

**Der Einfluss des Proteins HalS
von *Pseudomonas aeruginosa*
auf die interzelluläre Kommunikation**

Inaugural Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Silke Heckmann

aus Datteln

Düsseldorf, November 2005

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Korreferent: Prof. Dr. Joachim F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2005

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie die konstruktiven Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Projekts „Rolle extrazellulärer Enzyme bei Aufbau, Erhalt und Abbau von Biofilmen“.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie, vor allem des Labors 206, bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. Frank Rosenau und Frau Dr. Susanne Wilhelm danke ich für die zahlreichen Gespräche und konstruktiven Diskussionen. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Denis Tielker und Frau Dr. Aileen Funke für die Durchsicht des Manuskriptes.

Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Christian Leggewie und Frau Andrea Kreuz danken, die nicht nur in unserem kleinen Büro für wertvolle Anregungen, Aufmunterung, Spaß und vieles mehr gesorgt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Marco Oldiges und Frau Nadine Stein vom Institut für Biotechnologie 2 sowie Frau Dr. Bea Santiago-Schübel von der Zentralabteilung für Chemische Analysen für die große Hilfsbereitschaft sowie die Durchführung der MS-Analysen.

Herrn Dr. Jost Wingender, Herrn Dr. Martin Strathmann und Frau Dr. Petra Tielen der Abteilung Aquatische Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen danke ich für die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei der Laser-Scanning Mikroskopie.

Mein persönlichster und herzlichster Dank gilt:

Meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und vor allem den drei Kleinsten für die wunderbare Ablenkung. Meinen Freunden, von denen ich insbesondere Silke für viel Spaß und Beistand während meiner Promotionszeit (und insgesamt 20 Jahren!) danken möchte. Mein besonderer Dank gilt auch Torsten für seine großartige Unterstützung und für noch so vieles mehr...

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion:

Heckmann, S., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2005) HalS, a new protein from *Pseudomonas aeruginosa* influencing quorum sensing. Manuskript in Vorbereitung.

Posterpräsentationen:

Wingender, J., Tielen, P., Strathmann, M., Flemming, H.-C., Heckmann, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2001) Extracellular enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Book of abstracts, *Pseudomonas* 2001, Brüssel, Belgien, p. 157.

Heckmann, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. (2003) HalS from *Pseudomonas aeruginosa*: a hydrolase for inactivation of autoinducers? Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2003, Berlin, p. 59.

Heckmann, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. (2003) HalS of *Pseudomonas aeruginosa* is involved in AHL degradation. Book of abstracts, *Pseudomonas* 2003, Québec, Canada, p. 83.

Rosenau, F., Heckmann, S., Smolski, A., Wingender, J., Flemming, H.-J., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. (2003) The lipase LipC of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for cell motility and affects rhamnolipid production and biofilm formation. Book of abstracts, ASM Conference, Biofilms 2003, Victoria, British Columbia, Canada, p. 82.

Heckmann, S., Gdynia, A., Tielen, P., Wingender, J., Flemming, H.-C., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2005) The physiological role of the extracellular lipase LipC from *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts, *Pseudomonas* 2005, Marseille, Frankreich, p. 141.

Heckmann, S., Kreuz, A., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. (2005) HalS affects quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2005, p. 165.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	IV
Abkürzungen	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Quorum-sensing</i> (QS) bei <i>Vibrio fischeri</i> : das Modellbeispiel der AHL-abhängigen Regulationsmechanismen	1
1.2 Signalmoleküle Gram-negativer Bakterien: <i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlactone (AHLs)	3
1.3 <i>Quorum-sensing</i> bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.4 <i>Quorum-sensing</i> und Virulenz bei <i>P. aeruginosa</i>	8
1.5 <i>Quorum-sensing</i> und globale Regulation bei <i>P. aeruginosa</i>	11
1.6 Interspezies-Kommunikation	12
1.7 Inhibierung der interzellulären Kommunikation (<i>Quorum-quenching</i>)	13
1.7.1 AHL-degradierende Enzyme bei Bakterien	14
1.7.2 AHL-degradierende Enzyme bei Eukaryonten	18
1.7.3 Inhibierung der interzellulären Kommunikation als antimikrobielle Therapie	19
1.8 Ziele dieser Arbeit	20
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Chemikalien und Enzyme	22
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	22
2.3 Oligonukleotide	24
2.4 Nährmedien	25
2.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	26
2.6 Kultivierung von Biofilmen	26
2.6.1 Kultivierung von Biofilmen auf Glasobjektträgern	26
2.6.2 Kultivierung von Biofilmen in Durchflusszellen	26
2.7 Isolierung von Nukleinsäuren	27
2.8 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	27
2.9 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	27
2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	27
2.11 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	28
2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.13 Reverse Transkription	28
2.14 Sequenzierung von DNA	28

2.15	Konstruktion <i>halS</i> -defizienter Stämme von <i>P. aeruginosa</i>	28
2.16	Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten (GZE).....	29
2.17	Extraktion von <i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlactonen (AHLs).....	30
2.17.1	Extraktion von AHL-Signalmolekülen aus Kulturüberständen.....	30
2.17.2	Extraktion von AHL-Signalmolekülen aus Bakterienzellen.....	30
2.18	AHL-Degradationstests.....	30
2.19	Detektion von AHL-Signalmolekülen	31
2.19.1	Dünnschichtchromatographische Auftrennung von AHL-Signalmolekülen.....	31
2.19.2	Detektion von AHL-Signalmolekülen mit Indikatorbakterien	31
2.19.3	Detektion von AHL-Signalmolekülen mittels LC-MS/MS	31
2.20	Extraktion und Detektion des <i>Pseudomonas-quinolone</i> -Signals (PQS).....	32
2.21	Quantifizierung der Pyocyanin-Produktion	33
2.22	Orcinol-Test zum Rhamnolipid-Nachweis	33
2.23	Nachweis der Pathogenität im Pflanzenmodell	33
2.24	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.25	Denaturierung und <i>in vitro</i> -Renaturierung des HalS _{LecB} -Fusionsproteins.....	34
2.26	Enzymaktivitätstests	34
2.26.1	Detektion der Proteaseaktivität	34
2.26.2	Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität.....	34
2.27	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM).....	34
2.28	Computerprogramme und Online-Datenbanken.....	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Das Protein HalS von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> zeigt Homologien zu AHL-Lactonasen	36
3.2	Konstruktion <i>halS</i> -defizienter und <i>halS</i> -überexprimierender Stämme von <i>P. aeruginosa</i>	38
3.3	Die <i>halS</i> -Deletion führt zu einer Erhöhung der Pyocyaninproduktion.....	40
3.4	Die <i>halS</i> -Überexpression inhibiert die Schwärmbewegung	41
3.5	Durch die <i>halS</i> -Überexpression wird der Rhamnolipidgehalt reduziert.....	43
3.6	Einfluss von HalS auf die Biofilmbildung.....	44
3.6.1	Biofilmbildung unter statischen Kulturbedingungen.....	45
3.6.2	Biofilmbildung unter dynamischen Kulturbedingungen	46
3.7	Die extrazelluläre proteolytische Aktivität wird durch die <i>halS</i> -Überexpression herabgesetzt.....	47

3.7.1 Die <i>lasB</i> -Expression wird durch die <i>halS</i> -Überexpression gesteigert	49
3.8 Einfluss von HalS auf die Pathogenität von <i>P. aeruginosa</i>	50
3.9 Untersuchungen zur Wirkungsmechanismus des HalS-Proteins.....	51
3.9.1 Einfluss von HalS auf die Signalmolekül-Produktion bei <i>P. aeruginosa</i>	52
3.9.2 Degradation synthetischer AHL-Signalmoleküle durch gereinigtes HalS	55
3.9.3 Degradation synthetischer AHL-Signalmoleküle durch Gesamtzellextrakte	57
3.9.4 Nachweis der AHL-Signalmoleküle mittels LC-MS/MS	60
3.9.5 Einfluss von HalS auf artfremde Signalmoleküle.....	63
3.10 Untersuchungen zur transkriptionalen Regulation des <i>halS</i> -Gens.....	65
3.11 Das <i>halS</i> -Gen ist in einem Operon organisiert	67
4 DISKUSSION	69
4.1 Identifizierung des AHL-Lactonase-homologen Proteins HalS von <i>P. aeruginosa</i> ...	69
4.2 Einfluss der <i>halS</i> -Expression auf die Virulenzfaktor-Produktion bei <i>P. aeruginosa</i> .	72
4.2.1 Zusammenfassende Betrachtung des Einflusses von HalS auf Zelldichte- abhängige Phänotypen	79
4.3 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des HalS-Proteins	80
4.3.1 Analyse der Signalmolekül-Produktion von <i>P. aeruginosa</i>	80
4.3.2 <i>In vitro</i> -Analyse der AHL-Degradation durch HalS.....	84
4.4 Regulation der <i>halS</i> -Expression.....	90
4.5 Die physiologische Funktion AHL-degradierender Enzyme.....	92
4.5.1 Beurteilung der Funktion des HalS-Proteins von <i>P. aeruginosa</i>	94
5 ZUSAMMENFASSUNG	97
6 LITERATUR.....	99
7 ANHANG	111

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Regulation der Biolumineszenz bei <i>Vibrio fischeri</i> .	2
Abb. 2	Strukturen von <i>Quorum-sensing</i> -Signalmolekülen.	5
Abb. 3	<i>Quorum-sensing</i> bei <i>P. aeruginosa</i> .	8
Abb. 4	Mechanismen zur AHL-Degradation durch AHL-Lactonasen und AHL-Acylasen.	15
Abb. 5	Einfluss der AHL-Lactonase AiiA auf die Pathogenität von <i>E. carotovora</i> .	16
Abb. 6	Vergleich der Aminosäuresequenzen von HalS aus <i>P. aeruginosa</i> (Pa_HalS) und AHL-Lactonasen.	37
Abb. 7	Konstruktion und Nachweis der <i>halS</i> -defizienten Mutanten von <i>P. aeruginosa</i> .	39
Abb. 8	Einfluss der <i>halS</i> -Expression auf die Pyocyaninproduktion von <i>P. aeruginosa</i> .	41
Abb. 9	Inhibierung der Schwärmbewegung durch HalS-Überproduktion.	42
Abb. 10	Nachweis des Schwimmverhaltens (A) und der <i>twitching motility</i> (B) bei <i>P. aeruginosa</i> .	43
Abb. 11	Einfluss der <i>halS</i> -Expression auf die Rhamnolipidgehalte in Kulturüberständen von <i>P. aeruginosa</i> .	44
Abb. 12	CLSM-Aufnahmen von Biofilmen unter statischen Kulturbedingungen.	45
Abb. 13	CLSM-Aufnahmen von Biofilmen unter dynamischen Kulturbedingungen.	47
Abb. 14	Nachweis der proteolytischen Aktivität von <i>P. aeruginosa</i> .	49
Abb. 15	Ermittlung der β -Galaktosidase-Aktivität der translationalen <i>lasB::lacZ</i> -Fusion in Abhängigkeit der <i>halS</i> -Expression.	50
Abb. 16	Vergleich der Virulenz von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (WT) und der <i>halS</i> -Mutante ($\Delta halS$) in einem Pflanzenmodell.	51
Abb. 17	Nachweis der AHL-Signalmoleküle aus <i>P. aeruginosa</i> -Kulturüberständen mittels <i>A. tumefaciens</i> .	53
Abb. 18	Nachweis der AHL-Signalmoleküle aus <i>P. aeruginosa</i> -Kulturüberständen mittels <i>C. violaceum</i> .	54
Abb. 19	Dünnschichtchromatographischer Nachweis von PQS.	55
Abb. 20	Nachweis von synthetischem 3-oxo-C12-HSL nach Inkubation mit gereinigtem HalS _{LecB} .	57
Abb. 21	Nachweis von synthetischem 3-oxo-C12-HSL (A) und 3-oxo-C6-HSL (B) nach Inkubation mit Gesamtzellextrakten aus <i>P. aeruginosa</i> .	59
Abb. 22	LC-MS/MS-Nachweis von 3-oxo-C12-HSL und dessen Degradationsprodukt.	62
Abb. 23	Abschwächung der Pathogenität von <i>Erwinia carotovora</i> gegenüber Kartoffeln durch HalS.	65
Abb. 24	Ermittlung der <i>halS</i> -Promotoraktivität in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und der QS-Mutante $\Delta lasI/rhlI$.	66
Abb. 25	Lokalisation des <i>halS</i> -Gens (ORF PA1415) im Genom von <i>P. aeruginosa</i> .	67
Abb. 26	Nachweis eines gemeinsamen Transkriptes der offenen Leserahmen PA1417, PA1416 und PA1415.	68
Abb. 27	Verteilung der QS-regulierten Gene auf dem <i>P. aeruginosa</i> -Chromosom.	70
Abb. 28	Vergleich der Operonstrukturen von <i>halS</i> aus <i>P. aeruginosa</i> (A) und der AHL-Lactonase <i>attM</i> aus <i>A. tumefaciens</i> (B).	91
Abb. 29	Konstruktion des Mutagenesevektors pSUAL12.	111

Tab. 1	Übersicht verschiedener <i>Quorum-sensing</i> -Systeme Gram-negativer Bakterien.	4
Tab. 2	Vorkommen AHL-degradierender Enzyme bei Prokaryonten und Eukaryonten.	17
Tab. 3	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.	22
Tab. 4	Übersicht der verwendeten Vektoren.	23
Tab. 5	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.	24
Tab. 6	Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika.	26
Tab. 7	HPLC-Parameter für die LC-MS-Kopplung.	32
Tab. 8	Parameter des Triple Quadrupol Massenspektrometers.	32
Tab. 9	Darstellung der Strukturen, HPLC-Retentionszeiten und MS/MS-Fragmentierungsmuster von 3-oxo-C12-HSL und dessen Degradationsprodukt.	62
Tab. 10	Verhältnis des geöffneten zum intakten 3-oxo-C12-HSL in Zellsedimenten von <i>P. aeruginosa</i> .	63
Tab. 11	Einfluss von HalS auf QS-abhängige Phänotypen.	79

Abkürzungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten. Aminosäuren wurden in dem gebräuchlichen Ein-Buchstabencode abgekürzt.

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
AHL(s)	<i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlacton(e)
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
cDNA	komplementäre DNA
CF	cystische Fibrose
Cm ^r	Chloramphenicol-Resistenz
CLSM	konfokale(s) Laser-Scanning-Mikroskop(ie)
CRP	cAMP-Rezeptor-Protein
C-Terminus	Carboxyterminus
3-D	dreidimensional
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESI	Elektrosprayionisation
Gm ^r	Gentamycin-Resistenz
GZE	Gesamtzellextrakt(e)
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
KÜ	Kulturüberstand
λ	Wellenlänge
LC	Kurzform von HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LV	Leervektor
M	Molar
Mb	Megabasen
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MS	Massenspektrometrie
N-Terminus	Aminoterminal
O.D.	optische Dichte
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-Galactosid
ORF	<i>open reading frame(s)</i> , offene(r) Leserahmen
p.A.	<i>per analyse</i>

PCR	Polymerasekettenreaktion
P_{lac}	Promotor des <i>lacZYA</i> -Operons
PQS	<i>Pseudomonas quinolone</i> -Signal
QS	Quorum-sensing
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sm^r	Streptomycin-Resistenz
Sp^r	Spectinomycin-Resistenz
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc^r	Tetracyclin-Resistenz
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtkultur(en)
UV	Ultraviolett
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Nomenklatur für AHL-Signalmoleküle:

C4-HSL	<i>N</i> -Butanoyl-L-Homoserinlacton
C6-HSL	<i>N</i> -Hexanoyl-L-Homoserinlacton
3-oxo-C6-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Hexanoyl)-L-Homoserinlacton
3-oxo-C8-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Octanoyl)-L-Homoserinlacton
3-oxo-C10-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Decanoyl)-L-Homoserinlacton
3-oxo-C12-HSL	<i>N</i> -(3-oxo-Dodecanoyl)-L-Homoserinlacton

1 EINLEITUNG

Bakterien wurden lange Zeit als einzellige Lebewesen angesehen, die unabhängig voneinander ihre biologischen Funktionen ausführen. Seit den letzten vier Jahrzehnten häuften sich jedoch die Erkenntnisse, dass diese Art der strikt einzelligen Lebensweise eher die Ausnahme darstellt. Stattdessen leben Bakterien in multizellulären Gemeinschaften und zeigen ein aufeinander abgestimmtes Verhalten. So existiert der größte Teil aller in der Natur vorkommenden Bakterien in Biofilmen (Costerton *et al.*, 1999; Costerton *et al.*, 1995). Innerhalb dieser, an einer Oberfläche angehefteten, Bakterienpopulation können die Zellen an unterschiedlichen Stellen unterschiedliche Aktivitäten zeigen, so dass innerhalb eines Biofilms eine Spezialisierung der Zellen vorliegt (Wimpenny *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1998).

Voraussetzung für die Organisation in einer multizellulären Gemeinschaft ist die Zell-Zell-Kommunikation. Entdeckt wurde das Phänomen der interzellulären Kommunikation in den 60er Jahren anhand der Zelldichte-abhängigen Regulation der Biolumineszenz bei *Vibrio fischeri* (Kempner & Hanson, 1968; Nealson *et al.*, 1970).

1.1 Quorum-sensing (QS) bei *Vibrio fischeri*: das Modellbeispiel der AHL-abhängigen Regulationsmechanismen

Die Zelldichte-abhängige Regulation der Biolumineszenz bei *V. fischeri* konnte 1981 auf die Produktion niedermolekularer Substanzen, der so genannten „Autoinducer“ zurückgeführt werden (Eberhard *et al.*, 1981). Diese *N*-Acyl-L-Homoserinlactone (AHLs) werden von der Signalmolekül-Synthase LuxI synthetisiert. Bei zunehmender Populationsdichte steigt die Konzentration dieser Signalmoleküle, die durch die Membran diffundieren können und somit auch außerhalb der Zelle akkumulieren (Abb. 1). Bei Erreichen der so genannten Schwellenwertkonzentration binden die Signalmoleküle an den Transkriptionsaktivator LuxR. Dieser Komplex bindet an die Promotorregion des Biolumineszenz-Operons *luxICDABEG* und aktiviert dessen Transkription (Engbrecht *et al.*, 1983; Swartzman *et al.*, 1990). Dadurch wird sowohl die Biolumineszenz als auch eine verstärkte Produktion der Signalmoleküle induziert. Da auch das *luxI*-Gen durch die Signalmoleküle positiv reguliert wird, verstärken sie ihre eigene Produktion und wurden daher als „Autoinducer“ bezeichnet (Eberhard *et al.*, 1981).

Die Bindung von AHL-aktivierten Transkriptionsregulatoren an die DNA erfolgt an so genannte *lux*-Boxen (Abb. 1). Diese 20 bp großen invertierten Sequenzwiederholungen

(*inverted repeats*) befinden sich ca. 40 bp stromaufwärts von Genen, die durch LuxR-homologe Proteine reguliert werden, und wurden auch in vielen anderen Organismen identifiziert (Devine *et al.*, 1989; Eglund & Greenberg, 1999).

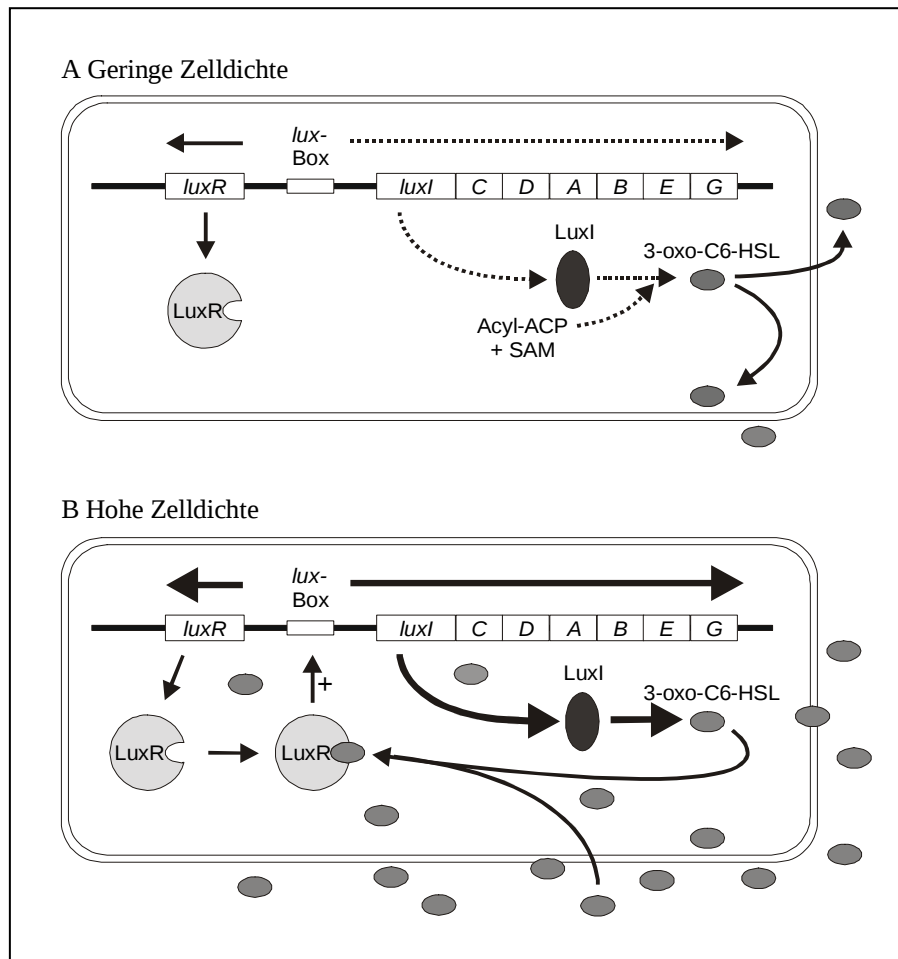


Abb. 1: Regulation der Biolumineszenz bei *Vibrio fischeri* (modifiziert nach Whitehead *et al.*, 2001). **A:** Bei geringer Zelldichte findet aufgrund der niedrigen Konzentration des Signalmoleküls 3-oxo-C6-HSL nur eine schwache Transkription der Biolumineszenzgene (*luxICDABEG*) statt. **B:** Bei hohen Zelldichten wird eine Schwellenwertkonzentration von 3-oxo-C6-HSL erreicht, das Signalmolekül bindet an LuxR und aktiviert die Transkription von *luxICDABEG*. Es kommt zur verstärkten Produktion der Signalmoleküle sowie zur Emission von Licht.

Kommunikationssysteme, über die Bakterien die Zelldichte wahrnehmen und physiologische Prozesse in Abhängigkeit der Populationsdichte regulieren können, werden in der Literatur als *Quorum-sensing*-Systeme zusammengefasst, wobei die kleinste Einheit, die zu Zelldichte-abhängigen Reaktionen befähigt ist, per Definition das *Quorum* darstellt (Fuqua *et al.*, 1994). So wird die Biolumineszenz bei *V. fischeri* erst bei einer Zelldichte ausgelöst, die hoch genug ist, um sichtbares Licht zu emittieren. Derart hohe Zelldichten werden im freien Meerwasser nicht erreicht, so dass die Bakterien in dieser nährstoffarmen Umgebung keine Energie für

eine unnötige Lichtproduktion vergeuden (Nealson & Hastings, 1979). Die höchsten Zelldichten (ca. 10^{11} Zellen pro ml) erreicht *V. fischeri* im Lichtorgan der mit ihnen in Symbiose lebenden marinen Fische und Tintenfische (Boettcher & Ruby, 1995). Innerhalb dieser Lichtorgane werden die Bakterien mit Nährstoffen versorgt und der Wirt profitiert von der Lichtproduktion.

1.2 Signalmoleküle Gram-negativer Bakterien: *N*-Acyl-L-Homoserinlactone (AHLs)

Nach der Entdeckung des LuxR/I-*Quorum-sensing*-Systems bei *V. fischeri* wurden auch bei vielen anderen Bakterien QS-Systeme identifiziert, und seit den 90er Jahren ist die Zell-Zell-Kommunikation über AHL-Signalmoleküle als weit verbreitetes Phänomen unter Gram-negativen Bakterien akzeptiert (Fuqua *et al.*, 1996; Swift *et al.*, 1999). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht verschiedener QS-Systeme, die eine Vielzahl verschiedener Phänotypen regulieren. Dazu gehören unter anderem die Produktion und Sekretion von Virulenzfaktoren, Antibiotikaproduktion, Beweglichkeit, Biofilmbildung und konjugativer Plasmid-Transfer. Die QS-Systeme bestehen jeweils aus Proteinen mit Homologien zu LuxI und LuxR, die von LuxI-homologen Proteinen synthetisierten Signalmoleküle gehören zur Klasse der *N*-Acyl-L-Homoserinlactone. Diese Moleküle bestehen aus einem Lactonring und einer Acyl-Seitenkette. Unterschiede liegen in der Länge dieser Seitenkette (bisher wurden Moleküle mit 4 bis 14 C-Atomen beschrieben) sowie der Modifikation an der Position C3 (3-oxo- bzw. 3-hydroxygruppe). Die Strukturen einiger AHL-Signalmoleküle sind in Abbildung 2 dargestellt.

Tab. 1: Übersicht verschiedener Quorum-sensing-Systeme Gram-negativer Bakterien.

Spezies	Signalmolekül	QS-System	Phänotyp	Referenz
<i>Vibrio fischeri</i>	3-oxo-C6-HSL	LuxI/LuxR	Biolumineszenz	Eberhard <i>et al.</i> , 1981
<i>Vibrio harveyi</i>	3-hydroxy-C4-HSL	LuxLM/LuxN	Biolumineszenz	Bassler <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-oxo-C12-HSL	LasI/LasR	Exoenzyme, RhlR, Xcp, Biofilmbildung, ...	Passador <i>et al.</i> , 1993; Gambello & Iglewski, 1991
	C4-HSL	RhlI/RhlR	Exoenzyme, Pyocyanin, Rhamnolipide, ...	Brint & Ohman, 1995; Pearson <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	C6-HSL	PhzI/PhzR	Phenazin-Antibiotika	Pierson <i>et al.</i> , 1994
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-oxo-C8-HSL	TraI/TraR	konjugativer Plasmid-Transfer	Piper <i>et al.</i> , 1993
<i>Erwinia carotovora</i>	3-oxo-C6-HSL	ExpI/ExpR	Exoenzyme	Pirhonen <i>et al.</i> , 1993
		CarI/CarR	Carbapenem-Antibiotika	Bainton <i>et al.</i> , 1992
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3-oxo-C6-HSL	ExpI/ExpR	Pectatlyase	Nasser <i>et al.</i> , 1998
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	CviI/CviR	Exoenzyme, Antibiotika, Violacein	McClellan <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia cepacia</i>	C8-HSL	CepI/R	Protease, Siderophore	Lewenza <i>et al.</i> , 1999
<i>Ralstonia solanacearum</i>	C8-HSL	SolI/SolR	?	Flavier <i>et al.</i> , 1997
<i>Serratia liquifaciens</i>	C4-HSL	SwrI/SwrR	Extrazelluläre Protease, Schwärmen	Eberl <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	7-cis-C14-HSL	CerI/CerR	Ablösung von Bakterienaggregaten	Puskas <i>et al.</i> , 1997
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3-oxo-C6-HSL	EagI/EagR	?	Swift <i>et al.</i> , 1993
<i>Escherichia coli</i>	?	?/SdiA	Zellteilung	Withers & Nordstrom, 1998
<i>Yersinia enterocolitica</i>	C6-HSL	YenI/YenR	?	Throup <i>et al.</i> , 1995
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	C8-HSL	YesI/YesR	?	Atkinson <i>et al.</i> , 1999

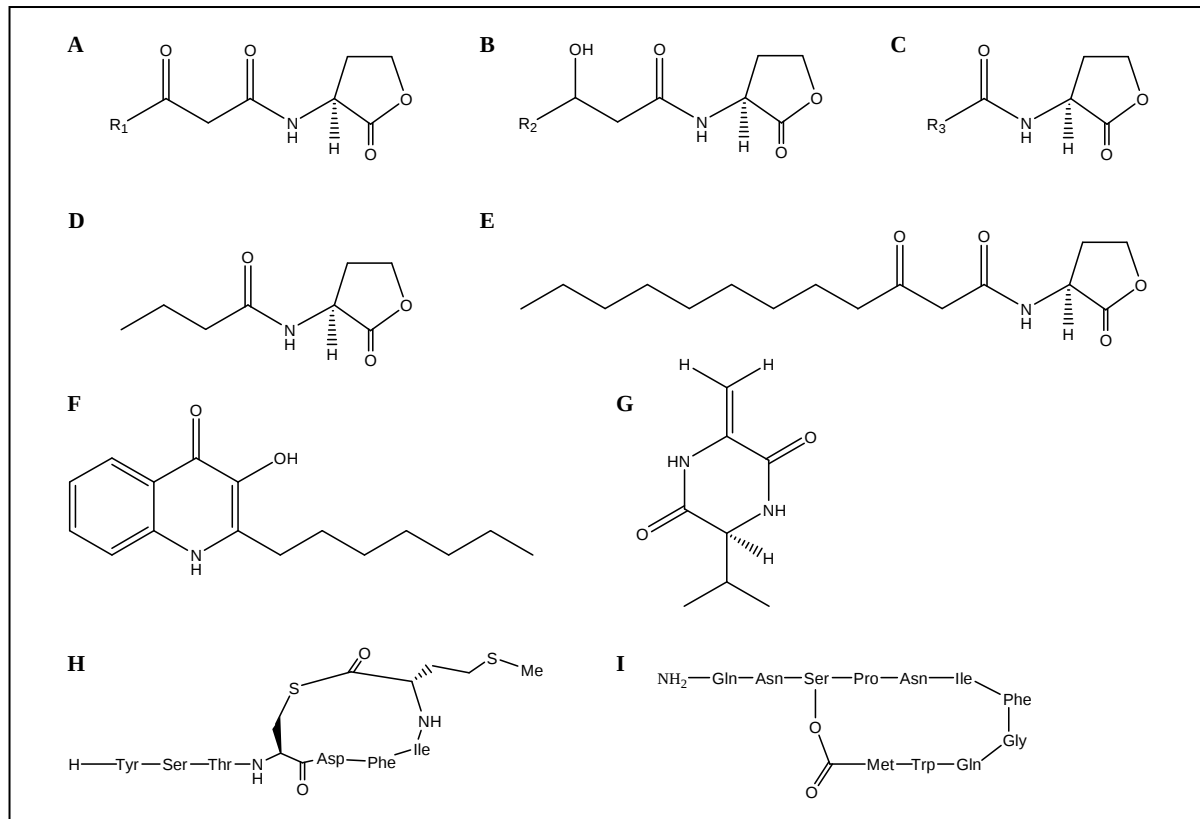


Abb. 2: Strukturen von Quorum-sensing-Signalmolekülen. Dargestellt sind generelle Strukturen der *N*-Acyl-L-Homoserinlactone Gram-negativer Bakterien mit oxo- (A), hydroxy- (B) oder keiner Substitution (C) an Position C3. *P. aeruginosa* produziert die AHLs C4-HSL (D) und 3-oxo-C12-HSL (E) sowie das *Pseudomonas-quinolone*-Signal (PQS) 2-heptyl-3-hydroxy-4-Quinolone (F) und das Diketopiperazin (DKP) cyclo(ΔAla-L-Val) (G). (H) und (I) zeigen die Quorum-sensing-Peptide der Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis* (aus Camara *et al.*, 2002).

1.3 Quorum-sensing bei *Pseudomonas aeruginosa*

Eines der bestuntersuchten bakteriellen Zell-Zell-Kommunikationssysteme ist das QS-Netzwerk von *P. aeruginosa*. Dieses besonders vielseitige und ubiquitär verbreitete γ -Proteobakterium kann Infektionen bei Menschen, Tieren und Pflanzen hervorrufen (Smith & Iglewski, 2003b). Als opportunistischer Krankheitserreger befällt dieser Organismus insbesondere immunsupprimierte Patienten, die an Krebs, AIDS, Brandwunden oder der Erbkrankheit cystische Fibrose (CF) leiden (Fergie *et al.*, 1994; Lyczak *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996). Infektionen des bronchopulmonalen Traktes durch *P. aeruginosa* gelten bei CF-Patienten als Haupttodesursache (Jaeger, 1994). Zudem ist dieser Keim für die meisten, durch Gram-negative Bakterien verursachten nosokomialen Infektionen verantwortlich (Picard *et al.*, 1994; Römling *et al.*, 1994). Therapien gegen *P. aeruginosa*-Infektionen werden durch die hohe intrinsische Antibiotikaresistenz sowie durch die Ausbildung von Biofilmen auf dem Wirtsgewebe erschwert (Conway *et al.*, 2003; Høiby, 2002).

Das pathogene Potential dieses Stammes ist auf die Produktion und Sekretion einer Vielzahl von Virulenzfaktoren zurückzuführen, von denen viele durch QS reguliert werden, z. B. Elastase, Exotoxin A, Phospholipase C, Pyocyanin und Rhamnolipide (Whitehead *et al.*, 2001; Winzer & Williams, 2001). *P. aeruginosa* hat zwei QS-Systeme des LuxR/I-Typs (Abb. 3). Zunächst wurde das für die Expression der Elastase LasB verantwortliche Regulationssystem beschrieben, welches als Las-System bezeichnet wird (Gambello & Iglewski, 1991). Die Signalmolekül-Synthase LasI synthetisiert das langkettige *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-Homoserinlacton (3-oxo-C12-HSL) (Pearson *et al.*, 1994). Der Transport dieses Signalmoleküls aus und in *P. aeruginosa*-Zellen erfolgt über eine langsame Diffusion sowie einen aktiven Export über die MexAB-OprM Pumpe, dabei wurde eine dreifach höhere Konzentration des Signalmoleküls in den Zellen ermittelt (Pearson *et al.*, 1999). Durch Bindung des 3-oxo-C12-HSL an den entsprechenden Transkriptionsaktivator LasR kommt es zur verstärkten Transkription von *lasI* und damit zum rapiden Anstieg an verfügbarem *Autoinducer*. Das Las-System reguliert neben der Produktion von LasB unter anderem auch LasA, Exotoxin A und das Xcp-Sekretionssystem (Chapon-Hervé *et al.*, 1997; Gambello *et al.*, 1993; Passador *et al.*, 1993; Toder *et al.*, 1991).

Das zweite QS-System ist das Rhl-System mit dem zugehörigen kurzkettigen Signalmolekül *N*-Butanoyl-L-Homoserinlacton (C4-HSL) (Pearson *et al.*, 1995). C4-HSL kann frei durch die *P. aeruginosa*-Membran diffundieren, so dass sich schnell ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer Konzentration einstellt (Pearson *et al.*, 1999). Als erste vom Rhl-System abhängige Expression wurde die des *rhlAB*-Operons entdeckt. Dieses Operon kodiert für eine Rhamnosyltransferase, die für die Rhamnolipid-Synthese erforderlich ist (Ochsner & Reiser, 1995). Weiterhin beeinflusst das Rhl-System die Produktion der Virulenzfaktoren LasA, LasB, LecA und Pyocyanin (Brint & Ohman, 1995; Latifi *et al.*, 1995; Winzer *et al.*, 2000).

Die beiden QS-Systeme agieren nicht unabhängig voneinander, sondern sie unterliegen einer hierarchischen Anordnung, in der das Las-System das Rhl-System kontrolliert (Abb. 3). Das AHL-aktivierte LasR-Protein aktiviert nicht nur die Expression von *lasI*, sondern auch die *rhlR*-Expression, so dass eine Aktivierung des Las-Systems eine Aktivierung des Rhl-Systems nach sich zieht. Eine weitere, posttranslationale Kontrolle über das Rhl-System ergibt sich durch die von Pesci *et al.* (1997) beschriebene Inhibierung der Bindung des C4-HSL an das zugehörige RhlR-Protein durch das 3-oxo-C12-HSL. Es wurde gezeigt, dass die Anwesenheit des 3-oxo-C12-HSL die RhlR/C4-HSL-abhängige Expression von *rhlA* reduziert. Hier wurde postuliert, dass die kompetitive Bindung des langkettigen Signalmoleküls an RhlR nö-

tig ist, um eine frühe Induktion von *rhlI* sowie der Rhl-abhängigen Gene zu verhindern. Jedoch wurden die Untersuchungen im heterologen Wirt *Escherichia coli* durchgeführt. Später wurde von Winzer *et al.* (2000) gezeigt, dass die RhlR/C4-HSL-abhängige Expression von *lecA* nur im heterologen Wirt *E. coli*, nicht aber in *P. aeruginosa* durch 3-oxo-C12-HSL verringert wird. Diese Art der Kontrolle des Las-Systems über das RhlR-System bleibt also vorerst ungeklärt.

Eine weitere Verbindung zwischen dem Las- und dem Rhl-System stellt das *Pseudomonas-quinolone*-Signal (PQS) dar. Dieses 2-heptyl-3-hydroxy-4-Quinolon unterscheidet sich strukturell stark von den anderen beiden Signalmolekülen (Abb. 2.F). Es ähnelt den Quinolon-Antibiotika, zeigt aber keine antibakterielle Wirkung. Die PQS-Produktion ist vom Las-System abhängig, für die Bioaktivität wird RhlR benötigt (Pesci *et al.*, 1999). Die Produktion dieses Signalmoleküls unterliegt einer komplexen Regulation und ist vom Verhältnis zwischen 3-oxo-C12-HSL und C4-HSL abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die PQS-Synthese als auch die Transkription des entsprechenden Operons *pqsABCDE* positiv vom Las- und negativ vom Rhl-System beeinflusst werden (McGrath *et al.*, 2004).

PQS wird in der frühen Stationärphase gebildet und erhöht die Expression von *lasB*, *rhlR* und *rhlI* (Diggle *et al.*, 2003; McKnight *et al.*, 2000; Pesci *et al.*, 1999). Eine Beteiligung an der Wahrnehmung der Zelldichte wird für PQS nicht angenommen (McKnight *et al.*, 2000). Obwohl das Rhl-System bei Abwesenheit von PQS aktiv ist, sind bestimmte Rhl-abhängige Phänotypen, wie die Produktion von Pyocyanin und des Lectins LecA, strikt vom PQS abhängig (Diggle *et al.*, 2003). Durch die exogene Zugabe von PQS wird die Biofilmbildung sowie die Produktion verschiedener QS-abhängiger Virulenzfaktoren verstärkt (Calfee *et al.*, 2001; Diggle *et al.*, 2003; McKnight *et al.*, 2000; Pesci *et al.*, 1999). Eine Produktion des PQS während einer Infektion wurde durch die direkte Detektion dieses Signalmoleküls im Sputum von CF-Patienten nachgewiesen (Collier *et al.*, 2002), sowie durch Befunde, die eine erhöhte PQS-Synthese in *P. aeruginosa*-Isolaten aus CF-Lungen belegen (Guina *et al.*, 2003).

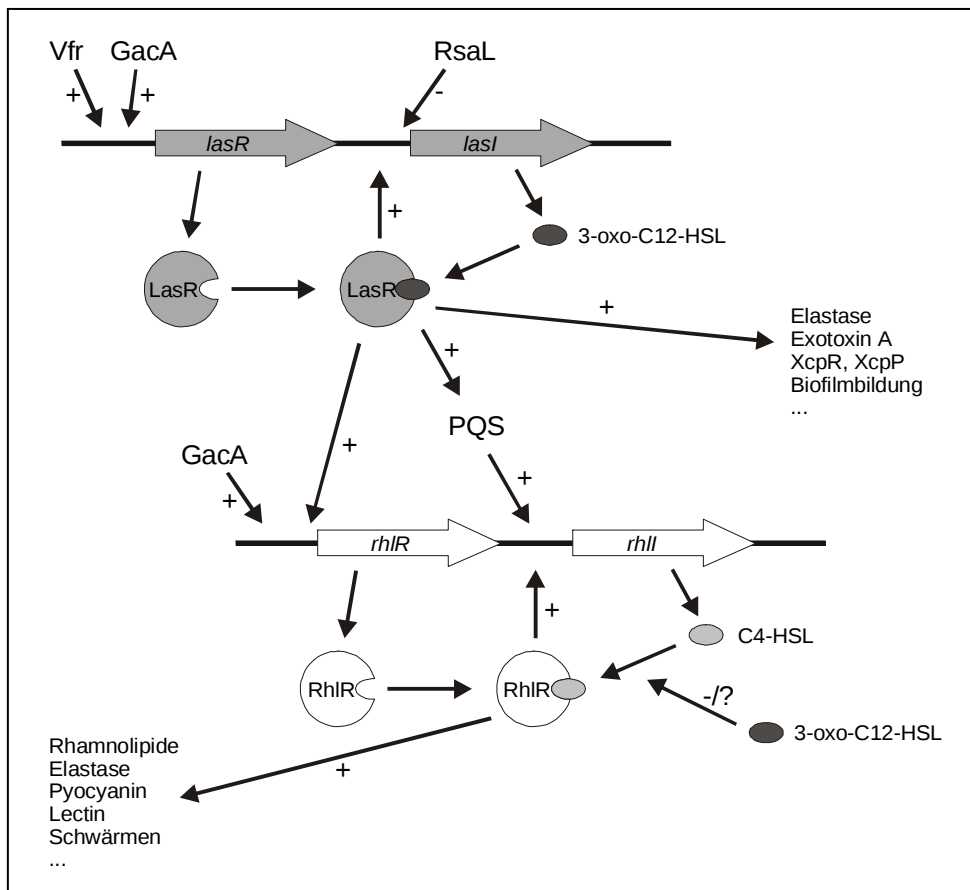


Abb. 3: Quorum-sensing bei *P. aeruginosa* (modifiziert nach Whitehead *et al.* (2001) und Juhas *et al.* (2005)). Die hierarchisch angeordneten QS-Systeme Las und Rhl regulieren die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren über die Signalmoleküle 3-oxo-C12-HSL bzw. C4-HSL. Bei hohen Zelldichten akkumulieren die von LasI bzw. RhII synthetisierten Signalmoleküle, die bei Erreichen einer Schwellenwertkonzentration an die Transkriptionsregulatoren LasR bzw. RhIR binden. Die aktivierten Komplexe LasR/3-oxo-C12-HSL bzw. RhIR/C4-HSL induzieren sowohl die Synthese der Signalmoleküle (Autoinduktion) als auch die Expression verschiedener Virulenzfaktoren. Dabei ist das Las-System dem Rhl-System übergeordnet, eine weitere Verbindung entsteht durch das *Pseudomonas-quinolone*-Signal (PQS). Beide QS-Systeme werden von übergeordneten, globalen Regulatoren kontrolliert, von denen hier die aktivierenden Regulatoren GacA und Vfr sowie der reprimierende Regulator RsaL dargestellt sind.

1.4 Quorum-sensing und Virulenz bei *P. aeruginosa*

Die QS-Systeme sind entscheidend für die Pathogenität von *P. aeruginosa*. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Stämme mit Mutationen in den QS-Genen *lasI*, *rhII* oder *lasR* eine stark abgeschwächte Virulenz aufweisen. Untersucht wurden u. a. Infektionen des respiratorischen Traktes sowie Brandwunden bei Mäusen, die Mortalität von Nematoden und Infektionen von *Arabidopsis*-Blättern (Pearson *et al.*, 2000; Rumbaugh *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999).

Der große Vorteil der QS-regulierten Expression von Virulenzfaktoren für die Bakterien liegt darin, einen „Angriff“ auf den Wirt so lange zu verzögern, bis die Population (das *Quorum*) ausreichend groß ist, um den Wirt effektiv zu schädigen. Eine frühzeitige Produktion von

Virulenzfaktoren einiger weniger Bakterien könnte den Wirt alarmieren und Abwehrmechanismen einleiten. Bei einer Synchronisation der Virulenzfaktorproduktion einer großen Population hingegen bleibt den Wirtsabwehrmechanismen nicht genügend Zeit, um eine Infektion zu bekämpfen.

Eine verzögerte Produktion von Virulenzfaktoren erreichen die Zellen einerseits durch die QS-kontrollierte Transkription dieser Faktoren. Zusätzlich wird aber auch der Export vieler dieser Exoproteine durch QS gesteuert. Der Transport über die äußere Membran erfolgt bei vielen Virulenzfaktoren, wie z. B. Exotoxin A, Elastase und Phospholipase über das Xcp-Sekretionssystem (Tommasen *et al.*, 1992). Die für Komponenten dieses Sekretionssystems kodierenden Gene *xcpP* und *xcpR* benötigen für ihre volle Expression funktionelle Las- und Rhl-Systeme (Chapon-Hervé *et al.*, 1997). Damit haben *P. aeruginosa*-Zellen einen weiteren Kontrollmechanismus entwickelt, um die Produktion von Virulenzfaktoren in Abhängigkeit der Zelldichte zu regulieren.

Bei der Ausbildung von Infektionen haben die AHL-Signalmoleküle von *P. aeruginosa* nicht nur die Funktion, die Expression der Virulenzfaktoren zu regulieren, sie sind auch selbst Virulenzfaktoren, indem sie Entzündungsreaktionen einleiten. Studien von Telford *et al.* (1998) und Smith *et al.* (2001; 2002) belegen, dass 3-oxo-C12-HSL die Produktion von Zytokinen, Lymphozyten und Antikörpern beeinflusst und als Immunsuppressor agieren kann. Weiterhin inhibiert dieses *P. aeruginosa*-Signalmolekül die Muskelkontraktion in Blutgefäßen bei Schweinen (Lawrence *et al.*, 1999). Dadurch könnten die *P. aeruginosa*-Populationen die Blutversorgung und damit ihre eigene Nährstoffversorgung erhöhen.

Ein direkter Einfluss von QS auf Infektionsprozesse wurde auch durch den Nachweis von AHL-Signalmolekülen im Sputum von CF-Patienten sowie der AHL-abhängigen Expression von Reportergenen in den Lungen von infizierten Mäusen gezeigt (Middleton *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2000).

In den Lungen von CF-Patienten sowie auf einer Vielzahl anderer Oberflächen bildet *P. aeruginosa* Biofilme aus, die ein enormes medizinisches, aber auch industrielles Problem darstellen. Denn innerhalb dieser in eine Matrix aus selbst produzierten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebetteten Population weisen die Bakterien eine höhere Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika und der Immunantwort des Wirtes auf (Mah & O'Toole, 2001; Stewart & Costerton, 2001).

Die Entwicklung der komplexen Biofilmstruktur ist sowohl von externen Umweltsignalen als auch vom QS abhängig (Davies *et al.*, 1998). Die Zusammensetzung des umgebenden Mediums, Sauerstoff- und Nährstoffgehalt sowie der pH-Wert nehmen großen Einfluss auf den

mehrstufigen Entwicklungsprozess (Sauer *et al.*, 2002; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). Als erste Voraussetzung für die Biofilmbildung wurde die Beweglichkeit der *P. aeruginosa*-Zellen beschrieben (O'Toole & Kolter, 1998). Planktonische Zellen können mittels der polaren Flagelle in flüssigen Umgebungen schwimmen, eine Bewegung entlang fester Oberflächen, die so genannte *twitching motility*, erfolgt durch Ausdehnung und Retraktion der Typ IV-Pili (Bradley, 1980; Merz *et al.*, 2000).

Diesen beiden Oberflächenstrukturen wird je nach äußeren Bedingungen eine unterschiedliche Bedeutung für die Adhäsion an das Substratum zugewiesen (De Kievit *et al.*, 2001; Klausen *et al.*, 2003a; Klausen *et al.*, 2003b; O'Toole & Kolter, 1998). O'Toole & Kolter (1998) zeigten, dass die *twitching motility* eine Aggregation angehefteter Zellen zu Mikrokolonien ermöglicht, welche die Basiseinheit eines Biofilms bilden (Costerton *et al.*, 1995). In neueren Studien wurde gezeigt, dass die Bildung von Mikrokolonien auch Typ IV-Pili-unabhängig durch die Teilung einzelner angehefteter Zellen erfolgen kann (De Kievit *et al.*, 2001; Klausen *et al.*, 2003b). Durch die Produktion der EPS entwickelt sich schließlich der differenzierte und heterogene Biofilm, der von wasserführenden Kanälen durchzogen ist, welche einen Transport von Nähr- und Abfallstoffen ermöglichen (Costerton *et al.*, 1995; 1999). Voraussetzung für die Bildung und Aufrechterhaltung dieser Kanäle ist die QS-abhängige Synthese von Rhamnolipiden (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). QS-Systeme wurden von Davies *et al.* (1998) als notwendige Voraussetzung zur Differenzierung von Biofilmen beschrieben. Da innerhalb von Biofilmen hohe Zelldichten erreicht werden und die Diffusion limitiert ist, liefern Biofilme optimale Bedingungen für eine Kommunikation über QS-Systeme. Sessile Bakterien innerhalb von Biofilmen weisen einen von planktonischen Zellen stark abweichenden Phänotyp auf (Déziel *et al.*, 2001; Pratt & Kolter, 1999). Auch die AHL-Signalmoleküle weisen ein verändertes Profil auf. Während in Flüssigkulturen das langkettige Signalmolekül (3-oxo-C12-HSL) überwiegt, wurden in Biofilmen vermehrt kurzkettige AHLs (C4-HSL) nachgewiesen (Singh *et al.*, 2000).

Eine Bedeutung wird den Signalmolekülen auch bei der Ablösung von Zellen aus Biofilmen zugesprochen. Dieser Wechsel von der sessilen zur planktonischen Lebensweise ermöglicht die Besiedelung neuer Oberflächen und wird möglicherweise durch einen Nährstoffmangel ausgelöst (Klausen *et al.*, 2003b; Sauer *et al.*, 2002).

1.5 Quorum-sensing und globale Regulation bei *P. aeruginosa*

Die große Bedeutung der QS-Systeme wird auch durch die beträchtliche Anzahl der QS-regulierten Gene deutlich. Durch die vollständige Sequenzierung des 6,3 Mb großen *P. aeruginosa*-Genoms (Stover *et al.*, 2000) war es möglich, mittels Microarray-Studien das QS-regulierte Transkriptom von *P. aeruginosa* zu analysieren. Dabei wurden in drei unabhängigen Studien 3 % bis 7 % aller Gene als QS-reguliert identifiziert (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Die meisten dieser Gene haben eine unbekannte Funktion, andere kodieren für Membranproteine, Transkriptionsfaktoren oder Enzyme, die an Zwei-Komponenten-Systemen oder Exportmechanismen beteiligt sind. In allen drei Studien wurden viele Virulenzfaktor-kodierende Gene gefunden. Neben vielen Übereinstimmungen wurden in den drei Studien auch unterschiedliche Gene als QS-reguliert beschrieben, was zum Teil auf unterschiedliche Kulturbedingungen zurückgeführt wird. Veränderungen der Medienzusammensetzung, Sauerstoff- und Eisengehalt haben signifikanten Einfluss auf die QS-Regulation (Kim *et al.*, 2005; Smith & Iglewski, 2003a; Wagner *et al.*, 2003).

Interessanterweise wiesen nur 7 % der QS-regulierten Gene *lux*-Box-homologe Sequenzen in ihrem stromaufwärts-Bereich auf (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Dieses eher geringe Vorkommen von spezifischen DNA-Bindedomänen für die LuxR-homologen Proteine LasR und RhlR weist auf eine indirekte Regulation vieler Gene über QS hin. Dazu passt die Beobachtung, dass viele QS-regulierte Gene Transkriptionsregulatoren oder Mitglieder von Zwei-Komponenten-Systemen sind. Über eine Induktion dieser regulatorischen Faktoren könnte QS indirekt eine Reihe von Mechanismen beeinflussen, die die Genexpression regulieren.

Hinzu kommen globale Regulatoren, die den QS-Systemen übergeordnet sind und somit eine weitere Ebene der QS-Regulation bilden. Ein wichtiger Faktor ist der globale Aktivator GacA, ein hoch konservierter Zwei-Komponenten *response regulator*, der die *rhlR*-Expression aktiviert (Reimann *et al.*, 1997). Die Expression von *lasR* und *lasI* ist von dem CRP-homologen Transkriptionsregulator Vfr abhängig (Albus *et al.*, 1997). Negative Regulatoren sind RsaL, welcher mit dem LasR/3-oxo-C12-HSL-Komplex um die Bindung am *lasI*-Promotor konkurriert (De Kievit *et al.*, 1999), sowie MvaT, welcher für das Timing der QS-Induktion verantwortlich zu sein scheint (Diggle *et al.*, 2002). Die alternativen Sigmafaktoren RpoN und RpoS zeigten sowohl positive als auch negative Effekte auf QS-abhängige Gene (Heurlier *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2004; Whiteley *et al.*, 2000).

Neben LasR und RhlR wurde bei *P. aeruginosa* ein weiteres LuxR-homologes Protein, QscR, identifiziert (Chugani *et al.*, 2001). QscR, selbst abhängig von GacA, reprimiert die Transkription von *lasI* und ist an der „Feinabstimmung“ des QS-Netzwerkes beteiligt. Je nach Anwesenheit von AHLs bildet es inaktive Heterodimere mit LasR oder RhlR und verhindert somit die Expression von QS-abhängigen Genen (Ledgham *et al.*, 2003).

1.6 Interspezies-Kommunikation

Zell-Zell-Kommunikationssysteme auf der Basis von *N*-Acyl-L-Homoserinlactonen sind unter Gram-negativen Bakterien weit verbreitet (vgl. Tab. 1). Diese Signalmoleküle sind strukturell sehr ähnlich, dennoch weisen sowohl die LuxI- als auch die LuxR-homologen Proteine eine hohe Spezifität bei der Synthese bzw. der Bindung ihres entsprechenden Signalmoleküls auf (Watson *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002b). Eine Interaktion zwischen Bakterien verschiedener Spezies findet dennoch statt, und es konnte gezeigt werden, dass einige LuxR-homologe Proteine auch mit nicht-zugehörigen AHLs interagieren können. Dabei wurde sowohl eine Aktivierung des Transkriptionsregulators nachgewiesen als auch die Blockierung dieser Aktivierung durch um die Bindestelle konkurrierende fremde AHLs (Greenberg, 1979; McClean *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 1996).

Ein Beispiel für die Aktivierung des QS-Systems durch AHL-Moleküle artfremder Bakterien liefert *Burkholderia cepacia*. Dieses pathogene Bakterium reguliert die Produktion von extrazellulären Faktoren durch das CepR/CepI-QS-System mit dem entsprechenden Signalmolekül *N*-octanoyl-L-Homoserinlacton (C8-HSL) (Lewenza *et al.*, 1999). In den Lungen von CF-Patienten kommt es häufig zu einer Co-Infektion von *B. cepacia* und *P. aeruginosa* und zur Bildung gemischter Biofilme. Da beide Organismen die gleiche chemische Sprache benutzen, um die Biofilmbildung und die Virulenzfaktor-Produktion zu regulieren, wurden Studien zur interzellulären Kommunikation zwischen diesen beiden Stämmen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine unidirektionale Kommunikation von *P. aeruginosa* zu *B. cepacia* erfolgt (McKenney *et al.*, 1995; Riedel *et al.*, 2001). Kulturüberstände von *P. aeruginosa* stellten die Protease-Produktion einer *cepI*-negativen *B. cepacia*-Mutante wieder her, umgekehrt erfolgte keine Komplementation des QS-negativen Phänotyps. Weiterhin wurde über die Expression AHL-abhängiger Reportergene eine Interspezies-Kommunikation in artifiziellen Biofilmen sowie infizierten Mäusen nachgewiesen. Wiederum reagierten die *B. cepacia*-Zellen auf die von *P. aeruginosa* synthetisierten Signalmoleküle, dieser Stamm profitiert also von QS-Systemen anderer, um die eigene Pathogenität zu regulieren.

Die Hemmung des QS-Systems durch artfremde AHL-Moleküle ist von *Chromobacterium violaceum* bekannt. Die natürlicherweise C6-HSL-abhängige Violacein-Produktion wird durch langkettige Signalmoleküle, wie z. B. das 3-oxo-C12-HSL von *P. aeruginosa*, inhibiert (McClean *et al.*, 1997). Dieses Signalmolekül scheint durch kompetitive Hemmung das eigentliche Signalmolekül vom zugehörigen Transkriptionsregulator CviR zu verdrängen. Interspezies-Kommunikation findet aber nicht nur zwischen verschiedenen Bakterienspezies statt, sondern auch zwischen Bakterien und Eukaryonten. Wie bereits beschrieben, löst das 3-oxo-C12-HSL von *P. aeruginosa* immunomodulatorische Effekte bei Säugetieren aus (Telford *et al.*, 1998). Höhere Pflanzen, z. B. *Pisum sativum*, produzieren AHL-Mimetika, die bakterielle QS-Systeme stimulieren. Dadurch kann z. B. das QS-abhängige Schwärmen induziert und somit eine Konzentrierung der Bakterien auf der Pflanzenoberfläche verhindert werden (Bauer & Robinson, 2002). Bislang ist die Struktur dieser AHL-imitierenden Substanzen unklar, jedoch scheinen sie sich chemisch von den bakteriellen AHL-Signalmolekülen zu unterscheiden (Teplitski *et al.*, 2000).

1.7 Inhibierung der interzellulären Kommunikation (*Quorum-quenching*)

QS-Systeme sind von enormer Bedeutung für die Pathogenität von Bakterien. Daher könnte die Hemmung dieser QS-Systeme ein therapeutisches Ziel für die Behandlung bakterieller Infektionen darstellen (Camara *et al.*, 2002; Smith & Iglewski, 2003a). Mechanismen zur Interferenz mit bakteriellen QS-Systemen sind bereits aus der Natur bekannt. Als erstes Beispiel der QS-Hemmung durch einen eukaryontischen Organismus wurde die Furanon-Produktion der Meeresalge *Delisea pulchra* beschrieben (Givskov *et al.*, 1996). Durch die Produktion dieser Metabolite schützt die Alge sich selbst vor einem übermäßigen Bewuchs durch marine Bakterien. Neben der QS-abhängigen Schwärmbewegung konnte auch die Biolumineszenz von Reporterstämmen durch Furanone inhibiert werden (Manefield *et al.*, 1999). Zunächst wurde vermutet, dass diese Moleküle mit den bakteriellen Signalmolekülen um die Bindestelle an LuxR-homologen Proteinen konkurrieren. Neuere Studien zeigten jedoch eine gesteigerte Degradation der LuxR-Proteine in Gegenwart der Furanone, so dass die intrazelluläre LuxR-Konzentration gesenkt und die AHL-Antwort gestört wird (Manefield *et al.*, 2002).

Die spezifische Funktion von Furanonen als QS-Antagonisten konnte mit Hilfe von Microarray-Analysen bestätigt werden. Hentzer *et al.* (2003) zeigten, dass 80 % der Gene, die durch Furanon-Einwirkung bei *P. aeruginosa* reprimiert waren, tatsächlich QS-regulierte Gene sind.

Weiterhin konnten Furanone *in vivo* als effektive QS-Inhibitoren bei Infektionen eingesetzt werden. In einem Mausmodell einer chronischen *P. aeruginosa*-Lungeninfektion wurde die Anzahl der Bakterien in den Lungen durch die Behandlung mit synthetischen Furanonen drastisch gesenkt (Hentzer *et al.*, 2003). Als weitere QS-Inhibitoren wurden AHL-degradierende Enzyme beschrieben, welche sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten identifiziert wurden.

1.7.1 AHL-degradierende Enzyme bei Bakterien

Bakterien sind hoch anpassungsfähige Organismen, die schnell auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren können. Ermöglicht wird dies durch zahlreiche Regulationsmechanismen, die je nach Wuchs- und Umweltbedingungen an- oder abgeschaltet werden. Ein Regulationssystem mit großem Wirkungsbereich stellt das *Quorum-sensing* dar. Mit Hilfe dieses Systems erfolgt die Aktivierung einer Vielzahl von Genen bei Erreichen einer genügend hohen Populationsdichte. Auch das Verlassen dieses QS-aktivierten Zustandes könnte eine Notwendigkeit zur Anpassung an die aktuellen Bedingungen sein. Das Ausschalten QS-abhängiger Genexpression könnte ausreichend Energie und Ressourcen sichern, um z. B. essentielle Proteine und Enzyme der Stressantwort zu synthetisieren (Zhang & Dong, 2004). Deswegen wird für einige QS-fähige Bakterien ein „QS-Signal-turnover-System“ vermutet, unter dessen strikter Kontrolle AHL-degradierende Enzyme das Verlassen des QS-aktivierten Zustandes ermöglichen.

AHL-degradierende Enzyme bieten jedoch nicht nur einen Vorteil für QS-fähige Bakterien, indem sie kontrolliert die eigenen Signalmoleküle abbauen und dadurch der Population das Verlassen des QS-aktivierten Zustandes ermöglichen, sondern auch für Organismen, die durch eine Hemmung der QS-Systeme konkurrierender Bakterien profitieren. Denn sehr häufig werden durch QS Prozesse reguliert, die andere Organismen in der Umgebung schädigen. So verschafft sich z. B. *Erwinia carotovora* durch die QS-induzierte Carbapenem-Produktion einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien in derselben Nische (Bainton *et al.*, 1992; McGowan *et al.*, 1995). Sind diese konkurrierenden Bakterien jedoch in der Lage, das QS-System von *E. carotovora* zu hemmen, indem sie die entsprechenden Signalmoleküle degradieren, verhindern sie die Antibiotikaproduktion und werden nicht von *E. carotovora* verdrängt (Roche *et al.*, 2004).

Das erste AHL-degradierende Enzym wurde in einem *Bacillus*-Stamm aus einer Bodenprobe identifiziert (Dong *et al.*, 2000). Bei *Bacillus*-Spezies, sowie allen anderen Gram-positiven Bakterien, sind bisher keine Signalmoleküle des AHL-Typs identifiziert worden. Stattdessen nutzen Gram-positive Bakterien Oligopeptide als Signalmoleküle (Abb. 2.H, I), die über ABC-Transporter exportiert werden. Die Wahrnehmung der in Abhängigkeit der Zelldichte akkumulierenden Oligopeptide erfolgt entweder über ein Zwei-Komponenten Signaltransduktions-System, bei dem eine Phosphorylierung der Sensorkinase auf den *response regulator* übertragen wird, der die Transkription der Zielgene reguliert, oder über einen aktiven Transport der Oligopeptide in die Zelle mittels einer spezifischen Oligopeptid-Permease. In diesem Fall bindet das Peptid an ein entsprechendes Regulatorprotein, welches dann die Transkription der Zielgene reguliert (Kleerebezem *et al.*, 1997).

Das AHL-degradierende Enzym AiiA aus *Bacillus* hat demnach keine Funktion für das eigene QS-System. Die physiologische Rolle könnte darin bestehen, Signalmoleküle Gram-negativer Bakterien zu degradieren und somit fremde QS-Systeme zu hemmen. Die Aminosäuresequenz von AiiA zeigte keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen, weist aber das bei zahlreichen Metallohydrolasen konservierte, von Melino *et al.* (1998) als Zink-Bindemotiv beschriebene, HXHXDH-Motiv auf. Dieser konservierte Bereich ist essentiell für die AiiA-Aktivität (Dong *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2002), jedoch wurden widersprüchliche Befunde zur Notwendigkeit von Zink oder anderen Metall-Ionen veröffentlicht (Thomas *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). Biochemische Analysen ergaben, dass es sich bei AiiA um eine Lactonase handelt, die die Esterbindung des Homoserinlactonrings verschiedener AHL-Signalmoleküle spalten kann (Abb. 4, Dong *et al.*, 2001).

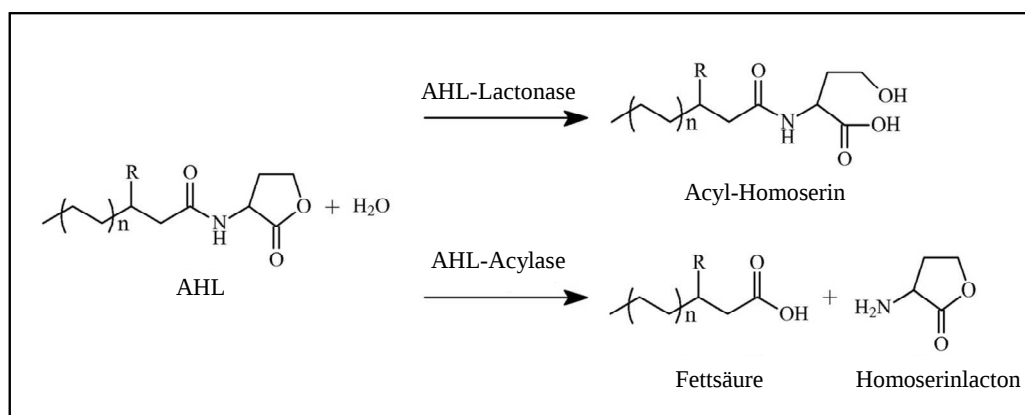


Abb. 4: Mechanismen zur AHL-Degradation durch AHL-Lactonasen und AHL-Acylasen.

Die heterologe Expression von *aiiA* in dem Pflanzenpathogen *E. carotovora* führte zu einer fehlenden AHL-Akkumulation im Kulturüberstand, einer reduzierten Produktion der extrazellulären Pectatlyase und einer abgeschwächten Pathogenität gegenüber den Wirtspflanzen Kartoffel, Tabak und Chinakohl (Abb. 5, Dong *et al.*, 2000). Auch die *aiiA*-Expression in Pflanzen bewirkte eine Störung des *E. carotovora* QS-Systems und eine erhöhte Resistenz gegen Infektionen mit diesem Pflanzenpathogen (Dong *et al.*, 2001).

Es konnte also gezeigt werden, dass die AHL-Lactonase aus *Bacillus spec.* bakterielle Infektionen bei Pflanzen verhindern kann. Auch bei dem opportunistisch humanpathogenen Bakterium *P. aeruginosa* wurde durch die *aiiA*-Expression eine Reduktion der Virulenzfaktorproduktion erreicht (Reimann *et al.*, 2002). Die *aiiA*-Expression verhinderte eine Akkumulation von C4-HSL und führte zu einer reduzierten Menge an 3-oxo-C12-HSL, Elastase, Rhamnolipiden und Pyocyanin und verringerte die Schwämbewegung von *P. aeruginosa*.

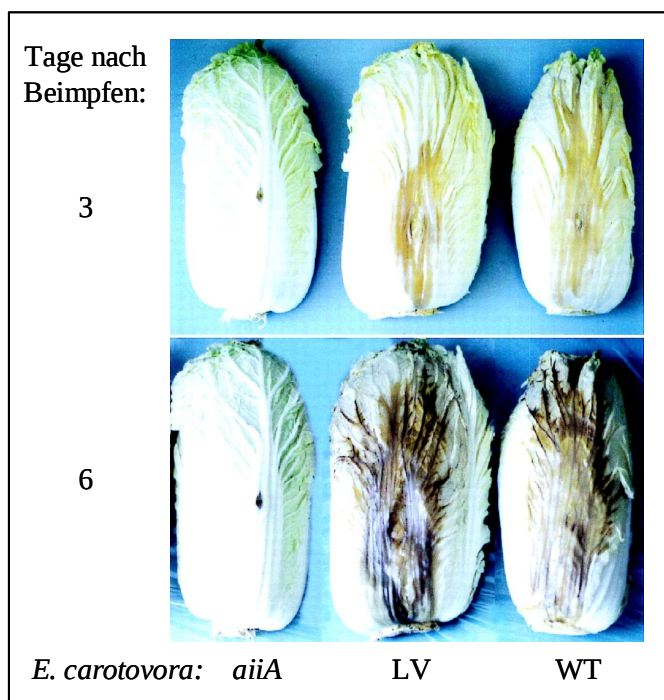


Abb. 5: Einfluss der AHL-Lactonase AiiA auf die Pathogenität von *E. carotovora* (Dong *et al.*, 2000). Chinakohl, der mit dem *E. carotovora*-Wildtyp (WT) bzw. der Leervektorkontrolle (LV) beimpft wurde, zeigt 3 bzw. 6 Tage später starke Fäulnissymptome. Die heterologe Expression von *aiiA* in *E. carotovora* verhindert den Verfall.

Kurz nach der Identifizierung der AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus* wurden eine Reihe weiterer „Quorum-quenching-Enzyme“ beschrieben (Tab. 2). AHL-Lactonasen wurden nicht nur in weiteren, keine AHLs produzierenden, *Bacillus*-Stämmen identifiziert, sondern auch bei dem AHL-Produzenten *Agrobacterium tumefaciens*. Für diesen Stamm wurde die Existenz eines QS-Signal-turnover-Systems vorgeschlagen, welches den Zellen das Verlassen des QS-aktivierten Zustandes, den konjugativen Ti-Plasmid-Transfer, ermöglicht (Zhang *et al.*,

2002a). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der AHL-Lactonase AttM durch den Suppressor AttJ reguliert wird und die Mutation dieses Suppressors zu einer konstitutiven AHL-Lactonase-Produktion führt, wodurch eine 3-oxo-C8-HSL-Akkumulation sowie der Ti-Plasmid-Transfer verhindert wird.

Tab. 2: Vorkommen AHL-degradierender Enzyme bei Prokaryonten und Eukaryonten.

Spezies	Gen	Mechanismus	Referenz
Prokaryonten			
<i>Bacillus</i> spec. 240B1	<i>aiiA</i>	AHL-Lactonase	Dong <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus</i> spec. A24	<i>aiiA</i> homolog	AHL-Lactonase	Reimann <i>et al.</i> , 2002
<i>B. thuringiensis</i>	<i>aiiA</i> homolog	AHL-Lactonase	Dong <i>et al.</i> , 2002; Lee <i>et al.</i> , 2002
<i>B. cereus</i>	<i>aiiA</i> homolog	AHL-Lactonase	Dong <i>et al.</i> , 2002
<i>B. anthracis</i>	<i>aiiA</i> homolog	AHL-Lactonase	Ulrich, 2004
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>attM</i> , <i>aiiB</i>	AHL-Lactonase	Carlier <i>et al.</i> , 2003; Zhang <i>et al.</i> , 2002a
<i>Arthrobacter</i> spec. IBN110	<i>ahlD</i>	AHL-Lactonase	Park <i>et al.</i> , 2003
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>ahlK</i>	AHL-Lactonase	Park <i>et al.</i> , 2003
<i>Variovorax paradoxus</i>	nicht bekannt	AHL-Acylase (?)	Leadbetter & Greenberg, 2000
<i>Ralstonia</i> Stamm XJ12B	<i>aiiD</i>	AHL-Acylase	Lin <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas</i> Stamm PAI-A, <i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>pvdQ</i>	AHL-Acylase	Huang <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces</i> spec.	<i>ahlM</i>	AHL-Acylase	Park <i>et al.</i> , 2005
Eukaryonten			
Mensch (Lungenepithel)	PONs	Lactonase	Chun <i>et al.</i> , 2004
Diverse Säugetiere (Serum)	PONs	Lactonase	Yang <i>et al.</i> , 2005

Neben AHL-Lactonasen, die die Esterbindung des Homoserinlactonrings spalten, wurde eine weitere Klasse AHL-degradierender Enzyme beschrieben, die AHL-Acylasen. Diese AHL-inaktivierenden Enzyme hydrolysieren die Amidbindung, so dass die Fettsäure-Seitenkette vom Homoserinlactonring abgespalten wird. Beschrieben wurden AHL-Acylasen bei den Gram-negativen Bakterienstämmen *Pseudomonas* PAI-A, *Variovorax paradoxus* VAI-C und *Ralstonia* XJ12B (Huang *et al.*, 2003; Leadbetter & Greenberg, 2000; Lin *et al.*, 2003). Bei *V. paradoxus* wurde das entsprechende Gen jedoch nicht kloniert, die Fähigkeit, AHLs als

einzigste Energie- und Stickstoffquelle zu nutzen, wurde aber auf die Existenz eines solchen Enzyms zurückgeführt (Leadbetter & Greenberg, 2000). Auch bei dem *Pseudomonas*-Stamm PAI-A wurde das Wachstum mit langkettigen AHLs als einziger Energiequelle auf eine AHL-Acylase zurückgeführt und entsprechende Degradationsprodukte konnten auch in dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 detektiert werden (Huang *et al.*, 2003). Die AHL-Acylase-Aktivität konnte auf das *pvdQ*-Gen zurückgeführt werden. Bei Expression in *E. coli* erfolgte die Degradation langkettiger AHLs, die konstitutive Expression in *P. aeruginosa* PAO1 verhinderte die Akkumulation von 3-oxo-C12-HSL. Da *pvdQ*-Deletionsmutanten von *P. aeruginosa* jedoch immer noch in der Lage waren, langkettige AHLs als einzige Energiequelle zu nutzen, wurde die Existenz weiterer AHL-degradierender Enzyme vermutet (Huang *et al.*, 2003).

1.7.2 AHL-degradierende Enzyme bei Eukaryonten

Wie bereits erwähnt, haben auch höhere Organismen Abwehrmechanismen entwickelt, die die Zell-Zell-Kommunikation von Bakterien stören. Neben pflanzlichen AHL-Mimetika und QS-hemmenden Furanonen aus Algen wurde bei Säugetieren eine Inaktivierung von AHL-Signalmolekülen nachgewiesen. Chun *et al.* (2004) führten die AHL-Inaktivierung durch menschliches Lungenepithel auf Zell-assoziierte Enzyme zurück. Dabei zeigte sich eine Spezifität für langkettige Signalmoleküle wie 3-oxo-C12-HSL und C6-HSL. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Fähigkeit zur AHL-Inaktivierung unter verschiedenen Zelltypen variiert. Vor allem Gewebetypen, die häufig einem Kontakt mit Bakterien ausgesetzt sind, wie Lunge und Darm, zeigten eine effektive Inaktivierung von AHLs. Eine kürzlich veröffentlichte Studie belegt, dass AHL-inaktivierende Enzyme im Serum verschiedener Säugetiere verbreitet sind (Yang *et al.*, 2005). Analysen der Degradationsprodukte zeigten, dass es sich hierbei um Lactonasen handelt, die den Lactonring von AHLs öffnen. Aufgrund der ähnlichen Enzymeigenschaften handelt es sich vermutlich um Paraoxonasen (PONs). PONs haben verschiedene Funktionen bei Säugetieren, sie können eine Reihe von Estern und Lactonen hydrolysieren und sind durch ihre antioxidativen Eigenschaften an der Entgiftung diverser Metabolite beteiligt (Draganov *et al.*, 2000). Die Expression drei verschiedener PON-Gene aus Mäusen in CHO-Zelllinien verifizierten die AHL-Inaktivierungs-Aktivität von PONs (Yang *et al.*, 2005).

Auch die Expression der bakteriellen AHL-Lactonase AiiA in Pflanzen lieferte vielversprechende Ergebnisse. So zeigten transgene Kartoffel- und Tabakpflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen mit *E. carotovora* (Dong *et al.*, 2001). Diese Befunde verdeutlichen,

dass es möglich ist, „*Quorum-quenching*-Pflanzen“ zu entwickeln und QS-abhängige bakterielle Infektionen zu blockieren.

1.7.3 Inhibierung der interzellulären Kommunikation als antimikrobielle Therapie

Die Bedeutung der QS-Systeme für die Pathogenität von Bakterien wurde in verschiedenen Studien demonstriert. Dabei wurde nicht nur gezeigt, dass die Expression einer Vielzahl von Virulenzfaktoren durch QS reguliert wird, sondern auch, dass Bakterien mit Mutationen in QS-Genen eine abgeschwächte Pathogenität aufweisen. Weitere Studien zeigten außerdem, dass es möglich ist, durch QS-Inhibitoren bzw. AHL-inaktivierende Enzyme bakterielle Infektionen *in vivo* zu verhindern bzw. zu mildern. Diese Befunde eröffnen neue Möglichkeiten der antimikrobiellen Therapie.

QS-Inhibitoren können die Virulenz von Bakterien abschwächen, ohne sie abzutöten oder das Wachstum zu inhibieren. Es wird also kein selektiver Druck zur Entwicklung von resistenten Mutanten ausgeübt. Angesichts der zunehmenden Anzahl multiresistenter Bakterienstämme ist dies ein großer Vorteil gegenüber konventionellen Antibiotika. Ein weiterer Unterschied zu konventionellen Antibiotika ist der vermutlich enge Wirkungsbereich der QS-Inhibitoren, denn es scheint kein universelles Virulenz-regulierendes QS-System im Bakterienreich zu geben. Darin könnte jedoch der Vorteil liegen, dass die nützliche Bakterienflora geschützt wird (Camara *et al.*, 2002).

Aus bisheriger Sicht sind die möglichen Angriffspunkte für eine Inhibierung von QS-Systemen folgende:

1. Inhibierung der Signalmolekül-Synthese
2. Inhibierung der Aktivierung LuxR-homologer Proteine
 - R-Protein-Degradation (z. B. Furanone)
 - AHL-Analoga als Antagonisten
3. Degradation der AHL-Signalmoleküle
 - AHL-Acylasen
 - AHL-Lactonasen

Die Inhibierung der QS-Systeme ist ein vielversprechendes Ziel für die Bekämpfung bakterieller Infektionen. Um die Einsatzfähigkeit für Medizin, Landwirtschaft und Industrie zu prüfen, müssen jedoch noch eine Reihe von Mechanismen aufgeklärt werden und Studien bezüg-

lich möglicher Nebenwirkungen sowie der Stabilität und Effektivität entsprechender Wirkstoffe erfolgen.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Viele Bakterien nutzen Zell-Zell-Kommunikationssysteme, um ihre eigene Zelldichte zu ermitteln und die Genexpression Zelldichte-abhängig zu regulieren. Dazu werden niedermolekulare Signalmoleküle produziert und ins umgebende Milieu abgegeben. Eine Akkumulation dieser Signalmoleküle wird von allen Bakterienzellen der Population wahrgenommen und bewirkt die koordinierte Expression bestimmter Gene und somit die Synchronisation des Verhaltens der gesamten Bakterienpopulation. Besondere Bedeutung haben derartige *Quorum-sensing*-Systeme durch die Regulation von Virulenzfaktoren pathogener Bakterien.

P. aeruginosa ist ein tier-, pflanzen- und humanpathogenes Bakterium, welches die Expression einer Vielzahl von Virulenzfaktoren Zelldichte-abhängig reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Störung der QS-Systeme zu einer Abschwächung der Virulenz führt. Daher wird die Störung der QS-Systeme als eine neue Möglichkeit angesehen, bakterielle Infektionen zu bekämpfen. Ein natürlich vorkommender Mechanismus zur Störung von QS-Systemen ist die enzymatische Degradation von AHL-Signalmolekülen. Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich ein einziges AHL-degradierendes Enzym bekannt, die AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus spec.* (Dong *et al.*, 2000). Nachdem beschrieben wurde, dass ein Organismus, der selbst keine AHLs produziert, fähig ist, diese Moleküle enzymatisch zu degradieren, sollte untersucht werden, ob auch Organismen, die über AHLs kommunizieren, dazu in der Lage sind. Durch Homologievergleiche mit dem *aiiA*-Gen wurde ein entsprechender ORF im Genom von *P. aeruginosa* identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das putative AHL-Lactonase-homologe Protein HalS aus *P. aeruginosa* untersucht werden.

Um den Einfluss von HalS auf die QS-Systeme von *P. aeruginosa* zu analysieren, sollten sowohl ein *halS*-negativer als auch ein *halS*-überexprimierender *P. aeruginosa*-Stamm erzeugt werden. Es sollte geprüft werden, inwieweit die eigene Signalmolekül-Produktion beeinflusst wird und welche Auswirkungen HalS auf verschiedene Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* hat. Als Beispiele für QS-abhängige Phänotypen sollten die Biofilmbildung und die Beweglichkeit, sowie die Produktion verschiedener extrazellulärer Metabolite und Enzyme untersucht werden. Durch *in vitro*-Analysen sollte ferner ein direkter Einfluss von HalS auf Signalmoleküle geprüft werden.

Da QS für *P. aeruginosa* von großer Bedeutung ist, wurde vermutet, dass HalS als putative AHL-Lactonase unter der strikten Kontrolle eines möglicherweise komplexen Regulationsystems steht. Daher sollten Reportergenfusionen hergestellt und Untersuchungen zur Expression des *halS*-Gens durchgeführt werden.

Des Weiteren sollte der Einfluss des HalS-Enzyms auf andere, artfremde Signalmoleküle untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei eine mögliche Beeinflussung der QS-regulierten Virulenz anderer Bakterienstämme.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen:

Antibiotika: Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

Chemikalien: Biomol (Hamburg), Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg).

Enzyme: Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym von Sigma (Deisenhofen), T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A und T4-DNA-Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), *Pfu*-DNA-Polymerase von Stratagene (Heidelberg), DNaseI von Promega (Mannheim), Reverse Transkriptase von Invitrogen (Karlsruhe).

Medienkomponenten: Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), Oxoid (Wesel).

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	<i>traG::lacZ traR</i> (pZLR4) AHL-Sensorstamm	Cha <i>et al.</i> , 1998
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	mini Tn5 AHL-Sensorstamm	McClellan <i>et al.</i> , 1997
<i>Erwinia carotovora</i>	Wildtyp	Hauben <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (λ Its857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7</i> <i>gene1</i>)	Novagen, Madison, USA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 ΔlacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15)	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> JM101	F' <i>traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proAB</i> <i>Δ(lac-proAB) thi supE1</i>	Yannish-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Ec294::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)], <i>pro res recA tra⁺ Tp^r Sm^r</i>	Simon <i>et al.</i> , 1986
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Δ <i>halS</i> (Ω Sm ^r /Sp ^r)	<i>halS::pKOhalS ΩSm^r/Sp^r</i>	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 3

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $halS::Gm^r$ $\Delta halS$ (Gm^r)	diese Arbeit
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $lasI::Gm$ $rhII::Tc$ $\Delta lasI/rhII$	Beatson <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\Delta lipA/H$, mit chromosomal integriertem D180- Tc^r $lacI^q$ T7- PABST7.1 RNA-Polymerase	Rosenau, 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $lasB::Km$ PAN10	Braun <i>et al.</i> , 1998

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Vektoren.

Vektoren für <i>E. coli</i>	genetische Marken	Referenz/Bezugsquelle
pBKS	P_{T7} P_{T3} P_{lac} $lacZ\alpha$ Amp^r $ColE1$	Stratagene, Heidelberg
pBSL141	$ColE1$ Amp^r Gm^r	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pET22b	$ColE1$ $P_{T7\Phi10}$ $lacI^q$ $pelB$ Amp^r	Novagen, Madison, USA
pKnockout Ω	$ColE1$ Sm^r/Sp^r mob	Windgassen <i>et al.</i> , 2000
pSUP202	$ColE1$ mob Amp^r Cm^r Tc^r	Simon <i>et al.</i> , 1983
Vektoren mit weitem Wirtsbereich	genetische Marken	Referenz/Bezugsquelle
pBBR1MCS	$lacZ\alpha$ Cm^r rep mob	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pBR22b	$lacZ\alpha$ Cm^r rep mob (MCS: pET22b)	Rosenau & Jaeger, 2003
pTZ110	Amp^r , promotorloses $lacZ$	Schweizer & Chuanchuen, 2001
rekombinante Plasmide	genetische Marken	Referenz/Bezugsquelle
pBKhalS1	425 bp <i>SalI</i> / <i>HindIII</i> -PCR-Fragment (stromaufwärts-Bereich von <i>halS</i>) in pBKS	diese Arbeit
pBKhalS2	493 bp <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> -PCR-Fragment (stromabwärts-Bereich von <i>halS</i>) in pBKS	diese Arbeit
pBRAL	784 bp <i>XbaI</i> / <i>SacI</i> -Fragment aus pET1415 in pBBR1MCS (<i>halS</i> -Gen P_{lac} -kontrolliert)	diese Arbeit
pBR1415	721 bp <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> -PCR-Produkt in pBR22b (<i>halS</i> -Gen P_{T7} -kontrolliert)	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 4

pET1415	721 bp <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> -PCR-Produkt in pET22b (<i>halS</i> -Gen P _{T7} -kontrolliert)	diese Arbeit
pG1AL1	ca. 0,8 kb <i>MluI</i> -Fragment (Gm ^r) aus pBSL141 in pBKhalS1	diese Arbeit
pG1AL12	1,2 kb <i>SalI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment aus pG1AL1 in pBKhalS2	diese Arbeit
pKOhalS	5'- und 3'-verkürztes <i>halS</i> -Gen (507 bp) in pKnockoutΩ	diese Arbeit
pSUAL12	1,7 kb <i>SalI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment aus pG1AL12 in pSUP202	diese Arbeit
pTS400	<i>lasB::lacZ</i> Amp ^r	Passador <i>et al.</i> , 1993
pTZAL	455 bp <i>XhoI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment aus pBKhalS1 in pTZ110 (<i>halS::lacZ</i> -Fusion)	diese Arbeit
pURE	pET19 mit synthetischer MCS, <i>lecB</i> -Gen	Bartels, 2004
pUSHL	750 bp <i>halS</i> -Fragment in pURE (<i>halS::lecB</i> P _{T7Φ10} -kontrolliert)	Bartels, 2004

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien) und Interaktiva (Ulm) bezogen und sind im Detail in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	DNA-Sequenz (in 5'→ 3' Richtung)	Merkmal
halSint_up	TGCAACATGTGGCATGTCCAG	
halSint_dwn	ATAGTCGTCGAGGTTGGAATG	
1415up	CAGAGACCCATATGAGAATCGTCAGC	<i>NdeI</i>
1415dwn	TCCC <u>GGATCC</u> GGTCTATCGATC	<i>BamHI</i>
halS1up	GGCGTCGACAGCCTGTCCTTCG	<i>SalI</i>
halS1dwn	GGAAGCTTACGCGTCGCGGTCTCTGTCCG	<i>HindIII</i> , <i>MluI</i>
halS2up	GCGAAGCTTACGCGTACCAAACCGGG	<i>HindIII</i> , <i>MluI</i>
halS2dwn	CGGGATCCGGTGGCGGTGCATG	<i>BamHI</i>
Gmup1	TATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGC	
Gmdwn1	GCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATA	
1417up	AACAACCACGGCTATGGCGA	
opr1417up	CCAAGGTCGGCATCGTCGTG	
halSdwn1	TTGTAGAAGTGCCGGGTTT	

2.4 Nährmedien

LB-Medium:

10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefextrakt

NB-Medium:

8 g/l Bouillon (Lab Lemco Broth, Oxoid); 4 g/l NaCl

NYB-Medium:

25g/l Bouillon (Lab Lemco Broth, Oxoid); 5 g/l Hefextrakt

M9-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 % (v/v) Lösung 1; 1% (v/v) Lösung 2; 1 % (v/v) Lösung 3; 10 % (v/v) Lösung 4

Lösung 1: 40 g/l Glucose

Lösung 2: 25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Lösung 3: 2 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Lösung 4: 70 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 30 g/l KH_2PO_4 ; 5 g/l NaCl; 10 g/l NH_4Cl

ABG-Medium (Chilton *et al.*, 1974):

5 % (v/v) AB Salz ($\times 20$); 5 % (v/v) AB Puffer ($\times 20$); 0,2 % (w/v) Glucose

AB Salz ($\times 20$): 20 g/l NH_4Cl ; 6 g/l MgSO_4 ; 3 g/l KCl; 0,2 g/l CaCl_2 ; 0,05 g/l FeSO_4

AB Puffer ($\times 20$): 60 g/l K_2HPO_4 ; 23 g/l NaH_2PO_4

APM-Medium:

10% (v/v) Lösung 1; 10 % (v/v) Lösung 2; 5 % (v/v) Lösung 3; 75 % (v/v) Lösung 4

Lösung 1: 21,81 g/l Na-D-Gluconat

Lösung 2: 10,11 g/l KNO_3

Lösung 3: 4,92 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

Lösung 4: 1,37 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 3,9 g/l KH_2PO_4

PPGAS-Medium (Wild *et al.*, 1997):

5 g/l Glukose; 10 g/l Pepton; 1,08 g/l NH_4Cl ; 1,48 g/l KCl; 14,6 g/l Tris;

0,36 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; pH = 7,2

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Hitzelabile Chemikalien wurden mit Membranfiltern mit einem Porendurchmesser von 0,2 μm (Schleicher und Schüll, Dassel) sterilfiltriert und den autoklavierten Medien bei einer Temperatur von $\leq 60^\circ\text{C}$ zugesetzt.

Plattentests zur Beweglichkeit von *P. aeruginosa*-Zellen:

Schwimmen: M9-Minimalagarplatten mit 0,3 % (w/v) Agar.

Schwärmen: M9-Minimalagarplatten mit 0,5 % (w/v) Agar ohne NH_4Cl in der Lösung 4. Als einzige Stickstoffquelle wurde stattdessen 0,05 % (w/v) Glutamat zugesetzt.

***Twitching motility*:** LB-Agarplatten (1,5 % (w/v) Agar). Einzelkolonien wurden mit Zahnstochern durch den Agar bis zum Grund der Petrischale gestochen.

Für den qualitativen Nachweis von Enzymen wurden folgende Indikatorplatten verwendet:

α -Komplementations-Agar (Sambrook *et al.*, 1989):

1 ml 100 mM IPTG in 70 % (v/v) Ethanol; 3 ml 2 % (w/v) X-Gal in DMF; 300 ml LB-Agar

Skim-Milk-Agar:

3% (w/v) Magermilchpulver (30 min, 105°C) in LB-Agar. Proteaseaktivität führt zur Entstehung klarer Höfe um Bakterienkolonien.

2.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Kulturen von *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden, soweit nicht anders angegeben, in LB-Medium angelegt und bei 37°C bebrütet. *E. carotovora* und *C. violaceum* wurden bei 30°C in LB-Medium, *A. tumefaciens* bei 30°C in ABG-Medium bebrütet. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina in Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH) bei 180–220 UpM kultiviert, wobei das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10 entsprach. Bakterienstämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 6) kultiviert.

Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine O.D._{580nm} = 0,05 beimpft. Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C eingefroren.

Tab. 6: Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika.

Antibiotikum	für <i>E. coli</i> [µg/ml]	für <i>P. aeruginosa</i> [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	100	-
Carbenicillin (Cb)	-	600
Chloramphenicol (Cm)	50	300
Irgasan (Irg)	-	25
Spectinomycin (Sp)	50	200
Streptomycin (Sm)	50	200
Tetracyclin (Tc)	25	100

2.6 Kultivierung von Biofilmen

2.6.1 Kultivierung von Biofilmen auf Glasobjektträgern

Fettfreie, hitzesterilisierte Glasobjektträger wurden in sterilen Petrischalen mit 15 ml NB-Medium überschichtet und von einer ÜK auf eine O.D._{580nm} = 0,05 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C für 48 h auf einer Wippe, um einen langsamen Fluss des Mediums über die Objektträger zu erzeugen. Die Objektträger wurden entnommen und die Zellen mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYTO 9 (Molecular Probes, Eugene, USA) angefärbt. Dazu wurden 100 µl Färbelösung (1,5 µl SYTO 9-Stammlösung in 1 ml 0,14 M NaCl) auf die Objektträger aufgebracht und nach 15 min Inkubation im Dunkeln die Biofilme mittels CLSM (2.27) analysiert.

2.6.2 Kultivierung von Biofilmen in Durchflusszellen

Die Kultivierung von Biofilmen unter dynamischen Bedingungen erfolgte in Zwei-Kanal-Durchflusszellen in APM-Medium bei 30°C über einen Zeitraum von 3 Tagen. Als Substratum dienten Deckgläser aus Borosilikat-Glas (24 × 60 mm, Dicke 0,17 mm, Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen). Jeder Kanal (Ausmaße 3 × 8 × 54 mm) wurde mit 5 ml einer Zellsuspension mit einer O.D._{580nm} = 0,05 beimpft. Um die Adhäsion der Zellen an das Sub-

stratum zu ermöglichen, wurden die Durchflusszellen zunächst für 1 h stehen gelassen und anschließend unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe (Ismatec, IPC-N, Wertheim-Mondfeld) ein Medienstrom von 20 ml/h gestartet. Nach 24 h, 28 h und 72 h wurden jeweils zwei Kanäle pro Bakterienstamm mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYTO 9 (Molecular Probes, Eugene, USA) gefärbt, indem 2,5 ml Färbelösung (1,5 µl SYTO 9-Stammlösung je 1 ml APM-Medium) in jeden Kanal injiziert wurden. Die Analyse der Biofilme erfolgte mittels CLSM (2.27).

2.7 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firmen Invitex (Berlin) und Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

Chromosomale DNA aus Zellen von *P. aeruginosa* wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen isoliert.

Zur Isolierung von mRNA wurde das RNeasy-Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die Konzentration von DNA- und RNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

2.8 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und RNA sowie der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) in 0,6 - 2 %igen (w/v) Agarosegelen.

Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 × TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Größstandard für die DNA-Gele wurde die „1kb-ladder“ von Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep[®] Gel cleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.9 In vitro-Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Sambrook *et al.* (1989) sowie nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.11 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 ml einer ÜK des Plasmid-haltigen Donorstamms *E. coli* S17-1 mit 1 ml Zellen des jeweiligen Rezipientenstammes von *P. aeruginosa*, die zuvor für 10 min bei 46°C inkubiert wurden, gemischt und durch Zentrifugation (3 min; 5.000 g; RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für mindestens 4 h bei 37°C auf einer LB-Agarplatte inkubiert, bevor diese in 1 ml LB-Medium resuspendiert und in Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-6} auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion des Donorstamms enthielt der Selektivagar zusätzlich 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, CH).

2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 × (2 min 98°C); 30 × (1 min 95°C; 0,5 min 55–65°C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5–2 min 72°C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); 1 × (5 min 72°C). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin Extract“-Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers. Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.13 Reverse Transkription

Die Herstellung von cDNA erfolgte mit Hilfe des Enzyms ThermoScriptTM Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe). Zunächst wurde die Gesamt-RNA einer DNase-Behandlung nach Angaben des Herstellers (RQ1 DNase, Promega, Mannheim) unterzogen. Danach wurden ca. 1 µg RNA mit 15 pmol spezifischem Oligonukleotid und 20 nmol dNTPs für 5 min bei 65°C denaturiert. Dem Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 20 µl) wurden dann 4 µl 5 × cDNA-Synthesepuffer, 100 nmol DTT, 40 units RNaseOUTTM Ribonuclease Inhibitor und 15 units ThermoScriptTM RT zugesetzt. Nach einer Inkubation für 45 min bei 50°C wurde die Reaktion bei 85°C für 5 min inaktiviert. Zum Nachweis der cDNA wurden jeweils 2 µl als Matrize in eine PCR-Reaktion eingesetzt.

2.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

2.15 Konstruktion *halS*-defizienter Stämme von *P. aeruginosa*

Zur Inaktivierung des *halS*-Gens wurde mit Hilfe des Suizidvektors pKnockoutΩ die Vektor-Insertionsmutante $\Delta halS$ erstellt. Zunächst wurde unter Verwendung der Oligonukleotide *halSint_up* und *halSint_dwn* ein 507 bp großes internes Fragment von *halS* mittels PCR

amplifiziert. Durch die Verwendung der *Taq*-Polymerase konnte das 5'- und 3'-verkürzte *halS*-Gen über den 3'-T-Überhang in den *XcmI*-geschnittenen Vektor pKnockout Ω kloniert werden. Der entstandene Mutagenesevektor pKOhalS wurde nach Transformation des *E. coli* Stammes S17-1 durch di-parentale Konjugation in Zellen von *P. aeruginosa* PAO1 eingebracht. Durch homologe Rekombination integriert der gesamte Mutagenesevektor in das Genom, so dass das *halS*-Gen unterbrochen wird (schematisch in Abb. 7.A dargestellt). Diese Insertionsmutanten konnten auf LB-Agarplatten mit den Antibiotika Sm, Sp und dem zur Gegenselektion verwendeten Detergenz Irgasan selektiert werden, da der Mutagenesevektor in *P. aeruginosa* nicht replizieren kann. Der Nachweis der Insertion des Mutagenesevektors in das *halS*-Gen erfolgte mittels PCR.

Zur Überprüfung des *halS*-negativen Phänotyps wurde eine weitere Mutante erzeugt, in der das gesamte *halS*-Gen deletiert und gegen eine Gentamycin-Resistenzkassette (Gm^r) ausgetauscht wurde. Zunächst wurden die stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Gensequenzen mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe der Oligonukleotide halS1up und halS1dwn wurde an das 5'-Ende des stromaufwärts-Bereiches die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SalI* eingefügt, während an das 3'-Ende die Erkennungssequenzen für die Enzyme *MluI* und *HindIII* inseriert wurden. Mit Hilfe der Oligonukleotide halS2up und halS2dwn wurden an das 5'-Ende des stromabwärts-Bereiches ebenfalls Erkennungssequenzen für die Enzyme *HindIII* und *MluI* inseriert, an das 3'-Ende die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *BamHI*. Die Klonierung des Mutagenesevektors pSUAL12, der eine Gm^r -Kassette zwischen dem stromaufwärts- und dem stromabwärts-Bereich trägt, ist im Anhang (Abb. 29) dargestellt. Nach der Transformation des *E. coli*-Stammes S17-1 mit dem Mutagenesevektor wurde dieser durch di-parentale Konjugation in Zellen von *P. aeruginosa* PAO1 eingebracht. Die Transkonjuganden, die auf Selektivagarplatten mit den Antibiotika Gm, Tc und dem zur Gegenselektion verwendeten Detergenz Irgasan wachsen konnten, enthielten den Mutagenesevektor durch homologe Rekombination ins Genom integriert, da dieser als pSUP202-Derivat in *P. aeruginosa* nicht replizieren kann. Für das zweite Rekombinationsereignis, das im Verlust des Vektoranteils aus dem Genom resultierte, wurden die Transkonjuganden in 5 ml LB-Medium mit Gm kultiviert und mehrmals überimpft. Die Bakteriensuspension wurde in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-4} auf LB-Agarplatten mit Gm ausplattiert. Durch paralleles Überimpfen von Einzelkolonien auf Selektivagar mit und ohne Tc wurden die erhaltenen Klone auf den Verlust des pSUP202-Vektoranteils hin untersucht. Der Nachweis der entstandenen Mutante $\Delta halS$ (Gm^r) erfolgte, wie in Abb. 7.C dargestellt, mittels PCR.

2.16 Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten (GZE)

Zellfreie Kulturüberstände wurden durch Zentrifugation (15 min, 6.000 UpM, 4°C) gewonnen und im Bedarfsfall sterilfiltriert (Schleicher und Schüll, NC45 Membranfilter, 0,45 μ m Porendurchmesser).

Das Zellsediment wurde entsprechend einer O.D._{580nm} = 10 in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (KP_i, 100 mM, pH 6,5) aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 2 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation für 5 min bei 6.000 UpM entfernt.

2.17 Extraktion von *N*-Acyl-L-Homoserinlactonen (AHLs)

2.17.1 Extraktion von AHL-Signalmolekülen aus Kulturüberständen

Die Extraktion von AHL-Signalmolekülen erfolgte nach einer Kultivierung für 16 h bei 37°C in gepuffertem NYB-Medium (100 mM KP_i , pH 6,5) ohne Antibiotika-Selektion. Dazu wurden 200 ml der zellfreien Kulturüberstände zweimal mit 100 ml Dichlormethan versetzt und 30 min geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurden die vereinigten Dichlormethanextrakte gefiltert (Whatman No. 3) und im Rotationsverdampfer (Büchi, R-205) bei 36°C unter Anlegen eines Vakuums (600 bis 80 mbar) eingetrocknet. Der Rückstand wurde in 400 μ l Ethylacetat (versetzt mit 0,01 % (v/v) Essigsäure) aufgenommen.

2.17.2 Extraktion von AHL-Signalmolekülen aus Bakterienzellen

Die Extraktion intrazellulärer AHL-Moleküle erfolgte nach Byers *et al.* (2002). Es wurden 2 ml einer ÜK zentrifugiert (5 min, 8.000 UpM, RT) und das Zellsediment in 2 ml Ethanol resuspendiert. Nach einer Inkubation für 48 h bei 4°C wurde das Gemisch erneut zentrifugiert und 1 ml der organischen Phase in einer Vakuumzentrifuge (Uniequip Univapo 100 H) eingetrocknet und der Rückstand in 100 μ l 10 mM Ammoniumacetat (pH 6,5) aufgenommen.

2.18 AHL-Degradationstests

AHL-Degradationstests wurden sowohl mit gereinigtem HalS_{LecB}-Fusionsprotein (2.25) als auch mit GZE aus *P. aeruginosa* und *E. coli* durchgeführt. Zur Herstellung der *P. aeruginosa*-GZE wurden ÜK verwendet, in *E. coli* JM101 erfolgte die HalS-Überexpression mit Hilfe des Plasmids pBRAL für 2,5 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG. Die Proben (Proteinlösungen bzw. GZE) sowie die AHL-Lösungen lagen in KP_i (50 - 100 mM, pH 6,8) vor. Jeweils gleiche Volumina (50 – 100 μ l) der Probe und einer AHL-Lösung wurden miteinander vermischt und 30 min bis 24 h bei verschiedenen Temperaturen (RT, 30°C, 37°C) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Gemische in Zentrifugationskonzentratoren (Millipore, Schwalbach) mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa zentrifugiert (30 min, 13.000 UpM). Für den Nachweis langkettiger AHLs wurden jeweils 10 μ l (entsprechend 1 - 200 pmol AHLs), für den Nachweis kurzkettiger AHLs 30 μ l (entsprechend 4 - 20 nmol AHLs) auf mit Indikatorbakterien überschichtete Agarplatten (2.19.2) aufgetragen.

Die Degradation von *Erwinia carotovora*-AHLs wurde indirekt über einen Virulenztest (modifiziert nach Lee *et al.*, 2002) untersucht. *E. carotovora*-Kulturen wurden bei einer $O.D._{580nm} = 1$ geerntet und mit 0,14 M NaCl auf eine $O.D._{580nm} = 0,05$ verdünnt. *P. aeruginosa*-ÜK wurden in 0,14 M NaCl auf eine $O.D._{580nm} = 5$ eingestellt bzw. als GZE verwendet. In *E. coli* JM101 erfolgte die HalS-Überexpression mit Hilfe des Plasmids pBRAL für 3 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG. Jeweils 100 μ l der *P. aeruginosa*- bzw. *E. coli*-Bakteriensuspensionen wurden mit 100 μ l der *E. carotovora*-Suspension vermischt. 20 μ l dieses Gemisches wurden direkt oder nach 2 h Inkubation bei 37°C auf Kartoffelscheiben aufgetragen, die 16 h bei 30°C bebrütet wurden. Als Kontrollen wurden jeweils 20 μ l der einzelnen Bakterienkulturen aufgetragen.

2.19 Detektion von AHL-Signalmolekülen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten synthetischen AHL-Moleküle wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dyker (Lehrstuhl Organische Chemie, Ruhr-Universität Bochum) nach der von Eberhardt *et al.* (1981) beschriebenen Methode hergestellt (C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C12-HSL) oder von der Firma Fluka, Sternheim (C6-HSL) bezogen. Gelöst wurden AHLs stets in Ethylacetat (versetzt mit 0,01 % Essigsäure).

2.19.1 Dünnschichtchromatographische Auftrennung von AHL-Signalmolekülen

Für den Nachweis und die Identifikation von AHL-Signalmolekülen nach Shaw *et al.* (1997) wurden 2 - 6 µl der aus Kulturüberständen extrahierten AHLs (2.17.1) in geeigneter Verdünnung auf Dünnschichtchromatographie-Platten (RP-18 F_{254s}, 20 × 20 cm, Merck, Darmstadt) aufgebracht und als Laufmittel 60 % Methanol in Wasser verwendet. Als Standards wurden synthetische AHLs aufgetragen. Nach der Auftrennung der Proben wurden die DC-Platten für 1 h bei 30°C getrocknet.

2.19.2 Detektion von AHL-Signalmolekülen mit Indikatorbakterien

Der Nachweis von AHL-Signalmolekülen erfolgte nach McClean *et al.* (1997) bzw. Shaw *et al.* (1997) mit Hilfe der AHL-Biosensoren *Chromobacterium violaceum* CV026 bzw. *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), die durch gentechnische Veränderungen keine AHL-Signalmoleküle produzieren, aber auf diese Moleküle in detektierbarer Weise reagieren. Bei Anwesenheit geeigneter AHL-Moleküle produziert *C. violaceum* CV026 Violacein, *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) produziert β-Galaktosidase, so dass violette bzw. hellblaue (durch Zugabe des Substrates X-Gal) Spots detektiert werden können.

DC-Platten bzw. Agarplatten wurden mit 150 ml bzw. 4 ml Indikatorbakterien in Weichagar überschichtet (für *C. violaceum*: 33 % ÜK in LB, 66 % LB-Agar (1,12 % (w/v) Agar), für *A. tumefaciens*: 33 % ÜK in ABG-Medium, 66 % Agar (1,12 % (w/v)), 100 µg/ml X-Gal).

Nach einer Bebrütung für 24 h bei 30°C konnten die entstandenen violetten bzw. hellblauen Spots mit denen der Standard-Moleküle verglichen werden und somit AHLs identifiziert und ihre Konzentration abgeschätzt werden.

2.19.3 Detektion von AHL-Signalmolekülen mittels LC-MS/MS

Der massenspektrometrische Nachweis der AHL-Signalmoleküle erfolgte nach Extraktion der AHLs aus Bakterienzellen (2.17.2). Die LC-MS/MS-Analyse wurde von der Zentralabteilung für Chemische Analysen (ZCH, FZ-Jülich) durchgeführt. Vor der MS-Detektion erfolgte die chromatographische Trennung in der HPLC-Anlage. Die HPLC-Parameter für die LC-MS-Kopplung und die Parameter des Triple Quadrupol Massenspektrometers sind in den Tabellen 7 und 8 aufgeführt.

Tab. 7: HPLC-Parameter für die LC-MS-Kopplung.

Säule	Pronto SIL C18 (RP18 SH)	(Bischoff)
Auto Sampler	Agilent 1100 G 1329 A; 4°C	(Agilent Technologies)
Pumpe	Agilent 1100 G 1312 A	(Agilent Technologies)
Säulenofen	Agilent 1100 G 1316 A; Raumtemperatur	(Agilent Technologies)
Flussrate	500 $\mu\text{l min}^{-1}$	
Injektionsvolumen	5 μl	
Detektion	Triple Quadrupol MS-Anlage	(Applied Biosystems)
Eluent A	5 mM Ammoniumacetat (pH 4,5)	
Eluent B	100 % Methanol	
Gradient	15 min 50 % A, 13 min 5 % A, 2 min 50 % A	

Tab. 8: Parameter des Triple Quadrupol Massenspektrometers.

Massenspektrometer	4000 Q TRAP Linear Ion Trap Quadrupole LC-MS/MS	(Applied Biosystems)
Ionenquelle	ESI (TIS)	
ESI Parameter	Optimierung durch 10 μl Schleifeninjektion (manuell)	
Turbogas	Luft 20 psi	
Nebulizergas	Luft 20 psi	
Curtaingas	N ₂ / 25 psi	
Ionspray voltage	5500 V	
Temperatur (Turboheater)	500°C	
Q2 Kollisionsgas	N ₂	
Auflösung	Unit ($\pm 0,7$ amu)	
Software Version	Analyst 1.4	(Applied Biosystems)

2.20 Extraktion und Detektion des *Pseudomonas-quinolone*-Signals (PQS)

Die PQS-Extraktion erfolgte nach einer Kultivierung für 24 h bei 37°C in NB-Medium ohne Antibiotika-Selektion. Jeweils 10 ml Kultur wurden mit dem gleichen Volumen Ethylacetat (versetzt mit 0,01 % (v/v) Essigsäure) für 30 Sekunden stark gemischt und anschließend zentrifugiert (5 min, 10.000 UpM). Die organische Phase wurde im Rotationsverdampfer (Büchi, R-205) bei 37°C unter Anlegen eines Vakuums (600 bis 80 mbar) eingetrocknet und der Rückstand in 50 μl Methanol aufgenommen.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung erfolgte auf Kieselgel-Platten (F₂₅₄, 20 × 20 cm, Merck, Darmstadt). Die DC-Platten wurden zuvor 30 min in 5 % (w/v) KH₂PO₄ inkubiert und nach dem Trocknen 1 h bei 90°C im Hybridisierungssofen erhitzt. Aufgetragen wurden jeweils 10 μl der Proben, als Laufmittel wurde Dichlormethan:Methanol (95:5) verwendet. Die DC-Platten wurden unter UV-Licht betrachtet. Die Identifikation des PQS er-

folgte durch ESI-MS-Analyse der in Frage kommenden Spots (durchgeführt von der Arbeitsgruppe Dr. Piotrowski, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum).

2.21 Quantifizierung der Pyocyanin-Produktion

Nach dem modifizierten Protokoll von Cox (1986) wurden 4 ml Kulturüberstand einer NB-Übernachtskultur viermal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Der relative Pyocyanin-Gehalt der organischen Phase wurde spektralphotometrisch bei 695 nm bestimmt. Nach Essar *et al.* (1990) wurde dieser Wert mit 85,36 multipliziert und somit die Pyocyanin-Konzentration in µg pro ml Kulturüberstand berechnet.

2.22 Orcinol-Test zum Rhamnolipid-Nachweis

Rhamnolipid-Gehalte in Kulturüberständen wurden über einen, nach Ochsner (1993) modifizierten, Orcinol-Test (Chandrasekaran & Bemiller, 1980) ermittelt. Dabei wurden 300 µl Kulturüberstand einer PPGAS-Übernachtskultur (falls erforderlich mit Medium verdünnt) zweimal mit 600 µl Ethylacetat extrahiert, die gesammelten organischen Phasen in einer Vakuumzentrifuge (Uniequip Univapo 100 H) eingetrocknet und in 100 µl Wasser gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Orcinol (1,6 % (w/v) in Wasser) und 800 µl H₂SO₄ (60 %) wurde das Gemisch 30 min bei 80°C erhitzt und die Absorption bei 421 nm gemessen. Rhamnosekonzentrationen wurden durch Vergleich mit Rhamnose-Standards und Rhamnolipidkonzentrationen unter Bezugnahme auf die folgende Gleichung ermittelt:

1 µg Rhamnose $\triangleq$ 2,5 $\pm$ 0,5 µg Rhamnolipid.

2.23 Nachweis der Pathogenität im Pflanzenmodell

Als Modellpflanze zum Nachweis der Pathogenität von *P. aeruginosa* diente *Arabidopsis thaliana*. Modifiziert nach Rahme *et al.* (2000) wurden Bakteriensuspensionen auf die Unterseite der Blätter intakter Pflanzen aufgetragen. Dazu wurden jeweils 5 µl einer ÜK in NB (O.D._{580nm} = 1,1 bis 1,3) neben die Mittelrippe pipettiert, ohne die Pflanzen zu verletzen. Die Pathogenität der Bakterien wird durch die Entstehung lokaler Gewebsläsionen sichtbar. Zur Dokumentation wurden beimpfte Blätter nach vier Tagen abgeschnitten und fotografiert. Die Pflanzen wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Pollmann (Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt.

2.24 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970), bestehend aus einem 5 %igen Sammel- und einem 15 %igen Trenngel. Die Protein-Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und 10 min bei 95°C denaturiert.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100 - 200 V. Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg) gefärbt.

2.25 Denaturierung und *in vitro*-Renaturierung des HalS_{LecB}-Fusionsproteins

Die Expression und Reinigung des HalS_{LecB}-Fusionsproteins erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit (Bartels, 2004). Die heterologe Überexpression des *halS*-Gens erfolgte als Genfusion mit dem *lecB*-Gen aus *P. aeruginosa* mit Hilfe des Expressionsvektors pUSHL in dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Nach Induktion mit 0,5 mM IPTG und weiteren 20 h Kultivierung bei 30°C wurden die Zellen geerntet, in 50 mM KP_i (pH 7) auf eine O.D._{580nm} = 35 konzentriert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (Branson-Sonifier W250, 4 × 1 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Die Denaturierung erfolgte für 1 h bei 37°C in 8 M Harnstoff. Die Renaturierung des HalS_{LecB}-Fusionsproteins erfolgte nach Dekker *et al.* (1995) durch eine 1:14 Verdünnung des denaturierten GZE im Renaturierungspuffer (50 mM KP_i, 1 mM CaCl₂, 0,1 M Glycin, 100 µM ZnCl₂) und Inkubation für 3 h bei 30°C. Nach Zentrifugation (20 min, 9.000 UpM, 4°C) wurden 50 ml des klaren Überstandes des Renaturierungsansatzes auf eine D-Mannose-Agarose-Säule (Sigma, Deisenhofen) gegeben, diese mit 250 ml Waschpuffer (50 mM KP_i) gewaschen und das HalS_{LecB}-Fusionsprotein anschließend mit 20 mM D-Mannose in 50 mM KP_i (pH 7) eluiert (Bartels, 2004).

2.26 Enzymaktivitätstests

2.26.1 Detektion der Proteaseaktivität

Neben Skim-Milk-Indikatorplatten (2.4) wurde proteolytische Aktivität auch mittels Novex® Zymogramm-Gelen (Blue Casein) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) detektiert. Dazu wurden 12,5 µl zellfreier Kulturüberstand mit 12,5 µl 2 × SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 0,005 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) versetzt und ohne aufzukochen in den Casein-haltigen Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Proteasen erfolgte nach Herstellerangaben.

2.26.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität

Die Aktivität der β-Galaktosidase wurde in Toluol-permeabilisierten Zellen mit *o*-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG) als Substrat im Spektralphotometer (NovaspecII, Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 420 nm nach Miller (1972) bestimmt.

2.27 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)

Biofilme wurden in jeweils zwei unabhängigen Experimenten kultiviert und es wurden mindestens drei verschiedene Stellen eines Biofilms mittels CLSM analysiert. Die mit dem Nukleinsäure-bindenden Farbstoff SYTO 9 (Molecular Probes, Eugene, USA) gefärbten Biofilme wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Jena) unter Verwendung einer Achroplan 40 × 0,60-NA-Linse visualisiert. Die Aufnahme der 3-D-Bildstapel erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm unter Einsatz eines LP 505 nm Langpassfilters, wobei die Größe des *pinhole* 1,0 Airy unit betrug. Für die Aufnahme der Biofilme wurde die Zeiss LSM Software (Version 2.8) verwendet.

2.28 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software), dem „DNA STAR“-Programmpaket (Lasergen) und PSORT (<http://www.psort.nibb.ac.jp>) (Nakai & Horton, 1999).

Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997).

DNA-Sequenzinformationen von *P. aeruginosa* wurden von dem „*Pseudomonas*-Genome Project“ bezogen (<http://www.pseudomonas.com>).

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Scanners, einer digitalen Kamera sowie einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Während der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen der Abbildungen vorgenommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Das Protein HalS von *Pseudomonas aeruginosa* zeigt Homologien zu AHL-Lactonasen

Als erstes Enzym, welches in der Lage ist, bakterielle Signalmoleküle des *N*-Acyl-L-Homoserinlacton (AHL)-Typs zu degradieren, wurde die AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus spec.* 240B1 identifiziert. Dieses Enzym besteht aus 250 Aminosäuren und wird von einem 750 bp umfassenden Gen kodiert. Aufgrund der fehlenden Signalsequenz und der ausschließlich Zell-assoziierten Lactonase-Aktivität wurde AiiA als cytoplasmatisches Enzym beschrieben (Dong *et al.*, 2000).

Durch Sequenzvergleiche mit dem *P. aeruginosa*-Genom wurde ein zu AiiA homologes putatives Protein mit 29 % identischen und 42 % ähnlichen Aminosäuren identifiziert. In der *Pseudomonas*-Datenbank (<http://www.pseudomonas.com>) ist dieses, durch den ORF PA1415 kodierte, Protein als hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion eingetragen. Laut Sequenzanalysen handelt es sich um eine Metallo- β -Lactamase mit intrazellulärer Lokalisation. Dieses AHL-Lactonase-homologe Protein wird im Folgenden als HalS bezeichnet. Es besteht aus 242 Aminosäuren, hat ein errechnetes Molekulargewicht von 27 kDa und das kodierende Gen umfasst 729 bp.

Die relativ geringe Homologie von 29 % identischen Aminosäuren zwischen HalS und der AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus* zeigt sich auch beim Vergleich mit anderen AHL-Lactonasen. So weisen die AHL-Lactonasen AiiB und AttM aus *Agrobacterium tumefaciens*, AhlD aus *Arthrobacter sp.* IBN110 und AhlK aus *Klebsiella pneumoniae* zwischen 25 % und 32 % identische Aminosäuren mit AiiA auf (Carlier *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003). Charakteristisch für die AHL-Lactonasen sind jedoch zwei konservierte Bereiche, die auch die HalS-Sequenz aufweist. Das HXXHDXH-Motiv wurde von Melino *et al.* (1998) als Zink-Bindemotiv beschrieben, für die Aktivität der AHL-Lactonase AiiA ist es essentiell (Dong *et al.*, 2000). Die beiden von Dong *et al.* (2000) identifizierten konservierten Bereiche sind in Abbildung 6 grau hinterlegt, die von Liu *et al.* (2005) als Zink-Liganden identifizierten Aminosäuren sind durch Fettdruck und Sternchen hervorgehoben.

	1				50
Pa_HalS					MRIV
Bs_AiiA		MTVK	KLYFVPAGRC	MLDHSSVNST	LTPGELLDLP
At_AttM		MTDI	RLYMLQSGTL	KCKVHNIKMN	QNGGADYEIP
At_AiiB	...MGNKLFV	LDLGEIRVDE	NFIIANSTFV	TPQKPTVSSR	LI.....DIP
As_AhlD	MEKDQLKVRV	LETGVMEADM	AWLLLKPGRI	IADRNNKERQ	REWG...EIP
Kp_AhlK		MMPEI	KLFMFQSGTQ	HCRYQHIRMN	QGVGEHYEIP
	51				100
Pa_HalS	SRDRWFETR	FYNGISLIHE	PYVRPFYRCN	MWHVQGRERD	VLVDSGSGLV
Bs_AiiA	VWCYLLETEE	GPILVDTGMP	ESAVNNEGLF	NGTFVEGQVL	PKMTEEDRIV
At_AttM	VPFFLITHPA	GHTVIDGGNA	IEVATDPRGH	WGGICD.VYW	PVLDKDQGCV
At_AiiB	VSAYLIQCTD	ATVLYDTGCH	PECMGTNGRW	PAQSQLNAPY	IGASECN.LP
As_AhlD	THAVLIEHPE	GRILWDTGVP	RDWSSRWQES	GMDNYFPVKT	ESSSESGLD
Kp_AhlK	VPWFLTHPD	GFTLIDGGLA	VEGLKDPSGY	WGSTVE.QFK	PVMSEEQGCV
	101		* * *		150
Pa_HalS	SLCEQLPWLT	ERPLLAVASH	THFDHIAGHH	EFAERLAHPA	EAEILAAPDG
Bs_AiiA	NILKRVGYEP	EDLLYIISSH	LHFDHAGGNG	AFIN.....T	PIIVQRAEYE
At_AttM	DQIKALGFDP	ADVKYVQSH	LHLDHTGAIG	RFPN.....A	THIVQRSEYE
At_AiiB	ERLRQLGLSP	DDISTVVLSH	LHNDHAGCVE	YF.....G	KSRLIAHEDE
As_AhlD	SSLAQVGLEP	ADIDLLILSH	LHLDHAGNAR	LFDN.....G	KTIVANRKE
Kp_AhlK	EQLKRIGIAP	EDIRYVVLSH	LHSDHTGAIG	RFPH.....A	THVVQRQEYE
	151				200
Pa_HalS	DNTLARAYVG	DEMFEAHPEC	PLCYAEYRVR	AAPATRLIDE	GDVLDLGDVR
Bs_AiiA	AAQHSEEYL.	KECIL	PNLNYK....	...IEG...	DYEVVPG...
At_AttM	YAFTPDWFAG	GGYIRKDFDK	PGLKWQ....	...FLNGAQD	DYYDVYGDGT
At_AiiB	FATAVRYFAT	GDHSSPYIVK	DIEAWLATPR	NWDLVGRDER	ERELAPGVNL
As_AhlD	LEGVQEIM..	GSHLGHLKA	DFEGLK....	...IDAIEG	DTEIVPGVSV
Kp_AhlK	YAFAPDWFTS	GAYCRRDFDR	PQLNWL....	...FLNGLSD	DHYDLYGDGT
	201	*		*	250
Pa_HalS	LQVLHTPGHS	PGGISL...W	EAATQTLFSG	DIVYD.....	GPLVEDAYHS
Bs_AiiA	VQLLHTPGHT	PGHQSLLIET	EKSGPVLLTI	DASYTKENF.	ENEV.PFAGF
At_AttM	LTTIFTPGHA	PGHQSFVRL	PNSKPLLLTI	DAAYTLDHWE	EKAL.PGFLA
At_AiiB	LN..FGTGHA	SGMLGLAVRL	EKQPGFLLVS	DACYTATNYG	PPARRAGVLH
As_AhlD	ID..T.PGHT	WGTMSLQVDL	PDDGTKIFTS	DAVYLRDSFG	PPAIGAAVWV
Kp_AhlK	LQCIFTPGHS	PGHQSFVRL	PGGTNFTLAI	DAAYTLDHYH	EKAL.PGLMT
	251		*		299
Pa_HalS	NLDDYASSLA	RLRELPV...	RTVHGGHFAS	FSGERLREMI	VAWFRNHDR
Bs_AiiA	DSELALSSIK	RLKEVVMKEK	PIVFFGHDIE	QERGCKVFPE	YI
At_AttM	STVDTVRSVQ	KLRTYAEKHD	ATVVTGHDPE	AWANFKKAPE	FYA
At_AiiB	DTIGYDRTVS	HIRQYAESRS	LTVLFGHDRE	QFASLIKSTD	GFYE
As_AhlD	NNLLWLESVE	KLRRIQERTN	AEMIFGHESE	QTSQIRWAHQ	GHYQ
Kp_AhlK	SATDVAQSVR	KLRQLTERYH	AVFIPGHDPE	EWKKNRLAPA	CYY

Abb. 6: Vergleich der Aminosäuresequenzen von HalS aus *P. aeruginosa* (Pa_HalS) und AHL-Lactonasen. Angegeben sind die Sequenzen der AHL-Lactonasen AiiA aus *Bacillus spec.* 240B1 (Bs_AiiA, Dong *et al.*, 2000), AttM und AiiB aus *Agrobacterium tumefaciens* (At_AttM, Zhang *et al.*, 2002b; At_AiiB, Carlier *et al.*, 2003), AhlD aus *Arthrobacter spec.* (As_AhlD, Park *et al.*, 2003) und AhlK aus *Klebsiella pneumoniae* (Kp_AhlK, Park *et al.*, 2003). Besonders konservierte Regionen sind grau hinterlegt, an der Zink-Bindung beteiligte Aminosäuren sind durch Fettdruck und Sternchen hervorgehoben.

3.2 Konstruktion *halS*-defizienter und *halS*-überexprimierender Stämme von *P. aeruginosa*

Um den Einfluss von HalS auf AHL-Signalmoleküle und bakterielle *Quorum-sensing* (QS)-Systeme zu untersuchen, wurde zunächst eine Mutante erzeugt, deren *halS*-Gen durch Insertion eines Mutagenesevektors inaktiviert wurde. Als Parentalstamm für die Mutagenese, die in Abbildung 7.A schematisch dargestellt ist, wurde der Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 verwendet. Durch die Vektorintegration wurde ein Stamm erzeugt, der zwei inaktive Kopien des *halS*-Gens enthält, wobei die erste am 3'-Ende und die zweite am 5'-Ende verkürzt ist. Zwischen diesen beiden inaktiven Kopien befindet sich die Vektorsequenz mit der Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzkassette ($\Omega\text{Sm}^r/\text{Sp}^r$). Die erfolgreiche Insertion des Mutagenesevektors in das *halS*-Gen wurde mittels PCR nachgewiesen. Die entstandene Mutante wird im Folgenden als ΔhalS bezeichnet.

Zur Verifizierung des *halS*-negativen Phänotyps wurde später eine weitere Mutante erzeugt, in der das gesamte *halS*-Gen deletiert und gegen eine Gentamycin-Resistenzkassette (Gm^r) ausgetauscht wurde (Abb. 7.B). Diese Mutante wird im Folgenden als ΔhalS (Gm^r) bezeichnet. Der Nachweis des Austausches des *halS*-Gens gegen die Gm^r -Kassette erfolgte mittels PCR (Abb. 7.C). Diese Mutante zeigte den gleichen Phänotyp wie die zuvor erzeugte Mutante, deren *halS*-Gen durch Insertion des Mutagenesevektors nur unterbrochen wurde. Daher wurde überwiegend darauf verzichtet, zusätzlich die Mutante ΔhalS (Gm^r) abzubilden.

Für die *halS*-Überexpression wurden zunächst T7-Expressionssysteme verwendet. Sowohl bei Überexpression im heterologen Wirt *Escherichia coli* BL21 (DE3) als auch im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 mit chromosomal integrierter T7-RNA-Polymerase wurden mittels SDS-PAGE-Analysen hohe Ausbeuten an überexprimiertem Protein nachgewiesen, jedoch lag dieses in Form von unlöslichen Proteinaggregaten (*inclusion bodies*) vor (ohne Abb.). Da der Einfluss von HalS auf physiologische Prozesse untersucht werden sollte, wurde ein moderateres Überexpressionssystem gewählt und das *halS*-Gen in das Plasmid pBBR1MCS kloniert, wo es unter der Kontrolle des in *P. aeruginosa* konstitutiven *lac*-Promotors steht. Das entstandene Plasmid pBRAL sowie der entsprechenden Leervektor pBBR1MCS wurden durch Konjugation in den Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 eingebracht (*halS*⁺⁺ bzw. LV).

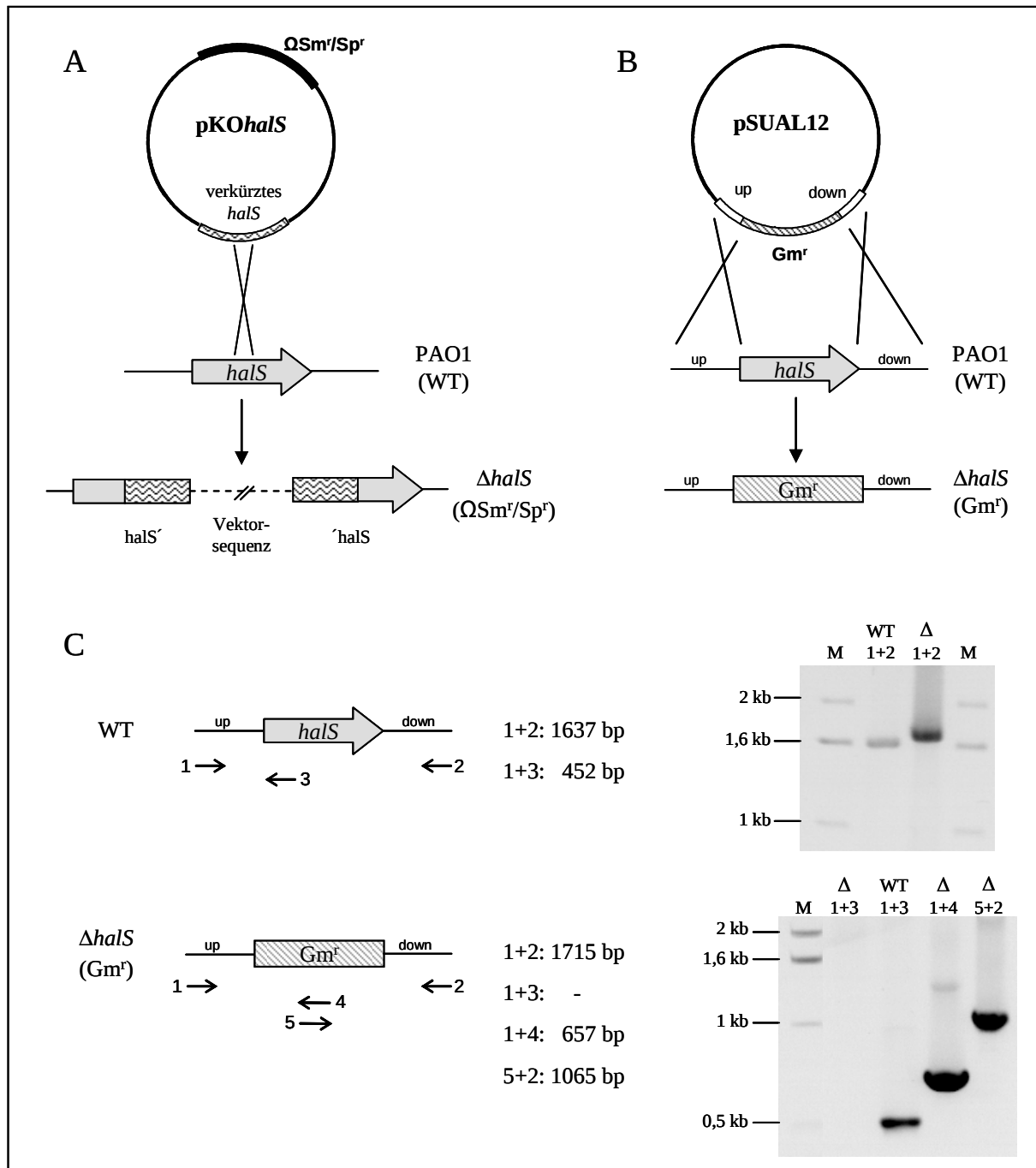


Abb. 7: Konstruktion und Nachweis der $halS$ -defizienten Mutanten von *P. aeruginosa*. **A:** Schema zur Konstruktion der Vektor-Insertionsmutante $\Delta halS$. Ein internes, am 3'- und 5'-Ende verkürztes Fragment des $halS$ -Gens wurde mittels PCR amplifiziert und in den Suizidvektor pKnockout kloniert. Durch homologe Rekombination (*single crossover*) inseriert der gesamte Mutagenesevektor pKOhalS in das $halS$ -Gen. Die entstehende Mutante enthält zwei inaktive Kopien des $halS$ -Gens, die durch die Vektorsequenz inklusive der $\Omega Sm^r/Sp^r$ -Kassette getrennt sind. **B:** Schema zur Konstruktion der Insertionsmutante $\Delta halS$ (Gm^r). Die flankierenden stromaufwärts- (up) und stromabwärts- (down) Bereiche des $halS$ -Gens wurden mittels PCR amplifiziert und mit einer Gm^r -Kassette in den Suizidvektor pSUP202 kloniert (die Konstruktion des Mutagenesevektors pSUAL12 ist im Anhang (Abb. 29) detailliert dargestellt). Durch homologe Rekombination (*double crossover*) wurde das gesamte $halS$ -Gen gegen die Gm^r -Kassette ausgetauscht. **C:** Nachweis der $\Delta halS$ (Gm^r)-Mutante mittels PCR. **Links:** Schematische Darstellung der Bindestellen der mit 1 bis 5 bezeichneten Oligonukleotide im Chromosom der *P. aeruginosa*-Stämme sowie Längenangaben der erwarteten Produkte. **Rechts:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 0,8 % Agarosegel. Verwendete Oligonukleotide: $halS1up$ (1), $halS2dwn$ (2), $halSdwn1$ (3), $Gmup1$ (4), $Gmdwn1$ (5). M: DNA-Marker, WT: Wildtyp, Δ : $\Delta halS$ (Gm^r).

3.3 Die *halS*-Deletion führt zu einer Erhöhung der Pyocyaninproduktion

Bei der Kultivierung der *halS*-Mutante fiel auf, dass sich die Farbe von Übernachtskulturen deutlich von der des Wildtyps unterscheidet und bei vergleichbaren Zelldichten ein wesentlich tieferes Blau-Grün aufweist (Abb. 8.A). Die Farbe von *P. aeruginosa*-Kulturen wird durch das blaue Pigment Pyocyanin beeinflusst, dessen Produktion vom Rhl-System reguliert wird. Pyocyanin hat eine wichtige Funktion bei der Virulenz dieses Bakteriums, da es die Cilienbewegung sowie die Proliferation von Lymphozyten hemmt und durch Radikalbildung zu Gewebeschäden führt (Ulmer *et al.*, 1990; Whiteley *et al.*, 1999). Um die Pyocyaninproduktion der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme zu vergleichen, wurden Kulturüberstände von NB-Übernachtskulturen mit Chloroform extrahiert. Abbildung 8.B zeigt den farblosen Extrakt des *P. aeruginosa*-Wildtyps und den blauen Extrakt der *halS*-Mutante. Zur Quantifizierung der Pyocyaninproduktion wurde die Absorption der Chloroform-Extrakte bei 695 nm gemessen und die Konzentration in µg Pyocyanin pro ml Kulturüberstand berechnet. Dabei wurde für die *halS*-Mutante eine um das Zweifache erhöhte Pyocyaninmenge ermittelt (Abb. 8.C). Die Überexpression des *halS*-Gens hatte keinen deutlichen Einfluss auf den Pyocyaningehalt. Durch Einbringen des *halS*-Überexpressionsplasmids pBRAL in die *halS*-Mutante ($\Delta halS$ pBRAL) konnte der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt werden, die Kulturfarbe entsprach der des Wildtyps.

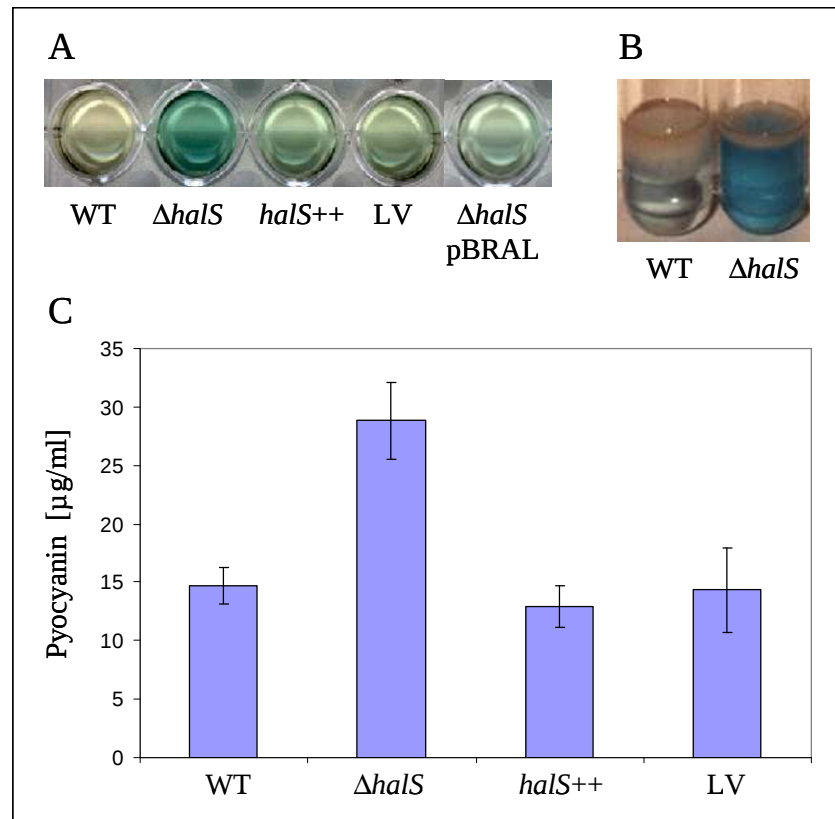


Abb. 8: Einfluss der *halS*-Expression auf die Pyocyaninproduktion von *P. aeruginosa*. **A:** Kulturüberstände nach einer Kultivierung von 16 h bei 30°C in NB-Medium. **B:** Chloroform-Extrakte nach viermaliger Extraktion von 4 ml Kulturüberstand mit je 1 ml Chloroform. **C:** Die Pyocyaninkonzentration wurde durch spektralphotometrische Messung der Chloroform-Extrakte bei 695 nm ermittelt und in $\mu\text{g/ml}$ Kulturüberstand angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. Untersucht wurden folgende *P. aeruginosa*-Stämme: Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm ($halS^{++}$), Leervektorkontrolle (LV) und *halS*-Mutante mit *halS*-Überexpressionsplasmid ($\Delta halS$ pBRAL).

3.4 Die *halS*-Überexpression inhibiert die Schwärmbewegung

Einen wichtigen Beitrag zur Virulenz von Bakterien leistet ihre Beweglichkeit. Sie ermöglicht die Ausbreitung der Zellen und ist eine Voraussetzung zur Bildung differenzierter Biofilme (O'Toole & Kolter, 1998). *P. aeruginosa* ist in der Lage, sich auf drei unterschiedliche Arten zu bewegen. Mit Hilfe der Flagelle können die Zellen in flüssigen Umgebungen schwimmen, die Typ IV-Pili ermöglichen die so genannte *twitching motility* entlang fester Oberflächen, und beide Oberflächenstrukturen sind an der Schwärmbewegung in semisoliden Umgebungen beteiligt (Köhler *et al.*, 2000). Für das Schwärmen wurde eine Regulation über QS nachgewiesen (Köhler *et al.*, 2000). Daher sollte überprüft werden, ob eine unterschiedliche Expression des *halS*-Gens diese Art der Beweglichkeit beeinflusst. Dazu wurden Einzelkulturen der *P. aeruginosa*-Stämme auf semisoliden Agarplatten aufgebracht, die eine Schwärmbewegung ermöglichen. Abbildung 9 zeigt, dass die Inaktivierung des *halS*-Gens die Beweglichkeit durch Schwärmen nicht beeinflusste. Sowohl der Wildtyp als auch die *halS*-Mutante

breiteten sich bereits innerhalb von 24 h auf der Agarplatte aus und besiedelten die gesamte Platte innerhalb weniger Tage. Im Gegensatz dazu verhinderte die *halS*-Überexpression die Ausbreitung der Zellen. Auch nach längeren Inkubationszeiten waren nur Ansätze des Schwärmens erkennbar, aber die Zellen breiteten sich nicht auf der Agarplatte aus.

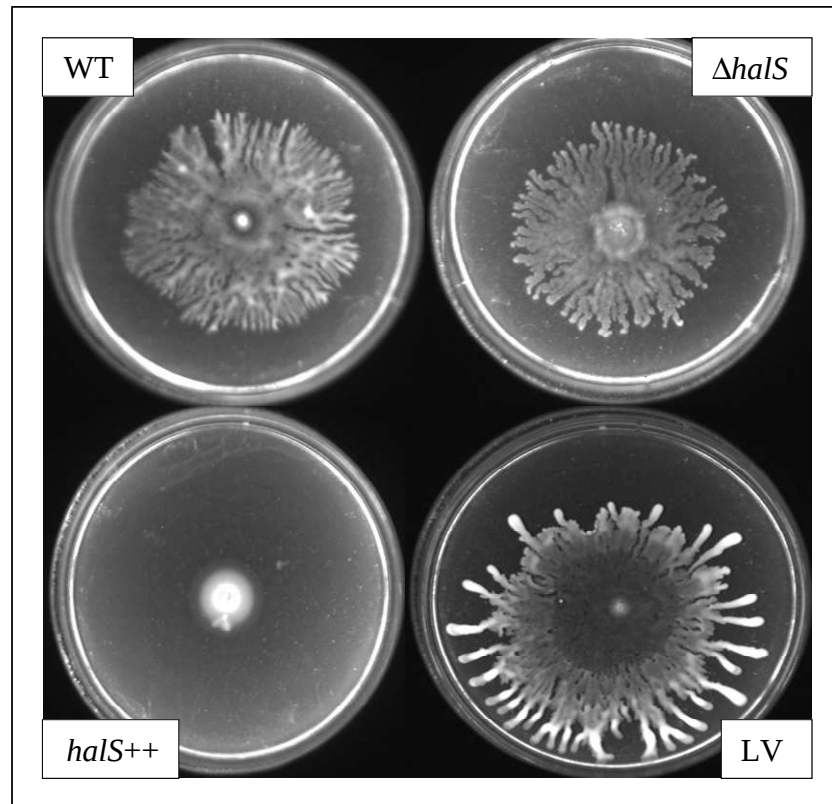


Abb. 9: Inhibierung der Schwärgbewegung durch HalS-Überproduktion. Die M9-Minimalagarplatten mit 0,5 % Agar und 0,05 % Glutamat als einziger Stickstoffquelle wurden mit Einzelkolonien der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS++*) und Leervektorkontrolle (LV) beimpft und 24 h bei 37°C und weitere 24 h bei RT bebrütet. Jeder Stamm wurde in fünf unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmung überprüft.

Um zu überprüfen, dass nur die QS-regulierte Schwärgbewegung beeinträchtigt ist und kein generelles Bewegungsdefizit durch die *halS*-Überexpression hervorgerufen wird, wurden ebenfalls das Schwimmverhalten sowie die *twitching motility* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass weder die Inaktivierung des *halS*-Gens noch dessen Überexpression die Flagellen-vermittelte Schwimmbewegung oder die Typ IV-Pili-vermittelte *twitching motility* beeinflusst (Abb. 10). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Beeinträchtigung des Schwärmens durch die *halS*-Überexpression durch eine verminderte Funktionalität der Flagelle bzw. der Typ IV-Pili bedingt ist.

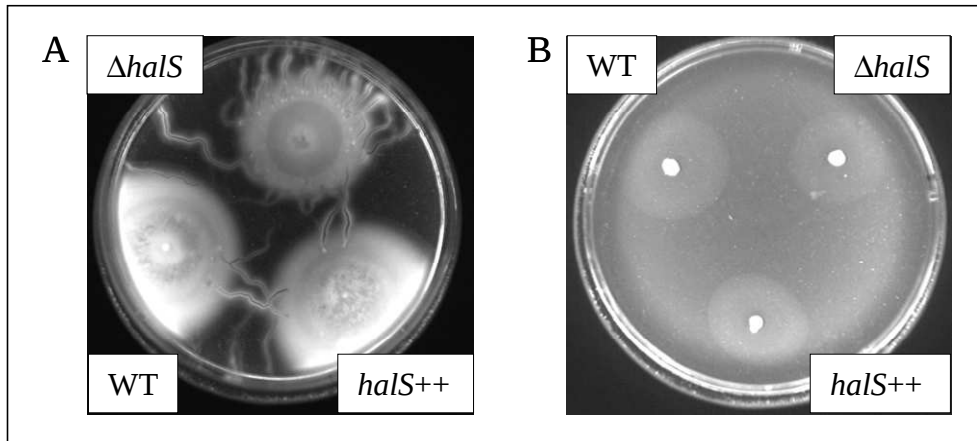


Abb. 10: Nachweis des Schwimmverhaltens (A) und der twitching motility (B) bei *P. aeruginosa*. **A:** Die M9-Minimalagarplatten mit 0,3 % Agar wurden mit Einzelkolonien beimpft und 24 h bei 37°C und weitere 24 h bei RT bebrütet. **B:** Einzelkolonien wurden mit Zahnstochern durch LB-Agar (1,5 % Agar) bis zum Grund der Petrischale gestochen und 24 h bei 37°C und weitere 48 h bei RT bebrütet. Die Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$) und HalS-Überproduktionsstamm (*halS*++) wurden in drei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmung überprüft.

3.5 Durch die *halS*-Überexpression wird der Rhamnolipidgehalt reduziert

Neben der Regulation durch QS wurde als weitere Voraussetzung für die Schwärmfähigkeit bei *P. aeruginosa* die Produktion von Rhamnolipiden beschrieben (Köhler *et al.*, 2000). Diese Biodetergenzien sind Virulenzfaktoren, die die Löslichkeit hydrophober Kohlenwasserstoffe und somit deren Bioverfügbarkeit erhöhen (Beal & Betts, 2000). Des Weiteren wird die Reibung zwischen Zellen und Oberflächen verringert, so dass Rhamnolipide sowie deren Vorstufen wie „Schmierstoffe“ wirken und die Beweglichkeit durch Schwärmen verbessern (Déziel *et al.*, 2003; Köhler *et al.*, 2000). Die Zelldichte-abhängige Biosynthese von Rhamnolipiden wird von Rhamnosyltransferasen katalysiert. Die Strukturgene der Rhamnosyltransferase 1, *rhlAB*, sind mit den Genen *rhlR/rhlI* in einem Gencluster organisiert und werden durch das Rhl-System reguliert (Ochsner & Reiser, 1995).

Um den Einfluss von HalS auf die Rhamnolipidproduktion zu untersuchen, wurden die Rhamnolipidgehalte in den Kulturüberständen der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*++) und Leervektorkontrolle (LV) miteinander verglichen. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte für 24 h bzw. 48 h bei 30°C in PPGAS Medium, welches aufgrund einer hohen Rhamnolipidproduktion für deren Analysen besonders geeignet ist (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Zhang & Miller, 1994).

Der quantitative Nachweis der Rhamnolipide erfolgte über einen Orcinol-Test (Chandrasekaran & Bemiller, 1980). Hierbei handelt es sich um einen photometrischen Test zum Nachweis von 3-Desoxy-Hexosen (Rhamnose), der die indirekte Quantifizierung von

Rhamnolipiden ermöglicht. Wie Abbildung 11 zeigt, hatte die Inaktivierung des *halS*-Gens keinen Einfluss auf den extrazellulären Rhamnolipidgehalt, die *halS*-Mutante verhielt sich ähnlich wie der Wildtyp und die Leervektorkontrolle. Demgegenüber führte die *halS*-Überexpression zu einer deutlichen Verringerung des Rhamnolipidgehaltes um ca. 36 %.

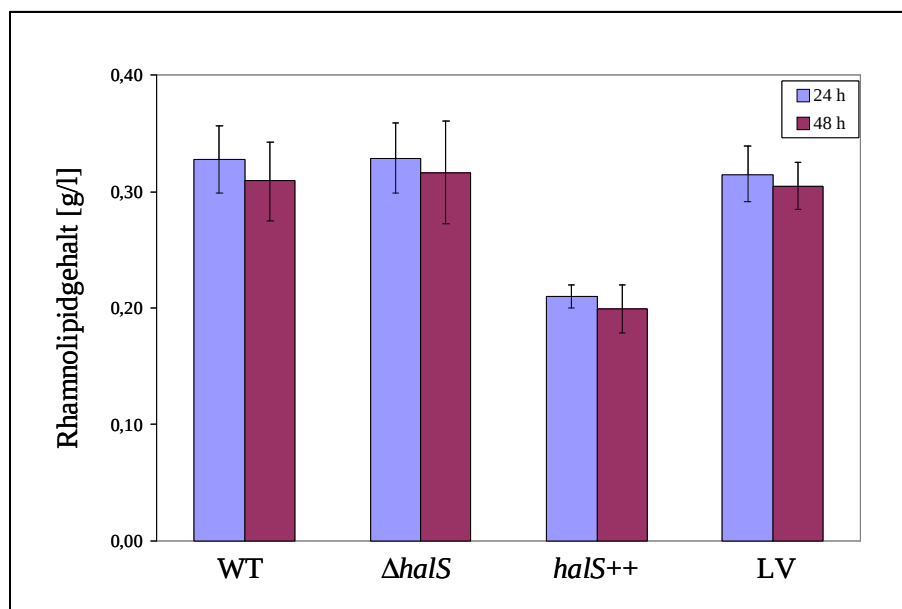


Abb. 11: Einfluss der *halS*-Expression auf die Rhamnolipidgehalte in Kulturüberständen von *P. aeruginosa*. Die *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*++) und Leervektorkontrolle (LV) wurden 24 h bzw. 48 h bei 30°C in PP GAS-Medium kultiviert und extrazelluläre Rhamnolipidgehalte durch den photometrischen Orcinol-Test bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

3.6 Einfluss von HalS auf die Biofilmbildung

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des *halS*-Gens sowohl die Beweglichkeit durch Schwärmen als auch die Rhamnolipidproduktion beeinträchtigt. Diese beiden QS-abhängigen Prozesse sind an der Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* beteiligt (Davey *et al.*, 2003; O'Toole & Kolter, 1998). Daher sollte untersucht werden, ob ein Einfluss von *halS* auch bei der Entwicklung von Biofilmen zu beobachten ist. Dazu wurden die verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen kultiviert und der Bewuchs von Glasobjektträgern bzw. -deckgläsern untersucht. Die Analyse der Biofilme mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) sowie die Kultivierung unter dynamischen Kulturbedingungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Wingender (*Biofilm Centre*, Abteilung Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt.

3.6.1 Biofilmbildung unter statischen Kulturbedingungen

Um die Bedeutung von HalS für den Prozess der Biofilmbildung zu untersuchen, wurden Biofilme der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺) und Leervektorkontrolle (LV) auf Glasobjektträgern in einem statischen System kultiviert. In diesem statischen System waren die Objektträger in Petrischalen von NB-Medium umgeben. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C auf einer Wippe, so dass ein langsamer Fluss des Mediums über die Objektträger erzeugt wurde und die entstehenden Biofilme abwechselnd von Luft und Medium umgeben waren. Nach 48 h wurden die Biofilme angefärbt und mittels CLSM analysiert. Während die Zelldichten der planktonischen Kulturen bei allen Stämmen vergleichbar waren, zeigten sich signifikante Unterschiede im Bewuchs der Glasoberfläche (Abb. 12). Der Wildtyp bildete in diesem System einen relativ homogenen Biofilm. Insbesondere die Seitenansicht (Abb. 12.B) verdeutlicht eine effiziente Besiedelung der Oberfläche und eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in den verschiedenen Biofilmschichten. Dagegen waren die *halS*-defiziente Mutante sowie der HalS-Überproduktionsstamm in der Biofilmbildung stark beeinträchtigt. Es waren nur wenige Zellen am Substratum angeheftet und es entwickelte sich kein mehrschichtiger Biofilm.

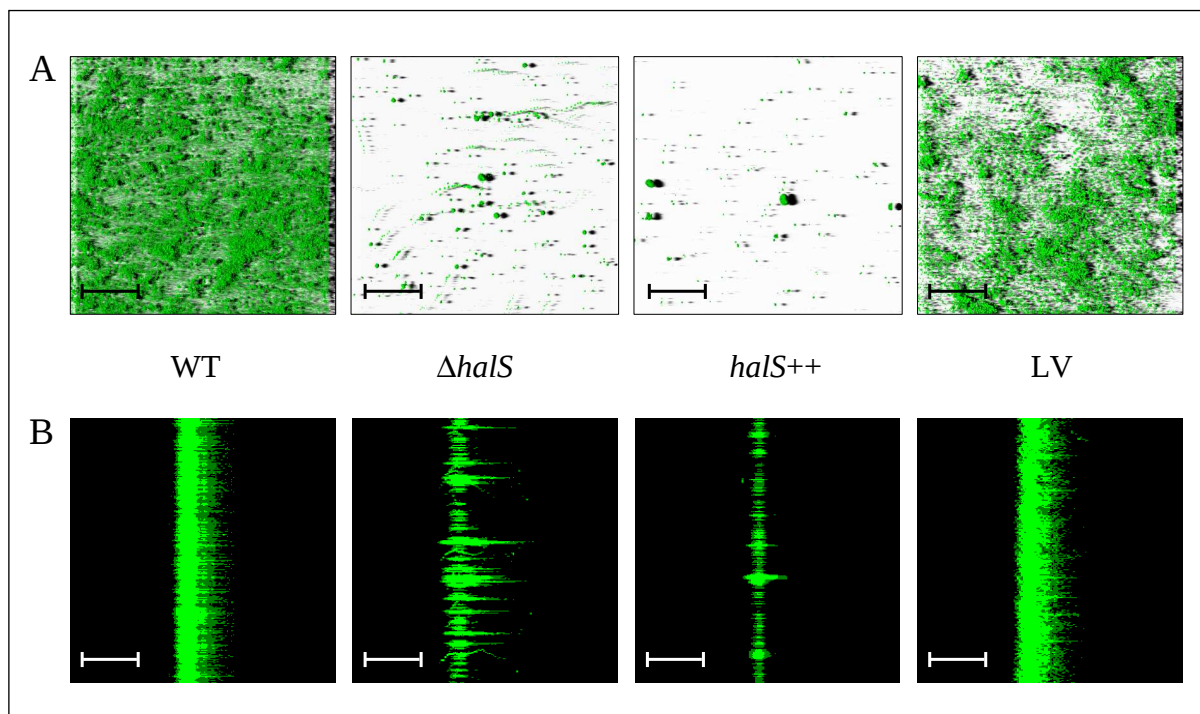


Abb. 12: CLSM-Aufnahmen von Biofilmen unter statischen Kulturbedingungen. Die Kultivierung der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺) und Leervektorkontrolle (LV) erfolgte auf Glasobjektträgern, die 48 h bei 30°C in NB-Medium auf einer Wippe inkubiert wurden. Die Zellen wurden mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYTO 9 gefärbt und mittels CLSM visualisiert. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten. **A:** Aufsicht. **B:** Seitenansicht. Größenbalken: 50 μ m.

3.6.2 Biofilmbildung unter dynamischen Kulturbedingungen

Die Analyse der Biofilmstruktur nach 48 h im statischen System ergab, dass sowohl die *halS*-defiziente Mutante als auch der HalS-Überproduktionsstamm in der Biofilmbildung beeinträchtigt sind. Um verschiedene Stadien der Biofilmentwicklung zu untersuchen, wurden die *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*++) und Leervektorkontrolle (LV) zusätzlich in einem Durchflussmodell kultiviert und die Biofilme in regelmäßigen Abständen mittels CLSM analysiert. Dieses Modell bestand aus Durchflusszellen mit Glasdeckgläsern als Substratum zur Anheftung der Bakterienzellen. Mit Hilfe von peristaltischen Pumpen wurde ein kontinuierlicher Medienstrom durch diese Durchflusszellen geleitet. Die Kultivierung erfolgte über drei Tage bei 30°C in APM-Medium. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen gefärbt und die Biofilme mittels CLSM analysiert. Exemplarisch sind in Abbildung 13 die Biofilme der verschiedenen Stämme nach 72 h dargestellt. Der Wildtyp bildete in diesem dynamischen System differenzierte Biofilme mit dreidimensionalen Strukturen. Vor allem in der Seitenansicht sind Mikrokolonien erkennbar, deren Entstehung sich bereits nach einer Kultivierung von 48 h abzeichnete (ohne Abb.). Dagegen bildeten die *halS*-Mutante ($\Delta halS$) und der HalS-Überproduktionsstamm (*halS*++) auch nach 72 h keine differenzierten Strukturen, die Glasoberfläche war nur schwach besiedelt und die Biofilme waren sehr dünn (Abb. 13).

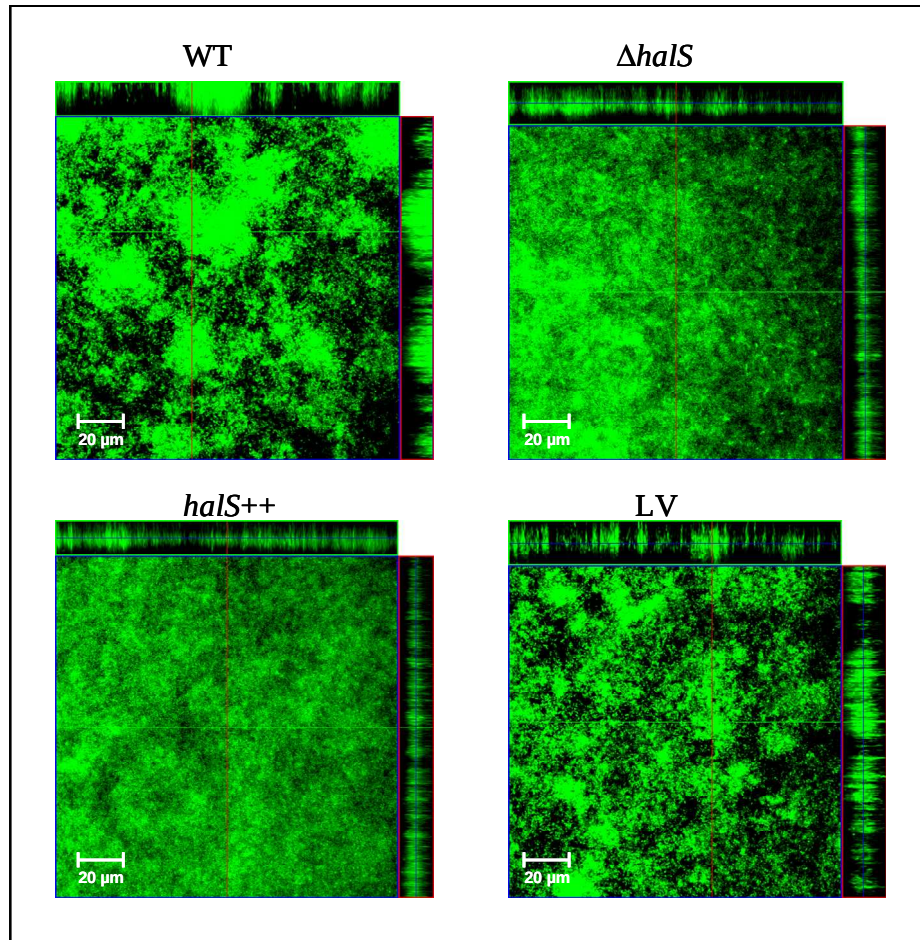


Abb. 13: CLSM-Aufnahmen von Biofilmen unter dynamischen Kulturbedingungen. Die Kultivierung der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*++) und Leervektorkontrolle (LV) erfolgte für drei Tage in Durchflusszellen bei 30°C in APM-Medium. Die Zellen wurden mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYTO 9 gefärbt und mittels CLSM visualisiert. Dargestellt sind Aufsichten und Seitenansichten von repräsentativen Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten. Größenbalken: 20 μ m.

3.7 Die extrazelluläre proteolytische Aktivität wird durch die *halS*-Überexpression herabgesetzt

Eine wichtige Protease, die von *P. aeruginosa* in das umgebende Medium sekretiert wird, ist die Elastase LasB. Anhand dieser Exoprotease wurde erstmals die Zelldichte-abhängige Genexpression bei *P. aeruginosa* beobachtet (Whooley *et al.*, 1983) und dadurch das erste QS-System in diesem Stamm identifiziert (Gambello & Iglewski, 1991). Später wurde neben dem Las-System auch das Rhl-System als Voraussetzung für die volle LasB-Aktivität entdeckt (Brint & Ohman, 1995). Als ein bedeutender Virulenzfaktor, kontrolliert von beiden QS-Systemen, sollte die LasB-Aktivität in Abhängigkeit von der *halS*-Expression untersucht werden.

Um die proteolytische Aktivität der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme miteinander zu vergleichen, wurden zunächst Skim-Milk-Indikatorplatten verwendet und mit Einzelkolonien beimpft. Bei proteolytischer Aktivität entstehen um die Bakterienkolonien klare Höfe, welche bei dem Wildtyp (WT), der *halS*-Mutante ($\Delta halS$) und der Leervektorkontrolle (LV) vergleichbare Größen aufwiesen (Abb. 14.A). Demgegenüber deutete der kleinere Hof des *HalS*-Überproduktionsstammes (*halS*⁺⁺) auf eine verringerte Proteaseaktivität hin.

Da *P. aeruginosa* verschiedene Proteasen in das umgebende Medium sekretiert, sollte überprüft werden, ob die verringerte Proteaseaktivität, die durch die *HalS*-Überproduktion hervorgerufen wird, tatsächlich durch einen Einfluss auf die QS-regulierte Elastase LasB bedingt ist. Um die verschiedenen extrazellulären proteolytischen Enzyme von *P. aeruginosa* unterscheiden zu können, wurden Kulturüberstände nach einer Kultivierung von 18 h bei 37°C in LB-Medium auf Zymogramm-Gele aufgetragen. Diese Methode erlaubt die Detektion proteolytischer Aktivität nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe. Durch die Spaltung des im Gel befindlichen Protease-Substrates Casein entstehen auf der Höhe proteolytisch aktiver Proteine weiße Banden. Auf diese Weise konnten jeweils zwei Banden im Gel detektiert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass in Zymogramm-Gelen die *P. aeruginosa* alkalische Protease bei einer Laufhöhe von ca. 56 kDa (Caballero *et al.*, 2001) und die Elastase LasB bei ca. 103 kDa bzw. 160 kDa (Caballero *et al.*, 2001; Kamath *et al.*, 1998) detektiert werden können. Daher wurde die beobachtete Bande bei ca. 56 kDa der alkalischen Protease und die Bande bei ca. 130 kDa der Elastase LasB zugeordnet. Als Kontrolle wurde zusätzlich der *lasB*-defiziente *P. aeruginosa*-Stamm PAN10 aufgetragen. In diesem Fall fehlte die weiße Bande bei 130 kDa. Die durch die alkalische Protease hervorgerufene Bande blieb sichtbar (Abb. 14.B). Dasselbe Bandenmuster ergab sich auch bei dem *HalS*-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺). Die Ergebnisse der Zymogramm-Gele unterstützen die Befunde der Skim-Milk-Indikatorplatten: während der *halS*-defiziente *P. aeruginosa*-Stamm keine signifikanten Auswirkungen auf die extrazelluläre proteolytische Aktivität zeigt, führt die Überexpression des *halS*-Gens zu einer deutlichen Abnahme der LasB-Aktivität.

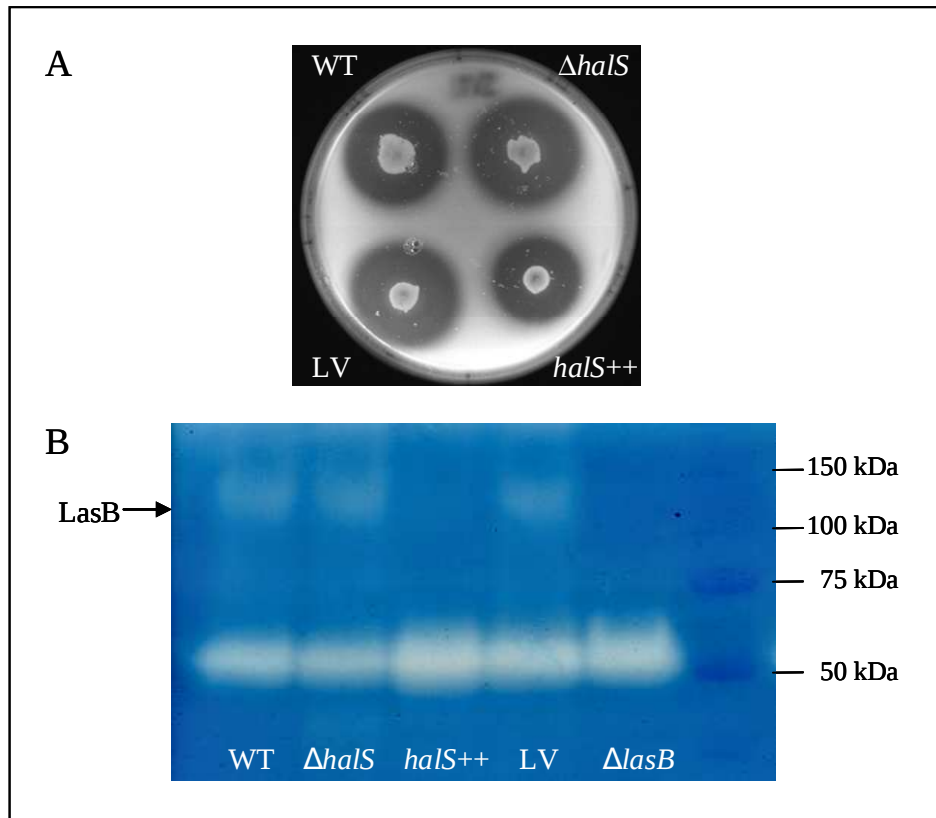


Abb. 14: Nachweis der proteolytischen Aktivität von *P. aeruginosa*. **A:** Protease-Indikatorplatten mit 3 % Skim-Milk als Substrat wurden mit Einzelkolonien beimpft, 24 h bei 37°C und 3 Tage bei RT inkubiert. **B:** Zymographischer Nachweis proteolytischer Enzyme in Kulturüberständen mittels Zymogramm-Gelen (Novex® Blue Casein). Aufgetragen wurden 12,5 µl zellfreie Kulturüberstände, die mit 12,5 µl Probenpuffer (2 ×) versetzt wurden. Als Marker wurde „Precision Plus Protein Prestained Standard All Blue“ (Bio-Rad, München) verwendet. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt. Verwendet wurden folgende *P. aeruginosa*-Stämme: Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm ($halS++$), Leervektorkontrolle (LV) und *lasB*-Mutante ($\Delta lasB$) als Negativkontrolle.

3.7.1 Die *lasB*-Expression wird durch die *halS*-Überexpression gesteigert

Mit Enzymaktivitätstests konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des *halS*-Gens die extrazelluläre Aktivität der QS-regulierten Elastase LasB herabsetzt. Nun sollte untersucht werden, ob die verringerte Elastase-Aktivität durch eine verringerte *lasB*-Expression verursacht wird. Die *lasB*-Expression wurde mit Hilfe einer translationalen Reportergenfusion ermittelt. Die Plasmid-kodierte *lasB*::*lacZ*-Fusion (pTS400) wurde dazu über Konjugation in den Wildtypstamm mit dem *halS*-Überexpressionsplasmid pBRAL ($halS++$) sowie in den Wildtypstamm mit dem entsprechenden Leervektor pBBR1MCS (LV) eingebracht. Die *lasB*-Expression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Wuchskurve durch Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt. Abbildung 15 zeigt einen deutlichen Einfluss der *halS*-Expression auf die *lasB*-Expression. Interessanterweise war die *lasB*-Expression im *halS*-

Überexpressionsstamm gegenüber dem Leervektor-tragenden Wildtypstamm zu jedem Zeitpunkt der Wuchskurve erhöht.

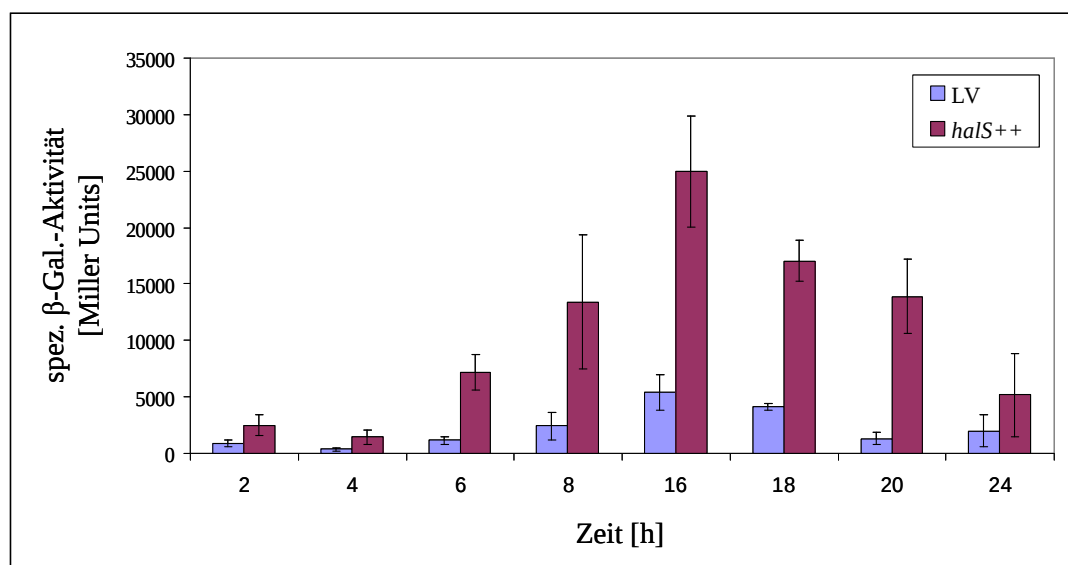


Abb. 15: Ermittlung der β -Galaktosidase-Aktivität der translationalen *lasB::lacZ*-Fusion in Abhängigkeit von der *halS*-Expression. Die *lasB*-Expression wurde mit Hilfe der episomal kodierten *lasB::lacZ*-Fusion (pTS400) ermittelt, die zusätzlich zum Leervektor (LV) bzw. dem *halS*-Überexpressionsplasmid (*halS++*) in den Wildtypstamm PAO1 eingebracht wurde. Die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität wurde bei einer Kultivierung in LB-Medium bei 37°C bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsreihen.

3.8 Einfluss von HalS auf die Pathogenität von *P. aeruginosa*

Durch die vorangegangenen Experimente konnte gezeigt werden, dass die Produktion diverser Virulenzfaktoren durch HalS beeinflusst wird. Um die Auswirkungen dieser Virulenzfaktoren als komplexes System zu untersuchen, wurde die Pathogenität in einem Pflanzenmodell überprüft. In diesem Virulenzmodell wurden Blätter von *Arabidopsis thaliana* mit Übernachtskulturen des *P. aeruginosa*-Wildtyps (WT) und der *halS*-Mutante ($\Delta halS$) infiziert, indem die Bakteriensuspensionen auf die Unterseite der Blätter aufgebracht wurden. Vier Tage nach Beimpfen der intakten Pflanzen wurden die Symptome untersucht. Dabei zeigte sich, dass die *halS*-Mutante verglichen mit dem Wildtyp ein leicht erhöhtes phytopathogenes Potential aufweist. Abbildung 16 zeigt, dass dieser Stamm stärkere Gewebsläsionen hervorruft. Außerdem blieben die Krankheitssymptome der mit dem Wildtyp infizierten Blätter auf den kleinen Bereich der beimpften Stelle beschränkt, während die mit der *halS*-Mutante infizierten Blätter größere befallene Flächen aufwiesen.

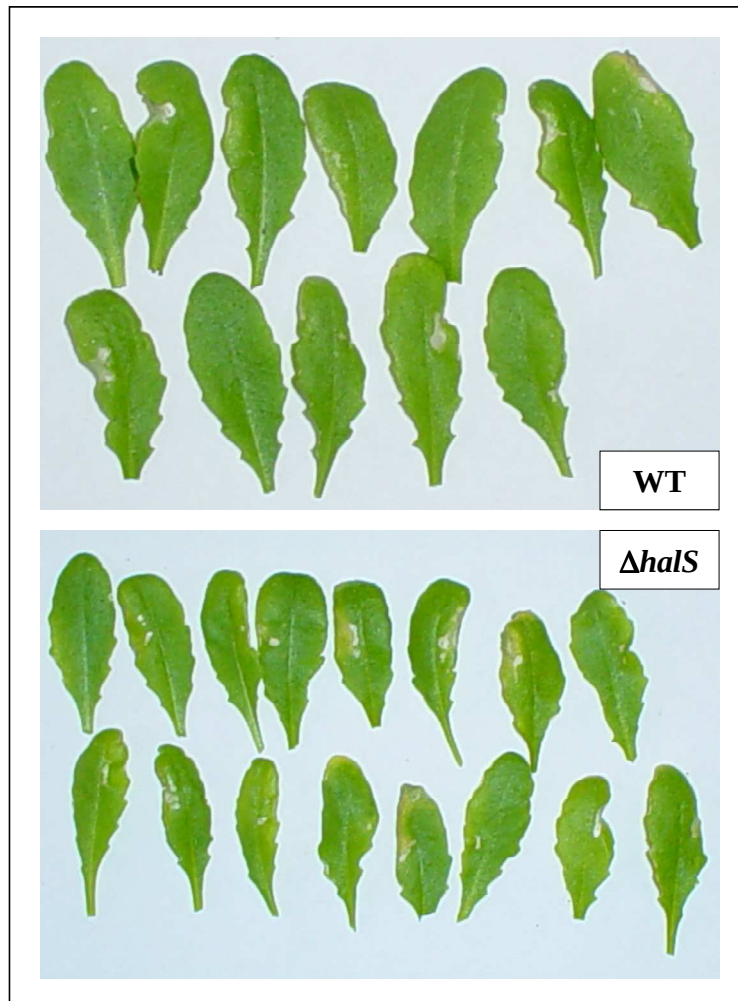


Abb. 16: Vergleich der Virulenz von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und der *halS*-Mutante ($\Delta halS$) in einem Pflanzenmodell. 5 μ l NB-Übernachtskulturen der *P. aeruginosa*-Stämme, welche Zelldichten (O.D._{580nm}) zwischen 1,1 und 1,3 erreicht hatten, wurden auf die Unterseite der Blätter von *Arabidopsis thaliana* pipettiert, ohne die Pflanzen zu beschädigen. Zur Dokumentation wurden die Blätter nach vier Tagen abgeschnitten und fotografiert. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, exemplarisch sind alle beimpften Blätter eines Versuches dargestellt.

3.9 Untersuchungen zur Wirkungsmechanismus des HalS-Proteins

Es konnte gezeigt werden, dass HalS deutliche Effekte auf QS-regulierte physiologische Prozesse bei *P. aeruginosa* auslöst. Um zu klären, ob das HalS-Protein auf indirekte Weise die interzelluläre Kommunikation beeinflusst oder ein direkter Einfluss durch Degradation der AHL-Signalmoleküle vorliegt, sollte der Wirkungsmechanismus des HalS-Proteins näher untersucht werden. Dazu wurde zunächst der Einfluss von HalS auf die Signalmolekül-Produktion bei *P. aeruginosa* untersucht. Außerdem wurden *in vitro*-Analysen zur AHL-Degradation durch HalS durchgeführt, indem das HalS-Protein sowohl in gereinigter Form als auch in Form von Gesamtzellextrakten mit verschiedenen synthetischen AHL-Signalmolekülen inkubiert und anschließend deren Aktivität analysiert wurde. Da AHL-Signalmoleküle in ba-

sischem Milieu instabil sind (Yates *et al.*, 2002), ist die Einhaltung eines neutralen pH-Wertes bei der Analyse dieser Moleküle von enormer Bedeutung. Daher wurden entsprechende Experimente in Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) durchgeführt und stets gepufferte Kulturmedien (versetzt mit 100 mM Phosphatpuffer, pH 6,5) verwendet.

3.9.1 Einfluss von HalS auf die Signalmolekül-Produktion bei *P. aeruginosa*

Die beiden QS-Systeme von *P. aeruginosa* (Las-System bzw. Rhl-System) produzieren vor allem die Signalmoleküle 3-oxo-C12-HSL bzw. C4-HSL, aber auch geringe Mengen 3-oxo-C6-HSL und C6-HSL, sowie Signalmoleküle mit acht bzw. zehn C-Atomen in der Acyl-Seitenkette.

Um einen Einfluss von HalS auf die Signalmolekül-Produktion bei *P. aeruginosa* zu untersuchen, wurden die AHL-Gehalte in den Kulturüberständen der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺) und Leervektorkontrolle (LV) miteinander verglichen. Nach einer Kultivierung für 24 h bei 30°C in NYB-Medium wurden Zelldichten (ermittelt durch die O.D._{580nm}) zwischen 3,4 und 4 erreicht. AHL-Moleküle wurden aus jeweils 200 ml Kulturüberstand extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Detektion langkettiger AHL-Moleküle (ab sechs C-Atomen in der Acyl-Seitenkette) erfolgte durch Überschichtung der DC-Platten mit dem Sensorbakterium *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4). *A. tumefaciens* reguliert die Expression des Ti-Plasmid-kodierten *tra*-Regulons Zelldichte-abhängig durch die Produktion des Signalmoleküls 3-oxo-C8-HSL. Bei dem Sensorstamm handelt es sich um eine AHL-Synthase-Mutante mit einer *traG::lacZ*-Fusion, so dass dieser Stamm auf geeignete exogene AHL-Moleküle mit der Expression der *lacZ*-kodierten β -Galaktosidase reagiert. Dadurch wird zugegebenes X-Gal gespalten und es entstehen hellblaue Spots, die die Anwesenheit entsprechender AHL-Moleküle anzeigen. Dabei zeigt der Stamm entsprechend seines eigenen QS-Systems eine höhere Sensitivität gegenüber 3-oxo-substituierten Signalmolekülen, vor allem gegenüber 3-oxo-C8-HSL.

Wie Abbildung 17 zeigt, konnten bei allen *P. aeruginosa*-Stämmen die Signalmoleküle 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL und 3-oxo-C12-HSL nachgewiesen werden. Die Identifikation der Signalmoleküle erfolgte anhand der Standardmoleküle sowie des Vergleiches mit Literaturangaben. Signifikante Unterschiede der AHL-Gehalte in den Kulturüberständen der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme wurden nicht detektiert.

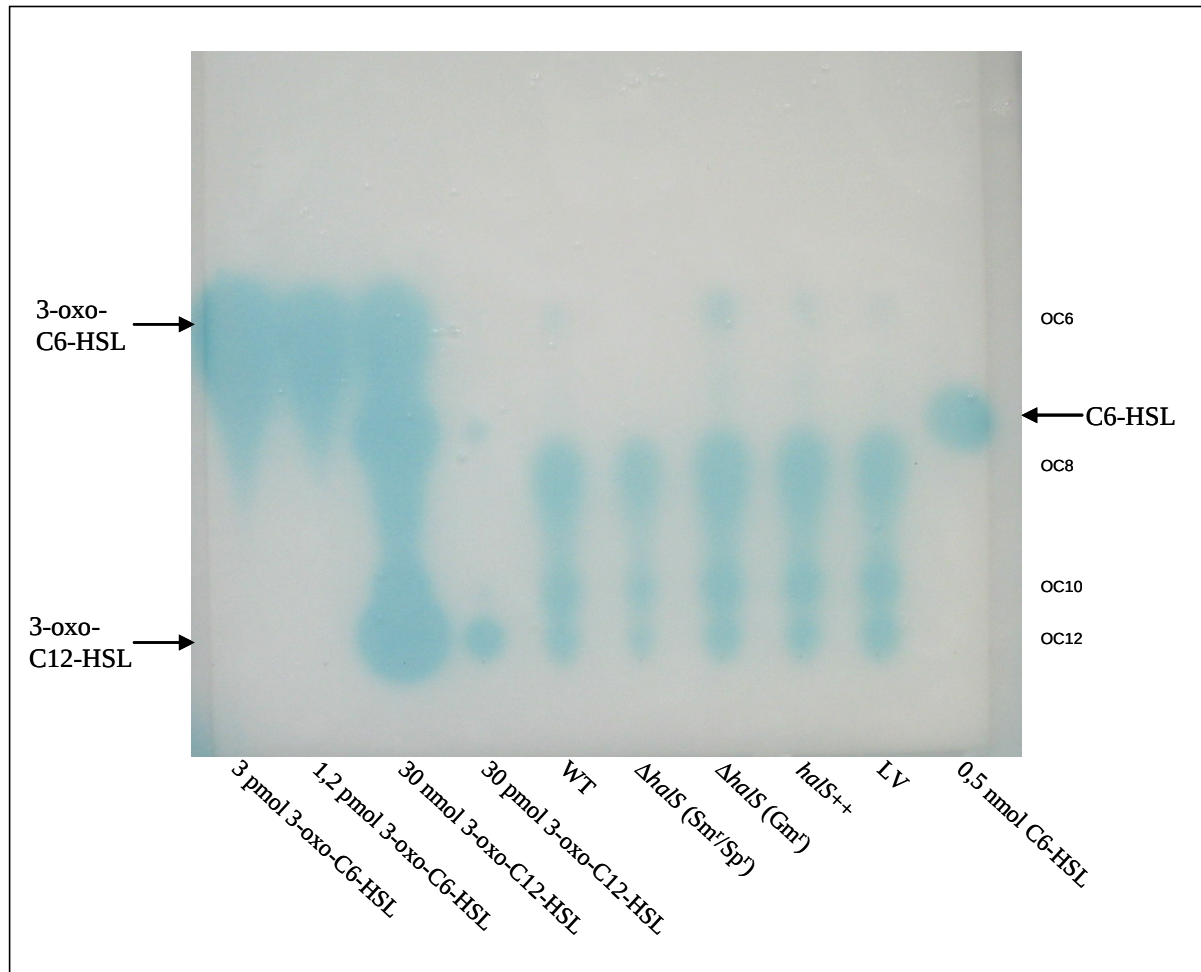


Abb. 17: Nachweis der AHL-Signalmoleküle aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen mittels *A. tumefaciens*. Es wurden 2 µl der 1:20 verdünnten AHL-Extrakte aus Kulturüberständen der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), *HalS*-Überproduktionsstamm (*halS*++) und Leervektorkontrolle (LV) dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und die DC-Platten mit dem Sensorbakterium *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) überschichtet und 24 h bei 30°C bebrütet. Als Substrat für die β -Galaktosidase wurde dem Weichagar 100 µg/ml X-Gal zugegeben. Als Referenzen wurden die synthetischen Signalmoleküle C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL und 3-oxo-C12-HSL in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Laufhöhe dieser Standardmoleküle wurde mit Pfeilen markiert. Die Kennzeichnungen OC6, OC8, OC10 und OC12 beziehen sich auf die mit Hilfe der Standards sowie Literaturangaben als 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL und 3-oxo-C12-HSL identifizierten Spots der *P. aeruginosa*-Extrakte. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus fünf unabhängigen Experimenten.

Kurzkettige AHL-Moleküle (bis zu sechs C-Atomen in der Acyl-Seitenkette) können durch Überschichtung der DC-Platten mit dem Sensorbakterium *Chromobacterium violaceum* CV026 sichtbar gemacht werden. Bei diesem Stamm handelt es sich ebenfalls um eine AHL-Synthase-Mutante, so dass die Zelldichte-abhängige Violacein-Produktion nur durch exogene AHL-Moleküle erfolgt. Entsprechend des C6-HSL-abhängigen QS-Systems von *C. violaceum* zeigt dieser Sensorstamm eine höhere Sensitivität gegenüber nicht-substituierten Signalmolekülen, vor allem gegenüber C6-HSL. Mit Hilfe dieses Systems wurden bei allen *P. aeruginosa*-Stämmen die Signalmoleküle C6-HSL und C4-HSL nachgewiesen. Ebenso wie

für die langkettigen Signalmolekülen gezeigt, wurden auch bei den kurzkettigen AHLs keine unterschiedlichen Gehalte in den Kulturüberständen detektiert (Abb. 18).

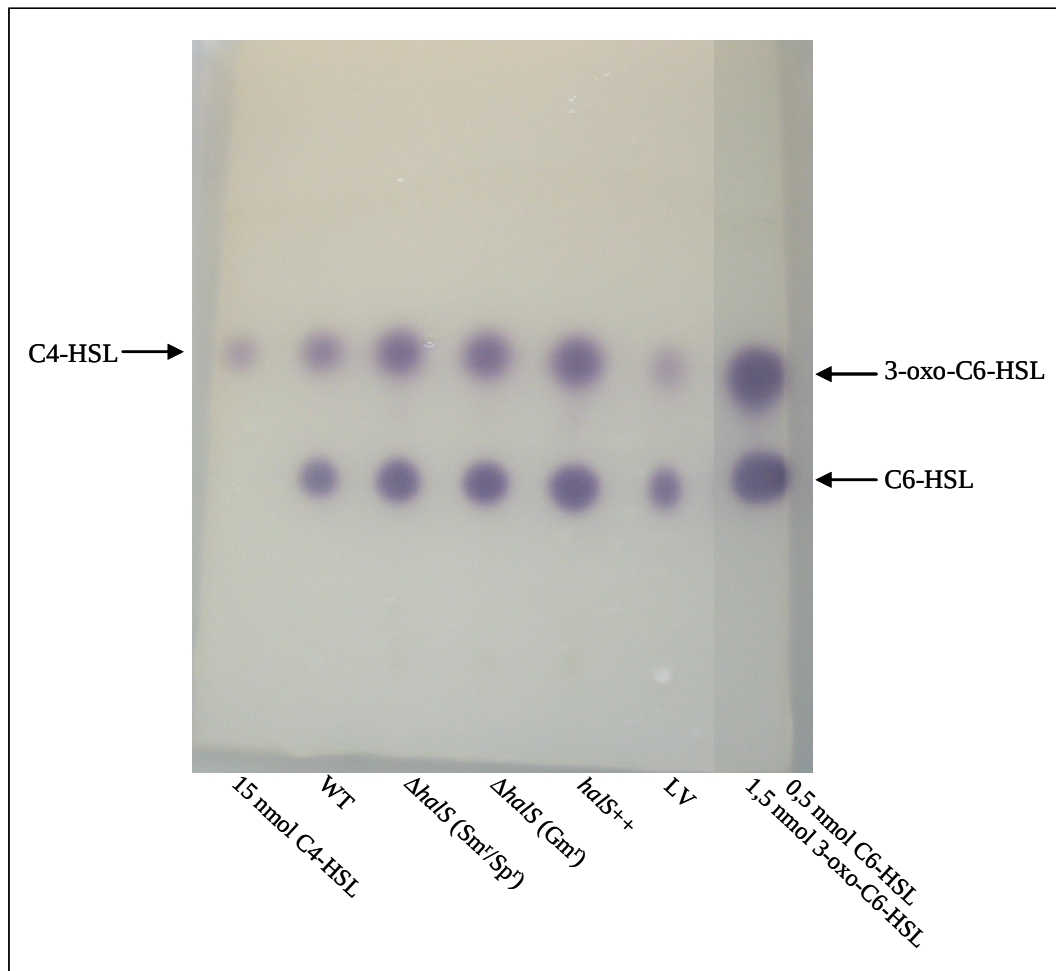


Abb. 18: Nachweis der AHL-Signalmoleküle aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen mittels *C. violaceum*. Es wurden 4 μ l der unverdünnten AHL-Extrakte aus Kulturüberständen der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*++) und Leervektorkontrolle (LV) dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und die DC-Platten mit dem Sensorbakterium *C. violaceum* CV026 überschichtet und 24 h bei 30°C bebrütet. Als Referenzen wurden die synthetischen Signalmoleküle C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL und C6-HSL in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Laufhöhe dieser Standardmoleküle wurde mit Pfeilen markiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus fünf unabhängigen Experimenten.

An der QS-Regulation ist jedoch ein weiteres, strukturell von den AHLs abweichendes, Signalmolekül beteiligt. Dieses *Pseudomonas-quinolone*-Signal (PQS) stellt eine Verbindung zwischen dem Las- und dem Rhl-System dar. Das Las-System kontrolliert die Synthese des PQS, welches maßgeblich an der Ausbildung Rhl-abhängiger Phänotypen beteiligt ist (Diggle *et al.*, 2003). Daher sollte auch der Gehalt dieses Signalmoleküls in Abhängigkeit der *halS*-Expression untersucht werden. Nach Kultivierung der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme für 24 h bei 37°C in NB-Medium erfolgte die Extraktion und die dünn-schichtchromatographische Auftrennung der Moleküle. Die Identifikation des PQS erfolgte durch ESI-MS-Ana-

lyse der in Frage kommenden Spots. In allen Stämmen konnte das PQS detektiert werden, signifikante Unterschiede im PQS-Gehalt wurden nicht nachgewiesen (Abb. 19).

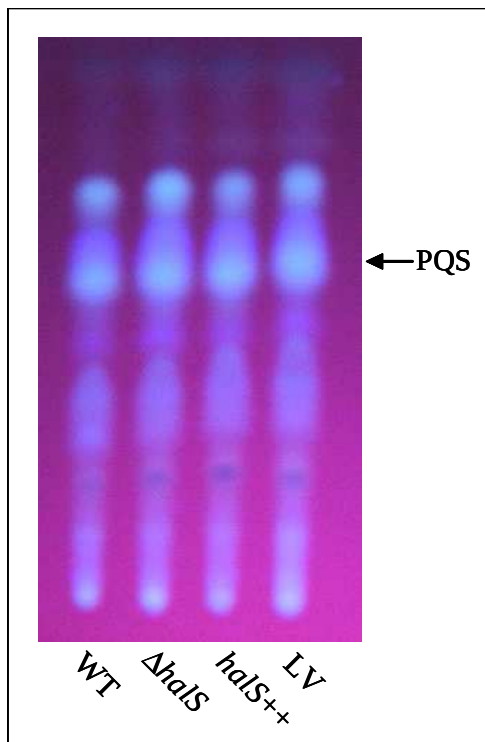


Abb. 19: Dünnschichtchromatographischer Nachweis von PQS. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der Ethylacetat-Extrakte der *P. aeruginosa*-Kulturen Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*++) und Leervektorkontrolle (LV). Nach dem Lauf wurden die DC-Platten unter UV-Licht betrachtet. Exemplarisch ist ein Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.9.2 Degradation synthetischer AHL-Signalmoleküle durch gereinigtes HalS

Die Analyse der AHL- und PQS-Gehalte in Kulturüberständen der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme ergab keine signifikanten Unterschiede bei der Signalmolekül-Produktion. Da jedoch deutliche Effekte bei QS-abhängigen Phänotypen auftraten, sollte der Einfluss des HalS-Proteins auf AHL-Signalmoleküle auch *in vitro* untersucht werden. Dazu wurde das HalS-Protein mit einem Affinitäts-tag, dem zuckerbindenden Lectin LecB aus *P. aeruginosa*, fusioniert und aufgereinigt. Das *halS*-Gen wurde im Rahmen einer Diplomarbeit in den Expressionsvektor pURE kloniert und unter der Kontrolle des T7-Promotors in dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) für 20 h bei 30°C überexprimiert (Bartels, 2004). Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall zeigten SDS-PAGE-Analysen, dass durch diese Überexpression unlösliche Proteinaggregate (*inclusion bodies*) gebildet wurden und nur sehr wenig des HalS_{LecB}-Fusionsproteins in der löslichen Fraktion vorlag (ohne Abb.). Um das Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie in größeren Mengen aufzureinigen zu können, wurde der Gesamtzellextrakt zunächst durch Zugabe von Harnstoff denaturiert und anschließend in Renaturierungspuffer aufgenommen. Unter Ausnutzung der Eigenschaft von LecB, spezifisch

an D-Mannose zu binden, wurde das HalS_{LecB}-Fusionsprotein über eine D-Mannose-Agarose-Säule gereinigt, wobei eine Ausbeute von 124 mg Fusionsprotein pro Liter Überexpressionskultur erreicht wurde (Bartels, 2004). SDS-PAGE-Analysen zeigten, dass das 365 Aminosäuren umfassende Fusionsprotein mit einem errechneten Molekulargewicht von 40 kDa bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden konnte (ohne Abb.).

Um die Aktivität des gereinigten HalS_{LecB}-Fusionsproteins zu untersuchen, wurde es mit den synthetischen AHL-Signalmolekülen C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL und 3-oxo-C12-HSL inkubiert und anschließend deren Aktivität analysiert. Dabei wurden verschiedene Inkubationszeiten (30 min, 4 h und 24 h) und Temperaturen (RT, 30°C und 37°C) gewählt. Eingesetzt wurden jeweils 400 pmol des Fusionsproteins und 40 pmol C4-HSL bzw. 10 pmol 3-oxo-C6-HSL und 3-oxo-C12-HSL. In der Kontrolle wurden die Signalmoleküle mit Phosphatpuffer statt der Proteinlösung versetzt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proteine unter Verwendung von Zentrifugationskonzentratoren (Ausschlussgröße 3 kDa) von der AHL-Lösung getrennt und Aliquots des Durchlaufs auf Indikatorplatten aufgetragen. Die Detektion des kurzkettigen Signalmoleküls erfolgte durch Auftragen von 30 µl (entsprechend der Ausgangskonzentration 12 nmol C4-HSL) auf *C. violaceum*-Indikatorplatten. Zur Detektion der langkettigen Signalmoleküle wurden jeweils 10 µl (entsprechend der Ausgangskonzentration 1 pmol 3-oxo-C6-HSL bzw. 3-oxo-C12-HSL) auf *A. tumefaciens*-Indikatorplatten aufgetragen.

Nach der Bebrütung der Indikatorplatten wurden intakte Signalmoleküle durch violette bzw. blaue Spots sichtbar. Zur Ermittlung der AHL-Degradation durch HalS wurden die Größe und die Intensität der Spots der verschiedenen Ansätze mit gereinigtem HalS-Protein mit dem jeweiligen Kontrollansatz ohne Enzymzugabe verglichen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit HalS inkubierten Ansätzen und der entsprechenden Pufferkontrolle festgestellt werden (ohne Abb.).

Zusätzlich sollte die Aktivität des HalS_{LecB}-Fusionsproteins aus der löslichen Fraktion untersucht werden. Nach der Reinigung über die D-Mannose-Agarose-Säule wurde das Fusionsprotein zunächst mittels Zentrifugationskonzentratoren auf 50 µg/ml (entsprechend 1,25 nmol/ml) einkonzentriert. Anschließend wurden 430 pmol des HalS_{LecB}-Proteins mit 25 nmol 3-oxo-C12-HSL für 16 h bei 25°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurden Verdünnungsreihen der AHL-Lösung hergestellt. Es wurden jeweils 10 µl, die entsprechend der Ausgangskonzentration 1, 10, 100 bzw. 200 pmol des AHL-Signalmoleküls enthielten, auf *A. tumefaciens*-Indikatorplatten aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20

dargestellt. Auf der linken Seite wurden jeweils die mit dem HalS_{LecB}-Fusionsprotein inkubierten Signalmoleküle, auf der rechten Seite die entsprechende Pufferkontrolle ohne Enzym aufgetragen. Diese beiden Ansätze wiesen jeweils vergleichbare Spots auf. Eine deutliche Degradation der eingesetzten AHL-Signalmoleküle durch das HalS_{LecB}-Protein wurde nicht festgestellt.

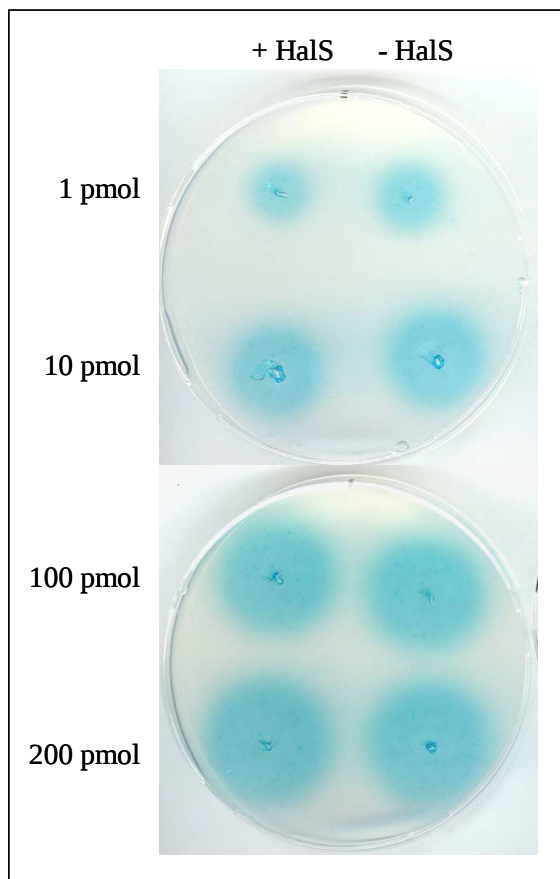


Abb. 20: Nachweis von synthetischem 3-oxo-C12-HSL nach Inkubation mit gereinigtem HalS_{LecB}. 25 nmol 3-oxo-C12-HSL wurden mit bzw. ohne HalS_{LecB}-Protein aus der löslichen Fraktion (430 pmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) für 16 h bei 25°C inkubiert. Durch Verwendung von Zentrifugationskonzentratoren wurden die Proteine aus der AHL-Lösung entfernt. Je 10 µl des Durchlaufs wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Indikatorplatten aufgetragen, welche mit *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) überschichtet waren. Diese Sensorbakterien reagieren auf intakte Signalmoleküle mit der Produktion der β -Galaktosidase. Als Substrat wurde dem Weichagar 100 µg/ml X-Gal zugegeben. Nach einer Bebrütung der Indikatorplatten für 24 h bei 30°C wurden intakte Signalmoleküle als blaue Spots sichtbar. Die angegebenen Konzentrationen wurden auf die Ausgangskonzentration von 3-oxo-C12-HSL bezogen.

3.9.3 Degradation synthetischer AHL-Signalmoleküle durch Gesamtzellextrakte

Durch Inkubation des aufgereinigten HalS_{LecB}-Fusionsproteins mit synthetischen AHL-Signalmolekülen konnte keine Degradation der Signalmoleküle nachgewiesen werden. Das Fusionsprotein wurde in einem T7-Expressionssystem im heterologen Wirt *E. coli* überexprimiert. Möglicherweise fehlen hier akzessorische Faktoren, die für die Aktivität von HalS notwendig sind. Daher wurden die AHL-Degradationstests auch im homologen Wirt *P. aeruginosa* durchgeführt, wobei die Überexpression des *halS*-Gens unter der Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors stattfand. Verglichen wurde die Fähigkeit zur AHL-Degradation der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺) und Leervektorkontrolle (LV).

Da die Sequenz des HalS-Proteins keine typischen Signalsequenzen für den Export aufweist und von anderen AHL-Lactonasen bekannt ist, dass sie im Cytoplasma lokalisiert sind (Dong *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003), wurden Gesamtzellextrakte (GZE) verwendet. Dazu wurden die Bakterien 16 h bis 24 h bei 30°C in NB-Medium kultiviert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall nach Einstellen der Zelldichte auf eine $O.D._{580nm} = 10$. Jeweils 100 μ l der GZE wurden mit demselben Volumen einer AHL-Lösung vermischt und 4 h bis 24 h bei 30°C inkubiert. Zur Detektion der verbliebenen intakten AHL-Signalmoleküle wurden die Gemische auf Indikatorplatten aufgetragen, die mit Sensorbakterien überschichtet waren. Langkettige Signalmoleküle wurden durch Auftragen von 10 μ l des Gemisches (entsprechend 1 pmol des eingesetzten 3-oxo-C6-HSL bzw. 3-oxo-C12-HSL) auf *A. tumefaciens*-Platten nachgewiesen. Für den Nachweis von C4-HSL bzw. 3-oxo-C6-HSL mittels *C. violaceum* wurden jeweils 30 μ l (entsprechend 20 nmol bzw. 4 nmol) aufgebracht. Nach der Bebrütung für 24 h bei 30°C gaben die Größe und die Intensität der entstandenen blauen bzw. violetten Spots Auskunft darüber, wie viele intakte Signalmoleküle sich in dem aufgetragenen Gemisch befanden.

Mit Hilfe der *C. violaceum*-Indikatorplatten konnten keine Unterschiede detektiert werden. Die Inkubation der synthetischen Signalmoleküle C4-HSL bzw. 3-oxo-C6-HSL mit GZE der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺) und Leervektorkontrolle (LV) resultierte stets in nicht unterscheidbaren Spots, eine Degradation dieser Signalmoleküle konnte nicht nachgewiesen werden (ohne Abb.).

Demgegenüber wurde unter Verwendung der sensitiveren *A. tumefaciens*-Platten eine unterschiedlich starke Beeinflussung der Signalmoleküle durch HalS beobachtet. Zum Teil wurden bei Verwendung des 3-oxo-C12-HSL bzw. 3-oxo-C6-HSL kaum Unterschiede in der Größe und Intensität der blauen Spots beobachtet. Jedoch wurde in einigen Experimenten unter den gleichen Versuchsbedingungen eine drastische Verminderung der AHL-Aktivität im Falle des HalS-Überproduktionsstammes detektiert. Das deutlichste Versuchsergebnis ist in Abbildung 21.A dargestellt. Hier war nach der Inkubation des 3-oxo-C12-HSL mit dem GZE des HalS-Überproduktionsstammes kaum eine Blaufärbung sichtbar. Die Menge intakter Signalmoleküle war demzufolge stark reduziert, so dass die AHL-abhängige β -Galaktosidase-Produktion des Sensorbakteriums deutlich vermindert war. Abbildung 21.B zeigt Ergebnisse zur Degradation des 3-oxo-C6-HSL. Hier deutet der kleinere Spot beim HalS-Überproduktionsstamm auf eine geringfügige Abnahme der AHL-Aktivität hin.

Zwischen Wildtyp, *halS*-Mutante, Leervektorkontrolle und Pufferkontrolle ohne Zugabe von Bakterien wurden in keinem Experiment signifikante Unterschiede beobachtet. Die Inaktivie-

rung des *halS*-Gens resultierte demnach nicht in einer deutlich verminderten AHL-Degradation. Auch verglichen mit der Pufferkontrolle fand keine Abnahme der AHL-Aktivität durch Inkubation mit dem Wildtyp bzw. der Leervektorkontrolle statt. Eine physiologische Degradation der AHLs durch Wildtyp bzw. Leervektorkontrolle wurde unter den gegebenen Bedingungen also nicht festgestellt.

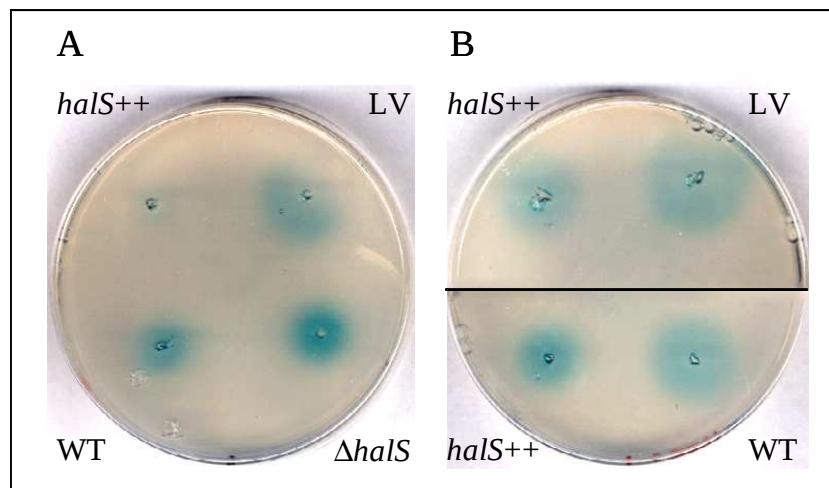


Abb. 21: Nachweis von synthetischem 3-oxo-C12-HSL (A) und 3-oxo-C6-HSL (B) nach Inkubation mit Gesamtzellextrakten von *P. aeruginosa*. Die GZE der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$), HalS-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺) und Leervektorkontrolle (LV) wurden nach einer Kultivierung für 17 h bei 30°C in NB-Medium hergestellt. Die Inkubation mit 20 pmol 3-oxo-C12-HSL bzw. 3-oxo-C6-HSL erfolgte für 4 h bei 30°C in Phosphatpuffer (100 mM, pH 6,8). Durch Verwendung von Zentrifugationskonzentratoren wurden die Proteine aus der AHL-Lösung entfernt. 10 μ l des Durchlaufs (entsprechend 1 pmol der AHL-Ausgangskonzentration) wurden auf Indikatorplatten aufgetragen, die mit *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) überschichtet waren. Diese Sensorbakterien reagieren auf intakte Signalmoleküle mit der Produktion der β -Galaktosidase. Als Substrat wurde dem Weichagar 100 μ g/ml X-Gal zugegeben. Nach einer Bebrütung der Indikatorplatten für 24 h bei 30°C wurden intakte Signalmoleküle als blaue Spots sichtbar.

Entsprechende AHL-Degradationsversuche wurden auch im heterologen Wirt *E. coli* durchgeführt. Dazu wurden das *halS*-Überexpressionsplasmid pBRAL sowie der entsprechende Leervektor pBBR1MCS in *E. coli* JM101-Zellen eingebracht, die *halS*-Expression mit 0,5 mM IPTG induziert und die Zellen nach 2,5 h geerntet. Nach Inkubation mit den Signalmolekülen C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL und 3-oxo-C12-HSL wurden die Gemische auf Indikatorplatten mit *C. violaceum* bzw. *A. tumefaciens* aufgebracht. Eine Degradation der Signalmoleküle durch das heterolog überexprimierte HalS-Protein im Vergleich zur Leervektorkontrolle konnte in keinem Fall beobachtet werden (ohne Abb.).

3.9.4 Nachweis der AHL-Signalmoleküle mittels LC-MS/MS

Durch die Verwendung von AHL-Sensorbakterien konnte eine Abnahme der 3-oxo-C12-HSL-Aktivität nach Inkubation mit dem Gesamtzellextrakt des HalS-Überproduktionsstammes beobachtet werden. Eine genauere Analyse sollte mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) erfolgen, die zusätzlich eine Detektion der inaktiven AHL-Degradationsprodukte erlaubt. Bei der Ringöffnung von AHLs (Acyl-Homoserinlactonen) durch AHL-Lactonasen entstehen die entsprechenden Acyl-Homoserine. Zur Vereinfachung werden diese Moleküle im Folgenden als intakte bzw. geöffnete AHLs bezeichnet. Untersucht wurde der intrazelluläre Gehalt von intaktem und geöffnetem 3-oxo-C12-HSL in den *P. aeruginosa*-Stämmen Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$) und HalS-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺).

Nach einer Kultivierung für 22 h bei 37°C in NB-Medium wurden die Signalmoleküle aus den Zellsedimenten extrahiert und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Oldiges (IBT-2, FZ-Jülich) mittels LC-MS/MS analysiert. Bei der verwendeten LC-MS-Kopplung werden die Moleküle zunächst chromatographisch aufgetrennt, und anschließend erfolgt die Trennung nach dem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z). Nach der Elektrosprayionisation (ESI) werden die Ionen im Triple Quadrupol-Massenspektrometer fragmentiert. Da die Massenselektion sowohl vor als auch nach der Fragmentierung erfolgt, kann ein bestimmtes MS/MS-Fragmentierungsmuster selektiert werden.

Als Standard-Molekül wurde synthetisches 3-oxo-C12-HSL analysiert. Es wurde eine Retentionszeit von 14,32 min und ein m/z -Verhältnis von 298,1 ermittelt. Bei energetischer Anregung zerfällt das Ion in zwei Fragmente, so dass Fragment-Ionen mit $m/z = 102$ sowie $m/z = 197$ detektiert werden. Um auch das geöffnete Molekül als Standard zu analysieren, wurde synthetisches 3-oxo-C12-HSL in Ammoniumcarbonat (pH 9) inkubiert, da von Yates *et al.* (2002) beschrieben wurde, dass unter basischen Bedingungen eine Ringöffnung bei AHLs erfolgt. In diesem Ansatz wurde ein Molekül mit dem erwarteten m/z -Verhältnis von 316,1 identifiziert, welches ein Fragment-Ion mit $m/z = 120$ bildet. Die Retentionszeit des geöffneten 3-oxo-C12-HSL auf der Chromatographie-Säule betrug 12,6 min. Die Strukturen der entsprechenden Moleküle sowie die ermittelten Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster sind in Tabelle 9 dargestellt.

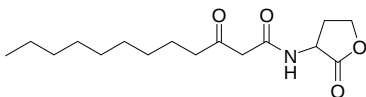
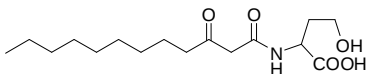
Bei der Analyse des geöffneten 3-oxo-C12-HSL wurde festgestellt, dass es bei der Hälfte der Moleküle durch die Ionisierung zu einer H₂O-Abspaltung und somit zu einer Schließung des Lactonrings kam (Oldiges, persönliche Mitteilung). Dadurch haben beide Moleküle nach der Ionisierung im Massenspektrometer die gleiche Masse, durch das unterschiedliche Verhalten der Moleküle in der vorher stattfindenden Chromatographie lassen sich das intakte und das

geöffnete AHL jedoch über die unterschiedlichen Retentionszeiten identifizieren. Somit können beide Moleküle bei Selektion des Fragmentierungsmusters $m/z = 298/197$ identifiziert werden und für jede Probe das Verhältnis des geöffneten zum intakten 3-oxo-C12-HSL bestimmt werden.

In allen untersuchten Stämmen wurden sowohl intakte als auch geöffnete AHLs identifiziert. Durch Selektion des Fragmentierungsmusters des geöffneten 3-oxo-C12-HSL ($m/z = 316/120$) konnten keine genauen Angaben zum unterschiedlichen Gehalt des geöffneten Moleküls in den verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen gemacht werden, da mit der verwendeten Methode eine absolute Quantifizierung nicht möglich ist.

Aus Abbildung 22 kann jedoch für jeden Stamm das Verhältnis des geöffneten zum intakten 3-oxo-C12-HSL ermittelt werden, welches in Tabelle 10 angegeben ist. Das Massenchromatogramm des Wildtyps (WT) zeigt, dass mit einem Verhältnis von 0,86 etwas weniger geöffnetes als intaktes 3-oxo-C12-HSL vorlag. Im Zellsediment der *halS*-Mutante war der Anteil der geöffneten Moleküle signifikant verringert, das Verhältnis zu den intakten Molekülen betrug 0,47. Demgegenüber wurde beim HalS-Überproduktionsstamm (*halS*⁺⁺) mit 1,14 ein umgekehrtes Verhältnis ermittelt, hier überwogen die geöffneten Signalmoleküle.

Tab. 9: Darstellung der Strukturen, HPLC-Retentionszeiten und MS/MS-Fragmentierungsmuster von 3-oxo-C12-HSL und dessen Degradationsprodukt („geöffnetes 3-oxo-C12-HSL“).

	Intakt	Geöffnet
3-oxo-C12-HSL		
Retentionszeit [min]	14,32	12,61
Fragmentierungsmuster [m/z]	298/197	316/120 298/197*
		* nach H ₂ O-Abspaltung bei Ionisierung

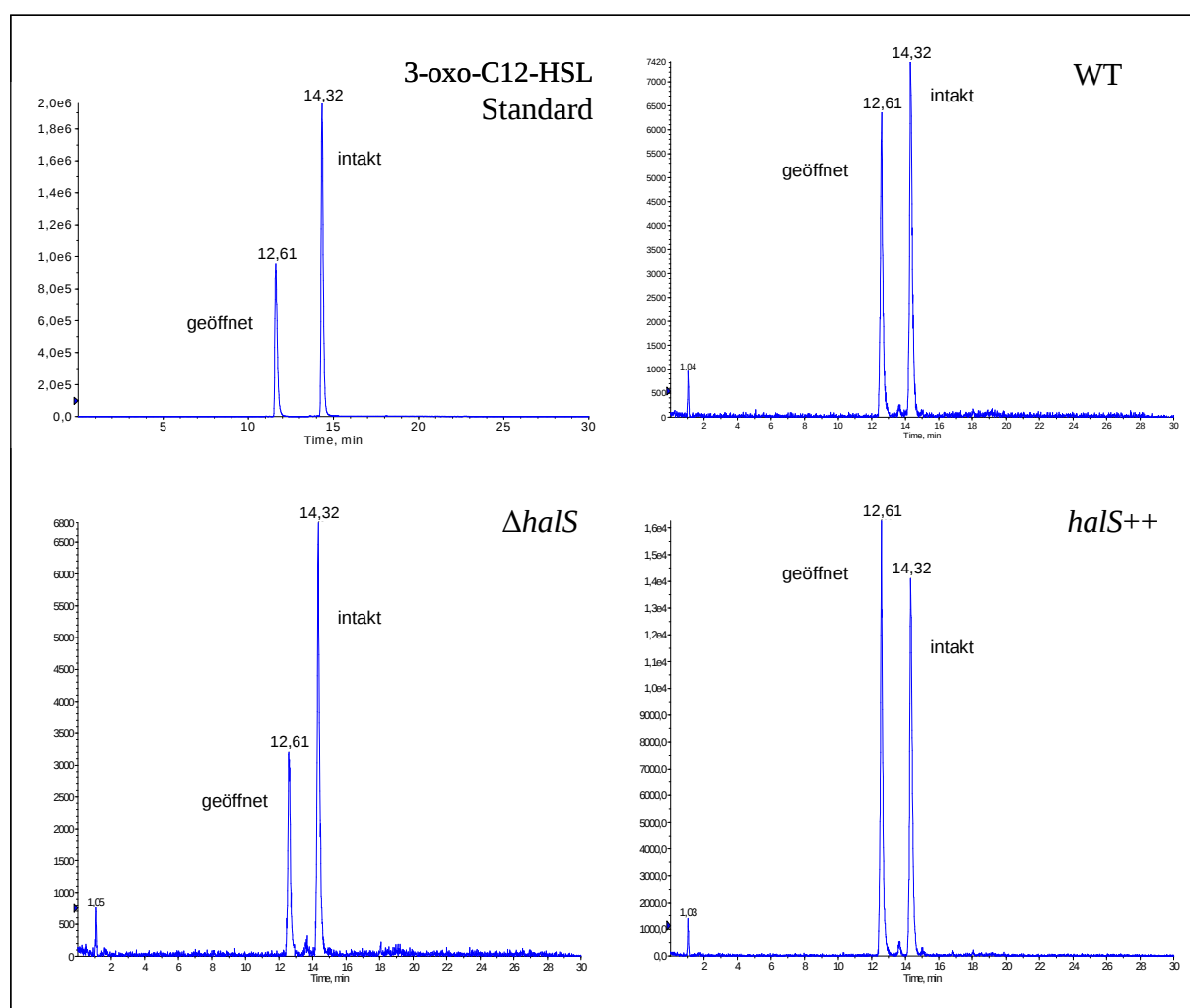


Abb. 22: LC-MS/MS-Nachweis von 3-oxo-C12-HSL und dessen Degradationsprodukt. AHL-Signalmoleküle wurden aus Zellsedimenten der *P. aeruginosa*-Stämme Wildtyp (WT), *halS*-Mutante ($\Delta halS$) und HalS-Überproduktionsstamm (*halS++*) extrahiert und einer LC-MS/MS-Analyse unterzogen. Als Standard-Molekül wurde synthetisches 3-oxo-C12-HSL verwendet, welches zuvor 24 h bei pH 9 inkubiert wurde. Dadurch erfolgt, ebenso wie durch die Aktivität von AHL-Lactonasen, eine Öffnung des Lactonrings (s. Text). Die Retentionszeiten und MS/MS-Fragmentierungsmuster des intakten und des geöffneten 3-oxo-C12-HSL sind in Tabelle 9 angegeben. Dargestellt ist die Selektion des Fragmentierungsmusters $m/z = 298/120$, welches sowohl eine Identifizierung des intakten als auch des geöffneten Moleküls erlaubt.

Tab. 10: Verhältnis des geöffneten zum intakten 3-oxo-C12-HSL in Zellsedimenten von *P. aeruginosa*. Berechnet wurde dieses Verhältnis anhand der Ergebnisse der LC-MS/MS-Analysen (vgl. Abb. 22).

	3-oxo-C12-HSL geöffnet/intakt
WT	0,856
$\Delta halS$	0,471
<i>halS</i> ++	1,143

3.9.5 Einfluss von HalS auf artfremde Signalmoleküle

Die natürliche Funktion AHL-degradierender Enzyme ist bislang nicht eindeutig geklärt. Vorstellbar ist unter anderem ein „Quorum-sensing-Signal-turnover-System“, also die Degradation der eigenen Signalmoleküle, um den QS-aktivierten Modus zu verlassen.

Kompetitive Vorteile ergeben sich aber auch durch die Störung der QS-Systeme anderer, konkurrierender Bakterienspezies. Häufig werden durch QS Prozesse reguliert, die andere Bakterien in derselben ökologischen Nische schädigen, wie z. B. die QS-regulierte Antibiotikaproduktion bei *Erwinia carotovora* (Bainton *et al.*, 1992). Durch Degradation der artfremden Signalmoleküle könnten solche schädigenden Prozesse gehemmt werden, und möglicherweise ist dies die physiologische Funktion AHL-degradierender Enzyme. Daher sollte untersucht werden, ob das HalS-Protein artfremde AHL-Signalmoleküle spalten kann und möglicherweise eine höhere Spezifität gegenüber diesen aufweist. Als Beispiel diene das QS-System von *E. carotovora*. Dieses phytopathogene Bakterium reguliert die Produktion von Virulenzfaktoren über das ExpR/I-Quorum-sensing-System (Pirhonen *et al.*, 1993). Die Synthese des Signalmoleküls 3-oxo-C6-HSL führt zur Produktion und Sekretion der Exoenzyme Pectinase, Cellulase und Protease, so dass pflanzliche Zellwände angegriffen werden und Fäulnisprozesse einsetzen (Pirhonen *et al.*, 1993). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus spec.* das AHL-Signalmolekül von *E. carotovora* degradiert und die Virulenz dieses Stammes gegen verschiedene Pflanzen deutlich herabsetzt (Dong *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2001).

Um zu untersuchen, ob das HalS-Protein ebenfalls in der Lage ist, das AHL-Signalmolekül von *E. carotovora* zu degradieren und somit die Virulenz dieses Bakteriums abzuschwächen, wurden *P. aeruginosa*-Kulturen sowie Gesamtzellextrakte mit *E. carotovora*-Kulturen vermischt und auf Kartoffelscheiben aufgetragen. *E. carotovora*-Kulturen wurden dazu bei einer $O.D._{580nm} = 1$ geerntet und auf eine $O.D._{580nm} = 0,05$ verdünnt. *P. aeruginosa*-Übernachtskulturen wurden auf eine $O.D._{580nm} = 5$ eingestellt und unbehandelt sowie als GZE (mittels Ultra-

schall aufgeschlossen) verwendet. Gleiche Volumina dieser Bakteriensuspensionen wurden miteinander vermischt und 20 µl auf Kartoffelscheiben aufgetragen, die 16 h bei 30°C bebrütet wurden. Als Kontrollen wurden jeweils 20 µl der einzelnen Bakterienkulturen aufgetragen. Die Positivkontrolle (*E. carotovora*) verursachte deutliche Fäulnis (Abb. 23.A), *P. aeruginosa*-Kulturen bewirkten keine Zersetzung des Pflanzenmaterials (ohne Abb.).

Das Ausmaß der Fäulnissymptome variierte bei den verschiedenen Experimenten und zum Teil konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen detektiert werden. Auffällig war dennoch die häufig auftretende abgeschwächte Fäulnis bei Verwendung der *halS*-überexprimierenden Stämme. Der Einsatz des *halS*-Überexpressionsplasmids pBRAL sowohl im Wildtyp PAO1 (*halS*++) als auch in der *halS*-Mutante ($\Delta halS$ pBRAL) resultierte mehrfach in einer deutlichen Reduktion der Fäulnissymptome verglichen mit dem jeweiligen Ausgangsstamm oder der Leervektorkontrolle. Der unterschiedlich starke Einfluss der *halS*-Expression auf die Pathogenität von *E. carotovora* wird auch in Abbildung 23 verdeutlicht. Abbildung 23.A zeigt ein Experiment, bei dem die *halS*-Überexpression in der *halS*-Mutante die Fäulnisentwicklung vollständig inhibierte, während die Mischung der *E. carotovora*-Kultur mit dem GZE der *halS*-Mutante ähnliche Zerfallserscheinungen hervorrief wie *E. carotovora* allein. Demgegenüber sind in Abbildung 23.B auch bei der Überexpression des *halS*-Gens (sowohl im Wildtyp als auch in der *halS*-Mutante) faule Stellen sichtbar, aber verglichen mit der Leervektorkontrolle bzw. dem Ausgangsstamm deutlich abgeschwächt.

Die deutlichsten Fäulnisprozesse wurden bei Verwendung der GZE erzielt. Möglicherweise inhibieren vitale *P. aeruginosa*-Zellen *E. carotovora* und schwächen die Virulenz ab. Diese Vermutung wurde durch Experimente mit Mischkulturen bestätigt. Wurden *E. carotovora* und *P. aeruginosa* gemeinsam kultiviert und als Mischkultur auf Kartoffelscheiben aufgetragen, so traten keine Fäulnisprozesse auf (ohne Abb.).

Untersuchungen zum Einfluss des HalS-Proteins auf die Pathogenität von *E. carotovora* wurden zusätzlich in *E. coli* durchgeführt. Dazu wurden das *halS*-Überexpressionsplasmid pBRAL sowie der entsprechende Leervektor pBBR1MCS in *E. coli* JM101-Zellen eingebracht, die *halS*-Expression mit 0,5 mM IPTG induziert und die Zellen nach 3 h geerntet. Die Versuche wurden analog zu denen mit *P. aeruginosa* durchgeführt, es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem heterolog überexprimierten HalS-Protein und der Leervektorkontrolle beobachtet werden (ohne Abb.).

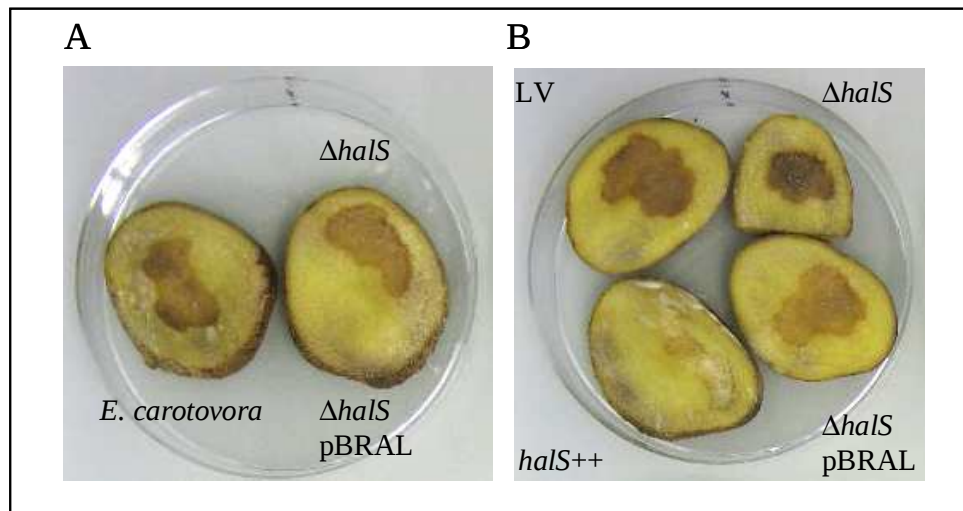


Abb. 23: Abschwächung der Pathogenität von *Erwinia carotovora* gegenüber Kartoffeln durch *HalS*. Gleiche Volumina einer *E. carotovora*-Kultur ($O.D._{580nm} = 0,05$) und GZE von *P. aeruginosa* ($O.D._{580nm} = 5$) wurden vermischt und 20 μ l des Gemisches ohne Inkubation (A) bzw. nach 2 h Inkubation bei 37°C (B) auf Kartoffelscheiben aufgetragen und 16 h bei 30°C bebrütet. Als Positivkontrolle wurden 20 μ l der *E. carotovora*-Kultur aufgetragen. Verwendet wurden folgende *P. aeruginosa*-Stämme: *halS*-Mutante ($\Delta halS$), *HalS*-Überproduktionsstamm (*halS*++; pBRAL in PAO1), Leervektorkontrolle (LV: pBBR1MCS in PAO1) und *halS*-Mutante mit *halS*-Überexpressionsplasmid ($\Delta halS$ pBRAL).

3.10 Untersuchungen zur transkriptionalen Regulation des *halS*-Gens

Um Hinweise darauf zu bekommen, unter welchen Bedingungen und zu welchen Zeitpunkten der Wuchskurve das *halS*-Gen exprimiert wird, wurden transkriptionale Reportergenfusionen konstruiert und Expressionsstudien durchgeführt. Für die episomale Reportergenfusion wurde ein 422 bp großes DNA-Fragment stromaufwärts des *halS*-Gens (-420 bis +1 relativ zum Translationsstartpunkt) ausgewählt, welches den putativen *halS*-Promotorbereich enthalten sollte. Nach Insertion in den Vektor pTZ110, welcher das promotorlose *lacZ*-Gen trägt, wurde die Reportergenfusion in den Wildtypstamm PAO1 eingebracht. Um Hintergrundaktivitäten des *lacZ*-tragenden Vektors pTZ110 zu berücksichtigen, wurde dieser Leervektor ebenfalls in den *P. aeruginosa*-Wildtyp eingebracht. Als Maß für die *halS*-Promotoraktivität wurde die intrazelluläre β -Galaktosidase-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wuchskurve bestimmt. Maximale β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden nach 14 h bis 18 h gemessen. Dabei lagen die berechneten Mittelwerte mit 800 Miller Units deutlich über der Hintergrundaktivität des Leervektors (Abb. 24). Somit wurde nachgewiesen, dass in dem für die Transkriptionsfusion ausgewählten DNA-Bereich ein Transkriptionsstart des *halS*-Gens liegt. Die stärkste von diesem Promotor ausgehende Transkription ist in der stationären Phase zu beobachten.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Transkription des *halS*-Gens möglicherweise selbst QS-abhängig ist. Die transkriptionale *halS::lacZ*-Fusion wurde daher zusätzlich in die QS-Mutante $\Delta lasI/rhlI$ (ΔI) eingebracht. In diesem *P. aeruginosa*-Stamm werden keine AHL-Signalmoleküle produziert, so dass hier die *halS*-Expression ohne den Einfluss der beiden QS-Systeme untersucht wird. Wie die Abbildung 24 zeigt, ist die Transkriptionsrate von *halS*, ermittelt durch die β -Galaktosidase-Aktivität, in dieser QS-Mutante vergleichbar mit der des Wildtyps. Hier wurden maximale β -Galaktosidase-Aktivitäten nach 14 h bis 24 h, also in der stationären Wachstumsphase, gemessen. Da das Ausschalten beider QS-Systeme keinen signifikanten Einfluss auf die *halS*-Promotoraktivität hat, wird davon ausgegangen, dass die *halS*-Expression selbst nicht QS-abhängig ist.

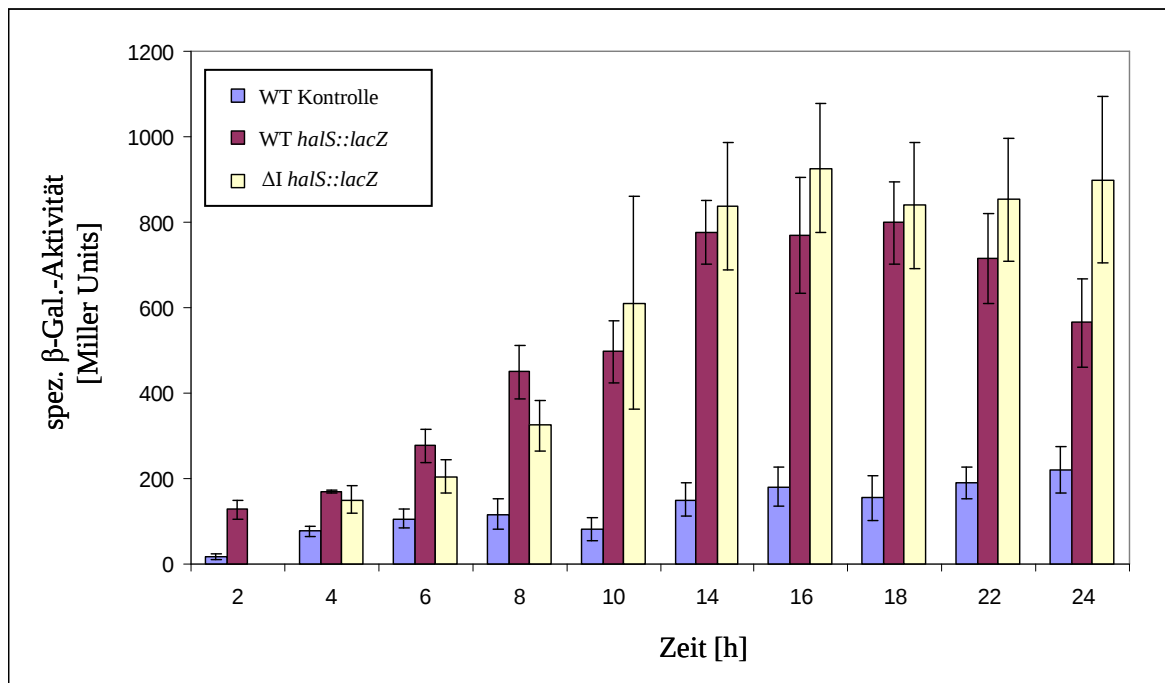


Abb. 24: Ermittlung der *halS*-Promotoraktivität in *P. aeruginosa* PAO1 und der QS-Mutante $\Delta lasI/rhlI$. Die episomal kodierte transkriptionale *halS::lacZ*-Fusion pTZAL wurde in den Wildtypstamm PAO1 (WT *halS::lacZ*) und die QS-defiziente Mutante $\Delta lasI/rhlI$ (ΔI *halS::lacZ*) eingebracht und die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität bei einer Kultivierung in NB-Medium bei 37°C bestimmt. Die Hintergrundaktivität des Leervektors pTZ110 wurde im Wildtyp (WT Kontrolle) ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsreihen.

3.11 Das *halS*-Gen ist in einem Operon organisiert

Untersuchungen zur transkriptionalen Regulation des *halS*-Gens in *P. aeruginosa* mittels einer episomalen *halS::lacZ*-Fusion zeigten die Existenz eines Promotors innerhalb eines 420 bp großen DNA-Abschnitts stromaufwärts des *halS*-Gens.

Im Genom von *P. aeruginosa* befindet sich das *halS*-Gen (ORF PA1415) direkt neben den beiden offenen Leserahmen PA1416 und PA1417 (Abb. 25), deren Funktion bisher unbekannt ist. ORF PA1417 ist in der *Pseudomonas*-Datenbank als putative Decarboxylase annotiert und weist Homologien zur Acetolactat-Synthase aus *E. coli* auf. ORF PA1416 ist, ebenso wie PA1415, als hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion annotiert. Homologievergleiche zeigten Ähnlichkeiten zu Oxidoreduktasen und FAD/FMN-abhängigen Dehydrogenasen. PA1417, PA1416 und PA1415 weisen dieselbe Transkriptionsrichtung auf und sind nur durch kurze intergenische Regionen von 45 bp bzw. 14 bp getrennt. Dies ließ vermuten, dass diese drei ORF von einem gemeinsamen Promotor kontrolliert werden. Dabei wäre das *halS*-Gen das letzte Gen in dem möglicherweise tricistronischen Operon, der darauf folgende ORF PA1414 wird in entgegengesetzter Richtung transkribiert. Es sollte überprüft werden, ob die *halS*-Expression von einem zweiten Promotor, stromaufwärts des ORF PA1417, reguliert wird. In diesem Fall würde ein Transkript von 3,7 kb entstehen, welches die drei ORF PA1417, PA1416 und PA1415 umfasst. Um die Vermutung der Organisation in einem Operon zu überprüfen, sollte mRNA isoliert und ein entsprechendes Transkript nachgewiesen werden.

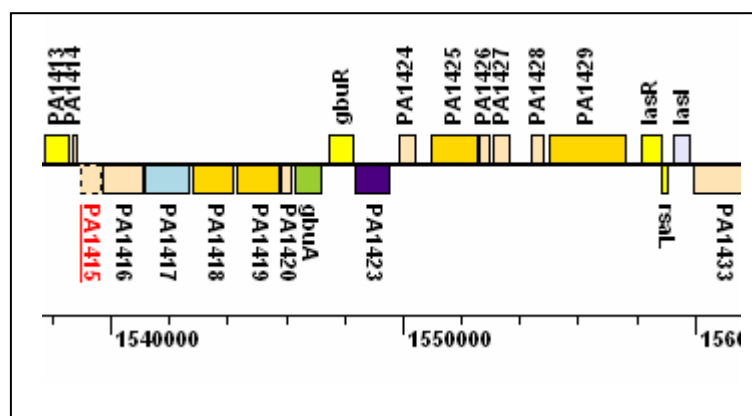


Abb. 25: Lokalisation des *halS*-Gens (ORF PA1415) im Genom von *P. aeruginosa*. Die offenen Leserahmen PA1417 und PA1416 liegen direkt stromaufwärts von PA1415, werden in dieselbe Richtung transkribiert und sind nur durch kurze intergenische Regionen getrennt (<http://www.pseudomonas.com>).

Zur reversen Transkription der mRNA wurde ein Oligonukleotid (*halSdwn1*) verwendet, welches der komplementären reversen Sequenz des *halS*-kodierenden Bereiches von +31 bis +51 relativ zum Translationsstartpunkt entsprach (Abb. 26). Der Nachweis des Transkriptes über die ORF PA1417 bis PA1415 erfolgte wie in Abbildung 26 dargestellt mittels PCR. Dabei wurde die synthetisierte cDNA als Matrice eingesetzt und mit zwei verschiedenen Oligonukleotidpaaren amplifiziert. In beiden Fällen wurden Fragmente mit der entsprechenden Größe, alle 3 Gene umfassend, nachgewiesen. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um amplifizierte chromosomale DNA handelt, wurde zur Kontrolle die RNA ohne vorherige reverse Transkription in die PCR eingesetzt. Da in diesem PCR-Ansatz kein Produkt entstand, konnte ausgeschlossen werden, dass die RNA-Präparation durch chromosomale DNA verunreinigt war.

Diese Ergebnisse belegen, dass das *halS*-Gen in einem Operon organisiert ist und nicht nur der Kontrolle eines direkt stromaufwärts liegenden Promotors, sondern zusätzlich eines weiter stromaufwärts liegenden, mindestens drei Gene kontrollierenden, Promotors unterliegt.

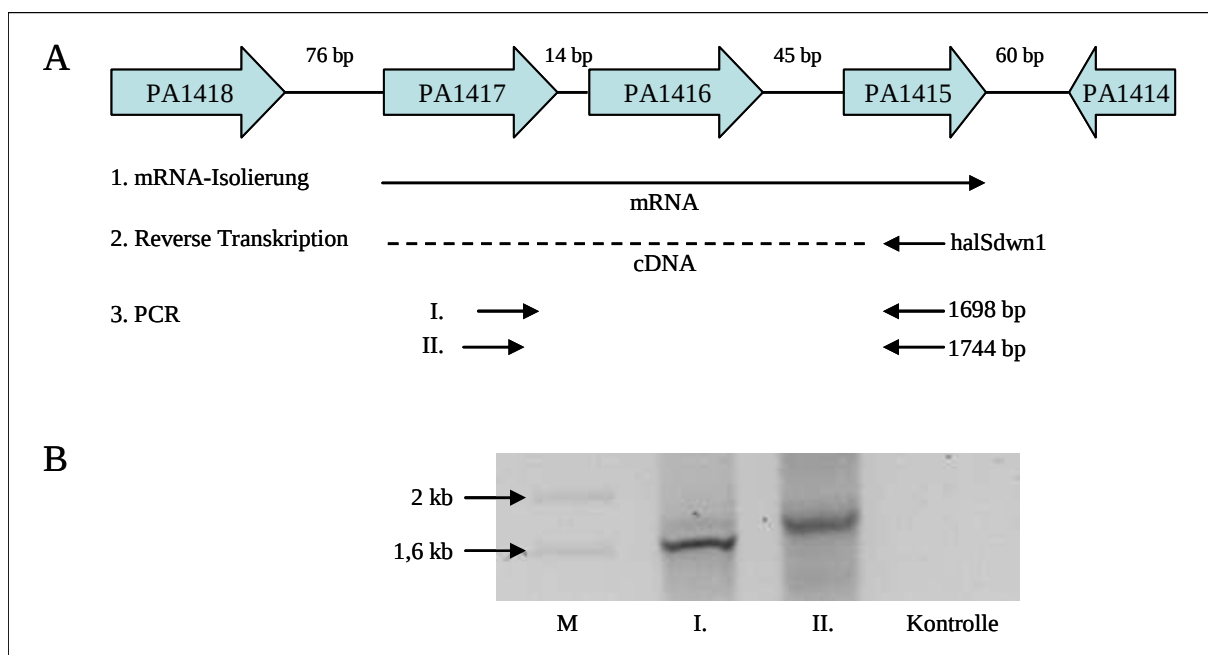


Abb. 26: Nachweis eines gemeinsamen Transkriptes der offenen Leserahmen PA1417, PA1416 und PA1415. **A:** Schematische Darstellung der Lage der ORF im Genom sowie der Durchführung zum Nachweis des gemeinsamen Transkriptes. Die mRNA wurde ausgehend vom *halS*-Gen (ORF PA1415) mit dem spezifischen Oligonukleotid *halSdwn1* in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis der cDNA erfolgte mittels PCR unter Einsatz zwei verschiedener Oligonukleotid-Paare (I.: 1417up/*halSdwn1*, II.: opr1417up/*halSdwn1*), die Fragmente von 1698 bp bzw. 1744 bp amplifizieren. **B:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 0,8 %igen Agarosegel. In der Kontrolle wurde die RNA ohne vorherige reverse Transkription in die PCR eingesetzt. M: DNA-Marker.

4 DISKUSSION

4.1 Identifizierung des AHL-Lactonase-homologen Proteins HalS von *P. aeruginosa*

Zell-Zell-Kommunikationssysteme werden von diversen Bakterien genutzt, um die Genexpression und somit ihr physiologisches Verhalten in Abhängigkeit von der eigenen Zelldichte zu regulieren. Seit den 90er Jahren ist *Quorum-sensing* (QS) über AHL-Signalmoleküle als weit verbreitetes Kommunikationssystem unter Gram-negativen Bakterien anerkannt (Fuqua *et al.*, 1996; Swift *et al.*, 1999). Da insbesondere die Expression von Virulenzfaktoren durch QS reguliert wird, entstand die Idee, durch Störung dieses Kommunikationssystems bakterielle Infektionen zu bekämpfen. Daher wurde nach Enzymen gesucht, die AHL-Signalmoleküle inaktivieren können (Dong *et al.*, 2000). Als Quelle für derartige AHL-degradierende Enzyme kamen Bakterien in Frage. AHL-produzierende Bakterien sind ubiquitär verbreitet, und häufig dient QS dazu, der eigenen Spezies einen Vorteil zu verschaffen und andere Spezies in derselben Nische zu schädigen und zu verdrängen. Um dieser Schädigung zu entgehen, könnten diese Bakterien Mechanismen entwickelt haben, um fremde QS-Systeme auszuschalten. Möglicherweise hat eine Co-Evolution zwischen AHL-basierten Kommunikationssystemen zur Ausbildung kompetitiver Vorteile und AHL-Inaktivierungssystemen zur Störung dieser stattgefunden (Dong & Zhang, 2005).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war ein einziges AHL-degradierendes Enzym bekannt, die AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus spec.* 240B1 (Dong *et al.*, 2000). Identifiziert wurde dieses Enzym bei einem Screening von mehr als 400 Umweltisolaten und 100 Laborstämmen. AiiA spaltete die Esterbindung des Homoserinlactonrings der Signalmoleküle 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL und 3-oxo-C10-HSL (Dong *et al.*, 2001). *Bacillus* produziert keine AHL-Signalmoleküle, diese sind bisher nur bei Gram-negativen Bakterien beschrieben worden. Eine erste Fragestellung zu Beginn der vorliegenden Arbeit zielte auf die Existenz AHL-degradierender Enzyme in AHL-produzierenden Bakterien. AHL-Signalmoleküle dienen der Wahrnehmung der Zelldichte. Da sie über die Autoinduktion ihre eigene Produktion verstärken (vgl. Abb. 1), müsste die AHL-Konzentration, sobald die QS-Maschinerie einmal aktiviert wurde, stetig ansteigen. Eine Akkumulation der Signalmoleküle über längere Zeit würde daher ihrer Funktion widersprechen, denn Fluktuationen der Zelldichte könnten nicht wahrgenommen werden. Um ihre Funktion ausüben zu können, müssen Signalmoleküle also instabil sein oder abgebaut werden. Hinweise auf einen Abbau von AHL-Molekülen liefert die Tatsache, dass diese in neutralen und leicht sauren Umgebungen stabil sind, jedoch keine Akkumulation von AHLs in solchen Umgebungen bekannt ist (Leadbetter & Greenberg,

2000). Über die Produktion AHL-degradierender Enzyme hätten QS-fähige Bakterien die Möglichkeit, bei Bedarf den QS-aktivierten Zustand wieder zu verlassen.

Gegenstand dieser Arbeit war daher die Identifizierung von möglichen AHL-degradierenden Enzymen bei *P. aeruginosa*. Das QS-System von *P. aeruginosa* ist eines der bestuntersuchten, und dieser opportunistische Erreger verschiedener Infektionskrankheiten gilt als Modellorganismus für die Analyse komplexer QS-Netzwerke (Juhas *et al.*, 2005). Die Komplexität dieses QS-Systems wird bereits durch die hierarchische Anordnung der zwei separaten, jedoch interagierenden QS-Systeme (Las- und Rhl-System) und der Verwendung von verschiedenen Signalmolekülen (3-oxo-C12-HSL und C4-HSL) deutlich. Diese QS-Systeme werden wiederum von übergeordneten globalen Regulatoren kontrolliert (vgl. Kap. 1.5). Die Notwendigkeit einer komplexen Regulation der QS-Aktivierung ist durch die hohe Anzahl QS-regulierter Gene ersichtlich. Mit Hilfe von Microarray-Analysen wurden umfassende Untersuchungen zum QS-regulierten Transkriptom von *P. aeruginosa* durchgeführt, welche belegen, dass 3 % bis 7 % aller offenen Leserahmen durch QS beeinflusst werden (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Dieser globale Effekt wird außerdem durch die homogene Verteilung der QS-beeinflussten Gene über das gesamte Chromosom deutlich. Abbildung 27 zeigt, dass die in den Microarrays identifizierten Gene nicht in Clustern lokalisiert sind, sondern sowohl die QS-aktivierten als auch -reprimierten Gene im Genom verstreut vorliegen (Schuster *et al.*, 2003).

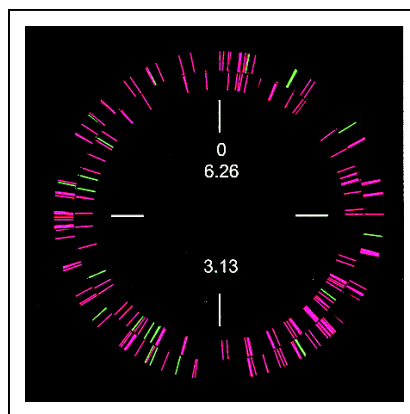


Abb. 27: Verteilung der QS-regulierten Gene auf dem *P. aeruginosa*-Chromosom. Rot: aktivierte Gene, grün: reprimierte Gene. Die Gene im inneren Kreis werden gegen den Uhrzeigersinn transkribiert. Angegeben sind die Positionen in Megabasen (Schuster *et al.*, 2003).

Die Komplexität der QS-Systeme wird außerdem durch das unterschiedliche Timing der Induktion verschiedener QS-regulierter Gene erhöht. Wie die Microarray-Analysen zeigten, werden zwar die meisten QS-abhängigen Gene bei dem Übergang in die stationäre Phase induziert, einige Gene jedoch während des frühen Wachstums und andere erst spät in der Stationärphase (Schuster *et al.*, 2003). Des Weiteren werden für die Aktivierung einiger QS-

kontrollierter Gene mehrere Signale benötigt. Neben einer ausreichenden Zelldichte sind für die Aktivierung dieser Gene außerdem spezielle Umweltbedingungen erforderlich (Diggle *et al.*, 2002; Yarwood *et al.*, 2005).

Ein derart komplex reguliertes System lässt auch die Existenz von AHL-Inaktivierungsmechanismen vermuten. Nach Veröffentlichung des ersten AHL-degradierenden Enzyms, der AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus*, wurden Homologievergleiche mit dem *P. aeruginosa*-Genom durchgeführt und der ORF PA1415 identifiziert. Das durch diesen ORF kodierte putative Protein ist in der *Pseudomonas*-Datenbank (<http://www.pseudomonas.com>) als hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion eingetragen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist 29 % Identität und 42 % Ähnlichkeit mit AiiA auf, sowie die beiden konservierten Bereiche, die von Dong *et al.* (2000) identifiziert wurden (Abb. 6). Hierbei handelt es sich um konservierte Bereiche von Arylsulfatasen und Metallo- β -Lactamasen. Das HXHXDH-Motiv ist als Zink-Bindemotiv bekannt (Melino *et al.*, 1998). Für die Aktivität der AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus* ist dieses Motiv essentiell (Dong *et al.*, 2000), jedoch wurde in einer 2004 veröffentlichten Studie berichtet, dass weder Zink noch andere Metallionen für die Enzymaktivität benötigt werden (Wang *et al.*, 2004). Da weder die Zugabe von Zink noch die Entfernung durch den Chelator EDTA die Enzymaktivität beeinflussten, wurde AiiA nicht zur Familie der Metallohydrolasen gezählt. Diese Befunde wurden jedoch von Thomas *et al.* (2005) widerlegt. Zwar wurde diese Studie mit dem AiiA-homologen Protein aus *Bacillus thuringiensis* durchgeführt, jedoch weisen die beiden AiiA-Proteine über 90 % identische Aminosäuren auf und die an der Zink-Bindung beteiligten Aminosäuren sind absolut konserviert. Neben der Beobachtung, dass AHL-Lactonasen zwei Zinkionen in ihrem aktiven Zentrum beinhalten, wurde außerdem gezeigt, dass AiiA aus *B. thuringiensis* ein stereoselektives Metalloprotein ist, welches ausschließlich das S-Enantiomer des C6-HSL hydrolysiert (Thomas *et al.*, 2005). Kürzlich wurde die dreidimensionale Struktur dieser AHL-Lactonase veröffentlicht, die ebenfalls belegt, dass zwei Zinkionen am aktiven Zentrum gebunden sind (Liu *et al.*, 2005).

Aufgrund der Homologie zu AiiA sowie der Existenz des Zink-Bindemotivs wurde angenommen, dass es sich bei dem in *P. aeruginosa* identifizierten putativen Protein ebenfalls um eine Zink-abhängige AHL-Lactonase handelt, die die Esterbindung in Lactonringen von AHL-Signalmolekülen spalten kann. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher die funktionelle Untersuchung dieses als HalS bezeichneten Proteins. Eine mögliche regulatorische Funktion für das QS-System von *P. aeruginosa* wurde außerdem aus der Lokalisation des

halS-Gens im Chromosom abgeleitet. Das Gen liegt in relativer Nähe zu den Genen *lasR* und *lasI*, welche eines der beiden QS-Systeme von *P. aeruginosa* bilden (Abb. 25).

4.2 Einfluss der *halS*-Expression auf die Virulenzfaktor-Produktion bei *P. aeruginosa*

Für die funktionelle Untersuchung des AHL-Lactonase-homologen Proteins HalS wurde zunächst der Einfluss dieses Proteins auf QS-regulierte Prozesse bei *P. aeruginosa* untersucht. Dazu wurden *halS*-defiziente und *halS*-überexprimierende Stämme konstruiert. Für erste Experimente wurde eine Vektor-Insertionsmutante ($\Delta halS$) erstellt, deren Phänotyp später durch die Genaustausch-Mutante $\Delta halS$ (Gm^r) verifiziert wurde. Die Konstruktion dieser *halS*-defizienten Mutanten ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Polare Effekte auf stromabwärts liegende Gene konnten ausgeschlossen werden, da die nachfolgenden Gene in entgegengesetzter Richtung transkribiert werden. Die *halS*-Überexpression (*halS*⁺⁺) erfolgte unter der Kontrolle des in *P. aeruginosa* konstitutiven *lac*-Promotors.

Die Betrachtung QS-abhängiger Phänotypen bei *P. aeruginosa* ergab einen deutlichen Einfluss von HalS. Die Auswirkungen übermäßiger bzw. fehlender HalS-Mengen werden zunächst im Einzelnen und am Ende dieses Kapitels zusammenfassend diskutiert.

Der Vergleich des *halS*-defizienten Stammes mit dem Wildtyp bzw. dem *halS*-überexprimierenden Stamm zeigte eine drastische Veränderung der Kulturfarbe. Hervorgerufen wird die für *Pseudomonas* typische blau-grüne Kulturfarbe durch die QS-abhängige Produktion des Siderophors Pyoverdin und des blauen Pigments Pyocyanin (Stintzi *et al.*, 1998; Whiteley *et al.*, 1999). Für die Produktion des Virulenzfaktors Pyocyanin wurde eine strikte Abhängigkeit vom Rhl-System nachgewiesen (Brint & Ohman, 1995; Latifi *et al.*, 1995). Der Einfluss von HalS auf die Pyocyaninproduktion wurde untersucht, indem dieses Pigment aus den Kulturüberständen der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme extrahiert und quantifiziert wurde. Dabei wurde deutlich, dass die Inaktivierung des *halS*-Gens eine Verdopplung der Pyocyanin-Menge verursachte. Diese Beobachtung wurde darauf zurückgeführt, dass das Fehlen von HalS zu einer verminderten AHL-Degradation und somit zu einer Erhöhung der AHL-Konzentration führt. Hierdurch bedingt steigt die QS-abhängige Pyocyaninproduktion. Durch Einbringen des Plasmid-kodierten *halS*-Gens konnte der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden. Durch die unphysiologisch hohe Produktion von HalS wurde jedoch keine weitere Senkung der Pyocyaninproduktion erreicht. Die konstitutive *halS*-Expression im HalS-Überproduktionsstamm nahm keinen signifikanten Einfluss auf die Pyocyaninkonzentration. Mit

12 µg/ml, 14 µg/ml und 14 µg/ml wiesen HalS-Überproduktionsstamm, Wildtyp und Leervektorkontrolle vergleichbare Werte auf.

Demgegenüber berichteten Reimann *et al.* (2002) von einer Senkung der Pyocyaninproduktion durch Überexpression des *aiiA*-Gens aus *Bacillus spec.* A24 in *P. aeruginosa* PAO1. Während für die Leervektorkontrolle ca. 18 µg/ml ermittelt wurden, sank die Pyocyaninkonzentration durch konstitutive *aiiA*-Expression in PAO1 auf unter 5 µg/ml.

Beim Vergleich dieser beiden Studien muss berücksichtigt werden, dass es sich bei AiiA um ein heterologes Protein mit vermutlich stark abweichender Substratspezifität und Enzymkinetik handelt. Des Weiteren müssen die experimentellen Unterschiede, z. B. die Wahl der Kulturmedien, berücksichtigt werden. Die Auswirkungen veränderter äußerer Bedingungen, wie Belüftung oder Medienzusammensetzung, auf die QS-Regulation werden in Kapitel 4.3.2 diskutiert.

Eine weitere Virulenz-assoziierte Eigenschaft, die durch HalS beeinflusst wird, ist die Schwärmfähigkeit von *P. aeruginosa*. Die Beweglichkeit allgemein spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Infektionen: sie ermöglicht die Ausbreitung der Bakterienzellen und ist eine Voraussetzung zur Bildung differenzierter Biofilme (O'Toole & Kolter, 1998). Anders als das Flagellen-vermittelte Schwimmen in flüssigen Umgebungen und die Typ VI-Pili-vermittelte *twitching motility* entlang fester Oberflächen ist das Schwärmen in semisoliden Umgebungen QS-abhängig (Köhler *et al.*, 2000). Dabei wurde vor allem eine Abhängigkeit vom Rhl-System nachgewiesen. Während *rhlR*- sowie *rhlI*-defiziente Mutanten schwärmunfähig waren, zeigten *lasI*- sowie *lasR*-Mutanten eine lediglich reduzierte Schwärmfähigkeit (Köhler *et al.*, 2000). Der geringe Einfluss des Las-Systems auf die Schwärmbewegung könnte durch die hierarchische Anordnung dieser beiden QS-Systeme bedingt sein, denn ein Ausfall des Las-Systems verhindert die volle Induktion des Rhl-Systems (vgl. Abb. 3).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des *halS*-Gens das Schwärmen der *P. aeruginosa*-Zellen nahezu vollständig hemmt (Abb. 9). Die Schwärmbewegung benötigt sowohl die Flagelle als auch die Typ IV-Pili (Köhler *et al.*, 2000). Da weder das Schwimmen noch die *twitching motility* durch die *halS*-Überexpression beeinträchtigt wurden (Abb. 10), kann von der Funktionalität dieser beiden Oberflächenstrukturen ausgegangen werden. Es liegt demnach kein generelles Bewegungsdefizit vor, sondern nur das QS-abhängige Schwärmen wird durch die HalS-Überproduktion inhibiert. Demgegenüber hat das Fehlen von HalS keine erkennbaren Auswirkungen auf das Schwärmverhalten.

Als eine Ursache für die Inhibierung des Schwärmens wurde eine ebenfalls verringerte Rhamnolipidproduktion des HalS-Überproduktionsstammes nachgewiesen. Rhamnolipide verbessern die Schwämbewegung von Bakterien, da sie aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften die Reibung zwischen Zellen und Oberflächen verringern (Déziel *et al.*, 2003; Köhler *et al.*, 2000). Die Produktion dieser Virulenzfaktoren wird ebenfalls QS-abhängig reguliert. Die entsprechenden Strukturgene *rhlAB* sind mit den Genen *rhlR* und *rhlI* in einem Gencluster organisiert und werden durch das Rhl-System reguliert (Ochsner & Reiser, 1995). Die Ermittlung der Rhamnolipidgehalte in den Kulturüberständen der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme ergab im Falle des HalS-Überproduktionsstammes eine Reduktion um 36 %. Wie auch bei der Schwärmfähigkeit beobachtet, führte die konstitutive *halS*-Expression zu einer Abnahme des Virulenz-assoziierten Phänotyps, was auf eine verstärkte AHL-Degradation zurückgeführt wird. Die Inaktivierung des *halS*-Gens hatte jeweils keine deutlichen Auswirkungen.

In engem Zusammenhang mit der Beweglichkeit und der Rhamnolipidproduktion steht bei *P. aeruginosa* die Biofilmbildung. Die Beweglichkeit der Bakterienzellen erfüllt sowohl bei der Bildung als auch bei der Auflösung von Biofilmen wichtige Aufgaben (Klausen *et al.*, 2003b; O'Toole & Kolter, 1998). Rhamnolipide sind die Voraussetzung für die Bildung und Aufrechterhaltung wasserführender Kanäle innerhalb von Biofilmen (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). Eine Verbindung dieser drei Zelldichte-abhängigen Phänotypen ergibt sich auch durch die herrschenden Nährstoffbedingungen. Sowohl für die Rhamnolipidproduktion als auch für die Schwämbewegung ist eine Repression durch Ammonium sowie einen Eisen-Überschuss bekannt (Déziel *et al.*, 2003; Guerra-Santos *et al.*, 1984). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass ungünstige Nährstoffbedingungen die Produktion der Biodetergenzien und die Oberflächenbeweglichkeit erhöhen und dadurch verhindern, dass die Bakterienzellen zur sessilen Lebensweise übergehen und Biofilme in nährstoffarmen Umgebungen bilden (Déziel *et al.*, 2003).

Biofilme sind seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Schließlich repräsentieren sie nicht nur den Großteil der in der Natur vorkommenden Bakterien, sondern stellen auch ein großes industrielles und medizinisches Problem dar. *P. aeruginosa* besiedelt nicht nur Rohre und Leitungen, sondern auch medizinische Implantate, Schläuche von Kathedern und die Lungen von CF-Patienten (Costerton, 1995; Costerton *et al.*, 1999). Innerhalb solcher Biofilme sind Bakterien oftmals widerstandsfähiger gegen herkömmliche Antibiotika und der Immunantwort des Wirtes, wodurch die Bekämpfung von Biofilmen erschwert wird

(Costerton *et al.*, 1999; Fux *et al.*, 2005; Stewart & Costerton, 2001). Die Erkenntnis, dass die Biofilmbildung durch QS beeinflusst wird, könnte einen neuen Therapieansatz liefern (Davies *et al.*, 1998).

Dass QS-Signale einen Einfluss auf Biofilme von *P. aeruginosa* ausüben, ist unbestritten, jedoch gibt es unterschiedliche Befunde darüber, welche Funktionen genau die QS-Signale ausüben und in welcher Phase der Biofilmentwicklung die AHL-Signale eine Rolle spielen (Davies *et al.*, 1998; De Kievit *et al.*, 2001; Klausen *et al.*, 2003a; Sauer *et al.*, 2002).

Davies *et al.* (1998) beobachteten, dass vor allem Mutationen des Las-Systems Defekte in der Biofilmbildung auslösten. Verglichen mit dem Wildtyp bildeten *lasI*-Mutanten nicht nur einen wesentlich dünneren, gleichmäßig dichten Biofilm aus, sondern zeigten auch eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem Biozid SDS. Die Autoren schlossen, dass insbesondere das Las-System für die Ausbildung differenzierter Biofilme notwendig ist. Auch die Studien von De Kievit *et al.* (2001) belegen, dass die Inaktivierung von *lasI* bzw. *rhlI* zur Ausbildung flacherer Biofilme führen. Diese Defekte konnten durch Zugabe der entsprechenden Signalmoleküle behoben werden. Die Autoren beobachteten bereits in den frühen Stadien der Biofilmbildung eine Beeinträchtigung durch Mutationen des QS-Systems. Sauer *et al.* (2002) berichteten dagegen von einem Einfluss des Las-Systems erst in späteren Stadien der Biofilmdifferenzierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Veränderung der Biofilmarchitektur in Abhängigkeit der *halS*-Expression beobachtet. Der Einfluss von HalS auf die Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* wurde in zwei unterschiedlichen Systemen untersucht. Im statischen Modell wurden Glasobjektträger in Petrischalen mit Vollmedium überschichtet. Die Kultivierung der Biofilme erfolgte für 48 h auf einer Wippe, um mäßige Scherkräfte auf die Biofilme auszuüben. In einem zweiten Modell wurden dynamische Bedingungen gewählt. Die Biofilme wurden in Durchflusszellen kultiviert, wobei die immobilisierten Zellen kontinuierlich von frischem Nährmedium umströmt wurden. Im Gegensatz zum statischen Modell wurde hier Minimalmedium verwendet.

In beiden Modellen zeigte sich, dass HalS die Biofilmbildung deutlich beeinflusst. Sowohl die Inaktivierung als auch die übermäßige Expression des *halS*-Gens beeinträchtigten die Biofilmbildung. Während der Wildtyp im statischen Modell das Substratum nahezu vollständig bedeckte, waren nur wenige Zellen der *halS*-Mutante sowie des HalS-Überproduktionsstammes angeheftet (Abb. 12). Dabei ist zu beachten, dass die Zelldichten der planktonischen Kulturen vergleichbar waren. Die Störung der *halS*-Genexpression scheint die Anheftung der

Zellen an das Substratum zu behindern. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob die initiale Anheftung nicht erfolgt war, oder eine Ablösung nur locker angehefteter Zellen stattfand. Es wurde mehrfach berichtet, dass die Typ IV-Pili für den Anheftungsprozess notwendig sind. Klausen *et al.* (2003b) und De Kievit *et al.* (2001) zeigten, dass dies nur unter bestimmten Bedingungen der Fall ist. Sie ermittelten nur in Glucose-Medium bzw. nur unter statischen Bedingungen einen essentiellen Beitrag der Typ IV-Pili an der Adhäsion. Bei der Analyse von Biofilmen müssen daher stets die herrschenden Bedingungen berücksichtigt werden, da sowohl die Zusammensetzung des Kulturmediums als auch andere Umweltbedingungen, wie die Verwendung von Durchfluss- bzw. statischen Modellen, die Biofilmbildung erheblich beeinflussen und unterschiedliche Faktoren eine unterschiedliche Gewichtung erhalten (De Kievit *et al.*, 2001; Klausen *et al.*, 2003b; O'Toole & Kolter, 1998). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der *halS*-Expression auf die Biofilmentwicklung zusätzlich in einem dynamischen System unter Verwendung eines Minimalmediums untersucht. Der Wildtyp bildete in diesem System dreidimensionale Mikrokolonien, die nach 48 h sichtbar wurden und nach 72 h deutlicher ausgeprägt waren. Demgegenüber waren die Biofilme der *halS*-Mutante und des *HalS*-Überproduktionsstammes sehr flach, dreidimensionale Strukturen wurden auch nach 72 h nicht erkennbar (Abb. 13).

Die Ausbildung von Mikrokolonien wurde von O'Toole & Kolter (1998) auf die Typ IV-Pili-vermittelte *twitching motility* zurückgeführt, die eine Aggregation von zunächst benachbarten, angehefteten Zellen ermöglicht. In neueren Studien wurde gezeigt, dass die Bildung von Mikrokolonien auch Typ IV-Pili-unabhängig durch die Teilung einzelner angehefteter Zellen erfolgen kann (De Kievit *et al.*, 2001; Klausen *et al.*, 2003b).

Eine *HalS*-bedingte Beeinträchtigung der Biofilmbildung durch eine verminderte Funktionalität der Typ IV-Pili wird ausgeschlossen. Da alle Stämme in gleichem Maße zur *twitching motility* fähig waren, kann davon ausgegangen werden, dass die Typ IV-Pili vorhanden und auch funktional sind. Die genauen Wirkungsmechanismen, über die eine Beeinflussung der QS-Signale die Ausbildung dreidimensionaler Biofilm-Strukturen verhindern kann, sind bisher weitgehend unbekannt. Da sowohl die Inaktivierung des *halS*-Gens als auch die Überexpression zu einer vergleichbaren Biofilmarchitektur führen, wird postuliert, dass *HalS* an der Feinabstimmung der beiden QS-Systeme beteiligt ist. Das Verhältnis der beiden wichtigsten QS-Signalmoleküle von *P. aeruginosa* (C4-HSL und 3-oxo-C12-HSL) zueinander scheint für den komplexen Prozess der Biofilmbildung entscheidend zu sein. So wurde berichtet, dass in Biofilmen sowie im Sputum von CF-Patienten ein im Vergleich zu planktonischen Kulturen umgekehrtes Verhältnis dieser beiden AHLs herrscht (Singh *et al.*, 2000). In Biofilmen und

Sputum-Proben wurde signifikant mehr C4-HSL detektiert, was möglicherweise auf einen verstärkten Abbau des langkettigen 3-oxo-C12-HSL unter Biofilmbedingungen zurückgeführt werden könnte (Huang *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde bei den AHL-Degradationstests nur für langkettige, 3-oxo-substituierte AHLs eine Abnahme der Aktivität durch Inkubation mit HalS beobachtet (Kap. 3.9.3). Durch eine Verstärkung sowie eine Inhibierung der AHL-Degradation durch die *halS*-Überexpression bzw. *halS*-Deletion könnte das Verhältnis von 3-oxo-C12-HSL zu C4-HSL derart verändert werden, dass in beiden Fällen die Entwicklung dreidimensionaler Strukturen verhindert wird.

Als typischer QS-regulierter Virulenzfaktor wurde auch die Elastase LasB betrachtet, deren Expression vorwiegend vom Las-System, in geringerem Maße aber auch vom Rhl-System kontrolliert wird (Brint & Ohman, 1995; Gambello & Iglewski, 1991). Die Analyse der extrazellulären proteolytischen Aktivität mittels Skim-Milk-Indikatorplatten deutete bereits eine Verminderung im Falle des HalS-Überproduktionsstammes und eine leicht erhöhte Aktivität der *halS*-Mutante an (Abb. 14). Um eine Überlagerung der Elastase-Aktivität durch andere Proteasen auszuschließen, wurde die extrazelluläre Elastase-Aktivität zusätzlich zymographisch untersucht. Hierbei erfolgte der Aktivitätsnachweis nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine, sodass eine proteolytische Aktivität einem bestimmten Enzym zugeordnet werden konnte. In diesen Experimenten wurde eine deutliche Abnahme der LasB-Aktivität im Kulturüberstand des HalS-Überproduktionsstammes beobachtet, während die Aktivität der alkalischen Protease nicht beeinflusst wurde. Bei der *halS*-Mutante wurde keine verstärkte Elastase-Aktivität ermittelt. Wie bereits für die Rhamnolipidproduktion und das Schwärmen beschrieben, scheint nur die Überproduktion, aber nicht das Fehlen von HalS diese QS-abhängigen Prozesse signifikant zu beeinflussen.

Die Analyse des Einflusses von HalS auf die Elastase LasB sollte durch Expressionsstudien mit Hilfe einer translationalen *lasB*-Reportergenfusion ergänzt werden. Durch Vergleich der *lasB*-Expression im *P. aeruginosa*-Wildtyp mit bzw. ohne *halS*-Überexpressionsplasmid wurde ebenfalls ein deutlicher Einfluss von HalS auf die Elastase nachgewiesen. Jedoch erfolgte im Überexpressionsplasmid-tragenden Stamm eine stärkere *lasB*-Expression als in der entsprechenden Leervektorkontrolle.

Diese Befunde erscheinen zunächst widersprüchlich. Nach der allgemeinen Auffassung von QS müsste eine AHL-Lactonase-bedingte Degradation von AHL-Signalmolekülen zu einer verminderten Transkription QS-regulierter Gene führen. Bei der Analyse einer veränderten *lasB*-Expression durch Eingriffe in die QS-Regulation muss jedoch berücksichtigt werden,

dass die Expression der Elastase sowohl vom Las- als auch vom Rhl-System kontrolliert wird. Es wurde gezeigt, dass der *lasB*-Promotor zwei *lux*-Boxen (Bindestellen für AHL-aktivierte Transkriptionsregulatoren) aufweist, wobei LasR nur an eine dieser Stellen mit hoher Affinität bindet. Für die andere *lux*-Box wird eine RhlR-Bindung vermutet (Schuster *et al.*, 2004). Die Aktivierung der *lasB*-Expression müsste demnach getrennt für beide QS-Systeme analysiert werden. Da die Überexpression des *halS*-Gens nicht zu einer Reduktion der *lasB*-Expression im *P. aeruginosa*-Wildtyp führt, beeinflusst HalS möglicherweise nur eines der beiden QS-Systeme.

Durch Überexpression der AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus* in *P. aeruginosa* PAO1 wurde die *lasB*-Expression, ebenfalls ermittelt über eine translationale *lasB*::*lacZ*-Fusion, stark vermindert (Reimann *et al.*, 2002). Für AiiA wurde jedoch bereits gezeigt, dass es sowohl C4-HSL als auch 3-oxo-C12-HSL, also beide Signalmoleküle von *P. aeruginosa* degradiert (Wang *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass trotz gesteigerter *lasB*-Expression die Aktivität des Virulenzfaktors LasB durch die erhöhte HalS-Produktion herabgesetzt wurde.

Eine verminderte Aktivität eines extrazellulären Enzyms trotz erhöhter Expression lässt vermuten, dass entweder die Faltung oder der Transport des Proteins beeinträchtigt wird. Die Elastase LasB wird als Prä-Proenzym synthetisiert (Bever & Iglewski, 1988). Nach dem Transport über die innere Membran wird die Signalsequenz abgespalten und das Proenzym durch Autoproteolyse prozessiert. Nach der Faltung im Periplasma wird sowohl das Propeptid, welches als intramolekularer Faltungshelfer (Chaperon) fungiert, als auch die reife Elastase über die Xcp-Maschinerie sekretiert (Braun *et al.*, 1998). Da die Komponenten dieses Sekretionssystems ebenfalls QS-abhängig sind, könnte der HalS-Einfluss auf die LasB-Aktivität auch indirekt über eine verminderte Sekretion erfolgen.

Der beobachtete Einfluss von HalS auf einzelne Virulenzfaktoren wurde in einem *in vivo*-Pathogenitätsmodell bestätigt, bei dem das Zusammenwirken verschiedener Virulenzfaktoren betrachtet wird. *P. aeruginosa* verursacht Infektionen bei phylogenetisch stark divergierenden Wirtsorganismen. Dennoch wurde eine auffallende Übereinstimmung der Virulenzmechanismen beobachtet, und die gleichen Virulenzfaktoren sind für die Entstehung von Krankheiten bei Tieren und Pflanzen verantwortlich. Daher haben sich Pflanzen, insbesondere *Arabidopsis thaliana*, als Modellorganismen für Studien tier- oder humanpathogener Bakterien etabliert (Rahme *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie wurde durch Beimpfen von *Arabidopsis thaliana*-Blättern mit *P. aeruginosa*-Kulturen ein leicht erhöhtes phytopathogenes Potential

der *halS*-defizienten Mutante im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (Abb. 16). Beide Kulturen lösten zwar Läsionen des Pflanzengewebes aus, jedoch wiesen die mit der *halS*-Mutante infizierten Blätter stärkere Krankheitssymptome und größere befallene Flächen auf.

4.2.1 Zusammenfassende Betrachtung des Einflusses von HalS auf Zelldichte-abhängige Phänotypen

Die Betrachtung diverser QS-abhängiger Phänotypen bei *P. aeruginosa* ergab einen deutlichen Einfluss des HalS-Proteins. Die beobachteten Effekte, die sowohl Rhl-abhängige als auch Las-abhängige Prozesse (vgl. Abb. 3) betreffen, sind zusammenfassend in Tabelle 11 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass die Deletion des *halS*-Gens zu einer erhöhten Pyocyaninproduktion, einer beeinträchtigten Biofilmentwicklung sowie einer leicht erhöhten Phytopathogenität führte. Stärkere Effekte wurden jedoch bei konstitutiver *halS*-Expression im Überproduktionsstamm beobachtet. Hierdurch wurde die Schwärmbewegung nahezu vollständig inhibiert, der Rhamnolipidgehalt sowie die Elastase-Aktivität im Kulturüberstand reduziert und ebenfalls eine Beeinträchtigung der Biofilmentwicklung bewirkt.

Tab. 11: Einfluss von HalS auf QS-abhängige Phänotypen. Dargestellt sind die Phänotypen der *halS*-defizienten Mutante ($\Delta halS$) und des HalS-Überproduktionsstammes (*halS*⁺⁺) im Vergleich zum Wildtyp und/oder der Leervektorkontrolle. Zeichenerklärung: (↑): Zunahme, (↓): Abnahme, (=): kein signifikanter Unterschied, (n. u.): nicht untersucht.

QS-abhängiger Phänotyp	$\Delta halS$	<i>halS</i> ⁺⁺
Pyocyaningehalt	↑	=
Schwärmverhalten	=	↓
Rhamnolipidgehalt	=	↓
Biofilmarchitektur, statisches Modell	stark verminderte Anheftung	stark verminderte Anheftung
Biofilmarchitektur, Durchflussmodell	flach, undifferenziert	flach, undifferenziert
Elastase-Aktivität	=	↓
Elastase-Expression	n. u.	↑
Pathogenität im Pflanzenmodell	↑	n. u.

Der Befund, dass die Überexpression eines AHL-degradierenden Enzyms stärkere Effekte auslöst als das Fehlen dieses Enzyms, wurde auch von Huang *et al.* (2003) berichtet. QS-

regulierte Phänotypen wurden in der Studie nicht betrachtet, jedoch zeigten die Autoren, dass die Überexpression des AHL-Acylase-homologen PvdQ-Proteins aus *P. aeruginosa* eine Akkumulation der langkettigen AHL-Signalmoleküle verhindert. Die Deletionsmutante war jedoch in gleichem Maße wie der Wildtyp zu einer Akkumulation, aber auch Degradation der Signalmoleküle fähig. Daraus schlossen die Autoren, dass *P. aeruginosa* weitere AHL-degradierende Enzyme produziert.

Die Existenz mehrerer AHL-degradierender Enzyme in einem Organismus, der eine Vielzahl physiologischer Prozesse über AHL-Signalmoleküle reguliert, lässt vermuten, dass diese Enzyme an der Feinabstimmung eines komplizierten QS-Systems beteiligt sind. Seit der Identifizierung des QS-Systems von *P. aeruginosa* wurden kontinuierlich neue Faktoren beschrieben, welche die QS-Regulation beeinflussen. Es wurde deutlich, dass QS ein viel komplizierteres System ist, als lediglich die Wahrnehmung einer Schwellenwertkonzentration von AHLs und die dadurch bedingte Induktion bestimmter Zielgene (Schuster *et al.*, 2003). Vielmehr erfolgt die Aktivierung verschiedener QS-abhängiger Gene in unterschiedlichen Wachstumsphasen und benötigt verschiedene äußere Bedingungen (Kim *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2003). Dabei findet die Regulation auf verschiedenen Ebenen statt. Neben Regulatoren, die einen globalen Einfluss auf die QS-Systeme ausüben (vgl. Abb. 3), sind verschiedene Mechanismen bekannt, die eine Regulation zwischen den beiden QS-Systemen von *P. aeruginosa* ermöglichen. Das hierarchisch übergeordnete Las-System aktiviert das Rhl-System auf Transkriptionsebene, jedoch wurden auch verschiedene posttranslationale Mechanismen beschrieben, über die das Las-System das Rhl-System reprimiert und somit eine frühzeitige Aktivierung des Rhl-Systems verhindert (vgl. Kap. 1.3). Eine weitere Möglichkeit, eine Feinregulation zwischen diesen beiden Systemen zu erreichen, besteht in der Degradation der AHL-Moleküle. Dadurch könnte die QS-Aktivierung allgemein verzögert werden oder durch die spezifische Degradation nur eines Signalmoleküls das Verhältnis der beiden AHLs zueinander verändert werden. Dies ermöglicht eine Feinabstimmung der Expression der von den jeweiligen AHL-Signalen kontrollierten Gene (Roche *et al.*, 2004).

4.3 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des HalS-Proteins

4.3.1 Analyse der Signalmolekül-Produktion von *P. aeruginosa*

Die beobachteten Auswirkungen übermäßiger bzw. fehlender HalS-Mengen auf verschiedene QS-kontrollierte Faktoren ließ vermuten, dass die *halS*-Überexpression eine erhöhte Degr-

dation von Signalmolekülen und somit eine Reduktion QS-abhängiger Phänotypen auslöst, während die Inaktivierung des *halS*-Gens zu einer verminderten Degradation von Signalmolekülen führt. Um diese Befunde zu bestätigen, wurden die Signalmolekülmengen der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme verglichen. Nach Extraktion der AHL-Signalmoleküle aus den Kulturüberständen und dünnschichtchromatographischer Auftrennung erfolgte der Nachweis mit Hilfe von Sensorbakterien. Die wichtigsten Signalmoleküle von *P. aeruginosa* sind C4-HSL und 3-oxo-C12-HSL. Daneben werden eine Reihe weiterer AHLs mit unterschiedlich langen Acyl-Seitenketten produziert, deren physiologische Funktion bislang ungeklärt ist. Katalysiert wird die AHL-Synthese von den AHL-Synthasen LasI bzw. RhII, Vorstufen sind S-Adenosylmethionin (SAM) und unterschiedlich beladene Acyl-ACPs (*acyl carrier proteins*). Da Acyl-ACP während der Fettsäurebiosynthese gebildet wird, hat der Zellstoffwechsel unmittelbaren Einfluss auf die Produktion der verschiedenen AHL-Moleküle (Val & Cronan, 1998). Die LasI-katalysierte Produktion von 3-oxo-AHLs wurde in einem *in vitro*-System mit gereinigtem LasI-Protein näher untersucht. Durch Veränderungen der Substrat- und Cofaktormengen konnte eine Verschiebung der Produktion des Signalmoleküls 3-oxo-C12-HSL hin zu Molekülen mit kürzeren Acyl-Ketten bewirkt werden (Hoang *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die äußeren Bedingungen stark auf LasI auswirken. Im Kulturüberstand aller untersuchten *P. aeruginosa*-Stämme wurden mit Hilfe des Sensorstammes *Agrobacterium tumefaciens* vier verschiedene AHLs detektiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Shaw *et al.* (1997) wurden diese anhand der Standardmoleküle als 3-oxo-Derivate mit 6, 8, 10 und 12 C-Atomen in der Acyl-Seitenkette identifiziert (Abb. 17). Dabei waren keine signifikanten Mengenunterschiede bei den verschiedenen Stämmen erkennbar. Es muss jedoch beachtet werden, dass eine genaue Quantifizierung der Signalmoleküle mit Hilfe der Biosensoren nicht möglich ist. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die Sensorbakterien eine unterschiedliche Empfindlichkeit für verschiedene AHLs aufweisen. So reagiert *A. tumefaciens* nur auf 3-oxo-AHLs, wobei 3-oxo-C8-HSL als das eigene Signalmolekül am sensitivsten nachgewiesen werden kann. Dadurch ergibt sich der besonders gut sichtbare Spot des 3-oxo-C8-HSL, während das in größeren Mengen von *P. aeruginosa* produzierte 3-oxo-C12-HSL nur einen kleinen Spot hervorruft (Abb. 17). Demgegenüber weist der zweite verwendete Sensorstamm, *Chromobacterium violaceum*, eine erhöhte Sensitivität für kurzkettige unsubstituierte AHLs, vor allem für das eigene C6-HSL, auf. Mit Hilfe dieses AHL-Biosensors wurden bei allen *P. aeruginosa*-Stämmen C4-HSL und C6-HSL detektiert. Erneut wurden keine signifikanten Mengenunterschiede nachgewiesen (Abb. 18). Bei diesem Stamm muss die allgemein viel geringere Sensitivität beachtet werden.

Während *A. tumefaciens* einen AHL-Nachweis im Pikomol-Bereich ermöglicht, können hier nur AHLs im Nanomol-Bereich nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der AHL-Biosensoren konnte eine Degradation der von *P. aeruginosa* produzierten AHLs nicht nachgewiesen, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Bei Degradation nur sehr geringer Mengen eines oder mehrerer AHLs kann die geringe Intensitätsabnahme des oder der Spots mit der verwendeten Methode nicht detektiert werden kann. Des Weiteren kann es bei der durchgeführten Methode, bei der die AHLs durch dünnenschichtchromatographische Auftrennung identifiziert wurden, zu falsch-positiven Reaktionen kommen. AHL-Lactonasen hydrolysieren die Esterbindung von Homoserinlactonringen, die entstehende geöffnete Form der Signalmoleküle zeigt keine Aktivität. Die Ergebnisse von Yates *et al.* (2002) belegen jedoch, dass diese geöffneten Moleküle durch Interaktion mit einer hydrophoben Chromatographie-Matrix rezyklisieren können, sodass ursprünglich degradierte Signalmoleküle ihre aktive Struktur zurück erhalten und eine Reaktion der AHL-Biosensoren auslösen.

Neben den AHL-Signalmolekülen beeinflusst auch das *Pseudomonas-quinolone*-Signal (PQS) viele der in der vorliegenden Arbeit untersuchten QS-abhängigen Phänotypen. Dieses Signalmolekül unterscheidet sich strukturell stark von den AHLs (Abb. 2.F). Eine Degradation dieses Moleküls durch HalS wurde deshalb nicht angenommen. Da aber die Expression des *pqs*-Operons vom Las-System aktiviert wird (Pesci *et al.*, 1999), würde eine HalS-bedingte Degradation des 3-oxo-C12-HSL nicht nur zu einer Veränderung der Las-kontrollierten Eigenschaften führen, sondern auch zu einer verringerten PQS-Synthese. Dadurch wiederum würden maßgeblich Rhl-abhängige Faktoren ebenfalls beeinträchtigt (vgl. Kap. 1.3). Der Nachweis der PQS-Moleküle aus Extrakten der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme lieferte jedoch keine Hinweise auf eine unterschiedlich starke Synthese dieser Signalmoleküle (Abb. 19).

LC-MS/MS-Analysen zur AHL-Degradation

Die Analyse der Signalmoleküle, die von den verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen produziert wurden, erfolgte neben dem Nachweis der intakten AHLs über AHL-Sensorbakterien zusätzlich massenspektrometrisch. Diese Methode ermöglicht nicht nur den sensitiven Nachweis intakter Signalmoleküle, sondern auch derer Degradationsprodukte. Durch eine AHL-Lactonase-katalysierte Degradation von Acyl-Homoserinlactonen entstehen die entsprechenden Acyl-Homoserine, die durch die Öffnung des Lactonrings hydrophilere Eigenschaften

aufweisen (Dong *et al.*, 2001). Nachgewiesen wurden diese Moleküle nach der Inkubation synthetischer AHLs mit gereinigten Enzymen. Ein *in vivo*-Nachweis dieser AHL-Degradationsprodukte wurde bisher nicht beschrieben.

Der Export der *P. aeruginosa*-Signalmoleküle erfolgt im Falle des kurzkettigen Signalmoleküls (C4-HSL) über eine freie Diffusion, das langkettige 3-oxo-C12-HSL wird zusätzlich zu einer langsamen Diffusion aktiv über die MexAB-OprM-Pumpe aus der Zelle transportiert (Pearson *et al.*, 1999). Da der Export der geöffneten Moleküle durch die hydrophileren Eigenschaften möglicherweise eingeschränkt oder sogar verhindert wird, wurde der intrazelluläre Signalmolekül-Gehalt analysiert. Nach Extraktion der Signalmoleküle aus Zellsedimenten, die in der Stationärphase geerntet wurden, erfolgte die Analyse mittels LC-MS/MS. Der große Vorteil der MS-Analyse liegt darin, dass auch die geöffneten und dadurch inaktivierten Signalmoleküle nachgewiesen werden können. Die zuvor eingesetzten AHL-Nachweismethoden ließen nur den Nachweis aktiver AHLs zu, so dass eine geringe Abnahme der aktiven Moleküle nicht detektiert werden konnte. Mittels LC-MS/MS kann jedoch auch eine Zunahme der Degradationsprodukte ermittelt werden.

Eine absolute Quantifizierung der intakten bzw. geöffneten Signalmoleküle in den verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen war auch mit dieser Methode nicht möglich, jedoch konnte das Verhältnis des geöffneten zum intakten 3-oxo-C12-HSL in jeder Probe bestimmt werden. Über die anderen untersuchten AHLs (C4-HSL und 3-oxo-C6-HSL) können bisher noch keine Aussagen getroffen werden, da diese nicht eindeutig identifiziert werden konnten.

Die Ergebnisse belegen, dass im Zellsediment des Wildtyps vergleichbare Mengen des geöffneten und des intakten 3-oxo-C12-HSL vorlagen. In der *halS*-Mutante war der Anteil der geöffneten Moleküle signifikant verringert. Die Überexpression des *halS*-Gens führte zu einem umgekehrten Verhältnis, in diesem Zellsediment überwogen die geöffneten Moleküle (Abb. 22, Tab. 10).

Diese Ergebnisse unterstützen die bisherige Annahme, dass HalS einen Einfluss auf AHL-Signalmoleküle ausübt, jedoch nur eine mäßige Degradation stattfindet. Durch die konstitutive *halS*-Expression wurde der Anteil geöffneter Moleküle erhöht, aber es lagen weiterhin intakte Signalmoleküle vor. Auch die Inaktivierung des *halS*-Gens bewirkte keine vollkommene Veränderung der AHL-Degradationsfähigkeit. Der ermittelte Anteil der geöffneten Moleküle war in diesem Stamm verringert, eine Degradation der Signalmoleküle wurde jedoch nicht vollständig verhindert.

4.3.2 *In vitro*-Analyse der AHL-Degradation durch HalS

Bei Eingriffen in die QS-Regulation von *P. aeruginosa in vivo* sind Ursache-Wirkungsbeziehungen nur sehr schwer zu interpretieren, denn schon leichte Veränderungen der Bedingungen führen aufgrund der Komplexität der QS-Regulation zu diversen phänotypischen Veränderungen. Der Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Expression QS-regulierter Gene wurde von Wagner *et al.* (2003) mit Hilfe von Microarray-Analysen untersucht. Detaillierte Analysen der Expression der QS-Regulatoren *lasR*, *lasI*, *rhlR* und *rhlI* belegen große Unterschiede der absoluten mRNA-Transkriptmenge bei verschiedenen Kulturmedien sowie Sauerstoffbedingungen. Für *rhlR* wurde ein Unterschied in der Transkriptmenge von bis zu 75 % nachgewiesen, die *lasI*-Expression wurde durch Wachstum in Vollmedium um 50 % gesenkt. Diese durch veränderte Umweltbedingungen ausgelösten starken Abweichungen der Transkription der QS-Regulatoren üben einen gravierenden Einfluss auf die Expression der QS-abhängigen Gene aus. Bei der Betrachtung QS-regulierter Prozesse muss daher immer berücksichtigt werden, dass es sich bei QS um komplexe Regulations-Netzwerke handelt, die durch eine Vielzahl (auch bisher unbekannter) Stimuli beeinflusst werden und andere äußere Bedingungen abweichende Effekte bewirken können.

Auch die Beeinflussung eines Mitgliedes der QS-Kaskade kann globale Auswirkungen haben. Die Studie von Beatson *et al.* (2002) beschäftigte sich mit den Folgen der Inaktivierung eines QS-Regulators. Es wurde nachgewiesen, dass *lasI*- bzw. *rhlI*-Mutanten häufig Sekundärmutationen in anderen regulatorischen Genen aufweisen. Aufmerksam wurden die Autoren durch das gehäufte Auftreten *twitching motility*-defekter Varianten nach einigen Subkultivierungen von *lasI*- bzw. *rhlI*-Mutanten. Diese Defekte konnten auf Deletionen im *vfr*-Gen zurückgeführt werden, welches für einen globalen Transkriptionsregulator kodiert (vgl. Abb. 3). Vermutet wurde, dass Mutationen in QS-Systemen regulatorischen und physiologischen Stress verursachen, so dass ein Selektionsdruck auf die Entstehung kompensierender Sekundärmutationen ausgeübt wird. Solche Sekundärmutationen in regulatorischen Genen könnten für die zum Teil widersprüchliche Literatur bezüglich QS-regulierter Phänotypen verantwortlich sein (Beatson *et al.*, 2002).

AHL-Degradation durch gereinigtes HalS-Protein

Um die weitreichenden phänotypischen Auswirkungen einer QS-Beeinflussung zu umgehen, wurde der Einfluss des gereinigten HalS-Proteins auf die Signalmoleküle von *P. aeruginosa* untersucht. Um große Mengen des HalS-Proteins aufzureinigen zu können, wurde das *halS*-Gen

unter der Kontrolle des starken T7-Promotors überexprimiert. Zunächst wurde das *halS*-Gen in das Expressionsplasmid pET22b kloniert und in den heterologen Wirt *E. coli* BL21 (DE3) eingebracht. SDS-PAGE-Analysen zeigten hohe Ausbeuten an überexprimiertem Protein, jedoch lag dieses in Form von unlöslichen Proteinaggregaten (*inclusion bodies*) vor. Für eine starke Überexpression im homologen Wirt *P. aeruginosa* wurde das *halS*-Gen in das Plasmid pBR22b kloniert und in den Stamm PABST7.1 mit chromosomal integrierter T7-RNA-Polymerase eingebracht. Auch hier konnten schon 2 h nach Induktion mit IPTG starke Proteinbanden mittels SDS-PAGE-Analysen nachgewiesen werden. Die Überexpression resultierte jedoch ebenfalls in unlöslichen Proteinaggregaten. Die gleiche Beobachtung wurde auch von Park *et al.* (2003) gemacht. Zur Produktion des AHL-Lactonase-homologen Proteins AhlD aus *Arthrobacter* wurde das *ahlD*-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors in *E. coli* überexprimiert, der Großteil des Proteins bildete jedoch *inclusion bodies*.

In einem weiteren Ansatz wurde das HalS-Protein mit dem Affinitäts-tag LecB fusioniert (Bartels, 2004). Das Lectin LecB aus *P. aeruginosa* hat eine intrinsische Affinität zu D-Mannose, so dass das Fusionsprotein affinitätschromatographisch aufgereinigt werden kann (Tielker, 2005). Die Überexpression erfolgte unter der Kontrolle des T7-Promotors im heterologen Wirt *E. coli* BL21 (DE3). Auch die Überexpression als rekombinantes HalS_{LecB}-Fusionsprotein resultierte jedoch in der Bildung unlöslicher Proteinaggregate, die auch durch Senkung der Kultivierungstemperatur auf 30°C nicht verhindert werden konnte. Daher wurden die *inclusion bodies* einem Denaturierungs-/Renaturierungsverfahren unterzogen. Nach der Denaturierung durch Harnstoff wurde der Gesamtzellextrakt in einen Standard-Renaturierungspuffer (Dekker *et al.*, 1995) aufgenommen, dem aufgrund der Existenz des Zink-Bindemotivs in der HalS-Sequenz Zink zugesetzt wurde. Nach der affinitätschromatographischen Reinigung wurde das HalS_{LecB}-Fusionsprotein mit verschiedenen synthetischen AHL-Signalmolekülen inkubiert. Eingesetzt wurden Signalmoleküle, die auch von *P. aeruginosa* produziert werden: das kurzkettige, unsubstituierte C4-HSL, das langkettige 3-oxo-C12-HSL und das 3-oxo-C6-HSL. Da neben der Substratspezifität von HalS auch nicht bekannt ist, unter welchen Bedingungen das Protein aktiv ist, wurden unterschiedliche Temperaturen (RT, 30°C, 37°C) und Inkubationszeiten (30 min, 4 h, 24 h) gewählt. Der Nachweis der Signalmoleküle erfolgte anschließend mit Hilfe der Sensorstämme *A. tumefaciens* und *C. violaceum*, die nur auf intakte AHL-Signalmoleküle reagieren. Die Spots, die die Signalmoleküle nach Inkubation mit HalS_{LecB} hervorriefen, wurden jeweils mit denen des Kontrollansatzes ohne Enzymzugabe verglichen. Bei keinem der drei Signalmoleküle war eine signifikante Ab-

nahme des Spots nach HalS-Einwirkung gegenüber der Pufferkontrolle erkennbar, eine Degradation dieser Signalmoleküle durch das HalS_{LecB}-Fusionsprotein konnte nicht nachgewiesen werden (ohne Abb.).

Das Fehlen nachweisbarer AHL-Lactonase-Aktivität des HalS_{LecB}-Fusionsproteins kann verschiedene Ursachen haben. Denkbar ist z. B. eine Inaktivierung von HalS durch die C-terminale Fusion mit LecB. Für einige Enzyme wurde gezeigt, dass ihre Aktivität nicht durch den LecB-tag beeinträchtigt wird (Tielker, 2005), jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der C-Terminus von HalS zugänglich bleiben muss, um z. B. die korrekte Faltung des Proteins nicht zu behindern. Bei der AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus* wurden N-terminale Fusionen verwendet, ohne die Enzymaktivität zu beeinträchtigen (Dong *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Eine N-terminale Fusion mit LecB ist jedoch nicht möglich, da dies die Zuckerbindung des Lectins und somit die Proteinreinigung verhindern würde.

Des Weiteren ist nicht sichergestellt, dass die *in vitro*-Denaturierung/Renaturierung tatsächlich aktives HalS_{LecB}-Protein liefert. Es wurde ein Standard-Renaturierungspuffer verwendet, dem aufgrund der vermuteten Zink-Abhängigkeit von HalS lediglich Zink zugesetzt wurde, ohne jedoch weitere Optimierungen vorzunehmen. Für den Lectin-Anteil kann jedoch von einer Renaturierung ausgegangen werden, da die Funktionalität des Lectins durch die erfolgreiche Reinigung des Fusionsproteins nachgewiesen wurde.

Um den Denaturierungs-/Renaturierungsschritt zu umgehen, wurde zusätzlich das in sehr geringen Mengen in der löslichen Fraktion der Überexpressionskultur vorkommende HalS_{LecB}-Fusionsprotein in AHL-Degradationstests eingesetzt. Eine Inkubation mit synthetischem 3-oxo-C12-HSL, dem vorherrschenden Signalmolekül von *P. aeruginosa* (Pearson *et al.*, 1999), ergab jedoch ebenfalls keine Reduktion der Signalmolekül-Aktivität verglichen mit dem Kontrollansatz ohne Enzymzugabe.

Neben der Modifizierung des HalS-Proteins als rekombinantes Fusionsprotein muss berücksichtigt werden, dass die Überexpression im heterologen Wirt *E. coli* durchgeführt wurde. Es muss in Betracht gezogen werden, dass eine heterologe Expression von HalS nicht möglich ist, da für die Aktivität von HalS akzessorische Faktoren benötigt werden, die bei einer Überexpression in *E. coli* fehlen. In Frage kommen dabei z. B. spezifische Faltungshelfer (Chaperone), ohne die das HalS-Protein nicht seine aktive Konformation erhält. Spezifische Faltungshelfer sind bei *P. aeruginosa* auch eine Voraussetzung für die Produktion aktiver Lipase (Rosenau & Jaeger, 2000). In dem Fall sind das Enzym und dessen spezifisches Chaperon

bereits in einem bicistronischen Operon kodiert, die Faltung der Lipase erfolgt jedoch erst nach der Sekretion über die innere Membran im Periplasma (Rosenau & Jaeger, 2000).

Die Notwendigkeit eines spezifischen Chaperons für eine korrekte Faltung von HalS würde nicht nur die fehlende Aktivität des in *E. coli* produzierten Proteins erklären, sondern auch die Bildung von *inclusion bodies* durch eine P_{T7}-kontrollierte Überexpression im homologen Wirt *P. aeruginosa*. Durch die sehr starke Überproduktion des HalS-Proteins ohne gleichzeitige Überproduktion des Chaperons wären nicht genügend Faltungshelfer verfügbar, um eine korrekte Faltung von HalS zu gewährleisten.

Für die AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus* ist bekannt, dass sie nach heterologer Überexpression aktiv ist. Sowohl nach Expression in *E. coli* und *P. aeruginosa* als auch in Pflanzen wurde die AHL-degradierende Aktivität bzw. eine Reduktion der bakteriellen Virulenz nachgewiesen (Dong *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2001; Reimann *et al.*, 2002).

Für die Notwendigkeit akzessorischer Faktoren für die Aktivität von HalS gibt es mehrere Anzeichen. Kein Experiment, in dem das *halS*-Gen im heterologen Wirt *E. coli* exprimiert wurde, lieferte Hinweise auf eine AHL-Degradation. In *E. coli* wurden sowohl die P_{T7}-kontrollierte *halS*-Überexpression zur Reinigung des HalS_{LecB}-Fusionsproteins, aber auch P_{lac}-kontrollierte Überexpressionen durchgeführt. Letztere Überexpressionskulturen wurden analog zu den *P. aeruginosa*-Überexpressionskulturen in verschiedenen Experimenten eingesetzt. Im Gegensatz zu den homologen Überexpressionskulturen bewirkten die *E. coli*-Kulturen weder eine Verminderung der Virulenz von *Erwinia carotovora* gegenüber Kartoffeln (3.9.5) noch eine *in vitro*-Degradation synthetischer Signalmoleküle (3.9.3).

Für eine Beteiligung weiterer Faktoren an der HalS-Aktivität könnte auch die Organisation des *halS*-Gens in einem Operon sprechen, deren mögliche Bedeutung in Kapitel 4.4 diskutiert wird.

AHL-Degradation durch Gesamtzellextrakte von *P. aeruginosa*

Hinweise auf eine Degradation von Signalmolekülen durch HalS wurden durch *in vivo*-Analysen QS-abhängiger Phänotypen erhalten. Besonders auffällige Effekte ergaben sich bei der P_{lac}-kontrollierten konstitutiven Überexpression des *halS*-Gens. Unter den gleichen Bedingungen sollten daher auch *in vitro*-Analysen zur AHL-Degradation stattfinden. Der Wildtyp-Stamm, die *halS*-Mutante, die P_{lac}-kontrollierte *halS*-Überexpression und die entsprechende Leervektorkontrolle wurden dazu bis zur Stationärphase kultiviert. Da die HalS-Aminosäuresequenz keine Hinweise auf einen Export dieses Proteins liefert und für AiiA sowie weitere

AHL-Lactonasen eine intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen wurde (Dong *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003), wurden Gesamtzellextrakte der *P. aeruginosa*-Stämme hergestellt.

Die Inkubation dieser Gesamtzellextrakte mit synthetischen AHLs ergab im Falle der kurzkettigen AHLs, die mit Hilfe des Sensorstammes *C. violaceum* nachgewiesen wurden (C4-HSL und 3-oxo-C6-HSL), keine Abnahme der AHL-Mengen. Wurden die 3-oxo-C6-HSL-Moleküle jedoch mit dem sensitiveren Stamm *A. tumefaciens* nachgewiesen, deuteten die kleineren Spots bei Verwendung des *halS*-Überexpressionsstammes auf eine geringfügige Abnahme der 3-oxo-C6-HSL-Aktivität hin (Abb. 21.B). Die deutlichste Abnahme der AHL-Aktivität nach Inkubation mit dem Gesamtzellextrakt des *HalS*-Überproduktionsstammes erfolgte bei Verwendung des langkettigen 3-oxo-C12-HSL (Abb. 21.A). Das Ausmaß der AHL-Degradation variierte jedoch zwischen den einzelnen Versuchen. Zurückzuführen ist die unterschiedlich starke Beeinflussung der AHL-Moleküle durch *HalS* möglicherweise darauf, dass für die Aktivierung von *HalS* verschiedene, bisher unbekannte, Bedingungen erfüllt sein müssen. Für die Aktivierung einiger QS-regulierter Gene wurde beschrieben, dass nur das Erreichen einer bestimmten Zelldichte nicht ausreicht, sondern verschiedene weitere Parameter entscheidend sind (Yarwood *et al.*, 2005). Identifiziert wurden in diesem Zusammenhang z. B. hohe Eisen- und Sauerstoffgehalte, die trotz einer genügend hohen Zelldichte die Aktivierung QS-abhängiger Gene verzögern (Kim *et al.*, 2005). Schon sehr leichte, unter normalen Laborbedingungen auftretende, Abweichungen der Kulturbedingungen könnten auch zu einer Beeinflussung der Parameter führen, die für die *HalS*-Aktivität notwendig sind.

Bei der Analyse von AHL-Signalmolekülen ist außerdem der herrschende pH-Wert von besonderer Bedeutung. Byers *et al.* (2002) und Yates *et al.* (2002) berichteten von einer nicht-enzymatischen Hydrolyse der AHL-Signalmoleküle unter basischen Bedingungen. Es wurde nachgewiesen, dass eine Erhöhung des pH-Wertes oder der Temperatur die Hydrolyse der AHLs verstärkt. Die *in vitro*-Degradationstests mit *HalS* wurden durch Verwendung von Phosphatpuffer in neutralem Milieu durchgeführt. Der Nachweis der verbliebenen AHL-Moleküle erfolgte durch Überschichten der AHL-Proben mit Sensorbakterien in Weichagar. Durch Bebrütung dieser Indikatorplatten könnte es, bedingt durch den Wuchs der Sensorbakterien, zu einer Erhöhung des pH-Wertes kommen. Sollte ein basisches Milieu erreicht werden, könnte eine nicht-enzymatische AHL-Degradation, die je nach erreichtem pH-Wert unterschiedlich stark ausfällt, die Ergebnisse beeinträchtigen.

Dennoch weisen die *in vitro*-Degradationsexperimente auf eine unterschiedliche Substratspezifität von HalS hin. Auch bei Betrachtung des Substratspektrums von AiiA und anderen AHL-Lactonasen zeigen sich Unterschiede. AiiA hat zwar ein weites Substratspektrum, jedoch werden unsubstituierte AHLs effizienter degradiert als 3-oxo-Derivate, und AHLs mit nur vier C-Atomen in der Acyl-Seitenkette werden mit der geringsten Effizienz abgebaut (Wang *et al.*, 2004). Demgegenüber werden durch die AHL-Lactonase AhlD aus *Arthrobacter spec.* 3-oxo-Derivate effizienter umgesetzt als unsubstituierte AHLs (Park *et al.*, 2003).

Die bei HalS beobachtete höhere Spezifität für langkettige AHLs wurde auch für eine AHL-Acylase aus *P. aeruginosa* beschrieben (Huang *et al.*, 2003). AHL-Acylasen hydrolysieren die Amidbindung von AHLs, so dass die Fettsäure-Seitenkette vom Homoserinlactonring abgespalten wird. Bei *P. aeruginosa* PAO1 wurde diese AHL-Acylase-Aktivität auf das *pvdQ*-Gen zurückgeführt, dessen konstitutive Expression eine Akkumulation von 3-oxo-C12-HSL verhindert. Auch bei Expression in *E. coli* wurde die Degradation ausschließlich langkettiger AHLs nachgewiesen (Huang *et al.*, 2003). Die spezifische Degradation der langkettigen Signalmoleküle von *P. aeruginosa* könnte eine regulatorische Funktion erfüllen. Durch Änderung des Verhältnisses zwischen kurz- und langkettigen Signalmolekülen kann eine Feinabstimmung der QS-Regulation erfolgen (Huang *et al.*, 2003; Roche *et al.*, 2004). Huang *et al.* (2003) postulierten außerdem die Existenz weiterer AHL-degradierender Enzyme in *P. aeruginosa*, denn auch eine *pvdQ*-Deletionsmutante zeigte einen Abbau von AHLs und eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte 3-oxo-C12-HSL-Akkumulation.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit HalS gemacht. Der Vergleich der AHL-Aktivität nach Inkubation synthetischer AHLs mit Gesamtzellextrakten der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme ergab nur bei der *halS*-Überexpression deutliche Veränderungen gegenüber der Kontrolle, bei der die AHLs in Puffer inkubiert wurden. Bei der *halS*-Mutante wurde, verglichen mit dem Wildtyp, der Leervektorkontrolle und der Pufferkontrolle, keine erhöhte AHL-Aktivität beobachtet, also keine verminderte AHL-Degradation. Eine physiologische AHL-Degradation durch den Wildtyp bzw. die Leervektorkontrolle wurde demnach nicht ermittelt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass HalS für eine volle Aktivierung andere Bedingungen benötigt, seien es die Kultivierungsbedingungen (das Medium, der Zinkgehalt, die Temperatur usw.) oder die Bedingungen, unter denen die *in vitro*-Degradationstests durchgeführt wurden (pH, Temperatur, Konzentration der Substrate usw.). Möglicherweise werden aber auch andere, hier nicht getestete AHLs mit höherer Effizienz von HalS degradiert.

4.4 Regulation der *halS*-Expression

Als putative AHL-Lactonase in einem AHL-produzierenden Stamm wurde für HalS ein striktes Regulationssystem vermutet. Bisher wurden nur PvdQ von *P. aeruginosa* (Huang *et al.*, 2003) sowie AiiB und AttM von *A. tumefaciens* (Carlier *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002a) als AHL-degradierende Enzyme bei AHL-produzierenden Bakterien beschrieben. Für das *pvdQ*-Gen wurde eine QS- aber auch Eisen-abhängige Regulation nachgewiesen (Huang *et al.*, 2003; Whiteley *et al.*, 1999), bei *A. tumefaciens* wurde von einem aus mehreren Komponenten bestehenden „QS-Signal-turnover-System“ berichtet (Zhang *et al.*, 2002a).

Um die transkriptionale Regulation des *halS*-Gens zu untersuchen, wurde zunächst eine episomale Reportergenfusion konstruiert, indem die 420 bp stromaufwärts des *halS*-Gens mit dem promotorlosen *lacZ*-Gen fusioniert wurden. Die Expressionsstudien ergaben stetig ansteigende Transkriptionsraten mit den höchsten Werten in der stationären Wachstumsphase (Abb. 24). Eine Regulation der *halS*-Transkription über QS wurde ausgeschlossen, indem die Expressionsstudien ebenfalls in einer QS-Mutante durchgeführt wurden, die keine AHL-Signalmoleküle synthetisiert. Das Fehlen der beiden Signalmoleküle hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die *halS*-Promotoraktivität (Abb. 24).

Die Untersuchungen mit der episomalen *halS::lacZ*-Fusion belegten ferner die Existenz eines Transkriptionsstarts in dem für die Reportergenfusion ausgewählten DNA-Bereich direkt stromaufwärts von *halS*.

Jedoch wurde für das *halS*-Gen die Organisation in einem Operon nachgewiesen. Stromaufwärts von *halS*, nur durch kurze intergenische Regionen voneinander getrennt, befinden sich die offenen Leserahmen PA1416 und PA1417 (Abb. 25.A), deren Funktion bisher unbekannt ist. Durch Isolierung der RNA und Herstellung der spezifischen cDNA, ausgehend von *halS*, wurde mittels PCR ein gemeinsames Transkript für *halS* mit diesen beiden offenen Leserahmen nachgewiesen (Abb. 26.B). Demzufolge unterliegt das *halS*-Gen nicht nur der Kontrolle eines direkt stromaufwärts liegenden Promotors, sondern zusätzlich eines weiter stromaufwärts liegenden, mindestens drei Gene kontrollierenden, Promotors. Das *halS*-Gen ist das letzte Gen in diesem Operon, der darauf folgende offene Leserahmen wird in entgegengesetzter Richtung transkribiert.

Um den Einfluss beider Promotoren auf die *halS*-Transkription erfassen zu können, sollte eine chromosomale *lacZ*-Fusion konstruiert werden. Für dieses Konstrukt wurde ein 709 bp großes DNA-Fragment des kodierenden Bereiches von *halS* (+1 bis +709 relativ zum Translationsstartpunkt) mit dem promotorlosen *lacZ*-Gen fusioniert und in den Suizidvektor pSUP202 inseriert. Diese Reportergenfusion sollte durch homologe Rekombination (*single crossover*)

in das *halS*-Gen von *P. aeruginosa* PAO1 chromosomal integriert werden. Trotz mehrfacher Versuche konnte der entsprechende Stamm bisher nicht konstruiert werden, daher können derzeit keine abschließenden Aussagen über die transkriptionelle Regulation des *halS*-Gens und dessen Abhängigkeit von verschiedenen Parametern getroffen werden.

Die Organisation des AHL-Lactonase-kodierenden Gens in einem Operon findet sich auch bei *A. tumefaciens*. Beim Vergleich mit dem *halS*-Operon fallen einige Ähnlichkeiten auf (Abb. 28). Das entsprechende Operon bei *A. tumefaciens* besteht ebenfalls aus drei Genen und das *attM*-Gen, welches für die AHL-Lactonase kodiert, ist ebenfalls das letzte Gen in diesem Operon (Zhang *et al.*, 2002a). Die beiden stromaufwärts liegenden Gene, *attK* und *attL*, weisen Homologien zu Genen für die Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase bzw. Alkoholdehydrogenase von *E. coli* auf (Zhang *et al.*, 2002a). Für das *att*-Gencluster, welches aus insgesamt 33 Genen besteht, wurde zuvor eine Beteiligung an der Anheftung der *A. tumefaciens*-Zellen an Pflanzenzellen beschrieben (Matthysse *et al.*, 2000). Die Bedeutung von AttK und AttL für die AHL-Lactonase-Aktivität von AttM ist bislang unbekannt.

Auch die Funktion der beiden offenen Leserahmen PA1416 und PA1417 von *P. aeruginosa* für die HalS-Aktivität ist unbekannt. ORF PA1416 weist Homologien zu Oxidoreduktasen und FAD/FMN-abhängigen Dehydrogenasen auf, ORF PA1417 ist eine putative Decarboxylase und weist Ähnlichkeiten zur Acetolactat-Synthase von *E. coli* auf. Signifikante Homologien zu den Genen *attL* und *attK* von *A. tumefaciens* wurden nicht nachgewiesen.

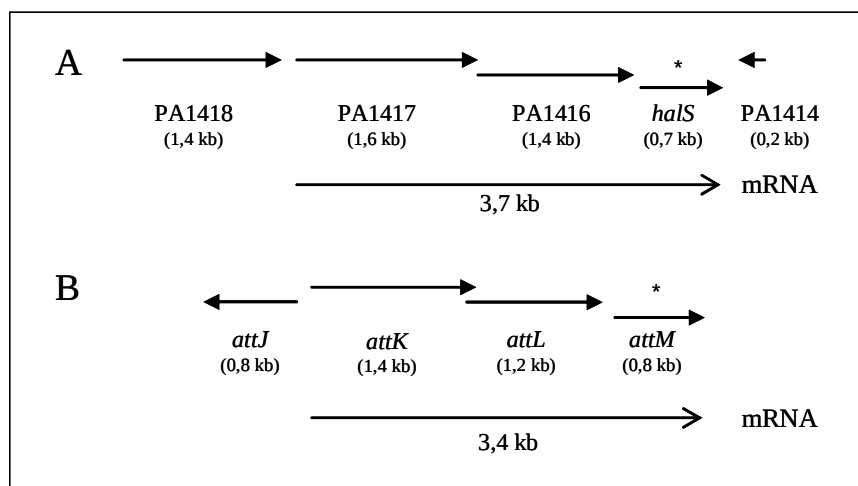


Abb. 28: Vergleich der Operonstrukturen von *halS* (PA1415) aus *P. aeruginosa* (A) und der AHL-Lactonase *attM* aus *A. tumefaciens* (B). Die Gene sowie das Transkript des jeweiligen Operons (mRNA) wurden proportional zu ihrer Länge dargestellt. Die Bezeichnungen der offenen Leserahmen von *P. aeruginosa* entsprechen den Angaben in der *Pseudomonas*-Datenbank, *halS* und *attM* sind durch Sternchen hervorgehoben.

Das *attK-attL-attM*-Operon bei *A. tumefaciens* wird von dem negativen Transkriptionsfaktor AttJ reguliert, welcher zur IclR-Familie gehört (Zhang *et al.*, 2002a). Das entsprechende Gen befindet sich direkt stromaufwärts dieses Operons und wird in entgegengesetzter Richtung transkribiert. Die Autoren zeigten, dass AttJ an den Promotor des *attK-attL-attM*-Operons bindet und dessen Expression reprimiert. Erst beim Übergang in die Stationärphase wird das Operon exprimiert und dadurch die AHL-Degradation veranlasst. Da *attJ* in allen Wachstumsphasen konstitutiv exprimiert wird, müssen weitere, bislang unbekannte, Faktoren an der Kontrolle der *attM*-Expression während der Stationärphase beteiligt sein.

Die Identifizierung dieses Wachstumsphasen-abhängigen QS-Signal-*turnover*-Systems liefert eine Erklärung für die Beobachtung, dass der QS-abhängige konjugative Ti-Plasmid-Transfer bei *A. tumefaciens* beim Übergang in die Stationärphase stoppt. Dieses System reguliert somit das Verlassen des QS-aktivierten Zustandes (Zhang *et al.*, 2002a).

Ähnliche QS-Signal-*turnover*-Systeme existieren möglicherweise auch bei anderen Bakterien. Eine Akkumulation der AHL-Signalmoleküle während der exponentiellen Wachstumsphase und eine Abnahme der AHL-Konzentration in der Stationärphase wurden auch bei *E. carotovora* (Byers *et al.*, 2002), *P. aeruginosa* und *Y. pseudotuberculosis* (Yates *et al.*, 2002) nachgewiesen. Allerdings führten die Autoren diese auf eine nicht-enzymatische, pH-abhängige Hydrolyse der AHL-Moleküle zurück.

4.5 Die physiologische Funktion AHL-degradierender Enzyme

Es ist bislang nicht eindeutig geklärt, welche natürliche Funktion AHL-degradierende Enzyme haben und ob AHLs tatsächlich die natürlichen Substrate dieser Enzyme darstellen. Roche *et al.* (2004) betonten, dass Zink-Metallohydrolasen, zu denen die AHL-Lactonasen zählen, diverse Enzymaktivitäten aufweisen und, dass es kaum möglich ist, einem Enzym eine spezifische Funktion zuzuweisen, weil es ein bestimmtes Substrat spalten kann. So wurde für PvdQ aus *P. aeruginosa* berichtet, dass es sich um eine AHL-degradierende Acylase handelt (Huang *et al.*, 2003), jedoch hat dieses Enzym zudem eine spezifische Funktion bei der Pyoverdininbiosynthese (Lamont & Martin, 2003).

Auch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der AHL-Lactonase AiiA aus *Bacillus* warf einige Fragen bezüglich der natürlichen Substrate auf. Das aktive Zentrum dieser AHL-Lactonase bildet einen Hohlraum, der sich in zwei tief in das Enzym hineinragende Äste verzweigt (Liu *et al.*, 2005). Dieser Hohlraum kann durch die Bindung von AHL-Molekülen

jedoch nicht ausgefüllt werden. Die Existenz eines zweigeteilten Hohlraumes könnte jedoch darin begründet sein, dass AHLs mit unterschiedlich langen Seitenketten und unterschiedlichen Substitutionen an Position C3 verschiedene Stellen des Hohlraumes besetzen. Als weitere Möglichkeit führten die Autoren an, dass AHL-Lactonasen nicht für AHL-Substrate optimiert sind, sondern alternative Substrate existieren, die den verzweigten Hohlraum vollständig ausfüllen. Dennoch kann die Strukturaufklärung der AHL-Lactonase dazu beitragen, den Mechanismus der AHL-Degradation zu verstehen und effektivere Enzyme zu entwickeln, um die QS-Systeme pathogener Bakterien zu stören (Liu *et al.*, 2005).

AHL-Lactonasen und AHL-Acylasen wurden in sehr verschiedenen Bakterienspezies identifiziert, so dass eine weite Verbreitung AHL-degradierender Enzyme angenommen wird (Dong & Zhang, 2005). Die ersten AHL-degradierenden Enzyme wurden bei Stämmen identifiziert, die selbst keine AHL-Moleküle produzieren. Dazu gehören sowohl Stämme, die AHLs lediglich degradieren, wie z. B. *Bacillus spec.* 240B1 (Dong *et al.*, 2001), aber auch solche, die AHLs als Energiequelle nutzen, wie z. B. *Variovorax paradoxus* (Leadbetter & Greenberg, 2000). Da QS weit verbreitet ist, befinden sich AHL-Moleküle in den verschiedensten Umgebungen. Der evolutive Ursprung AHL-degradierender Enzyme könnte somit die Nutzung dieser Moleküle als Nährstoffe sein (Roche *et al.*, 2004).

Die physiologische Funktion AHL-degradierender Enzyme könnte jedoch auch darin bestehen, QS-Systeme anderer Bakterien zu stören, um der eigenen Spezies einen kompetitiven Vorteil zu verschaffen. Als Beispiel kann die QS-regulierte Antibiotikaproduktion von *Erwinia carotovora* betrachtet werden, die den Wuchs konkurrierender Bakterien in derselben Nische hemmt (Bainton *et al.*, 1992). Durch Degradation der entsprechenden AHL-Signalmoleküle könnten diese Bakterien die schädigende Antibiotikaproduktion verhindern (Roche *et al.*, 2004).

Um eine mögliche Funktion des HalS-Proteins bei der Degradation artfremder AHL-Signalmoleküle zu überprüfen, wurde dessen Einfluss auf die Pathogenität von *E. carotovora* untersucht. Die Pathogenität gegenüber Pflanzen wird bei *E. carotovora* durch eine QS-abhängige Exoenzym-Produktion verursacht (Pirhonen *et al.*, 1993). Der Einfluss des HalS-Proteins auf Signalmoleküle von *E. carotovora* (3-oxo-C6-HSL) wurde untersucht, indem die verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme zusammen mit *E. carotovora*-Kulturen auf Kartoffelscheiben aufgetragen und die Fäulnissymptome verglichen wurden. Dabei führte die HalS-Überproduktion zu einer Abschwächung der Pathogenität von *E. carotovora* (Abb. 23).

Wie bereits bei der Degradation synthetischer Signalmoleküle durch *P. aeruginosa*-Gesamtzellextrakte beschrieben (Kap. 3.9.3), wurde auch ein unterschiedlich starker Einfluss der HalS-Überproduktion auf die *E. carotovora*-Signalmoleküle beobachtet. So führte die *halS*-Überexpression in einigen Experimenten zu einer vollständigen Inhibierung der Fäulnis, in anderen jedoch nur zu einer leichten Abschwächung (Abb. 23.A und B). Mögliche Gründe für eine unterschiedliche Aktivität von HalS, wie z. B. die Notwendigkeit akzessorischer Faktoren oder spezieller Kulturbedingungen, wurden bereits in Kapitel 4.3.2 diskutiert.

4.5.1 Beurteilung der Funktion des HalS-Proteins von *P. aeruginosa*

Bei AHL-produzierenden Bakterien können AHL-degradierende Enzyme zusätzlich eine regulatorische Funktion ausüben: durch den Abbau der eigenen Signalmoleküle könnten sie für eine Verzögerung der QS-Induktion sowie für das Verlassen des QS-aktivierten Zustandes verantwortlich sein. Bei *P. aeruginosa* ergibt sich durch die Existenz von zwei QS-Systemen, die über verschiedene AHL-Signalmoleküle reguliert werden, noch die Funktion der Feinabstimmung zwischen diesen beiden Systemen.

P. aeruginosa zeichnet sich durch eine extrem hohe Anpassungsfähigkeit aus. Die vollständige Sequenzierung des Genoms belegt die Existenz einer Vielzahl von Transkriptionsregulatoren und Zwei-Komponenten-Systemen, die es dem Organismus ermöglichen, auf verschiedenste Umwelteinflüsse zu reagieren (Stover *et al.*, 2000). Auch die Produktion eines kurzkettigen (C4-HSL) und eines langkettigen (3-oxo-C12-HSL) Signalmoleküls erhöht die Adaptionfähigkeit dieses pathogenen Bakteriums. Im Gegensatz zu *Yersinia pseudotuberculosis*, welches AHLs mit sechs und acht C-Atomen in der Acyl-Seitenkette produziert, kann *P. aeruginosa* unter günstigen Bedingungen nahezu jedes menschliche Gewebe infizieren (Yates *et al.*, 2002). Die Autoren wiesen eine nicht-enzymatische Hydrolyse von AHL-Signalmolekülen unter basischen Bedingungen nach, die umso stärker ist, je kürzer die Acyl-Seitenkette und je höher der pH-Wert und die Temperatur. Folglich sind langkettige AHLs stabiler, jedoch weisen sie aufgrund ihrer hydrophoberen Eigenschaften eine verminderte Diffusion auf. Zudem könnten diese Moleküle in Gewebszellmembranen inserieren und somit den Bakterienzellen praktisch verloren gehen (Yates *et al.*, 2002). Bei Menschen können pH-Werte über 8, welche zu einer deutlichen AHL-Degradation führen könnten, in Tränen, Urin und Galle vorgefunden werden. Demgegenüber können pH-Werte unter 5, welche AHLs stabilisieren würden, in Urin und Magensaft auftreten (Yates *et al.*, 2002). Somit erhalten die verschiedenen Signalmoleküle unter veränderten Bedingungen eine andere

Bedeutung. Zudem berichteten Singh *et al.* (2000) von einem höheren C4-HSL-Gehalt unter Biofilmbedingungen, während in planktonischen Kulturen das 3-oxo-C12-HSL überwiegt. Das Verhältnis dieser beiden Signalmoleküle zueinander könnte durch die AHL-degradierende Aktivität des HalS-Proteins beeinflusst werden. Über diese regulatorische Funktion in der QS-Kaskade würden diverse QS-abhängige Prozesse beeinflusst. Das Verhältnis der beiden Signalmoleküle zueinander ist unter anderem entscheidend für die Produktion des PQS (McGrath *et al.*, 2004). Dieses Signalmolekül beeinflusst wiederum die Expression verschiedener Rhl-abhängiger Gene (Diggle *et al.*, 2003). Eine höhere Konzentration des 3-oxo-C12-HSL kann außerdem die Induktion des Rhl-Systems verzögern. Zum einen wurde im heterologen Wirt *E. coli* beobachtet, dass dieses Signalmolekül mit C4-HSL um die Bindung an dessen zugehöriges RhlR-Protein konkurriert (Pesci *et al.*, 1997). Zum anderen bewirkt das 3-oxo-C12-HSL die Dissoziation von RhlR-Dimeren (Ventre *et al.*, 2003). Wie auch für andere LuxR-homologe Proteine beschrieben, erfolgt die Bindung dieses Transkriptionsregulators an die DNA als Homodimer. Während das LasR-Protein von *P. aeruginosa* und das TraR-Protein von *A. tumefaciens* erst durch die Bindung der entsprechenden AHL-Moleküle dimerisieren (Kiratisin *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2000), liegt RhlR bereits als Dimer vor und wird durch die C4-HSL-Bindung, welche vermutlich eine Konformationsänderung auslöst, aktiviert (Ventre *et al.*, 2003). Ist die 3-oxo-C12-HSL-Konzentration in der Zelle höher als die C4-HSL-Konzentration, liefert die Dissoziation der RhlR-Dimere eine weitere Möglichkeit, die Expression Rhl-abhängiger Gene zu verzögern. Eine Feinabstimmung der QS-Systeme durch ein verändertes Verhältnis der beiden AHLs kann zudem durch das dritte LuxR-homologe Protein von *P. aeruginosa*, QscR („quorum sensing controlled repressor“), erfolgen. Für QscR wurde keine zugehörige LuxI-homologe AHL-Synthase nachgewiesen, sondern die Bindung der AHL-Moleküle 3-oxo-C12-HSL und C4-HSL, welche vom Las- bzw. vom Rhl-System synthetisiert werden (Ledgham *et al.*, 2003). Des Weiteren bildet QscR inaktive Heterodimere mit LasR und RhlR. Dadurch kann zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, wenn die Konzentration der AHL-Moleküle gering ist, eine Expression der QS-regulierten Gene verhindert werden. Durch steigende AHL-Konzentrationen verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der Bildung 3-oxo-C12-HSL-gebundener LasR-Homodimere und C4-HSL-gebundener RhlR-Homodimere, so dass beim Übergang in die Stationärphase eine kontrollierte Expression der Zielgene erfolgen kann. Die Repression QS-regulierter Gene durch QscR ist nach den Beobachtungen von Legham *et al.* (2003) folglich abhängig von den relativen Mengen der R-Proteine und den relativen Konzentrationen der verschiedenen AHLs, die zur selben Zeit in der Zelle vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das HalS-Protein diverse QS-regulierte Prozesse bei *P. aeruginosa* beeinflusst. Besonders interessant war dabei die Abschwächung verschiedener Virulenz-assoziiierter Phänotypen durch die Überproduktion des HalS-Proteins. Es wurde sowohl eine Verringerung des Gehaltes extrazellulärer Metabolite und Enzyme als auch eine Beeinträchtigung der Biofilmbildung erzielt.

Die physiologische Funktion des HalS-Proteins könnte in einer mäßigen, strikt regulierten AHL-Degradation liegen, die an der Feinabstimmung der beiden QS-Systeme oder dem Abstoppen der QS-Aktivierung beteiligt ist. Vermutlich ist HalS ein Mitglied eines komplexen AHL-Degradations-Systems, welches den Bakterienzellen eine Adaptierung bei sich ändernden Umweltbedingungen ermöglicht. So ist bei *P. aeruginosa* noch ein weiteres Enzym mit der Fähigkeit zur AHL-Degradation beschrieben worden, das AHL-Acylase-homologe Protein PvdQ (Huang *et al.*, 2003).

Da eine Aktivität nur im homologen Wirt zu beobachten war, scheinen akzessorische Faktoren für die HalS-Aktivität notwendig zu sein. Die Identifizierung dieser Faktoren ist von zentraler Bedeutung, um den Wirkungsmechanismus des HalS-Proteins eingehend zu untersuchen. Auch die Analyse der *halS*-Expression sollte Gegenstand künftiger Studien sein, um zu erfahren, unter welchen Bedingungen das *halS*-Gen exprimiert wird und wie dessen Regulation erfolgt. Von besonderem Interesse ist dabei die Aufklärung der Funktion der mit *halS* in einem Operon organisierten Gene.

Da die Zell-Zell-Kommunikation entscheidend zur Virulenz pathogener Bakterien beiträgt, ist die Störung der QS-Systeme von großem medizinischen Interesse und könnte als eine alternative antimikrobielle Therapie Anwendung finden. Insbesondere das QS-Netzwerk von *P. aeruginosa* ist Gegenstand intensiver Forschungen, um Strategien zu entwickeln, die durch eine Inhibierung der QS-Systeme die Virulenz dieses Bakteriums abschwächen. Auch der Einfluss des Proteins HalS auf dieses komplexe Netzwerk könnte als Ansatz zur Entwicklung alternativer Therapiemöglichkeiten gegen Infektionen mit *P. aeruginosa* dienen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die interzelluläre Kommunikation, das so genannte *Quorum-sensing* (QS), ermöglicht Bakterienzellen, ihre Populationsdichte wahrzunehmen und durch eine koordinierte Genexpression das Verhalten der gesamten Population zu synchronisieren. Bei Gram-negativen Bakterien erfolgt die Zell-Zell-Kommunikation über die Produktion, Akkumulation und Wahrnehmung von *N*-Acyl-L-Homoserinlactonen (AHLs). Das opportunistisch pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* reguliert verschiedenste physiologische Prozesse sowie die Expression einer Vielzahl von Virulenzfaktoren über ein komplexes QS-Netzwerk, welches aus zwei hierarchisch angeordneten QS-Systemen mit jeweils spezifischen AHL-Signalmolekülen besteht. Die Störung der Zell-Zell-Kommunikation ist daher von großem medizinischen Interesse. Eine Möglichkeit ist die enzymatische Degradation der AHL-Signalmoleküle durch AHL-Lactonasen, die zu Beginn dieser Arbeit nur bei dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus spec.* bekannt waren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde über Homologievergleiche die putative AHL-Lactonase HalS bei *P. aeruginosa* identifiziert und ein deutlicher Einfluss dieses Proteins auf QS-regulierte Phänotypen nachgewiesen. Zur funktionellen Untersuchung des HalS-Proteins wurden *halS*-defiziente und *halS*-überexprimierende *P. aeruginosa*-Stämme konstruiert. Die *halS*-Deletion führte zu einer erhöhten Produktion des zytotoxischen Pigments Pyocyanin und einer leicht erhöhten Phytopathogenität. Durch die *halS*-Überexpression wurde die Schwärmbewegung der Bakterien nahezu vollständig inhibiert und der extrazelluläre Gehalt des Bio-detergenzes Rhamnolipid reduziert. Zudem führte die *halS*-Überexpression zu einer verminderten proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand, welche auf eine reduzierte Menge aktiver Elastase LasB zurückgeführt werden konnte.

Des Weiteren wurde der Einfluss des HalS-Proteins auf die Biofilmbildung untersucht, welche bei der Ausbildung von Infektionen eine bedeutende Rolle spielt. Dazu wurden Biofilme unter statischen sowie dynamischen Bedingungen kultiviert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die Untersuchungen ergaben eine Beeinträchtigung der Biofilmbildung sowohl bei Inaktivierung als auch bei Überexpression des *halS*-Gens. In beiden Fällen wurden flache, undifferenzierte Biofilme gebildet.

Die beobachteten phänotypischen Auswirkungen deuteten darauf hin, dass die Inaktivierung des *halS*-Gens zu einer leicht verminderten AHL-Degradation führt, so dass QS-abhängige Prozesse verstärkt werden. Noch deutlichere Effekte wurden durch die *halS*-Überexpression ausgelöst. Die in diesem Fall erzielte Reduktion verschiedener QS-regulierter Prozesse wurde

auf eine erhöhte AHL-Degradation zurückgeführt. *In vitro*-Analysen zur AHL-Degradation ergaben eine Abschwächung der AHL-Aktivität durch überproduziertes HalS-Protein. Zudem konnte die QS-abhängige Pathogenität von *Erwinia carotovora* gegenüber Kartoffeln durch die HalS-Überproduktion vermindert werden.

Die Ergebnisse belegen, dass das HalS-Protein eine regulatorische Funktion im QS-Netzwerk ausübt. Das Zell-Zell-Kommunikationssystem von *P. aeruginosa* hat globale Auswirkungen und die Regulation erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Als ein AHL-degradierendes Enzym in einem AHL-produzierenden Organismus unterliegt auch HalS einer komplexen Regulation. Es wurde nachgewiesen, dass das *halS*-Gen in einem Operon organisiert ist und von zwei verschiedenen Promotoren kontrolliert wird. Zudem sind für die HalS-Aktivität offensichtlich akzessorische Faktoren notwendig. Wahrscheinlich ist das HalS-Protein ein Mitglied eines komplexen AHL-Degradations-Systems. Durch eine AHL-Degradation in der Zelle kann sowohl die Feinabstimmung der beiden QS-Systeme als auch eine Verzögerung bzw. ein Abstoppen der QS-Aktivierung erfolgen. Aufgrund der Komplexität der QS-Regulation können über diese Funktion weitreichende Auswirkungen erzielt werden, welche den Bakterienzellen eine Adaptierung an sich ändernde Umweltbedingungen ermöglichen.

6 LITERATUR

- Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. & Iglewski, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3928-3935.
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**, 63-67.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Atkinson, S., Throup, J. P., Stewart, G. S. & Williams, P. (1999). A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol* **33**, 1267-1277.
- Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P., Stewart, G. S. & Williams, P. (1992). N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* **288**, 997-1004.
- Bartels, K. (2004). Lektin B aus *Pseudomonas aeruginosa*. Evaluierung des Anwendungspotentials als Affinitäts-"Tags". Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
- Bassler, B. L., Wright, M. & Silverman, M. R. (1994). Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* **13**, 273-286.
- Bauer, W. D. & Robinson, J. B. (2002). Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 234-237.
- Beal, R. & Betts, W. B. (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* **89**, 158-168.
- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Semmler, A. B. & Mattick, J. S. (2002). Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**, 3598-3604.
- Bever, R. A. & Iglewski, B. H. (1988). Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *J Bacteriol* **170**, 4309-4314.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Boettcher, K. J. & Ruby, E. G. (1995). Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *J Bacteriol* **177**, 1053-1058.
- Bradley, D. E. (1980). A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26**, 146-154.
- Braun, P., de Groot, A., Bitter, W. & Tommassen, J. (1998). Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**, 3467-3469.
- Brint, J. M. & Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* **177**, 7155-7163.
- Byers, J. T., Lucas, C., Salmond, G. P. & Welch, M. (2002). Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol* **184**, 1163-1171.

- Caballero, A. R., Moreau, J. M., Engel, L. S., Marquart, M. E., Hill, J. M. & O'Callaghan, R. J. (2001).** *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal Biochem* **290**, 330-337.
- Calfee, M. W., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2001).** Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11633-11637.
- Camara, M., Williams, P. & Hardman, A. (2002).** Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* **2**, 667-676.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4989-4993.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D. & Farrand, S. K. (1998).** Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1119-1129.
- Chandrasekaran, E. V. & Bemiller, J. N. (1980).** Constituent analyses of glycosaminoglycans. In *Methods in Carbohydrate chemistry VIII.*, pp. 89-96. Edited by R. L. Whistler, Bemiller, J.N. Academic Press, NY, San Francisco, London.
- Chapon-Hervé, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A. & Bally, M. (1997).** Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **24**, 1169-1178.
- Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1974).** *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3672-3676.
- Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C. & Greenberg, E. P. (2001).** QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2752-2757.
- Chun, C. K., Ozer, E. A., Welsh, M. J., Zabner, J. & Greenberg, E. P. (2004).** Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3587-3590.
- Collier, D. N., Anderson, L., McKnight, S. L., Noah, T. L., Knowles, M., Boucher, R., Schwab, U., Gilligan, P. & Pesci, E. C. (2002).** A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* **215**, 41-46.
- Conway, S. P., Brownlee, K. G., Denton, M. & Peckham, D. G. (2003).** Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* **2**, 321-332.
- Costerton, J. W. (1995).** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **15**, 137-140.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.
- Cox, C. D. (1986).** Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect Immun* **52**, 263-270.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. (2003).** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**, 1027-1036.
- 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* **280**, 295-298.

- De Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L. & Iglewski, B. H. (1999).** RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 2175-2184.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1865-1873.
- Dekker, N., Merck, K., Tommassen, J. & Verheij, H. M. (1995).** In vitro folding of *Escherichia coli* outer-membrane phospholipase A. *Eur J Biochem* **232**, 214-219.
- Devine, J. H., Shadel, G. S. & Baldwin, T. O. (1989).** Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5688-5692.
- Déziel, E., Comeau, Y. & Villemur, R. (2001).** Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* **183**, 1195-1204.
- Déziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003).** *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**, 2005-2013.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. & Camara, M. (2002).** Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**, 2576-2586.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Camara, M. & Williams, P. (2003).** The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* **50**, 29-43.
- Dong, Y. H. & Zhang, L. H. (2005).** Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* **43 Spec No**, 101-109.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3526-3531.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1754-1759.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F. & Zhang, L. H. (2001).** Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* **411**, 813-817.
- Draganov, D. I., Stetson, P. L., Watson, C. E., Billecke, S. S. & La Du, B. N. (2000).** Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* **275**, 33435-33442.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. & Oppenheimer, N. J. (1981).** Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**, 2444-2449.
- Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S., Christiansen, G., Chhabra, S. R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S. & Givskov, M. (1996).** Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**, 127-136.
- Egland, K. A. & Greenberg, E. P. (1999).** Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol Microbiol* **31**, 1197-1204.
- Engbrecht, J., Nealson, K. & Silverman, M. (1983).** Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**, 773-781.

- Espinosa-Urgel, M. (2003).** Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J Bacteriol* **185**, 699-700.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A. & Crawford, I. P. (1990).** Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* **172**, 884-900.
- Fergie, J. E., Shema, S. J., Lott, L., Crawford, R. & Patrick, C. C. (1994).** *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. *Clin Infect Dis* **18**, 390-394.
- Flavier, A. B., Ganova-Raeva, L. M., Schell, M. A. & Denny, T. P. (1997).** Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* **179**, 7089-7097.
- Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996).** Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**, 727-751.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994).** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Stoodley, P. (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 34-40.
- Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991).** Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* **173**, 3000-3009.
- Gambello, M. J., Kaye, S. & Iglewski, B. H. (1993).** LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* **61**, 1180-1184.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. (1996).** Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**, 6618-6622.
- Greenberg, E. P., Hastings, J. W. & Ulitzur, S. (1979).** Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria. *Arch. Microbiol.* **120**, 87-91.
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O. & Fiechter, A. (1984).** *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl Environ Microbiol* **48**, 301-305.
- Guina, T., Purvine, S. O., Yi, E. C., Eng, J., Goodlett, D. R., Aebersold, R. & Miller, S. I. (2003).** Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2771-2776.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. & Swings, J. (1998).** Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol* **21**, 384-397.
- 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., Hoiby, N. & Givskov, M. (2003).** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo J* **22**, 3803-3815.
- Heurlier, K., Denervaud, V., Pessi, G., Reimmann, C. & Haas, D. (2003).** Negative control of quorum sensing by RpoN (σ^{54}) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**, 2227-2235.

- Hoang, T. T., Sullivan, S. A., Cusick, J. K. & Schweizer, H. P. (2002).** Beta-ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. *Microbiology* **148**, 3849-3856.
- Høiby, N. (2002).** Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros* **1**, 249-254.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979).** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**, 73-102.
- Huang, J. J., Han, J. I., Zhang, L. H. & Leadbetter, J. R. (2003).** Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5941-5949.
- Jaeger, K. E. (1994).** [Extracellular enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* as virulence factors]. *Immun Infekt* **22**, 177-180.
- Juhas, M., Eberl, L. & Tümmler, B. (2005).** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **7**, 459-471.
- Kamath, S., Kapatral, V. & Chakrabarty, A. M. (1998).** Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. *Mol Microbiol* **30**, 933-941.
- Kempner, E. S. & Hanson, F. E. (1968).** Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol* **95**, 975-979.
- Kim, E. J., Wang, W., Deckwer, W. D. & Zeng, A. P. (2005).** Expression of the quorum-sensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density. *Microbiology* **151**, 1127-1138.
- Kiratisin, P., Tucker, K. D. & Passador, L. (2002).** LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *J Bacteriol* **184**, 4912-4919.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003a).** Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* **50**, 61-68.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003b).** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**, 1511-1524.
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (1997).** Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**, 895-904.
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. & Pechere, J. C. (2000).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**, 5990-5996.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994).** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-802.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamont, I. L. & Martin, L. W. (2003).** Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**, 833-842.
- Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Lazdunski, A. & Williams, P. (1995).** Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **17**, 333-343.

- Lawrence, R. N., Dunn, W. R., Bycroft, B., Camara, M., Chhabra, S. R., Williams, P. & Wilson, V. G. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, inhibits porcine arterial smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol* **128**, 845-848.
- Leadbetter, J. R. & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**, 6921-6926.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N. & Lazdunski, A. (2003). Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol* **48**, 199-210.
- Lee, S. J., Park, S. Y., 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*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3919-3924.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P. & Sokol, P. A. (1999). Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* **181**, 748-756.
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R. & Zhang, L. H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**, 849-860.
- Liu, D., Lepore, B. W., Petsko, G. A., Thomas, P. W., Stone, E. M., Fast, W. & Ringe, D. (2005). Three-dimensional structure of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone hydrolase from *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11882-11887.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194-222.
- Mah, T. F. & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**, 34-39.
- 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* **145**, 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* **148**, 1119-1127.
- Matthysse, A. G., Yarnall, H., Boles, S. B. & McMahan, S. (2000). A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. *Biochim Biophys Acta* **1490**, 208-212.
- 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* **143**, 3703-3711.
- McGowan, S., Sebaihia, M., Jones, S., Yu, B., Bainton, N., Chan, P. F., Bycroft, B., Stewart, G. S., Williams, P. & Salmond, G. P. (1995). Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiology* **141**, 541-550.
- McGrath, S., Wade, D. S. & Pesci, E. C. (2004). Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett* **230**, 27-34.
- McKenney, D., Brown, K. E. & Allison, D. G. (1995). Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. *J Bacteriol* **177**, 6989-6992.

- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000).** The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 2702-2708.
- Melino, S., Capo, C., Dragani, B., Aceto, A. & Petruzzelli, R. (1998).** A zinc-binding motif conserved in glyoxalase II, beta-lactamase and arylsulfatases. *Trends Biochem Sci* **23**, 381-382.
- Merz, A. J., So, M. & Sheetz, M. P. (2000).** Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**, 98-102.
- Middleton, B., Rodgers, H. C., Camara, M., Knox, A. J., Williams, P. & Hardman, A. (2002).** Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol Lett* **207**, 1-7.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Nakai, K. & Horton, P. (1999).** PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- Nasser, W., Bouillant, M. L., Salmond, G. & Reverchon, S. (1998).** Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* **29**, 1391-1405.
- Nealson, K. H. & Hastings, J. W. (1979).** Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43**, 496-518.
- Nealson, K. H., Platt, T. & Hastings, J. W. (1970).** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**, 313-322.
- Ochsner (1993).** Genetics and biochemistry of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactant synthesis. Dissertation, Swiss Federal Institute of Technology Zurich.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6424-6428.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**, 295-304.
- Park, S. Y., Kang, H. O., Jang, H. S., Lee, J. K., Koo, B. T. & Yum, D. Y. (2005).** Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2632-2641.
- Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y. & Lee, J. K. (2003).** AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* **149**, 1541-1550.
- 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* **260**, 1127-1130.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1997).** Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**, 5756-5767.
- Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1999).** Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-1210.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1995).** A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1490-1494.
- Pearson, J. P., Feldman, M., Iglewski, B. H. & Prince, A. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* **68**, 4331-4334.

- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 197-201.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3127-3132.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11229-11234.
- Picard, B., Denamur, E., Barakat, A., Elion, J. & Goulet, P. (1994). Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. *J Med Microbiol* **40**, 313-322.
- Pierson, L. S., 3rd, Keppenne, V. D. & Wood, D. W. (1994). Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* **176**, 3966-3974.
- Piper, K. R., Beck von Bodman, S. & Farrand, S. K. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**, 448-450.
- 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*. *Embo J* **12**, 2467-2476.
- Pratt, L. A. & Kolter, R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **2**, 598-603.
- Puskas, A., Greenberg, E. P., Kaplan, S. & Schaefer, A. L. (1997). A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **179**, 7530-7537.
- Qin, Y., Luo, Z. Q., Smyth, A. J., Gao, P., Beck von Bodman, S. & Farrand, S. K. (2000). Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *Embo J* **19**, 5212-5221.
- Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M. W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C. L. & Tompkins, R. G. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8815-8821.
- Reimmann, 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. *Mol Microbiol* **24**, 309-319.
- Reimmann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., Defago, G. & Haas, D. (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **148**, 923-932.
- Richard, P., Le Floch, R., Chamoux, C., Pannier, M., Espaze, E. & Richet, H. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J Infect Dis* **170**, 377-383.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2001). N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* **147**, 3249-3262.
- Roche, D. M., Byers, J. T., Smith, D. S., Glansdorp, F. G., Spring, D. R. & Welch, M. (2004). Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology* **150**, 2023-2028.

- Römling, U., Fiedler, B., Bosshammer, J., Grothues, D., Greipel, J., von der Hardt, H. & Tümmler, B. (1994). Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis* **170**, 1616-1621.
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**, 1023-1032.
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2003). Overexpression of biocatalysts in *Pseudomonas*. In *Enzyme functionality: Design, Engineering and Screening*. Edited by A. Svendsen. New York, USA: Marcel Decker.
- Rosenau, F., Liebeton, K., Jaeger, K.-E. (1998). Überexpression extrazellulärer Enzyme in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biospektrum* **4**, 38-41.
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H. & Hamood, A. N. (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* **67**, 5854-5862.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**, 1140-1154.
- Schaefer, A. L., Hanzelka, B. L., Eberhard, A. & Greenberg, E. P. (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J Bacteriol* **178**, 2897-2901.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**, 2066-2079.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. & Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**, 973-985.
- Schweizer, H. P. & Chuanchuen, R. (2001). Small broad-host-range *lacZ* operon fusion vector with low background activity. *Biotechniques* **31**, 1258, 1260, 1262.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Jr., Rinehart, K. L. & Farrand, S. K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6036-6041.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**, 784-791.
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M. & Puhler, A. (1986). Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Meth Enzymol* **118**, 640-659.
- Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. & Greenberg, E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**, 762-764.
- Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P. & Welsh, M. J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**, 229-236.
- Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003a). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest* **112**, 1460-1465.

- Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003b). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**, 56-60.
- Smith, R. S., Harris, S. G., Phipps, R. & Iglewski, B. (2002). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation *in vivo*. *J Bacteriol* **184**, 1132-1139.
- Smith, R. S., Fedyk, E. R., Springer, T. A., Mukaida, N., Iglewski, B. H. & Phipps, R. P. (2001). IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol* **167**, 366-374.
- Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138.
- Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J. M. & Poole, K. (1998). Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: *lasR/lasI* mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **166**, 341-345.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Swartzman, A., Kapoor, S., Graham, A. F. & Meighen, E. A. (1990). A new *Vibrio fischeri* *lux* gene precedes a bidirectional termination site for the *lux* operon. *J Bacteriol* **172**, 6797-6802.
- Swift, S., Williams, P. & Stewart, G. S. A. B. (1999). N-Acylhomoserine lactones and quorum sensing in proteobacteria. In *Cell-cell signaling in bacteria*, pp. 291-313. Edited by G. M. Dunny & S. C. Winans. ASM Press, Washington, D. C.
- Swift, S., Winson, M. K., Chan, P. F., Bainton, N. J., Birdsall, M., Reeves, P. J., Rees, C. E., Chhabra, S. R., Hill, P. J., Throup, J. P. & et al. (1993). A novel strategy for the isolation of *luxI* homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol Microbiol* **10**, 511-520.
- Tan, M. W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2408-2413.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tompkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G. S., Bycroft, B. W. & Pritchard, D. I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66**, 36-42.
- Teplitski, M., Robinson, J. B. & Bauer, W. D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 637-648.
- 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* **44**, 7559-7569.
- Throup, J. P., Camara, M., Briggs, G. S., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P. & Stewart, G. S. (1995). Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* **17**, 345-356.

- Tielker, D. (2005).** Physiologie und Biotechnologie des Lektins LecB aus *Pseudomonas aeruginosa*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Toder, D. S., Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991).** *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Mol Microbiol* **5**, 2003-2010.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S. & Molin, S. (2000).** Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* **182**, 6482-6489.
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1992).** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **9**, 73-90.
- Ulmer, A. J., Pryjma, J., Tarnok, Z., Ernst, M. & Flad, H. D. (1990).** Inhibitory and stimulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanine on human T and B lymphocytes and human monocytes. *Infect Immun* **58**, 808-815.
- Ulrich, R. L. (2004).** Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6173-6180.
- Val, D. L. & Cronan, J. E., Jr. (1998).** *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J Bacteriol* **180**, 2644-2651.
- Ventre, I., Ledgham, F., Prima, V., Lazdunski, A., Foglino, M. & Sturgis, J. N. (2003).** Dimerization of the quorum sensing regulator RhlR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol Microbiol* **48**, 187-198.
- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. & Iglewski, B. H. (2003).** Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**, 2080-2095.
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H. & Zhang, L. H. (2004).** Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem* **279**, 13645-13651.
- Watson, W. T., Minogue, T. D., Val, D. L., von Bodman, S. B. & Churchill, M. E. (2002).** Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* **9**, 685-694.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. (2001).** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 365-404.
- Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999).** Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13904-13909.
- Whiteley, M., Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2000).** Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 4356-4360.
- Whooley, M. A., O'Callaghan, J. A. & McLoughlin, A. J. (1983).** Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *J Gen Microbiol* **129**, 981-988.
- Wild, M., Caro, A. D., Hernandez, A. L., Miller, R. M. & Soberon-Chavez, G. (1997).** Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 279-285.
- Wimpenny, J., Manz, W. & Szewzyk, U. (2000).** Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 661-671.
- Windgassen, M., Urban, A. & Jaeger, K. E. (2000).** Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 201-205.
- Winzer, K. & Williams, P. (2001).** Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**, 131-143.

- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Camara, M. & Williams, P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* **182**, 6401-6411.
- Withers, H. L. & Nordstrom, K. (1998). Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15694-15699.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Heydorn, A., Mathee, K., Moser, C., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N. & Givskov, M. (2000). Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**, 2481-2493.
- Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T. & McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4035-4039.
- Yang, F., Wang, L. H., Wang, J., Dong, Y. H., Hu, J. Y. & Zhang, L. H. (2005). Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Lett* **579**, 3713-3717.
- Yannish-Perron, C., Viera, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yarwood, J. M., Volper, E. M. & Greenberg, E. P. (2005). Delays in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled gene expression are conditional. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9008-9013.
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H. & Williams, P. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **70**, 5635-5646.
- Zhang, H. B., Wang, L. H. & Zhang, L. H. (2002a). Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4638-4643.
- Zhang, L. H. & Dong, Y. H. (2004). Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* **53**, 1563-1571.
- Zhang, R. G., Pappas, T., Brace, J. L., Miller, P. C., Oulmassov, T., Molyneaux, J. M., Anderson, J. C., Bashkin, J. K., Winans, S. C. & Joachimiak, A. (2002b). Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* **417**, 971-974.
- Zhang, Y. & Miller, R. M. (1994). Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2101-2106.

7 ANHANG

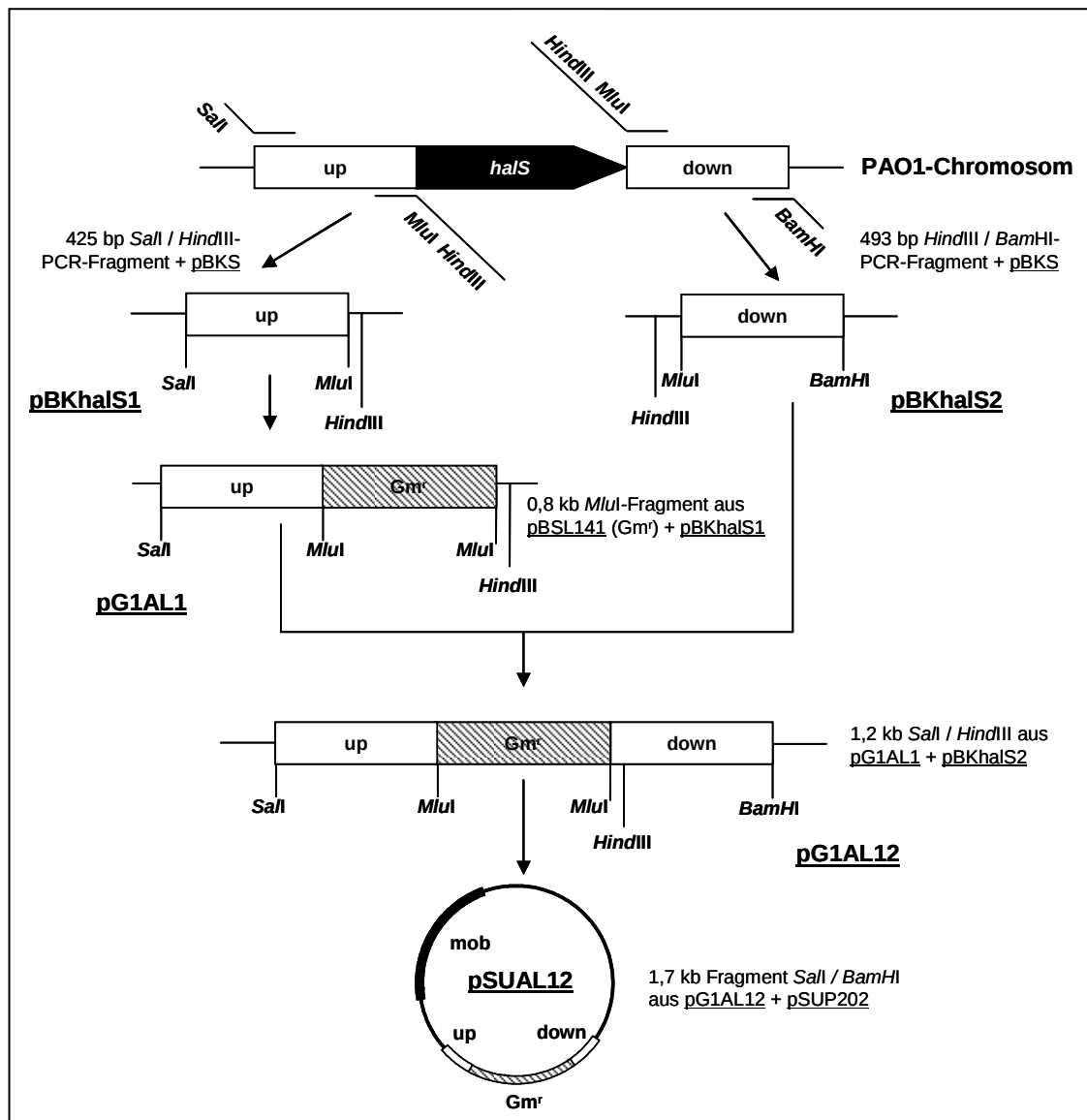


Abb. 29: Konstruktion des Mutagenesevektors pSUAL12. Zunächst wurden die flankierenden stromaufwärts- (up) und stromabwärts- (down) Bereiche des *halS*-Gens mittels PCR amplifiziert und über die jeweils inserierten Erkennungssequenzen in den Vektor pBKS kloniert. Die aus dem Plasmid pBSL141 isolierte *Gm^r*-Kassette wurde über die *MluI*-Schnittstelle hinter das stromaufwärts-Fragment in das Plasmid pBKhalS1 kloniert. Durch die Restriktion dieses Konstruktes mit den Enzymen *SalI* und *HindIII* und anschließender Klonierung über diese Erkennungssequenzen in das Plasmid pBKhalS2 entstand das zur Deletion geeignete Fragment. Nach der Isolierung mit den Enzymen *SalI* und *BamHI* wurde dieses Fragment über die entsprechenden Erkennungssequenzen in den Suizidvektor pSUP202 kloniert. Der entstandene Mutagenesevektor pSUAL12 wurde für die Konstruktion des *halS*-defizienten *P. aeruginosa*-Stammes $\Delta halS$ (*Gm^r*) eingesetzt.

Name: Heckmann
Vorname: Silke
Geburtsdatum: 16.09.1975
Geburtsort: Datteln
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung:

1982-1986 Kardinal-von-Galen-Grundschule, Waltrop
1986-1995 Theodor-Heuss-Gymnasium, Waltrop
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschul Ausbildung:

10/1995-04/2001 Biologie-Studium an der Ruhr-Universität Bochum
03/1998 Vordiplom in Biologie
02/2000 Diplom-Hauptprüfungen in Biologie:
Biol. Hauptfach: Mikrobiologie
Biol. Nebenfach: Genetik und Cytologie
Außerbiol. Nebenfach: Hygiene und Umweltmedizin
03/2000-04/2001 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen,
Ruhr-Universität Bochum
Thema: „Einfluss des lipolytischen Systems aus *Pseudomonas aeruginosa* auf die Biofilmbildung“
Studienabschluss: Diplom-Biologin
seit 10/2001 Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: „Der Einfluss des Proteins HalS von *Pseudomonas aeruginosa* auf die interzelluläre Kommunikation“

Anstellungen:

08/2000-01/2001 Studentische Hilfskraft an der
Ruhr-Universität Bochum,
Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen
07-10/2001 Wissenschaftliche Hilfskraft an der
Ruhr-Universität Bochum,
Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen
10/2001-09/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der
Ruhr-Universität Bochum,
Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen
10/2002-12/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
seit 01/2005 Wissenschaftliche Hilfskraft an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 10.11.2005

Silke Heckmann

