltmechanismus wären jedoch höhere Umsatzmengen und mehr Protein notwendig. Eine Erhöhung der Substratmenge zeigte jedoch keine Verbesserung des Umsatzes, vielmehr ging dieser zurück, was darauf hindeutet, dass hohe Substratkonzentrationen toxisch auf das Protein wirkten. Daher kann an dieser Stelle keine Aussage über mögliche Inaktivierungsmechanismen von MHF durch die BpiB-Proteine getroffen werden.

IV. Diskussion

Quorum Sensing ist in den letzten Jahren immer mehr in den Focus gerückt, seitdem sich gezeigt hat, dass viele klinisch relevanten bakteriellen Phänotypen wie Biofilmbildung und damit verbundene erhöhte Resistenzen und Komplikationen, wie beispielsweise bei *P. aeruginosa* in Verbindung mit Cystischer Fibrose (Winstanley und Fothergill, 2008), über Quorum Sensing gesteuert werden. Unter anderem aus diesem Grund wird das Quorum-Sensing-System von *P. aeruginosa* als neuer Angriffspunkt für die Therapie bei CF-Patienten betrachtet (Hoiby, 2002). Im Mausmodell zeigten sich bereits erste Erfolge. Durch den Einsatz halogenierter Furanone, welche bekanntermaßen als Anti-Quorum-Sensing-Moleküle fungieren (Rasmussen et al., 2000; Ren et al., 2001; 2002; Hentzer et al., 2002; Manefield et al., 2001), konnten die Symptome von Mukoviszidose durch Verhinderung der Biofilmbildung gemildert werden (Wu et al., 2004).

Aber auch in anderen klinischen Bereichen wie der Besiedlung von Kathetern (Nodaira et al., 2008, Troidle und Finkelstein, 2008, Stickler, 2008) und in der Papier- und Lebensmittelindustrie (Peltola et al., 2008, Kvist et al., 2008) stellen Biofilme ein Problem dar und werden dort bereits mit diversen antimikrobiellen Agenzien bekämpft.

Metagenomik bietet die Möglichkeit, durch die direkte Isolierung von Umwelt-DNA und deren Transfer in heterologe Wirte in Form von Genbanken Ressourcen zu erschließen, die durch die Analyse von Reinkulturen nicht erfasst werden können. Damit kann unabhängig von der Kultivierbarkeit eines Organismus dessen genetisches Potential erschlossen werden und die bakterielle Diversität eines gesamten Standortes erfasst werden (Handelsman, 2004). Auf diesem Wege kann die Metagenomik als nahezu unerschöpfliche Quelle für das Screening nach neuen Enzymen und anderen bakteriellen Molekülen gesehen werden (Steele und Streit, 2005). Dies beruht darauf, dass nur etwa 1 % aller Mikroorganismen mit bekannten Methoden kultivierbar sind (Torsvik and Øvreas, 2002) und somit die Analyse von Reinkulturen zum Screening nach neuen Enzymen nur einen Bruchteil des tatsächlich vorhandenen Potentials umfasst.

Viele bisher bekannte Quorum Sensing inhibierende Proteine stammen aus der Analyse von Reinkulturen, es sind nur wenige bekannt, die auf metagenomischen Studien beruhen (Riaz et al., 2008, Williamson et al., 2005). Dabei ist nicht bekannt, ob diese in der Lage sind, Biofilmen bzw. deren Bildung zu inhibieren. Insofern stellt

die hier präsentierte Arbeit die erste Studie dar, in der Biofilmbildung neben anderen QS gesteuerten Phänotypen durch den Einsatz metagenomischer Proteine, die sich zudem von allen bisher bekannten QQ-Enzymen unterscheiden, deutlich inhibiert wurde und demonstriert damit die vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten der Metagenomik.

1. Sequenzanalyse der Klone Bio1-9

Insgesamt wurden in dieser Arbeit neun Fosmid-Klone näher auf ihre QQ-Wirkung untersucht. Keiner der gefundenen Klone Bio1-9 detektierten ORFs wies, trotz nachgewiesener Quorum Quenching Aktivität mit dem AHL-Reporterstamm *E. coli* NW-AHL-1 und dem Nachweis des Abbaus von 3-Oxo-C₁₂-HSL durch den QS-Reporterstamm *A. tumefaciens* NTL4, Ähnlichkeiten mit bereits untersuchten QQ-Enzymen auf.

Auf dem Insert von Bio1 kam nur das später auch als AHL-Lactonase verifizierte Gen *bpiB01* als QQ-Gen in Frage. Es zeigte die größte Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* auf, zeigt jedoch keine konservierten Domänen. Ein Abgleich mit der RCBS-Datenbank zeigte eine Schwache Ähnlichkeit von *bpiB01* zu einer Hydrolase, jedoch zu keiner bekannten katalytischen Domäne (Abbildung A Anhang).

Dafür weist es am Beginn seiner Aminosäure-Sequenz (AS 1-26) ein Sekretionssignal auf, was auf eine ursprüngliche Funktion als sekretiertes Protein hinweist. Interessanterweise weisen keine anderen beschriebenen AHL-Lactonasen in ihrer Sequenz eine solche Sekretionssignatur auf, die Überprüfung der AS-Sequenzen der AHL-Lactonasen *aiiA*, *attM*, *qsdA*, *qlcA*, *ahID* und *ahIK* fiel negativ aus. Im Gegensatz dazu zeigt die AS-Sequenz der AHL-Acylase *aiiD* ebenfalls am Beginn der Sequenz eine Sekretionssignatur. Demnach handelt es sich bei *BpiB01* um das einzige bisher beschriebene Protein mit AHL-Lactonase-Aktivität, das eine Sekretionssequenz beinhaltet.

Den fünf ORFs aus Bio2 konnte ebenfalls nach dem Sequenzabgleich keine Ähnlichkeiten zu bekannten QQ-Enzymen zugewiesen werden. Zwei ORFs des Klons Bio2 weisen Übereinstimmungen mit Proteinen auf, die in den Eisentransport involviert sind. Die Interaktion zwischen Eisen-Transport und Quorum Sensing wurde

bereits beschrieben (Bollinger et al., 2001). So kann die Präsenz eines heterologen Eisentransporters den Eisentransport unterbrechen und dadurch Stress in der Zelle verursachen, die daraufhin ihr Quorum Sensing einstellt. Da aber kein Protein aus Bio2 näher untersucht wurde, kann an dieser Stelle keine definitive Aussage darüber getroffen werden, welcher ORF auf Bio2 nun tatsächlich die QQ-Aktivität bedingt.

Der auf dem Insert von Bio3 befindliche 385 AS große ORF *hypB1* zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem YmAE-Protein aus *Verrucomicrobium spinosum*. YmAE gehört zu der Familie der Zink-abhängigen Hydrolasen, auch *hypB1* weist die konservierte Domäne dieser Metallo- β -Lactamase-Superfamilie auf. Das charakteristische AS-Motiv für die Zink-Bindestelle, HXHX~DH, ist jedoch nur teilweise bei HypB1 vorhanden, der letzte ~DH-Rest fehlt (Abbildung C Anhang).

Da *hypB1* zu der Metallo- β -Lactamase-Superfamilie gehört, zu der ebenfalls die meisten bisher beschriebenen AHL-Lactonasen gehören (Liu et al., 2007), ist davon auszugehen, dass dieser ORF für die QQ-Aktivität von Bio3 verantwortlich ist, möglicherweise durch Spaltung des Lactonringes der AHL-Moleküle. Als letztendlicher Beweis wären allerdings weitergehende Untersuchungen wie heterologe Überexpression und ein Nachweis des Spaltmechanismus mit HPLC-MS-Analyse notwendig.

Das Insert Bio4 enthält von allen in dieser Arbeit untersuchten Inserts die ORFs mit dem geringsten Übereinstimmungsgrad zu bereits bekannten Sequenzen. Keiner der relativ kleinen ORFs mit einer Größe zwischen 132 und 39 AS besitzt Übereinstimmungen mit konservierten Domänen aus der NCBI-Datenbank. Abgleiche der Sequenzen der einzelnen ORFs mit der RCBS-Datenbank zeigten bei den ORFs zwar zum Teil geringfügige Übereinstimmungen mit Transferasen bzw. Oxidoreduktasen, katalytische Domänen waren jedoch nicht betroffen. Daher lässt sich anhand der Sequenz der ORFs auf Bio4 kein möglicher QQ-Wirkmechanismus ableiten.

Das Insert Bio5 besitzt insgesamt fünf ORFs, von denen sich *bpiB09* in weiterführenden Untersuchungen als QQ-ORF herausstellte. Dieser ORF besitzt bei einer Größe von 239 AS die größte Übereinstimmung mit einer putativen Kurz-Ketten Dehydrogenase aus *Acidobacterium Ellin34*. *BpiB09* besitzt zudem die konservierte Domäne der Kurz-Ketten Dehydrogenasen, auch die für den katalytischen

Mechanismus notwendigen Aminosäuren Lysin und Tyrosin im aktiven Zentrum (Abbildung B Anhang). Die Kurz-Ketten Dehydrogenase/Reduktase-Familie (SDR-Familie) besteht aus einer großen Familie von NAD(P)(H)-abhängigen Oxidoreduktasen. Diese weisen gleiche Sequenzmotive, so auch im aktiven Zentrum, auf, und zeigen ähnliche Mechanismen. SDR-Enzyme spielen unter anderem eine wichtige Rolle im Lipid-, Aminosäure-, Kofaktor- und Hormonmetabolismus, ebenso in Redox-Sensor-Mechanismen. Die enzymatischen Aktivitäten erstrecken sich über Aktivitäten als Oxidoreduktase über Epimerase-Aktivitäten bis hin zu Lyase-Aktivität (Kavanagh et al., 2008, Jörnvall et al., 1995). Oxidoreduktasen wurden auch bereits als Enzyme mit QQ-Aktivität beschrieben (Uroz et al., 2005).

Das Insert Bio6 besitzt zwei ORFs, die möglicherweise für die QQ-Aktivität verantwortlich sind. So weist der 685 AS große ORF *ord01* zwei konservierte Domänen aus der Aldo/Keto-Reduktase-Familie auf, zu der auch Oxidoreduktasen gehören. Der ORF *pep01* zeigt hohe Übereinstimmungen mit einer Peptidase und weist zwei konservierte Domänen auf, zum einen die konservierte Domäne der Esterase-Lipase-Superfamilie, die carbizyklische Ester aufspalten, zum anderen die konservierte Domäne der DAP2-Superfamilie. Sie umfasst Dipeptidyl-Amino-peptidasen/Acylaminoacyl-Peptidasen, welche im Aminosäuretransport und Aminosäure-Metabolismus agieren. Möglicherweise ist *pep01* in der Lage, als Peptidase die Peptidbindung der AHLs zu spalten. *Ord01* ist möglicherweise in Form einer Oxidoreduktase als QQ-Enzym aktiv. In beiden Fällen wären weiterführende Untersuchungen als zum Nachweis des QQ-Mechanismus notwendig.

Auf dem Insert Bio7 wurde bereits zuvor der ORF *bpiB04* als verantwortlicher QQ-ORF identifiziert und in dieser Arbeit schließlich verifiziert. Bei dem ORF *bpiB04* handelt es sich um einen sehr kleinen ORF von nur 135 AS Größe. Die Überprüfung der Sequenz lieferte jedoch keinerlei Hinweise auf eine mögliche Zugehörigkeit zu bereits bekannten Proteinfamilien, was den Schluss zulässt, dass es sich um ein Mitglied einer bisher nicht bekannten und beschriebenen Enzymfamilie handeln muss.

Auf dem Insert von Bio8 wurde in dieser Arbeit *bpiB05* als ORF mit QQ-Aktivität identifiziert. *BpiB05* weist bei einer Größe von 587 AS die höchste Ähnlichkeit zu

einem hypothetischen Protein aus *Bacteroides fragilis* auf und besitzt als konservierte Domäne einen Ausschnitt aus der konservierten Domäne der thrS-Superfamilie. Diese Aminoacyl-tRNA Synthetasen verbinden AS mit einer von zwei terminalen Hydroxyl-Gruppen ihrer zugehörigen tRNAs und tragen dadurch zu einer problemlosen Proteinsynthese bei (Minajigi und Francklyn, 2008). Quorum Quenching Aktivität wurde für diese Familie jedoch nicht beschrieben. Im Weiteren weist *bpiB05* jedoch auch eine schwache Ähnlichkeit zu einer Hydrolase auf. Innerhalb dieser Sequenzähnlichkeit konnten insgesamt zwei Calciumbindestellen dieser Hydrolase, einer Neopullulanase, detektiert werden, jedoch nicht deren aktives Zentrum.

Die Neopullulanase gehört zur Familie der α -Amylasen und katalysiert sowohl die Hydrolyse als auch Transglycosylierung von α -1,4- und α -1,6-glucosidischen Bindungen (Kuriki und Imanaka, 1999).

Insgesamt konnte jedoch auch hier die Sequenzanalyse keine Aufschlüsse über die Proteinfunktionalität herleiten, lediglich das Vorhandensein von Calciumbindestellen konnte gezeigt werden.

Bei dem Insert des Klons Bio9 wurden die ORFs *bpiB06* und *bpiB07* als verantwortliche QQ-ORFs in dieser Arbeit identifiziert. Hierbei ließ *bpiB07* als einziger QQ-ORF eine Schlussfolgerung seiner Funktion durch die Sequenzüberprüfung zu. *BpiB07* besitzt eine konservierte Domäne der Esterase-Lipase-Superfamilie und relativ große Ähnlichkeiten zu einer Dienlacton-Hydrolase in ihrer Gesamtheit (1-215/220 AS). Somit legt die Sequenzanalyse nahe, dass *BpiB07* in der Lage ist, AHLs durch die Spaltung des Lactonringes zu inaktivieren. Dies konnte experimentell verifiziert werden (Schipper et al., 2009).

BpiB06 zeigte die beste Übereinstimmung mit einem Histidin-Triaden-Protein, als konservierte Domänen wurde ein Ausschnitt der konservierten Domäne der AHS1-Superfamilie festgestellt. Diese stellt die erste Untereinheit des Enzyms Allophanat-Hydrolase dar. Somit kann auch bei *BpiB06* davon ausgegangen werden, dass die QQ-Aktivität auf hydrolytischer Aktivität beruht. Genaue Schlüsse lässt jedoch auch hier die Sequenzanalyse nicht zu.

In Tabelle 11 sind die potentiellen und verifizierten QQ-ORFs der Klone Bio1-Bio9 im Überblick zusammengefasst.

Tabelle 11: Potentielle und verifizierte QQ-ORFs der Klone Bio1-9.

Klon	ORF	Höchste Ähnlichkeit	Konservierte Domänen	Domäne-Familie (SF)	Experimentell verifizierter AHL-Spaltungsmechanismus
Bio1	<i>bpiB01</i>	Hypothetisches Protein	-	-	Lactonring
Bio3	<i>hypB1</i>	YmAE	+	Metallo- β -Lactamase-SF	-
Bio4	<i>bpiB02</i>	Hypoth. Protein	-	-	-
	<i>bpiB03</i>	Protein-Kinase-Familie-Protein	-	-	-
	<i>orf06</i>	2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase	-	-	-
Bio5	<i>bpiB09</i>	Kurzketten-Dehydrogenase	+	Kurzketten-Dehydrogenase/Reduktase-SF	Lactonring
Bio6	<i>ord01</i>	Aldo/Keto-Reduktase	+	Aldo/Keto-Reduktase-SF	-
	<i>pep01</i>	Peptidase	+	Esterase-Lipase SF, DAP2-SF	-
Bio7	<i>bpiB04</i>	Hypoth. Protein	-	-	Lactonring
Bio8	<i>bpiB05</i>	Hypoth. Protein	-	thrS-SF	Lactonring
Bio9	<i>bpiB06</i>	Histidin-Triaden Protein	+	AHS1-SF	-
	<i>bpiB07</i>	Dienlacton-Hydrolase	+	Esterase-Lipase-SF	Lactonring

2. Identifizierung der QQ-ORFs von Bio4 durch Subklonierung

Von dem Insert in Klon Bio4 waren in Vorarbeiten bereits die ORFs *bpiB02* und *bpiB03* als potentielle QQ-ORFs identifiziert worden (Diplomarbeit Schipper, 2004). Ihr Ausschalten durch Transposonmutagenese bedingte unter anderem, dass das Schwärmen in *E. coli* XL1 blue nach Transposoninsertion nicht mehr inhibiert wurde (Abbildung 25 H). Bei der Subklonierung zeigte sich jedoch, dass auch der ORF *orf06* für diesen Phänotyp mit verantwortlich war, da nur das gesamte Insert Bio4 das Schwärmen inhibierte, jedoch keine subklonierten Fragmente, bei dem *orf06* fehlte. Der ORF *orf06* zeigte zwar keine Ähnlichkeiten zu bekannten AHL-spaltenden

Enzymen, jedoch größere Übereinstimmungen mit den ORFs *bpiB02* und *bpiB03* in der tBlastX-Analyse. Auch *bpiB02* und *bpiB03* weisen keine Ähnlichkeiten zu bekannten QQ-Enzymen auf, die Ähnlichkeiten der Sequenzen von *bpiB02*, *bpiB03* und *orf06* lassen aber die Vermutung zu, dass diese drei ORFs miteinander in Verbindung stehen und in ihrer Gesamtheit mit dem anderen auf dem Insert Bio4 befindlichen ORFs ein Operon bilden, das nur in seiner Gesamtheit QQ-Aktivität zeigen kann.

3. Identifizierung der Spaltungsmechanismen von BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 durch HPLC-MS

Die HPLC-MS-Analysen von 3-Oxo-C₈-HSL und C₁₂-HSL mit den rekombinanten Proteinen BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 zeigten, dass alle getesteten Proteine in der Lage sind, AHL-Moleküle mit unterschiedlich langen Seitenketten und unabhängig von der Existenz einer 3-Oxo-Gruppe zu spalten. Als Spaltmechanismus stellte sich für alle Proteine der Mechanismus der Lactonringspaltung heraus. Dies bedeutet, dass es sich bei den Proteinen BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 um prinzipiell neue Enzyme mit AHL-Lactonase-Aktivität handelt. Diese Erkenntnisse bestätigen die ONPG-Tests mit den Proteinen BpiB01, BpiB04 und BpiB05, bei denen der Abbau von 3-Oxo-C₈-HSL indirekt nachgewiesen werden konnte.

Bis auf *qsdA* (Uroz et al., 2008) und die humanen Paraoxanasen (PON1-3) (Draganov et al., 2005) gehören alle bisher beschriebene AHL-Lactonasen der Familie der Metallo- β -Lactamasen an und besitzen als charakteristisches Merkmal das konservierte Motiv der Zinkbindestelle, HXHX~DH. Dieses konservierte Motiv konnte bei keinem der hier analysierten BpiB-Proteine gefunden werden, es bestehen jedoch auch keine strukturellen Ähnlichkeiten zu den PON-Enzymen oder dem erst kürzlich detektierten QsdA-Enzym. Somit handelt es sich bei den Proteinen BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 um bisher unbekannte und noch nicht beschriebene AHL-Lactonasen, die keinem bekannten Cluster angehören.

Bereits bekannte und funktionell verifizierte Enzyme mit AHL-Lactonase-Aktivität sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Während BpiB01, BpiB04 und BpiB09 als Zink-abhängige Lactonasen identifiziert werden konnten, wobei BpiB09 auch unter Calciumzugabe QQ-Aktivität zeigte, war bei BpiB05 QQ-Aktivität bei der Verwendung aufgereinigten BpiB05-Proteins nur

unter der Zugabe von Calcium nachweisbar. Somit ist BpiB05 neben den PONS das einzige bisher beschriebene AHL-Lactonase-Enzym, das Calcium anstelle von Zink als Cofaktor benötigt.

Tabelle 12: Bekannte und funktionell verifizierte AHL-Lactonasen

Cluster	Quelle, Gen-Bezeichnung	Referenz	Kofaktor / Motiv
<i>aiiA</i>	<i>Bacillus sp.</i> 240B1, <i>aiiA</i>	(Dong et al., 2000)	Zn ²⁺
	<i>B. thuringiensis</i> , <i>aiiA</i>	(Dong et al., 2002 ; Lee et al., 2002; Kim et al., 2005; Thomas et al., 2005)	Zn ²⁺
	<i>B. cereus</i> , <i>aiiA</i>	(Dong et al., 2002; Reimann et al., 2002)	Zn ²⁺
	<i>B. mycoides</i> , <i>aiiA</i>	(Dong et al, 2002)	Zn ²⁺
<i>attM</i>	<i>B. anthracis</i> , <i>aiiA</i>	(Ulrich, 2004)	Zn ²⁺
	<i>Arthrobacter sp.</i> IBN110, <i>ahID</i>	(Park et al., 2003)	Zn ²⁺
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>ahIK</i>	(Park et al., 2003)	Zn ²⁺
<i>qsda</i>	<i>A. tumefaciens</i> , <i>attM</i> , <i>aiiB</i>	(Carlier et al., 2003; Liu et al., 2007)	Zn ²⁺
	Metagenom, <i>qlcA</i>	(Riaz et al., 2008)	Zn ²⁺
<i>PON1 - PON3</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>qsda</i>	(Uroz et al., 2008)	Zn ²⁺
<i>bpiB01</i>	Mensch	(Ozer et al., 2005)	Ca ²⁺
<i>bpiB04</i>	Metagenom, <i>bpiB01</i>	(Schipper et al., 2009a)	Zn ²⁺
<i>bpiB07</i>	Metagenom, <i>bpiB04</i>	(Schipper et al., 2009a)	Zn ²⁺
<i>bpiB05</i>	Metagenom, <i>bpiB07</i>	(Schipper et al., 2009a)	Zn ²⁺
<i>bpiB09</i>	Metagenom, <i>bpiB05</i>	(Schipper et al., 2009b)	Ca ²⁺
	Metagenom, <i>bpiB09</i>	diese Arbeit	Zn ²⁺ , Ca ²⁺

Überraschend ist, dass BpiB09 Lactonase-Aktivität zeigte, da aufgrund seiner AS-Sequenz eher eine Oxidoreduktase-Aktivität zu vermuten gewesen wäre. Die Aktivität von BpiB09 war deutlich geringer als die der anderen BpiB-Proteine, was aber auch daran liegen kann, dass BpiB09 bei neutralem pH keine optimale Aktivität aufweist, oder dass kein NADP bzw. NADPH zugesetzt wurde, welches bei den Proteinen, deren katalytische Domäne BpiB09 aufweist, zur Aktivität notwendig ist. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob unter veränderten Inkubations-

bedingungen bzw. unter dem Einsatz von NADP bzw. NADPH eine Verbesserung der Aktivität zu erreichen ist.

4. Inhibition QS gesteuerter Phänotypen von *P. aeruginosa* PAO1

Quorum Sensing kontrolliert bei Bakterien vielfältige Phänotypen. In *P. aeruginosa* gehören dazu die Expression von Virulenz-Faktoren und Biofilmbildung (Hentzer et al., 2003). *P. aeruginosa* besitzt zwei miteinander verbundene QS-Systeme, zum einen das *las*-System, das aus dem Transkriptionsaktivator LasR und dem der AHL-Synthase LasI besteht, die die Synthese von 3-Oxo-C₁₂-HSL dirigiert, und dem *rhl*-System mit dem Transkriptionsregulator RhlR und der AHL-Synthase RhlI, die für die Synthese von C₄-HSL zuständig ist (Gambello und Iglewski, 1991, Bainton et al., 1992, Jones et al., 1993, Passador et al., 1993, Latifi et al., 1995, Pearson et al., 1995 und Lazdunski et al., 2004). Das *las*-System wird von GacA (Reimmann et al., 1997) positiv kontrolliert und auch von Vfr, welches für die Transkription von *lasR* benötigt wird (Albus et al., 1997, Juhas et al., 2005). An LasR gebundenes 3-Oxo-C₁₂-HSL aktiviert wiederum die Expression von RhlR, welches dann in Verbindung mit C₄-HSL die Expression von RhlI und die Expression diverser Virulenzfaktoren induziert. Gleichzeitig kann durch freies 3-Oxo-C₁₂-HSL, welches an RhlR binden kann, die Bindung des C₄-HSL an RhlR blockiert werden (Pesci et al., 1997). Auf diesem Weg kontrolliert das *las*-System das *rhl*-System auf Transkriptions- und Posttranslations-Ebene. Außerdem aktiviert der LasR-3-Oxo-C₁₂-HSL-Komplex die Expression von PQS, einem weiteren QS-Signalmolekül. Dieses aktiviert wiederum die Transkription von *rhlR* und wird von dem RhlR-C₄-HSL-Komplex inhibiert. Dies zeigt, dass die QS Systeme in *P. aeruginosa* in einem Netz gegenseitiger Kontrolle miteinander agieren und somit auch gezielte Genexpression ermöglichen. So sind bei der Biofilmbildung das *las*-System und das *rhl*-System im Anheftungsprozess aktiv, während die *rhlI*-Expression im späteren Verlauf des Biofilm-Aufbaus im Gegensatz zur *lasI*-Expression konstant bleibt (De Kievit et al., 2001). Dass Quorum Sensing bei der Biofilmbildung eine wichtige Rolle spielt, wurde erstmals von Hentzer im Jahr 2003 nachgewiesen (Hentzer et al., 2003).

Dass auch Twitching Motility über Quorum Sensing reguliert wird, wurde 1999 von Glessner beschrieben (Glessner et al., 1999), andere Studien wiederum verneinen, diese Beobachtung (Köhler et al., 2000). Daher ist an dieser Stelle festzuhalten, dass

die Beeinflussung der Motilität nach wie vor kontrovers diskutiert wird. Es steht jedoch fest, dass *Swarming* über QS kontrolliert wird, und dass zum Schwärmen auch die Produktion von Rhamnolipiden notwendig ist (Köhler et al., 2000).

Die Bildung von Pyocyanin wird in *P. aeruginosa* über RpoS kontrolliert, welches von *rhl*-system kontrolliert wird (Whiteley et al., 2000). Kürzlich wurde beschrieben, dass auch Pyocyanin in der Lage ist, bestimmte QS-regulierte Gene zu kontrollieren (Dietrich et al., 2006). Funktionen, die in *P. aeruginosa* über die drei beschriebenen QS-Systeme reguliert werden, sind in der folgenden Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: QS-gesteuerte Funktionen in *P. aeruginosa* (Juhás et al., 2005)

las-Kontrolle	rhl-Kontrolle	PQS-Kontrolle
PQS-Synthese	PQS-Synthese	Rhl-System
Rhl System	Rhamnolipide	Rhamnolipide
<u>Biofilm-Bildung</u>	Alkalische Protease	<u>Biofilm-Bildung</u>
Alkalische Protease	Elastase	Elastase
Elastase	<u>Pyocyanin</u>	<u>Pyocyanin</u>
Lipase	Lipase	Lectin A und B
HCN	Lectin A und B	
Exotoxin A	HCN	
Neuraminidase	Chitinase	
Catalase	RpoS	
Superoxid-Dismuase	Exoenzym S	
Aminopeptidase	<u>Swarming</u>	
<u>Swimming</u>	<u>Twitching</u>	
<u>Swarming</u>		
<u>Twitching</u>		

Wie Tabelle 13 und auch Abbildung 6 in der Einleitung zeigen, sind die QS-Systeme in *P. aeruginosa* so miteinander verflochten, dass zum Teil auch die gleichen Gene über mehrere QS-Systeme kontrolliert werden. So werden Motilitäts-Phänotypen sowohl vom *las*-system als auch vom *rhl*-System kontrolliert, Pyocyaninbildung von *rhl* und *pqs* und Biofilmbildung sowohl von *las* als auch von *pqs*.

Da viele Virulenz-Faktoren und die Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* über QS gesteuert werden, wurden bereits viele Studien mit dem Ziel durchgeführt, diese durch QS-gesteuerten Phänotypen durch QS-Inhibierung zu blockieren oder zumindest zu inhibieren. Dabei zeigten sich unterschiedliche Erfolge. So zeigten

P. aeruginosa-Mutanten, bei denen das *rhl*- und das *las*-System ausgeschaltet waren, deutlich reduzierte, aber nicht völlig inhibierte Biofilmbildung (Shih und Huang, 2002).

Die Expression von in *P. aeruginosa* exprimiertem AiiA, von dem nachgewiesen ist, dass es AHLs spalten kann, reduzierte in Tests die Schwärmaktivität, Biofilmbildung wurde bei dieser Studie jedoch nicht getestet (Reimann et al., 2002). Ebenso konnte durch den Zusatz von aus Serum gewonnenem PON1 durch Abbau der AHL-Moleküle Quorum Sensing und Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* inhibiert werden (Ozer et al., 2005).

Bei dem Zusatz halogenierter Furanone wiederum wurde Biofilmbildung neben der Expression von Virulenzfaktoren inhibiert (Hentzer et al., 2002, Hentzer et al., 2003, Bjarnsholt und Givskov, 2007). Ebenso inhibierten Fettsäuren mit verzweigten Ketten Schwimmen, Schwärmen und Biofilmbildung (Inoue et al., 2008). Auch der Einsatz eines exogen zugegebenen synthetischer Autoinducer-Analogs, 3-Oxo-C₁₂-(2-Aminocyclohexanol), sorgte für die Inhibition von Biofilmbildung und Virulenzfaktoren (Smith et al., 2003).

Dies zeigt, dass durch die Inhibition des Quorum Sensing Systems von *P. aeruginosa* viele mit diesen Systemen verbundene Phänotypen wie Motilität, Biofilmbildung und die Expression von Pyocyanin und anderen Virulenzfaktoren ausgeschaltet oder zumindest inhibiert werden können.

Alle getesteten *bpiB*-kodierenden pBBR1MCS-5-Konstrukte waren ebenfalls in der Lage, die Phänotypen Motilität, Pyocyaninbildung und Biofilmbildung deutlich zu inhibieren, während die Kontrollen mit den inaktivierten *bpiB*-Genen dem Wildtyp entsprechende Motilitäts-, Pyocyanin- und Biofilmphänotypen zeigten. Die Biofilmbildung stagnierte bei allen getesteten Klonen in einem frühen Stadium der Biofilmbildung vor der Bildung von Mikrokolonien, die durch den Einsatz von Typ IV-Pili entstehen, sodass davon auszugehen ist, dass neben Swarming und Swimming auch Twitching inhibiert sein könnte.

Da von den BpiB-Proteinen BpiB01, BpiB04 und BpiB05 nachgewiesen werden konnte, dass sie Lactonase-Aktivität besitzen und sowohl das Schwärmen als auch die Pyocyaninbildung bei Tests mit ausgewählten Klonen durch AHL-Zugabe komplementiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass sie in der Lage sind, das *las*- und das *rhl*-System von *P. aeruginosa* zu inhibieren und auf diesem Weg die

beobachteten Phänotypen hervorzurufen. Da bei der Studie der AiiA-Expression in *P. aeruginosa* PAO1 nur das Schwärmen und keine Biofilmbildung oder Pyocyaninbildung getestet wurde, kann an dieser Stelle kein weiterer Vergleich zur Wirkung von AiiA und den BpiB-Proteinen bezüglich der Inhibition weiterer QS-gesteuerter Phänotypen vorgenommen werden.

Da die Phänotypen Motilität, Biofilmbildung und Pyocyaninbildung über die verschiedenen QS-Systeme kontrolliert werden, müssen die *bpiB*-Gene mehr als eines dieser Systeme inhibieren, würde lediglich das *las*-System inhibiert, wäre die Biofilmbildung nicht deutlich inhibiert. Dies zeigten Studien mit *lasR*-Mutanten, bei denen nur *las*, aber nicht *rhl* inaktiviert ist und umgekehrt (Shih und Huang, 2002).

Möglicherweise werden neben den bekannten QS-Systemen weitere Gene in *P. aeruginosa* bei Expression der *bpiB*-Gene reprimiert. So ist beispielsweise für *P. aeruginosa* Klone, bei denen das *estA*-Gen, welches für eine membrangebundene Esterase codiert, inaktiviert wurde, nachgewiesen, dass diese neben der Repression mehrerer Virulenz-Gene und der Repression der Produktion von Rhamnolipiden, die für Schwärmen notwendig sind (Köhler et al., 2000), Schwärmen und Schwimmen inhibiert werden.

Um zu klären, ob und welche Gene zusätzlich zu den *las*- und *rhl*-Genen genau durch die *bpiB*-Gene inhibiert werden, wären Microarray-Studien zur Untersuchung der Genexpression in den entsprechenden *P. aeruginosa* PAO1-Klonen notwendig.

5. Inhibition der QS-gesteuerten Violaceinproduktion bei *C. violaceum*

Es ist bekannt, dass die Violaceinbildung bei *C. violaceum* über Quorum Sensing gesteuert ist, als Signalmolekül fungiert dabei C₆-HSL (McClellan et al., 1997). *C. violaceum* ist nicht in der Lage, auf die AHL-Moleküle anderer Spezies zu reagieren, die eine Acylkettenlänge von C₄-C₈ übersteigen, stattdessen inhibieren diese AHL-Moleküle die QS-gesteuerte Violacein-Produktion (McClellan et al., 1997). Neben der Inhibition durch längerkettige AHLs wird die Violacein-Produktion auch durch halogenierte Furanone reprimiert, deren Funktion als QS-Antagonisten bereits beschrieben wurde (Manefield et al., 1999 und 2002).

Die BpiB-Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 waren in der Lage, die Violacein-Produktion bei exogener Zugabe ohne Beeinträchtigung des Wachstums zu inhibieren. Da sie der HPLC-MS-Analyse nach Lactonase-Aktivität besitzen und in

der Lage sind, verschiedene AHL-Moleküle zu spalten, kann davon ausgegangen werden, dass die Inhibition der Violaceinbildung auf Spaltung der C₆-HSL-Moleküle zurückzuführen ist.

6. Schwärminhibition von *E. coli* K12 durch *bpiB01* - *bpiB07*

E. coli K12, zu dem auch der Stamm XL1 blue gehört, besitzt im Gegensatz zu *P. aeruginosa* kein eigenes AI-1 System. Es kann aber mit Hilfe seines SdiA-Systems auf AI-1 Moleküle anderer Spezies reagieren (Zhou et al., 2008) und über dieses System Gene regulieren (van Houdt et al., 2006).

Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass *E. coli* über ein AI-2 Quorum Sensing-System verfügt, das dem von *Vibrio harveyi* entspricht und über LuxS reguliert wird (Surette und Bassler, 1998).

Microarray-Analysen haben gezeigt, dass bis zu 242 Gene, das entspricht etwa 5,6% des Genoms von *E. coli*, über AI-2 reguliert werden (DeLisa et al., 2001). Darunter fallen auch die Motilitätsgene, die bei AI-2 Anwesenheit hochreguliert werden. Durch AI-2 werden unter anderem die *qseBC*-Gene, die in die Flagellenregulation involviert sind, exprimiert. Diese aktivieren wiederum das *flhDE*-Operon, den Regulator für die Flagellen- und Motilitätsgene (Sperrandio et al., 2002). Über sein AI-2 System ist *E. coli* in auch der Lage, Biofilmbildung zu kontrollieren (Gonzalez Barrio et al., 2008, Herzberg et al., 2006). AI-2 wird in der exponentiellen Wachstumsphase in großen Mengen produziert und in der stationären Phase abgebaut. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt (Winzer et al., 2002). Die Zugabe von Überstand des AI-2 defizitären *E. coli* Stammes DH5α aus der exponentiellen Phase zu einer einem anderen *E. coli* K12 Stamm verringerten die dortige AI-2 Konzentration deutlich, was daraufhin deutet, dass AI-2 über ein Netzwerk reguliert wird (Ren et al., 2004). Kürzlich wurde die Phosphorylierung und Prozessierung von AI-2 in Enterobakterien beschrieben (Xavier et al., 2007). Es ist jedoch offen, inwiefern auch andere Abbaumechanismen vorhanden sind. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass auch *P. aeruginosa* AI-2 abbauen kann, ohne jedoch einen Mechanismus zu beschreiben (Winzer et al., 2002).

Es wurde bereits gezeigt, dass halogenierte Furanone Biofilmbildung und Schwärmen in *E. coli* inhibieren (Ren et al., 2001) und über Microarray-Analyse nachgewiesen, dass dies über die Inhibition des AI-2 Systems geschieht, indem

unter anderem die Gene für Chemotaxis, Motilität und Flagellensynthese in Anwesenheit halogenierter Furanone inhibiert werden. Kürzlich wurde beschrieben, dass auch der Zusatz von Phytochemikalien, die auch als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet werden, Schwärmen in *E. coli* K12 inhibiert (Vattem et al., 2007).

Auch die Expression der *bpiB*-Gene in *E. coli* XL1 blue führten zu einer deutlichen Inhibition des Schwärmens, ohne dabei das Wachstum negativ zu beeinflussen. Da aber keine Strukturanalysen von mit den BpiB-Proteinen inkubierten AI-2 Molekülen unter Verwendung der HPLC-MS-Analyse möglich waren, da das zur Verfügung stehende MHF nicht mit dieser Methode analysierbar war, kann an dieser Stelle keine konkrete Aussage über den Wirkmechanismus der *bpiB*-Gene in *E. coli* getroffen werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass AI-2 über die Hydrolyse des Furanonringes durch BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 inaktiviert wird. Zur Verifizierung dieser Aussage sind jedoch weitergehende Untersuchungen notwendig, um festzustellen, ob die BpiB-Proteine eine solch weite Substratspezifität besitzen.

7. Ausblick

In dieser Arbeit wurden neun aus Metagenom-Genbanken stammende Klone isoliert und charakterisiert, die Quorum Quenching-Aktivität zeigten. Von diesen Klonen konnten die verantwortlichen QQ-Gene für sechs Klone, Bio1, Bio4, Bio5, Bio7, Bio8 und Bio9, bestimmt werden. Es handelte sich um bisher unbekannte Gene, von denen keines Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten charakterisierten QQ-Enzymen zeigte. Für die Klone Bio2, Bio3 und Bio6 müssten die verantwortlichen Gene in weiteren Arbeiten noch detektiert und isoliert werden, um sie näher untersuchen zu können.

Von fünf dieser sechs Klone konnten zudem die QQ-Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 rekombinant produziert und biochemisch auf ihre QQ-Aktivität bezüglich des Abbaus von AHL-Molekülen charakterisiert werden. Die verbleibenden *bpiB*-Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht überexprimiert und charakterisiert, auch diese Aufgabe gilt es in zukünftigen Arbeiten noch durchzuführen. Besonders für den Klon Bio4 stellt dies eine interessante Aufgabe dar, da dieser Klon viele kleine ORFs besitzt, die den experimentellen Ergebnissen nach in ihrer Gesamtheit die QQ-Aktivität zu bedingen scheinen.

Fünf der insgesamt neun Klone, Bio1, Bio4, Bio7, Bio8 und Bio9 bzw. deren *bpiB*-haltige Subkonstrukte inhibierten zudem Motilitätsphänotypen und Biofilmbildung in *P. aeruginosa*. Für die übrigen Bio-Klone wäre noch zu testen, ob auch sie bei in vivo-Expression in der Lage sind, Quorum Sensing gesteuerte Phänotypen wie Motilität und Biofilmbildung zu inhibieren.

Alle in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten BpiB-Proteine waren in der Lage, AHL-Moleküle durch Spaltung des Lactonringes zu inaktivieren. Sie alle stellen für sich neue Lactonasen da, die in der Literatur zuvor nicht beschrieben wurden. In weiteren Schritten wäre eine Kristallisierung der Proteine zu empfehlen mit dem Ziel, die genaue Struktur der Proteine inklusive der Bestimmung des aktiven Zentrums zu erhalten.

Im Weiteren wäre zu testen, in wie weit QS-gesteuerte Phänotypen wie Biofilmbildung und Motilität bei *P. aeruginosa* über die exogene Zugabe der BpiB-Proteine inhibiert werden können und ob gegebenenfalls über eine Immobilisierung der BpiB-Proteine auf Oberflächen Biofilmbildung inhibiert werden könnte, ein Aspekt, der auch im Hinblick auf industrielle Anwendungsmöglichkeiten der BpiB-Proteine interessant wäre.

In dieser Arbeit wurde zudem ermittelt, dass AI-2 gesteuertes Schwärmen bei *E. coli* XL1 blue durch die Klone Bio1, Bio4, Bio7, Bio8 und Bio9 sowie ihre *bpiB*-haltigen Subklone inhibiert wurde. Erste Tests deuten auf den Abbau der Autoinducer-Moleküle durch die BpiB-Proteine hin. Es konnte jedoch kein Spaltmechanismus ermittelt werden. Daher wäre eine weitere noch ausstehende Aufgabe, mit Hilfe von NMR-Analysen die Spaltmechanismen der BpiB-Proteine festzustellen.

V. Zusammenfassung

Bakterielle Zell-Zellkommunikation (Quorum Sensing) ist maßgeblich an der Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* beteiligt. Aufgrund seiner zentralen Funktion für Biofilmbildung bietet QS die Möglichkeit neue Strategien zur Biofilmprävention zu entwickeln.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden daher neun neuartige Quorum Sensing inhibierende Enzyme aus bisher nicht kultivierten Mikroorganismen mit Hilfe der Metagenomik isoliert, molekularbiologisch charakterisiert und auf ihre Biofilm-inhibitorische Wirkung hin analysiert. Für vier der insgesamt gefundenen Klone konnten die für die Quorum-Quenching-Aktivität verantwortlichen Gene isoliert und die zugehörigen Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 heterolog überexprimiert werden. Die biochemische Charakterisierung dieser Proteine mit Hilfe der HPLC-MS-Analytik ergab, dass die QQ-Aktivität bei AHL-Molekülen auf eine Spaltung des Lactonringes zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 um vier völlig neue Lactonasen handelt, welche in der Lage sind, AHL-Moleküle mit unterschiedlicher Struktur zu spalten und die keinerlei Ähnlichkeiten zu bisher beschriebene Lactonasen aufweisen.

Während BpiB01, BpiB04 und BpiB09 wie alle bisher beschriebenen bakteriellen AHL-Lactonasen Zink als Cofaktoren benötigten, zeigte BpiB05 eine Abhängigkeit von Ca^{2+} . Diese Eigenschaft wurde bisher nur für die humanen PONs beschrieben, die ebenfalls Lactonase-Aktivität aufweisen.

Weitere Analysen in *P. aeruginosa* zeigten, dass die Expression der *bpiB*-Gene mehrere QS-abhängige Phänotypen hervorruft, die zudem durch Transposoninsertionen in die *bpiB*-Gene wieder aufgehoben werden konnten. So wurde vor allen Dingen eine signifikante Inhibition der Biofilmbildung bis hin zum vollständigen Verlust der Fähigkeit Biofilme zu bilden beobachtet. Ebenso wurde gezeigt, dass die Pyocyaninproduktion und auch die Motilität durch die Expression der BpiB-Proteine beeinträchtigt wurden. Durch die Zugabe von 3-Oxo-C₁₂-HSL konnte der Schwärmphänotyp bei allen in dieser Arbeit getesteten Proteinen teilweise wiederhergestellt werden, ebenso exemplarisch die Pyocyaninbildung bei den *P. aeruginosa*-Klonen, die die *bpiB*-Gene *bpiB01*, *bpiB04* und *bpiB07* trugen. Diese Komplementationen lassen den Schluss zu, dass die *bpiB*-Gene mit den QS-Systemen von *P. aeruginosa* interagieren und vermutlich z. T. die Autoinducer-

vermittelte Signalweiterleitung durch deren Spaltung inhibieren, was durch die Erkenntnisse der HPLC-MS-Analyse für die Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05, BpiB06 und BpiB09 untermauert werden konnte. Durch die HPLC-MS Analysen konnte die Spaltung des Lactonringes für die AHL-Moleküle 3-Oxo-C₈-HSL und C₁₂-HSL für alle BpiB-Proteine nachgewiesen werden.

Die BpiB-Proteine waren zudem in der Lage, Quorum Sensing gesteuerte Phänotypen anderer Bakterien zu inhibieren, wie die exogene Zugabe der Proteine BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 zu dem Wildtyp Stamm von *C. violaceum* zeigte, bei dem die Zugabe dieser Proteine für eine Inhibition der Violaceinbildung sorgte.

Bei *E. coli* wurde das über AI-2 gesteuerte Schwärmen durch die *bpiB*-Gene deutlich inhibiert. Für Bio4 und Bio7 konnte exemplarisch gezeigt werden, dass ein Ausschalten der jeweils vorhandenen *bpiB*-Gene den ursprünglichen Schwärmphänotyp wiederherstellte. Ein eindeutiger Nachweis, auf welche Weise dabei die AI-2-Moleküle inaktiviert werden, konnte an dieser Stelle nicht erbracht werden. Hierfür wären weitere Untersuchungen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie notwendig. Erste Tests ergaben jedoch bereits Hinweise auf den Abbau des Signalmoleküls 5-Methyl-4-Hydroxy-3-Furanon (MHF), das in *E. coli* als AI-2 Molekül fungieren kann.

Die Ergebnisse für die AHL-Lactonasen BpiB01, BpiB04 und BpiB06 wurden in Applied and Environmental Microbiology unter dem Titel „Metagenome-derived clones encoding for two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*“ veröffentlicht (Schipper et al., 2009a); die Ergebnisse zu BpiB05 aus dem Klon Bio8 sind bei der Zeitschrift Microbiology unter dem Titel „BpiB05, a novel Ca²⁺-dependent and metagenome-derived *N*-acylhomoserine lactone (*N*-AHL) lactonase“ eingereicht (Schipper et al., 2009b, submitted).

VI. Literaturverzeichnis

Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E., Iglewski, B. H. (1997): Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* Vol. 179 No 12: 3928-3935.

Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* Vol 59 No 1:143-169.

Anagnostopoulos, C., Spizizen, J. (1961): Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* Vol. 81 No 5: 741-746.

Armstrong, R. N. (2000): Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* Vol. 39 No 45: 13625-13632.

Bainton, N. J., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Stead, P., Gledhill, L., Hill, P. J., Rees, C. E., Winson, M. K., Salmond, G. P., Stewart, G. S. (1992): A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene* Vol. 116 No 1: 87-91.

Bjarnsholt, T. , Givskov, M. (2007): Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* Vol. 362 No 1438: 1213-1222.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* Vol. 72: 248-254.

Bollinger, N., Hassett, D. J., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., McDermott T. R. (2001): Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm specific gene regulation. *Journal of Bacteriology* Vol. 183:1990-1996.

Bonifait, L., Grignon, L., Grenier, D. (2008): Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 74 No 15: 4969-4972.

Borchardt, S., Allain, J., Michels, J., Stearns, G., Kelly, R., McCoy, W. (2001): Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 67 No 7: 3174-3179.

Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. (1969): A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* Vol. 41 No 3: 459-472.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M. (1987): XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA-Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. *Bio Techniques* Vol. 5: 345-381.

- Buu, A., Menichi, B., Heyman, T. (1981):** Thiomethylation of tyrosine transfer ribonucleic acid is associated with initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*: effect of phosphate concentration. *Journal of Bacteriology* Vol. 146 No 2: 819-822.
- Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., Faure, D. (2003):** The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 69 No 8: 4989-4993.
- Chernin, L. S., Winson, M. K., Thompson, J. M., Haran, S., Bycroft, B. W., Chet, I., Williams, P., Stewart, G.S. (1998):** Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *Journal of Bacteriology* Vol. 180 No 17: 4435-4441.
- Clark, D. J., Maaløe, O. (1967):** DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* Vol.23: 99–112.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T. (2005):** Microbiology. Exploring microbial diversity - a vast below. *Science* Vol. 309 No 5739: 1331-1333.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., Greenberg E. P. (1998):** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* Vol. 280 No 5361: 295.
- d'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., Dessaux, Y. (2005):** Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 7 No 11: 1796-808.
- De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B. H. (2001):** Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 67 No 4: 1865-1873.
- De Kievit, T. R. und Iglewski B. H. (2000):** Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity* Vol. 68 No 9: 4839-4849.
- DeLisa, M. P., Valdes, J. J., Bentley, W. E. (2001):** Quorum signaling via AI-2 communicates the "Metabolic Burden" associated with heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology & Bioengineering* Vol. 75 No 4:439-450.
- Dernevaud, V., TuQuoc, P. Blanc, D., Favre-Bonte, S., Krishnapillai, V., Reimann, C., Haas, D., van Delden, C. (2004):** Characterisation of Cell-to-Cell Signaling-Deficient *Pseudomonas aeruginosa* Strains Colonising Intubated Patients. *Journal Of Clinical Microbiology* Vol. 42 No. 2:554-562.
- Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., Newman, D. K. (2006):** The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* Vol. 61 No 5: 1308-1321.

Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L., Zhang, L. H. (2002): Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology Vol. 68 No 4: 1754-1759.

Dong, Y. H. , Wang L. H.,J. Xu L., Zhang H. B., Zhang X. F., Zhang L. H. (2001): Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature Vol. 411 813-817.

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., Zhang, L. H. (2000): AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. PNAS Vol. 97 No 7: 3526-3531.

Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., Du, B. N: (2005): Human paraoxanases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. Journal of Lipid Research Vol. 46: 1239-1247.

Dubern J. F., Diggle S. P. (2008): Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. Molecular bioSystems Vol.4 No 9:882-888.

Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Neilson, K. H., Oppenheimer, N. J. (1981): Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. Biochemistry Vol. 20 No 9:2444-2449.

Eberl, L. (1999): N-Acyl Homoserinlactone-mediated gene Regulation in Gram-negative Bacteria. Systematic and Applied Microbiology Vol. 22: 493-506.

Eberl, L., Tümmler, B. (2004): *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. International Journal of Medical Microbiology Vol. 294 No 2-3: 123-131.

Eggert, T., Brockmeier, U., Dröge, M. J., Quax, W. J., Jaeger, K.-E. (2003): Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. FEMS Microbiology Letters Vol. 225 No 2: 319-324.

Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J. D., Steele, H. L., Reymond, J. L., Jaeger, K.-E., Streit, W. R. (2006): Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. Applied and Environmental Microbiology Vol. 72 No 5: 3637-3645.

Engebrecht, J., Neilson, K., Silverman M. (1983): Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. Cell Vol. 32 No 3: 773-781.

Estephane, J., Dauvergne, J., Soulère, L., Reverchon, S., Queneau, Y., Doutheau A. (2008): N-Acyl-3-amino-5H-furanone derivatives as new inhibitors of LuxR-dependent quorum sensing: Synthesis, biological evaluation and binding mode study. Bioorganic and Medical Chemistry Letters Vol. 8 No 15:4321-4324.

- Figurski, D. H., Helinski, D. R. (1979):** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. PNAS Vol. 76 No 4: 1648-1652.
- Freeman, J. A. und Bassler, B. L. (1999):** A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Molecular Microbiology Vol. 31 No 2: 665-677.
- Fuqua C., Winans, S. C. (1996):** Conserved *cis*-Acting Promoter Elements Are Required for Density-Dependent Transcription of *Agrobacterium tumefaciens* Conjugal Transfer Genes. Journal of Bacteriology Vol. 178 No 2: 435-440.
- Gambello, M. J., Iglewski, B.H. (1991):** Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. Journal of Bacteriology Vol. 173 No 9: 3000-3009.
- Geske, G. D., O'Neill J. C., Blackwell H. E. (2008):** Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria. Chemical Society Reviews Vol. 37: 1432–1447,
- Geske, G. D., O'Neill, J. C., Blackwell, H. E. (2007a):** *N*-Phenylacetanoyl-L-Homoserine Lactones Can Strongly Antagonize or Superagonize Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*. ACS Chemical Biology Vol. 2 No 5: 315-319.
- Geske, G. D., O'Neill, J. C., Miller, D. M., Mattman, M. E., Blackwell, H. E. (2007b):** Modulation of Bacterial Quorum Sensing with Synthetic Ligands: Systematic Evaluation of *N*-Acylated Homoserine Lactones in Multiple Species and New Insights into Their Mechanisms of Action. Journal of American Chemical Society Vol. 129 No 44: 13613-13625.
- Glessner, A., Smith, R. S., Iglewski, B. H., Robinson, J. B. (1999):** Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of twitching motility. Journal of Bacteriology Vol. 181 No 5: 1623-1629.
- González Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E., Wood, T.K. (2006):** Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). Journal of Bacteriology Vol. 188 No 1: 305-316.
- Hanahan, D. (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology Vol. 166 No 4: 557-580.
- Handelsman, J. (2004):** Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and molecular biology reviews Vol. 68 No 4:686-691.
- Håvarstein, L. S., Gaustad, P., Nes, I. F., Morrison D. A. (1996):** Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. Molecular Microbiology Vol. 21 No 4: 863-869.

- Henke, J.M. und Bassler, B. L. (2004):** Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* Vol. 186 No. 12: 3794-3805.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Høiby N., Givskov M. (2003):** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal* Vol. 22 No 15: 3803-3815.
- Hentzer M., Riedel, K., Rasmussen, T., Heydorn, A., Andersen, J., Parsek M., Rice, S., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2002):** Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* Vol. 148: 87-102.
- Herzberg, M., Kaye, I. K., Peti, W., Wood, T. K. (2006):** YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *Journal of Bacteriology* Vol. 188 No 2: 587-598.
- Hjelmgaard, T. , Persson, T., Rasmussen, T. B., Givskov, M., Nielsen, J. (2003):** Synthesis of furanone-based natural product analogues with quorum sensing antagonist activity. *Bioorganic and Medical Chemistry* Vol. 11 No 15: 3261-3271.
- Høiby, N. (2002):** Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *Journal of Cystic Fibrosis* Vol. 1 No 4: 249-254.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V., Morgan, A. F. (1979):** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews* Vol. 43 No 1: 73-102.
- Hugenholtz, P., Tyson, G. W. (2008):** Metagenomics. *Nature* Vol. 455 No 25: 481-483.
- Inoue, T., Shingaki, R., Fukui, K. (2008):** Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 281 No 1: 81-86.
- Janssens, J. C. A., Metzger K., Daniels, R., Ptacek, D., Verhoeven, T., Habel, L. W., Vanderleyden J., De Vos, D. E., De Keersmaecker, S. C. J. (2007):** Synthesis of *N*-Acyl Homoserine Lactone Analogues Reveals Strong Activators of SdiA, the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LuxR. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 73 No 2: 535-544.
- Jones, S. , Yu, B., Bainton, N. J., M Birdsall, M., B W Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J., Golby, P., Reeves, P. J., Stephens, S., *et al.* (1993):** The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal* Vol.12 No 6: 2477–2482.

- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. (1995):** Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* Vol. 34 No 18: 6003-6013.
- Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B. (2005):** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* Vol. 7 No 4: 459-471.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Salunkhe, P., Lauber, J., Buer, J., Tümmler, B. (2005):** GeneChip expression analysis of the VqsR regulon of *Pseudomonas aeruginosa* TB. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 242 No 2: 287-295.
- Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U. (2008):** The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* Vol. 65 No 24: 3895-3906.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel K., Spahr, S., Eberl L., Valverde, C., Haas, D., (2006):** Two GacA-Dependent Small RNAs Modulate the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* Vol. 188 No 16: 6026–6033.
- Kendall, M. M., Rasko, D. A., Sperandio, V. (2007):** Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a luxS mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infections and Immunology* Vol. 75 No 10: 4875-4884.
- Kim, C., Kim, J., Park, H. Y., Park, H. J., Lee, J. H., Kim, C. K., Yoon, J. (2008):** Furanone derivatives as quorum-sensing antagonists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 80 No 1: 37-47.
- Kim, C., Kim, J., Park, H. Y., McLean, R. J., Kim C. K., Jeon, J., Yi, S. S., Kim, Y, G., Lee, Y. S., Yoon, J. (2007):** Molecular modeling, synthesis, and screening of new bacterial quorum sensing antagonists. *Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 17 No 10:1598-606.
- Kim, M. H., Choi, W. C., Kang, H. O., Lee, J. S., Kang, B. S., Kim, K. J., Derewenda, Z. S., Oh, T. K., Lee, C. H., Lee, J. K. (2005):** The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase. *PNAS* Vol. 102 No 49: 17606-17611.
- Kimmel, K. E., Maier, S. (1969):** Effect of cultural conditions on the synthesis of violacein in mesophilic and psychrophilic strains of *Chromobacterium*. *Canadian Journal of Microbiology* Vol. 15 No 1:111-116.
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., Pechère, J. C. (2000):** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology* Vol. 182 No 21: 5990-5996.

- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., Peterson, K. M. (1995):** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* Vol. 166 No 1: 175-176.
- Kuriki, T., Imanaka, T. (1999):** The concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 87 No 5: 557-565.
- Kvist, M., Hancock, V., Klemm, P. (2008):** Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 74 No 23: 7376-7382.
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* Vol. 227: 680-685.
- Larbig, K. D., Christmann, A., Johann, A., Klockgether, J., Hartsch, T., Merkl, R., Wiehlmann, L., Fritz, H. J., Tümmler, B. (2002):** Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *Journal of Bacteriology* Vol. 184 No 23: 6665-6680.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., Lazdunski, A. (1996):** A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology* Vol. 21 No 6: 1137-1146.
- Lazdunski, A. M., Ventre, I., Sturgis, J. N. (2004):** Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* Vol. 2 No 7: 581-592.
- Leadbetter, J., Greenberg, E. P. (2000):** Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology* Vol. 182 No 24: 6921-6926.
- Lee S. J., Park, S.-J., Lee, J.-J., Yum, D.-Y., Koo, B.-T., Lee, J.-K. (2002):** Genes Encoding The N-Acyl Homoserine Lactone-Degrading Enzyme Are Widespread in Many Subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 68 No 8: 31919-3924.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P., Sokol, P. A. (1999):** Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *Journal of Bacteriology* Vol. 181 No 3: 748
- Lin, Y., Xu, J., Hu, J., Wang, L., Ong, Leadbetter, J., Zang, L. (2003):** Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum quenching enzymes. *Molecular Microbiology* Vol. 47 No 3: 849-860.
- Liu, D., Thomas, P. W., Momb, J., Hoang, Q. Q., Petsko, G. A., Ringe, D., Fast, W. (2007):** Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemistry* Vol. 46 No 42: 11789-11799.

- Magnuson, R., Solomon, J. und Grossman, A. D. (1994):** Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* Vol. 77 No 2: 207-216.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S. (1999):** Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* Vol. 145 No 2: 283-291.
- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2002):** Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* Vol. 148 No 4: 1119-1127.
- Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond, G. P., Kjelleberg, S. (2001):** Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 205 No 1:131-138.
- Martinelli, D., Grossmann, G., Sequin, U., Brandl, H., Bachofen, R. (2004):** Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology* Vol.4: 25-35.
- Mayaud, C., Groupe, E. (2007):** *Pseudomonas* and bronchial diseases. *Medicine et maladies infectieuses* Vol 37 No 6: 300-304.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Williams, P. (1997):** Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* Vol. 143 No 12: 3703-3711.
- Miller M. B., Bassler, B. L. (2001):** Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* Vol. 55: 165-199.
- Minajigi, A., Francklyn, C. S. (2008):** RNA-assisted catalysis in a protein enzyme: The 2'-hydroxyl of tRNA(Thr) A76 promotes aminoacylation by threonyl-tRNA synthetase. *PNAS* Vol. 105 No 46: 17748-17753.
- Morohoshi, T., Shiono, T., Takidouchi, K., Kato, M., Kato, N., Kato, J., Ikeda, T. (2007):** Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 73 No 20: 6339-6344.
- Muh, U., Schuster, M., Heim, R., Singh, A., Olson, E. R., Greenberg, E. P. (2006):** Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. *Antimicrobial Agents in Chemotherapy* Vol. 50 No 11: 3674-3679.

Murray T.S., Egan M., Kazmierczak B. I. (2007): *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. Current opinion in pediatrics Vol 19 No 2: 83-88.

Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M., Nagasawa H. (2001): Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. Molecular Microbiology Vol. 41 No 1: 145-154.

Nealson K. H., Platt, T., Hastings, W. (1970): Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. Journal of Bacteriology Vol. 104: 313-322.

Nodaira, Y., Ikeda, N., Kobayashi, K., Watanabe, Y., Inoue, T., Gen, S., Kanno, Y., Nakamoto, H., Suzuki, H. (2008): Risk factors and cause of removal of peritoneal dialysis catheter in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Advances in Peritoneal Dialysis Vol. 24:65-68.

Ohman, D. E., Chakrabarty, A.M. (1981): Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate. Infection and Immunity Vol. 33 No 1: 142-148.

Oren, A. (2004): Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences Vol. 359 No 1444: 623-638.

Ozer, E. A., Pezzulo, A., Shih, D. M., Chun, C., Furlong, C., Lulis, A. J., Greenberg, E. P., Zabner, J. (2005): Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. FEMS Microbiology Letters Vol. 253 No 1: 29-37.

Pace, N. R. (1997): A molecular view over microbial diversity and the biosphere. Science Vol. 276 No 5313: 734-740.

Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y., Lee, J. K. (2003): AhID, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. Microbiology Vol. 70 No 10: 6173-6180.

Parsek, M., Greenberg, E. (2000): Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. PNAS Vol. 97 No 16: 8789-8793.

Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., Iglewski, B. H. (1993): Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. Science Vol. 260 No 5111: 1127-1130.

Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P. (1994): Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. PNAS Vol. 91 No 1: 197-201.

Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P. (1995): A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. PNAS Vol. 92 No 5: 1490-1494.

Peltola, M., Kanto Oqvist, C., Ekman, J., Kosonen, M., Jokela, S., Kolari, M., Korhonen, P., Salkinoja-Salonen, M. (2008): Quantitative contributions of bacteria and of *Deinococcus geothermalis* to deposits and slimes in paper industry. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology Vol. 35 No 12:1651-1657.

Pesci E. C., Milbank J.B., Pearson, J. P., McKnight, S. (1999): Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. PNAS Vol. 96: 1129-1134.

Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., Iglewski, B. H. (1997): Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology Vol. 179 No 10: 3127-3132.

Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva E. T. (1993): A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. The EMBO Journal Vol. 12 No 6: 2467.

Piper, K. R., Beck von Bodman, S., Farrand, S. K. (1993): Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Nature Vol. 362 No 6419: 448

Pomianek, M. E., Semmelhack, M. F. (2007): Making Bacteria Behave: New Agonists and Antagonists of Quorum Sensing. ACS Chemical Biology Vol. 2 No 5: 293-295.

Pumbwe, L., Skilbeck, C. A., Wexler, H. M. (2008): Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. Microbial Ecology Vol., 56 No 3: 412-419.

Rao, R. S., Karthika, R. U., Singh, S. P., Shashikala, P., Kanungo, R., Jayachandran, S., Prashanth, K. (2008): Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Indian Journal of Medical Microbiology Vol. 26 No 4: 333-337.

Rasmussen, T. B., Manefield, M., Andersen, J. B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2000): How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. Microbiology Vol. 146 No 12:3237-3244.

Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., Haas, D. (1997): The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. Molecular Microbiology Vol. 21 No 2: 309-319.

- Reimann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., Défago, G., Haas, D. (2002):** Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* Vol. 148 No 4: 923-932.
- Ren D., Bedzyk L. A., Ye R.W., Thomas S. M., Wood T. K. (2004):** Stationary-Phase Quorum-Sensing Signals Affect Autoinducer-2 and Gene Expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 70 No: 2038–2043.
- Ren, D., Bedzyk, L. A., Ye, R. W., Thomas, S. M., Wood, T. K. (2004):** Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 88 No 5: 630-642.
- Ren, D., Sims, J. J., Wood, T. K. (2001):** Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environmental Microbiology* Vol. 3 No 11: 731-736.
- Ren, D., Sims, J. J., Wood, T. K. (2002):** Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Letters in Applied Microbiology* Vol. 34: 293–299.
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, Y., Faure, D. (2008):** A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environmental Microbiology* Vol. 10 No 3: 560-570.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (2001):** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schipper, C. (2004):** Isolierung und Charakterisierung von Anti-Quorum.-Sensing-Molekülen aus Metagenomischer DNA, Diplomarbeit Universität Göttingen.
- Schipper, C, Hornung, C, Bijtenhoorn, P, Quitschau, M, Grond, S, Streit, WR. (2009a):** Metagenome-derived clones encoding for two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 75 No 1: 224-233.
- Schipper, C. Hornung, C., Bijtenhoorn, P., Weiland, N., Quitschau, M., Grond, S., Streit, W. R. (2009b):** BpiB05, a Ca²⁺ dependent metagenome- derived N-AHL lactonase. *Microbiology UK* (submitted).
- Shih, P. C., Huang, C. T. (2002):** Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Vol. 49 No 2: 309-314.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M.R. (2006):** The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology* Vol. 62 No 5: 1264-1277.

- Smith, K. M., Bu, Y., Suga, H. (2003):** Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chemistry & Biology* Vol. 10 No 1: 81-89.
- Smith, R. S., Iglewski, B. H. (2003a):** *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and Virulence. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 6 No 1: 56-60.
- Smith, R. S., Iglewski B. H. (2003b):** *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *Journal of Clinical Investigation* Vol. 112 No 10: 1460-1465.
- Solomon J. M., Lazazzera B. A., Grossman, A. D. (1996):** Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development* Vol. 10 No 16: 2014-2024.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P. und Kaper J. B. (2003):** Bacteria-host communication: the language of hormones. *PNAS* Vol. 100 No 15: 8951-8956.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Kaper, J. B. (2002):** Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Molecular Microbiology* Vol. 43 No 3: 809-821.
- Steele, H. L., Jaeger, K.-E., Daniel, R., Streit, W. R. (2009):** Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* Vol.16: 25-37.
- Steele, H. L., Streit, W. R. (2005):** Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 247 No 2: 105-111.
- Stickler, D. J. (2008):** Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nature Clinical Practice. Urology* Vol. 5 No 11: 598-608.
- Surette, M. G., Bassler, B. L. (1998):** Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *PNAS* Vol. 95 No 12: 7046-7050.
- Svenningsen, S. L., Waters, C. M., Bassler, B. L. (2008):** A negative feedback loop involving small RNAs accelerates *Vibrio cholerae*'s transition out of quorum-sensing mode. *Genes and Development* Vol. 22 No 2: 226-238.
- Taga, M., Bassler, B. (2003):** Chemical communication among bacteria. *PNAS* Vol. 100: 14549-14545.
- Thomas, P. W., Stone, E. M., Costello, A. L., Tierney, D. L., Fast, W. (2005):** The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry* Vol. 44 No 20: 7559-7569.
- Torsvik, V., Øvreås, L. (2002):** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 5 No 3: 240-245.

- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. PNAS Vol. 76: 4350-4354.
- Troidle, L., Finkelstein, F. O. (2008):** Catheter-related bacteremia in hemodialysis patients: the role of the central venous catheter in prevention and therapy. The International Journal of Artificial Organs Vol. 31 No 9: 827-833.
- Tu, K. C., Waters, C. M., Svenningsen, S. L., Bassler, B. L. (2008):** A small-RNA-mediated negative feedback loop controls quorum-sensing dynamics in *Vibrio harveyi*. Molecular microbiology Vol. 70 No 4:896-907.
- Ulrich, R. L. (2004):** Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. Applied and Environmental Microbiology Vol. 70 No 10: 6173-6180.
- Uroz S., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, P., Oger, P., Dessaux, Y. (2005):** N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. Microbiology Vol.151: 3313-3322.
- Uroz, S., Oger, P. M., Chapelle, E., Adeline, M. T., Faure, D., Dessaux, Y. (2008):** A *Rhodococcus qsdA*-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. Applied and Environmental Microbiology Vol. 74 No 5: 1357-1366.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., Haas, D. (2003):** RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Molecular Microbiology Vol. 50 No 4: 1361-1379
- Van Houdt, R., Aertsen, A., Moons, P., Vanoirbeek, K., Michiels, C.W. (2006):** N-acyl-L-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters Vol. 256 No 1: 83-89.
- Vattem, D. A., Mihalik, K., Crixell, S. H., McLean, R. J. (2007):** Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. Fitoterapia Vol. 78 No 4: 302-310.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J. (2008):** Living on a surface: swarming and biofilm formation. Trends in Microbiology Vol. 16 No 10:496-506.
- Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.-E., Streit, W. R. (2003):** Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. Applied and Environmental Microbiology Vol. 69 No 10: 6235-42.
- Whiteley, M., Parsek, M. R., Greenberg, E.P. (2000):** Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology Vol.182 No 15: 4356-4360.

Williamson, L. L., Borlee, B. R., Schloss, P. D., Guan, C., Allen, H. K., Handelsman, J. (2005): Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 71 No 10: 6335-44.

Williamson, L. L., Borlee, B. R., Schloss, P. D., Guan, C., Allen, H. K., Handelsman, J. (2005): Intracellular Screen To Identify Metagenomic Clones That Induce or Inhibit a Quorum-Sensing Biosensor. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 71 No 10: 6335-6344.

Winstanley C., Fothergill J. L. (2009): The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiology Letters* Vol 290 No 1: 1-9.

Winzer K., Hardie K. R., Burgess N., Doherty N., Kirke D., Holden M. T. G., Linfoth R., Cornell, K. A., Taylor A. J., Hill P. J., Williams P. (2002): LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* Vol.148:909–922.

Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J., Molin, S., Givskov, M., Høiby, N. (2004): Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Vol. 53: 1054-1061.

Xavier , K. B., Bassler B. L. (2003): LuxS Quorum sensing: more than jst a numbers game. *Current opinion in microbiology* Vol.6 No 2: 191-197.

Xavier K.B., Miller S. T., Lu W., Kim J. H., Rabinowitz J., Pelczer I., Semmelhack M. F., Bassler B. L. (2007): Phosphorylation and processing of the quorum-sensing molecule autoinducer-2 in enteric bacteria. *ACS chemical biology* Vol. 2 No 2: 128-136.

Young, F. E., Spizizen, J. (1961): Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* Vol. 81: 823-829.

Zhang, L., Murphy, P. J., Kerr, A, Tate, M. E. (1993): *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* Vol. 362 No 6419: 446-448.

Zhou, X., Meng, X., Sun, B. (2008): An EAL domain protein and cyclic AMP contribute to the interaction between the two quorum sensing systems in *Escherichia coli*. *Cell Research* Vol. 18 No 9:937-948.

VII. Anhang

1. Tabellen

Tabelle A: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio2

Tabelle B: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio3

Tabelle C: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio4

Tabelle D: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio5

Tabelle E: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio6

Tabelle F: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio7

Tabelle G: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio8

Tabelle H: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio9

Tabelle A: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio2

ORF	Größe [AS]	Organismus	Identität [%]	Ähnlichkeit [AS/AS _{total}]	Funktion	E-Wert	Accession Nummer
<i>orf01</i>	149	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	55	12-40/302	Glyoxalase I	0.4	NP_596010.1
<i>orf02</i>	168	<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> ATCC9039	37	12-174/183	Hypothetisches Protein Bind_0390	6e-24	AAK02536.1
<i>orf03</i>	105	Marines Gamma-Proteobakterium HTCC2207	40	16-112/114	Hypothetisches Protein GB2207_11188	2e-09	ZP_01224170.1
<i>orf04</i>	276	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi11	56	1-266/276	Hypothetisches Protein mit Hochaffinitäts-Fe ²⁺ /Pb ²⁺ -Permease Domäne	1e-55	YP_001236503.1
<i>orf05</i>	104	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	33	1-86/105	Hypothetisches Protein m111954	8e-07	NP103415.1

Tabelle B: BlastX Ergebnisse für alle ORFs auf Bio3

ORF	Größe [AS]	Organismus	Identität [%]	Ähnlich- keit [AS/AS _{total}]	Funktion	E- Wert	Accession Nummer
<i>orf01</i>	335	<i>Acibobacteria bacterium</i> Ellin345	32	1-263/271	Antwort- regulierendes Übertragungs- Protein	2e-29	YP_593365.1
<i>hypB1</i>	385	<i>Verrucomicro-bium spinosum</i> DSM4136	47	83-351/352	YmAE	6e-87	ZP_02928094.1

Tabelle C: Ergebnis der BlastX Analyse für die ORFs auf Bio4

ORF	Größe [AS]	Organismus	Identität [%]	Ähnlichkeit [AS/AS _{total}]	Funktion	E-Wert	Accession Nummer
<i>orf01</i>	126	<i>Stigmatella aurantica</i> DW4/3-1	35	528-608/620	Konserviertes hypothetisches Protein	2.6	ZP_01465604.1
<i>bpiB02</i>	102	<i>Canorhabditis briggsae</i> AF16	35	149-216/226	Hypothetisches Protein CBG17656	0.23	XP_001671434.1
<i>orf02</i>	104	<i>Podospira anserina</i>	51	335-361/646	Hypothetisches Protein	0.69	XP_001910343.1
<i>bpiB03</i>	52	<i>Musa accuminata</i>	36	106-160/648	Protein-Kinase-Familien-Protein	2.6	ABF70054.1
<i>orf04</i>	124	<i>Bos taurus</i>	39	188-241/619	Deltex Homolog 1	0.11	XP_590470.3
<i>orf05</i>	111	<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	30	308-378/489	Serin/Threonin-Protein-Kinase	0.016	ZP_03273726.1
<i>orf06*</i>	39	<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	52	2460231-2460157/2467205	Komplettes Genom, 2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase	1.5	CP_000359.1

* tBlastX-Analyse, Ähnlichkeit daher in bps/bps gesamt

Tabelle D: BlastX-Ergebnisse für die ORFs auf Bio5

ORF	Größe [AS]	Organismus	Identität [%]	Ähnlich- keit [AS/AS _{total}]	Funktion	E- Wert	Accession Nummer
<i>orf01</i>	321	<i>Acibobacteria bacterium Ellin345</i>	54	1-420/1308	Chromosomen- Segregations- protein	3e-117	YP_591713.1
<i>orf02</i>	274	<i>Hyphomonas neptium ATCC15444</i>	42	1-173/174	Hypothetisches Protein HNE_3120	4e-30	YP_761796.1
<i>bpiB09</i>	239	<i>Acidobacteria bacterium Ellin345</i>	54	11-243/244	Kurz-Ketten- Dehydrogenase SDR	4e-56	YP_591337.1

Tabelle E: BlastX-Ergebnisse für die ORFs auf Bio6

ORF	Größe [AS]	Organis- mus	Identität [%]	Ähnlich-keit [AS/AS _{total}]	Funktion	E-Wert	Accession Nummer
<i>orf01</i>	460	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC25259	57	3-343/343	Hypotheti- sches Protein Tpd_0236	4e-91	YP_313994.1
<i>ord01</i>	685	<i>Burkholderia ubonensis</i> Bu	71	1-320/232	Aldo/Keto- Reduktase	2e-124	ZP_02377181.1
<i>pep01</i>	610	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-1	44	41-640/668	Peptidase	1e-140	YP_001792183. 1

Tabelle F: Auflistung der ORFs auf Bio7

ORF	Größe [AS]	Organismus	Identität [%]	Ähnlichkeit [AS/AS _{total}]	Funktion	E-Wert	Accession Nummer
<i>orf01</i>	263	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	95	26-287/287	Ist-like ATP-Bindungs-Protein	4e-138	YP_575675.1
<i>orf02</i>	450	<i>Equus caballus</i>	24	463-728/1040	KIAA1522 (predicted)	0.004	XP_001499871.2
<i>orf03</i>	449	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	96	1-424/424	Transposase	0.0	YP_578020.1
<i>bpiB04</i>	135	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	29	154-217/260	Hypothetisches Protein AN8367.2	2.0	XP_681636.1

Tabelle G: BlastX-Analyse der ORFs auf Bio8

ORF	Größe [AS]	Organismus	Identität [%]	Ähnlichkeit [AS/AA _{total}]	Funktion	E-Wert	Accession Nummer
<i>orf01</i>	576	<i>Methylobacterium chloromethanicum</i>	34	76-600/1319	Hypothetisches Protein MchIDRAFT_0108	3e-71	ZP_02057942.1
<i>bpiB05</i>	587	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	25	99-568/578	Hypothetisches Protein BF0633	3e-33	YP_097916.1

Tabelle H: BlastX-Analyse der ORFs auf Bio9

ORF	Größe [AS]	Organismus	Identität [%]	Ähnlichkeit [AS/AA _{total}]	Funktion	E-Wert	Accession Nummer
<i>bpiB06</i>	175	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW	57	38-138/147	Histidin Triaden Protein	7e-23	YP_002296789.1
<i>bpiB07</i>	224	<i>Xanthomosa campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10	56	1-215/220	Dienlacton-Hydrolase	8e-59	YP_364619.1
<i>orf03</i>	124	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100	95	166-230/622	MiaB-Familien RNA-Modifizierungsenzym	3e-27	YP_001903003.1

2. Abbildungen

Abbildung A: Abgleich der Aminosäuresequenz von BpiB01 mit einer Hydrolase

Abbildung B: Abgleich der Aminosäuresequenz von BpiB05 mit der Neopullulanase

Abbildung C: Übereinstimmung von HypB1 mit der konservierten Domäne der Metallo- β -Lactamase-Superfamilie.

Abbildung D: HPLC-MS-Profile der Chemischen Verseifung und der Spaltung von C₁₂-HSL durch BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09

```

MKNLTKLFLGTVSLTGMLGLAAPAMAQETAAPPAAPAPVPMPAMSGPLTNNPAPFS
LDAVPGIEDVLGKVYVSGIVTGMVMGQTNAHEFPDGRDGYVDLTNGMVVLQKTDGWFQ
WYVQAGAYSYPYTLGVPYTNASTNTGASFGAVPQAWAKVALNDSFNVIAGELPTLIGDEY
AFTYENMNVERGLLWAEPLVSRGVQANYTSGPLTVSLSWNDGFYSNKFNTISGLISYG
FN.GGADTLAFAGEGNLGHYYGNAGSTLFGNNGEIFNLIYTHTSAGAWTISPYFQYENF
AFPGSGKTTTSSSTGAVLITYAFNDFWKLSSGRFEYVDSSGPLNLVLYGVGSNAFSFTITPT
WQYKRFFIRPEVSYVSAGSTTPGAALGPLGNDTDQFRGLLEAGILL

```

Abbildung A: Abgleich der Aminosäuresequenz von BpiB01 mit einer Hydrolase.

Der Bereich von AS 213 bis AS 294 stimmt mit der Hydrolase im Bereich AS 6-93 überein. Die übereinstimmenden AS sind rot gekennzeichnet, ähnliche AS blau. Nicht übereinstimmende AS in diesem Bereich sind in grau gehalten.

```

MFDYLHAFPIVDLLPHRLRSLLEPIGLDPGLRVEVCSHFELDPHGQDRECIQMAMAVVP
DDGKELPLPIEWNHGVVAYSVPASDAKGASEKFCPSLDGHDYVIASWGSGSFYTFNLAE
KVVWMLGLTPRCIGNEEQRMVYDDLGLPEFNVAGGEVSGQYYWQSSRNISWMSNEY
LRRYLWMRGAIGVRTFFYERLMPDTRELRLDMGSEPHVELKGEWWFLLDIREHRGGL
IQLWATVHAIKCELCENQTANGILWPGIDDPVTHDRANSIFDRDSVYLDDRFLEKYEQNSF
YDSTPVKVHGEAWHCSPSYLGQWSFTGCRVRGRNLIRVSLRDLYQAKPEREILHTHVHA
VGLARIAHTDLTEEHIVSKTARLAAELLQLGDHLSELAASLGIDKVASDLVHLSRQDIVDNG
WLNYPQLRRLAQVAPLEMNQQAFLSRCKSIHEIWQSVPLGFLRRLLEAAGVPRDAITQW
GSLKLFQTLNILEGLDRSEERVDVYRNREAPQNWDARNPGISALFVCNELRIADAHVVG
EKLVLQQLGFDASLRHGYGLALDFVDRVIEAFATINRPFASIFRRTLL

```

Abbildung B: Abgleich der Aminosäuresequenz von BpiB05 mit der Neopullulanase.

Der Bereich von AS 23 bis AS 182 stimmt mit der Neopullulanase im Bereich AS 195-359/637 überein. Die übereinstimmenden AS sind rot gekennzeichnet, ähnliche AS blau. Nicht übereinstimmende AS in diesem Bereich sind in grau gehalten. Die Calciumbindestellen sind in orange gehalten und kursiv markiert.

		10	20	30	40	50	60	70	80
	********
hypB	66	VPEFGIGQRALLV	RTGTGNILWDCV	LINPDTVALINALGG	----	ISATAISHPHY	----	VTSMVWSRAFGG	APIYLHEDD 139
gloB	19	VGPLSGNSVYLLV	DGEGGAVLIDTG	LGDAEAALLEALAA	gldVDAILL	HGHFdh	IGGAAVLKEAFGA	APVIAPAEV 97	
		90	100	110	120	130	140	150	
	********
hypB	140	REWVQRDV	-----	ITFWQGETHALG	HGLTLIRVGGHFRG	fqv	HSAAEAHGHGALFTGD	195	
gloB	98	PLLLREEILR	kagvtaeayaapgaspl	RALEDGDELDL	gLELEVLHTPGHTPG	----	HIVFLLLEDGGVLTGD	167	

Abbildung C: Übereinstimmung von HypB1 mit der konservierten Domäne der Metallo- β -Lactamase-Superfamilie. Die größte Übereinstimmung in dieser konservierten Domäne zeigte HypB1 mit dem Protein GloB. Die übereinstimmenden AS sind rot gekennzeichnet, nicht übereinstimmende Bereiche sind blau. Die grauen Bereiche markieren fehlende AS. Die katalytische Domäne, das Zink-Bindungs-Motiv HXHX-DH, ist mit einer roten Umrahmung markiert.

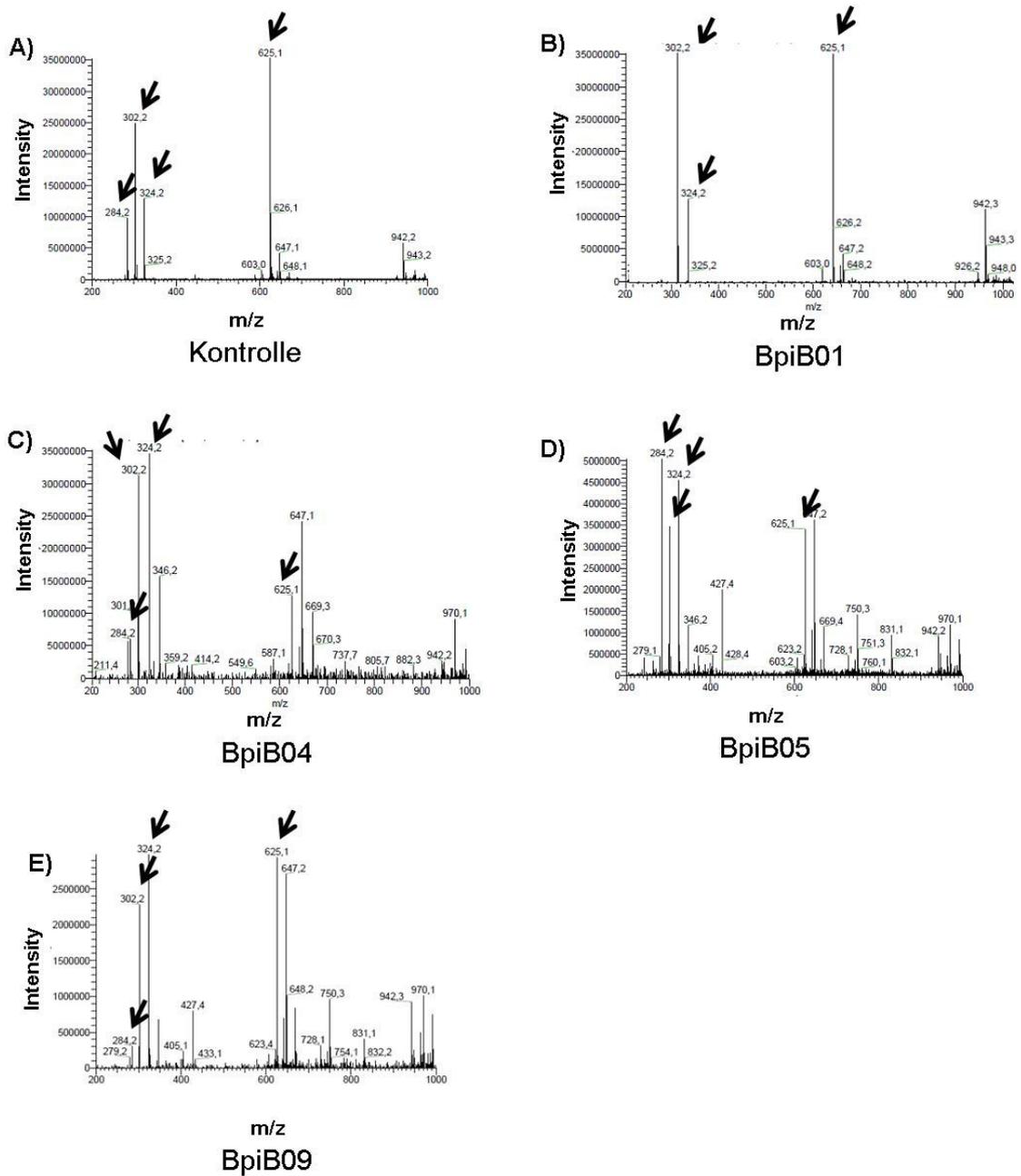


Abbildung D: HPLC-MS-Profile der Chemischen Verseifung und der Spaltung von C₁₂-HSL durch BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09. Abbildungsteil A zeigt das Massenspektrum des chemisch verseiften Spaltproduktes mit Massen von 284 [M-H₂O+H], 302 [M+H], 324 [M+ Na] und 625 [2 M+Na]. (gekennzeichnet mit schwarzen Pfeilen). In den Abbildungsteilen B-E zeigen alle mit den Proteinen BpiB01, BpiB04, BpiB05 und BpiB09 inkubierten C₁₂-HSL-Ansätze ebenfalls Spaltprodukt mit den der Kontrolle übereinstimmenden Massen, die ebenfalls durch schwarze Pfeile gekennzeichnet sind.

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit, für die Bereitstellung des Themas und die gute Betreuung während der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der AG Streit des Biofilm-Centers in Duisburg und später des Labors in Hamburg, ebenso bei allen anderen Mitgliedern des Biofilmcenters, die meinen Weg im Laufe der Zeit gekreuzt haben. Es war eine wunderbare und ereignisreiche Zeit, die ich nicht missen möchte.

Besonderer Dank geht hierbei an Sabine Dietl, Helen Steele, Julia Pottkämper, Christian Elend, Minna Eklund, Dagmar Krysciak und Mariel Grooters sowie an Claudia Hornung, Patrick Bijtenhorn und Christel Vollstedt, bei denen ich mich für die gute Zusammenarbeit und unterhaltsame Laborzeit bedanken möchte.

Ein großer Dank geht auch an die AG Grond aus Göttingen, insbesondere an Melanie Quitschau für die Durchführung der HPLC-MS-Analytik, für ein stets offenes Ohr bei Fragen und für die immer netten Treffen in Göttingen.

Nancy Weiland danke ich sehr für die Tests meiner Proteine mit Ihren QS-Reportersystemen.

Martin Strathmann aus der AG Flemming des Biofilm-Centers danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Biofilm-Tests, ebenso Jost Wingender.

Dank auch an Prof. Christian Mayer für die Durchführung der NMR-Messungen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Siebers herzlich bedanken.

Dankeschön auch an Peter Barthen und alle Mitglieder der AG Frohn für Ihre Hilfsbereitschaft und die stets unproblematische Versorgung mit Trockeneis.

Ebenfalls möchte ich mich bei den beiden Mitgliedern des Chemikaleinlagers, Thorsten Werner und Wolfgang Giesen und den Sekretärinnen des Biofilm-Centers, insbesondere Danica Behrends und Christiane Leuchtenberger, für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Der größte Dank gilt meiner Familie für deren vorbehaltlose und große Unterstützung, ohne die mein Studium und die Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären. Und natürlich meinem Mann Mike für seine Hilfe und Unterstützung in den gesamten letzten Jahren, vielen lieben Dank dafür.