



Technische Universität München

Fakultät für Physik

Lehrstuhl Physik synthetischer Biosysteme

Bakterielle Kommunikation in genetischen Netzwerken

Andrea Meyer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat) genehmigten Dissertation

Vorsitzende/-r: Prof. Dr. Martin Zacharias
Prüfende/-r der Dissertation: 1. Prof. Dr. Friedrich Simmel
2. Prof. Dr. Joachim Rädler

Die Dissertation wurde am 08.06.2020 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für
Physik am 03.11.2020 angenommen.

Publikationen

Einige der der Beschreibungen und Abbildungen wurden bereits vorab in folgenden Publikationen verwendet:

Single Cell Analysis of a Bacterial Sender-Receiver System. Ramalho T, Meyer A, Mückl A, Kapsner K, Gerland U, Simmel FC. *PLoS ONE* 11(1): e0145829, 2016

Communication and computation by bacteria compartmentalized within microemulsion droplets. Weitz M, Mückl A, Kapsner K, Berg R, Meyer A, Simmel FC. *Journal of the American Chemical Society*, 136(1):72-75, 2014

Abstract

This thesis has been created within the framework of the EU-project „BACTO-COM“, which aimed to use living systems for information delivery. Quorum Sensing and Conjugation in gram-negative bacteria have been examined as information processing systems. For detecting communication, fluorescent proteins have been implemented, which have been expressed after information delivery by the used E. Coli cultures. Characterization has been done in different levels of detail and divers methods of measurement. It started with batch cultures in a plate reader and ended up with single cell fluorescence microscopy in a chemostat.

Zusammenfassung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projekts „BACTOCOM“ erstellt, das es zum Ziel hatte lebende Systeme zur Informationsübermittlung zu nutzen. Als informationsverarbeitende Systeme wurden zum einen Quorum Sensing, zum zweiten Konjugation in gram-negativen Bakterien betrachtet. Als Kommunikationsnachweis dienten fluoreszierende Proteine, welche die verwendeten E. Coli-Stämme nach Informationsübermittlung exprimierten. Die Charakterisierung erfolgte in verschiedenen Detailgraden in mehreren Messmethoden. Es wurde mit Batch-Kulturen in einem Plate-Reader begonnen und endete mit Einzelzell-Fluoreszenzmikroskopie in einem Chemostaten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Molekularbiologische Grundlagen	3
2.1	Genexpression	3
2.1.1	DNA	3
2.1.2	RNA	8
2.1.3	Genkassette	13
2.1.4	Transkription	14
2.1.5	Translation und Proteinfaltung	15
2.2	Bakterielles Wachstum	15
2.3	Rauschen	22
2.3.1	Entstehung und Übertragung	22
2.3.2	Nutzen	24
2.3.3	Rauschmodulation	26
3	Zeitaufgelöste Einzelzell-Mikroskopie	27
3.1	Fluoreszenzmikroskopie	28
3.2	Fluoreszenzproteine	29
4	Der Chemostat	33
4.1	Chemostaten in der Mikrofluidik	34
4.1.1	Das Design	34
4.2	Lithographie	39
4.2.1	Photolithographie	39
4.2.2	Softlithographie	42
5	Konjugation	45
5.1	Konjugation des R388 Plasmids durch das Typ 4 Sekretionssystem	46
5.2	Nutzen für Bakterien	47
5.3	Materialien und Methoden	47

5.3.1	Zellen und Plasmide	47
5.3.2	Zellpräparation	48
5.3.3	Versuchsablauf	51
5.3.4	Auswertung	51
5.3.5	Ergebnisse und Diskussion	52
6	Quorum sensing	55
6.1	Peptidbasiertes Quorum sensing in grampositiven Bakterien	56
6.2	Quorum sensing zwischen verschiedenen Spezies	57
6.3	Lux-artiges Quorum sensing in gramnegativen Bakterien	58
6.4	Die Gruppe der AHLs	60
6.5	Alternative Theorien	62
6.5.1	Diffusion Sensing	62
6.5.2	Efficiency sensing	62
6.6	Charakterisierung eines Sender-Empfänger Systems	63
6.6.1	Materialien und Methoden	63
6.6.2	Wachstum von Sendern und Empfängern	67
6.6.3	Titrationsexperimente	68
6.6.4	Sender-Empfänger-Experiment	85
6.6.5	Vergleich der experimentellen Methoden	95
7	Zusammenfassung	99
A	Weitere Experimente	103
A.1	Wachstum in verschiedenen Kammergeometrien	103
A.1.1	Einführung	103
A.1.2	Materialien und Methoden	103
A.1.3	Ergebnis	104
A.1.4	Ausblick	104
A.2	Verschiedene Flussgeschwindigkeiten in der Mikrofluidik	105
A.2.1	Einführung	105
A.2.2	Materialien und Methoden	105
A.2.3	Ergebnisse	106
A.2.4	Ausblick	106
A.3	Verschiedene Farben in der Mikrofluidik	107
A.3.1	Einführung	107
A.3.2	Materialien und Methoden	107
A.3.3	Ergebnisse	107
A.3.4	Ausblick	108
A.4	Verschiedene Farben in motilen Zellen	108
A.4.1	Einführung	108

A.4.2	Materialien und Methoden	108
A.4.3	Ergebnisse	109
A.4.4	Ausblick	109
B	Verwendete Plasmide und Sequenzen	115
B.1	Senderplasmid	115
B.2	Empfängerplasmid	119
B.3	Konjugationsplasmide	121
B.4	Plasmide zur konstitutiven Fluoreszenzproteinexpression . . .	121
B.4.1	RFP-Expression	121
B.4.2	GFP-Expression	123
B.4.3	CFP-Expression	125

Abbildungsverzeichnis

2.1	DNA-Aufbau	5
2.2	A-B-Z-DNA	6
2.3	RNA-Aufbau	9
2.4	Übersicht über den genetischen Code	10
2.5	Aufbau der tRNA	11
2.6	Sekundärstruktur der 16S rRNA von E. coli	12
2.7	BtuB-Switch	13
2.8	Aufbau einer Genkassette	14
2.9	Bakterielles Wachstum	17
2.10	Intrinsisches und extrinsisches Rauschen	23
2.11	Entstehung und Übertragung von Rauschen	25
3.1	Strahlengang im invertierten Mikroskop	28
3.2	Kristallstruktur des fertig gefalteten GFP	31
3.3	Extinktion und Emission von GFP und RFP sowie die passenden Filter	32
4.1	Messung der Gradientenentstehung im Chemostaten	37
4.2	Geometrie des Chemostaten	38
4.3	Schleuderkurven verschiedener Photolacke	40
4.4	Herstellung von Silizium-Wafern	41
4.5	Herstellung des Chemostaten aus PDMS	43
5.1	parS-parB Konjugationssystem	49
5.2	Konjugationssystem mit Nachweis über GFP und RFP	50
6.1	Induktion bei lux-artigen Quorum Sensing Systemen	59
6.2	AHL-Grundgerüste	60
6.3	Konstrukte der Sender- und Empfängerzellen	64
6.4	Einfluss von AHL auf Sender- und Empfängerzellen	68
6.5	Wachstum im Plate-Reader bei unterschiedlichen AHL-Konzentrationen	69

6.6	Zellwachstum im Plate Reader	72
6.7	Fluoreszenzanstieg im Plate Reader bei unterschiedlichen AHL-Konzentrationen	75
6.8	Genregulationsfunktion und Hillkurve bei Titration im Plate-Reader	77
6.9	Zellwachstum und Genexpression im Chemostaten	80
6.10	Einzelzellauswertung der Genexpression bei einer AHL-Konzentration von 50 nM	83
6.11	Verteilung der Genexpressionsrate α aus Einzelzelltrajektorien	85
6.12	Einfluss von IPTG und AHL auf die Fluoreszenz	87
6.13	Wachstum von Sendern und Empfängern in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen	88
6.14	Fluoreszenzentwicklung in Abhängigkeit vom Sender-Empfänger-Mischverhältnis	90
6.15	Genexpression in Abhängigkeit des Sender-Empfänger-Verhältnisses	92
6.16	Quantifizierung der AHL-Konzentration in Sender-Empfänger-Experimenten	93
A.1	Einfluss der Kammergeometrie auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	111
A.2	Flussgeschwindigkeit auf das Wachstum und die Induktion von <i>E. coli</i>	112
A.3	Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> -Zellen, die sich nur in dem exprimierten Fluoreszenzprotein unterscheiden	113
A.4	Zellkolonien motiler Zellen nach 72h Wachstum	114

Tabellenverzeichnis

2.1	Genomgrößen verschiedener Organismen	7
2.2	Kopienzahlen von Plasmiden und ihre Inkompatibilitätsgruppen	8
6.1	Unterschiedliche lux-artige Quorum Sensing Systeme	61
A.1	Zellanteile in einer Kolonie aus motilen Zellen nach 72 h	110

Kapitel 1

Einleitung

Die hier vorliegende Arbeit basiert auf dem EU-Forschungsprojekt BACTOCOM, welches unter der Leitung von Martyn Amos (Manchester Metropolitan University, England) in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Friedrich Simmel (TU München, Deutschland), Dr. Nils Blüthgen und Dr. Ilka Axmann (Charité Berlin, Deutschland), Prof. Fernando de la Cruz (Universidad de Cantabria, Spanien), Prof. Alfonso Rodriguez-Patón (Universidad Politécnica de Madrid, Spanien), Prof. Alfonso Jaramillo (Université d'Evry Val d'Essonne-Genopole, Frankreich) in den Jahren 2010 bis 2013 durchgeführt wurde.

Motivation des Projektes war Informations- und Kommunikationstechnologien und Biotechnologie zu verknüpfen, um lebende Systeme zur Verarbeitung von Informationen zu nutzen. Biochemische Prozesse in biologischen Systemen ermöglichen eine Art der parallelen Datenverarbeitung wie sie bis dato nicht genutzt wird. Gleichzeitig bieten sie die Möglichkeit sich selbständig zu entwickeln, anzupassen und zu konfigurieren. Aus diesen Überlegungen heraus entstand die Idee zu dem Projekt BACTOCOM - „Bacterial computing with engineered populations“- , in dem ein einfacher bakterieller Computer gebaut werden sollte. Dabei sollten die Zellen als Mikroprozessoren dienen, die Informationen über den eigenen Zustand sowie die Umgebung um sie herum verarbeiten. Bei bestimmten chemischen Einflüssen sollten sie eine Art der Kommunikation zu den benachbarten Zellen aufbauen und dadurch Informationen weitervermitteln. Diese Informationen können in Form verschiedener Mechanismen weitergegeben werden. Chemische Signale und die Weitergabe von DNA spielen dabei Schlüsselrollen. Das gewünschte Verhalten kann durch das Hinzufügen genetischer Sequenzen in den DNA-Code oder Modifizierung bereits bestehender Funktionalitäten herbei geführt werden.

Die verschiedenen, an dem Projekt beteiligten Gruppen haben sich unterschiedlichen Bereichen dieses Projektes gewidmet. In das Arbeitspaket der TU München, unter der Leitung von Prof. Dr. Friedrich Simmel, fiel unter anderem die Charakterisierung der in Erwägung gezogenen bakteriellen Systeme. Zwei Arten der Informationsweitergabe wurden dabei in die engere Auswahl genommen und im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet. Zum einen Quorum Sensing, basierend auf dem Lux-System, was als am vielversprechendsten angesehen wurde, zum zweiten Konjugation in gramnegativen Bakterien. Verwendet wurden verschiedene *Escherichia coli*-Stämme (*E. coli*), die entsprechend der gewünschten Funktionalität ausgewählt und genetisch angepasst wurden. Als Nachweis für die Kommunikation dienten fluoreszierende Proteine, welche die Bakterien exprimierten, sobald die Informationsweitergabe stattgefunden hat. Die Charakterisierung erfolgte in verschiedenen Detailgraden mit unterschiedlichen Messmethoden. Es wurde in einem Plate-Reader begonnen, in denen die jeweilige Kultur als Ganzes analysiert wurde und endete mit der Betrachtung der einzelnen Zellen in einem Chemostaten unter dem Mikroskop.

Kapitel 2

Molekularbiologische Grundlagen

2.1 Genexpression

Um Abläufe genregulatorischer Netzwerke verstehen zu können, werden zunächst die Grundlagen der Genexpression vorgestellt. Da in dieser Arbeit ausschließlich in prokaryotischen Systemen gearbeitet wurde, werden nur deren Vorgänge betrachtet.

2.1.1 DNA

2.1.1.1 Aufbau von DNA

DNA (= deoxyribonucleic acid, dt.: DNS = Desoxyribonukleinsäure) wird auch häufig als der Code des Lebens bezeichnet. Alle zellulären Lebewesen besitzen eine DNA, auf der sämtliche Informationen, die zum Leben, zum Wachstum und zur Fortpflanzung benötigt werden, festgehalten sind.

Auf den ersten Blick erscheint dieser Code mit seinen nur vier Zeichen recht einfach. Dass er es aber nicht ist, zeigt z.B. die Tatsache, dass DNA zwar im Jahre 1869 durch Friedrich Miescher entdeckt wurde, ihre Funktion als Träger der Erbinformation jedoch erst 1944 von Oswald Avery festgestellt und ihr Aufbau sogar erst im Jahre 1953 durch James Watson und Francis Crick, mit Hilfe der Röntgenstrukturanalysen von Rosamund Franklin, beschrieben und im Fachmagazin Nature unter dem Titel „Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid“ veröffentlicht werden konnte [1] [2] [3]. Zu diesem Zeitpunkt war man aber noch weit davon entfernt, DNA einzelner Lebewesen zu sequenzieren. Es dauerte noch bis ins Jahr 2001, bis

das menschliche Genom im Rahmen des „Human Genome Project“ sequenziert wurde. Bis heute kann man jedoch vielen Teilabschnitten noch keine Funktion zuordnen [4].

Um die Mechanismen zellulären Lebens zu verstehen, sind Kenntnisse über den Aufbau der DNA, sowie das Lesen und Übersetzen der darauf gespeicherten Informationen, wichtig. DNA besteht aus vier unterschiedlichen Basen, an denen jeweils eine Desoxyribose und ein Phosphat-Rest hängt, wobei dem Phosphat H-Atome fehlen, was zu einer negativen Ladung der DNA führt. Bei Desoxyribose handelt es sich um eine Pentose, einem Zucker, der fünf Kohlenstoffatome enthält. Zusammen mit dem Phosphat-Rest bildet sie das Rückgrat der DNA als Verbindung zwischen zwei aufeinander folgenden Basen. Die fünf C-Atome sind mit 1' bis 5' durchnummeriert, wodurch eine eindeutige Zuordnung möglich ist und die DNA eine Richtung erhält. Man spricht vom 5'- und vom 3'-Ende, da diese beiden C-Atome die gegen, beziehungsweise in Laufrichtung zeigenden Atome sind. Der Phosphat-Rest bindet an genau diese beiden Atome an und verbindet dadurch zwei Zuckermoleküle, wodurch eine immer abwechselnde Reihe dieser beiden Moleküle entsteht. Das 5'-Ende dieser Kette endet mit einem Phosphatmolekül am C5-Atom, das 3'-Ende dagegen mit einem Zuckermolekül. Am C1-Atom ist die jeweilige Base kovalent gebunden.

Es gibt vier verschiedene Basen, welche sich in zwei Typen aufteilen. Die Purinbasen Adenin und Guanin und die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin. Die Zuordnungen leiten sich jeweils von ihrer Struktur ab, die dem Purin beziehungsweise dem Pyrimidin entsprechen. DNA tritt im Normalfall doppelsträngig auf. Das bedeutet sie besteht aus zwei Strängen, die komplementäre Sequenzen haben und gegenläufige Richtungen aufweisen. Komplementär zueinander sind die Basen Adenin und Thymin, welche mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen binden, sowie Guanin und Cytosin, die drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (Abb. 2.1).

Die durch den Doppelstrang entstandene Strickleiterstruktur dreht sich, bedingt durch die chemischen Bindungen, zu einer rechtshändigen Doppelhelix mit einer großen und einer kleinen Furche. Der Durchmesser dieser Doppelhelix beträgt 2 nm. Für eine gesamte Umdrehung werden 10,4 Basen benötigt und der dabei erfolgte Anstieg beträgt 3,4 nm. Davon nimmt die große Furche 2,2 nm und die kleine Furche 1,2 nm ein. Diese hauptsächlich auftretende Form stellt die sogenannte B-DNA dar. Es gibt noch weitere Formen, welche jedoch selten, oder nur *in-vitro* auftreten. Erwähnt seien hier die A-Form, die ebenfalls rechtshändig ist, einen Durchmesser von 2,6 nm aufweist und

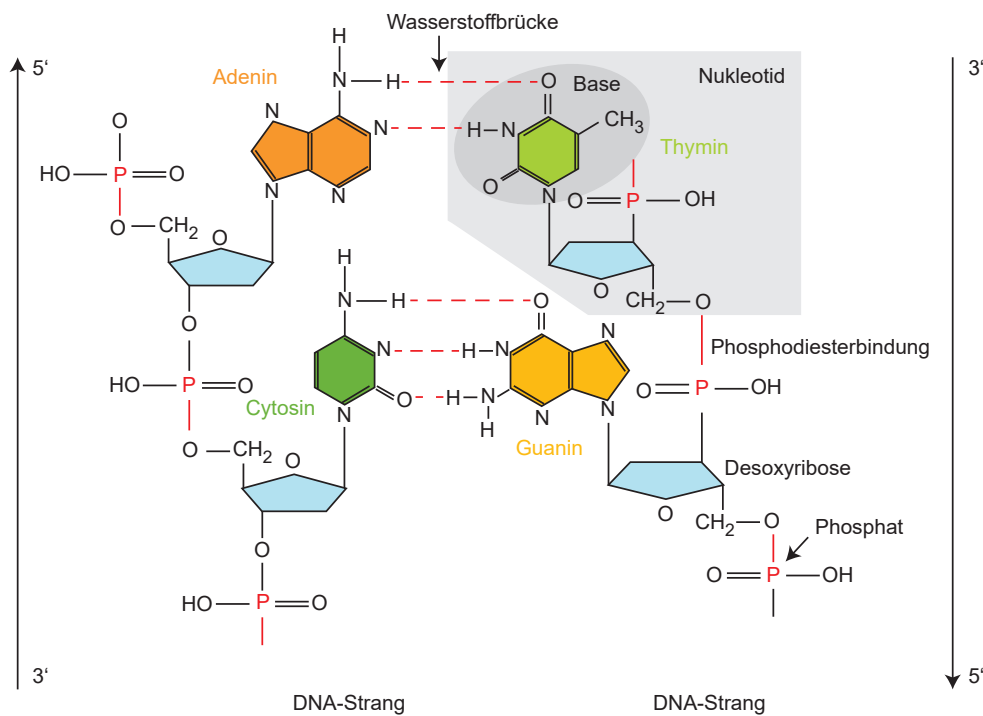


Abbildung 2.1: DNA-Strang bestehend aus den vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin sowie dem Rückgrat aus einem Phosphat und Desoxyribose. Zwei Stränge laufen in entgegengesetzten Richtungen und winden sich zu einer Doppelhelix, wobei die Basen über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind

11,6 Basen pro Umdrehung braucht, sowie die Z-Form. Sie ist linkshändig, hat einen Durchmesser von 1,8 nm und es werden 12 Basenpaare für eine Umdrehung benötigt (Abb. 2.2). [9]

2.1.1.2 DNA in Bakterien

Bakterielle DNA kommt in den meisten Arten in zwei funktionell unterschiedlichen Formen vor, der Genom-DNA und der Plasmid-DNA.

Das Genom einer bakteriellen Zelle besteht meist aus einem Chromosom, das in einer ringförmigen DNA vorliegt, die in mehrfacher Kopie in der Zelle vorhanden sein kann. Es ist in *E. coli* 4600 kB lang und beinhaltet die genetische Information, die das Überleben der Zelle sichert, wie beispielsweise Informationen zum Zellzyklus, dem auch die Zellteilung angehört. [10]

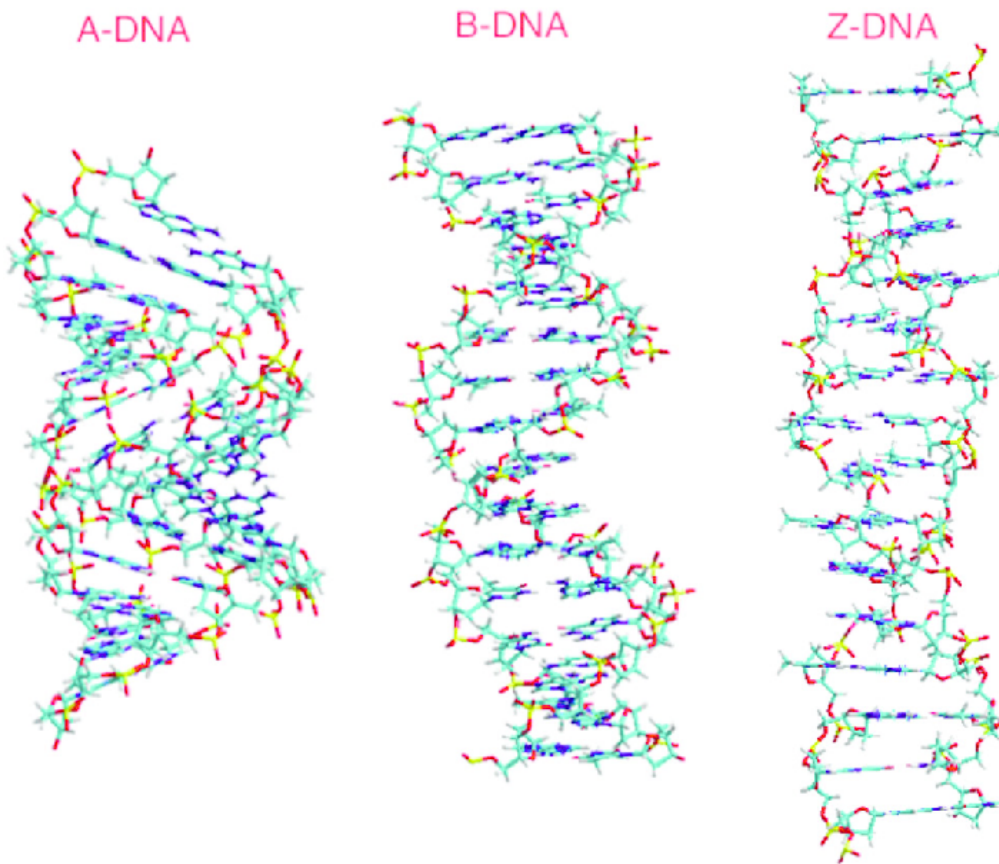


Abbildung 2.2: Molekularstrukturen verschiedener DNA-Strukturen: A-DNA entsteht bei niedrigerer Feuchtigkeit oder kristalliner DNA [5] [6], B-DNA entspricht der unter physiologischen Bedingungen auftretenden Form [7] und Z-DNA, deren Auftreten in der Regulation von Transkription eine Rolle spielt [8]. [9]

Bei Plasmiden handelt es sich ebenfalls um ringförmige DNA, die jedoch mit Größen von etwa 600 bp bis hoch zu 2000 kpb bedeutend kürzer als das Genom sind [19]. Im Allgemeinen beinhalten Plasmide keine Informationen, die für das Überleben unter „normalen“ Bedingungen für die Zelle notwendig sind. Vielmehr dienen die zusätzlichen Gene der Erhöhung der Fitness oder dem Überleben in einer feindlichen Umgebung. So sind beispielsweise auf Plasmiden Antibiotika-Resistenzen kodiert, die sich durch die Weitergabe des jeweiligen Plasmids auf benachbarte Zellen ausbreitet. Haben Zellen verschiedene Plasmide mit unterschiedlichen Resistenzen, entstehen sogenannte multiresistente Organismen. Diese kommen häufig in Krankenhau-

Organismus	Basenpaare (bp)	Referenz
<i>Escherichia Coli</i>	$4,6 \cdot 10^6$	[11]
HIV	9719	[12]
Bacteriophage T7	39937	[13]
<i>Bacillus subtilis</i>	$4,31 \cdot 10^6$	[14]
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,2 \cdot 10^8$	[15]
Zebrafisch <i>Danio rerio</i>	$1,41 \cdot 10^9$	[16]
Maus	$2,5 \cdot 10^9$	[17]
Mensch	$3,22 \cdot 10^9$	[18]

Tabelle 2.1: Genomgrößen verschiedener Organismen

sumgebung vor und sind nur schwer behandelbar. Plasmide sind, verglichen mit dem Genom, einfacher zu klonieren, da kein Einfluss auf lebensnotwendige Mechanismen genommen wird. Durch diese Eigenschaften werden im Forschungsbereich häufig Plasmide anstatt des Genoms genetisch verändert. Neben den zusätzlichen Informationen haben Plasmide weitere, zwingend notwendige Sequenzen, die den Verbleib in der Zelle sicherstellen. Zum einen gibt es den Replikationsursprung (Origin of Replication, oriV). Durch ihn wird festgelegt, wie viele Kopien des Plasmids innerhalb einer Zelle vorliegen. Das Spektrum reicht von „low copy“-Plasmiden mit exakt einer bis etwa fünf Kopien, über „medium copy“ mit circa 10 bis 100 Kopien bis hin zu „high copy“-Plasmiden mit bis zu mehreren hundert Kopien. Die verschiedenen Ursprünge arbeiten auf unterschiedliche Art und Weise und man muss bei der gleichzeitigen Nutzung verschiedener Plasmide darauf achten, dass die gewählte Kombination nicht aus derselben Inkompatibilitätsgruppe stammt, da diese dann auf denselben Replikationsmechanismen basieren, was dazu führt, dass sie nicht voneinander getrennt kontrollierbar sind. [10]

Im molekularbiologischen Labor wird in der Arbeit mit lebenden Zellen selten auf ein Resistenzgen verzichtet. Dieses dient als Selektionsmarker und es kann überprüft werden, ob die jeweilige Zelle das entsprechende Plasmid in sich trägt, da nur diejenigen unter Zugabe eines Giftes, im Allgemeinen ist dies ein Antibiotikum, überleben können, die die entsprechende Resistenz haben. Als Drittes sei hier der Transformationsursprung (Origin of Transformation, oriT) erwähnt. Er dient – zusammen mit einigen beteiligten Proteinen, die sich ebenfalls auf dem Plasmid befinden – der Weitergabe des Plasmids an andere Zellen in der Nachbarschaft. Auf diesen so genannten horizontalen oder lateralen Gentransfer wird in Kapitel 5 näher eingegangen.

Plasmid	Replicon	Kopienzahl	Inkompatibilitätsgruppe
pBR322	pMB1	15 - 20	colE1, pMB1
pUC	modified pMB1	500 - 700	colE1, pMB1
pMOB45	pKN402	15 - 120	
pACYC	p15A	18 - 22	P1, F, R6K, pSC101, p15A
pSC101	pSC101	ca. 5	P1, F, R6K, pSC101, p15A
colE1	colE1	15 - 20	colE1, pMB1

Tabelle 2.2: Kopienzahlen von Plasmiden und ihre Inkompatibilitätsgruppe [20]

2.1.2 RNA

RNA (= ribonucleic acid, dt.: RNS = Ribonukleinsäure) ist ähnlich wie DNA strukturiert. Sie besteht aus einem Phosphat-Rest, der mit einem Zucker das Rückgrat der Struktur bildet. Bei dem für die RNA verwendeten Zucker handelt es sich um Ribose, welche sich durch ein zusätzliches Sauerstoff-Atom am C2-Atom des Pentoserings von der Desoxyribose unterscheidet. Auch in der RNA gibt es ein 5'-Ende, an welchem ein Phosphat-Rest gebunden ist und ein 3'-Ende, das mit einem Zucker endet. Die Basen Adenin, Guanin und Cytosin sind dieselben wie in der DNA, lediglich das Thymin wird durch Uracil ersetzt. Das Uracil ist ebenfalls eine Pyrimidinbase und unterscheidet sich vom Thymin durch eine fehlende Methylgruppe, daher ist es in der Synthetisierung weniger energieaufwändig, was der Zelle zu Gute kommt, da die RNA-Syntheseraten deutlich über denen der DNA liegen (Abb. 2.3).

RNAs treten meist einzelsträngig auf, bilden jedoch Sekundärstrukturen aus, indem komplementäre Anteile auf sich selbst zurückfalten. Häufige Sekundärstrukturen sind sogenannte hairpin-loops oder stem-loops. Bei solch doppelsträngigen Abschnitten bildet auch RNA eine ähnliche Helixstruktur wie DNA aus. Vielen Sekundärstrukturen lässt sich eine Funktion zuordnen. Sie sind die grundlegenden Mechanismen um beispielsweise Riboswitches zu ermöglichen, aber auch tRNA wird dadurch erst funktionell. Man unterscheidet je nach Funktion verschiedene RNA-Typen. Die Wichtigsten sollen im Folgenden kurz erwähnt werden:

mRNA (= messenger RNA):

Die mRNA ist das Transkript eines Gens von der DNA. Es wird durch die RNA-Polymerase synthetisiert und von den Ribosomen zur Proteinsynthese abgelesen. Jeweils drei Basen ergeben ein sogenanntes Kodon, von denen es

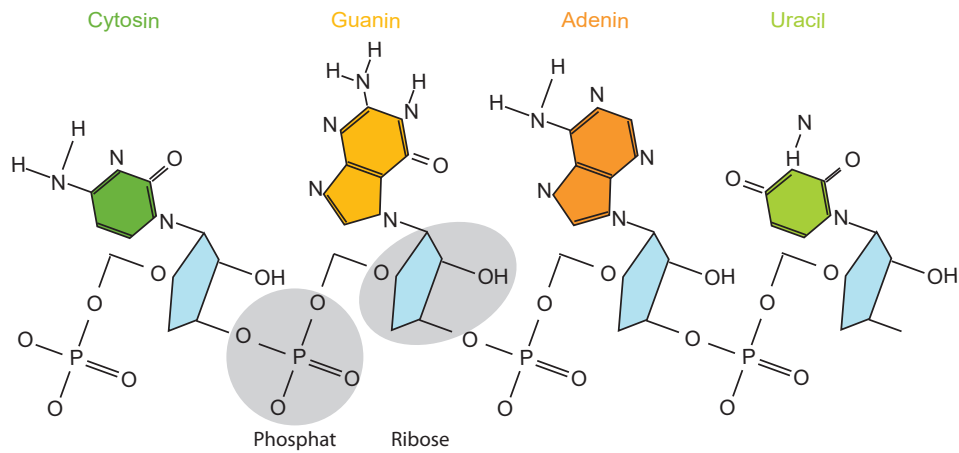


Abbildung 2.3: Ein RNA-Strang beinhaltet die vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil sowie ein Rückgrat in dem sich ein Phosphat und Ribose abwechseln.

insgesamt 64 gibt, von denen wiederum 61 für die 20 Aminosäuren kodieren (Abb. 2.4). Ein mRNA-Strang beginnt mit dem sogenannten Startkodon AUG (seltener auch GUG und UUG), welches in Prokaryoten für Formylmethionin kodiert und endet mit einem der drei Stopkods UAA, UGA oder UAG. Dazwischen liegt die Sequenz, welche die Informationen für die daraus entstehende Peptidkette beinhaltet. [21]

		zweiter Buchstabe				
		U	C	A	G	
erster Buchstabe	U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU CUC Leu CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU His CAC CAA CAG Gln	CGU CGC Arg CGA CGG	U C A G
	A	AUU Ile AUC AUA Met AUG	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	U C A G
	G	GUU GUC Val GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	U C A G
						dritter Buchstabe

Abbildung 2.4: Übersicht über den genetischen Code. Eine Aminosäure besteht immer aus drei Basen, wobei es mehrere Kombinationen zu einer Aminosäure geben kann. Zusätzlich zu den 61 Basenpaaren, die für die 21 Aminosäuren kodieren, gibt es noch drei Triplets, die als Stopp-Kodon fungieren. Das bedeutet, dass bei deren Auftreten die Translation beendet wird. [22]

tRNA (= transfer RNA):

Die tRNA stellt das Bindeglied zwischen mRNA und Protein dar. Sie besteht aus 74 - 90 Ribonukleotiden, die sich durch komplementäre Sequenzen zu einer Kleeblattstruktur aufeinander falten. Jeder der vier Arme nimmt eine spezielle Funktion ein. Erwähnt seien hier das Antikodon, welches an das komplementäre Kodon der mRNA bindet, sowie der Aminosäureakzeptorarm. Er besteht aus den aufeinander gefalteten 5' und 3' Enden der tRNA, wobei das 3'-Ende etwas länger ist und mit den Basen CCA endet. An diesen Arm bindet die zum jeweiligen Antikodon zugehörige Aminosäure, die in Verbindung mit der Kette der vorhergehenden und nachfolgenden Aminosäuren die für das jeweilige Protein benötigte Peptidkette ergibt [23]. Auf Grund der 64 möglichen Kodons, von denen jedes eine eigene t-RNA benötigt, sowie einer Reihe von speziesabhängiger Modifizierungen, beträgt der Anteil der t-RNA etwa 10 - 15% der Gesamt-RNA einer Bakterienzelle [24]. Die je

nach Organismus bis zu 41 unterschiedlichen tRNAs kodieren für alle 61 Triplets der 21 Aminosäuren. Möglich ist dies durch die Wobble-Hypothese, welche 1966 durch Francis Crick aufgestellt wurde. In ihr beschreibt er, dass die Wahl der Aminosäure häufig nur auf den ersten beiden Basen beruht. Dies ermöglicht, dass weniger unterschiedliche tRNAs benötigt werden als es Codons gibt und dennoch alle kodiert werden können [25].

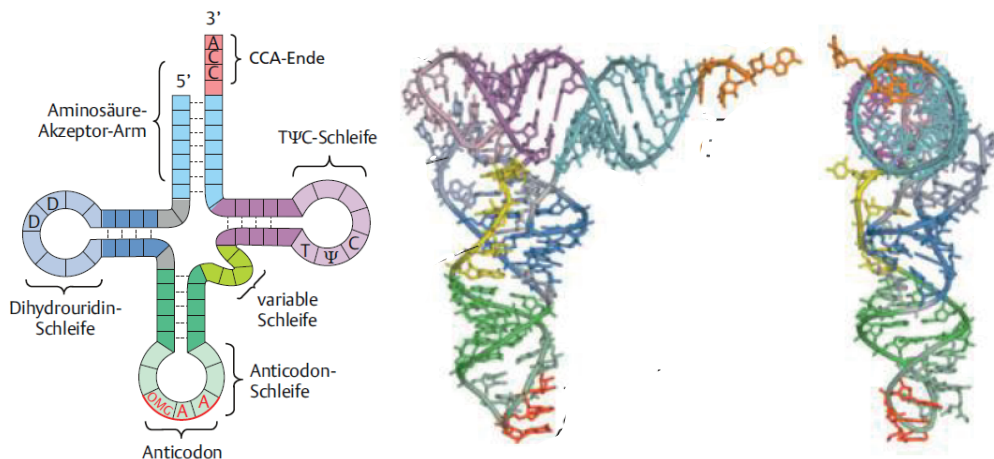


Abbildung 2.5: Kleeblatt- und L-Struktur der tRNA in verschiedenen Ansichten. Das Antikodon und das CCA-Ende bilden die beiden Enden des L. Die Basen des Antikodons sind nach außen orientiert [23].

rRNA (= ribosomale RNA):

Die rRNA bildet zusammen mit 52 Proteinmolekülen die Ribosomen, welche während der Translation unter anderem die Aufgabe haben, die Aminosäuren über Peptidbindungen aneinander zu knüpfen. Die Ribosomen setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen, der 30S Untereinheit, bestehend aus 21 Proteinen und der etwa 1700 nt langen 16S-rRNA und der 50S Untereinheit, bestehend aus 31 Proteinen, der 5S-rRNA mit 120 nt und der 23S-rRNA, die als größte rRNA 3700 nt besitzt. Die rRNA nimmt innerhalb des Konstrukts die strukturgebende und katalytischen Aufgabe an, während die Proteine als Gerüst dienen. Die tragende Rolle der rRNA lässt sich auch dadurch ablesen, dass sie auf der chromosomalen DNA kodiert und häufig gleich in mehreren Kopien vorhanden ist. Innerhalb einer *E. coli*-Zelle existieren zwischen 18000 und 20000 Ribosomen. [26] [27]

Da man davon ausgeht, dass die Sequenzen der ribosomalen RNA über die Jahrtausende hinweg nur geringfügig der Evolution unterworfen waren, werden sie auch zur Einordnung von Lebewesen und Pflanzen in phylogenetische Stammbäume verwendet, indem ihre Sequenzen und Sekundärstrukturen mit denen anderer Arten verglichen werden. Insbesondere die Sequenz der 16S-rRNA liefert hierbei aussagereiche Erkenntnisse. [28] [29]

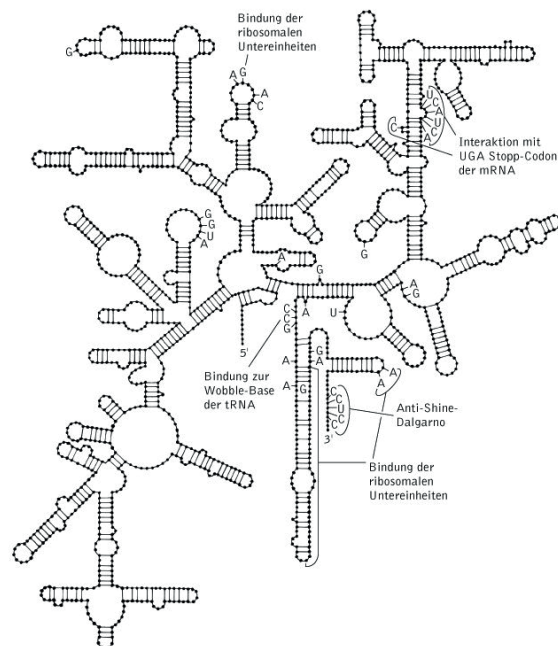


Abbildung 2.6: Sekundärstruktur der 16S rRNA von *E. coli* [30].

Ribozym:

Ribozyme sind katalytisch wirksame RNAs. Sie katalysieren, ähnlich wie Enzyme, chemische Reaktionen in der Zelle. Beispielsweise katalysiert die 23S-RNA der Ribosomen die Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren. 1989 wurde an ihre Entdecker Sidney Altman und Thomas Cech der Nobelpreis in Chemie verliehen. [30]

Riboswitches:

Riboswitches haben eine regulatorische Funktion der Genexpression durch die Bindung von Liganden. Durch ihre Sekundärstruktur bilden sich funktionelle Gruppen mit hochspezifischen stöchiometrischen Eigenschaften und

Ladungen aus. Bindet der Ligand an der vorgesehenen Stelle, findet eine Konformationsänderung statt, die die ribosomale Bindestelle (RBS) freigibt oder maskiert. Ein weiterer Mechanismus kann die Auflösung oder Entstehung von Terminatorsequenzen sein. Das hat Einfluss auf die Bindung des Ribosoms und damit auf die Translation. Beispiele hierfür sind der *btuB*-switch mit Coenzym B12 als Liganden und der TPP-switch mit Thiamin-Pyrophosphat als bindendes Molekül. [31] [32]

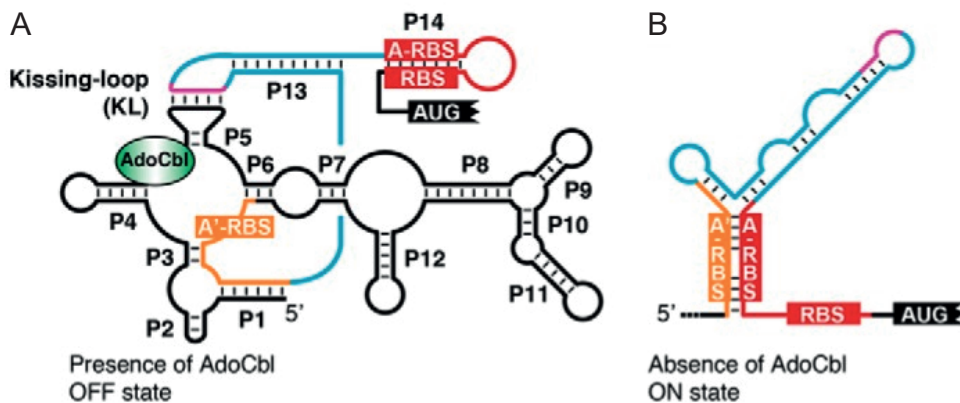


Abbildung 2.7: RNA Schalter dessen Sekundärstruktur sich in Abhängigkeit von AdoCbl ändert. (A) Ausgeschalteter Zustand in Anwesenheit von AdoCbl, in dem die RBS maskiert ist. (B) In Anwesenheit von AdoCbl (= Coenzym B12) wechselt die Konformation in den angeschalteten Zustand. Die RBS liegt frei und die Translation kann durchgeführt werden. [31]

2.1.3 Genkassette

Um ein Gen in ein Protein zu übersetzen, bedarf es nicht nur dessen Sequenz, sondern auch einiger anderer regulatorischer Teile.

Promotor:

Der Promotor ist der Ausgangspunkt der Genkassette. An ihn bindet die RNA-Polymerase um die Transkription zu starten. Solange er alleine steht handelt es sich um einen konstitutiven Promotor. Ist er durch einen Transkriptionsfaktor reguliert, befindet sich vor oder in seiner Sequenz eine Operatorregion, mit welcher der jeweilige Transkriptionsfaktor wechselwirkt, wodurch die Genexpression verstärkt oder unterdrückt wird.

Ribosomale Bindestelle (RBS):

Die RBS folgt auf den Promotor und steht unmittelbar, maximal jedoch nur durch wenige Basen getrennt, vor dem Gen. Sie enthält die Shine-Dalgarno-Sequenz und stellt mit dieser, wie ihr Name bereits vermuten lässt, die Bindestelle für Ribosomen dar.

Gen:

Das Gen beginnt mit dem Startkodon ATG. Bis zu diesem läuft das Ribosom, ohne zu transkribieren. Ab dem Startkodon wird die Sequenz abgelesen, wobei immer drei Basen ein Kodon bilden, welches für eine Aminosäure kodiert. Am Ende des Gens stehen ein oder mehrere Stoppkodons TAA. Sie sorgen dafür, dass das Ribosom von der RNA abfällt und die Translation gestoppt wird. Es können auch mehrere Gene aufeinander folgen, ohne dass eine weitere RBS oder ein weiterer Promotor nötig wären.

Terminator:

Am Ende einer Genkassette steht die Terminatorsequenz, welche dafür sorgt, dass die Transkription durch die RNA-Polymerase beendet wird. Je nach Art der Polymerase muss man darauf achten, den zugehörigen Terminator zu nutzen, da dieser ansonsten wirkungslos sein kann.



Abbildung 2.8: Aufbau einer Genkassette mit den benötigten Regulationssequenzen. Die RNA-Polymerase liest vom 3'- zum 5'-Ende.

2.1.4 Transkription

Bei der Transkription wird DNA in RNA umgeschrieben. Enthält die RNA genetische Informationen, handelt es sich um mRNA. Hierbei bindet der σ -Faktor, eine abtrennbare Untereinheit der RNA-Polymerase, zunächst an den freien außenliegenden Basen des Promotors. Dieser öffnet eine kurze Sequenz der DNA-Doppelhelix und die eigentliche Polymerase bindet an. Dann werden einige Basen repliziert, bevor der σ -Faktor wieder abfällt und die Polymerase ohne ihn weiterarbeitet, wodurch sie deutlich schneller wird. Mit etwa 55 nt/s liest die *E. coli*-Polymerase, während die T7-Polymerase mit bis zu 120 nt/s

mehr als doppelt so schnell arbeitet [33]. Gelangt sie zum Schluss an die Terminatorregion, werden sowohl der DNA-Strang als auch die synthetisierte RNA freigegeben und die Polymerase fällt ab [10].

2.1.5 Translation und Proteinfaltung

Bei der Translation wird die mRNA-Sequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt, wobei immer drei RNA-Nukleotide ein Kodon bilden, welches für eine Aminosäure kodiert. Um den richtigen, sogenannten Reading Frame zu lesen, steht zu Beginn der codierenden Sequenz das Startkodon, an dem die Ribosomen binden und von dem aus die Übersetzung in Aminosäuren startet. Die tRNAs binden hierfür mit dem entsprechenden Antikodon an ein Kodon. Durch das Enzym Aminoacyl-tRNA-Synthetase ist an das 3'-Ende der tRNA die zu dem Kodon gehörige Aminosäure gebunden. Die wird nun von der tRNA an die Ribosomen weitergegeben, welche daraus mit einer Geschwindigkeit von 20 nt/s eine Peptidkette in Richtung von N-zum C-Terminus knüpfen. Die Ribosomen laufen die gesamte mRNA entlang, bis sie ein Stoppkodon erreichen, welches für keine Aminosäure kodiert. Gemeinsam mit sogenannten Release Faktoren sorgt dieses Kodon dafür, dass sich das Ribosom von der mRNA löst und die Translation beendet wird. Die während des Lesevorgangs auftretende Fehlerrate durch Falschbeladung der tRNA ist mit einem Fehler pro 10000 Aminosäuren äußerst gering [30]. Die so entstandene Polypeptidkette muss im Anschluss noch in die finale Konformation gefaltet werden, in der das Protein aktiv ist. Um diesen Zustand zu erreichen, helfen häufig Chaperone. Es handelt sich dabei um bereits fertige Proteine, deren Aufgabe es ist, die Proteinfaltung zu katalysieren, in dem sie an hydrophobe Stellen der Peptidkette binden und diese vor ungewollter Bindung an andere Stellen schützen. Ist die Faltung abgeschlossen und hat das Protein seine native Struktur eingenommen, löst das Chaperon sich wieder und das Protein steht der Zelle in seiner vollen Funktion zur Verfügung [10].

2.2 Bakteriellies Wachstum

Bakterien vermehren sich, indem sich eine Mutterzelle in zwei genetisch identische Tochterzellen teilt. Da die beiden Tochterzellen sich ihrerseits erneut teilen und dieser Prozess mit einer bestimmten, vom betrachteten Organismus abhängigen Geschwindigkeit immer weiter fortgeführt wird, entsteht eine exponentiell wachsende, monoklonale Kultur. Es gilt daher:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu N(t) \quad (2.1)$$

$$\frac{dN}{N} = \mu dt \quad (2.2)$$

$$\int_0^{N(t)} \frac{1}{N} dN = \int_{t_0}^t \mu dt \quad (2.3)$$

$$\frac{1}{\delta} \ln \frac{N(t)}{N_0} = \mu(t - t_0) \quad (2.4)$$

$$N(t) = N_0 \exp(\mu \delta t). \quad (2.5)$$

Die Wachstumsrate μ und die Generationsdauer Δt erhält man, indem man die Zeit betrachtet, die es braucht, bis eine Kolonie die doppelte Zellzahl erreicht hat. Das bedeutet, man setzt $\frac{N(t)}{N_0} = 2$ und löst (2.2) nach μ bzw. Δt auf:

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu \Delta t \quad (2.6)$$

Wachstumsrate:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right)}{\Delta t} = \frac{\ln(2)}{\Delta t} \quad (2.7)$$

Generationsdauer:

$$\Delta t = \frac{\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right)}{\mu} = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (2.8)$$

Die Wachstumsrate hängt von verschiedenen Faktoren ab. Der Wichtigste ist hierbei der gewählte Organismus. So teilt sich *E. coli* unter optimalen Bedingungen etwa alle 20 Minuten, wohingegen *M. tuberculosis* dafür rund 18 Stunden braucht [11] [34]. Zur Schaffung dieser optimalen Bedingungen müssen Faktoren wie die Temperatur, der pH-Wert, Art und Menge der Nährstoffe wie Stickstoff- (N-) und Kohlenstoff (C-)Quellen Medium, sowie die Sauerstoffzufuhr beachtet und optimiert werden.

Misst man das tatsächliche Wachstum, so stellt man fest, dass es im Allgemeinen nicht dauerhaft exponentiell verläuft, sondern sich in verschiedene Phasen aufteilt (Abb. 2.9):

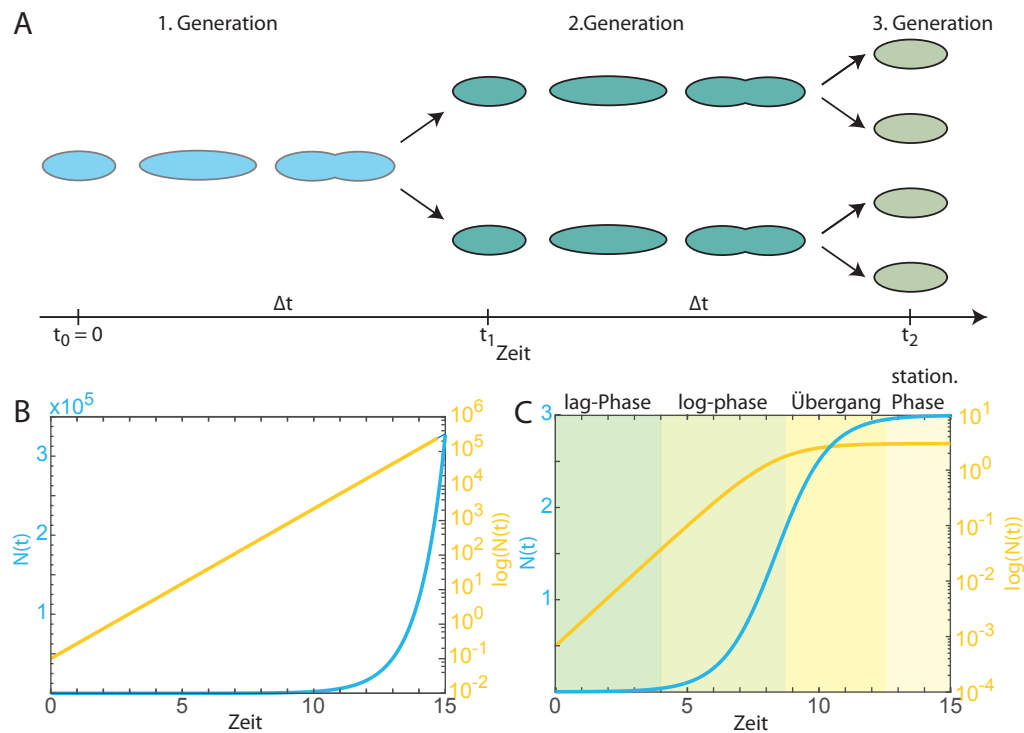


Abbildung 2.9: (A) Bakterielle Zellteilung, bei der aus einer Mutterzelle zwei genetisch identische Tochterzellen entstehen. (B) Exponentielles Wachstum in linearer (blau) und halblogarithmischer (orange) Darstellung (C) Logistisches Wachstum in linearer (blau) und halblogarithmischer (orange) Darstellung; die verschiedenen Wachstumsphasen sind farblich gekennzeichnet

lag-Phase:

In dieser ersten Phase passen sich die Bakterien an die neuen Umgebungsbedingungen an. Enzyme und Transportsysteme, die das vorhandene Nahrungsangebot optimal nutzen können, werden produziert. Eine Zellteilung findet in dieser Phase praktisch nicht statt.

log-Phase:

Die Zellen sind mit ihrem Stoffwechsel optimal auf die herrschenden Bedingungen eingestellt und vermehren sich exponentiell mit der höchsten, ihnen möglichen Teilungsrate μ_{max} .

stationäre Phase:

Mit Beginn der stationären Phase gehen die Ressourcen zur Neige. Die Bakterien fahren daher den Metabolismus herunter und stellen sich auf eine Hungerphase ein. Es herrscht während dieser Phase ein Fließgleichgewicht aus Zellteilung und absterbenden Zellen.

Absterbephase:

Bei Eintritt in die Absterbephase sind alle Nahrungsquellen aufgebraucht. Auch können sich in der Kultur toxische Stoffwechselprodukte angehäuft haben, die sich negativ auf das Überleben der Bakterien auswirken, da sie Einfluss auf Sekundärfaktoren wie den pH-Wert nehmen. Außerdem können - je nach Spezies - lytische Systeme induziert werden, die das Absterben der Kultur zusätzlich beschleunigen.

Haben die Zellen die Möglichkeit eine zweite Nahrungsquelle zu nutzen, beispielsweise, wenn unterschiedliche C-Quellen vorhanden sind, so wird erst die bevorzugte Quelle in einer log-Phase mit μ_{max} aufgebraucht. Daran anschließend erfolgt eine kurze Ruhephase, ähnlich der lag-Phase, in der sich die Kultur auf das veränderte Angebot einstellt, bevor sie in eine zweite log-Phase mit einer Teilungsrate von $\mu_2 < \mu_{max}$ übergeht. Dies wiederholt sich, bis alle Nahrungsquellen aufgebraucht sind und die stationäre Phase folgt.

Die ersten drei Phasen können mit dem Begriff „logistisches Wachstum“ zusammengefasst und durch eine logistische Funktion dargestellt werden.

Auch hier wird von einem exponentiellen Anstieg ausgegangen. Gleichzeitig wird jedoch von Beginn an der Maximalwert der Funktion berücksichtigt, ab dem kein Wachstum mehr vorhanden ist:

$$\dot{N}(t) = \frac{dN(t)}{dt} = \mu N(t)(N_{max} - N(t)) \quad (2.9)$$

$$\frac{1}{N(t)(N_{max} - N(t))} dN(t) = \mu dt \quad (2.10)$$

$$\int_{N(T)}^{N_{max}} \frac{1}{N(t)(N_{max} - N(t))} dN(t) = \int_T^{t_{max}} \mu dt \quad (2.11)$$

$$\frac{1}{N_{max}} \ln \left(\frac{N_{max}(N_{max} - N_{max})}{N(T)(N_{max} - N(T))} \right) = \mu(t_{max} - T) \quad (2.12)$$

$$\ln \left(\frac{N(T)}{N_{max} - N(T)} \right) = 1 - N_{max}\mu(t_{max} - T) \quad (2.13)$$

$$\frac{N_{max} - N(T)}{N(T)} = e^{(N_{max}\mu(t_{max} - T) - 1)} \quad (2.14)$$

Löst man nun nach $N(T)$ auf, erhält man:

$$N(T) = \frac{N_{max}}{e^{(N_{max}\mu(t_{max} - T) - 1)} + 1} \quad (2.15)$$

Mit $e^{N_{max}\mu t_{max} - 1} = const = b$ erhält man

$$N(T) = \frac{N_{max}}{be^{-N_{max}\mu T} + 1}. \quad (2.16)$$

Für $T = 0$ gilt

$$N(0) = \frac{N_{max}}{b + 1} = const = N_0 \quad (2.17)$$

$$\Rightarrow b = \frac{N_{max} - N_0}{N_0}. \quad (2.18)$$

Setzt man (2.18) in (2.16) ein, erhält man die logistische Funktion, mit der sich das Wachstum einer Bakterienkultur berechnen lässt

$$\boxed{N(T) = \frac{N_{max}N_0}{(N_{max} - N_0)e^{-N_{max}\mu T} + N_0}}. \quad (2.19)$$

Hierbei ist N_0 die Zahl der Zellen $N(t)$ zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Wachstumsrate μ bestimmt die Steilheit der Funktion, welche bei der maximalen Zellzahl N_{max} die stationäre Phase erreicht.

Diese sogenannte logistische Funktion ist häufig eine gute Näherung, hat aber den Nachteil, dass sie punktsymmetrisch ist. Das bedeutet, der Wendepunkt befindet sich immer auf halber Höhe zwischen N_0 und N_{max} . Das Wachstumsverhalten einer Zellkultur hält jedoch im Allgemeinen nicht perfekt an diese Symmetrie. So variiert beispielsweise die Dauer der lag-Phase zu Beginn des Wachstums oder die Position des Wendepunkts. Daher wurden verschiedene Funktionen entwickelt, die eine detailliertere Beschreibung des Wachstums einer Zellkolonie ermöglichen. Genannt seien hier die Gompertz-Funktion

$$N(t) = N_0 + (N_{max} - N_0)e^{-e^{-\frac{\mu(t-T_{\frac{1}{2}})}{2}}}, \quad (2.20)$$

mit $T_{\frac{1}{2}}$ als Zeitpunkt an dem der Wendepunkt liegt und das Baranyi-Modell

$$N(t) = N_0 + \frac{1}{\mu} \ln(e^{-\mu t} + e^{\mu \lambda} - e^{-\mu(\lambda+t)}) \quad (2.21)$$

mit λ als Dauer der lag-Phase, welches speziell an das bakterielle Wachstum modelliert wurde [35] [36] [37].

Daneben gibt es noch weitere Modelle wie das Richards-Modell und das three-phase linear-Modell. Ein Vergleich all dieser Modelle zeigt, dass das Baranyi-Modell am besten an den Verlauf einer Wachstumskurve gefittet werden kann [36]. Auf Grund der dennoch guten Ergebnisse, wird im Rahmen dieser Arbeit die logistische Funktion als Fitfunktion genutzt.

Die bisher gemachten Annahmen gehen von einer statischen Kultur, einer sogenannten Batch-Kultur, aus. Das bedeutet, die Kultur wird einmal angesetzt und es wird, insbesondere was das Nahrungsangebot angeht, kein weiterer Einfluss genommen. Dieser Art entsprechen die Messungen, die in dieser Arbeit in einem Plate-Reader vorgenommen wurden.

Sowohl in der industriellen Biotechnologie als auch in der Forschung ist man jedoch meist an der exponentiellen Phase interessiert, in der der Metabolismus am aktivsten ist. Um diese Phase möglichst lange zu erhalten ist ein kontinuierliches Nahrungsangebot, sowie der Abtransport von toxischen Stoffwechselprodukten nötig. Gleichzeitig darf das Zellwachstum nicht durch das angebotene Volumen begrenzt werden. Eine solche Kultur erhält man, indem während der gesamten Laufzeit Nahrungsquellen zugeführt und gleichzeitig Abfallprodukte und überschüssige Zellen abtransportiert werden. Das Gesamtvolumen und die Zelldichte einer solchen Kultur bleibt im optimalen

Fall gleich, jedoch befinden sich die Bakterien durchgängig in der log-Phase. Solch einen Ansatz bezeichnet man als Chemostat oder auch kontinuierliche Kultur. Er wurde innerhalb dieser Arbeit in den Mikrofluidik-Experimenten umgesetzt.

2.3 Rauschen

In Einzelzellexperimenten kann beobachtet werden, dass eigentlich monoklonale Zellen unterschiedliche Phänotypen ausbilden. Dies resultiert aus stochastischen Prozessen, welchen die Genexpression unterliegt und wird als Rauschen (engl. Noise) bezeichnet. Rauschen ist definiert als das Verhältnis der Standardabweichung zum Mittelwert des exprimierten Gens [38]. Man unterscheidet zwischen intrinsischem und extrinsischem Rauschen, abhängig von der Ursache. Extrinsisches Rauschen sind Effekte, welche eine komplette Zelle betreffen, aber von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein können, wie etwa die Zahl der Ribosomen oder der RNA-Polymerasen. Intrinsisches Rauschen sind Effekte, die sich auf die Expression einzelner Gene innerhalb einer Zelle auswirkt, wie „ON“- und „OFF“-Zustände von Promotoren [39]. Dabei erzeugt intrinsisches Rauschen im Allgemeinen auch extrinsisches.

Extrinsisches und intrinsisches Rauschen können messbar gemacht werden, indem die Expression zweier fluoreszierender Proteine jeweils von dem gleichen Promotor reguliert werden. Vergleicht man die Expressionslevel der verschiedenen Zellen, kann man extrinsisches Rauschen beobachten. Misst man die Expression der beiden Fluoreszenzproteine innerhalb einer Zelle, erhält man ein Maß für intrinsisches Rauschen (Abb. 2.10 und Abb. 2.11). [39]

Extrinsisches und intrinsisches Rauschen unterscheiden sich auch in der Zeitskala, in welcher sich die Fluktuationen abspielen. So wurde für intrinsisches Rauschen eine typische Fluktuationsskala von 9 Minuten gefunden, wohingegen extrinsisches Rauschen mit etwa 40 Minuten sich im Größenbereich eines Zellzyklus abspielt. [40]

2.3.1 Entstehung und Übertragung

Rauschen entsteht durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren: den sogenannten Bursts, der Mittelung über die Zeit und die Übertragung des Rauschens auf nachfolgende Systeme (Abb. 2.11).

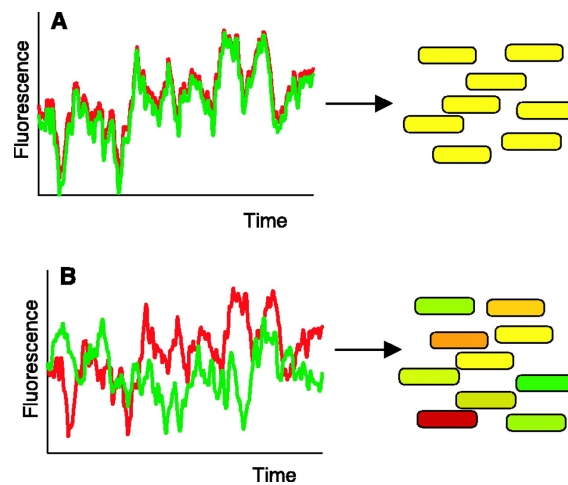


Abbildung 2.10: (A) Gäbe es kein Rauschen, würde in Zellen mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen, die von Promotoren der gleichen Art, exprimiert werden, immer dieselbe Anzahl beider Proteinmoleküle innerhalb einer Zellen und in den Zellen untereinander vorhanden sein. (B) Intrinsisches Rauschen wird sichtbar, in dem ein Fluoreszenzprotein stärker exprimiert wird als das andere. Durch die verschiedenen Expressionslevel der Zellen untereinander sind die einen stärker fluoreszierend als die anderen, was das extrinsische Rauschen bewerten lässt. [39]

Das bei Genaktivität entstehende Rauschen ist dabei kein Poisson-Prozess. Golding et al. zeigten, dass die Genaktivität einen linear ansteigenden Mittelwert mit konstanten Parametern, exponentiell verteilte inaktive und aktive Phasen und ein gleichbleibendes Verhältnis aus Varianz und Mittelwert, den sogenannten Fano-Faktor, hat, was einem Poisson Prozess entspricht. Gleichzeitig stellten sie jedoch auch fest, dass der Fano-Faktor nicht wie erwartet

$$F = \frac{\sigma^2}{\langle n \rangle} = 1 \quad (2.22)$$

ist, sondern einen Wert von $4,1 \pm 0,5$ erreicht, wobei F den Fano-Faktor, σ^2 die Varianz und $\langle n \rangle$ den Mittelwert der transkribierten mRNA darstellt. Erklärt wird diese Abweichung durch Bursts, einer starken Abweichung der Expressionsrate für eine kurze Zeit. Im Allgemeinen werden Proteine kontinuierlich mit einer niedrigen Rate oder sogar gar nicht exprimiert, weshalb sie lediglich in geringer Anzahl in einer Zelle vorhanden sind. Gelegentlich kann diese Rate nach oben schnellen, was durch aktivierte Zustände der Promotoren bedingt ist. Diese Zustände werden durch das Binden oder Lösen von Transkriptionsfaktoren am Promotor ausgelöst. Dadurch werden kurzzeitig

viele mRNA-Moleküle transkribiert und sind verfügbar, was einen Anstieg der translatierten Proteine zur Folge hat. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle noch kein Transkript enthält, sinkt mit zunehmender Dauer des Experiments auf

$$P_{Transk}(t) = e^{-(k_1 \langle \Delta n \rangle^{-1})t} \quad (2.23)$$

Hierbei steht k_1 für eine konstante Transkriptionsrate und $\langle \Delta n \rangle$ für den mittleren Zuwachs an mRNA-Molekülen während eines Bursts. Dadurch verändert sich der Fano-Faktor auf

$$F = \frac{\sigma^2}{\langle n \rangle} = \langle \Delta n \rangle \quad (2.24)$$

was der beobachteten Abweichung vom Poisson-Prozess entspricht. [41]

Ein zweiter Faktor ist die zeitliche Mittelung. So ist die Lebenszeit eines Proteins im Normalfall länger als die Zeit zwischen zwei Bursts, wodurch sich die unterschiedliche Verfügbarkeit von mRNA herausmittelt. In einer Studie wurde dies bestätigt, indem gezeigt wurde, dass Rauschen bei niedriger Transkriptionsrate und hoher Translationsrate größer ist als bei hoher Transkriptions- und niedriger Translationsrate. Der dritte angesprochene Auslöser ist die kaskadenartige Übertragung des Rauschens von einem genetischen System zum nächsten. Dies wurde gezeigt, indem eine Transkriptionskaskade mit verschiedenen Fluoreszenzreportern versehen wurde. Dabei wurde auch festgestellt, dass sich bei längeren Kaskaden schnelle Fluktuationen zwar herausfiltern, dies jedoch auf Kosten des Timings der Signalübertragung geht. [42]

2.3.2 Nutzen

Es stellt sich die Frage, welchen Nutzen die Strategie des Rauschens bringt. Bakterielle Kolonien können durch eine Vielfalt unterschiedlicher Phänotypen ihre Gesamtfitness erhöhen. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer Veränderung der Umgebungsbedingungen ein Typ dabei ist, der sich an die neuen Bedingungen schnell anpasst, ist deutlich höher, als wenn alle Zellen sich in demselben Zustand befänden. So wurde experimentell gezeigt, dass in einer wachsenden Kolonie von Bakterien, welche ohne Antibiotikaresistenz sind, dennoch einige wenige Zellen überleben, wenn sie einem Antibiotikum ausgesetzt sind. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Vergleich mit

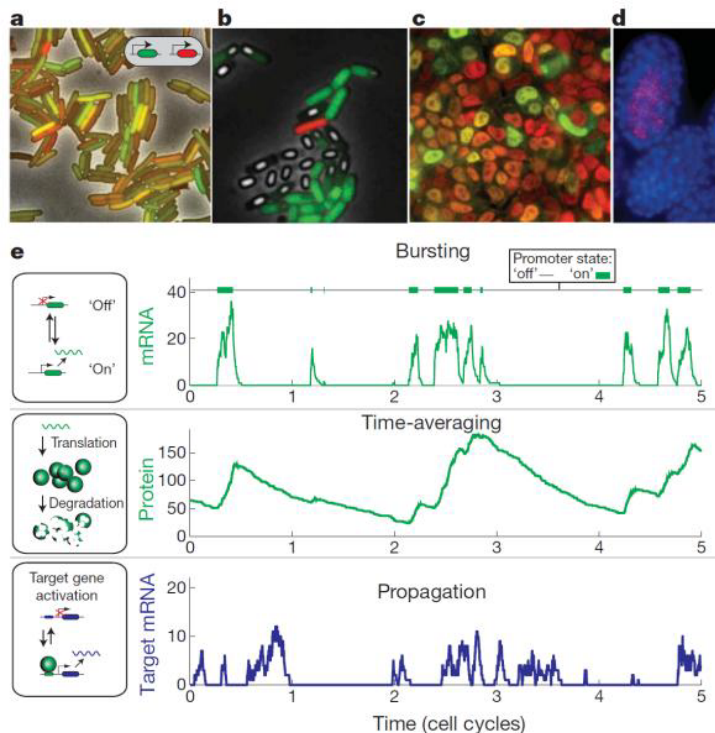


Abbildung 2.11: Rauschen kann in verschiedensten Zellpopulationen und genetischen Systemen durch die Expression unterschiedlicher Fluoreszenzproteine sichtbar gemacht werden: (a) *E. coli*, dass mit zwei identischen Promotoren unterschiedliche Fluoreszenzproteine exprimiert (b) *B. subtilis* dessen Zellen bei gleichen Umweltbedingungen unterschiedliches Verhalten zeigen (c) Stammzellen von Mäusen, die eine weitestgehend Produktion des rot getaggtten Proteins (Oct4) und eine heterogene Expression des grün-getaggtten Proteins (Nanog) aufweisen (d) genetisch identische *C. elegans*-Embryonen weisen zum selben Zeitpunkt unterschiedliche Entwicklungsstadien auf. Rot fluoreszierend ist ein bereits entwickelter Darm bei nur einem der beiden Embryonen zu sehen. (e) Übertragung von Rauschen von einem System ins nächste: mRNA wird während Bursts verstärkt transkribiert, was als intrinsisches Rauschen gilt (oben). Das erhöht die Anzahl der anschließend translatierten Proteine (mittig). Durch Einfluss dieser Proteine auf die Expression nachfolgender Genen, wird das Rauschen in Form von extrinsischem Rauschen weitergegeben (unten) [42].

den anderen Zellen ein stark vermindertes Wachstum haben. Diese sogenannten Persisters können zudem scheinbar zufällig wieder zu „normalen“ Zellen werden, genau wie auch der umgekehrte Prozess möglich ist. [43]

Ein weiteres Beispiel solch bistabilen Verhaltens ist die Kompetenz in *B. subtilis*. Es handelt sich hier um ein Quorum Sensing-System, bei dem ein Schwellwert des Proteins ComK überschritten werden muss, um die Aufnahme von DNA in die Zelle zu ermöglichen. Die ComK-Expression verläuft über eine positive Rückkopplung, das heißt sie verstärkt sich selbst und aktiviert dahinterliegende Gene, wodurch der kompetente Zustand hervorgerufen wird [44] [45]. Den Schwellwert um von der basalen in die getriggerte Expression des ComK-Proteins zu wechseln wird durch natürliches Rauschen hervorgerufen, weshalb ihn lediglich 10% - 20% der Zellen erreichen. [46]

2.3.3 Rauschmodulation

Da Rauschen vor allem durch die variable Zahl an mRNA-Molekülen bedingt ist, ist es nachvollziehbar, dass stark exprimierte Gene weniger Rauschen aufweisen als schwach exprimierte. So kommt es, dass Gene welche für die Zelle nicht zwingend überlebenswichtig sind, wie beispielsweise solche, die als Stressantwort synthetisiert werden, deutlich verrauschter sind als überlebenswichtige Proteine wie etwa Polymerasen.

Eine Möglichkeit Rauschen zu vermindern, sind negative Rückkopplungsschleifen (engl. negative feedback loop), da ein verstärkt exprimiertes Gen sich selbst runterreguliert, bzw. bei verringerter Expressionsrate diese sich erhöht. Umgekehrt verhält es sich bei positiver Rückkopplung (engl. positive feedback), wie sie im nativen Lux-System, das in abgewandelter Form in dieser Arbeit verwendet wird, vorkommt. In einem solchen System verstärkt sich eine Abweichung von der basalen Expression selbst. Im Falle von Kooperativität tritt bistabiles Verhalten auf, was bedeutet, dass ein Schwellwert unter- oder überschritten werden muss, um die Zelle in einen anderen Zustand zu versetzen. [47] [48]

Kapitel 3

Zeitaufgelöste Einzelzell-Mikroskopie

Einzelzell-Genexpression lässt sich durch die Kombination aus hochauflösender Mikroskopie, fluoreszierender Reporterproteine und quantitativer Bildanalyse experimentell beobachten und quantitativ bewerten.

Durch die fluoreszierenden Proteine kann der Grad der Genexpression für jede einzelne Zelle zum jeweiligen Aufnahmezeitpunkt gemessen werden. So lassen sich Induktion und Repression von Netzwerken, aber auch stochastische Effekte anhand der gemessenen Helligkeit bewerten. Beispielsweise wurde mit dieser Methode die Heterogenität bei konstitutiv exprimierenden Promotoren, oder die oszillatorische Expression Quorum-sensing basierter Netzwerke mit diesen Methoden analysiert. [42] [49] [50]

Die Durchführung dieser Experimente verlangt als Grundvoraussetzung ein entsprechendes Equipment, welches sowohl die technischen Anforderungen erfüllt, als auch die benötigten Umgebungsbedingungen schafft.

Zur zeitaufgelösten Mikroskopie benötigt man ein automatisiertes Mikroskop, das die Möglichkeit bietet eine gleichbleibende Umgebungstemperatur für die Probe zu halten, sowie einen Hardware-Autofokus um z-Drift bei Langzeitexperimenten entgegen zu wirken. Um bei bakteriellen Experimenten die Zellen ausreichend lange in der Wachstumsphase zu halten, muss dafür gesorgt werden, dass die Nährstoffversorgung über den gesamten Zeitraum der Messung gewährleistet ist und anfallende Abfallprodukte aus dem unmittelbaren Umfeld abtransportiert werden. Die anschließende Auswertung erfordert zudem, dass die Zellen während des Experiments möglichst unbeweglich sind, gleichzeitig aber nicht am Wachstum gehindert werden. Für die Auswertung

ist außerdem eine Bildanalyse-Software mit guter Mustererkennung nützlich, da diese einzelne Zellen erkennen kann und somit eine zeitaufwändige Auswertung per Hand abkürzt.

3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Für alle Mikroskopieexperimente dieser Arbeit wurde ein Olympus IX81 Mikroskop verwendet.

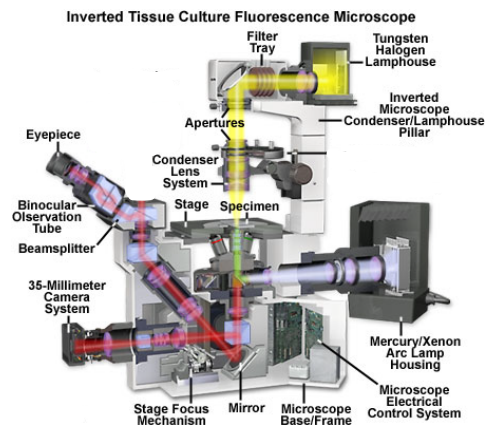


Abbildung 3.1: Der Lichtstrahl im invertierten Mikroskop wird durch eine Anzahl von Linsen sowohl zum Okular als auch zu der angehängten Kamera geleitet. Je nach Bedarf sind unterschiedliche Filter und Objektive in Gebrauch (angepasst von <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/ix70fluorescence/>).

Es handelt sich hierbei um ein invertiertes und voll automatisiertes Mikroskop, welches zusätzlich mit einem Laser-Autofokus-System ausgestattet ist um sauber fokussierte Bilder über einen langen Zeitraum zu gewährleisten. Durch den motorisierten x-y-Tisch (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) ist es möglich, die gewählte Position bei jedem Durchlauf exakt anzufahren. Die Hellfeldbelichtung wurde mit der mikroskopeigenen Beleuchtung durchgeführt, während zur Fluoreszenzbeleuchtung eine Quecksilber-Dampflampe (X-cite, EXFO, Quebec, Kanada) zur Anwendung kam. Eine eigens an das Mikroskop angepasste Plexiglas-Box (Okolab, Padua, Italien) mit Wärmezufuhr sorgt für gleichbleibende Temperatur, da für optimales Wachstum von *E. coli*-Bakterien 37°C notwendig sind. Alle Parameter wurden jeweils

in dem Programm „xcellence“ (Olympus, Hamburg, Deutschland) festgelegt und von diesem während des Experiments abgerufen. Das Programm hat Kontrolle über alle zum Mikroskop gehörigen Komponenten, wodurch für alle Teilexperimente möglichst gleiche Bedingungen, die technischen Abläufe betreffend, geschaffen werden können. Als Fluoreszenz-Reporterproteine wurden GFPmut3*, dsRed und CFP verwendet. Die entsprechenden Filtersets mit einem Anregungsfilter, einem Emissionsfilter und einem dichroiden Filter (Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland), sind im Filtrerrad verbaut, das ebenfalls motorisiert und automatisiert durch die Software gesteuert werden kann. Um Bleichen der Proteine, aber auch Belichtungsschäden an den Bakterien zu vermeiden, ist es wichtig für alle verwendeten Wellenlängen Filtersätze zu haben, die möglichst perfekt auf das benötigte Spektrum passen. Das bedeutet, dass das Spektrum, für das der Filter durchlässig ist, möglichst eng sein sollte und das transmittierte Intensitätsmaximum möglichst mit der Anregungs- beziehungsweise Emissionswellenlänge zusammenfällt (Abb. 3.3). Der dichroide Filter sollte mittig zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge sperren. Eine weitere Vorbeugung zur Vermeidung von Zellschäden oder Bleichen, ist der Einsatz einer hoch sensitiven emCCD-Kamera (iXon 888, Andor, Belfast, Irland). Durch diese Maßnahmen reichte in unseren Experimenten eine Belichtungszeit von 200 – 500 ms pro Aufnahme aus, um qualitativ hochwertige Bilder zu erhalten. Ein Merkmal der benutzten Kamera ist der große CCD-Chip von 1024 x 1024 Pixeln mit einer Größe von 13µm x 13µm pro Pixel. Bei einer 100-fachen Vergrößerung, die mit einem UPlanAp 100x Öl-Immersionsobjektiv (Olympus, Hamburg, Deutschland) erzeugt wurde, ergibt dies eine Gesamtbildgröße von 133,12 µm x 133,12 µm. Gegenüber den meisten anderen Kameras dieser Klasse, die mit 512 x 512 Pixeln und einer Pixelgröße von ca. 8 µm x 8 µm arbeiten bringt es den Vorteil, dass der beobachtete Bildausschnitt deutlich größer, bei dennoch ausreichender Auflösung, ist. So können in einem Ausschnitt mehr Zellen gemessen werden, wodurch statistische Aussagen genauer werden.

3.2 Fluoreszenzproteine

Eine der am weitesten verbreiteten Methoden zum Nachweis von Genexpression ist die Expression fluoreszierender Proteine. In dieser Arbeit wurden die Varianten CFP (em: 439 nm, ex: 476 nm), GFPmut3* (em: 501 nm, ex: 511 nm) und mRFP1 (em: 584 nm, ex: 607 nm) verwendet (<http://parts.igem.org>, Parts E0020, E1010 und E0040).

Das erste fluoreszente Protein wurde 1962 durch Osamu Shimomura in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt [51]. Es handelt sich dabei um die Wildform des GFP (wtGFP). Das Protein ist 26,9 kDa schwer und besteht aus einer 238 Aminosäuren langen Kette, die sich zu elf β -Faltblättern ausbilden, welche sich ume eine α -Helix legen. Dadurch entsteht eine Tonnenstruktur, in deren Zentrum sich das Chromophor befindet. Durch Experimente fand man heraus, dass das wtGFP sehr gut für den experimentellen Gebrauch geeignet ist, da es ungiftig und leicht in andere Organismen integrierbar ist. Des Weiteren können ohne Fluoreszenzverlust sowohl N- als auch C-terminal andere Proteine angehängt und somit Fusionsproteine gebildet werden. Vorteilhaft sind außerdem die Stabilität gegenüber einem großen pH-Bereich zwischen 5 und 12, die Resistenz gegenüber Proteasen und Detergenzien und eine Denaturierung erst ab 65°C [52] [53]. Leider hat der Wildtyp des GFPs auch gravierende Nachteile, was eine Veränderung des Proteins durch Mutagenese nach sich gezogen hat. So dauert die Oxidation der α - β -Bindung von Tyr66 bis zu zwei Stunden, es weist eine verhältnismäßig geringe Fluoreszenz auf und ab einer Temperatur von 20°C neigt es zur Bildung inaktiver Aggregate. Aus den Mutagenesen entstanden nicht nur Varianten, welche diese Probleme aus dem Weg räumten, sondern auch welche mit verschobenen Spektralbereichen vom blauen bis in den gelben Emissionsbereich, sowie beispielsweise pH-sensitive Varianten. Durch sogenannte ssrA-Systeme, kurze Aminosäureketten am C-terminalen Ende des Proteins, kann dieses abgebaut werden, wodurch eine Beobachtung von Dynamiken erleichtert wird. Bei diesen Tags kommt es auf die letzten drei Aminosäuren an, da sie die Degradationsgeschwindigkeit maßgeblich beeinflussen. Die so erreichten Halbwertszeiten reichen von > 5 h in der stabilen bis runter auf 20 min in der LVA-getaggen Variante. Damit befindet sich die Halbwertszeit im Bereich der Generationszeit von *E. coli* während der exponentiellen Wachstumsphase, was in den Ergebnissen von Experimenten mit LVA-Tags berücksichtigt werden muss, sie gleichzeitig aber auch für die Beobachtung von schnellen und dynamischen Abläufen prädestiniert. [54]

Ein weiteres Protein, welches in dieser Arbeit zum Einsatz kommt ist mRFP1 [56]. Es handelt sich dabei um eine Variante des rotfluoreszenten Proteins dsRed, welches ursprünglich aus der Koralle *Discosoma striata* stammt und von dem es – ähnlich wie beim wtGFP – heute unterschiedlichste Varianten gibt, deren Spektrum vom hellen Orange bis zum dunklen Rot reichen und die ebenfalls für verschiedenste Anwendungen optimiert wurden. Eine interessante Eigenschaft des Wildtyps ist die zeitlich versetzte Emission zweier verschiedener Wellenlängen. So entsteht während der autokatalytischen Bildung des Chromophors eine Zwischenstufe, die bei 475 nm angeregt wird

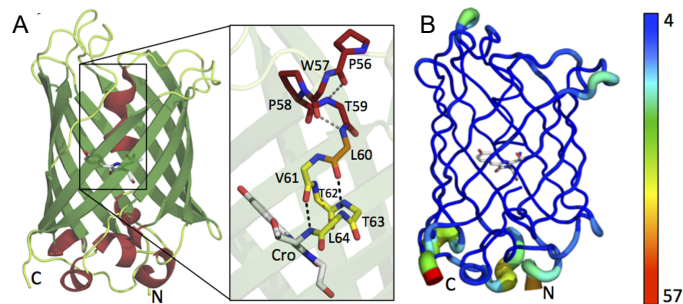


Abbildung 3.2: (A) GFP-Bändermodell, mit dem daneben vergrößerten Chromophor, welches sich innerhalb der Tonnenstruktur befindet. (B) Das B-Faktormodell der GFP-Struktur zeigt, dass die Atom-Positionen, außer am C- und N-terminalen Ende sehr gut definiert sind [55].

und bei 500 nm emittiert. Die anschließende endgültige Form dagegen hat eine Anregungswellenlänge von 558 nm und emittiert bei 550 nm. [57]

Bei den hier verwendeten Protein-Varianten handelt es sich um dauerhaft stabile Proteine, d.h. sie werden lediglich durch Zellteilung aus der Zelle verdünnt. Dadurch können zwar keine schnellen Dynamiken erkannt werden, jedoch ist das Langzeitverhalten bei gleichbleibenden Umgebungsbedingungen besser analysierbar. Dafür wurde das Fluoreszenzprotein jeweils hinter den zu regulierenden Promotor kloniert.

Da für die Fluoreszenzproteine keine weiteren Co-Faktoren benötigt werden, können sie in einer Vielzahl von Organismen exprimiert werden. Dadurch ist es möglich Expressions-Beobachtungen an lebenden Zellen mit Einzelzellauflösung durchzuführen. Bedingt durch den besseren Kontrast im Vergleich zu Hellfeldaufnahmen erhält man eine höhere Auflösung und damit eine bessere Darstellung einzelner Strukturen. Durch den linearen Anstieg der Quantenausbeute mit der steigenden Zahl der Proteine ist eine quantitative Analyse möglich.

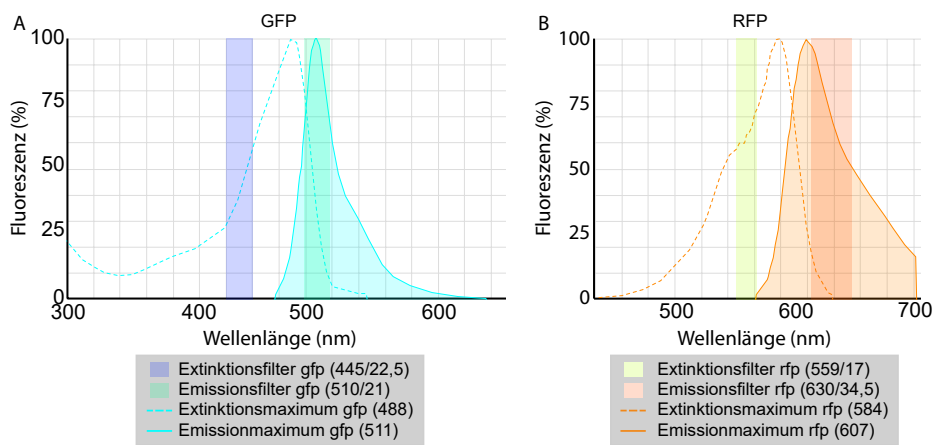


Abbildung 3.3: **(A)** Die in dieser Abbildung gezeigte Variante des GFPs wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und ist bei einem Maximum von 511 nm fluoreszierend. Die Filter werden so gewählt, dass sich die Durchlässigkeit nicht überschneidet und dennoch eine ausreichende Extinktion stattfindet. **(B)** Das Absorptionsmaximum der RFP-Variante mCherry befindet sich bei 584 nm, während die Emission bei 607 nm maximal ist (s. ThermoFisher SpectraViewer unter <https://www.thermofisher.com>).

Kapitel 4

Der Chemostat

Chemostaten wurden erstmals 1950 unabhängig voneinander von Monod und von Novick und Szilard beschrieben [58] [59]. Es handelt sich dabei um einen Bioreaktor, in dem die chemischen Bedingungen über einen langen Zeitraum hinweg gleich (statisch) bleiben. Dies wird gewährleistet, indem beständig frische Nährstoffe hinzugegeben werden und verbrauchtes Medium in einem Überlauf abfließt. Das Ganze geschieht in einem Fließgleichgewicht, bei dem die Verdünnungsrate

$$D = \frac{F}{V} \quad (4.1)$$

wobei F der mittleren Flussrate und V dem Volumen der Kultur entspricht, gleich der Wachstumsrate

$$\mu = \frac{\ln(2)}{t_d} \quad (4.2)$$

mit t_d als die Zeit, die es braucht um die Zellmasse zu verdoppeln, sein muss [59].

Je nach Nährstoffversorgung und Organismus kann man so die Zellen in einen bestimmten Wachstumszustand versetzen und über einen langen Zeitraum darin behalten. Anwendung findet dieses Verfahren heute sowohl in der Forschung als auch in der Industrie. So wird es beispielsweise zur Herstellung von Bioethanol oder Insulin genutzt. [60] [61]

4.1 Chemostaten in der Mikrofluidik

Seit einigen Jahren haben Chemostaten in Form von Mikrofluidik-Devices Einzug in die mikrobiologische Forschung gehalten. Es ist somit möglich Langzeitexperimente durchzuführen und dabei während der gesamten Zeit eine gleichbleibende Umgebung zu schaffen beziehungsweise Änderungen in den Umgebungsbedingungen genau definiert durchzuführen. Bei *in-vivo* Experimenten werden die Zellen dadurch durchgängig mit den benötigten Nährstoffen versorgt und Abfallprodukte können abtransportiert werden. Die Struktur der Umgebung kann außerdem mit verhältnismäßig geringen Mitteln an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden. So können beispielsweise Nischen und Fallen für Zellen, chemische Gradienten für chemotaktische Experimente oder mehrere gleichzeitig unter verschiedenen Bedingungen laufende Experimente ermöglicht werden. [62] [63]

4.1.1 Das Design

4.1.1.1 Die Anforderungen

Bevor ein Design entwickelt wird, müssen die Anforderungen, die künftig an die Strukturen gestellt werden, feststehen. In dem vorliegenden Fall sollte ein Mikrochemostat geschaffen werden, der über einen Zeitraum von 15 Stunden und länger die eingangs gewählten Bedingungen aufrecht erhalten kann. Zudem dürfen die Zellen nur in einer einzelnen Schicht wachsen, da eine Einzelzellanalyse im Anschluss an das Experiment durchgeführt werden soll. Die Nährstoffversorgung während des Versuchs soll rein diffusiv sein, damit auf die Bakterien keine zusätzlichen Kräfte wirken, die Einfluss auf das Wachstumsverhalten nehmen könnten. Da Titrationsexperimente mit verschiedenen Inducerkonzentrationen durchgeführt werden sollten, ist es sinnvoll innerhalb eines Versuchszeitraums durch einen angelegten Gradienten mehrere Experimente gleichzeitig ermöglicht, bei denen alle anderen Bedingungen sich nicht unterscheiden, um die Gesamtzahl an durchzuführenden Versuchen zu verringern. Da es auch zur Überlegung stand, das Wachstum in verschiedenen Geometrien, bei ansonsten gleichen Bedingungen zu beobachten, wurde auch dies in der Designentwicklung berücksichtigt.

4.1.1.2 Die Entwicklung

Da die vollständige Entwicklung eines Designs zeitlich sehr aufwändig ist und außerdem schon für unterschiedlichste Anforderungen Lösungen existieren, wurden Anleihen bei bereits veröffentlichten Mikrofluidikstrukturen gemacht und diese an unsere Bedürfnisse angepasst.

4.1.1.3 Die Hauptkanäle

Es wurde als Ausgangsbasis eine bereits veröffentlichte Struktur von Dertinger et al. genutzt. In dieser wird an drei Stellen Medium mit verschiedenen Fluoresceinkonzentrationen in die Struktur gegeben, welches sich stufenweise in Zick-Zack-Strukturen diffusiv mischt, bis am Ende acht Mischungen nebeneinander in einen Topf laufen und einen linearen Konzentrationsgradienten bilden. [64]

Da diese Struktur in einigen Punkten ungeeignet für das kontrollierte Wachstum von Bakterien ist, wurde Veränderungen in drei Punkten vorgenommen:

1. zunächst wurde die Zahl der Medium-Einlässe von drei auf zwei verringert. Mit dieser Maßnahmen sorgen wir dafür, dass immer ein linearer Gradient zwischen den gewählten Inducerkonzentrationen vorliegt.
2. Als zweites wurde das Zick-Zack-Muster in ein mäandrisches verändert. In den Spitzen des Zick-Zacks besteht die Möglichkeit, dass sich Bakterien während des Experiments ansammeln, zu wachsen beginnen und somit den Kanal verschließen. Diesem sogenannten Clogging soll durch möglichst wenige Ecken entgegengewirkt werden. [65] [66]
3. Da es das Ziel war, möglichst viele unterschiedliche Konzentrationen in einem Experiment zu messen, wurden am Ende des Gradientenmixers die Kanäle nicht mehr zusammengeführt, sondern jede entstandene Konzentration wurde in einen eigenen Kanal geleitet. So entstand die Möglichkeit acht Inducerkonzentrationen in einem Experiment zu messen und auszuwerten, was sowohl die Vergleichbarkeit der Messungen erhöht als auch die Zahl der benötigten Experimente verringert.

Das so abgeänderte Muster bildet das Grundgerüst, die Hauptkanäle, des Chemostaten. Es dient der Nährstoffversorgung der Zellen, dem Abtransport von Abfallprodukten und überschüssigen Zellen, sowie der Versorgung der Zellen mit dem entsprechenden Anregungsmolekül. Um all diese Zwecke

erfüllen zu können, wurde eine Kanalhöhe von $15\ \mu\text{m}$ gewählt. Bei einer Breite von $100\ \mu\text{m}$ im Chemostaten bleibt die Reynoldszahl kleiner eins und somit die Strömung laminar:

$$Re_C = \frac{\rho \cdot \nu \cdot D_h}{\mu} = \frac{10^3\ \text{kg m}^{-3} \cdot 2 \cdot 10^{-3}\ \text{m s}^{-1} \cdot 26 \cdot 10^{-6}\ \text{m}}{719,6 \cdot 10^{-6}\ \text{kg m}^{-1}\ \text{s}^{-1}} = 0,067 < 1 \quad (4.3)$$

Hierbei steht $\rho = 10^3\ \text{kg m}^{-3}$ für die Dichte der Flüssigkeit, $\nu = \frac{\text{Volumen pro Zeit}}{\text{Fläche}} = \frac{53\ \mu\text{l h}^{-1}}{15\ \mu\text{m} \cdot 100\ \mu\text{m}} = 2 \cdot 10^{-3}\ \text{m s}^{-1}$ für die mittlere Flussgeschwindigkeit im ersten Mischabschnitt, $D_h = \frac{4 \cdot \text{Breite} \cdot \text{Höhe}}{\text{Umfang}} = \frac{4 \cdot 100\ \mu\text{m} \cdot 15\ \mu\text{m}}{2 \cdot 100\ \mu\text{m} + 2 \cdot 15\ \mu\text{m}} = 26\ \mu\text{m}$ entspricht dem hydraulischen Durchmesser des Kanals und $\mu = 719,6 \cdot 10^{-6}\ \text{kg m}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ der Viskosität der Flüssigkeit bei 35°C . Als Flüssigkeit wurde Wasser angenommen, da Nährmedium von den verschiedenen Inhaltsstoffen jeweils so wenig enthält, dass sich seine Flusseigenschaften nicht wesentlich von Wasser unterscheiden.

Auf Grund des laminaren Flusses - die Reynoldszahl im Mixer mit einer Kanalbreite von $30\ \mu\text{m}$ beträgt $Re_M = 0,91 < 1$ - durchmischen sich die Konzentrationen rein diffusiv. Aus diesem Grund brauchen die Kanäle des Mixers eine ausreichende Länge um ein komplettes Durchmischen zu ermöglichen. Bei der benötigten Länge zeigen sich große Unterschiede zwischen theoretischer Berechnung, finiter Elemente Methode des Comsol-Modells und dem Experiment. So zeigt eine einfache Berechnung

$$Pe = \frac{\nu \cdot L}{D} = \frac{32716\ \mu\text{m s}^{-1} \cdot 30\ \mu\text{m}}{500\ \mu\text{m}^2\ \text{s}^{-1}} = 1963 \quad (4.4)$$

$$\Delta y_m = Pe \cdot L = 1963 \cdot 30\ \mu\text{m} = 58890\ \mu\text{m} = 58,9\ \text{mm} = 5,9\ \text{cm} \quad (4.5)$$

dass theoretisch $5,9\ \text{cm}$ für den ersten Mischungskanal benötigt würden. Pe steht in dieser Berechnung für die Péclet-Nummer, welche die Diffusionskonstante der AHLs in ein Verhältnis mit der Advektion setzt. Es steht ν für die Querschnittflussmenge, L für die Kanalbreite, die im Mixer $30\ \mu\text{m}$ beträgt und D für die Diffusionskonstante der AHLs. Jedoch zeigen sowohl die Simulation mit Hilfe der finiten Elemente-Methode in Comsol als auch ein Kalibrierexperiment in dem durch einen Einlass Puffer mit $10\ \mu\text{M}$ Fluorescein, durch den zweiten reiner Puffer gegeben wurde, wobei die Flussgeschwindigkeit pro Einlass bei $80\ \frac{\mu\text{l}}{\text{h}}$ lag, dass die Konzentrationen sich bereits bei einer Lauflänge von etwa $1,04\ \text{cm}$ durchmischen. Dies ist durch die Zwischenebenen zu erklären, in denen die Mischungen bei einer deutlich größeren Kanalbreite von

300 μm nicht laminar nebeneinander fließen, sondern senkrecht aufeinander treffen, bevor sie sich dann im nächsten Abschnitt weiter diffusiv vermischen (Abb. 4.1).

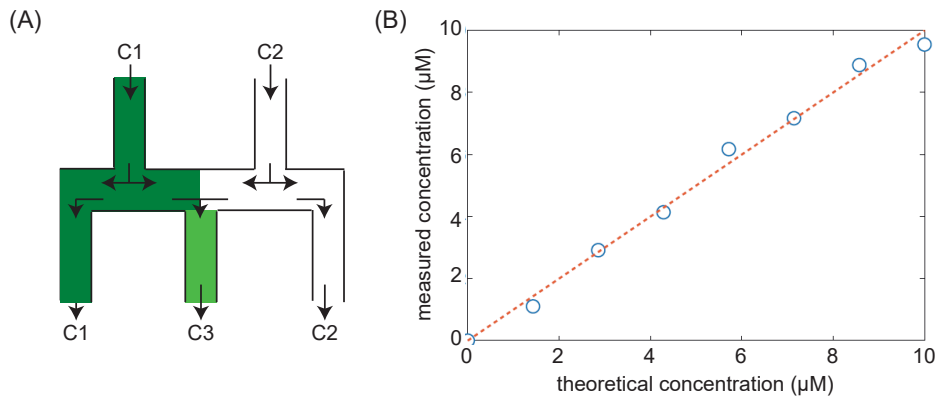


Abbildung 4.1: Zur Bestätigung der Funktionalität des Gradientenmixers wurde ein Kalibrierexperiment bei einer anfänglichen Flussgeschwindigkeit von $80 \mu\text{l h}^{-1}$ pro Einlass mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein durchgeführt. (A) Der linke Einlass wurde mit Puffer, der $10 \mu\text{M}$ Fluoreszein enthält, befüllt, der rechte Einlass enthielt reinen Puffer ohne Farbstoff. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am unteren Ende der Struktur im Bereich der Zellfallen. (B) Die Auswertung des Kalibrierexperiments zeigt einen linearen Gradienten links mit $0 \mu\text{M}$ nach rechts mit $10 \mu\text{M}$ Fluoreszein mit einer Abweichung von maximal 20 Prozent.

4.1.1.4 Die Fallen

Neben den Hauptkanälen wurden in die Mikrofluidikstruktur noch Fallen integriert. Diese wurden einer Veröffentlichung von Danino et al. entliehen [50].

In ihnen wird das Wachstum der Bakterien beobachtet. Ihre Höhe beträgt $1 \mu\text{m}$, was der optimalen Höhe entspricht um *E. coli*-Zellen festzuhalten, sie aber nicht am Wachstum zu hindern. Es wurden verschiedene Geometrien erstellt, wobei in dieser Arbeit vorwiegend eine rechteckige Form mit einer Länge von $100 \mu\text{m}$ und einer Breite von $60 \mu\text{m}$ genutzt wurde. Die Fallen waren an drei Seiten abgeschlossen und an einer der schmalen Seiten zum Hauptkanal hin geöffnet (Abb. 4.2). Dies ermöglichte den Abtransport überschüssiger Zellen, sowie den diffusiven Austausch von verbrauchtem und frischem Medium. Da möglichst ohne Hindernisse innerhalb der Zellkammer gearbeitet

werden sollte, musste auf die Dimension der Falle geachtet werden. Bei einem zu großen Verhältnis aus Breite und Höhe, kollabiert die Struktur und kann nicht mehr befüllt werden. [67] [68]

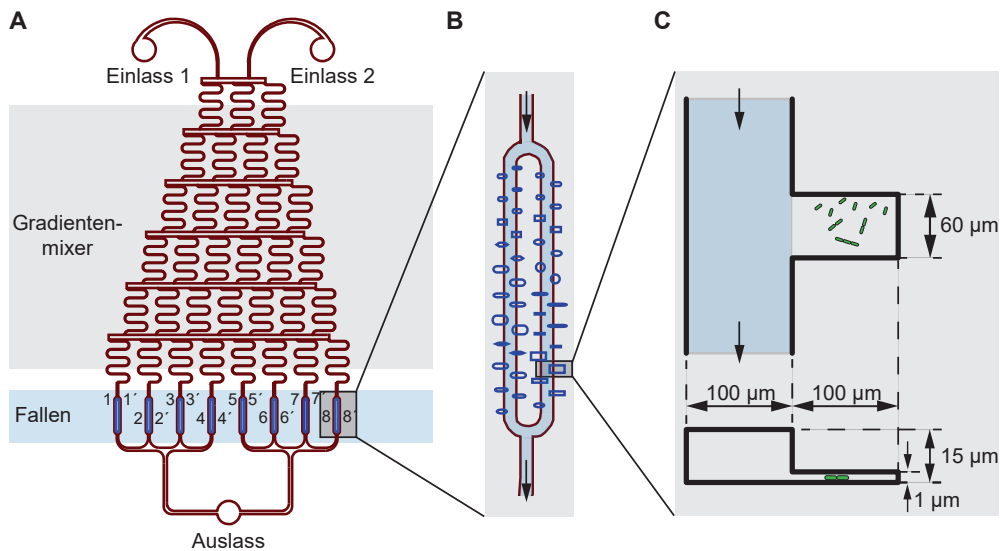


Abbildung 4.2: (A) Die Mikrofluidikstruktur wird an den Einlässen 1 mit reinem Medium und an Einlass 2 mit Medium, das die höchste gewünschte Inducerkonzentration enthält, befüllt. Das Medium läuft über Pumpen, angetrieben durch den Gradient, in dem sich mit jeder erreichten Stufe eine weitere Konzentrationsaufteilung bildet. Gelangt das Medium zu den Zellfallen, sind so 8 verschiedene, linear angeordnete Konzentrationen entstanden. (B) Das Medium wird beim anfänglichen Befüllen über Kapillarkräfte in die Fallen gezogen. Während des Experiments findet ein Nährstoffaustausch über Diffusion statt. (C) Die Hauptkanäle, welche der Zellversorgung und dem Abtransport dienen, haben eine Höhe von 15 μm , wodurch auch aus der Falle herauswachsende Zellen gut abtransportiert werden können. In den Fallen besteht eine Deckenhöhe von 1 μm , was der Höhe von *E. coli* entspricht und daher die Zellen festhält aber nicht in der Entwicklung hindert.

4.2 Lithographie

Mikrofluidik-Chips werden in zwei Schritten hergestellt. Im ersten Schritt, der Photolithographie, werden mittels Photolack Negative der gewünschten Strukturen auf Siliziumwafer aufgetragen. Darauf folgt die Softlithographie, in welcher der Wafer mit einem Polymer abgegossen und die daraus entstandene Struktur auf Glas aufgebracht wird.

4.2.1 Photolithographie

Die Ursprünge der Photolithographie liegen in der Halbleiter-Industrie, wo sie einen Schritt in der Anfertigung von Mikroelektronik-Bauteilen darstellt. Die Vorteile dieses Prinzips wurden bereits in den 1970er Jahren erkannt und auf andere Anwendungen angewandt. Unter anderem hat sich daraus die Herstellung von Mikrofluidik-Chips entwickelt, welche je nach Design, vielfältige experimentelle Möglichkeiten im molekularbiologischen Bereich bieten. Die Herstellung erfolgt in einem Reinraum, da bei solch kleinen Strukturen schon geringe Verunreinigungen ausreichen um sie unbrauchbar zu machen.

Um eine Struktur auf einen Silizium-Wafer aufbringen zu können, bedarf es einer Maske, auf die ein Negativ des gewünschten Designs gedruckt ist. Je nach Strukturgröße hat man zwei Möglichkeiten für solche Masken. Die weitaus Günstigere ist das Bedrucken transparenter Folien mit Hilfe eines hochauflösenden, aber handelsüblichen Druckers. Der große Nachteil dieser Variante ist die schlechtere Kantenschärfe der späteren Lackkante, wodurch Strukturen von kleiner als $20\ \mu\text{m}$ nicht sauber aufgelöst werden können, was dazu führt, dass die fertigen Strukturen zusammenfallen. Bedarf es solch hoher Auflösung ist eine Chrom-Maske das Mittel der Wahl. Auf eine Quarzglas-Platte ist Chrom aufgedampft, lediglich die Strukturfläche ist frei davon. Diese Chrom-Masken sind deutlich teurer in der Herstellung, liefern aber das bessere Endergebnis und sind langlebiger. Auf Grund dieser Vorteile und des Bedarfs einer Lackhöhe von nur $1\ \mu\text{m}$, haben wir uns für diese Variante entschieden.

Mit Hilfe der Maske wird die Struktur auf einen Lack beschichteten Siliziumwafer übertragen. Der Lack wird zuvor auf den Wafer aufgeschleudert, wobei man durch die Schleuderdauer und -geschwindigkeit die Schichtdicke bestimmen kann. Verschiedene Lacke, die sich in ihrer Viskosität unterscheiden verbessern das Ergebnis zusätzlich und vergrößern den Bereich aus dem die Schichtdicke gewählt werden kann (Abb. 4.3). Ist der Lack aufgetragen, wird

die Maske auf den Wafer gegeben und von oben mit einer Quecksilberdampflampe belichtet. Der Lack reagiert auf die i-Linie bei $\lambda = 365 \text{ nm}$ im Spektrum der Lampe. Nach einer Belichtungszeit, die von der Intensität der Lampe und der Schichtdicke des Lacks abhängt, kann der Lack entwickelt werden. Üblicherweise wird für die hier beschriebene Anwendung Negativ-Photolack verwendet. Das bedeutet, die belichteten Stellen polymerisieren aus und bleiben während des Entwickelns auf dem Wafer erhalten, so dass am Ende ein Negativ erzeugt wurde. Würde ein Positiv-Lack verwendet, verblieben die unbelichteten Stellen auf dem Wafer.

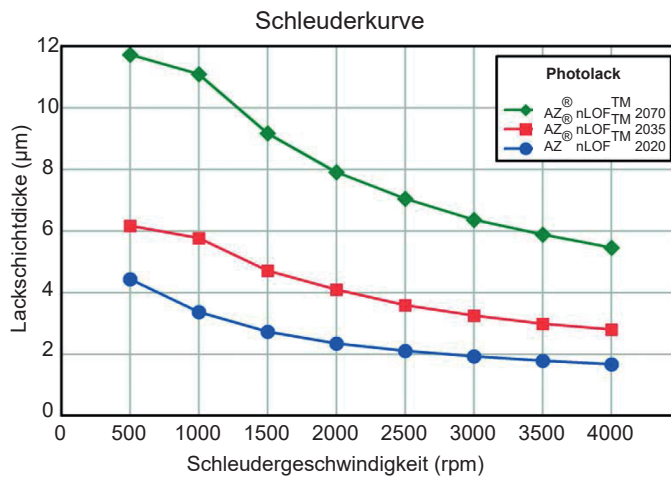


Abbildung 4.3: Anhand der Schleuderkurve kann der für die benötigte Schichtdicke erforderliche Lack und die zugehörige Schleudergeschwindigkeit ermittelt werden (siehe techn. Datenblatt zu AZ nLOF 2000 auf <https://www.microchemicals.com>).

Nachdem der Wafer entwickelt ist, kann man, sollte es nötig sein, die nächste Lackschicht aufbringen. In unserem Fall wurden im ersten Durchgang die Bakterienfallen in einer $1 \mu\text{m}$ hohen Schicht des SU-8-2 von MicroChem aufgetragen, belichtet und entwickelt. Im zweiten Schritt folgten mit Hilfe von nLOFTM2070 von MicroChemicals die $15 \mu\text{m}$ hohen Hauptkanäle nach dem gleichen Verfahren. Für diese zweite Schicht müssen Maske und Wafer vor der Belichtung sorgfältig gegeneinander ausgerichtet werden, damit die beiden Strukturen passgenau aufeinanderliegen. Andernfalls ist das Ergebnis unbrauchbar. Die Ausrichtung erfolgt mit Hilfe eines Maskaligners, in welchem die zweite Maske eingespannt ist. Mittels eines angebrachten Mikroskops und Stellschrauben für die x- und y-Richtung erfolgt die Justierung. Muster,

die bereits bei der Planung der Masken in das Layout eingefügt wurden, erleichtern die Einstellung. Ist dieser Schritt durchgeführt, wird entsprechend der Anforderungen des Lackes belichtet und entwickelt. Dieses Verfahren kann bei komplizierteren Strukturen noch öfter wiederholt werden, wobei immer von der dünnsten zur dicksten Lackschicht gearbeitet wird. Sind alle Schichten aufgetragen, wird der sogenannte Hardbake durchgeführt, bei dem der Wafer gebacken wird um den Lack abschließend auszuhärten und an den Wafer zu binden (Abb. 4.4).

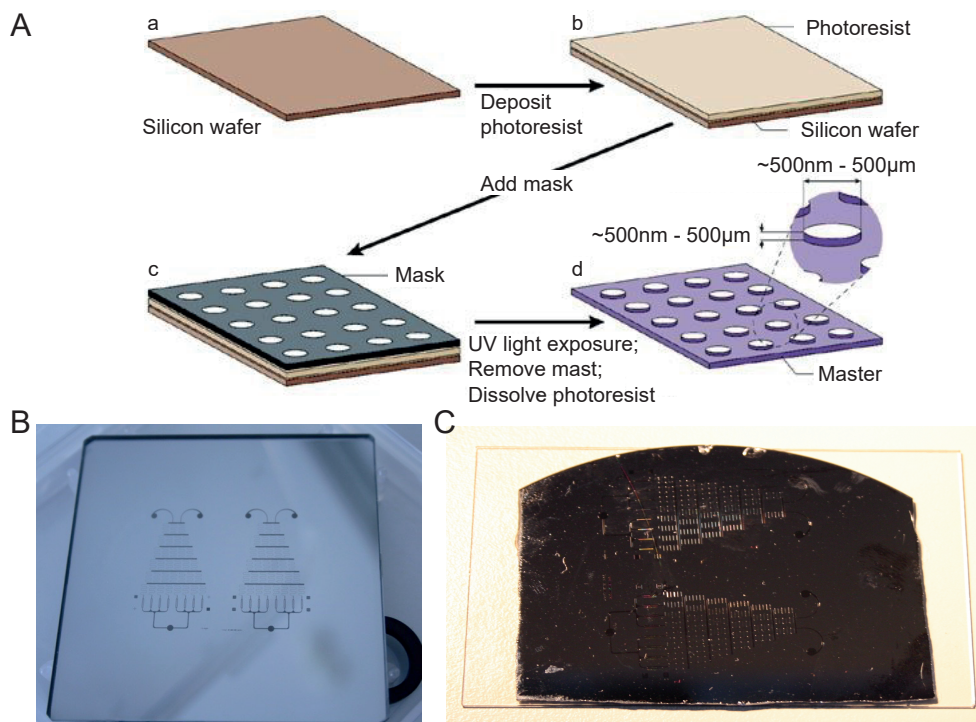


Abbildung 4.4: (A) Negativ-Photolack wird auf einen Siliziumwafer aufgeschleudert (a, b), im Anschluss wird die Chrommaske darauf gegeben und belichtet (c). Nach Entwicklung der belichteten Strukturen, steht der Master als Negativ zur Verfügung (d). [69] (B) Chrommaske mit den Versorgungskanälen der verwendeten Struktur (C) Fertiger und bereits verwendeter Siliziumwafer.

4.2.2 Softlithographie

Während die Photolithographie dazu dient, das Design der zweidimensionalen Maske in eine dreidimensionale Struktur auf dem Wafer zu übertragen, dient die Softlithographie dazu, von dem Negativ auf dem Wafer ein Positiv abzugießen um dieses für das Mikrofluidikexperiment zu verwenden.

Das verwendete Polymer heißt Polydimethylsiloxan (PDMS) und eignet sich auf Grund seiner Eigenschaften hervorragend für mikrobiologische Versuche. Es ist farblos und durchsichtig, was es zur Verwendung unter dem Mikroskop prädestiniert und da es zudem ungiftig und gasdurchlässig ist, ist es optimal als Material für den direkten Kontakt mit Bakterien geeignet. Es ist ein Polymer auf Siliziumbasis, mit Siloxanen als Struktureinheiten (Abb. 4.5B).

Das PDMS wird als Zwei-Komponenten-System geliefert, dem eigentlichen Polymer und dem Vernetzer, der das Aushärten katalysatorisch unterstützt. Die beiden Komponenten werden direkt vor Gebrauch in einem 10:1-Verhältnis gemischt. Die abzugießenden Wafer wurden zuvor in eine hitzebeständige Schale gelegt. Da durch das Mischen und das Gießen in dem PDMS Luftblasen entstanden sind, wird die Schale in eine Vakuumkammer gelegt, in der die eingeschlossene Luft wieder entzogen wird. Dieser Vorgang muss vollständig abgeschlossen sein, ansonsten können verbleibende Blasen die Kanäle unbrauchbar machen.

Nachdem die Luft entfernt wurde, wird die Schale mit dem Wafer und dem Polymer für zwei Stunden bei 110 °C ausgehärtet. Im Anschluss daran sollte man den Abguss noch etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur abkühlen lassen, damit sich Spannungen abbauen können und damit die Gefahr, den Wafer beim Abziehen des PDMS zu zerbrechen, verringert wird. Das PDMS wird nun vorsichtig von dem Silizium-Wafer gelöst, wobei die abgegossenen Strukturen als Positivabdruck darin erhalten bleiben. Für die Mikrofluidik-Anschlüsse werden mit einer Biopsie-Stanze an den vorgesehenen Stellen Löcher hineingestanz und der Abguss wird auf eine passende Größe zugeschnitten (Abb. 4.5A).

Als Boden für die Kammern werden handelsübliche Deckgläser verwendet. Sie sind für optische Anwendungen im Mikroskop abgestimmt, wodurch man eine optimale Bildgebung erzielt. Die Deckgläser und das PDMS werden im Ultraschallbad gereinigt, bevor sie in den Plasma Cleaner zur Oberflächenfunktionalisierung kommen. Diese ist nötig, da das PDMS ohne Funktionalisierung zwar van-der-Waals-Bindungen mit dem Glas eingehen würde, allerdings

sind die zu schwach, um den Drücken während des Experiments Stand zu halten. Durch die Behandlung im O_2 -Plasma Cleaner findet die Reaktion $SiOH \leftrightarrow SiO^- + H^+$ statt, wodurch das PDMS mit dem Glas eine kovalente und damit irreversible Bindung eingehen kann. Diese Bindung hält nun auch den Kräften stand, die vor allem während des Befüllvorgangs auftreten können. Nachdem Glas und PDMS miteinander verbunden sind, sind die Mikrofluidik-Chemostaten einsatzbereit (Abb. 4.5C).

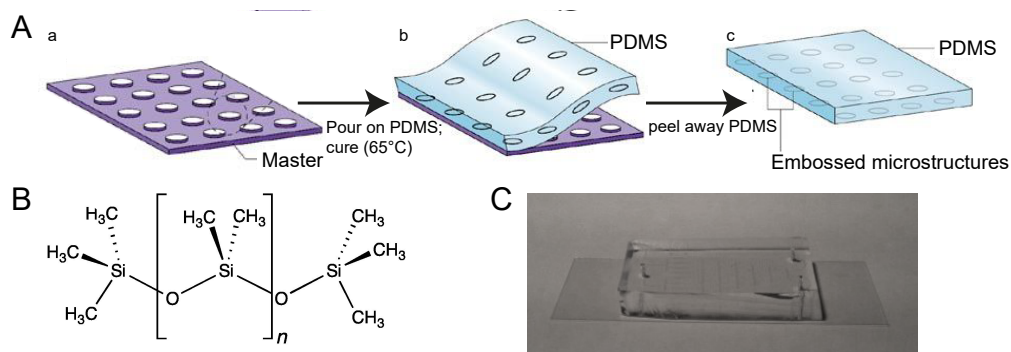


Abbildung 4.5: (A) Auf den Master wird PDMS gegossen, entlüftet und im Anschluss gebacken (a), nach der Aushärtung kann das PDMS abgezogen werden (b), wodurch ein Positiv zur weiteren Verwendung verfügbar ist (c) [69]. (B) PDMS-Struktur (C) Fertiges Mikrofluidik-Device.

Kapitel 5

Konjugation

Konjugation, auch lateraler oder horizontaler Gentransfer genannt, ist die Möglichkeit von Bakterien DNA an andere Zellen weiter zu geben.

Das Phänomen wurde 1946 das erste Mal durch Tatum und Lederberg beschrieben [70]. Sie berichten in ihrer Veröffentlichung von bakteriellem Sex, wobei es sich bei dem Spenderbakterium um die männliche (F^+) und dem Empfängerbakterium um die weibliche Zelle (F^-) handelt. Die Donorzelle stellt während des Konjugationsvorgangs eine Verbindung zur Empfängerzelle her, über die die zu transferierende DNA, meist in Form eines Plasmids, hindurchgeschleust wird. Bis heute sind nicht sämtliche Vorgänge in den Abläufen der verschiedenen Konjugationsmechanismen verstanden. Durch die bestehende Relevanz in Bezug auf die Weitergabe von Antibiotikaresistenzen zwischen verschiedenen bakteriellen Spezies und dem Potenzial Fremd-DNA gezielt in bestimmte Zelltypen einzuschleusen, handelt es sich bis heute um ein aktuelles Forschungsthema.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Informationsweitergabe von einer Zelle an die Nächste. Da DNA in lebenden Systemen DER Informationsträger ist und zudem das Empfängerbakterium bei Weitergabe mit neuen Fähigkeiten ausstatten kann, ist eine intensivere Betrachtung der Konjugation für eine Eignung als „Computing System“ im Rahmen des BACTOCOM-Projektes naheliegend. Es wurde mit dem Typ IV Sekretionssystem (T4SS) gearbeitet, welches eines der am besten untersuchten ist.

5.1 Konjugation des R388 Plasmids durch das Typ 4 Sekretionssystem

Das R388-Plasmid ist das kleinste derzeit bekannte Plasmid, welches ein Konjugationssystem beinhaltet. Es stammt aus der IncW-Inkompatibilitätsgruppe und ist etwa 34 kb lang, wovon rund die Hälfte der Gene für die Konjugation benötigt wird.

Die Maschinerie des T4SS auf dem R388-Plasmid besteht aus drei Funktionsmodulen, die jeweils aus verschiedenen Untereinheiten bestehen und die alle auf dem Plasmid kodiert sind. Jedes dieser Module hat im Prozess seine bestimmte Aufgabe, um die DNA, an die nächste Zelle zu geben:

1. Der Selector ist ein Relaxosom, das aus den Bestandteilen origin of transfer (*oriT*), einer Relaxase und einem Schnittprotein besteht.
2. Das Conduit ist ein Multiproteinkomplex, das den Proteintransporter bildet, durch den die DNA von einer Zelle in die andere geleitet wird
3. Das Coupling Protein führt den Selector und das Conduit zusammen und transportiert DNA aktiv in die Empfängerzelle

Auf dem R388-Plasmid liegt eine Region, die als der origin of transfer bezeichnet wird. Dieser Bereich besteht aus 330 bp und stellt den Ausgangs- und Endpunkt des Konjugationsprozesses dar. Er beinhaltet zudem eine Schnittstelle, an der der zu transferierende Strang des doppelsträngigen Plasmids durch das Schnittprotein des Selectors geschnitten wird. Der vordere Anteil des geschnittenen *oriT*'s bindet an das Relaxosom. Gemeinsam bilden die drei Teile den Selector.

Die Gene für das Conduit liegen ebenfalls auf dem R388-Plasmid. Es besteht aus zehn verschiedenen Proteinen und bildet einen Komplex, der als Pore zwischen den Zellen dient. Das Kopplungsprotein lagert sich an ihn an und bindet zudem den Selector. Was nun folgt, ist die Übertragung der DNA an die Empfängerzelle nach dem „shoot and pump“-Prinzip. Es bedeutet, dass die Relaxase aktiv durch den Kanal transportiert wird („shoot“), während die DNA passiv daran gebunden ist. Sobald dies geschehen ist, findet eine aktive, durch das Kopplungsprotein getriebene Bewegung der DNA statt („pump“). In der Empfängerzelle wird die einzelsträngige DNA wieder zu einem Ring zusammengesetzt und über die DNA-Polymerase zu einem Doppelstrang aufgefüllt. Ebenso wird in der Senderzelle das Plasmid wieder

zu einem Doppelstrang ergänzt, so dass am Ende das ursprünglich nur in einer Zelle vorkommende Plasmid in beiden Zellen vorhanden ist und von dort aus weiter an die jeweiligen Nachbarn verteilt werden kann. [10]

5.2 Nutzen für Bakterien

Den Nutzen der Konjugation kann man von zwei Seiten betrachten. Einmal aus der Sicht der Donorzelle, zum Zweiten aus der Sicht der Empfängerzelle, bzw. der Gesamtpopulation.

Die Donorzelle hat die Möglichkeit ihr genetisches Material weiterzugeben. Dadurch eröffnet sich ihr die Möglichkeit, neben Klonen, die durch Teilung entstehen, auch Zellen, die Fremd-DNA tragen, mit ihrer DNA zu infiltrieren. Sollten sich die Lebensbedingungen zu ihren Ungunsten ändern, so besteht die Möglichkeit, dass die Empfängerzelle in ihrer DNA Gene trägt, die es ihr ermöglichen zu überleben und damit das Erbgut zu erhalten.

Den größeren Nutzen dürfte allerdings die Empfängerzelle haben. Im Allgemeinen tragen die konjugierten Plasmide Gene, welche die Anpassungsmöglichkeiten der Zelle erweitern. So wird beispielsweise Antibiotika-Resistenz häufig auf diesem Weg von einem Individuum zum Nächsten übertragen. Breitet sich das Plasmid mit der Zeit über die gesamte Kolonie aus, so kann sie den Kontakt mit dem entsprechenden Antibiotikum überleben und sich weiter vermehren. Treffen zwei Bakterien aufeinander, welche unterschiedliche Plasmide konjugieren, können beide Zellen mit zusätzlichen Resistenzen hervorgehen. Auf diesem Weg entstehen in einer sehr effektiven Weise auch multiresistente Keime, welche vor allem im medizinischen Bereich ein großes Problem darstellen.

5.3 Materialien und Methoden

5.3.1 Zellen und Plasmide

Durch die Kollaborationen im BACTOCOM-Projekt, wurde ein geeignetes System von Prof. Fernando de la Cruz zur Verfügung gestellt. Verwendet wurde der *E. coli*-Stamm BW27783, welcher für die Konjugation geeignet ist. Zum Einsatz kam ein System, bei dem der oriT des R388-Plasmids auf ein pUA66-Plasmid verlegt wurde. Die übrige Konjugationsmaschinerie verblieb auf dem R388-Plasmid und beide Plasmide wurden in die Senderzelle eingebracht.

Da das Schnittenzym des Konjugationssystems nur an der Schnittstelle des *oriT*'s schneidet und die Relaxase daran bindet, wird das Plasmid übertragen, welches geschnitten wurde. So verbleibt die Konjugationsmaschinerie in der Senderzelle, während das pUA66-Plasmid an den Empfänger übertragen wird. Dieses System kam in zwei Nachweismethoden mit unterschiedlichen Analyseschwerpunkten zum Einsatz. [71] [72]

5.3.1.1 parS-parB-System

Die Erste der beiden Nachweismethoden erfolgte über das parS-parB-System. Hierbei befinden sich auf dem konjugierten Plasmid parS-Bindestellen. In der Empfängerzelle wird konstitutiv GFP exprimiert, das einen Komplex mit einem ParB-Protein, welches ursprünglich der Chromosomenteilung in *Caulobacter crescentus* dient, bildet [73]. Gelangt nun das pUA66-Plasmid in die Empfängerzelle, lagert sich das ParB-Protein an die *parS*-Bindestelle an. Durch das lokal konzentrierte GFP, erfolgt der Nachweis in Form von hellen Punkten in der Zelle auf dem Mikroskopbild (Abb. 5.1). Ist das Fusionsprotein dagegen ungebunden, kann keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. [74]

5.3.1.2 GFP-RFP-System

Die zweite Nachweismethode erfolgt ausschließlich über Fluoreszenzproteine. Auf dem zu konjugierenden Plasmid befindet sich das *gfp*-Gen. Das führt dazu, dass die Senderzellen grün fluoreszierend sind, die Empfängerzellen es jedoch erst werden, wenn sie das Plasmid erhalten haben. Um die Empfängerzellen von Sendern zu unterscheiden, die erst spät mit der Expression starten, wurde den Empfängerzellen zusätzlich ein pBAD-Plasmid gegeben, das ein *rfp*-Gen der Variante DsRed2mut enthält, welches konstitutiv exprimiert wird. So können beide Zelltypen eindeutig voneinander differenziert werden (Abb. 5.2).

5.3.2 Zellpräparation

Die Zellen wurden getrennt nach Sender- und Empfängerzellen in frischem LB-Medium unter Zugabe der jeweils benötigten Antibiotika aus einem -80° C -Freeze-Stock angesetzt. Das Wachstum erfolgte zunächst über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37° C mit 100 rpm. Die Dichte lag nach etwa 15 Stunden bei einer OD₆₀₀ zwischen 7 und 9. Um die Zellen erneut in die exponentielle Wachstumsphase zu bringen, wurden sie abzentrifugiert und in 10 ml frischen LB-Medium auf eine Dichte von 0,01 resuspendiert. Anschließend sind sie

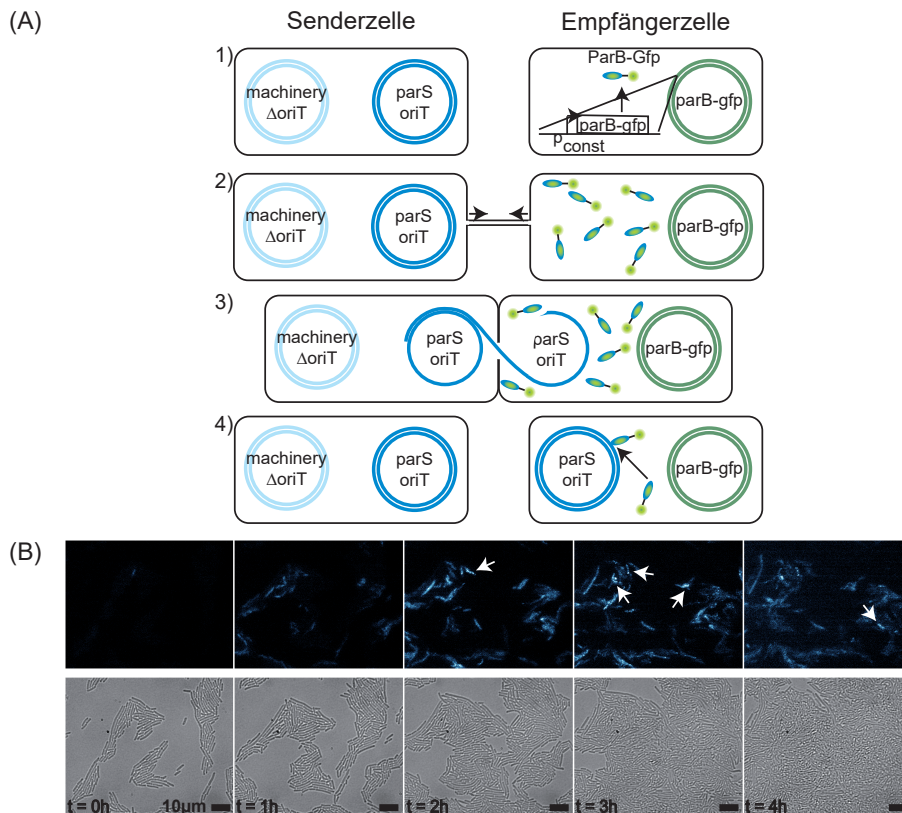


Abbildung 5.1: (A) Die Senderzelle besitzt zwei Plasmide: eines enthält die Konjugationsmechanismen, das andere den OriT und eine parS-Bindestelle. In der Empfängerzelle befindet sich ein Plasmid, welches ein parB-GFP-Fusionsprotein exprimiert (1). Die Senderzelle entwickelt einen Pilus, der an die Empfängerzelle anbindet und diese an sich heranführt, während in der Empfängerzelle bereits die Expression des Fusionsproteins gestartet ist (2). Sobald ein Kontakt zwischen den beiden Zellen besteht, wird durch das Conduit in der Senderzelle ein Kanal ausgebildet, durch den die DNA in die Empfängerzelle gelangt (3). Nach erfolgter Transfusion bildet sich der Kanal zurück, DNA-Polymerase vervollständigt das Plasmid und die bereits gebildeten Fusionsproteine binden mit dem parB-Protein an die parS-Bindestelle (4). (B) Einzelzellaufnahmen, in denen *E. coli* BW27783 in einer einzelnen Schicht wächst. Bei $t = 1$ h startet die parB-GFP-Expression. Konjugation kann ab $t = 2$ h nachgewiesen werden, in dem in den Fluoreszenzaufnahmen helle Punkte zu beobachten sind, welche durch die Bindung des Fusionsproteins an die parS-Bindestelle zustande kommen (Pfeile). Die konjugierten Plasmide verbleiben über den gesamten Beobachtungszeitraum von $t_{ges} = 15$ h in der Zelle. Frühere Veröffentlichungen, in denen bereits mit dem System gearbeitet wurde, zeigten, dass Zellen ohne die *parS*-Bindestelle höchstens eine sehr schwache Fluoreszenz aufweisen [75].

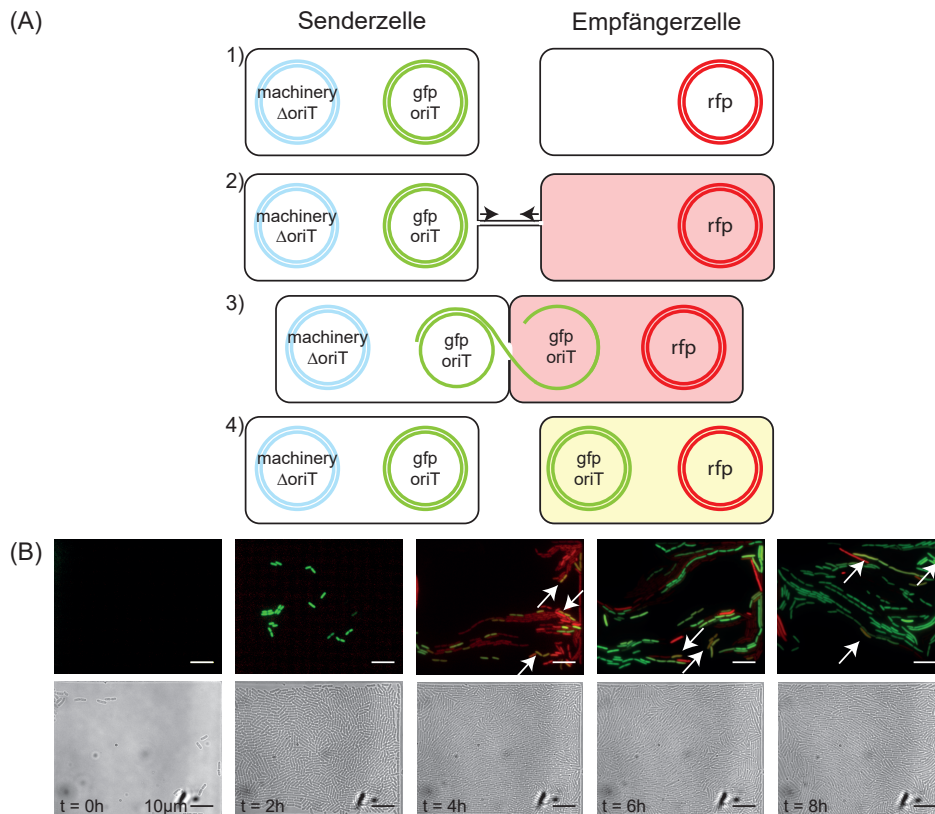


Abbildung 5.2: (A) Die Senderzelle besitzt zwei Plasmide: eines enthält die Konjugationsmaschinerie, das andere den OriT und das GFP-Gen. In der Empfängerzelle befindet sich ein Plasmid, durch welches RFP exprimiert wird (1). Die Weitergabe des zu konjugierenden Plasmids erfolgt analog zum bereits beschriebenen parS-parB-System (2 und 3). Nach abgeschlossener Konjugation startet die GFP-Expression in der Empfängerzelle (4). (B) Einzelaufnahmen, in denen *E. coli* BW27783 in einer einzelnen Schicht wächst. Bei $t = 2$ h sind die Senderzellen als grün fluoreszierend zu erkennen. Empfängerzellen sind mit einsetzender RFP-Expression rot fluoreszierend. Sobald sie das Plasmid der Senderzelle empfangen haben, startet die GFP-Produktion. Durch die Überlagerung beider Farben sind diese Zellen in gelblicher Färbung von dem Rest unterscheidbar.

für etwa 3 Stunden erneut bei 37°C und 100 rpm inkubiert worden, bis sie auf eine Dichte von $OD_{600} = 1$ gewachsen sind. Um sie für das Experiment im Chemostaten fertig zu machen, erfolgte eine erneute Abzentrifugation und Resuspension in jeweils 1 ml frischem LB-Medium, diesmal ohne die Zugabe von Antibiotika. Die OD_{600} lag nun für Sender und Empfänger bei 10. Zum Schluss wurden beide in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und in den Chemostaten gefüllt, in dem sie während des Experiments durchgängig mit frischem Medium versorgt werden und in der exponentiellen Wachstumsphase verbleiben konnten.

5.3.3 Versuchsaufbau

Nachdem die Zellen präpariert und in den Chemostaten eingebracht waren, wurde an diesen die Nährstoffversorgung angeschlossen. Über eine Pumpe gelangten 80 μ l frisches LB-Medium pro Stunde an die Zellen. Gleichzeitig wird dadurch ein Zellüberschuss sowie Abfallprodukte abtransportiert. Über eine Inkubationsbox wurde über den gesamten Messzeitraum von zwölf Stunden eine konstante Temperatur von 37°C gehalten. Die Aufnahmen erfolgten alle drei Minuten über einen Zeitraum von zwölf Stunden.

5.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Messungen konnte zu einem großen Teil nicht automatisiert durchgeführt werden, da, insbesondere beim parS-parB-System, die Programme die punktuelle Fluoreszenz nur sehr unzuverlässig von Hintergrundrauschen unterscheiden konnten. Als Hilfsmittel für die händische und die Bulk-Auswertung diente das frei erhältliche Programm ImageJ (Download über <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Für die Einzelzellauswertung, wurde, soweit möglich, das von Herrn Tiago Ramalho geschriebene Programm BigCellBrother genutzt (Download über <https://tmramalho.github.io/bigCellBrotherGUI>).

Zunächst wurde das Wachstum der Zellen in der Wachstumskammer analysiert. Dafür wurde in ImageJ ein Schwellwert an das Hellfeld-Bild angelegt, über den nur die mit Zellen bewachsenen Bereiche gespeichert und gemessen werden konnten. Ebenso wurde mit den Fluoreszenzaufnahmen verfahren. In diesem Fall wurden ausschließlich die Stellen abgespeichert und gemessen, die fluoreszierende Zellen des entsprechenden Farbbereichs enthält. Der Anteil der Empfängerzellen ergibt sich aus dem Quotienten von rot fluoreszender Fläche und Gesamtfläche aller Zellen. Dabei ist zu beachten, dass die RFP-Expression erst nach 2,5 h einsetzt und sehr schwach ist, wodurch auch Rauschen in die

Messung einfließt. Dies führt innerhalb der ersten Stunde zu Werten, die in der Gesamtbewertung vernachlässigt werden müssen, da sie nicht der Realität entsprechen. Somit startet die Beurteilung des Empfängeranteils erst mit $t = 3,5$ h.

5.3.5 Ergebnisse und Diskussion

Die Auswertung mit ImageJ zeigt, dass die Zellen ohne längere lag-Phase direkt in das exponentielle Wachstum starten. Dieses ist 2 h 45 min beobachtbar, wobei die Generationsdauer bei 42 min liegt. Nach dieser Zeit ist die Wachstumskammer mit Zellen gefüllt und das exponentielle Wachstum kann nicht mehr verfolgt werden. Der Anteil der Empfängerzellen schwankt während des gesamten Zeitraums um den Wert von 50% , wie es durch die anfängliche Präparation der Zellen auch erwartet wurde. Die erste Zelle mit konjugiertem Plasmid ist bei $t = 3$ h 15 min zu beobachten. Bis $t = 10$ h 6 min werden in einer händischen Auswertung insgesamt 46 Empfängerzellen gezählt, bei denen GFP-Expression nachgewiesen werden kann, die nicht der Zellteilung aus der vorhergehenden Generation entstammt, sondern durch Konjugation ermöglicht wird. Dies entspricht einer Konjugationsrate von $6,7 \text{ h}^{-1}$. Dabei findet die Plasmidweitergabe ausschließlich an Grenzbereichen statt, an denen Senderzellen und Empfängerzellen aufeinanderstoßen. Eine Weitergabe des Plasmids von Empfängern an andere Empfänger ist nicht vorgesehen und kann auch nicht beobachtet werden. Das konjugierte Plasmid hat zudem keinerlei direkt beobachtbare Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Es kann jedoch eine leicht erhöhte RFP-Expression gegenüber den nicht konjugierten Empfängern beobachtet werden (Abb. 5.2). Die Wahrscheinlichkeit der Plasmidweitergabe ist stark vom Wachstumsverlauf der Zellen in der Mikrofluidikkammer abhängig. Konjugation ist erst möglich, wenn Sender- auf Empfängerzellen treffen. Teilen dann Zellen, die bereits ein Plasmid erhalten haben, die Sender von den Empfängern ab, findet kein weiterer Konjugationsprozess statt. Diese Abtrennung kann sowohl durch mehrere Plasmidweitergaben als auch durch Zellteilung entstehen. Im Laufe des Experimentes kann diese Barriere durch wachstumsbedingte Zellverschiebungen auch wieder durchbrochen werden, was neue Grenzbereiche schafft, die erneute Konjugation ermöglichen. Da diese Dynamiken nicht vorhersagbar sind, lässt sich anhand der durchgeführten Experimente keine konkrete Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer Plasmidweitergabe zu einem bestimmten Zeitpunkt treffen.

Bereits diese grobe Auswertung der Messungen zeigt, dass Konjugation für das BACTOCOM-Projekt ein interessantes Thema ist. Aus verschiedenen

Gründen wird es in dieser Arbeit und mit dem vorliegenden System jedoch nicht weiterverfolgt:

1. Die Konjugation mit dem vorliegenden System ist nicht steuerbar. Sie kann nicht durch Zugabe eines Inducers oder Repressors an- oder ausgeschaltet, bzw. verstärkt oder abgeschwächt werden.
2. Konjugation findet nur im Grenzbereich statt, in dem Sender- und Empfängerzellen aufeinandertreffen. Dadurch ist die Möglichkeit zur Verbreitung des Plasmids sehr begrenzt.
3. Die Konjugation findet vergleichsweise selten statt. Mit 6,7 Ereignissen pro Stunde liegt die Konjugationsrate zwar höher als die Teilungsrate, jedoch verdoppelt sich mit jeder Zellgeneration die Zellzahl. Dadurch sinkt der Anteil der frisch konjugierten Zellen mit jeder Generation.

Trotz dieser Punkte ist das hier genutzte System ein spannender Kandidat für zukünftige Anwendungen. Insbesondere bei der Darstellung von Grenzflächen kann sein Einsatz von Nutzen sein.

Bisher liegt der Fokus bei der Informationsweitergabe von Bakterien auf Systemen wie dem Quorum Sensing, welches auch in dieser Arbeit intensiv betrachtet wird. Arbeiten zur Konjugation beziehen sich meist auf die intrazellulären Abläufe, die die Weitergabe von Plasmiden überhaupt erst ermöglichen [76] [77]. Erste Untersuchungen zur Nutzbarkeit der Konjugation zeigen Veröffentlichungen von A. Goni-Moreno et al., in denen logische Gatter aus konjugativen Plasmiden erstellt werden, indem ein Empfängerstamm Plasmide aus verschiedenen Donorstämmen empfängt [78]. In dieser Veröffentlichung wird die Möglichkeit anhand eines theoretischen Modells berechnet und mit Hilfe dessen Ergebnisse erläutert. Eine experimentelle Umsetzung hat bisher nicht stattgefunden.

Auf dem Gebiet des lateralen Gentransfers bieten sich viele Möglichkeiten um ein besseres Verständnis zu schaffen, das zukünftig in verschiedensten Bereichen wie der Medizin [79] von Nutzen ist. Dazu braucht es Informationen zur Auswirkung von Umwelteinflüssen, der Konjugation zwischen verschiedenen Spezies und vieles mehr, welche in zukünftigen Arbeiten betrachtet werden müssen.

Kapitel 6

Quorum sensing

„Quorum sensing (...) beschreibt eine bestimmte Form der Zell-Zell-Kommunikation, in welcher Gene in Abhängigkeit von der Zelldichte exprimiert werden, nachdem eine kritische Konzentration von Signalmolekülen (Autoinducer) erreicht wurde...“ [80]. Mit diesem einen Satz beschreiben Winzer et al. ein Phänomen, welchem auf Grund seiner Eigenschaften in den letzten 20 Jahren verstärkt Aufmerksamkeit gewidmet wurde.

Der Begriff des Quorum sensing (QS) wurde erstmals von Fuqua et al. gebraucht [81], wobei Quorum ursprünglich aus dem politischen Vokabular stammt und die Mindestzahl an Stimmberechtigten angibt, die es zur Beschlussfähigkeit braucht.

Erste Hinweise auf dessen Existenz gab es schon rund 30 Jahre vor seiner Namensgebung, als Tomasz 1965 die Abhängigkeit des Kompetenzzustandes in dem grampositiven Bakterium *Pneumococcus* (heute: *Streptococcus pneumoniae*) von einem „hormonartigen Zellprodukt“, welches in direktem Zusammenhang mit der Zelldichte steht, beschreibt [82]. In gramnegativen Bakterien stammt die erste Publikation über Autoinduktion aus dem Jahre 1970 von Nealson et al. Sie beschreibt den sprunghaften Anstieg der Lumineszenz in *Photobacterium fischeri* (bis 2007 auch *Vibrio fischeri*, seit 2007: *Aliivibrio fischeri*) in Abhängigkeit von der Populationsdichte. Des Weiteren kommt er zu dem Ergebnis, dass es sich dabei um Transkriptionskontrolle handelt, kann jedoch nicht sagen ob diese zunächst reprimiert ist, oder ob sie aktiviert wird [83]. Der Nachweis, dass die Expression durch einen Aktivator induziert wird, gelingt zwei Jahre später Eberhard [84]. Jedoch erst 1981 können Eberhard und Nealson den Aktivator, das N-(β -Ketocaproyl)-Homoserinlacton, in einer gemeinsamen Publikation benennen [85]. Heute ist dieses als N-(3-oxo-Hexanoyl)-L-Homoserinlacton (kurz: 3-oxo-C6-HSL) bekannt und eines von inzwischen vielen bekannten Acylhomoserinlactonen

(AHLs). 1983 veröffentlicht Engebrecht et al. die genetischen Mechanismen des lux-Systems, welches der Luziferase-Produktion und damit der Biolumineszenz in *A. fischeri* zugrunde liegt. In der selben Publikation wird des Weiteren gezeigt, dass es möglich ist, die lux-Genkassette in *Escherichia coli* zu transformieren und in diesem Organismus arbeiten zu lassen [86]. Damit ist der Weg für den heutigen Einsatz dieses Systems in der synthetischen Biologie geebnet. Als Fuqua et al. schließlich 1994 in einem Minireview dem Quorum sensing seinen Namen verleiht, sind nicht nur die Bedeutung der einzelnen Abschnitte der Genkassette entschlüsselt, sondern es sind bereits weitere, analog funktionierende Systeme gefunden [81]. Auch in der darauffolgenden Zeit wurde erfolgreich nach weiterer Zell-Zell-Kommunikation gesucht. Bis 2003 hat man über 70 lux-artige Quorum sensing-Systeme gefunden [87] und es wird angenommen, dass ca. 7% der Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien AHL-basiertes Quorum sensing zur bakteriellen Kommunikation nutzen [88]. Auch die Zahl der bekannten Systeme in grampositiven Bakterien ist gestiegen und es konnte der sogenannte Autoinducer-2 (AI-2) nachgewiesen werden, welcher sowohl in gramnegativen wie auch grampositiven Zellen vorkommt [89] [48].

In den letzten zehn Jahren hat QS Einzug in die synthetische Biologie gehalten und wird häufig verwendet, wenn es darum geht Bakterienpopulationen zu synchronisieren [90] [91], oder zelluläre Signale über Distanzen, in denen kein Zellkontakt mehr möglich ist, zu übermitteln [92] [93].

Da in dieser Arbeit ausschließlich lux-artiges, AHL-basiertes Quorum sensing zum Einsatz kommt, wird im Folgenden lediglich ein kurzer Überblick zu Peptid-basierter Zell-Zell-Kommunikation in grampositiven Bakterien gegen und im Anschluss ausführlich auf das angewandte System eingegangen.

6.1 Peptidbasiertes Quorum sensing in grampositiven Bakterien

Gram-positive Bakterien nutzen Autoinducer-Peptide (AIPs) in Quorum sensing Systemen. Da es sich hier um größere Moleküle handelt, ist eine passive Diffusion durch die Zellwand nicht mehr möglich und es werden andere Mechanismen von den Bakterien verwendet.

Bei dem System handelt es sich um ein Zwei-Komponenten Antwortsystem. Zunächst wird ein Protein exprimiert, welches geschnitten wird um daraus den

Autoinducer herzustellen. Dieses Teilstück wird durch ein Membranprotein namens ATP-binding cassette (ABC) Transporter in den extrazellulären Raum geschleust. Hier sammeln sich die Peptidketten mit steigender Zellzahl an und mit Erreichen eines Schwellwertes binden die Signalmoleküle an eine Histidin-Sensorkinase. Durch eine nun erfolgende Phosphorylierungskaskade, welche mit der Phosphorylierung eines Regulationsproteins endet, welches nun als Transkriptionsfaktor zum Einsatz kommt und die Antwort auf den Anstieg der Inducerkonzentration einleitet.

Einige dieser Systeme sind bereits gut untersucht. So beispielsweise das Kompetenz/Sporulationssystem in *Bacillus subtilis*. Die Zelle entscheidet bei schlechter Nährstoffversorgung in diesem System, ob sie in den Sporulationszustand oder in den kompetenten Zustand wechselt [94] [95] [96].

6.2 Quorum sensing zwischen verschiedenen Spezies

Eine weitere Art der Signalübertragung erfolgt über die Grenzen der eigenen Spezies hinweg. Das Signalmolekül ist hier vom Typ Autoinducer-2 (AI-2).

Eine genaue Funktion konnte dieser Art des Quorum sensings bisher nicht zugeordnet werden. Es wird jedoch von einer Kommunikation zwischen den Arten ausgegangen, da sich das luxS-Gen, welches die AI-2 Synthase codiert, bereits 2003 in 35 von 89 bis dahin sequenzierten Genomen befindet [97]. Zwar sind heute verschiedene AI-2 Moleküle bekannt, allerdings läuft deren Synthese bis zu einer Vorstufe des fertigen Moleküls hochkonserviert ab. Diese Vorstufe, dem 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD), entsteht durch die Zerlegung von S-adenosylhomocystein (SAH) durch LuxS und wird dann als stark reaktives Produkt, abhängig von der jeweiligen Spezies, zu einem der AI-2 Signale synthetisiert [98] [99] [100].

Das am besten untersuchte System in diesem Fall ist das von *Vibrio harveyi*, in welchem AI-2 zusammen mit zwei weiteren Molekülen das luxR-System reguliert, indem es dessen mRNA destabilisiert [101].

6.3 Lux-artiges Quorum sensing in gramnegativen Bakterien

Wie zu Beginn dieses Kapitels bereits geschrieben, ist das lux-System das am besten untersuchte Quorum sensing System in gramnegativen Bakterien. Es existieren viele weitere homologe Systeme, welche sich lediglich in der Struktur der beteiligten Signalmoleküle, den Acyl-Homoserin Lactonen (AHLs), und Proteine unterscheiden. Da die grundlegenden Funktionen jedoch analog ablaufen, sei hier ausschließlich das lux-System detailliert beschrieben, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

Das lux-System kommt in der Natur in dem marinen Bakterium *A. fischeri* vor und reguliert dessen Biolumineszenz, indem die Luziferaseproduktion unter dessen Kontrolle, und damit in Abhängigkeit von der Populationsdichte, steht [83] [86]. Die Bakterien leben sowohl freischwimmend im Meerwasser als auch in den Leuchtorganen anderer Meeresbewohner. Im großen Volumen des Meeres ist die Populationsdichte überaus gering ($<10^2$ Zellen/ml) und der induzierende Schwellwert des Signalmoleküls wird nicht erreicht [102] [103]. Befinden sich die Zellen jedoch in dem Leuchtorgan eines Tieres, können sie bis zu einer Dichte von mehr als 10^{10} Zellen/ml wachsen, was ausreicht um die Lumineszenz anzuregen [104]. Je nach Wirt dient das Leuchtorgan unterschiedlichen Funktionen. So imitiert der nachtaktive Tintenfisch *Euprymna scolopes* einfallendes Mondlicht um sich vor seinen Fressfeinden zu verstecken, wohingegen der Fisch *Monocentris japonicus* damit potentielle Partner anlockt [105].

Die Regulierung der Luziferaseproduktion erfolgt durch die lux-Genkassette, zu der das luxR-Gen, sowie das luxICDABE-Operon gehören. Während luxCDABE für die Biolumineszenz benötigt werden, dienen die Gene luxR und luxI der Expressionskontrolle. Die gesamte Genkassette wird bereits vor Induktion auf einem sehr niedrigen basalen Level transkribiert, wodurch eine geringe Zahl LuxR- und LuxI-Proteine in der Zelle vorhanden ist.

LuxI ist die Synthase des Autoinducers 3-oxo-C6-HSL. Es wandelt enzymatisch die Substrate S-Adenosyl-Methionin (SAM) und acyliertes Acyl-Carrier-Protein (acyl-ACP) in die Produkte 5'-Methylthioadenosin, Apo-ACP und 3-oxo-C6-HSL, das in diesem Fall benötigte AHL, um [106] [107] [108] [109]. Für die Genregulation wird von diesen Produkten lediglich das AHL gebraucht. Es kann passiv durch die Zellmembran diffundieren, was zu einem gleichmäßigen Konzentrationsanstieg im intra- und interzellulären Raum führt. Durch

6.3. LUX-ARTIGES QUORUM SENSING IN GRAMNEGATIVEN BAKTERIEN 59

die bis dahin ausschließlich basale Produktion, braucht es eine hohe Zelldichte um den benötigten Schwellwert zu erreichen. Ist die Schaltkonzentration an Autoinducern erreicht, bindet das AHL an eine N-terminale Domäne des LuxR-Proteins. Im Rahmen einer Konformationsänderung wird eine C-terminale Domäne frei. Anschließend dimerisieren zwei LuxR-AHL-Komplexe, die dann an eine 20 Basen lange Sequenz im lux-Promotor, die sogenannte lux-Box, binden [110] [111] [112]. Dies führt zu einer Induktion der Expression der gesamten Genkassette. Das bedeutet, nicht nur die Zielproteine werden verstärkt produziert, sondern auch die Regulationsproteine, wodurch das System in eine positive Rückkopplung mündet und, im Falle der lux-Kassette, sowohl die Lumineszenz als auch die AHL-Konzentration sprunghaft ansteigt (Abb. 6.1).

Die lux-Box ist eine hochkonservierte Sequenz, welche die Konsensus-Sequenz RNSTGYAXGATNXTRCASRT für LuxR-artige Proteine aufweist, dabei entspricht N = A, T, C oder G; R = G oder A; S = C oder G; Y = C oder T und X = N oder einer Lücke in der Sequenz [112].

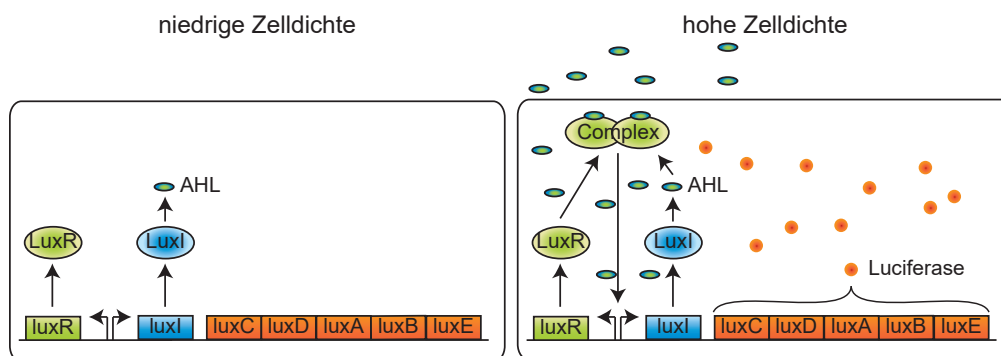


Abbildung 6.1: Bei niedriger Zelldichte findet eine Basalexpression der den Promotoren nachgeschalteten Gene statt. Es steht dadurch eine geringe Menge der für die Induktion benötigten Proteine LuxI und LuxR zur Verfügung. LuxI dient als Synthase für AHL. Dieses diffundiert durch die Zellmembran, wodurch die Konzentration innerhalb der Zellkolonie bei steigender Zellzahl gesamthaft wächst. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass AHL und LuxR einen Komplex bilden, welcher an die Promotorenbox bindet und die Genexpression induziert, was zu einer positiven Rückkopplung führt.

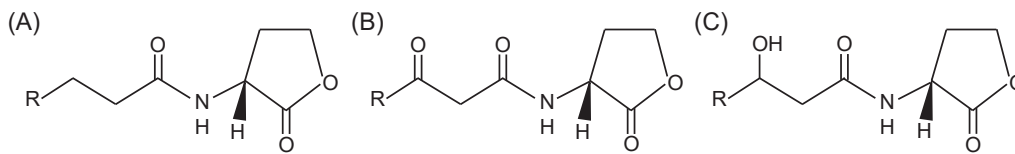


Abbildung 6.2: AHL-Grundgerüste (A) N-Acyl-L-Homoserinlacton (B) N-3-Oxoacyl-L-Homoserinlacton (C) N-3-Hydroxyacyl-L-Homoserinlacton [138]

6.4 Die Gruppe der AHLs

Der Botenstoff AHL ist ein kleines Molekül, das aus einem Homoserin besteht, welches zu einem Lactonring geschlossen ist. Über eine Acylgruppe ist an die Aminogruppe dieses Rings eine Fettsäure gebunden. Die Vielzahl an unterschiedlichen AHLs entsteht durch die verschiedenen Längen der Fettsäureketten von C4 bis C18, die gesättigt und ungesättigt vorliegen können, sowie durch mögliche Hydroxy- oder Oxosubstitutionen am C3-Atom [112]. Die Benennung der AHLs richtet sich ausschließlich nach der Anzahl der C-Atome und auftretenden Substitutionen der Seitenkette. Die C-Atome des Homoserins bleiben dabei unberücksichtigt.

Bis auf die Ausnahme des C7-HSL in *Rhizobium leguminosa* und *Serratia marcescens*, haben die Fettsäuren eine gerade Anzahl an C-Atomen. Dies ist bedingt durch das Acyl-ACP, von dem in der Synthese der AHLs die Seitenkette stammt und welches immer C2-Untereinheiten überträgt. Die Ketten der AHLs sind, wie alle Fettsäuren, aliphatische Monocarbonsäuren, welche unpolar und lipophil sind. Daher hängt die Lipophilie eines AHLs von der Länge der Fettsäurekette ab. Mit jeder C2-Untereinheit steigt $\log(P)$ um eins und damit die Lipophilie um eine Größenordnung [137].

AHLs ist es möglich frei durch die Zellmembran zu diffundieren und somit für eine gleichmäßige Anreicherung innerhalb und außerhalb der Zelle zu sorgen. Jedoch wurde für 3-oxo-C12-HSL nachgewiesen, dass sie sich auch der Hilfe membranassoziierter Pumpen bedienen um in den extrazellulären Raum zu gelangen [139]. Da sich einige der Strukturen sehr ähneln und trotz der Vielfalt an Möglichkeiten mehrere Arten den gleichen Inducer produzieren, ist Cross-Talk zwischen verschiedenen Systemen und Spezies nicht ausgeschlossen (Tab. 6.1).

Organismus	lux-artiges QS-System	AHL	Referenz
Vibrio fischeri	LuxI / LuxR	3OC6-HSL	[84] [86]
Aeromonas hydrophila	AhyI / AhyR	C4-HSL	[113]
Aeromonas salmonicida	AsaI / AsaR	C4-HSL	[114]
Agrobacterium tumefaciens	TraI / TraR	3OC8-HSL	[115] [116]
Burkholderia cepacia	CepI / CepR	C8-HSL	[117]
Chromobacterium violaceum	CviI / CviR	C6-HSL	[118]
Enterobacter agglomerans	EagI / EagR	3OC6-HSL	[119]
Erwinia carotovora	ExpI / ExpR CarI / CarR	3OC6-HSL 3OC6-HSL	[120] [121]
Erwinia chrysanthemi	ExpI / ExpR	3OC6-HSL	[122] [123]
Erwinia stewartii	EsaI / EsaR	3OC6-HSL	[124]
Pseudomonas aereofaciens	PhzI / PhzR	C6-HSL	[115] [125]
Pseudomonas aeruginosa	LasI / LasR RhII / RhIR	3OC12-HSL C4-HSL	[126] [127]
Ralstonia solanacearum	SolI / SolR	C6-HSL C8-HSL	[128]
Rhizobium leguminosarum	RhII / RhIR CinI / CinR	C6-HSL 3OHC14:1HSL	[129] [130] [131] [132]
Rhodobacter sphaeroides	CerI / CerR	C14:1-HSL	[133]
Vibrio anguillarum	VanI / VanR	3OC10-HSL	[134]
Yersinia enterocolitica	YenI / YenR	C6-HSL 3OC10-HSL	[135]
Yersinia pseudotuberculosis	YpsI / YpsR YtbI / YtbR	3OHC6-HSL C8-HSL	[136]

Tabelle 6.1: Verschiedene lux-artige Quorum Sensing Systeme. Systeme unterschiedlicher Organismen nutzen den selben Autoinducer, wodurch bei Mischkulturen Cross-Talk möglich ist. Liste entnommen aus [105].

6.5 Alternative Theorien

Neben der Theorie des Quorum Sensings bei Signalmolekül-produzierenden Bakterien, gibt es noch weitere Theorien.

6.5.1 Diffusion Sensing

Diffusion Sensing stellt eine alternative Hypothese zum Quorum Sensing dar. Sie wurde 2002 von Rosemary Redfield eingeführt und beruht auf der Annahme, dass die Zellen nicht kooperativ handeln, sondern die individuelle Fitness erhöhen wollen, indem sie den potentiellen, diffusionsbedingten Effektorverlust messen. Ist die Konzentration der produzierten Autoinducermoleküle zu niedrig, bedeutet das für die Zelle, dass die Produktion von beispielsweise Exoenzymen zu kostenintensiv ist, da sie sich zu schnell und zu weit von der Zelle entfernen um für diese noch nützlich zu sein. [140]

6.5.2 Efficiency sensing

Einen Versuch die Theorie des Quorum Sensings mit der des Diffusion Sensings zu vereinbaren, machten 2007 Hense et al. Sie bieten die Theorie des Efficiency Sensings an, indem sie argumentieren, dass das Ergebnis der bakteriellen Konzentrationsmessung eine Mischung aus Zelldichte, Zellverteilung und Massentransport ergibt, woraus die Zelle sich den Nutzen einer kostenintensiveren Produktion anderer Moleküle ableitet. [141]

2012 greifen West et al. diese Diskussion noch einmal auf und beziehen in ihre Überlegungen außerdem ein mathematisches Modell mit ein, welches 2001 von Brown und Johnstone aufgestellt wurde. In diesem Modell wurde versucht eine Vorhersage über die Evolution des Quorum Sensings zu machen, indem sie sich überlegten, welchen Einfluss natürliche Selektion auf die Produktion und die Antwort von Autoinducern hat. Nach Diskussion aller Argumente kommt die Gruppe zu dem Schluss, dass nach heutigem Wissenstand Efficiency Sensing wohl die am besten vertretbare Erklärung ist, Quorum Sensing sich jedoch als Begriff für das Gesamtphänomen eingebürgert hat. [142] [143]

6.6 Charakterisierung eines Sender-Empfänger Systems

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung eines Sender-Empfänger Systems, das über das lux-basierte Quorum Sensing System gesteuert wird. Um das Verhalten von *E. coli* mit Lux-Genkassette zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden in der experimentellen Herangehensweise ausgewählt. Zunächst wurde eine Titration mit synthetischem AHL als Bulk-Messung im Plate-Reader sowie als Einzelzell-Messung mit Mikrofluidik im Mikroskop an sogenannten Empfängerzellen durchgeführt. Im Anschluss wurde das synthetische AHL gegen Senderzellen ausgetauscht, welche natürliches AHL erzeugen und erneut sowohl Bulk- als auch Einzelzell-Messungen gemacht. Mit Hilfe der Ergebnisse aus den Titrationsexperimenten konnte so die AHL-Produktion der Senderzellen ermittelt werden.

6.6.1 Materialien und Methoden

6.6.1.1 Die Zellen

Es wurden zum einen Senderzellen hergestellt, die das luxI-Gen sowie ein *dsred*-Gen, welche jeweils auf einen T7/lac-Promotor folgen, auf einem pETDuet-1-Vektor beinhalten. Die zur Expression benötigte T7 RNA Polymerase wird in Anwesenheit von IPTG auf dem Genom des Zellstammes abgelesen. Auf die Expression von LuxI folgt die Synthese von AHL, während das RFP dem Nachweis der Senderzellen dient. Zum Zweiten wurden Empfängerzellen erzeugt, bei denen auf einem pSB1A3-Vektor ein *luxR*-Gen gesetzt wurde, das konstitutiv exprimiert wird und auf das ein luxR-Promotor folgt, hinter dem ein *gfp*-Gen liegt. Das führt zu einer vermehrten GFP-Expression in Abhängigkeit von einer steigenden AHL-Konzentration. Beide Konstrukte wurden jeweils in *E. coli* BL21 transferiert (Abb. 6.3).

6.6.1.2 Bulk-Messung

Zur Vorbereitung wurden die Kulturen über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C mit 100 rpm inkubiert. Währenddessen sind sie auf eine optische Dichte von bis zu $OD_{600} = 9$ gewachsen. Um die Zellen wieder in die exponentielle Wachstumsphase zu bringen, wurden sie abzentrifugiert und in 10 ml frischem LB-Medium auf eine Dichte von 0,01 resuspendiert. Im Anschluss wurden sie erneut im Schüttelinkubator inkubiert, bis sie eine optische Dichte von 1 erreicht haben. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in frischem

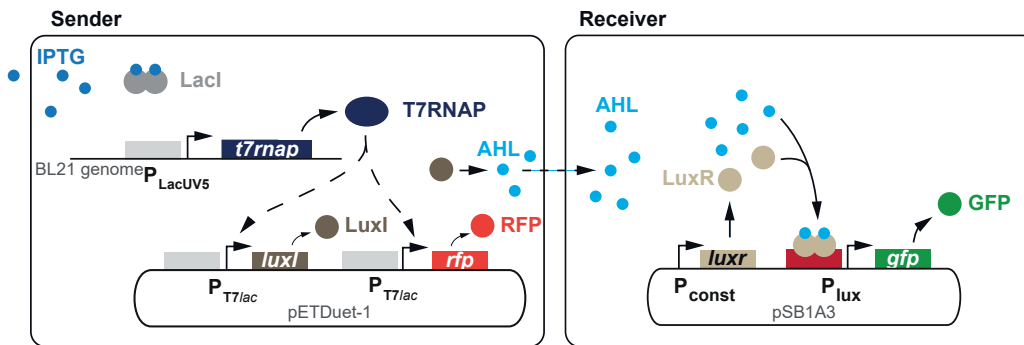


Abbildung 6.3: In den Senderzellen wird unter Zugabe von IPTG die T7 RNA Polymerase exprimiert. Diese nutzt die Zelle im Folgenden für die Expression der hinter einem T7/lac-Promotor liegenden *luxI*- und *dsred*-Gene. Das LuxI dient anschließend der Synthese von AHL. Das AHL diffundiert zu den Empfängerzellen, in denen LuxR konstitutiv exprimiert wird. Durch Komplexbildung von LuxR und AHL wird der LuxR-Promotor induziert, hinter dem ein *gfp*-Gen gesetzt wurde.

LB-Medium, wurden die Zellen in die Wells einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben. Synthetisches AHL wurde im Falle der Titrationsmessungen in frischem LB-Medium gelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen gegeben, so dass mit Beginn der Messungen AHL-Konzentrationen zwischen 0 nM und 100 nM in den einzelnen Messkammern vorlagen. Im Falle der Sender-Empfänger Experimente, wurden Sender- und Empfängerzellen in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Um Verdunstung vorzubeugen wurden die Platten mit einer semipermeablen Folie überzogen, welche einen Gasaustausch zur Sauerstoffversorgung zulässt.

Die Bulk-Messungen wurden in einem FLUOstar Omega der Firma BMG (Ortenberg, Deutschland) vorgenommen. Dieses Gerät zeichnet sich dadurch aus, dass man sowohl die Fluoreszenz als auch die Absorption der Kulturen in der 96-well Mikrotiterplatte automatisiert messen kann. Um einen möglichst hoch aufgelösten zeitlichen Verlauf zu erhalten, wurde alle 5 Minuten ein Messzyklus gestartet, wobei zuerst die Fluoreszenz aller Kammern und im Anschluss die Absorption aller Kammern gemessen wurde. Zwischen den Messungen wurden die Platten mit 1100 rpm ellipsoid in 2 Dimensionen geschüttelt, damit die Kulturen ausreichend mit Sauerstoff versorgt waren. Die Experimente liefen jeweils über 15 Stunden.

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS⁶⁵

Die Daten wurden mit Matlab ausgewertet. Neben der graphischen Darstellung wurde zusätzlich ein von Herrn Dr. Korbinian Kapsner erstelltes PlugIn genutzt, mit welchem man an die gemessenen Kurven einen Fit anlegen kann.

6.6.1.3 Einzelzell-Messung

Vorbereitung der Kulturen

Wie auch für die Bulk-Experimente, wurden die Zellen für die Einzelzell-Experimente über Nacht im Schüttelinkubator bei 37° C mit 100 rpm inkubiert, so dass sie am nächsten Morgen bis zu einer $OD_{600} = 9$ gewachsen sind. Da sie für das Experiment in der exponentiellen Wachstumsphase benötigt wurden, wurden sie abzentrifugiert und in 10 ml frischem LB-Medium auf eine Dichte von 0,01 resuspendiert. Im Schüttelinkubator wurden sie anschließend erneut bis auf eine Dichte von $OD_{600} = 1$ inkubiert. Durch Zentrifugieren und Resuspendieren wurde daraus eine $OD_{600} = 10$ erzielt, welche benötigt wurde um die Bakterien in ausreichender Menge in die Kammern des Chemostaten zu füllen, in denen sie während des Experimentes weiterwachsen. Für die Sender-Empfänger Experimente wurden auch hier wieder Sender- und Empfängerzellen in verschiedenen Verhältnissen zueinander gemischt, bevor sie in den Chemostaten gefüllt wurden.

Der Chemostat

Die Einzelzell-Experimente wurden in einer Flusskammer durchgeführt, deren grundlegende Funktionsweise in Abschnitt 4.1 und Herstellung in Abschnitt 4.2 und bereits dargelegt wurde. Daher soll an dieser Stelle nur eine kurze, auf das Experiment fokussierte Erklärung geboten werden.

Die seitlichen Ausbuchtungen der Hauptkanäle des Chemostaten stellen für die Bakterien eine Falle dar, da *E. coli* einen durchschnittlichen Durchmesser von 1,1 μm bis 1,5 μm hat, die Ausbuchtungen jedoch nur mit einer Höhe von 1 μm hergestellt wurden [30]. Diese Höhe hat sich als praktikabel erwiesen um die Zellen durch leichten Überdruck beim Einfüllen in die Fallen zu befördern und während der Messung festzuhalten, sie aber gleichzeitig nicht am Wachsen und Teilen zu hindern. Zudem ist den Bakterien bei einer solchen Höhe auch nur ein einlagiges Wachstum möglich. Sobald die Falle voll ist, werden die Zellen in den Hauptkanal gedrückt und abtransportiert.

Die Hauptkanäle haben eine Höhe von $15\ \mu\text{m}$. Sie dienen zum einen der Versorgung der Zellen mit frischem Medium, zum zweiten werden durch sie überschüssige Zellen sowie Abfallprodukte und verbrauchtes Medium abtransportiert. Dies gewährleistet eine gleichmäßige Versorgung der Zellkolonie mit frischen Nährstoffen, was ermöglicht, dass diese durchgängig in der exponentiellen Wachstumsphase verbleibt.

Im Falle der Titrationsexperimente wurde an jeden der beiden Einlässe Medium, welches unterschiedliche AHL-Konzentrationen enthält, angeschlossen. Dadurch konnte in jeder Kammer eine andere AHL-Konzentration angelegt und gemessen werden. Für die Sender-Empfänger Experimente wurde über beide Einlässe reines LB-Medium den Zellen zugeführt.

Die Messung

Die Messung wurde in einem inversen Fluoreszenzmikroskop des Typs IX81 der Marke Olympus mit einem 100x Öl-Immersionsobjektiv durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1). Durch den Inkubator war es möglich auch während des Experiments die optimale Temperatur von $37\ ^\circ\text{C}$ zu halten. Die Zellen wurden über einer Pumpe durchgängig mit insgesamt $160\ \mu\text{l}$ frischem LB-Medium pro Stunde versorgt.

Ein Experiment lief über 15 h, wobei alle drei Minuten Aufnahmen gemacht wurden. Wie bereits in den Bulk-Experimenten, wurden zunächst Titrations-Experimente mit synthetischem AHL in Konzentrationen zwischen $0\ \text{nM}$ und $100\ \text{nM}$ durchgeführt. Für diese wurden von jedem Ausschnitt zuerst Hellfeld-Aufnahmen mit einer Belichtungsdauer von $500\ \text{ms}$ und direkt im Anschluss Fluoreszenz-Aufnahmen zur Darstellung der GFP-Produktion mit einer Belichtungsdauer von $200\ \text{ms}$ erstellt, bevor der nächste Ausschnitt angefahren wurde. Pro Experiment konnten acht Ausschnitte und damit acht verschiedene Konzentrationen zeitaufgelöst beobachtet werden.

Im nächsten Schritt wurden - analog zu den Bulk-Messungen - Serien von Mischungen aus Sender- und Empfängerzellen in verschiedenen Mischverhältnissen aufgenommen. Die Rahmenbedingungen blieben dabei dieselben wie in den Titrations-Experimenten, zusätzlich wurden allerdings noch Fluoreszenz-Aufnahmen zur Darstellung der RFP-Produktion in den Senderzellen gemacht, um somit einen relativen Eindruck zur LuxI-Expression und damit AHL-Produktion zu erhalten.

Die Auswertung

Die Auswertungen der Bilder erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde mit dem frei erhältlichen Programm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) eine Bulk-Auswertung der Bakterien-Kolonien vorgenommen. Dabei wurden die Grauwerte der Fluoreszenzbilder über die gesamte Kolonie gemittelt gemessen. Im Anschluss erfolgte die Einzelzell-Auswertung über ein Programm namens BigCellBrother (<https://tmramalho.github.io/bigCellBrotherGUI/>), welches von Herrn Dr. Tiago Ramalho geschrieben wurde. Es ist in der Lage, auf den Hellfeldbildern die einzelnen Zellen voneinander zu unterscheiden. Dabei merkt es sich die Position jeder einzelnen Zelle und überträgt diese auf das zugehörige Fluoreszenzbild um darin den jeweiligen Grauwert zu messen. So erhält man einen relativen Wert der GFP- und RFP-Expression jeder einzelnen Zelle. Abschließend wurden die so erhaltenen Werte über Matlab in eine verwertbare Form und graphische Darstellung gebracht. Auch hier wurde das von Herrn Dr. Korbinian Kapsner erzeugte PlugIn zum Fitten der gemessenen Kurven verwendet.

6.6.2 Wachstum von Sendern und Empfängern

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von Sender- und Empfängerzellen im Plate-Reader verglichen und bewertet ob ein Einfluss der Induktionsmoleküle besteht. Dabei kann kein Effekt festgestellt werden. Sowohl die Senderbakterien als auch die Empfänger teilen sich unverändert. Im direkten Vergleich bestehen auch zwischen Sender- und Empfängerzellen keine signifikanten Unterschiede, was für die spätere Analyse von großem Nutzen ist (Abb. 6.4).

Die Messungen im Chemostaten ergeben große Wachstumsunterschiede der einzelnen Messungen, welche unabhängig von der Konzentration des Induktionsfaktors sind. Vielmehr ist die äußerst geringe Zellzahl zu Beginn eines Experiments erheblich anfälliger für stochastische Effekte. So werden beispielsweise Zellen mit einer langen lag-Phase nicht durch schneller angepasste Bakterien ausgeglichen. Auch unterschiedliche Anfangsbedingungen wie die Zellzahl innerhalb einer Messkammer, die Lage der Bakterien, oder die Teilungsphase, in welcher sich ein Bakterium bei Versuchsstart befindet, nehmen Einfluss auf das Wachstum und damit das Gesamtexperiment. Da es bisher keine adäquate Lösung dieses Problems gibt wurde durch möglichst exaktes Arbeiten und regelmäßige Kontrolle der Vorkultur die Anfangsbedingungen der verschiedenen Versuche so gut wie möglich aneinander angepasst.

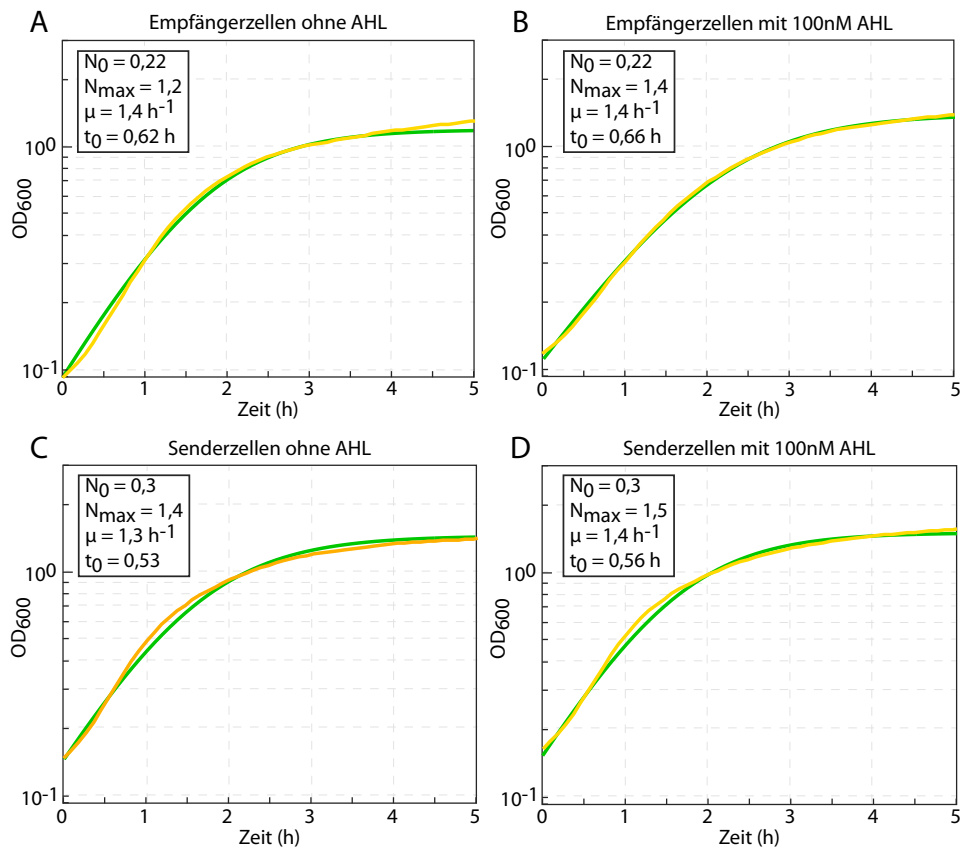


Abbildung 6.4: Sender- und Empfängerzellen wachsen mit der gleichen Geschwindigkeit. Auch Induktionsmoleküle haben keinen Einfluss auf das Wachstum **A** Empfängerzellen ohne AHL-Zugabe, **B** Empfängerzellen mit 100 nM AHL-Zugabe, **C** Senderzellen ohne AHL-Zugabe, **D** Senderzellen mit 100 nM AHL-Zugabe

6.6.3 Titrationsexperimente

6.6.3.1 Bulktitration im Platerader

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei dem Versuch im Plate-Reader um eine Batchkultur, auf die nach Versuchsstart kein Einfluss mehr genommen wird.

Von den gemessenen Werten wird zunächst die Entwicklung der optischen Dichte, das bedeutet das Wachstum der Zellen, betrachtet. Pro Konzentration wurden zwei bis drei Wells gemessen und daraus für die zukünftigen Betrachtungen der Mittelwert genommen. Das über eine Konzentration gemittelte

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS⁶⁹

Ergebnis der Absorptionsmessung ist eine logistische Kurve mit einer sehr kurzen lag-Phase von 20 Minuten. Im Anschluss folgt die log-Phase mit einer Dauer von etwa 80 Minuten. Danach beginnt die stationäre Phase, während der nur noch geringfügiges Wachstum vorhanden ist und die bis zum Ende des Experiments andauert (Abb. 6.5).

Fittet man an die Messergebnisse eine logistische Funktion, so erhält man eine Wachstumsrate von $\mu = 1,42 \pm 0,21 \text{ h}^{-1}$, was einer Generationszeit von $\Delta t = 0,49 \pm 0,07 \text{ h} = 29,4 \pm 4,2 \text{ min}$ entspricht.

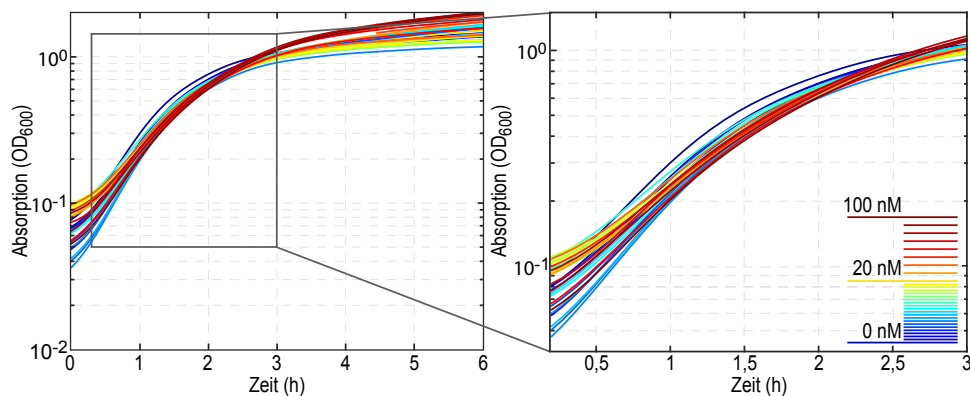


Abbildung 6.5: links: Zellwachstum in der Batchkultur bei unterschiedlichen AHL-Konzentrationen, gemittelt aus zwei, bzw. drei Einzelmessungen; rechts: vergrößerter Ausschnitt des exponentiellen Wachstums bei einer Wachstumsrate von $\mu = 1,42 \pm 0,21 \text{ h}^{-1}$

Schaut man sich jede Messung einzeln an und trägt alle gemeinsam in ein Diagramm ein, so ist erkennbar, dass es zwei Wachstumsverhalten gibt. In dem ersten wachsen die Kulturen bis auf eine optische Dichte von 2,5 bis 3,0, im zweiten lediglich auf eine OD600 von 1,5 - 2,0. Sie weisen dabei keine Abhängigkeit von der zugegebenen AHL-Konzentration auf (Abb. 6.6A). Da alle Zellen aus derselben Startkultur stammen, lässt das drei Möglichkeiten vermuten:

1. es hat innerhalb der Kultur eine Genmutation gegeben, welche ein verändertes Wachstum gegenüber den ursprünglichen Zellen beinhaltet
2. die äußeren Umstände unterscheiden sich während der Messung und sorgen für unterschiedliches Wachstum

3. in einigen Kulturen ist Glukose als bevorzugte Kohlenstoffquelle aufgebraucht und es findet ein Wechsel zur Verstoffwechslung eines anderen Zuckers statt

Eine Mutation lässt sich ohne Sequenzierung nicht völlig ausschließen, da es jedoch auch einzelne Kulturen gibt, in denen die Zellen von der niedrigen Wachstumskurve in die höhere wechseln, ist diese Theorie in diesem Fall unwahrscheinlich.

Auch der zweite Punkt lässt sich nicht bestätigen, da alle Zellen aus derselben Ausgangskultur stammen und erst direkt vor dem Experiment aufgeteilt werden. Zum Verdünnen wurde dabei für alle Wells LB-Medium derselben Charge verwendet und die äußeren Bedingungen während des Experiments (Temperatur, Schütteln, Gasaustausch) waren für alle Wells dieselben. Der einzig nachweisbare Unterschied ist die AHL-Konzentration, der die Bakterien ausgesetzt sind. Da jedoch keine Abhängigkeit des Wachstums zu der Konzentration vorhanden ist, kann auch diese Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Als dritter und letzter Punkt bleibt die Möglichkeit, dass die Kohlenstoffquelle während des Experiments gewechselt wird. Diese Erklärung ist die für das unterschiedliche Wachstum anzunehmende, da wie oben bereits beschrieben, einzelne Kulturen zunächst in eine stationäre Phase wechseln, bevor die erneut mit der Teilung beginnen. Dabei bedienen sich die Bakterien zu Beginn der am leichtesten verfügbaren C-Quelle. In dem vorliegenden Fall handelt es sich dabei um frei verfügbare Zucker, wie Glukose. Solange alle Zellen damit gut versorgt sind, befinden sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase. Ist die Glukose verbraucht und steht keine weitere C-Quelle zur Verfügung, wachsen die Zellen zunächst langsamer und schließlich gar nicht mehr, bis sie absterben. Um dem vorzubeugen, besitzt *E. coli* die Fähigkeit seinen Stoffwechsel umzustellen und auf eine andere C-Quelle auszuweichen. Für gewöhnlich äußert sich dies in einer lag-Phase, bevor erneut eine exponentielle Phase einsetzt. Diese hat im Allgemeinen eine geringere Wachstumsrate als die erste Wachstumsphase, da sich die neue C-Quelle in Form von Aminosäuren von den Zellen weniger optimal nutzen lässt. Einige Kulturen stellen sich so schnell auf die Verwertung ein, dass die lag-Phase nicht vorhanden ist. Die Stoffwechselumstellung macht sich hier lediglich im verringerten Wachstum bemerkbar. Die Gründe, warum einige Kulturen nicht auf eine alternative Verstoffwechslung umsteigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher betrachtet. [144]

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS 71

Da in dieser Arbeit eine hohe Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Messungen gewährleistet sein muss, wird im Folgenden nur die erste exponentielle Phase des Experiments betrachtet, die bis $t = 3$ h nach Start der Messungen dauert. Während der Vorbereitung des Experiments befinden sich die Zellen bereits in der exponentiellen Wachstumsphase. Daher benötigen sie nach dem Start der Messungen nur eine kurze Zeit zur Adaption an die neuen Umgebungsbedingungen, bevor sie das exponentielle Wachstum wieder fortsetzen. Es beginnt bei $t = 0,6$ h und einer OD_{600} von $0,125 \pm 0,024$ nach Start der Messungen und endet bei $t = 1,5$ h und einer OD_{600} von $0,487 \pm 0,037$. Dies zeigt, dass das Wachstum in den Wells sehr gleichmäßig ist (Abb. 6.6B).

Der Zeitpunkt der maximalen Teilungsrates entspricht dem Zeitpunkt zu dem die zeitliche Ableitung der Absorption maximal ist. Der Zeitpunkt des globalen Maximums entspricht dem der maximalen Teilungsrates. Er liegt bei $t = 1$ h 41 min \pm 13 min nach Start der Messungen. Auch hier deutet die niedrige Streuung auf ein sehr synchrones Verhalten der Messkulturen hin. Trotz dieser nur sehr geringen Unterschiede konnte beobachtet werden, dass die höheren Wachstumsgeschwindigkeiten bei den höheren AHL-Konzentrationen auftreten, das Maximum dafür allerdings auch zu einem etwas späteren Zeitpunkt im Messverlauf beobachtet wird. Grund dafür dürfte eine längere Anpassungsphase zu Beginn der Messung sein. Durch die höhere AHL-Konzentration wird der Stoffwechsel der Zelle stärker beeinflusst und die Adaptionphase wird verlängert. Gleichzeitig ist der Stoffwechsel dieser Kulturen aktiver, wodurch die Teilungsrates leicht erhöht ist. Eine Bestätigung dieser Theorie müsste in entsprechenden Experimenten gezeigt werden. Die Differenz zwischen frühestem und spätestem Maximum beträgt $\Delta t = 0,9$ h (Abb. 6.6C).

Neben der Absorption als Merkmal des Zellwachstums wurde auch die Fluoreszenz als Merkmal der Genexpression gemessen. Exprimiert wurde, wie bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben, GFPmut3b, eine äußerst stabile Variante des grün fluoreszierenden Proteins mit einer *in-vitro* gemessenen Halbwertszeit von $t_{\frac{1}{2}} = 33$ h (<http://parts.igem.org>, Part E0040). Diese hat den Vorteil, dass die gemessene Fluoreszenz und damit die Genexpression, nicht durch einen gleichzeitig stattfindenden Abbau der Proteine verfälscht wird, wie es bei einer getaggen GFP-Variante der Fall wäre. Geht die Fluoreszenz in die Sättigung, ist das ein Nachweis dafür, dass die Genexpression eingestellt wurde.

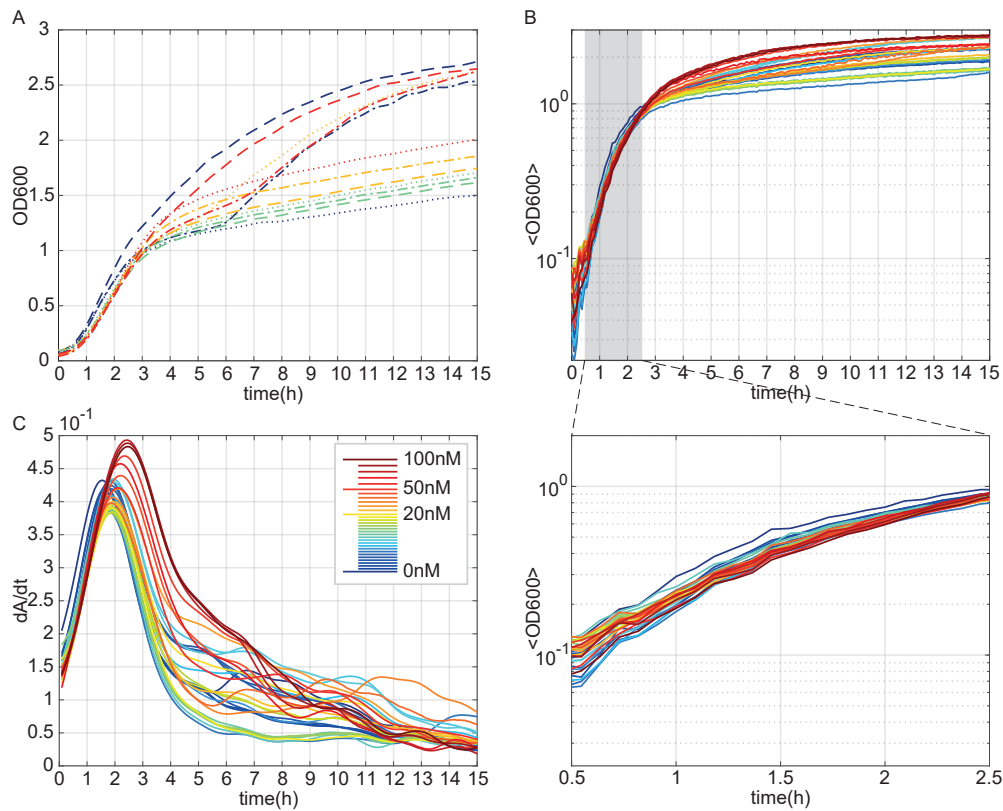


Abbildung 6.6: Zellwachstum im Plate Reader (A) Wachstumskurve in unterschiedlichen Wells bei ansonsten gleichen Bedingungen. Jede Farbe steht für eine AHL-Konzentration, wobei bis zu drei Wells mit derselben Konzentration gemessen wurden. Es können drei Verhaltensweisen beobachtet werden: 1. es gibt eine exponentielle Phase, mit einer Dichte von 1,5 bis 2 am Ende des Experiments, 2. es gibt zwei exponentielle Phasen mit einer Dichte von 2,5 bis 3 am Ende des Experiments 3. es gibt eine exponentielle Phase mit einer Dichte von 2,5 bis drei am Ende des Experiments. (B) Mittelwert des Wachstums aus allen Messungen einer Konzentration. Im Zeitraum zwischen 0,6 h und 1,5 h befinden sich die Zellen in der exponentiellen Phase, sie wachsen bis zum Übergang in die Sättigung nach 2,5 h unabhängig von der Konzentration. (C) Zeitliche Ableitung der Wachstumskurve. Mit Erreichen des globalen Maximums ist die Zellteilungsrate maximal. Dieser Zeitpunkt ist nach 1 h 41 min \pm 13 min erreicht. Zellen, die einer hohen AHL-Konzentration ausgesetzt sind, sind dabei tendenziell etwas später dran als solche mit einer niedrigen Konzentration.

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS 73

In dem hier durchgeführten Experiment konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Genexpression wie erwartet abhängig von der AHL-Konzentration im Nährmedium ist. Je höher die Konzentration, desto stärker die Expression. Im folgenden Abschnitt wird näher auf die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung eingegangen.

Betrachtet man die Fluoreszenz auf die jeweilige Gesamtkultur bezogen, erhält man einen extrem gleichmäßigen Anstieg mit einer kurzen Einschwingdauer von etwa 0,67 h zu Beginn der Messung. Damit ist die Einschwingzeit geringfügig länger als beim Zellwachstum. Während dieses Zeitraums wird die GFP-Produktion gestartet und die Kulturen verhalten sich auch bei unterschiedlichen AHL-Konzentrationen sehr ähnlich. Im Anschluss daran steht eine exponentielle Expressionsphase, in der sich die Abhängigkeit von der AHL-Konzentration in Dauer und Fluoreszenzanstieg zeigt. Je niedriger die AHL-Konzentration, desto niedriger die Genexpression und desto länger die exponentielle Phase. Bei einer AHL-Konzentration von 1 nM startet sie bei 0,65 h und dauert 1,5 h, bei 15 nM beginnt sie erst nach 0,8 h und hat nur noch eine Dauer von rund 0,75 h. Bei höchsten AHL-Zugabe von 100 nM startet die exponentielle Phase erst nach 0,9 h und dauert etwas weniger als 0,25 h. Gleichzeitig ist die Steigung bei hohen Inducer-Konzentrationen deutlich höher, was in dieser Phase zu einer klaren Trennung der Fluoreszenz nach Konzentration führt. Anschließend folgt eine Phase mit linearem Anstieg. Sie dauert bei 100 nM drei Stunden mit einer Steigung von $0,3 \cdot 10^5/h$, bei 1 nM sogar 5,5 h, jedoch nur mit einer Steigung von $0,01 \cdot 10^5/h$. Da mit fortschreitender Messzeit jedoch das Verhalten der Kulturen zu divergieren beginnt, lässt sich keine solche exakte Aussage mehr treffen wie noch während der exponentiellen Phase. Mit fortschreitendem Experiment gehen die Messkulturen in eine Sättigungsphase über. Mit Erreichen dieses Abschnittes ist die Genexpression beendet. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Eine Möglichkeit ist, dass das zugegebene AHL verbraucht ist und somit kein Inducer mehr für die Genexpression zur Verfügung steht. Auch kann die Nährstoffversorgung sich soweit verschlechtert haben, dass die Zellen ihren Stoffwechsel auf ein Minimum reduzieren und somit die GFP-Produktion als nicht überlebenswichtig ausgesetzt wird. Am wahrscheinlichsten ist, dass es sich um eine Mischung der Faktoren handelt (Abb. 6.7A).

Um eine Vergleichbarkeit mit den in Abschnitt 6.6.3.2 folgenden Einzelmessungen unter dem Mikroskop zu erhalten, wurde noch die Fluoreszenz pro Absorption betrachtet. Bei einer $OD_{600} = 1$ beträgt die Zelldichte etwa $1 \cdot 10^9$ Zellen pro ml, somit bekommt man eine Kurve über das gemittelte Verhalten der einzelnen Zellen einer Messkultur, wenn die Fluoreszenz durch

die Absorption geteilt wird und ein Verhaltensvergleich mit den Einzelzellexperimenten ist möglich [145].

Trägt man den Quotienten der beiden Werte gegen die Zeit auf, erkennt man, dass sich das Verhalten von dem der reinen Fluoreszenzmessung deutlich unterscheidet. Es ist auch hier wieder eine Einschwingphase vorhanden, die länger ausfällt, je niedriger die zugegebene AHL-Konzentration ist. So beträgt sie bei einer Konzentration von 1 nM 1,8 h, wohingegen sie bei 100 nM lediglich 0,8 h dauert. Die Zellen beginnen dabei im frischen Medium mit AHL zunächst mit einer starken, von der AHL-Konzentration unabhängigen, Genexpression, welche aus den optimierten Bedingungen zu resultieren scheint. Sie wird im Anschluss jedoch noch einmal reguliert und an die jeweils vorhandene AHL-Konzentration angepasst, um dann während des Experiments aufrecht erhalten zu werden. Dies äußert sich in einem Anstieg der Fluoreszenz pro Absorption innerhalb der ersten 45 Min nach Start des Experimentes. Dieser Anstieg ist unabhängig von der AHL-Konzentration im Medium. Nach 45 Min setzt die Regulation ein und die GFP-Produktion wird angepasst. Je niedriger die Inducer-Konzentration ist, desto stärker wird die Expression reduziert. Im Diagramm wird das durch einen Abfall der Fluoreszenz pro Absorption deutlich, der stärker ausfällt, je niedriger die Konzentration an AHL ist. Bei $[AHL] < 3 \text{ nM}$ fällt der Wert sogar unter den Ausgangswert. Je höher die Konzentration, desto geringer ist der Abfall. Bei $[AHL] = 10 \text{ nM}$ handelt es sich bereits nur noch um einen Terrassenpunkt, bei $[AHL] = 100 \text{ nM}$ ist lediglich eine leicht verringerte Steigung zu beobachten. Die anschließende exponentielle Phase geht allgemein bis $t = 3 \text{ h}$. Während der exponentiellen Phase, wie auch in der folgenden linearen Phase, zeigt sich, dass die Steigung mit sinkender Inducer-Menge flacher wird, wodurch sich die verschiedenen Messkulturen weiter auftrennen. Wie bereits im Absatz zur Absorptionsmessung beschrieben, wird der Messverlauf nach Eintritt in die lineare Phase nicht mehr weiter betrachtet, da sich durch das unterschiedliche Wachstumsverhalten der einzelnen Kulturen keine klaren Aussagen mehr treffen lassen (Abb. 6.7B).

Abschließend zu der Betrachtung der Titrationsmessung im Plate-Reader soll nun noch eine Aussage über die Genregulationsfunktion des zugegebenen synthetischen AHLs gemacht werden. Hierzu ist es nötig, die Rate α der Genexpression im zeitlichen Verlauf des Experimentes zu betrachten. Dafür muss zunächst der Wert aus Fluoreszenz pro Absorption nach der Zeit abgeleitet werden. Folgende Rechnung ist nötig:

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS75

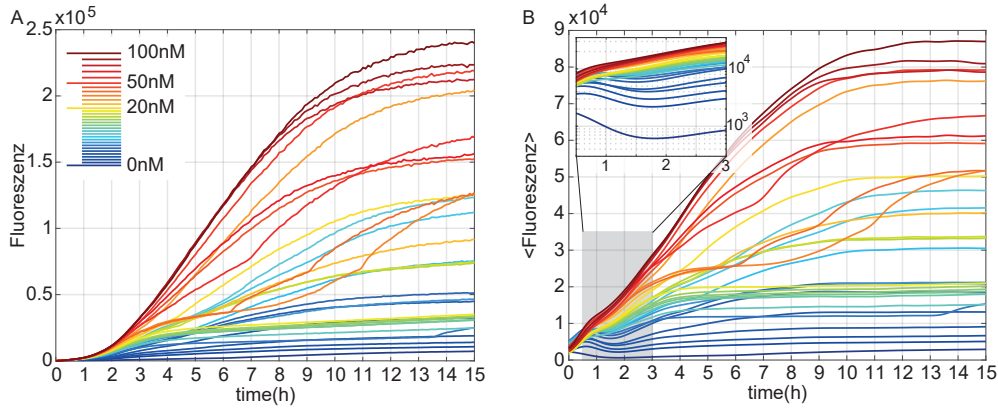


Abbildung 6.7: Fluoreszenzanstieg bei AHL-Titration im Plate Reader (A) Gesamtfluoreszenz im zeitlichen Verlauf, gemittelt über alle Messungen. Wie auch in der Wachstumskurve, ist zu Beginn ein exponentieller Anstieg zu beobachten. Mit steigender AHL-Konzentration startet die exponentielle Phase später, hat aber dafür die höhere Steigung. Unabhängig von der Konzentration endet die exponentielle Expression bei $t = 1,5$ h. (B) Mittlere Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf. Durch die Bildung des Quotienten aus Gesamtfluoreszenz und Absorption erhält man die mittlere Fluoreszenz pro Zelle. (Inset) Die exponentielle Phase dauert bis $t = 3$ h, wobei die Steigung mit der beigefügten AHL-Konzentration zunimmt, wodurch eine Auftrennung der Kulturen zustande kommt.

$$\mu = \frac{1}{A} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (6.1)$$

$$f = \frac{F}{A} \quad (6.2)$$

$$\frac{df}{dt} = \alpha - \mu f - \delta \approx \alpha - \mu f \quad (6.3)$$

$$\alpha = \frac{df}{dt} + \mu f = \frac{d\left(\frac{f}{A}\right)}{dt} + \frac{1}{A} \frac{dA}{dt} \frac{F}{A} = \frac{1}{A} \frac{dF}{dt} - \frac{f}{A^2} \frac{dA}{dt} + \frac{F}{A^2} \frac{dA}{dt} = \frac{1}{A} \frac{dF}{dt} \quad (6.4)$$

Hierbei steht F für die Gesamtfluoreszenz, A für die gemessene Absorption, μ für die Wachstumsrate, diesmal in Abhängigkeit von der Absorption. Die zeitliche Entwicklung von f , der Fluoreszenz pro Absorption setzt sich

zusammen aus der GFP-Expressionsrate α , der Verringerung der Proteindichte durch Zellteilung und dem Abbau von GFP δ . Da es sich - wie bereits beschrieben - um eine sehr stabile Proteinvariante handelt, kann $\delta = 0$ gesetzt werden. Die GFP-Expression α im zeitlichen Verlauf erhält man, indem (6.3) α aufgelöst und (6.1) für μ sowie (6.2) für f eingesetzt wird.

Um aus den so erhaltenen Kurven Aussagen zum Quorum Sensing-bedingten Schaltverhalten zu machen, werden die jeweiligen lokalen Maxima von α betrachtet, die während der exponentiellen Wachstumsphase auftreten. Diese werden dann gegen die AHL-Konzentration aufgetragen. Die sich so ergebende Kurve kann durch eine Hill-Funktion

$$F = \alpha_{max} \cdot \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad (6.5)$$

gefittet werden (Abb. 6.8). Der sich daraus ergebende Hill-Koeffizient n macht eine Aussage über die Kooperativität zwischen einem Enzym, in diesem Fall das LuxR-Protein, und seinem Liganden, dem AHL. Durch den Fit erhält man die Werte $\alpha_{max} = 25000$ für den sich aus den Messungen ergebenden höchsten Fluoreszenzwert, der durch hohe AHL-Zugaben erreicht würde, $k = 14$ nM als die AHL-Konzentration, bei der die Zellen vom Off- in den On-Zustand schalten und $n = 1$ als Hill-Koeffizient. Diese Werte stehen in gutem Einklang mit bereits durch theoretische Modelle gefundenen Werten [146] [147].

6.6.3.2 Titration im Chemostaten

Um die Auswirkungen unterschiedlicher, definierter AHL-Konzentrationen auch auf einzelne Zellen beobachten zu können, wurden zusätzlich zu dem Bulk-Experiment auch Einzelzell-Experimente unter dem Mikroskop durchgeführt. Hierfür wurden Zellen in den in Kapitel 4.1 beschriebenen Chemostaten gefüllt und über einen Zeitraum von 15 Stunden alle drei Minuten mit Hellfeld- als auch Fluoreszenzbelichtung aufgenommen. Mit dieser sogenannten „Time-lapse“-Mikroskopie konnte sowohl die Zellteilung als auch die Fluoreszenz hochaufgelöst beobachtet werden.

Vor einer Einzelzell-Analyse wurde auch dieses Experiment zunächst im Bulk ausgewertet. Anstelle der optischen Dichte, wie zuvor im Plate-Reader-Experiment, diente hier die mit Zellen besetzte Fläche der Mikroskopie-Aufnahme als Referenz für das Zellwachstum.

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS 77

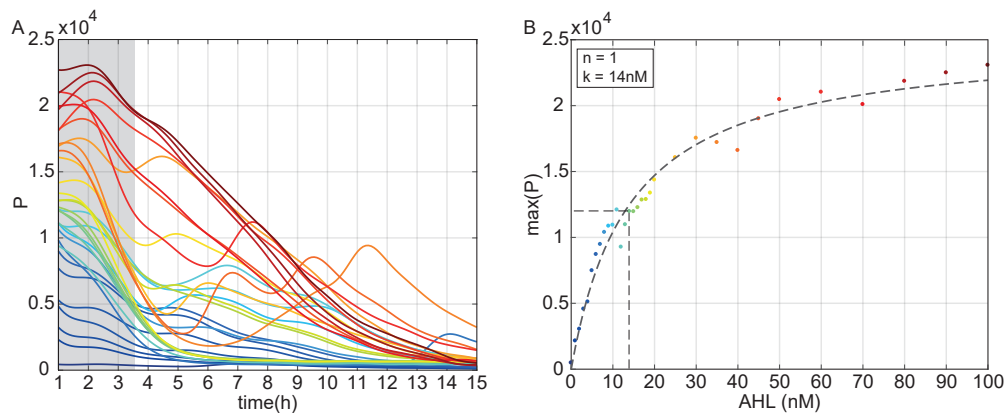


Abbildung 6.8: Hillkurve bei AHL-Titration im Plate Reader (A)

Entwicklung der Genregulation im zeitlichen Verlauf. Für die Erstellung der Hill-Kurve wird das Maximum während der exponentiellen Phase der mittleren Fluoreszenz betrachtet (grau hinterlegt). **(B)** Hill-Kurve aus den Maxima der Genregulationsfunktion während der exponentiellen Phase. Es ergibt sich ein Hill-Exponent von $n = 1$ und ein Schwellwert von $k = 14 \text{ nM}$.

Trägt man diese gegen die Zeit auf, erhält man eine Wachstumskurve. Auf Grund der beschränkten Dimensionen der Zellfalle von $L = 100 \mu\text{m} \cdot B = 60 \mu\text{m} \cdot H = 1 \mu\text{m}$ kann das Wachstum jedoch nur so lange beobachtet werden, bis die Kammer mit Zellen gefüllt ist. Ist die Kammer gefüllt, werden Bakterien am offenen Ende der Falle von nachkommenden Bakterien aus der Falle herausgedrückt und durch den Versorgungskanal abtransportiert.

a Bulkauswertung

Die Kammern sind zu Beginn des Experiments mit 58 ± 18 Zellen befüllt. In allen lässt sich beobachten, dass die Zellen direkt nach dem Befüllen über die gesamte Grundfläche verteilt sind, sich jedoch dann zunächst an das geschlossene Ende der Kammer bewegen, bevor das Wachstum von dort Richtung offenem Ende beginnt. Nach einer Adaptionsphase, die unabhängig von der zugegebenen AHL-Konzentration bei $1 \text{ h } 38 \text{ min} \pm 1 \text{ h } 17 \text{ min}$ liegt, dauert die Wachstumsphase $8 \text{ h } 49 \text{ min} \pm 2 \text{ h } 19 \text{ min}$ und endet $10 \text{ h } 05 \text{ min} \pm 2 \text{ h } 25 \text{ min}$ nach Start der Messungen. Betrachtet wurde hierbei für alle drei Werte der Zeitraum von Beginn der Zellteilung in der Kammer bis hin zur vollen Kammer. Nicht unterschieden wurde zwischen exponentiellem Wachstum und

linearem Wachstum, mit welchem einige Messungen zunächst starten. Dieser Umstand wird den äußeren Bedingungen und der Anpassungsphase der Zellen zugeschrieben. Die äußeren Bedingungen unterschieden sich hinsichtlich der genutzten Übernachtskulturen, da nicht alle Messungen in einem Experiment durchgeführt werden konnten. Zudem befinden sich nach dem Befüllen des Chemostaten noch viele Zellen in den Versorgungskanälen. Sie verbrauchen zum einen einen Teil der Nährstoffe, wodurch die nicht mehr vollständig an die zu messenden Bakterien gelangen, zum Zweiten kann eine Ansammlung von Zellen im Versorgungskanal einen stark negativen Einfluss auf die Flussgeschwindigkeit haben, bevor sie herausgespült werden. Es wechseln jedoch alle Kolonien noch vor Erreichen einer komplett befüllten Kammer in das exponentielle Wachstum. Die Wachstumsrate der exponentiellen Phase liegt bei $\lambda_W = 0,43 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$, was einer Teilungsrate von $\tau = 0,62 \pm 0,13 \text{ h}^{-1}$ entspricht.

Die hohe Standardabweichung lässt sich durch die unterschiedlichen Randbedingungen erklären, die die Zellen vor allem zu Beginn des Experiments vorfanden und auf die kein Einfluss genommen werden konnte. Dazu gehören die Zellzahl in der Kammer, die Lage der Zellen in der Kammer, die exakte Wachstumsphase zu der das Experiment gestartet wurde und die Masse an Zellen, die sich zu Beginn des Experiments noch in den Hauptkanälen befindet. Sie ist jedoch in Einklang mit anderen bereits veröffentlichten Werten [148].

Die für *E. coli* sehr niedrige Teilungsrate lässt sich mit den Bedingungen während des Experimentes erklären. Zellen werden während des Experiments aus der Kammer herausgespült, auch wenn diese noch nicht komplett befüllt ist. Diese Zellen fallen bei der weiteren Betrachtung weg, wodurch sich eine scheinbar niedrigere Wachstumsrate ergibt. Das zeigt sich auch in der nicht komplett gleichmäßig verlaufenden Wachstumskurve (Abb. 6.9A).

Trotz der ungleichmäßigen und verlangsamten Wachstumskurve, bietet der Chemostaten den Vorteil, dass die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verbleiben, da er die Bakterien mit einer gleichbleibenden Konzentration frischer Nährstoffe versorgt, die Zelldichte weitestgehend konstant hält, sobald die Messkammer vollständig gefüllt ist und Abfallstoffe sowie überschüssige Zellen abtransportiert. Die Teilungsrate ist dabei zwar niedriger als in den Plate-Reader-Experimenten, bleibt jedoch über die gesamte Dauer beständig.

Wie bereits im Plate-Reader-Experiment wurde auch hier die Messung der Fluoreszenz als Nachweis des Induktionsgrades genutzt. Um vergleichbare Aussagen machen zu können, wurde die in Grauwerten gemessene Fluoreszenz durch die mit Bakterien besetzte Grundfläche der Kammer geteilt, was im

Plate-Reader der Rechnung Fluoreszenz durch Absorption entspricht. Dafür wurde zunächst die Gesamtfluoreszenz der jeweiligen Messkammer im zeitlichen Verlauf betrachtet, welche mit einer Wachstumsrate von $\lambda_F = 0,42 \pm 0,18$ exponentiell anwächst (Abb. 6.9B). Da diese Wachstumsrate weitestgehend der des Zellwachstums mit $\lambda_W = 0,43$ entspricht, ist ein näherungsweise linear ansteigender Mittelwert zu erwarten. Diese Erwartung wird durch die Messungen bestätigt. Der Anstieg des Mittelwerts $M_F = \frac{F}{A}$ erfolgt nach einer Einschwingphase linear, bevor er nach einer Übergangsphase in einen stabilen Zustand übergeht, in dem das Verhältnis aus Gesamtfluoreszenz und Fläche gleichbleibend ist.

Trägt man die mittlere Fluoreszenz aller gemessenen AHL-Konzentrationen in einem Diagramm gegeneinander auf, zeigt sich, wie bereits im Plate-Reader Experiment, die Bestätigung, dass mit zunehmender Inducermenge auch die Genexpression ansteigt (Abb. 6.9C). Betrachtet man als nächstes das Maximum der nach der Zeit abgeleiteten mittleren Fluoreszenz

$$\max(\dot{M}_F) = \max\left(\frac{dF}{dt} \cdot \frac{1}{A}\right) \quad (6.6)$$

erhält man mittels einer angefitteten Hill-Funktion

$$H = a \cdot \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad (6.7)$$

weitere Informationen zum Schaltverhalten der Kulturen. Man erhält einen Hill-Koeffizienten von $n = 0,95 \pm 0,2$, was aussagt, dass das LuxR-Protein und AHL eine leicht positive Kooperativität aufweisen und eine Schaltkonzentration von $k = 5,3 \pm 1,4$ nM. Das bedeutet, ab einer AHL-Konzentration von 5,3 nM ist die induzierte Genexpression so stark, dass von einem „on“-Zustand gesprochen werden kann (Abb. 6.9D). Auch diese beiden experimentell gefundenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit denen anderer Veröffentlichungen [149] [150] [151] [147].

b Analyse der Schwankungen in der Genexpression

Die Einzelzellauswertung erfolgte mittels dem Programm „BigCellBrother“, das eigens für die von uns benötigten Analysen von Herrn Dr. Tiago Ramalho geschrieben wurde. Es kann über <https://tmramalho.github.io/bigCellBrotherGUI/> bezogen werden. Das Programm erkennt nach einer Anlernphase die einzelnen Zellen und ermöglicht dadurch eine differenziertere Betrachtung als in der Bulk-Analyse in ImageJ.

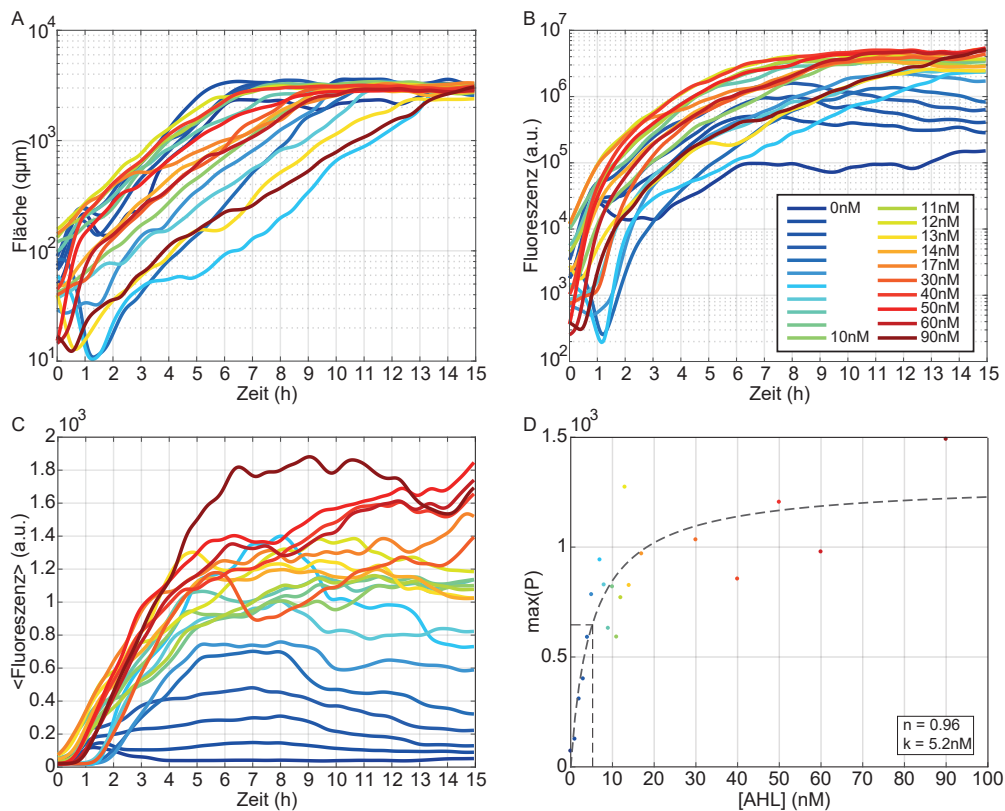


Abbildung 6.9: Wachstum und Genexpression im Mikroskop (A)

Die Zellen befinden sich über den gesamten Zeitraum in der exponentiellen Phase. (B) Der Anstieg der Gesamtfluoreszenz entspricht zunächst der Wachstumsrate. Eine klare Auftrennung nach zugegebener AHL-Konzentration ist noch nicht direkt sichtbar. (C) Der Anstieg der mittleren Fluoreszenz erfolgt über einen weiten Zeitraum linear. Die GFP-Expression steigt mit der AHL-Konzentration. (D) Der Hill-Fit aus den Maxima der Genregulationsfunktion ergibt eine Schwellwertkonzentration von 5,2 nM AHL und einen Hill-Koeffizienten von $n = 0,96$.

Über das Hellfeldbild wird die Lage der Zellen erkannt und auf die zugehörigen Fluoreszenzbilder übertragen um dann die dortigen Grauwerte als Maß für die Fluoreszenz und damit die Genexpression zu messen. Daneben lassen sich bei Bedarf auch noch Ausrichtung der Zelle, Länge und Breite sowie die Standardabweichung der Fluoreszenz analysieren. Über die zeitabhängige Entwicklung der Fluoreszenz lässt sich die stochastische Reaktion des AHL- P_{lux} -Systems auf die Induktion charakterisieren.

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS 81

Neben den bisher gemachten Untersuchungen der gewonnenen Daten, wurden auch die Schwankungen in der Genexpression genauer betrachtet. Zur Charakterisierung der stochastischen Antwort des AHL/ P_{lux} -Systems, wurden zeitabhängige Histogramme der Fluoreszenzlevel erstellt. Abbildung 6.10 zeigt hierfür das Ergebnis bei einer Induktion mit 50 nM AHL, wobei nicht die einzelnen Zellen über die Zeit getrackt, sondern alle ohne Bezug zum vorhergehenden Zeitpunkt ausgewertet wurden. Diese Darstellung entspricht der Fokker-Planck-Beschreibung stochastischer Systeme mit einer zeitabhängigen Wahrscheinlichkeitsverteilung.

Zur Darstellung des vollständigen Expressionslevels über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde die mittlere Fluoreszenz jeder Zelle gegen die Zeit halblogarithmisch aufgetragen. Dabei fällt auf, dass es eine Reihe von spätinduzierenden Bakterien gibt, sowie einige, die über die gesamte Messdauer unterhalb des durchschnittlichen Niveaus bleiben (Abb. 6.10A). Wählt man nun einen späten Aufnahmezeitpunkt aus und erstellt aus den darin enthaltenen Messwerten ein Histogramm, so erhält man zwei Peaks. Der erste bei niedrigerer Fluoreszenz entspricht dabei den Zellen, deren GFP-Expression geringer ausfällt. Der zweite Peak ist der Hauptpeak. Er enthält den Großteil der Zellen des ausgewählten Zeitpunkts und sein Expressionslevel lässt sich gut mit einer logarithmischen Normalverteilung fiten (Abb. 6.10B).

Diese Art der Verteilung beschreibt unter anderem biologische Größen, die sich aus mehreren unabhängigen kinetischen Raten zusammensetzen. Es greift der zentrale Grenzwertsatz, der besagt, dass im Falle von vielen verschiedenen Raten, die nicht oder kaum miteinander korrelieren, die logarithmische Normalverteilung als limitierende Verteilung resultiert [152] [153]. Wie in dem vorliegenden Fall mit nur vier unabhängigen Raten, reichen in der Realität bereits einige wenige Raten aus um sich der logarithmischen Normalverteilung anzunähern. Die Konzentration p eines Proteins kann in unserem System mit Hilfe der Raten für die mRNA-Synthese, α_r , die mRNA-Degradation, λ_r , die Translation, α_p , sowie die Proteindegradation, λ_p , über den Ausdruck $p = \frac{\alpha_r \alpha_p}{\lambda_r \lambda_p}$ berechnet werden.

Wie bereits oben erwähnt, gibt es einen kleineren Teil an Zellen, dessen Antwort auf die AHL-Induktion deutlich später und weniger stark als die der Mehrheit ausfällt. Da sich diese Zellen im Vergleich zu dem dominanten Anteil auch nicht wesentlich vermehren, wird hier davon ausgegangen, dass sie sich in einem anderen physiologischen Zustand befinden. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu umgehen, wurden sie zuvor über eine Gaußsche Mischverteilung aus der Gesamtbetrachtung entfernt. Dadurch ist es möglich, zu jedem Zeitpunkt den Mittelwert und die Varianz des dominanten Teils der Population,

welche sich scheinbar in einem einheitlichen physiologischen Zustand befindet, zu betrachten.

Von der so definierten Mehrheit der Zellen wurde im nächsten Schritt die Rauschcharakteristik betrachtet. Um diese zu bestimmen, bedarf es zunächst der Kenntnis der Varianz der Proteinexpression, σ_p^2 . Hierfür wird zunächst das arithmetische Mittel und die Standardabweichung einer einzigen Zelle berechnet, die sich aus den Grauwerten der einzelnen Pixel ergeben, die in dem aufgenommenen Bild der jeweiligen Zelle zugeordnet werden:

$$\langle p^k \rangle = \sum_{i,j \in \mathcal{L}(k)} \frac{p_{i,j}}{a^k} \quad (6.8)$$

und

$$\sigma_{p^k}^2 = \sum_{i,j \in \mathcal{L}(k)} \frac{(p_{i,j} - \langle p^k \rangle)^2}{a^k} \quad (6.9)$$

wobei $a^k = \sum_{i,j \in \mathcal{L}(k)}$. Aus den so gewonnenen Werten kann das Rauschen, das aus der Heterogenität verschiedener Individuen resultiert, berechnet werden:

$$\bar{p} = \sum_k \frac{\langle p^k \rangle}{N} \quad (6.10)$$

und somit

$$\sigma_p^2 = \sum_k \frac{(\langle p^k \rangle - \bar{p})^2}{N}. \quad (6.11)$$

Aus der so berechneten Varianz, σ_p^2 , und dem Mittelwert, $\langle p \rangle$, kann das Rauschen, $\frac{\sigma_p^2}{\langle p \rangle^2}$, bestimmt werden, welches das Quadrat des Variationskoeffizienten $CV = \frac{\sigma_p}{\langle p \rangle}$ darstellt. Trägt man nun das Rauschen gegen den Mittelwert in einem parametrischen Plot auf, wobei zu beachten ist, dass beide Werte in Abhängigkeit zur Zeit sind, erkennt man, dass $\frac{\sigma_p^2}{\langle p \rangle^2}$ nach Erreichen von etwa einem Drittel der maximalen Expression konstant bleibt (Abb. 6.10C). Das bedeutet, dass ab diesem Punkt die Standardabweichung proportional zum Mittelwert anwächst. Der damit berechnete Variationskoeffizient liegt bei $CV = 0,17$, was die Hälfte des Wertes ist, der bereits zuvor im Autoinducer-System von *V. harveyi* nachgewiesen wurde [149].

Die Skalierung zwischen Rauschen und dem Mittelwert wird häufig genutzt um zwischen intrinsischem und extrinsischem Rauschen zu unterscheiden.

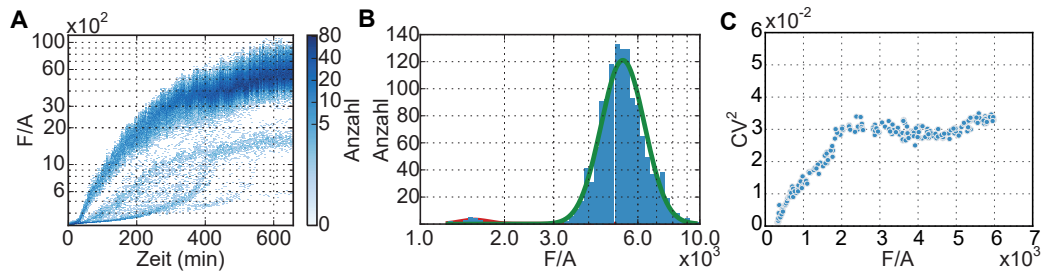


Abbildung 6.10: Einzelzellauswertung der Genexpression bei einer AHL-Konzentration von 50 nM (A) Zeitliche Entwicklung der mittleren Fluoreszenz pro Zelle. Deutlich erkennbar sind die Gruppen von spät- und schwachinduzierten Zellen. (B) Halblogarithmisch aufgetragenes Histogramm der mittleren Fluoreszenz pro Zelle zum Zeitpunkt $t = 600$ min. Die rote und grüne Linie repräsentiert die Gaußsche Mischverteilung aus der sich die Verteilung des dominanten, stark induzierten Zellanteils in Form der grünen Linie ergibt. (C) Parametrische Darstellung von CV^2 als Funktion der mittleren Fluoreszenz. Das Rauschen steigt dynamisch an, bis etwa ein Drittel des maximalen Expressionslevels erreicht ist. Danach bleibt CV^2 konstant, was extrinsisches Rauschen beschreibt.

Eine Studie dazu besagt, dass intrinsisches Rauschen vor allem bei niedrigen Expressionsleveln, extrinsisches Rauschen dagegen bei hohen Expressionsleveln dominant ist [154]. Dahingehend stimmen unsere Beobachtungen überein, da ein konstantes Rauschen bei hohen Expressionsleveln mit dem erwarteten Verhalten extrinsischen Rauschens übereinstimmt. Dagegen steigen die Werte bei $\frac{F}{A} < \frac{1}{3}(\frac{F}{A})_{max}$ annähernd linear an. Dieses Verhalten stimmt weder mit der Erwartung an extrinsisches, noch mit der an intrinsisches Rauschen, bei dem der Wert zurückgehen würde, überein. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Abschnitt mit dem Zeitraum übereinstimmt, in dem die Genexpression der Zellen hochgefahren wird und sich das zuvor beschriebene Verhalten in erster Linie auf Systeme im stationären Zustand anwendbar ist. Dennoch bleibt der Anstieg des Rauschens überraschend, da bereits existierende Modelle über verlässliche, zeitabhängige Genexpression ebenfalls einen Rückgang des Rauschens bei steigendem Mittelwert vorhersagen [155]. Da jedoch die genaue stochastische Dynamik des anfänglichen Induktionsprozesses von verschiedensten Faktoren wie der Dynamik des Reportersystems abhängt, ist es fraglich, ob während dieses Zeitraums eine allgemeine Aussage mittels einem vereinfachendem mathematischen Modell gemacht werden kann.

c Antwortkurven einzelner Zelltrajektorien

Die bisherigen Analysen haben sich ausschließlich auf das Verhalten der gesamten Zellkolonie bezogen. Dabei wurde festgestellt, dass die Population sehr heterogen ist und sich einzelne Zellen deutlich vom durchschnittlichen Verhalten unterscheiden können. Daher wurde die Dynamik der Genexpression einzelner Zellen getrackt und daraus die Antwortkurve einer einzelnen, homogenen Subpopulation sowie deren Abstammungslinie ermittelt. Um Zellen auszusortieren, die ein spezielles Induktionsverhalten aufweisen, wurde die Zellen entsprechend ihrer Expressionsgrade am Ende des Experiments klassifiziert und alle Trajektorien ausgeschlossen, deren Werte sich außerhalb der Subpopulation befinden. Aus der zeitlichen Entwicklung wurde die Dynamik der GFP-Produktionsrate α jeder Zelle berechnet. Wie bereits in den Analysen zuvor, kam auch hier die das Maximum dieses Wertes $\max_t \alpha(t)$ als Maß für den Grad der Induktion zum Einsatz. Zusätzlich wurde als alternativer Ansatz noch die mittlere Produktionsrate $\langle \alpha(t) \rangle_t$ betrachtet.

Beide Observablen wurden in einem Histogramm aufgetragen und können gut durch eine logarithmische Normalverteilung gefittet werden (Abb. 6.11A und 6.11C). Aus dieser lassen sich Mittelwert und Standardabweichung für jede AHL-Konzentration ablesen und in einem Diagramm auftragen. Trägt man die so gewonnenen Werte gegen die zugegebene AHL-Konzentration auf, erhält man wie bereits in der Bulk-Auswertung eine Hillkurve, die nun jedoch auf Einzelzelldaten beruht (Abb. 6.11B und 6.11D). Aus ihr lassen sich der Schwellwert sowie die Kooperativität zwischen dem LuxR-Protein und dem AHL ableiten. Im Falle von $\max_t \alpha(t)$ erhält man $K = 2,7 \pm 0,6$ nM und $n = 1,2 \pm 0,6$, wohingegen $\langle \alpha(t) \rangle_t$ die Werte $K = 3,8 \pm 1,2$ nM und $n = 1,5 \pm 0,6$ liefert.

Die letzten beiden Werte stellen dabei die Ergebnisse für mittlere Expressionsraten einzelner Bakterien dar, die zu einer Subpopulation gehören. Sie sind die vertrauenswürdigste Abschätzung dieser Größen und die gefitteten Kurven befinden sich in guter Übereinstimmung mit den bereits in der Bulk-Auswertung erhaltenen Ergebnisse. Die Hill-Kurve weist jedoch gegenüber der Bulk-Auswertung eine höhere Kooperativität und einen niedrigeren Schwellwert auf. Diese Verschiebung ergibt sich aus dem Einfluss, den die spätinduzierten Zellen in den Analysen zuvor gehabt haben. Durch sie hat sich der Schwellwert nach oben und die Kooperativität nach unten verschoben. Durch den Fokus auf die schnell induzierten Bakterien, erhält man eine schärferes Schaltverhalten, das die Heterogenität in der Antwortkurve der Population glättet.

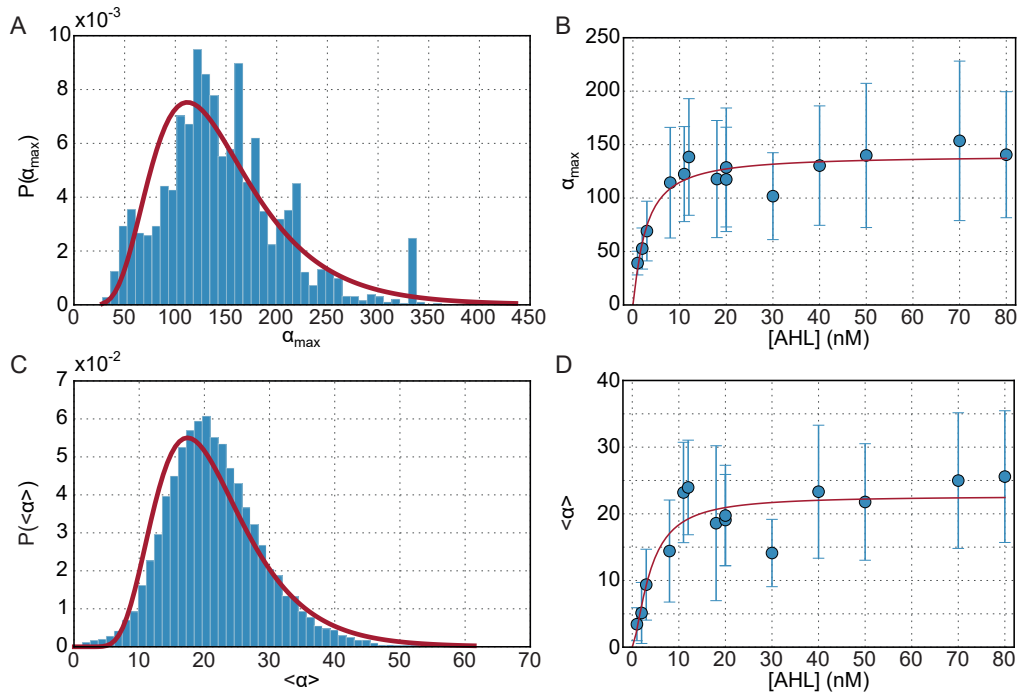


Abbildung 6.11: Verteilung der Genexpressionsrate α aus Einzelzelltrajektorien (A) Histogramm der maximalen Genexpression $\alpha_{max} = \max_t \alpha_t$ jeder Einzelzelltrajektorie bei einer AHL-Konzentration von 50 nM. Die rote Linie entspricht einem lognormalen MLE-Fit für $P(\alpha_{max})$ (B) Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung $P(\alpha_{max})$. Die rote Linie entspricht einer Regressionskurve, die durch den Fit einer Hill-Kurve an die Daten entstammt. (C) Histogramm der mittleren Genexpression $\langle \alpha(t) \rangle$ jeder Einzelzelltrajektorie bei einer AHL-Konzentration von 50 nM. Die rote Linie entspricht einem lognormalen MLE-Fit für $P(\langle \alpha(t) \rangle)$. (D) Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung $P(\langle \alpha(t) \rangle)$. Die rote Linie entspricht einer Regressionskurve, die durch den Fit einer Hill-Kurve an die Daten entstammt.

6.6.4 Sender-Empfänger-Experiment

Im Anschluss an die Titrationsexperimente wurden sogenannte Sender-Empfänger-Experimente durchgeführt. Dabei dienten die bereits zur Titration verwendeten Zellen als Empfänger-Zellen. Zusätzlich wurden nun anstatt des synthetischen AHLs die Senderzellen hinzugefügt. Diese exprimieren unter Zugabe von IPTG das LuxI-Protein, welches der Synthese von AHL dient. Zusätzlich haben sie unter dem gleichen Promotor noch das dsred-Gen imple-

mentiert, wodurch sie im Laufe des Experiments rot fluoreszieren und somit von den grün fluoreszierenden Empfängerzellen unterschieden werden können.

6.6.4.1 Bulk-Messung

Vor Beginn der Messreihen wurde zunächst noch untersucht, ob beide Zelllinien dasselbe Wachstumsverhalten aufweisen und ob IPTG Einfluss darauf hat. Hierzu wurden beide Kulturen jeweils für sich im Plate-Reader gemessen. Einmal mit und einmal ohne die Zugabe von 1 mM IPTG, sowie jeweils einmal mit und ohne einer AHL-Konzentration von 100 nM. Das Ergebnis zeigt, dass das IPTG keinen sichtbaren Einfluss auf das Wachstum von Sender- und Empfängerzellen hat. Jedoch erkennt man auch, dass in diesem Experiment die Empfängerkulturen mit hoher AHL-Konzentration etwas langsamer und weniger dicht wachsen. Da jedoch die AHL-Konzentration, welche durch die Sender-Zellen produziert wird, erheblich niedriger ist, kann diese Beobachtung vernachlässigt werden. Mit diesem Ergebnis werden die Experimente als linear skalierbar betrachtet. Ein Vergleich der Fluoreszenzen zeigt, dass IPTG und AHL keinen Einfluss auf die Fluoreszenz von GFP nehmen, jedoch die Fluoreszenz von RFP in Anwesenheit hoher AHL-Konzentrationen geringfügig schwächer ausfällt. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Expression von RFP auch ohne Induktion durch IPTG nachgewiesen werden kann (Abb. 6.12).

Für die Experimente wurden unterschiedliche Verhältnisse von Sender zu Empfänger gewählt um mögliche gegenseitige Einflüsse aufdecken und mit unterschiedlichen AHL-Konzentrationen arbeiten zu können. Die Induktion der Senderzellen war dagegen mit 1 mM IPTG immer auf demselben Niveau. Eine zusätzliche Induktion der Empfängerzellen hat nicht stattgefunden.

Es wurde wie bereits in den Titrationsexperimenten auch hier wieder mit Bulk-Messungen im Plate-Reader begonnen um an einen groben Überblick über das Verhalten der Kulturen und erste Ergebnisse zu gelangen. Es wurden Sender- und Empfängerzellen in den Verhältnissen 1:1, 2:1, 3:1 und 1:2 gemischt um verschieden hohe AHL-Konzentrationen zu erhalten.

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel wurde auch hier zuerst das Zellwachstum näher betrachtet. Eine Einschwingphase im Zellwachstum, dass mit der Adaption an die veränderten Umgebungsbedingungen zusammenhängt, ist in diesem Versuch nicht nachweisbar. Die Kulturen befinden sich bereits in der exponentiellen Phase, welche bis zu $t = 2 \text{ h } 2 \text{ min} \pm 20 \text{ min}$ andauert. In diesem Zeitraum beträgt die Wachstumsrate $\lambda_W = 1,34 \pm 0,16 \text{ h}^{-1}$. Das

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS 87

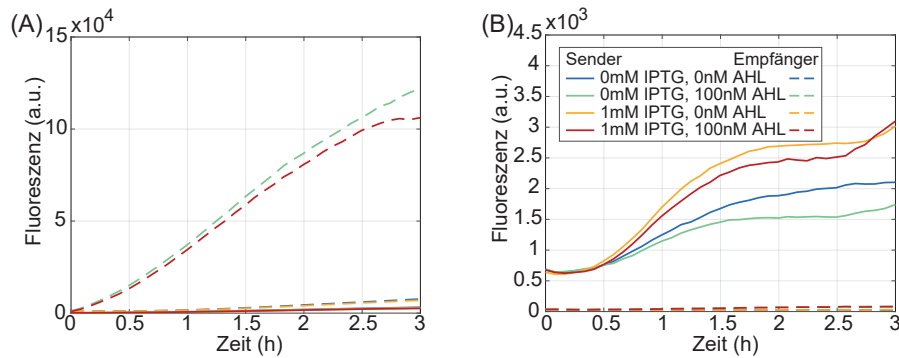


Abbildung 6.12: Einfluss von IPTG und AHL auf die Fluoreszenz (A) GFP-Messung: Senderzellen sind unabhängig vom Inducer nicht grün fluoreszierend, die Empfängerzellen weisen ohne AHL-Zugabe eine geringe Basalexpression auf, mit AHL-Induktion findet eine ausgeprägte GFP-Expression statt. IPTG nimmt keinen Einfluss auf die Fluoreszenz. **(B)** RFP-Messung: Empfängerzellen weisen keine Fluoreszenz im RFP-Spektrum auf. Senderzellen werden durch IPTG-Zugabe induziert. AHL weist eine reprimierende Wirkung auf die RFP-Fluoreszenz auf.

entspricht einer Teilungsrates von $\tau = 1,94 \pm 0,27 \text{ h}^{-1}$. Im Anschluss folgt der Übergang in die stationäre Phase (Abb. 6.13).

Die unterschiedlichen Verhältnisse aus Sender- und Empfängerzellen führen zu unterschiedlichen AHL-Konzentrationen. Jedoch muss in der Auswertung berücksichtigt werden, dass bei einer hohen AHL-Konzentration auch die Zahl der Senderzellen im Vergleich zu den Empfängerzellen deutlich höher und damit die gemessene Fluoreszenz vergleichsweise niedriger ist. Um die Ergebnisse dadurch nicht zu verfälschen, wurden die Fluoreszenzwerte entsprechend dem Empfängeranteil umgerechnet.

Die reine Empfängerkultur hat, wie bereits beim Wachstum, keine nachweisbare Einschwingphase für die Genexpression. Gleiches gilt für die Senderzellen und deren Induktion durch 1mM IPTG. Anders verhält es sich dagegen bei den Empfängerzellen in gemischten Proben. Hier besteht eine Einschwingphase von $32,5 \text{ min} \pm 2,5 \text{ min}$, in welcher die durch Basalexpression entstandene Fluoreszenz nachlässt. Im Anschluss daran beginnt die Induktionsphase, in der das, durch die Sender bereits synthetisierte, AHL die Genexpression startet. Die maximale AHL-Expression ist nach $1 \text{ h } 2 \text{ min} \pm 6 \text{ min}$ erreicht. Die Antwort der Empfängerzellen folgt $10 \text{ min} \pm 7 \text{ min}$ später, wobei zu beobachten ist, dass die Antwort länger dauert, je höher der Anteil der Senderzellen und damit die nutzbare Zahl der AHL-Moleküle ist (Abb. 6.14A).

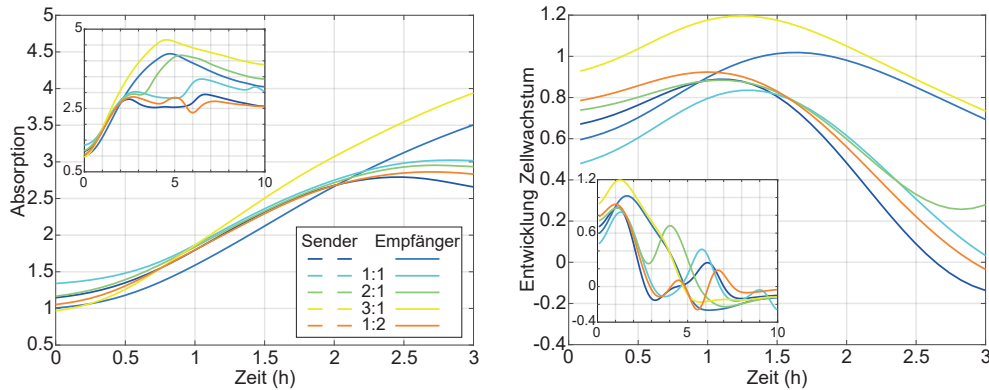


Abbildung 6.13: Wachstum von Sendern und Empfängern in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (A) Während der exponentiellen Wachstumsphase, die $2\text{ h } 2\text{ min} \pm 20\text{ min}$ andauert, zeigen alle Kulturen dasselbe Wachstumsverhalten. In Klein ist das Wachstum über die gesamte Versuchsdauer dargestellt. **(B)** Die zeitliche Ableitung der Absorptionsmessung ergibt, dass die Maxima der Wachstumsgeschwindigkeit unabhängig vom Mischungsverhältnis sind und zeitlich eng beieinanderliegen.

Nach Berechnung der mittleren Fluoreszenz pro Zelle, wobei die Absorption als Größe für die Anzahl der Zellen steht, zeigt sich, dass - wie erwartet - die Genexpression mit steigendem Anteil an Senderzellen wächst. Auch hier lässt sich, wie bereits in den Titrationsexperimenten, ein näherungsweise lineares Verhalten beobachten (Abb. 6.14B).

Auch hier lässt sich mit Hilfe der zeitlichen Ableitung der mittleren Fluoreszenz P eine Aussage über die Genregulation treffen. Es lässt sich darüber feststellen, dass die maximale Genexpression der Sender etwa $0,5\text{ h}$ vor der der Empfänger eintritt (Abb. 6.14C).

Trägt man zuletzt die Maxima der Genexpression in Abhängigkeit der Mischverhältnisse gegeneinander auf, so zeigt sich, dass die Expression der Sender in allen Fällen gleich stark ist, die Expression der Empfänger jedoch exponentiell mit dem Anteil an Sendern sinkt (Abb. 6.14D). Dieses Verhalten lässt sich direkt aus Gleichung 6.7 ableiten, indem man $x = \frac{1}{2}x$ setzt. So erhält man

$$H = a \cdot \frac{\left(\frac{1}{2}x\right)^n}{k^n + \left(\frac{1}{2}x\right)^n} = a \cdot \frac{\left(\frac{1}{2}\right)^n x^n}{k^n + \left(\frac{1}{2}\right)^n x^n}, \quad (6.12)$$

und zeigt damit, dass eine exponentielle Abhängigkeit der Genexpression von einer linearen Änderung des Inducers besteht.

6.6.4.2 Mikroskopmessung

Auf die Plate-Reader Messungen folgten auch hier wieder Mikroskopie-Versuche. Die Einstellungen während des Experiments waren dieselben wie in den Titrationsversuchen und zur Bildanalyse wurden ebenfalls dieselben Programme genutzt. Sender- und Empfängerzellen wurden für diese Versuche in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 gemischt. Dieses bezieht sich jedoch ausschließlich auf die Mischung im Rahmen der Versuchsvorbereitung. Ein Befüllen der Messkammern in dem exakten Verhältnis aus Sendern und Empfängern ist technisch bedingt nur mit einer Näherung von $4 \pm 2\%$ möglich gewesen. Es wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die Zahlen, über die gesamte Mikrofluidikstruktur gemittelt, dem angestrebten Verhältnis entsprechen.

Die Auswertung des Wachstums in den Messkammern ergibt, dass die Senderzellen mit einer Teilungsrate $\tau_S = 2,7 \pm 0,93 \text{ h}^{-1}$ etwas langsamer wachsen als die Empfängerzellen mit einer Teilungsrate von $\tau_E = 4 \pm 1,25 \text{ h}^{-1}$. Dieser hohe Wert ist insbesondere durch das Wachstumsverhalten der Mischungsverhältnisse 1:7 und 1:15 bedingt, in dem die Empfänger in einer länger andauernden lag-Phase verweilen und anschließend in ein starkes Wachstum übergehen, wohingegen das Wachstum der Sender deutlich schwächer ausfällt. Die maximale Wachstumsrate der Empfänger ist bei $t_{max,A,E} = 4 \text{ h } 36 \text{ min} \pm 1 \text{ h } 6 \text{ min}$ erreicht. Nach $6 \text{ h} \pm 1 \text{ h } 06 \text{ min}$ ist die Messkammer komplett mit Zellen ausgefüllt und eine weitere Aussage über das Wachstum kann in der Bulk-Analyse nicht mehr getroffen werden (Abb. 6.15A).

Die graphische Darstellung der GFP-Fluoreszenz zeigt, dass die Induktion zu ähnlichen Zeitpunkten startet. Lediglich die Messreihe mit nur 6,75% Senderzellenanteil beginnt die Expression zeitlich verzögert. Bedingt durch diesen geringen Anteil dauert es länger, bis die Sender eine zur Induktion ausreichende Menge AHL synthetisiert haben. Mit Beginn der Zellinduktion startet die Genexpression, was zu einem exponentiell verlaufenden Fluoreszenzanstieg mit einer Rate von $\lambda_F = 3,15 \pm 0,66 \text{ h}^{-1}$ führt. Diese Wachstumsrate ist etwas höher als die des Zellwachstums. Daher ist auch der Anstieg der mittleren Fluoreszenz mit einem Wachstum von $\lambda_{F,Mean} = 3,20 \pm 0,66 \text{ h}^{-1}$ exponentiell. Nach $6 \text{ h } 39 \text{ min} \pm 1 \text{ h } 9 \text{ min}$ ist das Maximum der mittleren GFP-Fluoreszenz erreicht. Bereits nach $4 \text{ h } 39 \text{ min} \pm 1 \text{ h } 9 \text{ min}$ ist die mittlere Genexpression auf jeweils maximalem Niveau. Danach geht die Genexpression zurück, bis sie

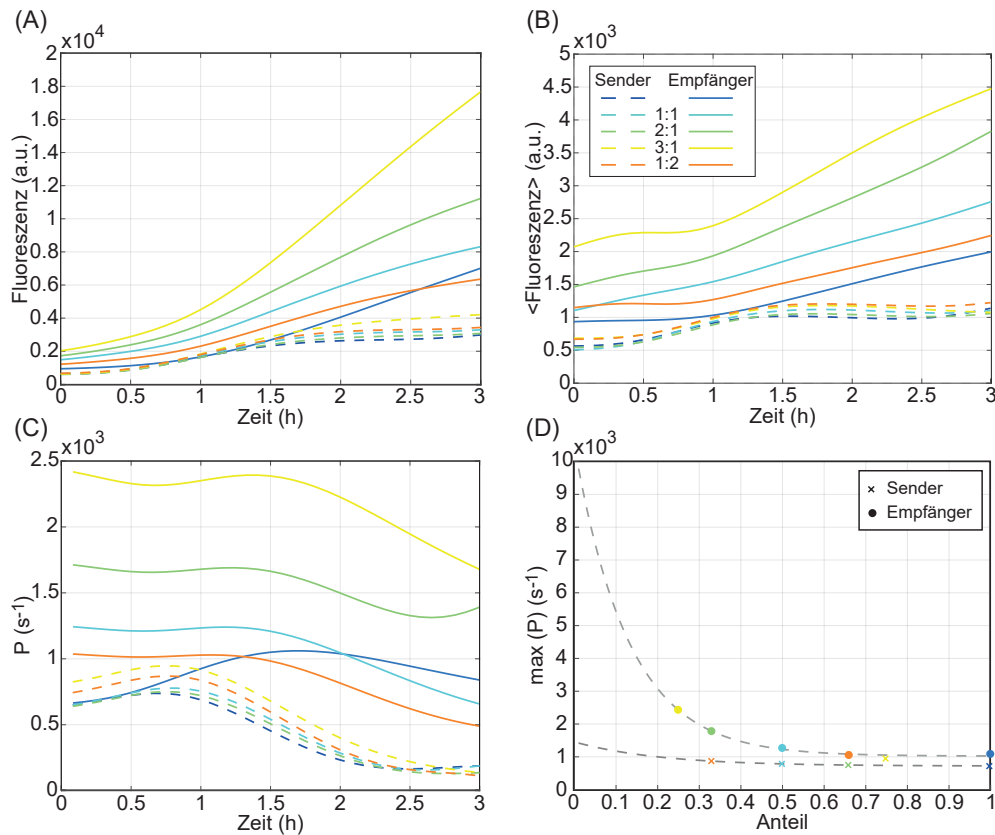


Abbildung 6.14: Fluoreszenzentwicklung in Abhängigkeit vom Sender-Empfänger-Mischverhältnis Durchgezogene Linien: GFP-Expression der Empfänger, gestrichelte Linien: RFP-Expression der Sender. Die Darstellungen der Abbildung sind nur näherungsweise, da sie über die jeweilige gesamte Kultur betrachtet sind, in denen keine exakte Unterscheidung in der Entwicklung der Mischverhältnisse gemacht werden kann. **(A)** Die Werte der Gesamtfluoreszenz starten sowohl für Empfänger als auch für Sender ähnlich, unabhängig vom Mischungsverhältnis. Je höher der Senderanteil ist, desto höher ist die GFP-Expression der Empfänger. Die Induktion der Sender ist über den gesamten betrachteten Zeitraum praktisch gleich **(B)** Die Betrachtung der mittleren Fluoreszenz zeigt einen näherungsweise linearen Anstieg der Genexpression der Empfängerzellen. Die RFP-Produktion der Senderzellen ist auf Grund der gleichbleibend hohen IPTG-Zugabe unabhängig vom Mischungsverhältnis. **(C)** Das Maximum der Genexpression ist zeitlich unabhängig vom Sender-Empfänger-Verhältnis. Die Sender erreichen es vor den Empfängern. **(D)** Die angefitzte Exponentialfunktion zeigt, dass die Genexpression der Empfänger exponentiell mit dem linearen Rückgang des Senderanteils sinkt. Die Induktion der Sender ist unabhängig von ihrem Anteil im Mischungsverhältnis.

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS⁹¹

gegen Ende der Messungen annähernd komplett eingestellt ist. Diesen Effekt sieht man auch in der Fluoreszenzauswertung. Nach den Maximalwerten dünnt die Fluoreszenz nach und nach mit der Zellteilung aus (Abb. 6.15B und 6.15C).

Um diesen Effekt erklären zu können, wurde die RFP-Fluoreszenz der Senderzellen ausgewertet. Dabei konnte beobachtet werden, dass die maximale RFP-Fluoreszenz bereits bis zu 1 h 24 min vor dem GFP-Maximum auftritt. Die maximale RFP-Expression findet jedoch mindestens 48 min nach der zugehörigen GFP-Expression statt. Die größte mit Senderzellen bewachsene Fläche ist erreicht, kurz nachdem die maximale Expressionsrate erreicht ist. Mit rückgängiger Zahl LuxI-exprimierender Zellen und gleichzeitig langsamer ablaufender AHL-Synthese, ist für die Empfängerzellen weniger Inducer vorhanden, wodurch auch hier die Expressionsrate und damit die Fluoreszenz sinkt.

Bei Betrachtung der Gesamtfluoreszenz zum Zeitpunkt maximaler Genexpression, fällt auf, dass sich ein lineares Schaltverhalten zwischen den Mischungsverhältnissen 1:1, 1:3 und 1:7 zeigt. Es ist davon auszugehen, dass auch das Mischungsverhältnis 1:15 in diesen Fit passt, wenn die Genexpression der Senderzellen nicht deutlich stärker als in den anderen Fällen ausgefallen wäre. Dies kann der Tatsache geschuldet sein, dass bei einer Induktion mit 1 mM IPTG den Sendern im Mischungsverhältnis 1:15 deutlich mehr Inducer pro Zelle zur Verfügung stand als in den anderen Experimenten (Abb. 6.15D).

6.6.4.3 Quantifizierung der AHL-Konzentration

Eine quantitative Analyse dieser Sender-Empfänger-Experimente gestaltet sich aus verschiedenen Gründen schwierig. Zum einen gibt es keinen einfachen *in situ* Sensor für AHL, sondern die Empfängerbakterien selbst sind zelluläre Sensoren. Zum Zweiten handelt es sich bei Sendern und Empfängern um lebende Systeme, die sich dynamisch verhalten und wachsen. Das bedeutet, dass der Output zu jedem Zeitpunkt von der Systemhistorie und den Details des Systems, wie die Entwicklung des Sender-Empfänger-Verhältnisses r , der Wachstumsrate und der Expressionsrate. Um dennoch die effektive AHL-Konzentration abschätzen zu können, muss auf ein Modell zurückgegriffen werden, das die Dynamik der Genexpression des Systems beschreibt. Hierfür bedarf es der Produktionsraten für die AHL-Synthase LuxI sowie dem daraus umgesetzten AHL.

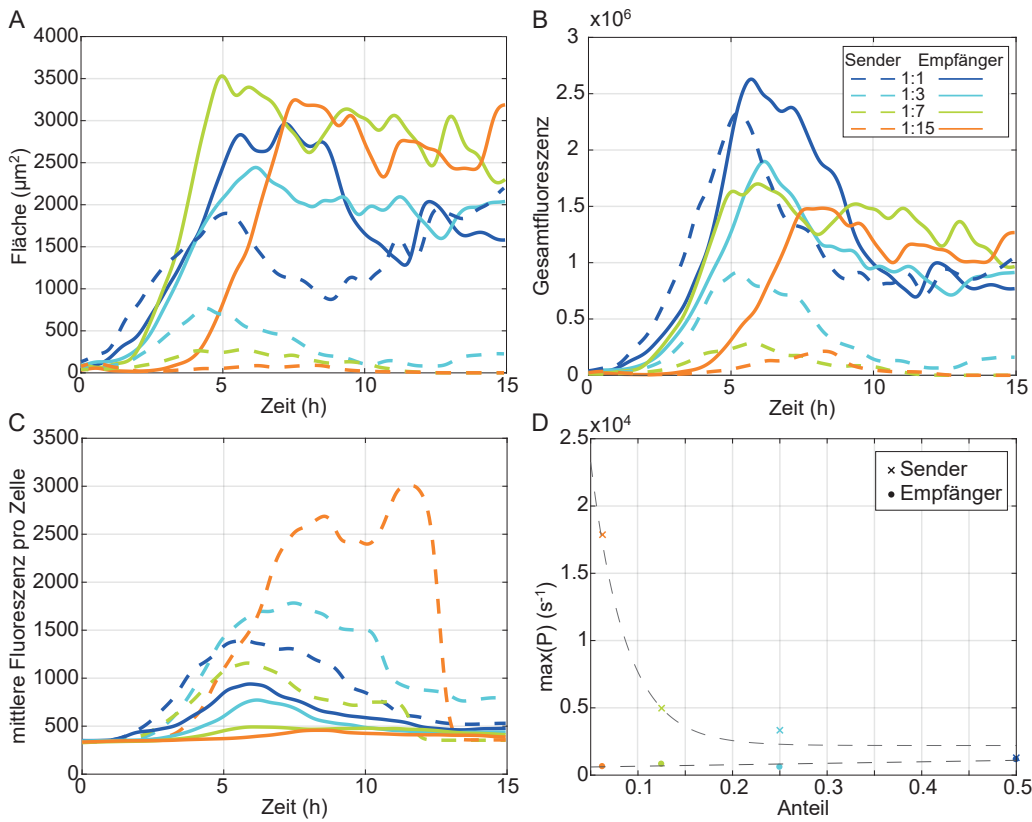


Abbildung 6.15: Genexpression in Abhängigkeit des Sender-Empfänger-Verhältnisses (A) Wachstum der Sender und Empfänger **(B)** Gesamtfluoreszenz aller Sender und aller Empfänger, wobei für die Sender die Fluoreszenz von RFP und für die Empfänger die Fluoreszenz von GFP ausgewertet wurde. **(C)** Mittlere Fluoreszenz der einzelnen Zellen. **(D)** Maximale Genexpressionsrate für Sender (Kreuz) und Empfänger (Punkt) jedes Sender-Empfänger-Verhältnisses. In allen Fällen wurde für die Sender die Fluoreszenz des exprimierten RFPs und für die Empfänger die Fluoreszenz des exprimierten GFPs ausgewertet.

Die LuxI-Produktionsrate kann beschrieben werden durch

$$\frac{d}{dt}[LuxI](t) = \alpha_l r N(t) - \lambda[LuxI](t), \quad (6.13)$$

wobei es sich bei α_l um die LuxI-Produktionsrate, bei N um die Gesamtzahl der Empfängerbakterien und bei $[LuxI]$ um die mittlere Konzentration an LuxI-Molekülen in der Mikrofluidikkammer zum Zeitpunkt t handelt. Des Weiteren

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS 93

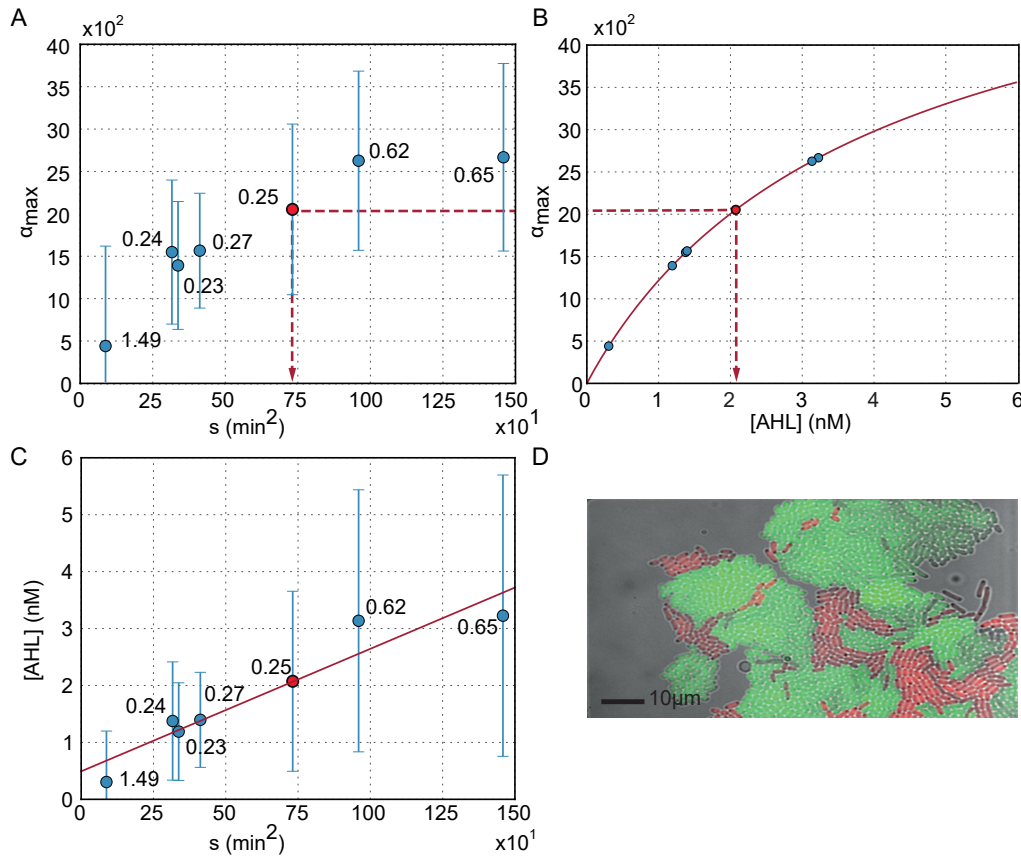


Abbildung 6.16: Quantifizierung der AHL-Konzentration in Sender-Empfänger-Experimenten (A) Maximale GFP-Induktion aus sieben Experimenten als Funktion der effektiven AHL-Produktionskonstante $s = \langle r \rangle t_{max}^2$. Der Parameter s ändert sich mit dem Sender-Empfänger-Verhältnis r . Die Anfangsverhältnisse lagen bei $r = 0,067, 0,142, 0,33$ und 1 (entspricht den Sender-Anteilen von $6,25\%, 12,5\%, 25\%$ und 50%). Auf Grund von Zellteilung und der Dynamik innerhalb der Zellkammer variieren die Verhältnisse mit der Zeit. Die so entstandenen jeweiligen mittleren Verhältnisse $\langle r \rangle$ ergeben sich aus den einzelnen Datenpunkten. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen, wie sie sich aus den Histogrammen der Einzelzell-Genexpression in Abbildung 6.11 ergeben. (B) Berechnung der effektiven AHL-Konzentration für die sieben Experimente, wobei die Kalibrierungskurve aus den Experimenten genutzt wird, in denen ausschließlich Empfänger mit konstanten AHL-Konzentration gemessen wurden. (C) Der Parameter s und die effektive AHL-Konzentration in der Falle können wie über die gestrichelte Linie und den roten Messpunkt in (A) und (B) beispielhaft dargestellt, in Beziehung gebracht werden. Ein linearer Fit nach Gleichung 6.17 ist als rote Linie dargestellt. Die Fehlerbalken wurden über Fehlerfortpflanzung aus der Standardabweichung in (A) bezogen. (D) Beispielausschnitt einer Mikrofluidik-Kammer, die sowohl Sender- (rot) als auch Empfängerbakterien (grün) enthält.

entspricht die Rate λ der Kombination aus Degradation und Verdünnung von LuxI und r dem Sender-Empfänger-Verhältnis, dass in den verschiedenen Experimenten unterschiedlich ausfällt und sich über die Dauer eines Versuchs entwickeln kann. AHL wird aus LuxI mit der Rate α_a hergestellt und verteilt sich diffusiv in der Kammer. Im Folgenden wurde der Abbau und Zerfall von AHL vernachlässigt, jedoch der Ausfluss aus der Wachstumskammer mit der Rate C berücksichtigt.

Daraus ergibt sich die AHL-Produktionsrate über

$$\frac{d}{dt}[AHL](t) = \alpha_a[LuxI](t) - C[AHL](t). \quad (6.14)$$

Diese Gleichungen können für die exponentielle Wachstumsphase, in der $N(t) = N_0 e^{\lambda t}$ gilt, und der Annahme, dass die Raten für Wachstum, γ , Abbau, λ und Ausfluss, C , analytisch gelöst werden. Aus der Gleichung 6.13 ergibt sich somit

$$[LuxI](t) = \frac{N_0 \alpha_l r}{\gamma + \lambda} (e^{\gamma t} - e^{-\lambda t}). \quad (6.15)$$

Setzt man nun 6.15 in 6.14 ein, lässt sich diese mit Hilfe der vorherigen Annahmen lösen zu

$$\begin{aligned} [AHL](t) &= \frac{N_0 \alpha_l \alpha_a r}{(\gamma + \lambda)(C + \gamma)(C - \lambda)} \\ &\cdot [C(e^{\gamma t} - e^{-\lambda t}) + \gamma(e^{-Ct} - e^{-\lambda t}) + \lambda(e^{-Ct} - e^{\gamma t})] \\ &\approx \frac{1}{2} N_0 \alpha_l \alpha_a r t^2 \end{aligned} \quad (6.16)$$

Aus diesem Ergebnis erkennt man, dass es zu jedem Zeitpunkt t eine Anzahl an Individuen gibt, die AHL auf Grund des Populationswachstums proportional zu t produzieren. Integriert man über die Zeit, erhält man eine Gesamtproduktion von AHL in der Kammer, die proportional zu t^2 ist. $\frac{1}{2} \alpha_a \alpha_l r N_0$ stellt die Proportionalitätskonstante dar, die sowohl von den AHL- und LuxI-Produktionsraten sowie der anfänglichen Populationsgröße der Sender abhängt.

Das Sender-Empfänger-Verhältnis r das zum Zeitpunkt t der gemessenen AHL-Konzentration herrscht, unterscheidet sich von Experiment zu Experiment. Daher wird in jedem Experiment der Zeitpunkt t_{max} zum Messen genutzt, zu dem die Sender maximal induziert sind. Das Sender-Empfänger-Verhältnis wird dabei abgeschätzt, indem während des Zeitraums $[0, t_{max}]$

über $r(t)$ gemittelt wird. Um nun noch verschiedene Sender-Empfänger-Experimente vergleichen zu können, wird die Variable $s = \langle r \rangle t_{max}^2$ eingeführt. Sie ermöglicht es eine Kalibrierkurve zu erstellen, bei der der Parameter s in Beziehung zu der effektiven Menge AHL in der Kammer steht:

$$[AHL]_{eff}(s) = \frac{1}{2} \alpha_a \alpha_l N_0 s \quad (6.17)$$

Verschiedene Schätzungen geben an, dass der Diffusionskoeffizient von AHL bei 100 bis 1000 $\mu m^2/s$ liegt [155] [93] [156] [157]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das AHL sehr schnell durch die Kammer diffundiert und somit jede Zelle derselben AHL-Konzentration ausgesetzt ist. Dadurch ergibt sich eine GFP-Expressionsrate der Empfängerzellen von:

$$\alpha \equiv \frac{d}{dt}[GFP](t) = \alpha_g \frac{[AHL]^n(t)}{[AHL]^n(t) - k^n}. \quad (6.18)$$

Hierbei stehen n und k wie bereits zuvor für den Hill-Exponenten und den AHL-Schwellwert für die Induktion.

Mit diesen Ergebnissen kann nun jede experimentell gefundene GFP-Expressionsrate α einem Parameter s zugeordnet und somit charakterisiert werden. Gleichzeitig ist es möglich, α mit Hilfe von Gleichung 6.18 einer effektiven AHL-Konzentration zuzuordnen, womit wiederum eine Beziehung zwischen der AHL-Menge und dem Parameter s hergestellt wird. Diese erlaubt es die Senderstärke gemäß Gleichung 6.17 zu bestimmen (Abb. 6.15). In der Praxis bedeutet das, dass die effektive AHL-Konzentration eines Sender-Empfänger-Experimentes berechnet, Daten aus mehreren Experimenten verglichen oder auch zwei Experimente auf Vergleichbarkeit geprüft werden können.

6.6.5 Vergleich der experimentellen Methoden

6.6.5.1 Plate-Reader vs. Mikroskop

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Messverfahren Plate-Reader und Mikrofluidik zeigen, wie groß der Einfluss verschiedener Umgebungsbedingungen auf das Verhalten von Bakterien ist. Beide Versionen stellen exemplarische Abbildungen von natürlichen Habitaten dar. Die beiden Fälle unterscheiden sich vor allem in dem Raum, der zur Verfügung steht, den Bewegungsmöglichkeiten der Zellen und in der Nährstoffversorgung, wobei diese in beiden Fällen zu Beginn der Experimente als optimal angesehen werden kann. Während im Plate-Reader Experiment die Zellen frei schwimmen können, sind sie

jedoch in der Mikrofluidik-Kammer räumlich stark begrenzt. Dies führt dazu, dass im ersten Fall ein schnelles Zellwachstum einsetzt, welches jedoch durch den Verbrauch an Nährstoffen begrenzt wird. Sind diese aufgebraucht, setzt auch das Wachstum aus und würde mit der Zeit sogar in ein Zellsterben übergehen. Anders schaut es im zweiten Fall aus. Hier ist das Wachstum deutlich langsamer. Die Bakterien haben eine deutlich niedrigere Teilungsrate, welche jedoch über den gesamten Zeitraum des Experiments anhält. Dafür sorgt die durchgängige Versorgung von frischen Nährstoffen, der Abtransport von Abfallprodukten und die gleichbleibende Zelldichte, sobald eine Kammer gefüllt ist.

Ähnliche Unterschiede kann man in Bezug auf die Genexpression erkennen. Während der Hill-Koeffizient, welcher hier für die Kooperativität von AHL und LuxR steht, wie erwartet im Rahmen der Messbedingungen gleich ist, so ist die Schaltkonzentration, welche als Wendepunkt zwischen aus- und angeschalteten Kolonien steht, stark umgebungsabhängig. So beträgt sie in der Bulk-Messung 14 nM, während es in der Einzelzellmessung je nach Art der Auswertung lediglich 4,3 nM und weniger sind. Verschiedene Faktoren können hier einflussnehmend sein:

1. die Beständigkeit der AHL-Konzentration: während in der Einzelzellmessung die Zellkolonie durchgängig mit einer gleichbleibenden AHL-Konzentration versorgt wird, kann die im Bulk-Experiment nur zu Beginn garantiert werden. Im Laufe des Experimentes können AHL-Moleküle durch die Zellen abgebaut und zersetzt werden, ohne dass sie durch frische Moleküle ersetzt würden.
2. die Nährstoffversorgung: bedingt durch die optimale Nährstoffversorgung über den gesamten Messzeitraum, können die Bakterien viel Energie in die Genexpression stecken. Dies ist im Plate-Reader nur anfangs möglich im Verlauf des Versuchs werden die Nährstoffe verbraucht und die Bakterien müssen sich darauf einstellen, was sich auch in einer verringerten Expressionsrate bemerkbar macht.
3. die Wachstumsgeschwindigkeit: bei einer hohen Wachstumsgeschwindigkeit, wie sie im Bulk-Reader gemessen wird, wird ein hoher Anteil der Energie in die Zellteilung gesteckt. Bei einer niedrigeren Rate wie im Chemostaten bleiben mehr Reserven, die in andere Stoffwechselfvorgänge gesteckt werden können.

6.6. CHARAKTERISIERUNG EINES SENDER-EMPFÄNGER SYSTEMS⁹⁷

Sowohl in Bezug auf das Wachstum als auch auf die Genexpression kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur ein Faktor maßgebend ist, sondern dass eine Mischung aus allen - vielleicht auch hier nicht erwähnten - das Zellverhalten bestimmt.

6.6.5.2 Titration vs. Sender-Empfänger-Zellen

Zwischen den reinen Titrationsmessungen und dem Sender-Empfänger-Experiment sind einige Unterschiede im Verhalten der Bakterien zu beobachten.

So wachsen die Zellen in den gemischten Versuchen deutlich schneller als wenn mit synthetischem AHL induziert sind. Eine Versuchsreihe, in der getestet wurde, ob IPTG oder AHL Einfluss auf die Zellen haben belegt diesen Effekt. So ist das Wachstum der Zellen durch IPTG unbeeinflusst, verringert sich jedoch bei der Zugabe von AHL. Da in den Sender-Empfänger-Messungen zunächst ohne AHL gestartet wird und dieses erst von den Sendern erzeugt werden muss, kann damit das schnellere Wachstum erklärt werden.

Ein Vergleich der Fluoreszenzmessungen ist nur auf qualitativer Ebene möglich. So wurde die Kurve ohne AHL-Zugabe im Titrationsexperiment als Referenzkurve genutzt, an welche die reine Empfängerkurve aus dem Sender-Empfänger-Experiment angepasst wurde. Dies geschah unter der Annahme, dass nach 10 Stunden Messdauer beide Kurven denselben Wert haben. Die restlichen Messreihen wurden entsprechend skaliert und auf das Ergebnis des Titrationsexperimentes gelegt. So erhält man eine Einschätzung, welche Konzentration an AHL während der Messung durch die Senderzellen erzeugt wurde. Der so gefundene Wert liegt dabei etwas niedriger als in der Realität, da in Referenzmessungen gezeigt werden konnte, dass die GFP-Fluoreszenz unter Zugabe von IPTG etwas geringer ausfällt als ohne.

Im Falle des Plate-Reader Experimentes kommt man so auf eine AHL-Konzentration von etwas über 3 nM AHL, was weit unterhalb der zuvor gefundenen $k = 14$ nM liegt. Jedoch ist der Wert nur als sehr grobe Näherung zu betrachten, da neben der Skalierung auch noch eine Hochrechnung stattgefunden hat, bei der der Anteil an Senderzellen aus dem Wachstum herausgerechnet wurde.

Die Betrachtung der Mikroskopie-Ergebnisse ist für eine Aussage zur AHL-Konzentration deutlich vorteilhafter, da hier eine reine Auswertung der Empfängerzellen erfolgen kann. Zwar bestehen noch immer Unschärfen, wie

beispielsweise das Verhältnis von Sendern und Empfängern auf den gesamten Chemostaten gesehen, jedoch sind diese weniger einflussreich.

Das Maximum der AHL-Konzentration, welches im Verlauf der Messungen erreicht wird, liegt bei rund 4 nM. Wie bereits beim Plate-reader erfolgt der Fluoreszenzanstieg langsamer als bei der Titration, was dem Umstand geschuldet ist, dass der Inducer durch die Senderzellen zunächst noch synthetisiert werden muss, bevor die GFP-Expression induziert werden kann. Im Gegensatz dazu war in den Titrationmessungen von Beginn und über den gesamten Zeitraum eine gleichbleibende Menge an AHL vorhanden. Die experimentell gemessenen 4 nM liegen noch leicht unter dem Schwellwert von 4,3 nM. Im Anschluss an den jeweiligen Maximalwert fällt die Fluoreszenz beinahe wieder auf den Ausgangswert ab. Dieses Verhalten ist in abgeschwächter Form bereits in den Titrationsexperimenten zu sehen. Um die Ursache genau zu bestimmen bedarf es weiterer Experimente. Jedoch ist derzeit die Annahme, dass die Bedingungen innerhalb der Wachstumskammer nicht mehr optimal sind, sobald diese voll bewachsen ist. Für eine Verifikation dieser Annahme bräuchte es Versuche, in denen die Zellen nicht von drei Seiten eingesperrt sind. Dies ließe sich beispielsweise durch Wachstumskanäle, aus denen die Bakterien zu zwei Seiten entweichen können, umsetzen.

Kapitel 7

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen des BACTOCOM-Projektes der Fokus auf interzelluläre Kommunikation und Reportersysteme von Bakterien gelegt. In der Betrachtung wurde zunächst die Übertragung genetischen Materials von einer Zelle an die nächste mittels Konjugation gewählt. In den durchgeführten Versuchen stellte sich jedoch heraus, dass die Nachteile des Systems überwiegen. So erfolgt die Plasmidübertragung vergleichsweise langsam und es lassen sich zwar Grenzlinien zwischen Sendern und Empfängern feststellen, jedoch verwischen diese mit fortdauerndem Zellwachstum stark. Nicht zuletzt ist die gemessene Fluoreszenz sehr schwach und eine kolonieweite Ausbreitung der Plasmide nicht gegeben, was den Nachweis erfolgreicher Übertragung zusätzlich erschwert. Aus diesen Gründen wurde die detailliertere Charakterisierung des Systems nicht weitergeführt.

Als zweite Option stand das Lux-artige Quorum Sensing-System zur Verfügung. Es stellte sich heraus, dass die Zellreaktion auf das Inducer-Molekül N-3-oxo-C6-Homoserinlaktone, welches durch die Zellwand diffundiert, innerhalb von etwa zwei Zellzyklen erfolgt. Zudem erstreckt sich Expression des Reporterproteins GFP über die gesamte Kolonie und der Fluoreszenzanstieg ist stark genug um eine quantitative Analyse vorzunehmen. Diese Vorteile führten zu einer Entscheidung für das System und der damit benötigten näheren Charakterisierung.

Zunächst wurden Titrationsmessungen an genetisch modifizierte Empfängerzellen mit synthetischem N-3O-C6-HSL vorgenommen. Diese erfolgte als Bulk-Messung im Plate-Reader und auf Einzelzellebene zur Charakterisierung der Dynamik der Genexpression. Hierfür wurden die Zellen in einen Chemostaten eingebracht und die Entwicklung der Zellen mit zeitaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Mit Hilfe spezieller Analyse-Software,

konnten aus den Aufnahmen große Zahlen von Zellen über einen langen Zeitraum hinweg getrackt, Zellteilung über mehrere Generationen hinweg verfolgt und Subpopulationen in einer heterogenen Kolonie herausgefiltert werden.

Im Anschluss wurde die Antwort der einzelnen Bakterien auf unterschiedliche Inducerkonzentrationen mit Hilfe verschiedener Methoden quantifiziert. Indem die zeitliche Entwicklung der statistischen Verteilung der Aktivität der Genexpression beobachtet wurde, konnten mehrere Subpopulationen mit unterschiedlichem Induktionsverhalten nachgewiesen werden. Die so über den mittleren Fluoreszenzwert gewonnenen Antwortkurven der Versuche im Chemostaten sind in guter Übereinstimmung mit den Bulk-Messungen im Plate-Reader. Lediglich der Induktionsschwellwert liegt im Einzelzell-Experiment unterhalb dessen was im Bulk gemessen wurde. Dies lässt sich jedoch den unterschiedlichen Umgebungsbedingungen zuschreiben. Antwortkurven von Einzelzelltrajektorien erlaubten die Konzentration auf die dominante Subpopulation, welche ein einheitliches Induktionsverhalten aufwies. Die Analyse dieser Hauptpopulation zeigte eine stärkere Antwort auf den Autoinducer und damit einen höheren Hill-Exponenten als die gleiche Analyse über die Gesamtkolonie. Ein kleiner Teil der Bakterien wies eine deutlich langsamere Reaktion auf das AHL auf, was mit der geringeren Wachstumsrate dieser Zellen zusammenhängen kann. Das Rauschen der Genexpression wurde als extrinsisches erkannt, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von vorherigen Studien zu anderen bakteriellen Kommunikationssystemen ist. Überraschend war jedoch, dass der Variationskoeffizient im nicht stationären Zustand der Anfangsphase dynamisch ansteigt, dann jedoch konstant wird, sobald etwa $\frac{1}{3}$ der maximalen Genexpression erreicht ist.

Die bereits für die Titration angewandten Methoden wurden im nächsten Schritt noch einmal für ein System aus Senderzellen, die die Autoinducer-Synthase LuxI exprimieren, und den Empfängerzellen verwendet. Dabei dienen die Empfänger selbst als hochsensitive AHL-Bioreporter. Mit Hilfe eines einfachen Genexpressionsmodells für das Sender-Empfänger-System und der Antwortkurve aus den Titrationsexperimenten, konnte eine effektive AHL-Konzentration, die durch die Senderzellen erzeugt wird berechnet und eine effektive Senderstärke zugeordnet werden. Diese Senderstärke kann mittels des Sender-Empfänger-Verhältnisses in der Messkammer angepasst werden, jedoch variiert es auf Grund statistischer Fluktuationen im Laufe eines Versuchs und auch von Experiment zu Experiment. Die effektive AHL-Konzentration ist in etwa proportional zu t^2 , was aus der Zellteilung und der gleichzeitig stattfindenden AHL-Produktion resultiert.

Zusammengefasst konnte auf Bulk- und auf Einzelzellebene die Antwort der Empfängerzellen auf den Inducer N-3O-C6-HSL und die Stärke der Senderzellen quantifiziert werden. Das erlaubt eine bessere Charakterisierung dieses wichtigen interbakteriellen Kommunikationsweges für Anwendungen der Synthetischen Biologie, bei der die stochastische Natur der Genexpression Beachtung findet. Dieselben Methoden können auch auf natürliche Quorum Sensing Systeme angewandt werden, um diese quantitativ zu charakterisieren und weitere Antworten auf dem Gebiet der bakteriellen Kommunikation zu finden.

Anhang A

Weitere Experimente

Neben den im Hauptteil beschriebenen Experimenten, wurden noch weitere Versuche durchgeführt, die jedoch aus Zeitgründen und auf Grund ihrer nur indirekten Relevanz zum BACTOCOM-Projekt nicht weiterverfolgt oder intensiver betrachtet wurden. Um jedoch einen möglichst vollständigen Überblick zu geben, werden sie im Folgenden aufgezeigt. Einige der Experimente waren zum Zeitpunkt der Durchführung bereits von anderen Gruppen veröffentlicht. Hier ging es darum, deren Wege zu verstehen und die Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt des Projekts nutzbringend einfließen zu lassen. Die Tatsache, dass BACTOCOM nicht verlängert wurde, hat die weitere Verfolgung der Ideen jedoch verhindert.

A.1 Wachstum in verschiedenen Kammergeometrien

A.1.1 Einführung

In allen Experimenten aus Kapitel 6.6 konnte beobachtet werden, dass die Zellen zu Beginn des jeweiligen Versuchs an das geschlossene Ende der Wachstumskammer im Chemostaten wandern. Diese Messungen wurden jedoch alle in derselben Kammergeometrie durchgeführt und haben die Frage aufgeworfen, ob das Verhalten in anderen Geometrien ebenso auftritt.

A.1.2 Materialien und Methoden

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens unter verschiedenen geometrischen Bedingungen wurden die gleichen Zellen verwendet, wie in Abschnitt 6.6.4. Auch die Vorbereitung der Zellen wurde auf dieselbe Art und Weise

durchgeführt, wobei für Sender und Empfänger ein Mischverhältnis von 1:7 gewählt wurde.

Im Anschluss an die Vorbereitung der Kulturen wurden diese in den Mikrofluidik-Chemostaten gefüllt, eine Flussgeschwindigkeit von $2 \times 80 \mu\text{l/h}$ eingestellt, mit der die Zellen mit frischem LB-Medium versorgt wurden. Die darauffolgenden Hellfeldaufnahmen wurden alle drei Minuten mit einer Belichtungsdauer von 500 ms über einen Zeitraum von 15 Stunden erzeugt.

Unabhängig von der Ausbreitung in x-y-Richtung haben alle Kammern eine Höhe von $1 \mu\text{m}$, da eine höhere Höhe Multilayer-Wachstum der Bakterien zur Folge gehabt hätte, wodurch eine Einzelzellauswertung der Aufnahmen mit den vorhandenen Programmen unmöglich wäre. Eine niedrigere Höhe dagegen führt zu einer Kräfteinwirkung auf die Zellen, die deren Morphologie beeinflussen kann. Variiert wurden dagegen Länge und Breite der Kammern, sowie die zugrundeliegende geometrische Form.

A.1.3 Ergebnis

Wie in Abbildung A.1 dargestellt, lässt sich bereits mit bloßem Auge feststellen, dass die Zellen unabhängig von den betrachteten Geometrien (Abb. A.1 (A)) der Kammern an deren geschlossenes Ende wandern, bevor sie mit der Teilung beginnen und so die Kammern auffüllen (Abb. A.1 (B)). Eine Messung der gesamten bewachsenen Fläche verteilt über die Zeit zeigt zudem, dass die Teilungsrate während der exponentiellen Wachstumsphase unbeeinflusst bleibt und sich in allen betrachteten Kammern gleich verhält (Abb. A.1 (C)). Das beobachtete Verhalten könnte den Zellen dazu dienen in einem möglichst geschützten Raum die Population zu vergrößern und gegebenenfalls durch Mechanismen wie der Produktion einer extrazellulären Matrix zu stabilisieren, bevor sie sich verschiedenen Umwelteinflüssen, wie hier der Strömung, im Hauptkanal aussetzt

A.1.4 Ausblick

Neben den hier dargestellten Formen, macht es für eine möglichst vielfältige Charakterisierung Sinn, das Wachstum auch in extremen Maßen zu betrachten. Darunter fallen beispielsweise zum einen Kammern mit einer Breite von ca. $1 \mu\text{m}$, in denen die Zellen nur wie an einer Perlenkette der Länge nach aneinander gereiht wachsen können oder zum zweiten welche, die keine glatten und geraden Wände haben, sondern ausgefranst oder mit Nischen versehen

sind. Zudem konnte in der durchgeführten Messreihe nicht beobachtet werden, wie sich das Verhalten entwickelt, wenn es kein verschlossenes Ende gibt. Zusätzlich ist es auch interessant, zu betrachten, ob sich eine veränderte Flussgeschwindigkeit auf den Rückzug in Nischen auswirkt. Auch hierzu wurden Basisversuche gemacht, die im folgenden Kapitel dargestellt werden.

A.2 Verschiedene Flussgeschwindigkeiten in der Mikrofluidik

A.2.1 Einführung

Für das Wachstum von Bakterien ist eine optimale Nährstoffversorgung von großer Bedeutung. Fällt diese zu gering aus, wechseln die Zellen von der Wachstums- in die stationäre Phase oder sterben ab. Gleichzeitig muss vermieden werden, dass sich Abfallprodukte im direkten Umfeld der Bakterien ansammeln, da diese toxische Wirkung haben können. Beide Voraussetzungen sind im Chemostaten vorhanden. Mit Hilfe der Durchflussgeschwindigkeit, kann eine Feinjustierung der Bedingungen vorgenommen werden. Ist sie zu hoch, könnten Drücke entstehen, die Auswirkungen auf die Zellen haben, oder durch Verformung der Wachstumskammer Einfluss auf das Experiment nehmen. Bei zu niedriger Geschwindigkeit wiederum besteht die Möglichkeit, dass die Versorgung mit Nährstoffen sowie der Abtransport von Abfallprodukten und überschüssigen Zellen nicht gewährleistet ist. Im Rahmen der hier beschriebenen Versuche, wurde nach der optimalen Flussgeschwindigkeit gesucht.

A.2.2 Materialien und Methoden

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten wurden die gleichen Zellen verwendet, wie in Abschnitt 6.6.4. Auch die Vorbereitung der Zellen wurde auf dieselbe Art und Weise durchgeführt, wobei für Sender und Empfänger ein Mischverhältnis von 1:1 gewählt wurde.

Im Anschluss an die Vorbereitung der Kulturen wurden diese in drei Einzelerperimenten in den Mikrofluidik-Chemostaten gefüllt und Flussgeschwindigkeiten von $60 \mu\text{l/h}$, $80 \mu\text{l/h}$ und $120 \mu\text{l/h}$ je Einlass eingestellt. Die darauffolgenden Hellfeldaufnahmen wurden alle drei Minuten mit einer Belichtungsdauer von 500 ms über einen Zeitraum von 15 Stunden erzeugt.

A.2.3 Ergebnisse

Die Versuche zeigen, dass mit $2 \times 80 \mu\text{l/h}$ das erfolgreichste Ergebnis erzielt wird. Die Zellen passen sich schnell an die neuen Umgebungsbedingungen an und gehen in die exponentielle Wachstumsphase, in der sie verbleiben (siehe auch Abb. 6.9 und Abb. 6.16, Hauptteil). Bei $2 \times 60 \mu\text{l/h}$ verharren die Bakterien für 6 h ohne Wachstum und sterben dabei sogar teilweise ab. Erst nach dieser Zeit haben sich einige wenige Zellen an die Bedingungen angepasst und starten mit der Zellteilung. Sobald sie die exponentielle Wachstumsphase erreicht haben, teilen sie sich mit derselben Geschwindigkeit wie die Zellen, welche mit $2 \times 80 \mu\text{l/h}$ versorgt werden. Die Fluoreszenz entwickelt sich jedoch im Vergleich zu $2 \times 80 \mu\text{l/h}$ deutlich weniger gut. So ist die Messung mit einem Teil Sender und einem Teil Empfänger durchgeführt worden und die mittlere Fluoreszenz verbleibt unterhalb der, die im Falle von $2 \times 80 \mu\text{l/h}$ gemessen wurde, wobei hier der Senderanteil bei nur $\frac{1}{7}$ im Vergleich zum Empfängeranteil lag, was zu Folge hat, dass deutlich weniger AHL pro Zelle zur Verfügung steht. Im Fall von $2 \times 120 \mu\text{l/h}$ werden die Zellen aus der Kammer herausgespült, sobald die Versorgung über die Pumpe gestartet wird. Zurück bleibt eine leere Kammer und es kann keine Messung vorgenommen werden. Zusätzlich bliebe zu klären, ob sich bei Bedarf die Medien aus den beiden Zuläufen trotz der höheren Geschwindigkeit noch vollständig durchmischen würden.

A.2.4 Ausblick

Neben der reinen Flussgeschwindigkeit spielt auch das angebotene Nährmedium eine große Rolle in der Zellversorgung. Man könnte mit diesen variieren, beispielsweise LB-Medium mit M9-Medium in unterschiedlichen Konzentrationen mischen, und beobachten, ob die Zellen daraufhin bei anderen Flussgeschwindigkeiten ihr optimales Verhalten zeigen. Auch hierbei ist eine Relevanz in Hinblick auf die natürliche Umgebung gegeben, da Einblick auf die optimalen Bedingungen im Zusammenspiel aus Nährstoffen, Feuchtigkeitzufuhr und Nischenverhalten gewonnen werden kann.

A.3 Verschiedene Farben in der Mikrofluidik

A.3.1 Einführung

Parallel zu den verschiedenen Wachstumsnischen in Form von unterschiedlichen Geometrien der Zellkammern ist auch ein Einblick in die Entwicklung konkurrierender Stämme interessant. Besondere Bedingungen liegen dann vor, wenn es keine eindeutig fittere Spezies gibt. Diese Vorgaben wurden umgesetzt, indem *E. coli* BL21 mit drei, sich nur im zu exprimierenden Fluoreszenzprotein unterscheidenden Plasmiden bestückt wurde. Unterschiede in der Fitness konnten nicht nachgewiesen werden. Anschließend wurden die drei Zellstämme in einem 1:1:1 Verhältnis gemischt und ihre Entwicklung in der Mikrofluidik beobachtet.

A.3.2 Materialien und Methoden

Zur Untersuchung wurden *E. coli* BL21 mit je einem aus drei pSB1A2-Plasmiden ausgestattet, auf denen jeweils RFP, GFP oder CFP konstitutiv exprimiert wurden. Die Vorbereitung der Kulturen erfolgte in derselben Art und Weise, wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben. Vor dem Start des Experimentes wurden die Zellen in einem 1:1:1 Verhältnis gemischt. Im Anschluss wurde die Zellmischung in den Mikrofluidik-Chemostaten gefüllt und über den gesamten Versuchszeitraum mit $2 \times 80 \mu\text{l/h}$ frischen LB-Mediums versorgt. Es wurden über einen Zeitraum von 7,5 h alle drei Minuten von jedem Ausschnitt eine Hellfeldaufnahme und je eine Fluoreszenzaufnahme mit CFP-, GFP- und RFP-Filterset durchgeführt. Die Belichtungsdauer der Hellfeldaufnahme betrug 500 ms, die der Fluoreszenzaufnahme 100 ms.

A.3.3 Ergebnisse

Die Auswertung der Aufnahmen zeigt, dass nicht vorhergesagt werden kann, welche Zellen am stärksten wachsen. In allen Fällen lässt weder die anfängliche Lage der Zellen, noch deren Zahl zu Beginn des Versuchs Rückschlüsse auf den Verlauf des Experiments zu (s. Abb. A.3). Im Verlauf des Versuchs, können einzelne Farben komplett aus der Wachstumskammer verdrängt werden, jedoch auch durch Zellen, die aus vorherigen Kammern heraus gespült und aus dem Transportkanal in die Kammer wandern, wieder eingebracht werden. Es ließ sich beobachten, dass „Gewinnerfarben“ häufig zunächst einmal am Kammerrand um die gesamte Kammer herumwachsen, bevor sie von allen Seiten in das Innere der Kammer wachsen und dadurch bereits vorhandene Zellen hinausdrängen.

A.3.4 Ausblick

Neben den dargestellten Versuchen, würde es Sinn machen, auch Mikroskopie-Versuche in Kammern ohne Begrenzung zu machen, sowie diese über einen längeren Zeitraum als 7,5 h laufen zu lassen. Dadurch könnte man das Verhalten beobachten, wenn es keine Ränder gibt, an denen die Zellen entlang wachsen können. Ebenso interessant sind komplett geschlossene Kammern, in denen untersucht werden kann, was passiert, wenn die verschiedenen Farben aufeinandertreffen, sich jedoch nicht ausweichen können.

A.4 Verschiedene Farben in motilen Zellen

A.4.1 Einführung

Neben dem Wachstum in einer gut durchmischten Umgebung wie im Plate Reader oder einem Chemostaten wie in der Mikrofluidik, ist auch das Wachstum auf einer Oberfläche von Bedeutung. Die durchgeführten Experimente bauen auf eine Veröffentlichung von Oskar Hallatschek auf [158]. In dieser gibt er einen Tropfen mit etwa 10^6 nicht-motiler *E. coli*-Zellen auf eine Agar-Platte mit LB-Medium und lässt sie über einen Zeitraum von vier Tagen darauf wachsen. Die Zellen sind eine Mischung aus zwei Klonen, die sich genetisch ausschließlich in dem exprimierten Fluoreszenzprotein unterscheiden. Während des Wachstums bilden sich einzelne Sektoren aus, in denen jeweils nur eine der beiden Spezies vorkommt.

Die darauf aufbauenden Experimente wurden mit motilen Zellen durchgeführt um zu sehen, ob die resultierenden Kolonien sich deutlich von denen, die Hallatschek gemessen hat, unterscheiden. Genutzt wurden die Stämme *E. coli* MG1655 und *E. coli* W3110, die, wie bereits in Abschnitt A.3, jeweils einem konstitutiv exprimierten Fluoreszenzprotein versehen ausgestattet wurden.

A.4.2 Materialien und Methoden

Für den ersten Teil der Experimente wurden die motilen *E. coli*-Stämme MG1655 und W3110 genutzt. In sie wurde via Elektroporation ein pSB1A2-Konstrukt hineingegeben, in das ein konstitutiver Promotor vor ein Fluoreszenzprotein kloniert wurde. Die verwendeten Fluoreszenzproteine sind CFP, GFP und RFP.

Zur Vorbereitung des Versuchs, wurde aus jedem der Klone eine Übernachtskultur bei 37°C und 100 rpm angesetzt. Am folgenden Tag wurden sie

abzentrifugiert und in frischem LB-Medium auf eine $OD_{600} = 0,1$ resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut bei 37°C inkubiert und sind bis zu einer $OD_{600} = 1$ gewachsen, bevor sie noch einmal abzentrifugiert und in frischem LB-Medium wieder auf die $OD_{600} = 1$ resuspendiert wurden. Im nächsten Schritt wurden verschiedene Mischungen der Zellen hergestellt, in denen jede der jeweils verwendeten Spezies in definierten Anteilen vertreten war. Zuletzt wurde $1\ \mu\text{l}$ jeder Kultur auf jeweils eine LG-Agar-Platte aufgebracht und für 3 Tage bei 37°C inkubiert.

Nach Abschluss des Wachstums wurden Aufnahmen der Kolonien mit 10-facher Vergrößerung gemacht. Da kein aufrechtes Mikroskop mit passendem Filtersatz, entsprechender Beleuchtungseinrichtung und automatisiertem x-y-Tisch greifbar war, wurden die Aufnahmen in einem inversen Mikroskop (Olympus IX81) erstellt. Dafür ist jede Kolonie aus der LB-Agar-Platte ausgeschnitten und auf ein Deckglas gelegt worden. Diese Technik führt vereinzelt zu Artefakten in Form von eingeschlossenen Luftblasen, lässt dennoch die Strukturen der Kolonien erkennen.

Die einzelnen Ausschnitte jeder Kolonie wurden abschließend per Hand zu einem Gesamtbild zusammengestellt und mit Hilfe des Programms ImageJ grob analysiert.

A.4.3 Ergebnisse

Entgegen der anfänglichen Erwartung, dass sich bei motilen Zellen keine klaren Grenzen ausbilden, liegen in allen betrachteten Fällen sauber voneinander getrennte Farbbereiche vor. Im Vergleich zu den von O. Hallatschek durchgeführten Messungen, werden die Zellkolonien jedoch größer. Die von ihm dargestellte und hier als typisch angenommene Kolonie startet das Wachstum zu $t = 0\ \text{h}$ mit einem Durchmesser von $1,83\ \text{mm}$ und ist nach $72\ \text{h}$ auf einen Durchmesser von $8,3\ \text{mm}$ angewachsen. In den durchgeführten Versuchen wurde mit derselben Zelldichte und einem Durchmesser von $1,8\ \text{mm}$ gestartet. Nach $72\ \text{h}$ Wachstumsdauer wurde im Mittel ein Durchmesser von $13,7\ \text{mm}$ gemessen. Der Zellstamm scheint dabei keinen Einfluss auf die Größe der Kolonie zu nehmen.

A.4.4 Ausblick

Ein nächster Schritt um diese Versuche fortzuführen, könnte sein, anstatt der konstitutiv exprimierten Fluoreszenzproteine, das Sender-Empfänger-System

	Organismus						Ausbreitung		
	MG1633			W3110			gesamt	Mitte	1. Ring
	CFP	GFP	RFP	CFP	GFP	RFP			
(1)	98 %						12,5 mm		
(2)	85 %	29 %				0 %	12,8 mm	4,9 mm	0,9 mm
(3)	64 %	16 %	52 %				13,9 mm	5,83 mm	0,6 mm
(4)	68 %		46 %			0 %	12,5 mm	3,8 mm	0,7 mm
(5)	92 %				0,1 %	22 %	13,8 mm	7,3 mm	0,6 mm
(6)		67 %					14,3 mm		
(7)		20 %	77 %				14,1 mm	4,8 mm	0,6 mm
(8)		68 %		13 %		12 %	15,7 mm	6,2 mm	0,5 mm
(9)			94 %				13,4 mm		
(10)			90 %	18 %	4 %		14,1 mm	6,0 mm	0,5 mm
(11)			92 %	14 %			14,5 mm	6,1 mm	0,6 mm
(12)			93 %		11 %		14,3 mm	6,1 mm	0,5 mm
(13)				38 %	2 %	63 %	12,5 mm	3,7 mm	0,6 mm
(14)					92 %		13,4 mm		
(15)					6 %	94 %	13,8 mm	5,9 mm	0,6 mm
(16)						93 %	11,8 mm		

Tabelle A.1: Zellanteile in einer Kolonie aus motilen Zellen nach 72 h. Die gelb hinterlegten Reihen entsprechen den Kolonien aus Abb. A.4.

aus dem Hauptteil zu nutzen und die Zellen zu Kolonien wachsen zu lassen um zu beobachten, welche Auswirkungen die unterschiedliche Fitness auf das Gesamtsystem hat.

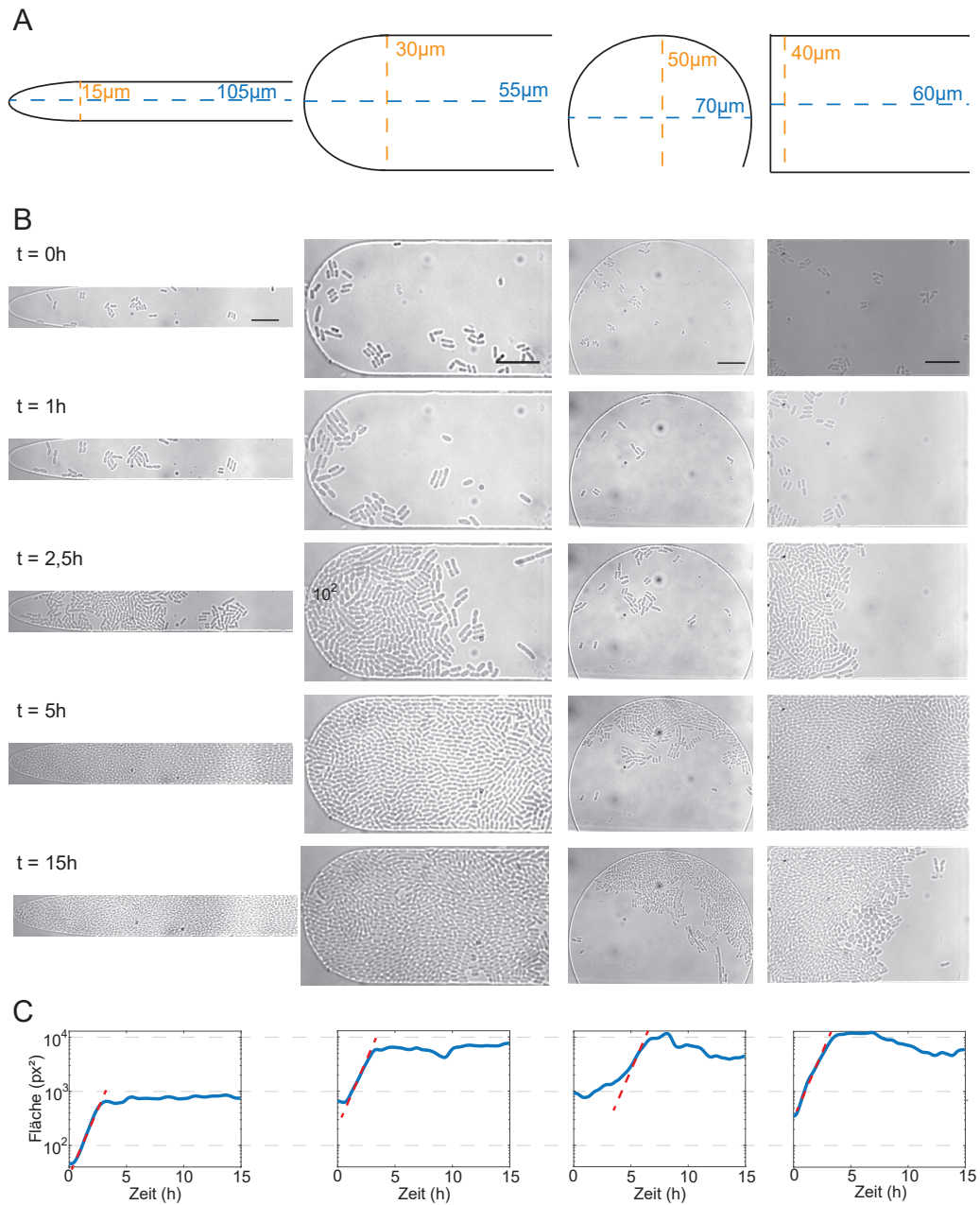


Abbildung A.1: (A) Die Dimensionen der betrachteten Kammern variieren von $15\ \mu\text{m}$ bis $105\ \mu\text{m}$ bei einer einheitlichen Höhe von $1\ \mu\text{m}$, (B) Wachstum im Zeitraum von $t_{\text{Start}} = 0\ \text{h}$ bis $t_{\text{Ende}} = 15\ \text{h}$. Die Hellfeldaufnahmen wurden alle drei Minuten erstellt, der Balken entspricht einer Länge von $10\ \mu\text{m}$. (C) Die Diagramme zeigen die von Zellen bewachsene Fläche in Abhängigkeit von der Zeit. Die rote gestrichelte Linie hat in allen vier Diagrammen die selbe Steigung, wodurch gezeigt werden kann, dass die Wachstumsgeschwindigkeiten nur geringfügig voneinander abweichen.

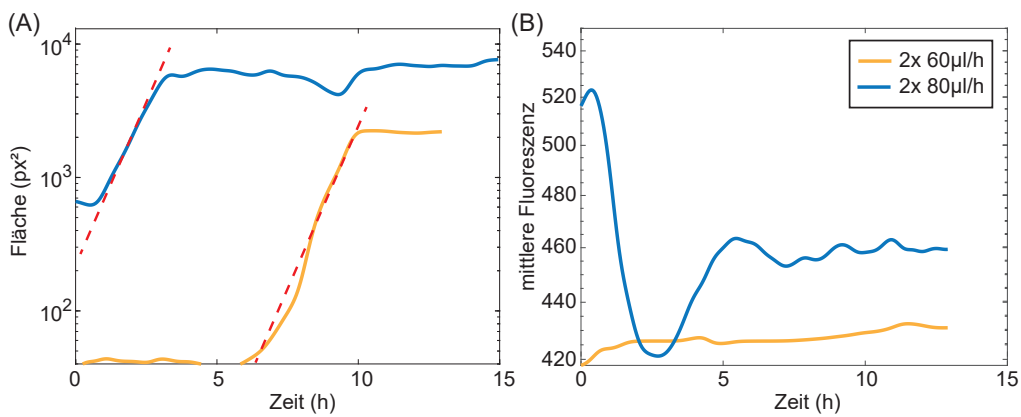


Abbildung A.2: (A) Die Zellen, welche mit der niedrigeren Flussgeschwindigkeit versorgt werden, verbleiben 5,5 h länger in der stationären Phase als die mit $2 \times 80 \mu\text{l/h}$ versorgten Zellen. Wie an der roten gestrichelten Linie zu erkennen ist, erreichen beide Kulturen sie selbe Wachstumsrate, sobald sie das exponentielle Wachstum erreicht haben. (B) Trotz des Sender-Empfänger-Verhältnisses von 1:1 bleibt die GFP-Expression bei $2 \times 60 \mu\text{l/h}$ deutlich unterhalb von der der mit $2 \times 80 \mu\text{l/h}$ versorgten Zellen, obwohl diese mit dem Sender-Empfänger-Verhältnis 1:6 wachsen, was bedeutet, dass im Verhältnis weniger AHL zur Verfügung steht.

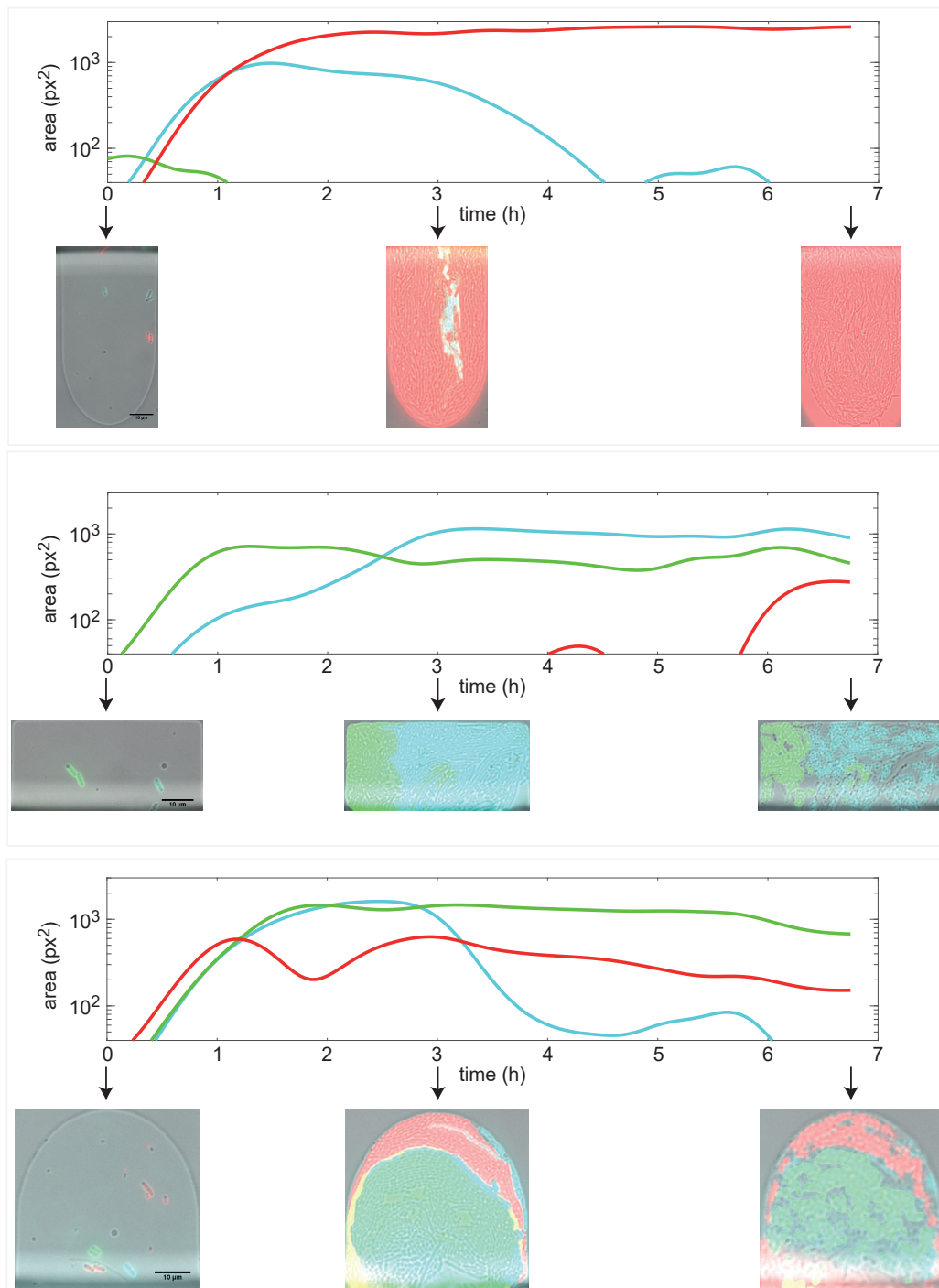


Abbildung A.3: Zellen, die in einem 1:1:1-Verhältnis gemischt wurden, wachsen in einer Mikrofluidik-Kammer. Es lässt sich nicht vorhersagen, welche Farbe im Laufe des Experimentes dominiert.

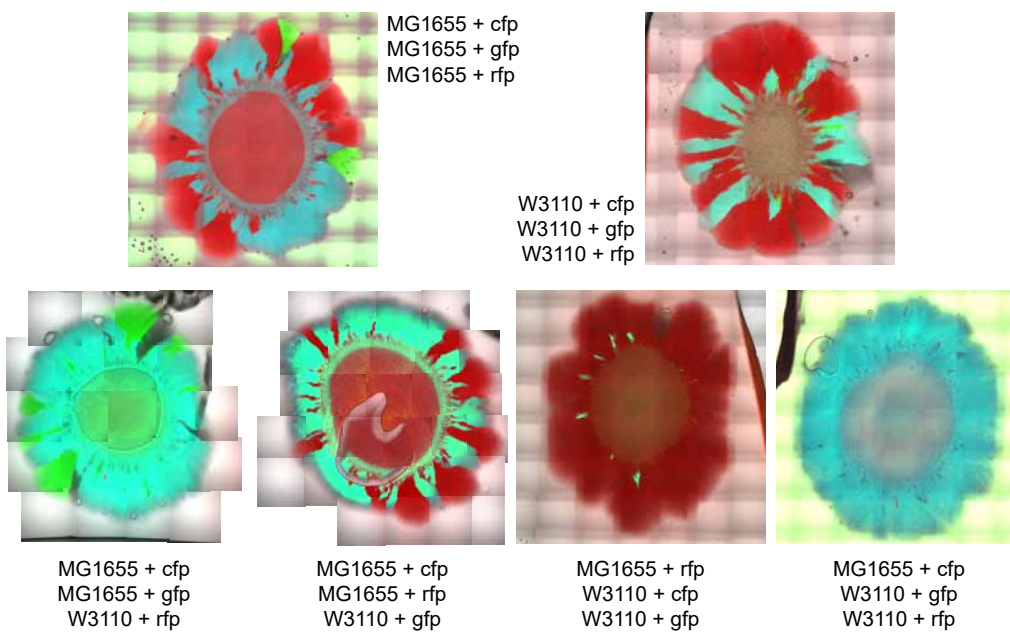


Abbildung A.4: Kolonien motiler Zellen **(A)** 1:1:1-Mischungen aller drei Farben wurden von nur einem Stamm gemischt. Zum Ende der Messung sind alle drei Farben auch im äußeren Ring vorhanden. **(B)** Werden die beiden Stämme gemischt, ist in allen betrachteten Fällen der Stamm MG1655 stärker als W3110. Unabhängig davon, ob zwei oder ein Teil MG1655 in der anfänglichen Mischung enthalten waren.

Anhang B

Verwendete Plasmide und Sequenzen

B.1 Senderplasmid

```
1  ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaaaaga ggagaaatac
51 tagatgacta taatgataaa aaaatcggat tttttggcaa ttccatcgga
101 ggagtataaa ggtattctaa gtcttcgtta tcaagtgttt aagcaaagac
151 ttgagtggga cttagttgta gaaaataacc ttgaatcaga tgagtatgat
201 aactcaaatg cagaatatat ttatgcttgt gatgatactg aaaatgtaag
251 tggatgctgg cgtttattac ctacaacagg tgattatatg ctgaaaagtg
301 tttttcctga attgcttggg caacagagtg ctcccaaaga tcctaataata
351 gtcgaattaa gtcgttttgc tgtaggtaaa aatagctcaa agataaataa
401 ctctgctagt gaaattacaa tgaaactatt tgaagctata tataaacacg
451 ctgttagtca aggtattaca gaatatgtaa cagtaacatc aacagcaata
501 gagcgatfff taaagcgtat taaagttcct tgtcatcgta ttggagacaa
551 agaaattcat gtattaggtg aactaaatc ggttgtattg tctatgccta
601 ttaatgaaca gtttaaaaaa gcagtcttaa atgctgcaaa cgacgaaaac
651 tacgctttag tagcttaata actctgatag tgctagtgta gatctcctgc
701 aggtcgacaa gcttgcggcc gcataatgct taagtcgaac agaaagtaat
751 cgtattgtac acggccgcat aatcgaatc aatacgactc actatagggg
801 aattgtgagc ggataacaat tccccatcct agtatattag ttaagtataa
851 gaaggagata tacatatgat ggcttcctcc gaagacgtta tcaaagagtt
901 catgcgtttc aaagttcgta tggaaggttc cgttaacggt cagcagttcg
951 aatcgaagg tgaaggtgaa ggctcgtccg acgaaggtag ccagaccgct
1001 aaactgaaag ttaccaaaagg tggcccgctg ccgttcgctt gggacatcct
1051 gtccccgcag ttccagtagc gttccaaagc ttacgttaaa caccggctg
1101 acatcccgga ctacctgaaa ctgtccttcc cggaagggtt caaatgggaa
```

1151 cgtgttatga acttcgaaga cggtggtggtt gttaccgtta cccaggactc
 1201 ctccctgcaa gacggtgagt tcatctacaa agttaactg cgtggtacca
 1251 acttcccgtc cgacggtccg gttatgcaga aaaaaacat gggttgggaa
 1301 gcttccaccg aacgtatgta cccggaagac ggtgctctga aagggtgaaat
 1351 caaaatgcgt ctgaaactga aagacggtgg tctactacgac gctgaagtta
 1401 aaaccaccta catggctaaa aaaccggttc agctgccggg tgcttataaa
 1451 accgacatca aactggacat cacctcccac aacgaagact acaccatcgt
 1501 tgaacagtac gaacgtgctg aaggtcgtca ctccaccggt gcttaataac
 1551 gctgatagtg ctagtgtaga tgccttaatt aacctaggct gctgccaccg
 1601 ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctctaaac ggcttgagg
 1651 ggttttttgc tgaaaggagg aactatatcc ggattggcga atgggacgcg
 1701 ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta cgcgcagcgt
 1751 gaccgctaca cttgccagcg ccctagcggc cgctcctttc gctttcttcc
 1801 cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg
 1851 gggctccctt tagggttccg atttagtgtt ttacggcacc tcgaccccaa
 1901 aaaacttgat taggggtgat gttcacgtag tgggcatcgc ccctgataga
 1951 cggtttttgc ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc
 2001 ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggctt attcctttga
 2051 tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga
 2101 tttatacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt
 2151 tctggcggca cgatggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc
 2201 cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta
 2251 aacttggtct gacagttact taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct
 2301 gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact
 2351 acgatacggg agggcttacc atctggccc agtgctgcaa tgataccgcg
 2401 agaccacgca tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg
 2451 gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag
 2501 tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag
 2551 tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt
 2601 cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt
 2651 acatgatccc ccatgttgtg caaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc
 2701 gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg
 2751 cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct
 2801 gtgactggtg agtactcaac caagtattc tgagaatagt gtatgcggcg
 2851 accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata
 2901 gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa
 2951 ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc
 3001 tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt
 3051 gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaat aaggcgaca
 3101 cggaaatggt gaatactcat actcttctt tttcaatcat gattgaagca
 3151 tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag

3201 aaaataaac aaataggtca tgacccaaat cccttaacgt gagttttcgt
3251 tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat
3301 cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct
3351 accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga
3401 aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt
3451 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata
3501 cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt
3551 cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag
3601 cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac
3651 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcga
3701 cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc
3751 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct
3801 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt
3851 gatgctcgtc aggggggocgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc
3901 tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc
3951 tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag
4001 ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc
4051 gaggaagcgg aagagcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgtg
4101 cggatattca caccgcatat atggtgact ctcagtaca tctgctctga
4151 tgccgcatag ttaagccagt atacactccg ctatcgctac gtgactgggt
4201 catggctgcg ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg
4251 cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg
4301 agctgcatgt gtcagagggtt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgaggca
4351 gctgcggtaa agctcatcag cgtggtcgtg aagcgattca cagatgtctg
4401 cctgttcatc cgcgtccagc tcgttgagtt tctccagaag cgttaatgtc
4451 tggcttctga taaagcgggc catgtaagg gcggtttttt cctgtttggg
4501 cactgatgcc tccgtgtaag ggggatttct gttcatgggg gtaatgatac
4551 cgatgaaacg agagaggatg ctcacgatac gggttactga tgatgaacat
4601 gcccggttac tggaacgttg tgagggtaaa caactggcgg tatggatgcg
4651 gcgggaccag agaaaaatca ctcagggtca atgccagcgc ttcgttaata
4701 cagatgtagg tgttccacag ggtagccagc agcatcctgc gatgcagatc
4751 cggaacataa tgggtgcaggg cgctgacttc cgcgtttcca gactttacga
4801 aacacggaaa ccgaagacca ttcatgttgt tgctcaggtc gcagacgttt
4851 tgcagcagca gtcgcttcac gttcgctcgc gtatcgggta ttattctgctc
4901 taaccagtaa ggcaaccccc ccagcctagc cgggtcctca acgacaggag
4951 cacgatcatg ctagtcatgc cccgcgcca ccggaaggag ctgactgggt
5001 tgaaggctct caagggcacg ggtcgagatc ccggtgccta atgagtgagc
5051 taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa
5101 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg
5151 gtttgctgat tgggcgcccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg
5201 caacagctga ttgcccttca ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc

5251 ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa aatcctgttt gatggtggtt
5301 aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt atcccactac
5351 cgagatgtcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg
5401 cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg
5451 ccctcattca gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca
5501 gtcgccttcc cgttccgcta tccggctgaat ttgattgcga gtgagatatt
5551 tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg agacagaact taatgggccc
5601 gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat gctccacgcc
5651 cagtgcgcta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct
5701 ggtcagagac atcaagaaat aacgccgga cattagtga gccagcttcc
5751 acagcaatgg catcctggtc atccagcggga tagttaatga tcagcccact
5801 gacgcgttgc gcgagaagat tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc
5851 cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc tggcaccag ttgatcggcg
5901 cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca gggccagact
5951 ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg
6001 ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgcgcg ttccactttt
6051 tcccgcgttt tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac
6101 ggtctgataa gagacaccgg catactctgc gacatcgtat aacgttactg
6151 gtttcacatt caccaccctg aattgactct cttccgggcg ctatcatgcc
6201 ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga tctcgacgct
6251 ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg
6301 ccgttgagca ccgccgccg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc
6351 caacagtccc ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag
6401 cgctcatgag cccgaagtgg cgagcccgat cttccccatc ggtgatgtcg
6451 gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg gcgccggtga tgccggccac
6501 gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatcga tctcgatccc gcgaaat**taa**
6551 **tacgactcac** **tata**

B.2 Empfängerplasmid

```

1 tccctatcag tgatagagat tgacatccct atcagtgata gagatactga
51 gcactactag agaaagagga gaaatactag atgaaaaaca taaatgccga
101 cgacacatac agaataatta ataaaattaa agcttgtaga agcaataatg
151 atattaatca atgcttatct gatatgacta aaatggtaca ttgtgaatat
201 tatttactcg cgatcattta tcctcattct atggttaaat ctgatatttc
251 aatcctagat aattacccta aaaaatggag gcaatattat gatgacgcta
301 atttaataaa atatgatcct atagtagatt attctaactc caatcattca
351 ccaattaatt ggaatatatt tgaaaacaat gctgtaaata aaaaatctcc
401 aaatgtaatt aaagaagcga aaacatcagg tcttatcact gggtttagtt
451 tccctattca tacggctaac aatggcttcg gaatgcttag ttttgcacat
501 tcagaaaaag acaactatat agatagttaa tttttacatg cgtgtatgaa
551 catacatta attgttcctt ctctagttga taattatcga aaaataaata
601 tagcaaataa taaatcaaac aacgatttaa ccaaagaga aaaagaatgt
651 ttagcgtggg catgcgaagg aaaaagctct tgggatattt caaaaatatt
701 aggttgtagt gagcgtactg tcactttcca ttttaaccaat gcgcaaatga
751 aactcaatac aacaaaccgc tgccaaagta tttctaaagc aattttaaca
801 ggagcaattg attgcccata ctttaaaaat taataacact gatagtgcta
851 gtgtagatca ctactagagc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc
901 gaaagactgg gcctttcggt ttatctggtg tttgtcggtg aacgctctct
951 actagagtca cactggctca ccttcgggtg ggcctttctg cgtttatata
1001 ctagagacct gtaggatcgt acaggtttac gcaagaaaat ggtttgttat
1051 agtcgaataa atactagagt cacacaggaa agtactagat gcgtaaagga
1101 gaagaacttt tcaactggagt tgtcccaatt cttggtgaat tagatggtga
1151 tgtaaatggg cacaaatfff ctgtcagtgg agagggtgaa ggtgatgcaa
1201 catacggaaa acttaccctt aaatftatft gcactactgg aaaactacct
1251 gttccatggc caacacttgt cactactttc ggttatggtg ttcaatgctt
1301 tgcgagatac ccagatcata tgaaacagca tgactttttc aagagtgcca
1351 tgcccgaagg ttatgtacag gaaagaacta tatttttcaa agatgacggg
1401 aactacaaga cacgtgctga agtcaagttt gaaggtgata cccttggtta
1451 tagaatcgag ttaaaaggta ttgattttta agaagatgga aacattcttg
1501 gacacaaatt ggaatacaac tataactcac acaatgtata catcatggca
1551 gacaaacaaa agaatggaat caaagttaac ttcaaaatta gacacaacat
1601 tgaagatgga agcgttcaac tagcagacca ttatcaacaa aatactccaa
1651 ttggcgatgg ccctgtcctt ttaccagaca accattacct gtccacacaa
1701 tctgcccttt cgaaagatcc caacgaaaag agagaccaca tggtccttct
1751 tgagtttgta acagctgctg ggattacaca tggcatggat gaactataca
1801 aataatacta gtagcggcgg ctgcagtccg gcaaaaaagg gcaaggtgtc
1851 accaccctgc cttttttctt taaaaccgaa aagattactt cgcgttatgc
1901 aggcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga

```

1951 gcggtatcag ctcaactcaa ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg
 2001 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaa aggccagcaa aaggccagga
 2051 accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccacaggct ccgccccct
 2101 gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac
 2151 aggactataa agataaccagg cgtttcccc tggagctcc ctctgctgct
 2201 ctctgtttcc gaccctgcc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct
 2251 tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc
 2301 ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc
 2351 agcccgaccg ctgcgctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg
 2401 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag
 2451 cagagcgagg tatgtaggag gtgctacaga gttcttgaag tggtaggcta
 2501 actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgctc tctgctgaag
 2551 ccagttacct tcggaaaaag agttgtagc tcttgatccg gcaaacaaac
 2601 caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca
 2651 gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac
 2701 gctcagtggg acgaaaactc acgtaaggg attttgggtca tgagattatc
 2751 aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa ttaaaaatga agttttaaat
 2801 caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta
 2851 atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt
 2901 tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat
 2951 ctggccccag tgctgcaatg ataccgagc agccacgctc accggctcca
 3001 gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg
 3051 tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag
 3101 cttagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tggtagcatt
 3151 gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggtagtg cttcattcag
 3201 ctccggttcc caacgatcaa ggccgagttac atgatcccc atgtagtgca
 3251 aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgtagtcag aagtagttg
 3301 gccgcagtgt tatcaactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac
 3351 tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca
 3401 agtcattctg agaataagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg
 3451 tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat
 3501 cattggaaaa cgttcttcgg ggcaaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt
 3551 tgagatccag ttcgatataa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca
 3601 tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa
 3651 tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatic
 3701 tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg
 3751 agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc
 3801 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta
 3851 tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacg

B.3 Konjugationsplasmide

Alle Plasmide zu den Konjugationsexperimenten wurden dankenswerter Weise von Prof. Fernando de la Cruz der Universidad de Cantabria im Rahmen des BACTOCOM-Projekts zur Verfügung gestellt.

B.4 Plasmide zur konstitutiven Fluoreszenz-proteinexpression

B.4.1 RFP-Expression

```

1 tccctatcag tgatagagat tgacatccct atcagtgata gagataactga
51 gcactactag agaaagagga gaaatactag atggcttcct ccgaagacgt
101 tatcaaagag ttcatgcggt tcaaagttcg tatggaaggt tccgtaaacg
151 gtcacgagtt cgaaatcgaa ggtgaagggt aaggctcgtcc gtacgaaggt
201 acccagaccg ctaaactgaa agttaccaa ggtggtccgc tgccgttcgc
251 ttgggacatc ctgtccccgc agttccagta cggttccaaa gcttacgtta
301 aacaccgggc tgacatcccg gactacctga aactgtcctt cccggaaggt
351 ttcaaattggg aacgtgttat gaacttcgaa gacgggtggtg ttgttaccgt
401 taccaggac tcctccctgc aagacggtga gttcatctac aaagttaaac
451 tgcgtggtac caacttcccg tccgacggtc cggttatgca gaaaaaac
501 atgggttggg aagcttccac cgaacgtatg taccgggaag acggtgctct
551 gaaaggtgaa atcaaaatgc gtctgaaact gaaagacggt ggtcactacg
601 acgctgaagt taaaaccacc tacatggcta aaaaaccggt tcagctgccg
651 ggtgcttaca aaaccgacat caaactggac atcacctccc acaacgaaga
701 ctacaccatc gttgaacagt acgaacgtgc tgaaggctct cactccaccg
751 gtgcttaata acgctgatag tgctagtgtg gatcgtact agtagcggcc
801 gctgcaggct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc
851 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa
901 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc
951 caggaaccgt aaaaaggcgg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc
1001 cccctgacga gcatcaca aaatcgacgct caagtacagag gtggcgaaac
1051 ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt
1101 gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc
1151 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc
1201 agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc
1251 cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca
1301 acccggtgta acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg
1351 attagcagag cgaggatagt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt
1401 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc

```

1451 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa
1501 caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac
1551 gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt
1601 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga
1651 ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt
1701 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat
1751 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc
1801 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt
1851 accatctggc cccagtgtg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg
1901 ctccagatth atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga
1951 agtggtcctg caactttatc gcctccatc cagtctatta attgttgccg
2001 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg
2051 ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca
2101 ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt
2151 gtgcaaaaaa gcggtagct cttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta
2201 agttggccgc agtgttatca ctcatgggta tggcagcact gcataattct
2251 cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc
2301 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc
2351 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg
2401 ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc
2451 gctggtgaga tccagttcga tgtaaccac tctgtcacc aactgatctt
2501 cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg
2551 caaatgccg caaaaaagg aataaggcg acacggaaat gttgaatact
2601 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc
2651 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg
2701 gttccgcgca cttttcccg aaaagtcca cctgacgtct aagaaacat
2751 tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggcagaatt
2801 tcagataaaa aaaatcctta gctttcgcta aggatgattt ctggaattcg
2851 cggccgcttc tagag

B.4.2 GFP-Expression

```

1 tccctatcag tgatagagat tgacatccct atcagtgata gagatactga
51 gcactactag agaaagagga gaaatactag atgcgtaaag gagaagaact
101 tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt gatgttaatg
151 ggacacaaatt ttctgtcagt ggagaggggtg aaggatgatgc aacatacggga
201 aaacttacc cttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg
251 gccaacactt gtcactactt tcggttatgg tgttcaatgc tttgcgagat
301 acccagatca tatgaaacag catgactttt tcaagagtgc catgcccga
351 ggttatgtac aggaaagaac tatatttttc aaagatgacg ggaactacaa
401 gacacgtgct gaagtcaagt ttgaaggatga tacccttggt aatagaatcg
451 agttaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa
501 ttggaataca actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaaca
551 aaagaatgga atcaaagtta acttcaaaat tagacacaa c attgaagatg
601 gaagcgttca actagcagac cattatcaac aaaatactcc aattggcgat
651 ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac ctgtccacac aatctgccct
701 ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt cttgagtttg
751 taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaataatac
801 tagtagcggc cgctgcaggc ttctcgtc actgactcgc tgcgctcgg
851 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacgg
901 tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc
951 cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca
1001 taggctccgc cccctgacg agcatcacia aatcgacgc tcaagtcaga
1051 ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga
1101 agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct
1151 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct
1201 gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg
1251 cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg
1301 tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca
1351 ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc
1401 ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat
1451 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt
1501 gatccgcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag
1551 cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt
1601 ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt
1651 tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa
1701 aatgaagtt ttaaatacaat ctaaagtata tatgagtaa cttggtctga
1751 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat
1801 ttcgttcac catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata
1851 cgggagggt taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc
1901 acgctcacc gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaagg

```

1951 ccgagcgcag aagtggcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt
2001 aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg
2051 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg
2101 gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga
2151 tccccatgt tgtgcaaaaa agcggtttagc tccttcggtc ctccgatcgt
2201 tgtcagaagt aagttggcgg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac
2251 tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact
2301 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag
2351 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa
2401 ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaacttca
2451 aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc
2501 caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa
2551 aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa
2601 tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca
2651 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata
2701 aacaaatagg ggttccgcgc acatttccc gaaaagtgcc acctgacgtc
2751 taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac
2801 gaggcagaat ttcagataaa aaaaatcctt agctttcgct aaggatgatt
2851 tctggaattc gcggccgctt ctagag

B.4.3 CFP-Expression

```

1  tccctatcag tgatagagat tgacatccct atcagtgata gagatactga
51  gcactactag agaaagagga gaaatactag atggtgagca agggcgagga
101 gctgttcacc ggggtggtgc ccacctggtt cgagctggac ggcgacgtga
151 acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac
201 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc
251 ctggcccacc ctctgtacca ccctgacctg gggcgtgcag tgcttcagcc
301 gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc
351 gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta
401 caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca
451 tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac
501 aagctggagt acaactacat cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa
551 gcagaagaac ggcatacaagg ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg
601 acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc
651 gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca cccagtccgc
701 cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt
751 tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa
801 taatactagt agcggccgct gcaggcttcc tcgctcactg actcgctgcg
851 ctcggtcggt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa
901 tacggttatac cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca
951 aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgctg tgctggcggtt
1001 tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa
1051 gtcagaggtg gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
1101 cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg
1151 atacctgtcc gccttttctc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct
1201 cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc
1251 tgtgtgcacg aacccccgtc tcagcccgac cgctgcgctt tatccggtaa
1301 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag
1351 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca
1401 gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt
1451 tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcgaaaaa agagttggta
1501 gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttggt
1551 tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt
1601 gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag
1651 ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcacctc gatcctttta
1701 aattaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg
1751 gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct
1801 gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact
1851 acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg
1901 agaccacgcg tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccc

```

1951 gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag
2001 tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag
2051 tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt
2101 cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatac aaggcgagtt
2151 acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc
2201 gatcgttgctc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg
2251 cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct
2301 gtgactgggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg
2351 accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata
2401 gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa
2451 ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc
2501 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt
2551 gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggat aaggcgaca
2601 cggaaatggt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat
2651 ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga
2701 aaaataaaca aataggggtt ccgcgcatat ttccccgaaa agtgccacct
2751 gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg
2801 tatcacgagg cagaatttca gataaaaaaa atccttagct ttcgctaagg
2851 atgatttctg gaattcgcgg ccgcttctag ag

Literaturverzeichnis

- [1] R. Dahm. Discovering dna: Friedrich miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet*, 122(6):565–81, 2008.
- [2] O. T. Avery, C. M. Macleod, and M. McCarty. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *J Exp Med*, 79(2):137–58, 1944.
- [3] J. D. Watson and F. H. Crick. The structure of dna. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 18:123–31, 1953.
- [4] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921, 2001.

- [5] M. C. Wahl and M. Sundaralingam. Crystal structures of a-dna duplexes. *Biopolymers*, 44(1):45–63, 1997.
- [6] Eric Girard, Thierry Prangé, Anne-Claire Dhaussy, Evelyne Migianu-Griffoni, Marc Lecouvey, Jean-Claude Chervin, Mohamed Mezouar, Richard Kahn, and Roger Fourme. Adaptation of the base-paired double-helix molecular architecture to extreme pressure. *Nucleic acids research*, 35(14):4800–4808, 2007.
- [7] A. S. Boyer, S. Grgurevic, C. Cazaux, and J. S. Hoffmann. The human specialized dna polymerases and non-b dna: vital relationships to preserve genome integrity. *J Mol Biol*, 425(23):4767–81, 2013.
- [8] P. C. Champ, S. Maurice, J. M. Vargason, T. Camp, and P. S. Ho. Distributions of z-dna and nuclear factor i in human chromosome 22: a model for coupled transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res*, 32(22):6501–10, 2004.
- [9] B. R. Wood. The importance of hydration and dna conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues. *Chem Soc Rev*, 45(7):1980–98, 2016.
- [10] Champness Wendy Snyder Larry. *Molecular Genetics of Bacteria*. ASM Press, 3rd edition, 1997.
- [11] F. R. Blattner, 3rd Plunkett, G., C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. The complete genome sequence of escherichia coli k-12. *Science*, 277(5331):1453–62, 1997.
- [12] B. Foley, T. Leitner, C. Apetrei, and et al. Hiv sequence compendium. *Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico*, 2013.
- [13] L. R. Garcia and I. J. Molineux. Rate of translocation of bacteriophage t7 dna across the membranes of escherichia coli. *J Bacteriol*, 177(14):4066–76, 1995.
- [14] R. Durrett, M. Miras, N. Mirouze, A. Narechania, I. Mandic-Mulec, and D. Dubnau. Genome sequence of the bacillus subtilis biofilm-forming transformable strain ps216. *Genome Announc*, 1(3), 2013.
- [15] M. D. Adams, S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle,

- R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. H. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeiffer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helt, C. R. Nelson, G. L. Gabor, J. F. Abril, A. Agbayani, H. J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R. M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, D. A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J. M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L. B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A. D. Mays, I. Dew, S. M. Dietz, K. Dodson, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A. E. Gabrielian, N. S. Garg, W. M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M. H. Wei, C. Ibegwam, et al. The genome sequence of *drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461):2185–95, 2000.
- [16] K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Mufato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G. J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assuncao, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J. H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliot, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, S. Begum, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Lloyd, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446):498–503, 2013.
- [17] Consortium Mouse Genome Sequencing, R. H. Waterston, K. Lindblad-

- Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. El-nitski, R. D. Emes, P. Esvara, E. Eyraas, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M. Kamal, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915):520–62, 2002.
- [18] Consortium International Human Genome Sequencing. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011):931–45, 2004.
- [19] Valentina Galata, Tobias Fehlmann, Christina Backes, and Andreas Keller. Plsdb: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Research*, 47(D1):D195–D202, 2018.
- [20] J. Sambrook and D. Russel. *Molecular cloning: A laboratory manual*, volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory, 2000.
- [21] Eugene V. Koonin and Artem S. Novozhilov. Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *Iubmb Life*, 61(2):99–111, 2009.
- [22] Soubaya T. Richard D., Chevalet P. *Biologie in Farbtafeln*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2013.
- [23] Dieter Jahn, Martina Jahn, Inge Kronberg, Thomas Langer, Regina Nethe-Jaenchen, Harald Schlatter, Beate Schultze, Johannes Siemens, Jörg Soppa, and Klaus Wolf. Genetik. *Georg Thieme Verlag*, 2017.
- [24] Peter Dröge, Rolf Knippers, Gunter Meister, Alfred Nordheim, Elmar Schiebel, Martin Vingron, and Jörn Walter. Molekulare genetik. *Georg Thieme Verlag*, 2015.

- [25] F. H. Crick. Codon–anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol*, 19(2):548–55, 1966.
- [26] Fritsche O. *Mikrobiologie*. Kompaktwissen Biologie. Springer Spektrum, 1 edition, 2016.
- [27] Berg J.M., Timoczko J.L., Gatto G.J. jr., and Stryer L. *Biochemie*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 8 edition, 2018.
- [28] S. L. O’Neill, R. Giordano, A. M. Colbert, T. L. Karr, and H. M. Robertson. 16s rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7):2699–2702, 1992.
- [29] Pablo Yarza, Pelin Yilmaz, Elmar Pruesse, Frank Oliver Glöckner, Wolfgang Ludwig, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman, Jean Euzéby, Rudolf Amann, and Ramon Rosselló-Móra. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16s rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12:635, 2014.
- [30] Dinkelaker B. Brechner E., Dreesmann D. *Kompaktlexikon der Biologie*, volume 3. Spektrum Akademischer Verlag, 2012.
- [31] Antony Lussier, Laurène Bastet, Adrien Chauvier, and Daniel A. Lafontaine. A kissing loop is important for btub riboswitch ligand sensing and regulatory control. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(44):26739–26751, 2015.
- [32] Narasimhan Sudarsan, Smadar Cohen-Chalamish, Shingo Nakamura, Gail Mitchell Emilsson, and Ronald R. Breaker. Thiamine pyrophosphate riboswitches are targets for the antimicrobial compound pyrithiamine. *Chemistry and Biology*, 12(12):1325–1335, 2005.
- [33] U. Vogel and K. F. Jensen. The rna chain elongation rate in escherichia coli depends on the growth rate. *Journal of Bacteriology*, 176(10):2807–2813, 1994.
- [34] S. T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eglmeier, S. Gas, 3rd Barry, C. E., F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter,

- K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685):537–44, 1998.
- [35] Kathleen M. C. Tjørve and Even Tjørve. The use of gompertz models in growth analyses, and new gompertz-model approach: An addition to the unified-richards family. *PLOS ONE*, 12(6):e0178691, 2017.
- [36] M. L. Pla, S. Oltra, M. D. Esteban, S. Andreu, and A. Palop. Comparison of primary models to predict microbial growth by the plate count and absorbance methods. *Biomed Res Int*, 2015:365025, 2015.
- [37] J. Baranyi, P. J. McClure, J. P. Sutherland, and T. A. Roberts. Modeling bacterial growth responses. *Journal of Industrial Microbiology*, 12(3):190–194, 1993.
- [38] J. Paulsson. Summing up the noise in gene networks. *Nature*, 427(6973):415–418, 2004.
- [39] M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia, and P. S. Swain. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297(5584):1183–6, 2002.
- [40] J M Raser and E K OShea. Noise in gene expression: Origins, consequences, and control. *Science*, 309(5743):2010–2013, 2005.
- [41] I. Golding, J. Paulsson, S. M. Zawilski, and E. C. Cox. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell*, 123(6):1025–36, 2005.
- [42] A. Eldar and M. B. Elowitz. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature*, 467(7312):167–73, 2010.
- [43] N. Q. Balaban, J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, and S. Leibler. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690):1622–5, 2004.
- [44] H. Maamar and D. Dubnau. Bistability in the bacillus subtilis k-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol Microbiol*, 56(3):615–24, 2005.
- [45] W. K. Smits, C. C. Eschevins, K. A. Susanna, S. Bron, O. P. Kuipers, and L. W. Hamoen. Stripping bacillus: Comk auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development. *Mol Microbiol*, 56(3):604–14, 2005.

- [46] E. W. Nester and B. A. Stocker. Biosynthetic latency in early stages of deoxyribonucleic acid transformation in bacillus subtilis. *J Bacteriol*, 86:785–96, 1963.
- [47] N. Rosenfeld, J. W. Young, U. Alon, P. S. Swain, and M. B. Elowitz. Gene regulation at the single-cell level. *Science*, 307(5717):1962–5, 2005.
- [48] B. L. Bassler, M. Wright, and M. R. Silverman. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in vibrio harveyi: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol*, 13(2):273–86, 1994.
- [49] Michael B. Elowitz and Stanislas Leibler. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 403:335, 2000.
- [50] T. Danino, O. Mondragon-Palomino, L. Tsimring, and J. Hasty. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 463(7279):326–330, 2010.
- [51] Shimomura Osamu, Johnson Frank H., and Saiga Yo. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3):223–239, 1962.
- [52] Fan Yang, Larry G. Moss, and George N. Phillips Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14:1246, 1996.
- [53] R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67:509–544, 1998.
- [54] Jens Bo Andersen, Claus Sternberg, Lars Kongsbak Poulsen, Sara Petersen Bjørn, Michael Givskov, and Søren Molin. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6):2240–2246, 1998.
- [55] James A. J. Arpino, Pierre J. Rizkallah, and D. Dafydd Jones. Crystal structure of enhanced green fluorescent protein to 1.35 Å resolution reveals alternative conformations for glu222. *PLoS ONE*, 7(10):e47132, 2012.
- [56] Robert E. Campbell, Oded Tour, Amy E. Palmer, Paul A. Steinbach, Geoffrey S. Baird, David A. Zacharias, and Roger Y. Tsien. A monomeric

- red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12):7877–7882, 2002.
- [57] Larry A. Gross, Geoffrey S. Baird, Ross C. Hoffman, Kim K. Baldrige, and Roger Y. Tsien. The structure of the chromophore within dsred, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22):11990–11995, 2000.
- [58] J. Monod. La technique de culture continue, theorie et applications. *Annales d’Institute Pasteur*, 79:390–410, 1950.
- [59] Aaron Novick and Leo Szilard. Description of the chemostat. *Science*, 112(2920):715–716, 1950.
- [60] Mori Yutaka and Inaba Toshiharu. Ethanol production from starch in a pervaporation membrane bioreactor using clostridium thermohydro-sulfuricum. *Biotechnology and Bioengineering*, 36(8):849–853, 1990.
- [61] Michael Schmidt, KunnelRaman Babu, Navin Khanna, Sabine Marten, and Ursula Rinas. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant escherichia coli. *Journal of Biotechnology*, 68(1):71–83, 1999.
- [62] Maximilian Weitz, Andrea Mückl, Korbinian Kapsner, Ronja Berg, Andrea Meyer, and Friedrich C. Simmel. Communication and computation by bacteria compartmentalized within microemulsion droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 136(1):72–75, 2014.
- [63] Börn Meier, Alejandro Zielinski, Christoph Weber, Delphine Arcizet, Simon Youssef, Thomas Franosch, Joachim O. Rädler, and Doris Heinrich. Chemotactic cell trapping in controlled alternating gradient fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28):11417–11422, 2011.
- [64] Stephan K. W. Dertinger, Daniel T. Chiu, Noo Li Jeon, and George M. Whitesides. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. *Analytical Chemistry*, 73(6):1240–1246, 2001.
- [65] Knut Drescher, Yi Shen, Bonnie L. Bassler, and Howard A. Stone. Bio-film streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(11):4345–4350, 2013.

- [66] Felix J. H. Hol and Cees Dekker. Zooming in to see the bigger picture: Microfluidic and nanofabrication tools to study bacteria. *Science*, 346(6208), 2014.
- [67] W. Zhou, Y. Huang, E. Menard, N. R. Aluru, J. A. Rogers, and A. G. Alleyne. Mechanism for stamp collapse in soft lithography. *Applied Physics Letters*, 87(25):251925, 2005.
- [68] Yonggang Y. Huang, Weixing Zhou, K. J. Hsia, Etienne Menard, Jang-Ung Park, John A. Rogers, and Andrew G. Alleyne. Stamp collapse in soft lithography. *Langmuir*, 21(17):8058–8068, 2005.
- [69] Douglas B. Weibel, Willow R. DiLuzio, and George M. Whitesides. Microfabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology*, 5:209, 2007.
- [70] J. Lederberg and E. L. Tatum. Gene recombination in escherichia coli. *Nature*, 158(4016):558, 1946.
- [71] G. Demarre, A. M. Guerout, C. Matsumoto-Mashimo, D. A. Rowe-Magnus, P. Marliere, and D. Mazel. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range r388 plasmid (incw) and rp4 plasmid (incp α) conjugative machineries and their cognate escherichia coli host strains. *Res Microbiol*, 156(2):245–55, 2005.
- [72] A. Khlebnikov, K. A. Datsenko, T. Skaug, B. L. Wanner, and J. D. Keasling. Homogeneous expression of the p(bad) promoter in escherichia coli by constitutive expression of the low-affinity high-capacity araE transporter. *Microbiology*, 147(Pt 12):3241–7, 2001.
- [73] D. A. Mohl, Jr. Easter, J., and J. W. Gober. The chromosome partitioning protein, parB, is required for cytokinesis in caulobacter crescentus. *Mol Microbiol*, 42(3):741–55, 2001.
- [74] Yongfang Li and Stuart Austin. The p1 plasmid is segregated to daughter cells by a ‘capture and ejection’ mechanism coordinated with escherichia coli cell division. *Molecular Microbiology*, 46(1):63–74, 2002.
- [75] Yongfang Li and Stuart Austin. The p1 plasmid is segregated to daughter cells by a ‘capture and ejection’ mechanism coordinated with escherichia coli cell division. *Molecular Microbiology*, 46(1):63–74, 2002.
- [76] R. Fernandez-Lopez, M. de Toro, G. Moncalian, M. P. Garcillan-Barcia, and F. de la Cruz. Comparative genomics of the conjugation region of f-like plasmids: Five shades of f. *Front Mol Biosci*, 3:71, 2016.

- [77] E. Grohmann, P. J. Christie, G. Waksman, and S. Backert. Type iv secretion in gram-negative and gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 107(4):455–471, 2018.
- [78] A. Goni-Moreno, F. de la Cruz, A. Rodriguez-Paton, and M. Amos. Dynamical task switching in cellular computers. *Life (Basel)*, 9(1), 2019.
- [79] E. Cabezon, F. de la Cruz, and I. Arechaga. Conjugation inhibitors and their potential use to prevent dissemination of antibiotic resistance genes in bacteria. *Front Microbiol*, 8:2329, 2017.
- [80] K. Winzer, K. R. Hardie, and P. Williams. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Curr Opin Microbiol*, 5(2):216–22, 2002.
- [81] W. C. Fuqua, S. C. Winans, and E. P. Greenberg. Quorum sensing in bacteria: the luxR-luxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 176(2):269–75, 1994.
- [82] A. Tomasz. Control of the competent state in pneumococcus by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature*, 208(5006):155–9, 1965.
- [83] K. H. Nealson, T. Platt, and J. W. Hastings. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*, 104(1):313–22, 1970.
- [84] A. Eberhard. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol*, 109(3):1101–5, 1972.
- [85] A. Eberhard, A. L. Burlingame, C. Eberhard, G. L. Kenyon, K. H. Nealson, and N. J. Oppenheimer. Structural identification of autoinducer of photobacterium fischeri luciferase. *Biochemistry*, 20(9):2444–9, 1981.
- [86] J. Engebrecht, K. Nealson, and M. Silverman. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from vibrio fischeri. *Cell*, 32(3):773–81, 1983.
- [87] M. E. Taga and B. L. Bassler. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 2:14549–54, 2003.
- [88] D. McDougald, S. A. Rice, and S. Kjelleberg. Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Anal Bioanal Chem*, 387(2):445–53, 2007.

- [89] B. L. Bassler, M. Wright, R. E. Showalter, and M. R. Silverman. Intercellular signalling in *vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol*, 9(4):773–86, 1993.
- [90] A. Prindle, P. Samayoa, I. Razinkov, T. Danino, L. S. Tsimring, and J. Hasty. A sensing array of radically coupled genetic 'biopixels'. *Nature*, 481(7379):39–44, 2011.
- [91] B. M. Ryback, D. I. Odoni, R. G. van Heck, Y. van Nuland, M. C. Hesselman, V. A. Martins Dos Santos, M. W. van Passel, and F. Hugenholtz. Design and analysis of a tunable synchronized oscillator. *J Biol Eng*, 7(1):26, 2013.
- [92] S. Basu, Y. Gerchman, C. H. Collins, F. H. Arnold, and R. Weiss. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*, 434(7037):1130–1134, 2005.
- [93] J. J. Tabor, H. M. Salis, Z. B. Simpson, A. A. Chevalier, A. Levskaya, E. M. Marcotte, C. A. Voigt, and A. D. Ellington. A synthetic genetic edge detection program. *Cell*, 137(7):1272–81, 2009.
- [94] T. Cagatay, M. Turcotte, M. B. Elowitz, J. Garcia-Ojalvo, and G. M. Suel. Architecture-dependent noise discriminates functionally analogous differentiation circuits. *Cell*, 139(3):512–22, 2009.
- [95] K. Turgay, J. Hahn, J. Burghoorn, and D. Dubnau. Competence in *bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J*, 17(22):6730–8, 1998.
- [96] B. A. Lazazzera and A. D. Grossman. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol*, 6(7):288–94, 1998.
- [97] K. B. Xavier and B. L. Bassler. Luxs quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol*, 6(2):191–7, 2003.
- [98] S. Schauder and B. L. Bassler. The languages of bacteria. *Genes Dev*, 15(12):1468–80, 2001.
- [99] X. Chen, S. Schauder, N. Potier, A. Van Dorsselaer, I. Pelczer, B. L. Bassler, and F. M. Hughson. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415(6871):545–9, 2002.
- [100] S. T. Miller, K. B. Xavier, S. R. Campagna, M. E. Taga, M. F. Semelhack, B. L. Bassler, and F. M. Hughson. *Salmonella typhimurium*

- recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal ai-2. *Mol Cell*, 15(5):677–87, 2004.
- [101] D. H. Lenz, K. C. Mok, B. N. Lilley, R. V. Kulkarni, N. S. Wingreen, and B. L. Bassler. The small rna chaperone hfq and multiple small rnas control quorum sensing in *vibrio harveyi* and *vibrio cholerae*. *Cell*, 118(1):69–82, 2004.
- [102] K. H. Nealson and J. W. Hastings. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev*, 43(4):496–518, 1979.
- [103] K. H. Lee and E. G. Ruby. Detection of the light organ symbiont, *vibrio fischeri*, in hawaiian seawater by using lux gene probes. *Appl Environ Microbiol*, 58(3):942–7, 1992.
- [104] K. J. Boettcher and E. G. Ruby. Detection and quantification of *vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *J Bacteriol*, 177(4):1053–8, 1995.
- [105] M. B. Miller and B. L. Bassler. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55:165–99, 2001.
- [106] Y. Jiang, M. Camara, S. R. Chhabra, K. R. Hardie, B. W. Bycroft, A. Lazdunski, G. P. Salmond, G. S. Stewart, and P. Williams. In vitro biosynthesis of the *pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule n-butanoyl-l-homoserine lactone. *Mol Microbiol*, 28(1):193–203, 1998.
- [107] M. R. Parsek, D. L. Val, B. L. Hanzelka, Jr. Cronan, J. E., and E. P. Greenberg. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8):4360–5, 1999.
- [108] A. L. Schaefer, D. L. Val, B. L. Hanzelka, Jr. Cronan, J. E., and E. P. Greenberg. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *vibrio fischeri* luxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18):9505–9, 1996.
- [109] M. I. More, L. D. Finger, J. L. Stryker, C. Fuqua, A. Eberhard, and S. C. Winans. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*, 272(5268):1655–8, 1996.
- [110] Y. Qin, Z. Q. Luo, A. J. Smyth, P. Gao, S. Beck von Bodman, and S. K. Farrand. Quorum-sensing signal binding results in dimerization of trar and its release from membranes into the cytoplasm. *EMBO J*, 19(19):5212–21, 2000.

- [111] N. A. Whitehead, A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson, and G. P. Salmond. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 25(4):365–404, 2001.
- [112] S. Atkinson, C. Y. Chang, R. E. Sockett, M. Camara, and P. Williams. Quorum sensing in yersinia enterocolitica controls swimming and swarming motility. *J Bacteriol*, 188(4):1451–61, 2006.
- [113] S. Swift, A. V. Karlyshev, L. Fish, E. L. Durant, M. K. Winson, S. R. Chhabra, P. Williams, S. Macintyre, and G. S. Stewart. Quorum sensing in aeromonas hydrophila and aeromonas salmonicida: identification of the luxri homologs ahyri and asari and their cognate n-acylhomoserine lactone signal molecules. *J Bacteriol*, 179(17):5271–81, 1997.
- [114] S. Swift, M. J. Lynch, L. Fish, D. F. Kirke, J. M. Tomas, G. S. Stewart, and P. Williams. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in aeromonas hydrophila. *Infect Immun*, 67(10):5192–9, 1999.
- [115] K. R. Piper, S. Beck von Bodman, and S. K. Farrand. Conjugation factor of agrobacterium tumefaciens regulates ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature*, 362(6419):448–50, 1993.
- [116] L. Zhang, P. J. Murphy, A. Kerr, and M. E. Tate. Agrobacterium conjugation and gene regulation by n-acyl-l-homoserine lactones. *Nature*, 362(6419):446–8, 1993.
- [117] S. Lewenza, B. Conway, E. P. Greenberg, and P. A. Sokol. Quorum sensing in burkholderia cepacia: identification of the luxri homologs cepri. *J Bacteriol*, 181(3):748–56, 1999.
- [118] L. S. Chernin, M. K. Winson, J. M. Thompson, S. Haran, B. W. Bycroft, I. Chet, P. Williams, and G. S. Stewart. Chitinolytic activity in chromobacterium violaceum: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J Bacteriol*, 180(17):4435–41, 1998.
- [119] S. Swift, M. K. Winson, P. F. Chan, N. J. Bainton, M. Birdsall, P. J. Reeves, C. E. Rees, S. R. Chhabra, P. J. Hill, J. P. Throup, and et al. 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(3):511–20, 1993.
- [120] S. Jones, B. Yu, N. J. Bainton, M. Birdsall, B. W. Bycroft, S. R. Chhabra, A. J. Cox, P. Golby, P. J. Reeves, S. Stephens, and et al. The lux

- autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in erwinia carotovora and pseudomonas aeruginosa. *EMBO J*, 12(6):2477–82, 1993.
- [121] N. J. Bainton, P. Stead, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, G. P. Salmond, G. S. Stewart, and P. Williams. N-(3-oxohexanoyl)-l-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in erwinia carotovora. *Biochem J*, 288 (Pt 3):997–1004, 1992.
- [122] R. P. Novick, S. J. Projan, J. Kornblum, H. F. Ross, G. Ji, B. Kreiswirth, F. Vandenesch, and S. Moghazeh. The agr p2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in staphylococcus aureus. *Mol Gen Genet*, 248(4):446–58, 1995.
- [123] S. Reverchon, M. L. Bouillant, G. Salmond, and W. Nasser. Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in erwinia chrysanthemi. *Mol Microbiol*, 29(6):1407–18, 1998.
- [124] S. Beck von Bodman and S. K. Farrand. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in erwinia stewartii require induction by an n-acylhomoserine lactone autoinducer. *J Bacteriol*, 177(17):5000–8, 1995.
- [125] D. W. Wood, F. Gong, M. M. Daykin, P. Williams, and 3rd Pierson, L. S. N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by pseudomonas aureofaciens 30-84 in the wheat rhizosphere. *J Bacteriol*, 179(24):7663–70, 1997.
- [126] D. G. Davies, M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361):295–8, 1998.
- [127] T. R. de Kievit and B. H. Iglewski. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*, 68(9):4839–49, 2000.
- [128] A. B. Flavier, L. M. Ganova-Raeva, M. A. Schell, and T. P. Denny. 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(22):7089–97, 1997.

- [129] M. T. Cubo, A. Economou, G. Murphy, A. W. Johnston, and J. A. Downie. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiA* and *rhiB* that can influence nodulation by rhizobium *leguminosarum* biovar *viciae*. *J Bacteriol*, 174(12):4026–35, 1992.
- [130] K. M. Gray, J. P. Pearson, J. A. Downie, B. E. Boboye, and E. P. Greenberg. Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. *J Bacteriol*, 178(2):372–6, 1996.
- [131] B. Rodelas, J. K. Lithgow, F. Wisniewski-Dye, A. Hardman, A. Wilkinson, A. Economou, P. Williams, and J. A. Downie. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol*, 181(12):3816–23, 1999.
- [132] J. K. Lithgow, A. Wilkinson, A. Hardman, B. Rodelas, F. Wisniewski-Dye, P. Williams, and J. A. Downie. The regulatory locus *cinR* in *rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol*, 37(1):81–97, 2000.
- [133] A. Puskas, E. P. Greenberg, S. Kaplan, and A. L. Schaefer. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*, 179(23):7530–7, 1997.
- [134] D. L. Milton, A. Hardman, M. Camara, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, G. S. Stewart, and P. Williams. Quorum sensing in *vibrio anguillarum*: characterization of the *vaiA/vaiR* locus and identification of the autoinducer *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J Bacteriol*, 179(9):3004–12, 1997.
- [135] J. P. Throup, M. Camara, G. S. Briggs, M. K. Winson, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, P. Williams, and G. S. Stewart. Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol*, 17(2):345–56, 1995.
- [136] S. Atkinson, J. P. Throup, G. S. Stewart, and P. Williams. A hierarchical quorum-sensing system in *yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol*, 33(6):1267–77, 1999.
- [137] M. Englmann, A. Fekete, C. Kuttler, M. Frommberger, X. Li, I. Gebefugi, J. Fekete, and P. Schmitt-Kopplin. The hydrolysis of unsubstituted

- n-acylhomoserine lactones to their homoserine metabolites. analytical approaches using ultra performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1160(1-2):184–93, 2007.
- [138] L. Eberl. N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 22(4):493–506, 1999.
- [139] J. P. Pearson, C. Van Delden, and B. H. Iglewski. Active efflux and diffusion are involved in transport of pseudomonas aeruginosa cell-to-cell signals. *J Bacteriol*, 181(4):1203–10, 1999.
- [140] R. J. Redfield. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol*, 10(8):365–70, 2002.
- [141] B. A. Hense, C. Kuttler, J. Muller, M. Rothballer, A. Hartmann, and J. U. Kreft. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol*, 5(3):230–9, 2007.
- [142] S. P. Brown and R. A. Johnstone. Cooperation in the dark: signaling and collective action in quorum-sensing bacteria. *Proc Biol Sci*, 268(1470):961–5, 2001.
- [143] S. A. West, K. Winzer, A. Gardner, and S. P. Diggle. Quorum sensing and the confusion about diffusion. *Trends Microbiol*, 20(12):586–94, 2012.
- [144] G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, and R. D’Ari. Escherichia coli physiology in luria-bertani broth. *J Bacteriol*, 189(23):8746–9, 2007.
- [145] F. Ausubel. *Short Protocols in Molecular Biology*. CurentProtocols, Paperback(2002) (2002), 2002.
- [146] M. Welch, J. T. Hodgkinson, J. Gross, D. R. Spring, and T. Sams. Ligand binding kinetics of the quorum sensing regulator pqsr. *Biochemistry*, 52(25):4433–8, 2013.
- [147] M. Carbonell-Ballesteros, S. Duran-Nebreda, R. Montanez, R. Sole, J. Macia, and C. Rodriguez-Caso. A bottom-up characterization of transfer functions for synthetic biology designs: lessons from enzymology. *Nucleic Acids Res*, 42(22):14060–9, 2014.
- [148] María-Leonor Pla, Sandra Oltra, María-Dolores Esteban, Santiago Andreu, and Alfredo Palop. Comparison of primary models to predict microbial growth by the plate count and absorbance methods. *BioMed Research International*, 2015:365025, 2015.

- [149] T. Long, K. C. Tu, Y. Wang, P. Mehta, N. P. Ong, B. L. Bassler, and N. S. Wingreen. Quantifying the integration of quorum-sensing signals with single-cell resolution. *PLoS Biol*, 7(3):e68, 2009.
- [150] M. L. Urbanowski, C. P. Lostroh, and E. P. Greenberg. Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified vibrio fischeri luxr protein. *J Bacteriol*, 186(3):631–7, 2004.
- [151] E. L. Haseltine and F. H. Arnold. Implications of rewiring bacterial quorum sensing. *Appl Environ Microbiol*, 74(2):437–45, 2008.
- [152] A. L. Koch. The logarithm in biology. 1. mechanisms generating the log-normal distribution exactly. *J Theor Biol*, 12(2):276–90, 1966.
- [153] A. L. Koch. The logarithm in biology. ii. distributions simulating the log-normal. *J Theor Biol*, 23(2):251–68, 1969.
- [154] Y. Taniguchi, P. J. Choi, G. W. Li, H. Chen, M. Babu, J. Hearn, A. Emili, and X. S. Xie. Quantifying e. coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science*, 329(5991):533–8, 2010.
- [155] V. Shahrezaei and P. S. Swain. Analytical distributions for stochastic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(45):17256–61, 2008.
- [156] G. E. Dilanji, J. B. Langebrake, P. De Leenheer, and S. J. Hagen. Quorum activation at a distance: spatiotemporal patterns of gene regulation from diffusion of an autoinducer signal. *J Am Chem Soc*, 134(12):5618–26, 2012.
- [157] W. S. Choi, D. Ha, S. Park, and T. Kim. Synthetic multicellular cell-to-cell communication in inkjet printed bacterial cell systems. *Biomaterials*, 32(10):2500–7, 2011.
- [158] Oskar Hallatschek, Pascal Hersen, Sharad Ramanathan, and David R Nelson. Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *arXiv.org*, q-bio.PE, 2008.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben. Insbesondere geht dieser an:

Prof. Dr. Friedrich Simmel, der mir die Möglichkeit und Unterstützung gegeben hat dieses spannende Thema zu bearbeiten

Dr. Andrea Mückl, mit der ich stets viel Spaß bei gemeinsamer Laborarbeit hatte. Ich freue mich sehr, dass unser Kontakt bis heute anhält

Helene Budjarek, ohne die das Labor im Chaos enden würde

Dr. Korbinian Kapsner, Dr. Max Scheible und Dr. Maximilian Weitz, für den regen Austausch und die gute Zusammenarbeit

Prof. Dr. Ulrich Gerland und Dr. Tiago Ramalho für die gute Zusammenarbeit

alle Mitglieder des Lehrstuhls für die stets freundschaftliche Atmosphäre

allen Kollaborationspartnern des BACTOCOM-Projekts, die Diskussionen mit ihnen haben immer wieder neue Impulse geschaffen

Markus Jungermann, ohne den diese Arbeit für alle Zeiten unvollendet geblieben wäre

meine Familie, auf die ich mich in allen Lebenslagen verlassen kann. Ohne ihre Unterstützung wäre ich niemals so weit gekommen