

Lehrstuhl für Mikrobiologie  
der Technischen Universität München

**Nachweis, Verbreitung und Bedeutung  
von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen  
bei Gram-negativen Bakterien**

**Otto Geisenberger**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für  
Chemie der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. W. Höll

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer  
2. Lecturer Dr. Ph. J. Hill,  
University of Nottingham, GB

Die Dissertation wurde am 13.09.2000 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 16.10.2000 angenommen.



# INHALTSVERZEICHNIS

## A. EINLEITUNG

<b>A.1 Zell-Zell-Kommunikation bei Gram-negativen Bakterien</b>	<b>1</b>
<b>A.2 ‘Quorum sensing’ in <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>4</b>
<b>A.3 ‘Quorum sensing’ in <i>Burkholderia cepacia</i></b>	<b>6</b>
<b>A.4 Zell-Zell-Kommunikation in der Rhizosphäre</b>	<b>6</b>
<b>A.5 Nachweis von <i>N</i>-Acyl-L-homoserinlactonen mit bakteriellen Biosensoren</b>	<b>7</b>
<b>A.6 Ziele dieser Arbeit</b>	<b>8</b>

## B. MATERIAL UND METHODEN

<b>B.1 Verwendete Bakterien und Plasmide</b>	<b>11</b>
<b>B.2 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung</b>	<b>12</b>
B.2.1 Nährmedien zur Anzucht von Mikroorganismen	12
B.2.2 Hemmstoffe	15
B.2.3 Kultivierung, Zellernte und Bestimmung der Optischen Dichte	16
B.2.4 Stammhaltung	16
<b>B.3 Nachweis von <i>N</i>-Acyl-L-homoserinlactonen</b>	<b>16</b>
B.3.1 Isolierung von AHL-Molekülen aus Zellkulturüberstand	16
B.3.2 Bakterielle Reportersysteme zum Nachweis von <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlactonen	17
B.3.2.1 <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	17
B.3.2.2 Sensorplasmide pSB403 und pSB1075	18
B.3.2.3 Sensorplasmid pJBA89	18
B.3.2.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 (pCF218) (pCF372)	19
B.3.3 Detektion von AHL-Molekülen mit Sensorbakterien	19
B.3.3.1 Identifizierung AHL-produzierender Bakterien mittels Kreuzstrich-Assay	19
B.3.3.2 Auswertung der Kreuzstrich-Assays	20
B.3.3.3 Detektion von AHL-Molekülen mittels Dünnschicht-Chromatographie	21

B.3.3.3.1 Prinzip der Dünnschicht-Chromatographie (DC)	21
B.3.3.3.2 Überschichtung der DC-Platten	22
B.3.3.4 Auswertung der überschichteten DC-Platten	22
B.3.3.5 Ermittlung der $R_f$ -Werte	24
B.3.3.6 Nachweis von AHL-Molekülen mittels Mikrotiterplatten-Assay	24
<b>B.4 Extraktion von Bakterien aus Wurzelmaterial</b>	<b>24</b>
<b>B.5 Detektion von Biolumineszenzsignalen</b>	<b>25</b>
<b>B.6 Detektion von Fluoreszenzsignalen</b>	<b>25</b>
<b>B.7 Epifluoreszenzmikroskopie</b>	<b>26</b>
<b>B.8 Synthetische AHL-Moleküle</b>	<b>26</b>
<b>B.9 Molekulargenetische Methoden</b>	<b>27</b>
B.9.1 Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNS	27
B.9.2 Analyse von Nukleinsäuren	28
B.9.2.1 Qualitative Analyse von Nukleinsäuren durch horizontale Agarosegel-	
elektrophorese	28
B.9.2.2 Quantitative Analyse von Nukleinsäuren mittels Spektralphotometrie	29
B.9.3 <i>In vitro</i> Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion	30
B.9.4 PCR-Primer	31
B.9.5 <i>LI-COR</i> -DNS-Sequenzanalyse nach dem `Cycle Sequencing`-Protokoll	32
B.9.6 Detektion und Analyse von DNS-Sequenzen	34
<b>C. ERGEBNISSE</b>	
<b>C.1 Bestimmung der Spezifitäten und Sensitivitäten der verwendeten AHL-</b>	
<b>    Sensorsysteme</b>	<b>35</b>
C.1.1 Die AHL-Sensorplasmide pSB403 und pSB1075	36
C.1.2 Der AHL-Sensor <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	38
C.1.3 Der AHL-Sensor <i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 (pCF218) (pCF372)	40
C.1.4 Der AHL-Sensor <i>E. coli</i> JM105 (pJBA89)	41
<b>C.2 Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Produktion von AHL-Molekülen am</b>	
<b>    Beispiel von <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>43</b>

C.2.1 Der Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die AHL-Produktion in <i>P. aeruginosa</i>	43
C.2.2 Der Einfluß des pH-Wertes auf die auf die AHL-Produktion in <i>P. aeruginosa</i>	45
C.2.3 Der Einfluß der Eisen-Konzentration auf die AHL-Produktion in <i>P. aeruginosa</i>	49
C.2.4 Der Einfluß von EDTA auf die AHL-Produktion in <i>P. aeruginosa</i>	51
<b>C.3 Die Produktion von AHL-Molekülen bei klinischen <i>P. aeruginosa</i> Isolaten</b>	<b>53</b>
C.3.1 AHL-Profile ausgewählter <i>P. aeruginosa</i> Isolate verschiedener Mukoviszidosepatienten	53
C.3.2 Longitudinaler Verlauf der AHL-Produktion bei chronischer Infektion mit <i>P. aeruginosa</i>	54
C.3.3 Longitudinaler Verlauf der AHL-Produktion bei Co-Infektion des Patienten mit <i>B. cepacia</i>	55
<b>C.4 Vergleich der AHL-Produktion bei Vertretern verschiedener <i>B. cepacia</i> Genomovare</b>	<b>58</b>
<b>C.5 Isolierung und Charakterisierung AHL-Molekülproduzierender Bakterien aus der Rhizosphäre von Tomaten</b>	<b>61</b>
C.5.1 Isolierung von Bakterien aus der Tomatenrhizosphäre	61
C.5.2 Untersuchung der Bakterienisolate auf die Produktion von AHL-Molekülen	61
C.5.3 Identifizierung der Rhizosphärenisolate	63
 <b>D. DISKUSSION</b>	
<b>D.1 Nachweis von AHL-Molekülen mit bakteriellen Biosensoren nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung</b>	<b>65</b>
<b>D.2 Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Produktion von AHL-Molekülen am Beispiel von <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>68</b>
<b>D.3 AHL-Produktion klinischer <i>P. aeruginosa</i> Isolate</b>	<b>73</b>
<b>D.4 Vergleich der AHL-Produktion bei Vertretern verschiedener <i>B. cepacia</i> Genomovare</b>	<b>77</b>
<b>D.5 Isolierung und Charakterisierung AHL-Molekülproduzierender Bakterien aus der Rhizosphäre von Tomaten</b>	<b>78</b>

<b>E. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
<b>F. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>83</b>
<b>G. PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>93</b>

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

A	Adenin, Ampere
AHL	<i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BHL	<i>N</i> -(butanoyl)-L-homoserinlacton
BP	Bandpaßfilter
Bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DHL	<i>N</i> -(decanoyl)-L-homoserinlacton
dDHL	<i>N</i> -(dodecanoyl)-L-homoserinlacton
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
Fa.	Firma
G	Guanin
g	Gramm, Fallbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HHL	<i>N</i> -(hexanoyl)-L-homoserinlacton
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	destilliertes, entionisiertes und filtriertes Wasser
K	Kilo
Kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LP	Langpaßfilter
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Milli, Meter
μ	Mikro
min	Minute
MPPA	Monopalmitoylphosphatidinsäure
N	Stickstoff
N	Nano
OBHL	<i>N</i> -(3-oxobutanoyl)-L-homoserinlacton
OD	Optische Dichte
ODHL	<i>N</i> -(3-oxodecanoyl)-L-homoserinlacton
OdDHL	<i>N</i> -(3-oxododecanoyl)-L-homoserinlacton
OtDHL	<i>N</i> -(3-oxotetradecanoyl)-L-homoserinlacton
OHHL	<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)-L-homoserinlacton
OHL	<i>N</i> -(octanoyl)-L-homoserinlacton
OOHL	<i>N</i> -(3-oxooctanoyl)-L-homoserinlacton
OtDHL	<i>N</i> -(3-oxotetradecanoyl)-L-homoserinlacton
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNS	Ribonucleinsäure

rDNS	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNS	Ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
tDHL	<i>N</i> -(tetradecanoyl)-L-homoserinlacton
TE	Tris/EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten, Uracil
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

## A. Einleitung

### A.1 Zell-Zell-Kommunikation bei Gram-negativen Bakterien

Bereits vor über 60 Jahren lieferten Untersuchungen an Leuchtbakterien erste Anhaltspunkte für die mögliche Existenz von multizellulärem Verhalten bei Bakterien (Doudoroff, 1942). Diese Vorstellung von einer Art „Gruppenverhalten“ bei Mikroorganismen fand zunächst jedoch wenig Beachtung. Erst als mit Beginn der modernen Biotechnologie in den 70er Jahren neue biochemische und genetische Methoden für detailliertere Untersuchungen zur Verfügung standen, konnte damit begonnen werden, die beobachteten Phänomene durch Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu erklären. Dies führte in der jüngsten Vergangenheit zu einer zunehmenden Bedeutung dieses Arbeitsgebietes.

Anfänglich konzentrierten sich die Studien auf drei Gruppen von Mikroorganismen. Neben den bereits erwähnten biolumineszenten, marinen Vibrionbakterien wurde hauptsächlich mit Gram-positiven Kokken und Myxobakterien gearbeitet. In den letzten Jahren konnte jedoch für eine ständig wachsende Anzahl verschiedener Bakterienspezies nachgewiesen werden, daß sie in der Lage sind, untereinander Informationen über den Zustand der Gesamtpopulation auszutauschen, und es ist daher davon auszugehen, daß es sich bei dieser Fähigkeit um eine bei den Prokaryoten weit verbreitete Eigenschaft handelt (Hardman *et al.*, 1998). Mittlerweile wurden alleine bei den Gram-negativen Bakterien über 15 Gattungen entdeckt, die kleine Signalmoleküle, die auch Pheromone genannt werden, einsetzen, um die Expression bestimmter Gene in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen, wie z.B. der Verfügbarkeit von Nährstoffen oder der Populationsdichte, zu regulieren (Dunny und Winans, 1999).

Kommunikationssysteme, die von Mikroorganismen zur Erkennung der eigenen Populationsdichte eingesetzt werden, faßt man heute in der Literatur oft unter dem Begriff `quorum sensing` (QS)-Systeme zusammen, wobei die kleinste Einheit, die zu Zelldichte-abhängigen, interzellulären Reaktionen befähigt ist, per Definition das Quorum darstellt (Fuqua *et al.*, 1994). Zur Ermittlung der Populationsdichte findet man bei den verschiedenen Systemen Signalmoleküle mit unterschiedlicher chemischer Struktur.

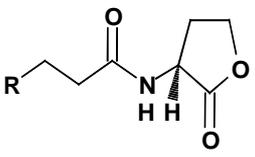
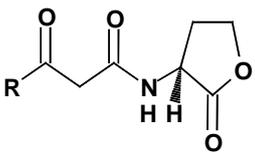
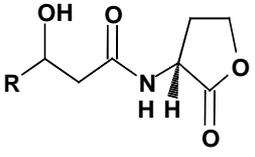
Bei *Stigmatella aurantiaca*, einem Bakterium, das zur Gruppe der Myxobakterien gehört, sind Pheromone an der Ausprägung des charakteristischen Entwicklungszyklus dieser Organismen

beteiligt. Als Signalmoleküle fand man hier beispielsweise Lipide, die für die Differenzierung von mehreren tausend Einzelzellen zu den sogenannten Fruchtkörpern verantwortlich sind. Voraussetzungen für die Ausbildung dieser multizellulären Zellverbände sind neben einer ausreichend hohen Zelldichte nährstofflimitierte Wachstumsbedingungen und eine feste Oberfläche (Qualls *et al.*, 1978).

In den meisten Fällen steuern die bakteriellen Kommunikationssysteme jedoch nicht morphologische Veränderungen einzelner Zellen, sondern beeinflussen die Pathogenität der jeweiligen Organismen. So verfügt das pflanzenpathogene Bakterium *Ralstonia solanacearum* über ein komplexes Regulationsnetzwerk, das verschiedene Signalsubstanzen, darunter auch die leicht flüchtigen 3-Hydroxypalmitinsäure-methylester (3-OH PAME), verwendet. Diese kleinen Moleküle sind für die Regulation verschiedener Virulenzfaktoren, wie z.B. der Endoglukanase, verantwortlich (Clough *et al.*, 1994). Bei *Xanthomonas campestris*, einem anderen pflanzenpathogenen Bakterium, ist ein noch relativ wenig charakterisiertes, extrazelluläres Molekül an der Regulation der Exoenzymproduktion und anderer Virulenzfaktoren beteiligt. Bei dieser als DSF bezeichneten Substanz handelt es sich möglicherweise wie bei dem erwähnten 3-OH PAME um Derivate aus dem Fettstoffwechsel der jeweiligen Organismen (Barber *et al.*, 1997).

Eine dritte Klasse von Signalsubstanzen stellen Butyrolactone dar. Diese wurden schon vor längerem bei einigen Arten der Gram-positiven Streptomycceten entdeckt (Horinouchi und Beppu, 1992) und konnten nun vor kurzem auch aus zellfreien Kulturüberständen von *Pseudomonas aureofaciens* isoliert werden (Gamard *et al.*, 1997). *P. aureofaciens* verfügt darüberhinaus noch über ein weiteres Kommunikationssystem, das *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL) verwendet, um die Synthese des fungiziden Antibiotikums Phenazin zu steuern (Wood *et al.*, 1997).

AHL-Moleküle sind bei Bakterien aus der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Untergruppe der Proteobakterien nach dem momentanen Kenntnisstand die am häufigsten verwendeten Pheromone. Es handelt sich dabei um verschiedene *N*-Acyl-L-homoserinlactone, die sich im wesentlichen durch die Länge der *N*-Acyl-Seitengruppe (bisher wurden Moleküle mit 4 bis 14 Kohlenstoffatomen beschrieben) sowie durch Modifikationen an Position C-3 (3-Oxo- oder 3-Hydroxygruppe) unterscheiden (siehe Abbildung A.1).

	R	Chemische Bezeichnung	Abkürzung	Molekulargewicht
	CH <sub>3</sub>	<i>N</i> -Butanoyl-L-HSL	BHL	171
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>N</i> -Hexanoyl-L-HSL	HHL	199
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	<i>N</i> -Octanoyl-L-HSL	OHL	227
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	<i>N</i> -Decanoyl-L-HSL	DHL	255
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CHCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	7,8- <i>cis-N</i> -(Tetradecanoyl)-L-HSL	7,8- <i>cis</i> -tDHL	311
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-L-HSL	OHHL	213
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	<i>N</i> -(3-Oxo-octanoyl)-L-HSL	OOHL	241
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	<i>N</i> -(3-Oxodecanoyl)-L-HSL	ODHL	269
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	<i>N</i> -(3-Oxododecanoyl)-L-HSL	OdDHL	297
	CH <sub>3</sub>	<i>N</i> -(3-Hydroxybutanoyl)-L-HSL	HBHL	186
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CHCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	7,8- <i>cis-N</i> -(3-Hydroxytetradecanoyl)-L-HSL	7,8- <i>cis</i> -HtDHL	326

**Abbildung A.1:** Strukturformeln und Molekulargewichte bisher identifizierter *N*-Acyl-L-homoserinlactone.

AHL-Moleküle wurden erstmals bei den marinen Bakterien der Genera *Vibrio* und *Photobacterium* nachgewiesen und ihre Beteiligung an der Steuerung der Biolumineszenz gezeigt (Eberhard *et al.*, 1981, Cao *et al.*, 1989). Da es sich bei diesen beiden Regulationssystemen um eine positiv rückgekoppelte Induktionskaskade handelt, werden AHL-Moleküle auch oft als ‘Autoinducer’ (AI) bezeichnet.

Die molekularen Mechanismen der Expression der Biolumineszenzgene wurden in der Vergangenheit besonders intensiv in *Photobacterium fischeri*, einem Bakterium, welches symbiontisch in den Leuchtorganen bestimmter Tintenfische vorkommt, untersucht. Bis zur Überschreitung einer definierten Konzentration an AHL-Molekülen katalysiert die sogenannte ‘AHL Synthase’, welche durch das *luxI* Gen kodiert wird, die konstitutive Produktion von AHL auf niedrigem Niveau. Bei *P. fischeri* handelt es sich dabei hauptsächlich um *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlacton (OHHL). Da die bakterielle Zellmembran permeabel für OHHL ist, häuft sich das Signalmolekül mit zunehmender Zelldichte in der Umgebung an und es kommt zum interzellulären Signalaustausch. Wird schließlich ein bestimmter Schwellenwert überschritten, interagiert das Pheromon mit seinem Rezeptorprotein LuxR und induziert die Transkription des *luxICDABE* Operons, das alle für die Erzeugung der Biolumineszenz benötigten Gene aufweist. Da das *luxI*-Gen selbst Teil diese Operons ist,

kommt es zu einer positiven Rückkopplung und damit zu einer raschen Zunahme der Lichtemission. Diese Autoinduktion erlaubt es *P. fischeri*, seine Abundanz in einem bestimmten Habitat zu überwachen und den biolumineszenten Phänotyp nur dort auszubilden, wo er für die symbiontische Lebensform von Vorteil ist, wie z.B. in dem Lichtorgan bestimmter Tiefseefische. Im freien Meerwasser hingegen, wo dieser Organismus nur in sehr geringen Zelldichten vorkommt, wäre die Biolumineszenzexpression aus energetischer Sicht nicht sinnvoll und wird daher nicht induziert (Greenberg, 1997).

Im Jahre 1992 wurde erstmals gezeigt, daß das gleiche Molekül, das die Biolumineszenz in *P. fischeri* kontrolliert, in *Erwinia carotovora* die Produktion des  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums Carbapenem reguliert (Bainton *et al.*, 1992). In der Folge wurden weitere Gram-negative Bakterien auf das Vorkommen *luxI*- bzw. *luxR*-homologer Gene hin untersucht, und mittlerweile wurden entsprechende Gene in insgesamt 25 bzw. 23 unterschiedlichen Spezies identifiziert (Eberl, 1999). Darunter waren zum Beispiel *traI/traR* aus *Agrobacterium tumefaciens* (Piper *et al.*, 1993), *soli/solR* aus *Ralstonia solanacearum* (Flavier *et al.*, 1997) und *swrI/swrR* aus *Serratia liquefaciens* (Eberl *et al.*, 1996).

Ein Vergleich der AHL-regulierten Systeme zeigt, daß in den jeweiligen Organismen sehr verschiedene Eigenschaften koordiniert werden. Das Spektrum der Phänotypen reicht dabei von der bereits beschriebenen Biolumineszenz und Antibiotikumsynthese über konjugativen Plasmidtransfer (Piper *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993), 'starvation response' (Thorne und Williams, 1999), bakterielle Fortbewegung (Lindum *et al.*, 1998; Glessner *et al.*, 1999) und Ausbildung differenzierter Biofilme (Davies *et al.*, 1998; O'Toole und Kolter, 1998) bis hin zur Produktion verschiedenster Virulenzfaktoren (Passador *et al.*, 1993; McKenney *et al.*, 1995). Die Regulation der Produktion von Virulenzfaktoren spielt insbesondere bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* im Zusammenhang mit der chronischen Infektion von Mukoviszidosepatienten eine wichtige Rolle (Govan *et al.*, 1996).

## A.2 'Quorum sensing' in *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* ist ein weit verbreiteter, opportunistisch humanpathogener Keim, der bei immungeschwächten Patienten ernsthafte Infektionen verursachen kann. Er ist zudem für die meisten, durch Gram-negative Bakterien verursachten nosokomialen Infektionen verantwortlich (Römling *et al.*, 1994). Grundlage dieser ausgeprägten Virulenz sind neben

einer Reihe zellassoziierter Virulenzfaktoren, wie z.B. Alginat, Pili und Lipopolysaccharid, auch extrazelluläre Faktoren, wie Proteasen (LasB-Elastase, alkalische Protease und LasA-Protease), Hämolysine (Rhamnolipid und Phospholipase) und Toxine (Exotoxin A und Exoenzym S) (Govan *et al.*, 1996). Wie in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, wird die Produktion vieler dieser Virulenzfaktoren von zwei, miteinander interagierenden AHL-Systemen kontrolliert (Pesci *et al.*, 1997).

Zunächst wurde das für die Expression der LasB-Elastase verantwortliche Regulationssystem in *P. aeruginosa* beschrieben, das als *las*-System bezeichnet wird. Diese Regulationseinheit setzt sich aus dem Autoinducer-Synthase Gen *lasI*, das für die Synthese von *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserinlacton (OdDHL) verantwortlich ist, und dem *lasR* Gen, welches den Transkriptionsaktivator kodiert, zusammen. Durch die Bindung von OdDHL an LasR kommt es zur verstärkten Transkription von *lasI* und damit zum rapiden Anstieg an verfügbarem Autoinducer. Das *las*-System ist aber nicht nur für die Produktion von LasB verantwortlich, sondern steuert darüberhinaus die Ausbildung weiterer Proteasen (LasA und alkalische Protease) und von Exotoxin A (ToxA). Neben diesen Virulenzfaktoren wird aber auch die Expression des XCP Typ II Sekretionssystem durch das *las*-System koordiniert (Van Delden und Iglewski, 1998).

Ein weiteres Signalsystem in *P. aeruginosa* wurde aufgrund seiner Fähigkeit, die Produktion von Rhamnolipiden zu koordinieren, identifiziert und wird als *rhl*-System bezeichnet. Diese Regulationseinheit besteht aus dem AHL-Synthasegen *rhlI*, das für die Herstellung von *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL) verantwortlich ist, und dem für den Transkriptionsaktivator kodierenden Gen *rhlR*. Dieses System steuert die Expression des *rhlAB* Operons, das eine Rhamnosyltransferase kodiert, die für die Synthese von Rhamnolipid erforderlich ist. Das *rhl*-System beeinflusst zudem die Herstellung der Virulenzgenprodukte LasA, LasB, Pyocyanin, Cyanid und der alkalischen Protease.

Die beiden Reaktionskreisläufe agieren jedoch nicht gänzlich unabhängig voneinander. Der LasR/OdDHL-Komplex aktiviert beispielsweise die Transkription von *rhlR*. Gleichzeitig blockiert der Autoinducer OdDHL die Bindung des Autoinducers BHL an RhlR und inhibiert damit die Expression RhlR/BHL-kontrollierter Gene (Lafiti *et al.*, 1995; Pesci *et al.*, 1997). Neueste Ergebnisse zeigen, daß LasR und RhlR in ein hierarchisches Netzwerk von Transkriptionsfaktoren eingebunden sind: die Regulatorproteine GacA und AlgR2 aktivieren bzw. inhibieren die Expression von *lasR* und gleichzeitig inhibiert AlgH die Expression von *rhlR* (unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Iglewski, Rochester, USA).

### A.3 'Quorum sensing' in *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia* (früher *Pseudomonas cepacia*) hat sich im Laufe der Jahre als wichtiger pathogener Organismus vor allem im Zusammenhang mit Patienten, die an Mukoviszidose (syn.: Zystische Fibrose) leiden, herausgestellt (Gilligan *et al.*, 1991). Nachdem in verschiedenen Bioassays gezeigt wurde, daß Kulturüberstände von *B. cepacia* Autoinducer-Aktivität aufweisen, konnte schließlich durch die Identifizierung der *luxRI* homologen Gene *cepRI* ein 'quorum sensing'-System in *B. cepacia* charakterisiert und gleichzeitig das Homoserinlacton *N*-Octanoyl-L-homoserinlacton (OHL) als einziges Signalmolekül nachgewiesen werden (Lewenza *et al.*, 1999). Frühere Arbeiten berichten dagegen von mindestens drei verschiedenen AHL-Molekülen, die in *B. cepacia* Kulturüberständen gefunden wurden (McKenney *et al.*, 1995). Für diese Diskrepanz wurden Unterschiede in der Produktion von AHL-Molekülen bei verschiedenen *B. cepacia* Isolaten verantwortlich gemacht (Lewenza *et al.*, 1999). Wie bei *P. aeruginosa* wird auch bei *B. cepacia* die Expression verschiedener extrazellulärer Virulenzfaktoren, wie z.B. Protease und Siderophore, in Abhängigkeit von der Zelldichte reguliert (Lewenza *et al.*, 1999).

### A.4 Zell-Zell-Kommunikation in der Rhizosphäre

Die Bezeichnung Rhizosphäre wurde von Hiltner 1904 erstmals verwendet. Er beschrieb damit den die Wurzeln umgebenden Bodenanteil, der verstärktes bakterielles Wachstum aufweist. Im Laufe der Jahre wurde dieser Begriff immer wieder neu definiert, um die Pflanzenwurzeln bei der Betrachtung dieses speziellen Lebensraumes stärker miteinzubeziehen. Die heutige Definition der Rhizosphäre differenziert zwischen Endo- und Ectorhizosphäre, wobei sich die erstere auf die unmittelbare Umgebung der Pflanze beschränkt. Diese umfasst mehrere Bereiche: eine Mucusschicht bestehend aus pflanzlichen oder bakteriellen Polysacchariden, die pflanzliche Epidermis, welche die Wurzelhaare miteinschließt, und die Cortexschicht. Im Gegensatz dazu bezieht sich die Ectorhizosphäre auf den Bodenanteil, der sich wenige Millimeter von der Wurzeloberfläche erstreckt (Belandreau *et al.*, 1978).

Mit der Entdeckung der Zelldichte-abhängigen Regulation der Carbapenemproduktion in *Erwinia carotovora* wurde zum ersten Mal AHL-vermittelte Kommunikation bei einem

pflanzenpathogenen Bakterium nachgewiesen (Bainton *et al.*, 1992). Mittlerweile wurden ‘quorum sensing’ Systeme bei weiteren Bakterien gefunden, die in Gesellschaft mit bestimmten Pflanzen vorkommen. So konnte gezeigt werden, daß *Rhizobium leguminosarum* ein langkettiges AHL-Signalmolekül [*N*-(3*R*-Hydroxy-7-*cis*-tetradecanoyl-*L*-homoserinlacton)] produziert, um mit Leguminosenpflanzen symbiontische Beziehungen einzugehen (Gray *et al.*, 1996; Schripsema *et al.*, 1996). In *Agrobacterium tumefaciens* wurde ein AHL-System gefunden, welches das Pheromon *N*-3-(oxooctanoyl)-*L*-homoserinlacton verwendet und das in die Kontrolle des Ti-Plasmidtransfers involviert ist (Zhang *et al.*, 1993; Piper *et al.*, 1993). In *Pseudomonas aureofaciens*, einem Bakterium, das in der Rhizosphäre von Weizen vorkommt und dabei die Pflanzen vor Schädlingen schützt, wird die Synthese der sogenannten Phenazinantibiotika ebenfalls über Pheromone gelenkt. Bei diesem Phänomen, das auch unter dem Begriff ‘pathogen suppression’ bekannt ist, wird das Wachstum gewisser pflanzenpathogener Mikroorganismen durch die produzierten Antibiotika inhibiert. Es konnte zudem gezeigt werden, daß die Produktion von AHL-Molekülen für die Persistenz von *P. aureofaciens* in der Rhizosphäre, d.h. für die Fähigkeit, mit anderen Rhizosphärenbakterien zu konkurrieren, notwendig ist (Pierson *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1997). Weitere Mikroorganismen aus der Rhizosphäre, die AHL-Signalmoleküle produzieren, umfassen *Pantoea stewartii* (Von Bodmann und Farrand, 1995), *Ralstonia solanacearum* (Flavier *et al.*, 1997) und *Pseudomonas syringae* (Dunny und Winans, 1999). Während bei *P. stewartii* die Produktion einer extrazellulären Polysaccharid Kapselsubstanz (EPS) über die LuxI/LuxR homologen Proteine EsaI/EsaR gesteuert wird, ist über die Autoinducer-regulierten Eigenschaften in *R. solanacearum* und *P. syringae* noch nichts bekannt.

#### **A.5 Nachweis von *N*-Acyl-*L*-homoserinlactonen mit bakteriellen Biosensoren**

Biologische Sensoren zum Nachweis bestimmter Substanzen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie auf die Anwesenheit des zu bestimmenden Analyten mit der Produktion eines leicht nachweisbaren Signals reagieren. Ein wesentlicher Vorteil biologischer Systeme ist ihre ausgesprochen hohe Sensitivität und Selektivität im Vergleich zu technischen Systemen.

Bakterielle Sensoren, die spezifisch AHL-Moleküle detektieren, haben in der jüngsten Zeit die Suche nach AHL-produzierenden Bakterienstämmen und die Identifizierung entsprechender *luxI* homologer Gene entscheidend gefördert. In verschiedenen Nachweismethoden eingesetzt, reagieren sie sowohl auf aufgereinigte AHL-Moleküle als

auch auf AHL-produzierende Bakterienstämme (McClellan *et al.*, 1997). Bereits 1977 wurde eine *Photobacterium fischeri* (früher *Vibrio fischeri*) Mutante beschrieben, die nur sehr wenig Autoinducer produzierte und daher kaum Licht emittierte. Sobald jedoch Autoinducer extern zugegeben wurde, konnte eine intensive Biolumineszenz beobachtet werden (Nealson, 1977). In den letzten Jahren wurden die Reportersysteme mit Hilfe gentechnischer Methoden im Hinblick auf eine verbesserte Sensitivität weiterentwickelt und mit neuen Reporterproteinen gekoppelt, so daß heute je nach Einsatzzweck eine optimale Auswahl getroffen werden kann. Es stehen neben verschiedenen biolumineszenten Sensorplasmiden (Swift *et al.*, 1993; Winson *et al.*, 1998) seit kurzem auch Reportersysteme zur Verfügung, die auf dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) basieren und daher zum ersten Mal auch Studien auf Einzelzellebene erlauben (Eberl, 1999, Andersen *et al.*, 2000). Weitere rekombinante Sensoren basieren auf der Expression einer *traA::lacZ* Genfusion in *Agrobacterium tumefaciens* (Fuqua und Winans, 1994), einer *lasB::lacZ* Fusion in einem *E. coli* Stamm mit einem chromosomalen *lasR* Gen (Passador *et al.*, 1996) oder einer *phzB::lacZ* bzw. *phzB::inaZ* Genfusion in *Pseudomonas aureofaciens* (Wood und Pierson, 1996; Wood *et al.*, 1997). Darüberhinaus wurde die Produktion des violetten Pigments Violacein in *Chromobacterium violaceum* und die Synthese eines orangefarbenen Phenazin-Antibiotikums in *P. aureofaciens*, beides AHL-regulierte Phänotypen, zur Konstruktion von Biosensoren verwendet (Pierson *et al.*, 1994; McClellan *et al.*, 1997).

## A. 6 Ziele dieser Arbeit

In vorliegender Arbeit sollten verschiedene bakterielle AHL-Biosensoren in Kombination mit der Dünnschicht-Chromatographie nach der von Shaw *et al.* (1997) entwickelten Methode bezüglich ihrer Sensitivitäten und Spezifitäten gegenüber ausgewählten AHL-Molekülen untersucht und verglichen werden. Darüberhinaus sollte der Einfluß verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Produktion dieser Moleküle am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa* analysiert werden. Die gewonnenen Ergebnisse sollten dazu beitragen die Synthese von AHL-Molekülen in *P. aeruginosa* Isolaten zu beschreiben, die über einen Zeitraum von bis zu elf Jahren aus chronisch infizierten Mukoviszidosepatienten isoliert wurden. Von besonderem Interesse waren dabei Patienten, die mit *B. cepacia* Stämmen co-infiziert waren. Darüberhinaus sollte das Vorkommen von AHL-Molekülen bei

repräsentativen Stämmen der Gattung *Burkholderia*, insbesondere bei Vertretern verschiedener *B. cepacia* Genomovare, untersucht werden.

Schließlich sollte gezeigt werden, ob es mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Methoden möglich ist, Bakterien, die in der Lage sind AHL-Moleküle zu produzieren, aus der Rhizosphäre von Tomaten zu isolieren und die produzierten Moleküle nachzuweisen.



## B. Material und Methoden

### B.1 Verwendete Bakterien und Plasmide

Bakterium, Plasmid	Eigenschaft	Herkunft / Referenz
<i>Aeromonas caviae</i> / <i>Aeromonas hydrophila</i>	Rhizosphärenisolat 7	diese Arbeit
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 (pCF218) (pCF372)	AHL-Sensor	Zhu <i>et al.</i> , 1998
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG1222	Typstamm, GV I	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG12615	GV III	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG14271	GV III	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG14291	GV IV	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG16659	GV III	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG18826	GV III	Sajjan <i>et al.</i> , 1995
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG18827	GV III	Mahenthiralingam <i>et al.</i> , 1996
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG18863	GV III	Lewenza <i>et al.</i> , 1999
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG7000	GV IV	Vandamme <i>et al.</i> , 2000
<i>Burkholderia cepacia</i> R-1464	GV I	Vandamme, Gent, B
<i>Burkholderia cepacia</i> H111	CF-Isolat, GV III	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Burkholderia cepacia</i> H191	CF-Isolat, GV II	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Burkholderia gladioli</i> LMG18157		Vandamme, Gent, B
<i>Burkholderia gladioli</i> LMG2216		Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia multivorans</i> LMG13010	Typstamm, GV II	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia multivorans</i> LMG16660	GV II	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia multivorans</i> LMG17588	GV II	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia multivorans</i> LMG18822	GV II	Mahenthiralingam <i>et al.</i> , 1996
<i>Burkholderia multivorans</i> LMG18824	GV II	Speert <i>et al.</i> , 1994
<i>Burkholderia multivorans</i> LMG18825	GV II	Millar-Jones <i>et al.</i> , 1998
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG6998	GV V	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG10929	Typstamm, GV V	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG16232	GV V	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG18835	GV V	Larsen <i>et al.</i> , 1993
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG18836	GV	Mahenthiralingam <i>et al.</i> , 2000
<i>Burkholderia</i> sp.	Rhizosphärenisolat 6	diese Arbeit
<i>Burkholderia</i> sp.	Rhizosphärenisolat 8	diese Arbeit
<i>Burkholderia</i> / <i>Ralstonia</i> LMG16407		Coenye <i>et al.</i> , 2000
<i>Burkholderia</i> / <i>Ralstonia</i> R-1465		Vandamme, Gent, B
<i>Chromobacterium violaceum</i> CVO26	AHL-Sensor	McClellan <i>et al.</i> , 1997
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Rhizosphärenisolat 2	diese Arbeit
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Rhizosphärenisolat 4	diese Arbeit
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Rhizosphärenisolat 3	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> JM105 (pJBA89)	AHL-Sensor	Andersen <i>et al.</i> , 1999
<i>Escherichia coli</i> MT102 (pSB403)	AHL-Sensor	Winson <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i> MT102 (pSB1075)	AHL-Sensor	Winson <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO I	CF-Isolat	Iglewski, Rochester, USA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JB646 (pJBA140)	AHL-Sensor	Andersen <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GS1	CF-Isolat, isoliert 1/86	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GSB7	CF-Isolat, isoliert 4/87	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GS14	CF-Isolat, isoliert 7/89	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GS26	CF-Isolat, isoliert 1/93	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GSB64	CF-Isolat, isoliert 7/94	Tümmeler, MH Hannover, D

Bakterium, Plasmid	Eigenschaft	Herkunft / Referenz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GS33	CF-Isolat, isoliert 4/96	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MW1	CF-Isolat, isoliert 9/85	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MW12	CF-Isolat, isoliert 10/91	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MW20	CF-Isolat, isoliert 11/92	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MW23	CF-Isolat, isoliert 3/93	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MW24	CF-Isolat, isoliert 9/93	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MW25	CF-Isolat, isoliert 4/94	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MW30	CF-Isolat, isoliert 12/96	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH1	CF-Isolat, isoliert 5/85	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH14	CF-Isolat, isoliert 10/89	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH34	CF-Isolat, isoliert 10/92	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH35	CF-Isolat, isoliert 3/93	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH38	CF-Isolat, isoliert 8/93	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH93	CF-Isolat, isoliert 3/94	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH41	CF-Isolat, isoliert 8/94	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH45	CF-Isolat, isoliert 9/95	Tümmeler, MH Hannover, D
<i>Pseudomonas putida</i>	Rhizosphärenisolat 5	diese Arbeit
<i>Rhanella aquatilis</i>	Rhizosphärenisolat 1	diese Arbeit

LMG:           Laboratorium voor Mikrobiologie, Universität Gent, Belgien  
 MH:            Medizinische Hochschule  
 GV:            Genomovar  
 CF-Isolat:    Isolat aus Mukovizidosepatient

## B.2 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung

### B.2.1 Nährmedien zur Anzucht von Mikroorganismen

Die verwendeten Nährmedien wurden zur Sterilisation in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven für 20 min bei 121 °C und  $1.013 \times 10^5$  Pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen, wie z.B. Hemmstoffe, wurden sterilfiltriert (Porengröße 0.22 µm, Millipore, Eschborn, D) und anschließend den autoklavierten Lösungen zugegeben. Die eingesetzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. Qualität bezogen. Feste Nährmedien enthielten 16 g/l Agar (Gibco BRL, Eggenstein, D). Als Lösungsmittel wurde stets Wasser in destillierter Qualität verwendet.

#### **Luria-Bertani-(LB)-Medium** (Sambrook *et al.*, 1989), modifiziert

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	4 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml
pH	7,4

**Soft-Agar**

Caseinhydrolysat	1,5 g
Hefeextrakt	0,75 g
NaCl	0,75 g
Agar	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 150 ml

**AB-Minimalmedium** (Clark *et al.*, 1967), modifiziert

A <sub>10</sub> :	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
	NaCl	30 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

B:	1 M MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2 ml
	0.5 M CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.2 ml
	0.01 M FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.3 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 900 ml

**Kohlenstoffquelle:**

Glukose (Stammlsg. 20%)	0,2%
Glycerin (Stammlsg. 50%)	0,4%
Succinat (Stammlsg. 20%)	0,4%
Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O (Stammlsg. 1 M)	15mM
Caseinhydrolysat (Stammlsg. 20%)	0,2%

Die Komponenten A<sub>10</sub> und B des Minimalmediums wurden getrennt sterilisiert und nach dem Autoklavieren vereinigt. Für die Herstellung von 1000 ml AB-Minimalmedium wurden 100 ml A<sub>10</sub>-Lösung mit 900 ml B-Lösung gemischt und eine der Kohlenstoffquellen in der angegebenen Endkonzentration zugegeben.

**`Agrobacterium` AB-Minimalmedium** (Chilton *et al.*, 1974)

20x AB-Salze:	NH <sub>4</sub> Cl	20 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	6 g
	KCl	3 g
	CaCl <sub>2</sub>	0,2 g
	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,05 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

20x AB-Puffer:	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	23g
	pH	7,0
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

Beide Komponenten wurden getrennt autoklaviert und anschließend 5 ml (Vorkultur) bzw. 50 ml (Hauptkultur) Nährmedium hergestellt:

H <sub>2</sub> O	4,4 ml bzw. 44 ml
20x AB-Salze	0,25 ml bzw. 2,5 ml
20x AB-Puffer	0,25 ml bzw. 2,5 ml
Mannitol (Stammlsg. 10%)	10 ml bzw. 1ml
Tetracyclin (4,5 mg/ml)	5 µl bzw. 50 µl
Spectinomycin (50 mg/ml)	5 µl bzw. 50 µl

**`Agrobacterium` AB-Softagar** (Chilton *et al.*, 1974)

Agar	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 88 ml
20x AB-Salze	5 ml
20x AB-Puffer	5 ml
Mannitol (Stammlsg. 10 %)	2 ml

Die Salze, der Puffer und die Mannitollösung wurden der autoklavierten Agar–Wasser-Mischung steril zugegeben.

**SYK-Medium**

Hefeextrakt	3 g
Saccharose	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml
pH-Wert	6,8

**LMG2**

Medium A:	`Lab-Lemco`Beef Extract	1 g
	Hefeextrakt	2 g
	Pepton	5 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml
	pH	7,4

Medium B:	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,45 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,39 g
	Medium A	1 l
	pH-Wert	6,8

**Mineralmedium nach Hegemann** (Hegemann, 1966)

EDTA	200 mg
MgSO <sub>4</sub>	580 mg
CaCl <sub>2</sub>	67 mg

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times \text{H}_2\text{O}$	0,2 mg
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,4 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4,5 g
Spurenelementlösung nach Drews	10 ml
Fruktose oder Succinat	0,4 %
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml

**Spurenelementlösung nach Drews (Drews, 1976)**

EDTA	800,0 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	10,0 mg
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	5,0 mg
$\text{CuSO}_4$	1,0 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	3,0 mg
$\text{ZnCl}_2$	2,0 mg
LiCl	0,5 mg
$\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,5 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,0 mg
KBr	2,0 mg
KJ	2,0 mg
$\text{BaCl}_2$	0,5 mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml

**B.2.2 Hemmstoffe**

Zur Herstellung von Selektivmedien und zur Plasmidstabilisierung bei der Kultivierung plasmidhaltiger Stämme wurden die unten angegebenen Hemmstoffe in den entsprechenden Konzentrationen verwendet. Die sterilfiltrierten Antibiotikallösungen wurden den autoklavierten Nährmedien steril zugegeben.

Antibiotikum	Abk.	Wirkungsweise	Konzentration [mg/l]	Lösungsmittel
Ampicillin	Amp	Hemmung der Mureinbiosynthese	100	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
Carbenicillin	Carb	Hemmung der Mureinbiosynthese	400-800	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
Kanamycin	Km	Hemmung der Proteinbiosynthese	30-100	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
Spectinomycin	Sp	Hemmung der Proteinbiosynthese	50	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
Rifampicin	Rif	Hemmung der RNS-Biosynthese	50	Methanol
Tetracyclin	Tc	Hemmung der Proteinbiosynthese	10-20	Methanol

### **B.2.3 Kultivierung, Zellernte und Bestimmung der Optischen Dichte**

Die Anzucht der aeroben Mikroorganismen erfolgte entweder auf agarhaltigen Nährböden in Petrischalen oder als Flüssigkultur auf einem Rundschüttler in Reagenzgläsern bzw. in Erlenmeyerkolben. Alle Bakterienstämme wurden mit Ausnahme von *E. coli*, der bei 37 °C inkubiert wurde, bei 30 °C kultiviert.

Zur Herstellung zellfreier Kulturüberstände wurden die Flüssigkulturen bei 7500 x g für 20 min zentrifugiert. Die photometrische Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit einem Pharmacia LKB Ultrospec Plus Spektrophotometer (Freiburg, D) bei einer Wellenlänge von 450 nm oder 600 nm gegen Nährmedium.

### **B.2.4 Stammhaltung**

Auf festen Nährmedien kultivierte Bakterienstämme wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und alle zwei Wochen überimpft. Die Reinheitsüberprüfung erfolgte durch Verdünnungsausstriche und mikroskopische Kontrolle im Phasenkontrast. Für eine langfristige Stammhaltung wurden die Bakterienstämme in Form von Glycerinkulturen archiviert. Dazu wurde 1 ml ÜN-Kultur mit 500 µl Glycerin (50%) in einem Schraubdeckel-Reaktionsgefäß (Nunc, Roskilde, DK) gemischt und bei -80 °C aufbewahrt (Sambrook *et al.*, 1989).

## **B.3 Nachweis von N-Acyl-L-homoserinlactonen**

### **B.3.1 Isolierung von AHL-Molekülen aus Zellkulturüberstand**

Die AHL-Extrakte der untersuchten Bakterienstämme wurden aus 250 ml Zellkulturüberstand hergestellt. Der zellfreie Überstand wurde dazu in einen 1000 ml Scheidetrichter vorgelegt und 100 ml Dichlormethan (Merck, Darmstadt, D) zugegeben. Beide Flüssigkeiten wurden durch kräftiges Schütteln ca. 2 min lang gründlich gemischt. Aus Sicherheitsgründen

(Explosionsgefahr!) wurde der Schüttelkolben nach jeweils 20 sec belüftet, um einen ausreichenden Druckausgleich zu gewährleisten. Sobald sich beide Phasen deutlich voneinander getrennt hatten, wurde die untere Dichlormethan-Phase in einem 500 ml Erlenmeyerkolben aufgefangen. Die obere, wässrige Phase wurde erneut mit Dichlormethan gemischt, wie oben beschrieben behandelt, und schließlich wurden beide Extrakte vereinigt. In den meisten Fällen war es nötig, restliches Wasser aus den Dichlormethanextrakten zu entfernen. Dazu wurde wasserfreies Magnesiumsulfat (Sigma, Steinheim, D) unter kräftigem Rühren der Dichlormethan-Wasser-Emulsion zugegeben bis sich die Dichlormethan-Phase vollständig klärte. Die gefilterten Extrakte (Whatman No. 3) wurden dann im Rotationsevaporator (Heidolph, D) bei einer Wasserbadtemperatur von 42 °C ohne Anlegen eines Vakuums eingedampft und der Rückstand in 250 µl Ethylacetat (Merck, Darmstadt, D) aufgenommen.

### **B.3.2 Bakterielle Reportersysteme zum Nachweis von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen**

#### **B.3.2.1 *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997)**

In *C. violaceum* wird die Produktion von Violacein, einem nicht-wasserlöslichen, violetten Pigment, das antimikrobielle Eigenschaften besitzt, in Abhängigkeit von der Zelldichte reguliert. Durch miniTn5 Transposonmutagenese wurde eine *C. violaceum* Doppelmutante (CV026) generiert, in der die AHL-Produktion unterbrochen wurde und die infolgedessen keine Pigmentierung aufweist. Die beiden Transposoninsertionsstellen wurden einem möglichen Repressorgen bzw. einem *luxI* homologen Gen, *cviI*, zugeschrieben. Durch massenspektroskopische Untersuchungen von Zellkulturüberständen wurde bewiesen, daß der *C. violaceum* Wildtypstamm HHL als einziges AHL-Molekül produziert. Bei der Verwendung des Stammes CV026 zur Identifikation von AHL-Molekülen wurde gezeigt, daß Homoserinlactone mit einer Seitenkette von mehr als acht C-Atomen, auch bei höheren Konzentrationen, keine Violaceinproduktion in dem Reporter stimulieren konnten. Gleichzeitig wurde jedoch festgestellt, daß AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von C10, C12 und C14 in der Lage waren, die Pigmentierung des CV026-Sensors zu inhibieren, wenn diese vorher durch Zugabe von HHL oder OHHL in der entsprechenden Konzentration stimuliert wurde.

### B. 3.2.2 Sensorplasmide pSB403 und pSB 1075 (Winson *et al.*, 1998)

Die bakterielle Luziferase wird aufgrund ihrer nicht-invasiven und nicht-destruktiven Eigenschaften häufig als Reportersystem für Genexpressionsstudien verwendet. Sie besteht aus zwei ungleichen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , die von den Genen *luxA* und *luxB* kodiert werden. Die Gene *luxC*, *luxD* und *luxE* kodieren für Proteine, welche Tetradekansäuren aus dem Fettsäurebiosyntheseweg abzweigen und in langkettige Aldehyde umwandeln, die bei der Lumineszenzreaktion als Substrat dienen (Meighen *et al.*, 1994). Die Luziferase oxidiert diese Substrate zusammen mit FMNH<sub>2</sub> in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und es entsteht dabei ein angeregtes, instabiles Zwischenprodukt (4a-Hydroxyflavin), das seine Anregungsenergie durch die Emission von Photonen abbaut (Wilson *et al.*, 1998).

Zur Herstellung der beiden AHL-Reportersysteme wurden die Gene *luxCDABE* von *Photobacterium luminescens* im Falle von pSB403 mit dem *luxR* Gen von *P. fischeri* und im Falle von pSB1075 mit dem *lasR* Gen von *P. aeruginosa* verknüpft. Beide Genfusionen stehen dabei unter der Kontrolle der entsprechenden Promotoren P<sub>luxI</sub> bzw. P<sub>lasI</sub>.

### B.3.2.3 Sensorplasmid pJBA89 (Andersen *et al.*, 2000)

Bei dem Plasmid pJBA89 handelt es sich um ein Derivat des Sensorplasmids pSB403, das mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* als Indikator kombiniert wurde. Da die Aktivierung des lichtemittierenden GFP-Chromophors lediglich geringe Mengen an molekularem Sauerstoff voraussetzt, kann GFP ohne zusätzliche *Aequorea*-spezifische Cofaktoren in einem breiten Spektrum von pro- und eukaryontischen Organismen exprimiert werden (Chalfie *et al.*, 1994). Bei dem hier verwendeten GFP handelt es sich um eine sogenannte `red-shifted` GFP-Variante (RS-GFP), die mit einem Absorptionsmaximum von 500 nm und einem Emissionsmaximum von 511 nm ein etwa 20-fach stärkeres Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Wildtyp-GFP aufweist. Um für Genexpressionsstudien eine möglichst sensitive AHL-Nachweisempfindlichkeit zu gewährleisten, wurde bei der Konstruktion des Sensors zudem eine spezielle, instabile RS-GFP-Modifikation gewählt, die durch Veränderungen am C-Terminus des Proteins Bindungsstellen für endogen vorhandene Proteasen aufweist. Dies führt in *E. coli* zu einer Verringerung der Halbwertszeit des GFP-Proteins von ursprünglich mehr als 24 h auf ungefähr 45 min (Andersen *et al.*, 1998).

Zur Kopplung der *gfp*-Expression an die Konzentration von AHL-Molekülen wurde ein Fragment aus pSB403, das *luxR* unter der Kontrolle des *luxI* Promotors und die angrenzenden Translationsstartstelle enthält, mit den oben beschriebenen *gfp*-Genen fusioniert.

#### **B.3.2.4 *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372) (Zhu et al., 1998)**

Bei *A. tumefaciens* vermitteln die LuxI/LuxR homologen Proteine TraI und TraR die zelllichteabhängige Expression des Ti-Plasmid-kodierten *tra*-Regulons. In dieser Regulationseinheit sind die für einen konjugativen Transfer des Ti-Plasmids nötigen Gene zusammengefasst. TraI synthetisiert dabei das AHL-Molekül OOHL, während TraR den entsprechenden Transkriptionsaktivator darstellt. Da gezeigt wurde, daß in einem *A. tumefaciens* Stamm, der TraR in Mengen produziert, wie sie im Wildtyp vorkommen, lediglich OOHL aktivierend wirkt, wurde bei der Entwicklung des *Agrobacterium*-Sensors das Konstrukt pCF218 verwendet. Bei diesem IncP-Plasmid wird TraR mit Hilfe eines Vektorpromotors überexprimiert, was zu einer starken Zunahme an Regulatormolekülen führt. Durch die erhöhte TraR-Konzentration kommt es auch in Gegenwart der anderen AHL-Moleküle, die eine geringere Affinität zu TraR zeigen, zur Bildung von aktiven TraI/TraR-Komplexen (Fuqua et al., 1994). Um die Produktion der AHL-Moleküle sichtbar machen zu können, wurden auf dem Plasmid pCF372 die Gene, die den *traI*-Promotor kodieren, mit den Genen für die  $\beta$ -Galaktosidase fusioniert. Liegen AHL-Moleküle in ausreichender Konzentration vor, so kommt es zur Expression des funktionsfähigen Enzyms und zur Umsetzung des Substrates X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) zu einem blauen Farbstoff. Als Wirtstamm für die beiden Plasmide pCF218 und pCF372 wurde der Ti-plasmidlose, mehrfachresistente *A. tumefaciens* Stamm A136 verwendet (Fuqua et al., 1996).

### **B.3.3 Detektion von AHL-Molekülen mit Sensorbakterien**

#### **B.3.3.1 Identifizierung AHL-produzierender Bakterien mittels Kreuzstrich-Assay**

Bei dieser Technik wurden Bakterienstämme, die auf die Produktion der frei durch den Agar diffundierenden AHL-Moleküle hin untersucht werden sollten, auf einer LB-Agarplatte senkrecht gegen einen der AHL-Reporterstämme ausgestrichen. Um ein homogenes Wachstum des Sensorstamms und damit eine möglichst gleichmäßige Expression der

Indikatorsubstanzen zu erreichen, wurde mit einer Impföse eine Kolonie von einer Agarplatte abgenommen und diese in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Die Spitze einer sterilen 1 ml Glaspipette wurde mit der Suspension benetzt und die anhaftende Flüssigkeit auf einem ca. 1 cm breiten Streifen über die Mitte einer Agarplatte verteilt. Sobald die Agarplatte vollständig getrocknet war, konnten mit einer Impföse die zu testenden Bakterienstämme rechtwinklig zum Sensorstamm ausgestrichen werden. Um eine gegenseitige Wachstumsbehinderung der Stämme auszuschließen, war darauf zu achten, daß die Teststämme zwar in unmittelbarer Nähe, aber ohne direkten Kontakt zum Sensorstamm ausgestrichen wurden. Bei diesem Assay konnte unter Verwendung aller oben erwähnter Sensorsysteme auf die entsprechenden selektiven Antibiotika in den LB-Agarplatten verzichtet werden, da die jeweiligen Plasmide ausreichend stabil waren.

### **B.3.3.2 Auswertung der Kreuzstrich-Assays**

Die Auswertung der Kreuzausstriche erfolgte je nach verwendetem Reportersystem auf unterschiedliche Weise:

#### **- *Chromobacterium violaceum* CV026**

Nach Inkubation der Agarplatten bei 30 °C für maximal 48 h konnten AHL-produzierende Stämme anhand der charakteristischen violetten Pigmentierung des Sensorstammes nachgewiesen werden.

#### **- Sensorplasmide pSB403 und pSB1075**

Die Agarplatten wurden bei 30 °C inkubiert und nach 24 h und 48 h ausgewertet. Zur Biolumineszenzdetektion wurde eine ultrasensitive Photonenkamera verwendet (siehe `B.5 Detektion von Biolumineszenzsignalen`).

#### **- Sensorplasmid pJBA89**

Kreuzausstriche, die mit dem auf dem grün fluoreszierenden Protein basierenden Reporter angefertigt wurden, zeigten nach ca. 24 h Inkubation bei 30 °C eine optimale Konzentration an Markerprotein. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte wie unter `B.6 Detektion von Fluoreszenzsignalen` beschrieben.

### B.3.3.3 Detektion von AHL-Molekülen mittels Dünnschicht-Chromatographie

#### B. 3.3.3.1 Prinzip der Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Die Dünnschicht- oder Planarchromatographie stellt ein chromatographisches Verfahren dar, bei dem ein Sorptionsmittel als stationäre Phase, ein Lösungsmittel oder auch Lösungsmittelgemische (häufig auch Laufmittel genannt) als mobile Phase und die Probenmoleküle beteiligt sind. Die stationäre Phase befindet sich bei der beschriebenen Adsorptionschromatographie als dünne Schicht auf einem geeigneten Träger, wie z.B. Glas. An dieser Schicht erfolgt die Trennung durch Elution der Probe mit dem Laufmittel (nach Römpp, 1990). Für eine verbesserte Auftrennung hydrophober Substanzen wird die sogenannte Umkehrphasen-Chromatographie verwendet, da hier unpolare Substanzen stärker zurückgehalten werden. Bei dieser Modifikation kommt folglich im Gegensatz zur üblichen Adsorptionschromatographie eine unpolare stationäre Phase zum Einsatz. Die mobile Phase ist dagegen polar. Zur Detektion der extrahierten *N*-Acyl-L-homoserinlacton-Proben wurden Umkehrphasen-Dünnschicht-Chromatographie-Platten (RP-18 F<sub>254s</sub>, 20x20 cm, Merck, Darmstadt, D) verwendet. Entlang einer Auftragslinie wurden 1,5 cm vom unteren und von den beiden Seitenrändern der DC-Platten entfernt im Abstand von ca. 2 cm zwischen 0,3 µl und 30 µl der Ethylacetatlösungen aufgetropft und mit einem kalten Luftstrom getrocknet. Die Auftrennung der unterschiedlichen AHL-Moleküle fand bei Kammer sättigung statt. Die Seitenwände der DC-Trogkammer wurden dazu mit Filterpapierstreifen (Whatman No. 1) ausgekleidet und der Boden der DC-Kammer bis zu einer Höhe von maximal 1 cm mit der Laufmittelmischung bestehend aus 60% Methanol und 40% H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> bedeckt. Die abgeschlossene Sättigung der Kammer mit Lösungsmitteldampf konnte am Auftreten von Kondensattropfen am Kammerdeckel erkannt werden. Die DC-Platten konnten jetzt in die Kammer gestellt werden, wobei darauf zu achten war, daß die Auftragslinie der Proben deutlich über dem Flüssigkeitsspiegel lag. Die hier beschriebene DC-Platten-Lösungsmittelkombination benötigte ca. 4 h pro Lauf bis die Lösungsmittelfront ca. 2 cm vom oberen Rand der DC-Platten entfernt war. Die Platten wurden dann aus der Kammer genommen, die exakte Höhe der Lösungsmittelfront markiert und anschließend mit kalter Luft getrocknet. Zur Aufbewahrung konnten die beschickten DC-Platten in Frischhaltefolie eingewickelt bei -20 °C gelagert werden. Da die chemisch modifizierte Schicht der verwendeten DC-Platten eine fluoreszierende Substanz enthält, konnte die erfolgreiche

Auftrennung der UV-Licht absorbierenden AHL-Moleküle mit Hilfe einer UV-Handlampe ( $\lambda=254$  nm) überprüft werden.

#### **B.3.3.3.2 Überschichtung der DC-Platten**

Zur Visualisierung der Position der unterschiedlichen AHL-Moleküle auf der DC-Platte wurde diese mit einer dünnen Agarschicht, die mit Sensorbakterien beimpft worden war, überlagert.

Die DC-Platten wurden dazu in einen speziell angefertigten Plexiglasrahmen, der zuvor mit Kunststoffolie ausgelegt worden war, eingesetzt und mit Hilfe einer nivellierbaren Unterlage horizontal ausbalanciert. Alternativ konnte auch ein Rahmen aus Autoklavierband um die DC-Platten geklebt werden. Anschließend wurden 10 ml der Sensorkultur dem 42 °C warmen Softagar zugegeben und gemischt ohne dabei Luftblasen zu erzeugen. Es wurde dann gerade soviel von dem flüssigen Agar über die DC-Platten verteilt, daß ein ca. 3 bis 5 mm dicker Film die gesamte Plattenoberfläche bedeckte. Beim Überschichten war darauf zu achten, kein Kieselgel von der Plattenoberfläche abzulösen. Das Ausgießen des Agars erfolgte daher stets vom Rand der DC-Platte her aus möglichst geringer Höhe. Kleinere Luftblasen konnten durch kurzes Abflammen mit der Bunsenbrennerflamme entfernt werden. Nach ca. 10 min, sobald sich der Agar verfestigt hatte, wurden die DC-Platten aus dem Rahmen genommen und in einem luftdichten Gefäß, das mit befeuchtem Küchenpapier ausgelegt worden war, bei 30 °C inkubiert.

#### **B.3.3.4 Auswertung der überschichteten DC-Platten**

Die Lokalisierung der AHL-Moleküle auf den überschichteten DC-Platten erfolgte je nach verwendetem Sensorsystem auf unterschiedliche Weise:

##### **- *Chromobacterium violaceum* CV026**

##### `Forward Assay`

Nachdem die überlagerten DC-Platten für maximal 48 h bei 30 °C inkubiert wurden, konnten die aufgetrennten AHL-Moleküle anhand violetter Pigmentflecken identifiziert werden. Sobald die Indikatorsubstanz ausreichend ausgeprägt war, wurden die überschichteten DC-Platten im Abzug getrocknet und in Plastikfolie verschweißt.

#### `Reverse Assay`

Bei dieser Methode wird die Fähigkeit langkettiger AHL-Moleküle, die Pigmentierung des Sensorstamms zu inhibieren, ausgenutzt, um Moleküle mit einer Seitenkettenlänge zwischen C8 und C12 nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde dem Softagar OHHL in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M zugegeben, so daß die langkettigen AHL-Moleküle als helle Flecken auf violetterem Hintergrund detektiert werden konnten. Die überschichteten DC-Platten wurden für ca. 24 h inkubiert und die Auswertung erfolgte, sobald sich die Violettfärbung ausreichend ausgeprägt hat. Es war darauf zu achten, eine zu lange Inkubation zu vermeiden, da schwache Signale bei längerer Bebrütung allmählich an Intensität verlieren.

#### **- Sensorplasmide pSB403 und pSB1075**

Die *lux*-Plasmide zeigten nach ca. 12 h Inkubation bei 30 °C die intensivste Lichtemission. Bei längerer Kultivierung wurden die Signale zunehmend diffuser und somit schwerer unterscheidbar. Zur Dokumentation der biolumineszenten Flecken wurden die DC-Platten luftblasenfrei in Küchenfolie eingewickelt und ein Röntgenfilm (X-Ray-90, AGFA-Gevaert, München, D) für ca. 10 min aufgelegt. Die belichteten Röntgenfilme wurden dann gemäß der Herstellerangaben der verwendeten Chemikalien (Adefo-Chemie, Nürnberg, D) entwickelt und fixiert.

#### **- Sensorplasmid pJBA89**

DC-Platten, die mit dem GFP-Reporter überschichtet wurden, zeigten nach ca. 24 h Inkubation bei 30 °C eine optimale Konzentration an Markerprotein. Die Detektion erfolgte mit dem unter `B.6 Detektion von Fluoreszenzsignalen` beschriebenen Kamerasystem.

#### **- *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372)**

Bei Verwendung des *Agrobacterium*-Sensors wurden die überschichteten DC-Platten mindestens 16 h inkubiert. In der Regel führte eine längere Bebrütung bis zu 48 h zu einer leichten Signalverstärkung. Zur Detektion der AHL-Moleküle wurde dem Softagar X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) in einer Konzentration von 60  $\mu$ g/ml zugegeben, so daß die aufgetrennten AHL-Moleküle anhand der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Sensors als hellblaue Spots identifiziert werden konnten.

### B.3.3.5 Ermittlung der $R_f$ -Werte

Für eine vorläufige Identifizierung der detektierten AHL-Moleküle wurde der  $R_f$ -Wert (*retention factor*) der entsprechenden Signale auf der DC-Platte ermittelt. Der  $R_f$ -Wert ist definiert als das Verhältnis der Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  einer Substanz  $i$  zur Wanderungsgeschwindigkeit des Elutionsmittels  $v_M$  bzw. das ihrer Laufstrecke  $z_i$  zur Laufstrecke des Elutionsmittels (= Abstand Start - Laufmittelfront) (nach Römpp, 1990). Da selbst unter konstanten Bedingungen bei der konventionellen Dünnschicht-Chromatographie die  $R_f$ -Werte leicht schwanken können, wurden diese unkontrollierbaren Einflüsse durch das Mitlaufenlassen von synthetischen Referenz-AHL-Molekülen mit bekanntem  $R_f$ -Wert ermittelt.

### B.3.3.6 Nachweis von AHL-Molekülen mittels Mikrotiterplatten-Assay

Zum schnellen Nachweis von AHL-Molekülen in Überständen von stationären Bakterienkulturen wurden die *E. coli lux*-Sensoren in LB-Medium bei 30 °C mit den entsprechenden Antibiotika bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,4 kultiviert und je 100  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension in jede Kavität einer Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde, DK) vorgelegt. In die erste Kavität einer Reihe wurden dann 100  $\mu$ l der zu untersuchenden Flüssigkeit pipettiert, gründlich gemischt und 100  $\mu$ l davon in die jeweils nächste Kavität weitergegeben und auf diese Weise die Probe zunehmend verdünnt. Zur Detektion der induzierten Biolumineszenz wurde die unter `B.5 Detektion von Biolumineszenzsignalen` beschriebene Photonenkamera verwendet. Durch den Vergleich der Lichtintensitäten von Proben mit synthetischen AHL-Molekülen bekannter Konzentration war zusätzlich eine quantitative Einschätzung möglich.

## B.4 Extraktion von Bakterien aus Wurzelmaterial

Die präparierten Wurzeln wurden in PBS-Puffer gewaschen, gewogen und in kleine Stücke geschnitten. Die Wurzelteile wurden dann in 0,1 % Na-Cholatpuffer aufgeschlämmt, wobei 50 ml pro g Wurzelfrischgewicht verwendet wurden. Die Wurzelsuspension wurde anschließend in Stomacher-Tütchen gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit zweimal für je 2 min behandelt. Nach dieser Prozedur wurde die Suspension in kleine Erlenmeyerkolben umgefüllt und pro 10 ml Volumen des Wurzelextrakts 0,25 g Polyethylenglycol (PEG) und

0,2 g Chelating Resin (Chelex 100) zugegeben und für eine Stunde bei 4 °C gerührt. Der Bakterienextrakt wurde anschließend zuerst durch Gaze (40 µm) und dann mit Einmalfiltern (5 µm) gefiltert. Zur Verbesserung der Extraktionseffizienz wurden die von dem Gazegewebe zurückgehaltenen Wurzelteile erneut in Na-Cholat-Lösung resuspendiert, mit dem Stomacher behandelt, mit PEG versetzt (eine erneute Zugabe von Chelex 100 ist nicht nötig!), bei 4 °C gerührt und schließlich wieder wie oben beschrieben gefiltert. Die geschilderten Versuchsschritte wurden dreimal wiederholt und die jeweils erhaltenen Bakteriensuspensionen auf Eis zwischengelagert und vereinigt.

### **B.5 Detektion von Biolumineszenzsignalen**

Zur Biolumineszenzdetektion wurde eine ultrasensitive Photonenkamera verwendet. Dieses zweiteilige Detektionssystem besteht aus einem Photomultiplier und der CCD-Kamera C2400-40 (Hamamatsu, Herrsching, D). Im Photomultiplier erfolgt die Erfassung einzelner Photonen an einer Photokathode, deren Signale nach Vervielfältigung über eine Anode zur CCD-Kamera weitergeleitet werden. Über diese Kamera ist es möglich, mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ARGUS20/HPD-CP (Version 5.1) Aufnahmen in digitalisierter Form zu erhalten. Das Kamerasystem wurde auf eine lichtdichte `Darkbox` (Unit1, DK) montiert, um störendes Licht aus der Umgebung auszuschließen.

### **B.6 Detektion von Fluoreszenzsignalen**

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem unter `B.5 Detektion von Biolumineszenz` beschriebenen CCD-Kamerasystem C2400-40, wobei eine Halogenlampe (Intralux 5000-1, Volpi AG, Schlieren, CH) mit dem Blau-Anregungsfilter HQ 480/40 (F44-001 für RS-GFP, AF Analystechnik, Tübingen, D) als Lichtquelle diente. Die Kamera wurde zur Detektion des GFP-Signals mit einem Pentax CCTV Objektiv und dem Sperrfilter HQ 535/50 (F44-001 für RS-GFP, AF Analystechnik, Tübingen, D) ausgestattet.

## B.7 Epifluoreszenzmikroskopie

Zur mikroskopischen Detektion von fluoreszierenden Einzelzellen wurden 5  $\mu$ l Bakteriensuspension auf einen Objektträger aufgetropft und das Phasenkontrast- bzw. Epifluoreszenzbild mit einem Epifluoreszenzmikroskop Axioplan (Zeiss, Oberkochen, D) untersucht. Es wurden Plan-Neofluar Objektive mit 10-, 40-, 63- und 100-facher Vergrößerung und folgende Filterkombinationen mit den entsprechenden Kenndaten verwendet:

Filtersatz	Anregungsfilter [nm]	Strahlenteiler [nm]	Sperrfilter [nm]	Verwendung
01 <sup>1</sup>	BP 365/12	395	LP 397	DAPI
09 <sup>1</sup>	BP 470/40	510	LP 520	GFP
15 <sup>1</sup>	BP 546/12	580	LP 590	CY3
F41-007 <sup>2</sup>	HQ 545/30	Q 565 LP	HQ 610/75	CY3
F41-012 <sup>2</sup>	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 510 LP	RS-GFP
F41-020 <sup>2</sup>	HQ 480/20	Q 495 LP	HQ 510/20	RS-GFP
F41-014 <sup>2</sup>	HQ 450/50	Q 480 LP	HQ 510/50	WT-GFP

<sup>1</sup> Zeiss, Oberkochen, D

<sup>2</sup> AHF-Analysentechnik, Tübingen, D

## B.8 Synthetische AHL-Moleküle

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten synthetischen AHL-Moleküle wurden überwiegend von der Arbeitsgruppe Williams (University of Nottingham, UK) nach der von Chhabra *et al.* (1993) beschriebenen Methode hergestellt. Außerdem wurden die AHL-Moleküle mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und ihre Struktur durch Massenspektroskopie und NMR-Spektroskopie bestätigt. Einige der Pheromonanaloge können seit kurzem über die Firma Fluka Chemie AG (Buchs, CH) bezogen werden: *N*-Butyryl-DL-homoserinlacton, *N*-Hexanoyl-DL-homoserinlacton, *N*-Heptanoyl-DL-homoserinlacton, *N*-Octanoyl-DL-homoserinlacton, *N*-Tetradecanoyl-DL-homoserinlacton und *N*-Butyryl-DL-homocysteinthiolacton.

## B.9 Molekulargenetische Methoden

### B.9.1 Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNS (Wisotzkey *et al.*, 1990), modifiziert

#### Verwendete Lösungen

Alle wässrigen Lösungen wurden mit Wasser aus einer Milli-Q-Plus-Anlage (Millipore, Bradford, Mass., USA) hergestellt. Enzymlösungen wurden stets frisch zubereitet. Weitere Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, vor ihrer Verwendung autoklaviert.

<b>Saline-EDTA-Puffer</b>	0,15 M NaCl 0,01 M EDTA pH 8,0
<b>Natriumacetat-Lösung</b>	5 M Natriumacetat
<b>SDS-Lösung</b>	25% (w/v) Natriumdodecylsulfat nicht autoklaviert
<b>Chissom</b>	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v)
<b>Lysozym-Lösung</b>	10 mg/ml Hühnerei-Lysozym in 10 mM Tris/HCl pH 8,5
<b>Proteinase K-Lösung</b>	20 mg/ml Proteinase K
<b>RNase A-Lösung</b>	100 mg/ml
<b>Tris/HCL-Lösung</b>	10 mM Tris/HCl pH 8,5

#### Zellernte und Lyse der Zellen

2 bis 10 ml ÜN-Kultur wurden zur Zellernte für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert und das sedimentierte Pellet in 500 µl Saline-EDTA-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit 20 µl Lysozym-Lsg. und 2 µl Proteinase K-Lsg. behandelt, bei 37 °C für 45 min inkubiert und anschließend durch die Zugabe von 40 µl SDS-Lsg. lysiert. Eine deutliche Lyse der Bakteriensuspension war nach mindestens 10 min Inkubation bei 60 °C feststellbar.

#### Reinigung der DNS

Zur Entfernung störender Verunreinigungen wurden dem Ansatz 180 µl 5 M Natriumacetat-Lsg. und 740 µl Chissom zugegeben und kräftig gemischt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 12000 x g wurde die obere, wässrige Phase in ein neues ERG überführt und mit dem

doppelten Volumen an eiskaltem Ethanol (absolut) versetzt. Zum Fällen der DNS wurde der Ansatz für mindestens 15 min bei -20 °C gekühlt. Die ausgefallene DNS konnte dann durch Zentrifugation für 15 min bei 12000 x g abgetrennt werden. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen. Die sedimentierte DNS wurde bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 100 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) gelöst.

Um RNS aus dem Präparat zu entfernen, wurde 1 µl RNase zugegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 100 µl Chloroform/Phenol ausgeschüttelt und 15 min bei 12000 x g bis zur deutlichen Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase konnte nun abgehoben und mit 1/9 Volumen Natriumacetat-Lsg. und 2,5 Volumen Ethanol (absolut) versetzt werden.

Die DNS wurde erneut für mindestens 10 min bei -20 °C gefällt, abzentrifugiert und mit 500 µl kaltem Ethanol (70%) gewaschen. Die getrockneten DNS-Pellets konnten abschließend in 100 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) aufgenommen werden.

## **B.9.2 Analyse von Nukleinsäuren**

### **B.9.2.1 Qualitative Analyse von Nukleinsäuren durch horizontale Agarosegelelektrophorese**

Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNS-Fragmente im elektrischen Feld verhält sich in einer Agarose-Gelmatrix umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts. Aufgrund dieser Eigenschaft ist es möglich, die Größe von linearisierten DNS-Fragmenten in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen anhand der  $R_f$ -Werte von Fragmenten bekannter Größe zu bestimmen.

#### Verwendete Lösungen

<b>50x TAE-Puffer</b>	2 M Tris-HCl 1 M Eisessig 0.1 M EDTA ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> pH 8,8
-----------------------	--

<b>Auftragspuffer</b>	25% (w/v) Ficoll 0.5% (w/v) Bromphenolblau
-----------------------	---

0.5% (w/v) Xylencyanol  
50 mM EDTA

#### Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Durchführung einer Elektrophorese für analytische Zwecke erfolgte in einer Gelelektrophoreseapparatur Typ H3 (Gibco BRL, Eggenstein, D). Eine durch Aufkochen gelöste 0.8 bis 2.0 % (w/v) Agaroselösung (Gibco BRL, Eggenstein, D) in 1x TAE-Puffer wurde in einen mit Kunststoffklebeband abgedichteten Gelträger mit eingesetzten Probekämmen gegossen. Nach Erstarren der Agaroselösung wurde das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoreseapparatur gelegt und vollständig mit Puffer bedeckt. Anschließend wurden die Probekämme vorsichtig gezogen. Die zu analysierende DNS-Lösung wurde mit 1/9 Volumen Auftragspuffer versetzt, in die Geltaschen gefüllt und bei 80 bis 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

Anhand der Farbmarker im Auftragspuffer konnte der Gellauf mitverfolgt und bei Bedarf beendet werden. In einem 0.8 % Agarosegel verhält sich Bromphenolblau wie ein DNS-Fragment von 300 bp Größe, Xylencyanol hingegen wie ein 4000 bp großes Fragment.

#### Gelfärbung und Dokumentation

Aufgrund der Eigenschaft von Ethidiumbromid, in Nukleinsäuremoleküle zu interkalieren, ist es mit Hilfe dieses Farbstoffs möglich, DNS-Fragmente nach Auftrennung in Agarosegelen sichtbar zu machen. Zur Anfärbung wurden Agarosegele 10 bis 20 min in ein Ethidiumbromidbad (Endkonzentration 1 mg/l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) gelegt und anschließend 5 min in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> entfärbt. Die Detektion der DNS-Banden erfolgte unter UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) mit Hilfe eines Transilluminators (Bachofer, Reutlingen, D) und die Dokumentation mit einem Video-Dokumentationssystem (CS-1, Cybertech, Berlin, D).

#### **B.9.2.2 Quantitative Analyse von Nukleinsäuren mittels Spektralphotometrie**

Da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm aufweisen, ist eine DNS-Konzentrationsbestimmung in wässrigen Lösungen mittels Spektralphotometrie möglich.

Dazu wurde die zu vermessende DNS-Probe in Quarzküvetten ( $d = 1$  cm, Hellma, Mühlheim, D) mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm, sowie für eine Reinheitskontrolle bei  $\lambda = 230$  nm und  $\lambda = 280$  nm, gegen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> als Referenz

photometrisch bestimmt (Pharmacia LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer, Freiburg, D). 1 OD<sub>260nm</sub> doppelsträngige DNS entspricht nach Cryer *et al.* (1975) einer Nukleinsäurekonzentration von annähernd 50 µg/ml. Die Bestimmung von Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol erfolgte durch die Bildung der Quotienten OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> bzw. OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>230nm</sub> und der Vergleich mit Referenzwerten bei Marmur (1961).

### **B.9.3 *In vitro* Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein enzymatisches *in vitro*-Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung definierter DNS-Regionen. Die Spezifität dieser Reaktion beruht auf der Verwendung von zwei kurzen, einzelsträngigen Oligonukleotidprimern, die spezifisch an komplementäre Sequenzabschnitte der DNS-Matrize (*template*) binden (Annealing). Eine thermostabile DNS-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNS-Matrize (Elongation). Am Ende dieser Reaktion liegen alle DNS-Moleküle als Doppelstränge vor. Für eine Wiederholung der Synthese muß deshalb die doppelsträngige DNS durch Hitze aufgeschmolzen werden (Denaturierung), um eine erneute Primeranlagerung zu ermöglichen.

Eine zyklische Wiederholung dieser drei Einzelschritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) bewirkt eine exponentielle Vermehrung des von den Primerbindungsstellen begrenzten DNS-Abschnitts. Auf diese Weise lassen sich spezifische PCR-Fragmente generieren, die für weitere molekulargenetische Arbeiten verwendet werden können.

Bei dieser Arbeit wurde die *TaKaRa Ex Taq* Polymerase der Firma TaKaRa (Otsu, JP) verwendet. Diese Polymerase aus *Thermus aquaticus* wurde speziell für die Amplifikation von besonders großen PCR-Produkten mit einer Länge von mehr als 4 kb entwickelt und weist eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität auf.

PCR-Reaktionsansatz

Reaktionspuffer (10x)	5 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	4 µl
Primer (50 pmol/µl)	je 0,5 µl
Template-DNS (1-100 ng)	x µl
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	50 µl
DNS-Polymerase (1 U)	0.2 µl

PCR-Standardprogramm

Startdenaturierung	3 min	94 °C
35 Zyklen: Denaturierung	30 sec	94 °C
Annealing	20 sec	x °C
Elongation	45 sec + 1 sec/Zyklus	72 °C
Finale Elongation	4 min	72 °C

**B.9.4 PCR-Primer**

Die verwendeten PCR-Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg, D) synthetisiert, HPSF (*High purified saltfree*)-gereinigt und in lyophilisierter Form geliefert. Nach Lösung der Primer-DNS in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung nach folgender Formel:

$$\frac{V_m \times OD_{260nm}}{V_p \times \epsilon \times d} = C \text{ [}\mu\text{mol / ml]}$$

V<sub>m</sub> = Meßvolumen (1000 µl)

V<sub>p</sub> = Probenvolumen (2 µl)

d = Schichtdicke (1 cm)

e = Anzahl A x 15.0 + Anzahl C x 7.4 + Anzahl G x 13.5 + Anzahl T x 8.8

Die Annealing-Temperatur der Primer ist abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotidprimer. Mit der `2+4`-Regel nach Suggs *et al.* (1981) konnte diese näherungsweise bestimmt werden:

$$T_M \text{ [}^\circ\text{C]} = \{2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)\}$$

Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikon
616V	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	16S-rDNS
630R	CAKAAAGGAGGTGATCC	16S-rDNS

### **B.9.5 LI-COR -DNS-Sequenzanalyse nach dem `Cycle Sequencing`-Protokoll**

Die nicht-radioaktive DNS-Sequenzanalyse nach dem `Cycle Sequencing-Protokoll` (Murray *et al.*, 1989) ist eine Kombination aus enzymatischer Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) und dem Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion mit einer thermostabilen DNS-Polymerase. Beim `Cycle Sequencing` kommt es durch Verwendung eines einzigen Primers zur linearen Amplifikation des gewünschten Produkts. Das Sequenzierprodukt besteht aus unterschiedlich langen Kopien eines DNS-Stranges, wobei die Länge durch den Einbau von zum Syntheseabbruch führenden Didesoxynukleotiden bestimmt ist. Im Verlauf der Amplifikationszyklen entstehen eine Vielzahl von DNS-Fragmenten, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Längen durch eine hochauflösende, denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese bis auf eine Base genau aufgetrennt werden können.

In vorliegender Arbeit wurde zur Plasmid-DNS-Sequenzierung der vollautomatische Sequenzanalysator LI-COR 4200 (LI-COR Inc., Lincoln, USA) verwendet. Die Markierung der Sequenzierprodukte erfolgte durch die Verwendung von Oligonukleotidprimern, welche an ihren 5'-Enden über einen Succinimidester mit einem Infrarotfarbstoff IRD800 (MWG-Biotech, Ebersberg, D) markiert waren und mit Hilfe eines Lasers detektiert werden konnten.

#### PCR-Standardreaktionsansatz

Die PCR-Reaktion wurde unter Verwendung von V-Boden Mikrotiterplatten (Biozym, Oldendorf, D) in einem PTC-100 Thermocycler (MJ Research, Watertown, USA) mit Mikrotiterplatteneinsatz und heizbarem Deckel durchgeführt. Alle benötigten PCR-Reagenzien mit Ausnahme der infrarotmarkierten Oligonukleotidprimer und der Template-DNS waren im `Thermo Sequenase cycle sequencing kit` (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) enthalten. Die Mikrotiterplatte wurde vor Reaktionsbeginn mit einer hitzestabilen Folie (Microseal `A` Film, MJ Research, Watertown, USA) versiegelt. Nach Ablauf des PCR-Programms wurden die Reaktionen sofort auf Eis gestellt und durch Zugabe von 2,5 µl Auftragspuffer (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) abgestoppt.

<u>Mastermix</u>	
QIAPrep-Plasmid-DNS	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	17 µl
Primer (1,25 pmol)	5 µl

Reaktionsansatz

Nukleotidmix (Amersham)	2 µl
Mastermix	6 µl

PCR-Standardprogramm

Startdenaturierung	2min	94 °C
25 Zyklen:	Denaturierung	30 sec 94 °C
	Annealing	30 sec 60 °C
	Elongation	1min 72 °C
		+ 0.5 sec/Zyklus
Finale Elongation	2min	72 °C

Sequenzierprimer

Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikon
699RIII	GGGTTGACTGCTCGTT	16S-rDNS
609VIII	AACAGGATTAGATACTCCC	16S-rDNS

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines hochauflösenden Polyacrylamidgels (4.3%) wurden die Glasplatten (66 cm Länge) gründlich mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, SDS (10%) und Ethanol<sub>abs.</sub> gereinigt. Um die Haftfähigkeit des Gels im Kammbereich zu erhöhen, wurde der obere Rand beider Glasplatten silanisiert. Dazu wurden 165 µl Silanlösung (50 µl Silan in 10 ml Ethanol<sub>abs.</sub>) und 5 µl 10 % Essigsäure auf die Platten aufgetragen und mit Zellstoff verrieben. Nach 15 min Einwirkzeit wurden die Platten mit Ethanol<sub>abs.</sub> abgerieben, mit einem Schallplattenreiniger entflust und in die mitgelieferten Plattenhalterungen eingespannt.

**10x TBE-Puffer**

Tris-HCl	162 g
Borsäure	27,5 g
EDTA	9,3 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
pH	8,3-8,7
(Lagerung bei 4 °C)	

**Gellösung**

Harnstoff	21 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	32 ml
Long Ranger Gel Solution	4,3 ml (FMC Bioproducts, Rockland, USA)
DMSO	500 µl

10x TBE-Puffer	5 ml
APS (10%)	350 µl
TEMED	50 µl

Die Gellösung wurde nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (10 % APS) und TEMED zügig in eine saubere 100 ml Kunststoffspritze aufgezogen und durch einen Sterilfilter (0.22 µm Porengröße, Millipore, Eschborn, D) zwischen die Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen des Vorkamms wurde das Gel zum Auspolymerisieren mindestens 1 Stunde horizontal gelagert. Das auspolymerisierte Gel wurde in das LI-COR-Sequenziergerät eingesetzt, mit 0.8x TBE-Puffer beladen und der Vorlauf gestartet, um das Gel auf die vorgeschriebene Lauftemperatur von 45 °C aufzuwärmen. Mit den Optionen Autogain und Autofocus des Softwarepakets BaseImageIR Data collection V4.0 (LI-COR Inc., Lincoln, USA) konnten Unregelmäßigkeiten im Gel abgeglichen und die richtige Focusebene eingestellt werden. Nach Beendigung des Vorlaufs wurde die Geltasche gründlich gespült, um Harnstoffablagerungen zu entfernen, und anschließend ein 48-Zahn-Haifischkamm eingesetzt. Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die Reaktionsansätze für 5 min bei 94 °C denaturiert und je 1,5 µl Probe in die Geltaschen gefüllt. Der Gellauf erfolgte für 12 Stunden nach Angaben des Herstellers bei 2000 V, 20 mA und 40 W.

### **B.9.6 Detektion und Analyse von DNS-Sequenzen**

Nach Beendigung des Gellaufs konnten die DNS-Sequenzen mit der Bildverarbeitungssoftware BaseImageIR Image Analysis V4.0 (LI-COR Inc., Lincoln, USA) gelesen und als Text-Dateien gespeichert werden. Da das automatische Leseprogramm jedoch z.B. bei Auftreten von Bandenkompensationen fehlerhafte Ergebnisse liefert, mußten die erhaltenen DNS-Sequenzen manuell kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden. Die Suche nach Homologien mit bekannten DNS-Abschnitten ermöglichten die frei zugänglichen Datenbanken im Internet. In vorliegender Arbeit wurde überwiegend die vom National Center for Biotechnology Information angebotene Suchmaschine `BLAST` verwendet (Altschul *et al.*, 1997).

## C. Ergebnisse

### C.1 Bestimmung der Spezifitäten und Sensitivitäten der verwendeten AHL-Sensorsysteme

Zum Nachweis von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen (AHL) stehen momentan neben verschiedenen chemischen Nachweisverfahren (Dunny und Winans, 1999) zahlreiche bakterielle Sensorsysteme zur Verfügung (Eberl, 1999). Diese Biosensoren reagieren auf die Anwesenheit von AHL-Molekülen mit der Produktion einer leicht nachweisbaren Indikatorsubstanz. Die dazu nötigen Reaktionen können sowohl durch synthetisch hergestellte Strukturanaloga als auch durch bakteriell produzierte AHL-Moleküle ausgelöst werden. Die Empfindlichkeit dieser Sensorstämme gegenüber extern zugegebenen AHL-Molekülen basiert darauf, daß sie einerseits kein intaktes AHL-Synthase Gen (*luxI*-Homolog) aufweisen, andererseits jedoch einen AHL-bindenden Transkriptionsaktivator (LuxR-Homolog) konstitutiv exprimieren, so daß bei einer ausreichenden Konzentration an AHL-Molekülen die Aktivierung bestimmter Zielpromotoren erfolgt. Die Expression der Reportergene kann somit unmittelbar an die Konzentration von AHL-Molekülen gekoppelt werden. Aus der Tatsache, daß bei Gram-negativen Bakterien AHL-Moleküle vorkommen, die Unterschiede in der chemischen Struktur der *N*-Acyl-Seitenkette aufweisen, ergeben sich erhebliche Auswirkungen auf die Sensitivität der einzelnen Sensorsysteme gegenüber den verschiedenen AHL-Molekülen. Abhängig von den bei der Konstruktion der Sensorsysteme verwendeten `quorum sensing` (QS)-Komponenten ergeben sich für jeden Sensor charakteristische Aktivierungsprofile für die verschiedenen AHL-Moleküle.

Eine einfache Methode zum sensitiven Nachweis der verschiedenen AHL-Derivate wurde von Shaw *et al.* (1997) entwickelt. Dabei werden die AHL-Moleküle zunächst abhängig von ihrer chemischen Struktur mittels Dünnschicht-Chromatographie (DC) aufgetrennt und anschließend durch Überlagerung der DC-Platte mit einer Agarschicht, die mit AHL-Sensorbakterien inokuliert wurde, nachgewiesen. Um die Nachweisgrenzen der einzelnen AHL-Sensorsysteme abschätzen bzw. vergleichen zu können, wurden synthetisch hergestellte AHL-Moleküle mittels DC-Analyse untersucht. Dabei wurden die aufgetragenen Mengen so bemessen, daß möglichst Signale mit vergleichbarer Intensität erhalten werden sollten. Ausgehend von der Größe der Spots der jeweiligen Signale konnte die minimal nachweisbare Menge jeder AHL-Molekülvariante für die einzelnen AHL-Biosensoren abgeschätzt werden.

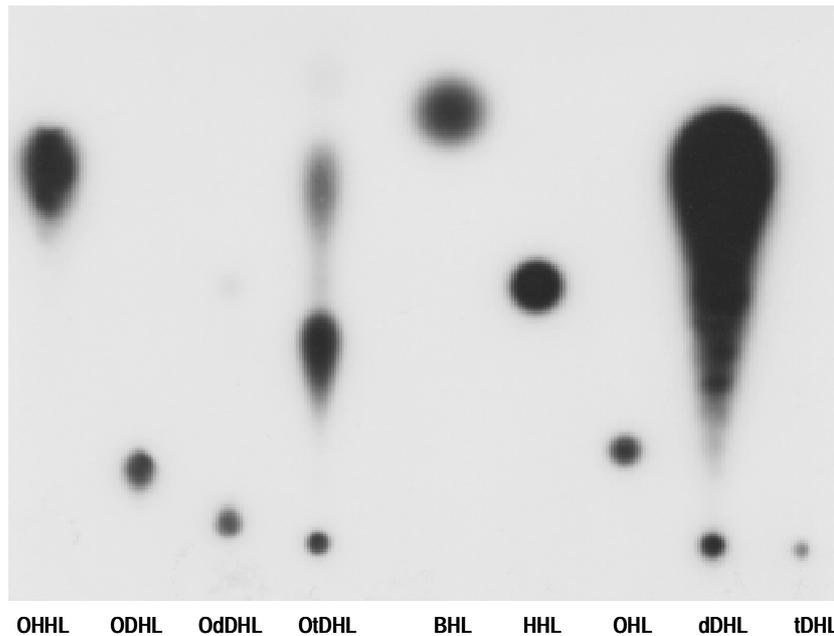
### C.1.1 Die AHL-Sensorplasmide pSB403 und pSB1075

Zur Abschätzung der Sensitivität der *lux*-Sensorplasmide pSB403 und pSB1075 (Winson *et al.*, 1998) wurden die in Tabelle C.1 zusammengefassten AHL-Mengen verwendet und die biolumineszenten Spots der überlagerten DC-Platten mit einem lichtempfindlichen Röntgenfilm detektiert (Abbildung C.1). Da das Sensorplasmid pSB403 auf der *lux* Kontrollregion von *P. fischeri* basiert, wies es erwartungsgemäß die höchste Sensitivität für OHHL und die beiden AHL-Moleküle mit der ähnlichsten Struktur, HHL und OHL, auf. Vergleicht man die Mengen der aufgetragenen AHL-Moleküle, so zeigt der Sensor pSB403 bei AHL-Molekülen mit gleicher Länge der *N*-Acyl-Seitenkette stets eine höhere Sensitivität gegenüber Molekülen mit 3-Oxo Substituenten. Zudem belegen die Ergebnisse, daß mit zunehmender Seitenkettenlänge (C8 bis C14) die Empfindlichkeit des Sensorsystems abnimmt. BHL konnte mit dem Sensor pSB403 dagegen vergleichsweise schlecht detektiert werden. LuxR scheint offensichtlich nur eine sehr geringe Affinität zu diesem kurzkettigen AHL-Molekül zu besitzen.

In den Spuren, in denen OtDHL und dDHL aufgetragen wurde, sind neben den Signalen mit den für diese AHL-Molekültypen charakteristischen  $R_f$ -Werten noch weitere Signale mit erheblich höheren  $R_f$ -Werten ( $> 0,25$ ) zu erkennen (Abbildung C.1). Dabei handelt es sich um Nebenprodukte, die bei der synthetischen Herstellung der AHL-Moleküle entstanden sind.

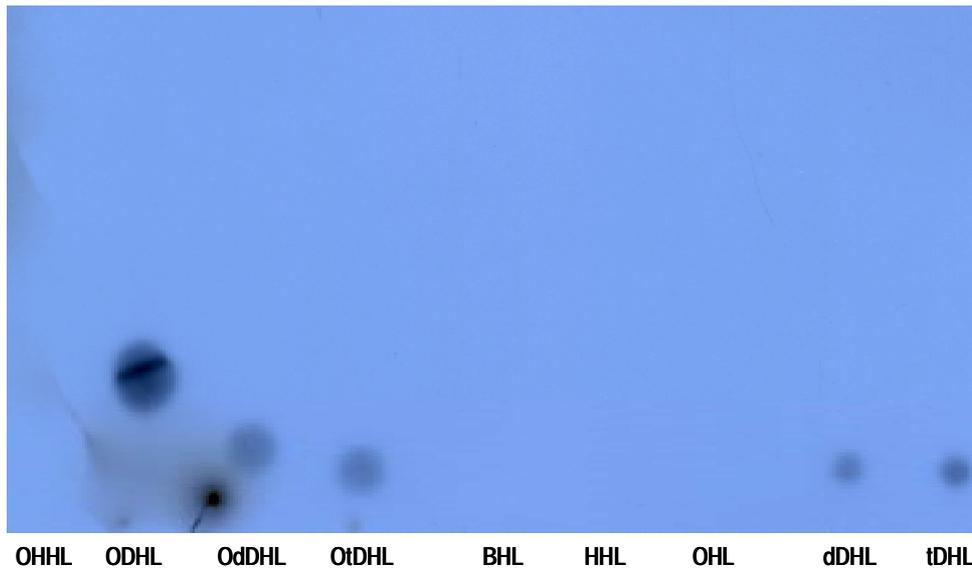
**Tabelle C.1:** Eingesetzte Mengen der synthetischen AHL-Moleküle in Kombination mit den Sensoren *E. coli* MT102 (pSB403) und *E. coli* MT102 (pSB1075).

AHL-Molekül	Formel	Eingesetzte Menge [Mol]	$R_f$ -Wert (+/- 10%)
OHHL	$C_{10}H_{15}NO_4$	$4,0 \times 10^{-13}$	0,68
ODHL	$C_{14}H_{23}NO_4$	$2,6 \times 10^{-8}$	0,18
OdDHL	$C_{16}H_{27}NO_4$	$2,7 \times 10^{-8}$	0,07
OtDHL	$C_{18}H_{31}NO_4$	$1,3 \times 10^{-7}$	0,02
BHL	$C_8H_{13}NO_3$	$1,2 \times 10^{-7}$	0,77
HHL	$C_{10}H_{17}NO_3$	$3,5 \times 10^{-11}$	0,47
OHL	$C_{12}H_{21}NO_3$	$4,4 \times 10^{-10}$	0,23
dDHL	$C_{16}H_{29}NO_3$	$1,1 \times 10^{-7}$	0,02
tDHL	$C_{18}H_{33}NO_3$	$8,0 \times 10^{-7}$	0,01



**Abbildung C.1:** Detektion ausgewählter synthetischer AHL-Moleküle nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Visualisierung mit dem Sensor *E. coli* MT102 (pSB403). Von den verschiedenen AHL-Molekülen wurden die in Tabelle C.1 angegebenen Mengen, welche im Routineeinsatz nachgewiesen werden konnten, eingesetzt.

Das Sensorplasmid pSB1075, bei dem die Expression der Reportergene durch das *P. aeruginosa las*-QS-System kontrolliert wird, zeigte die höchste Empfindlichkeit für OdDHL, welches auch das vom *las*-System eingesetzte AHL-Molekül darstellt. Wie die Spots in Abbildung C.2 zeigen, ist der Sensor pSB1075 jedoch nicht sensitiver für dieses langkettige AHL-Molekül als das Sensorplasmid pSB403. Die Profile bestätigen jedoch eine ausgesprochen hohe Selektivität, so daß ausschließlich AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von C10 bis C14 mit diesem Sensor nachgewiesen werden konnten. Kürzerkettige AHL-Moleküle konnten dagegen in den Mengen, die von pSB403 noch detektiert wurden, nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung C.2:** Detektion ausgewählter synthetischer AHL-Moleküle nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Visualisierung mit dem Sensor *E. coli* MT102 (pSB1075). Von den verschiedenen AHL-Molekülen wurden jeweils die gleichen Mengen, die auch zur Charakterisierung des Sensorplasmids pSB403 (Abbildung C.1) verwendet wurden, eingesetzt, um die Nachweisempfindlichkeit beider Systeme miteinander vergleichen zu können. Die eingesetzten AHL-Molekülmengen sind in Tabelle C.1 angegeben.

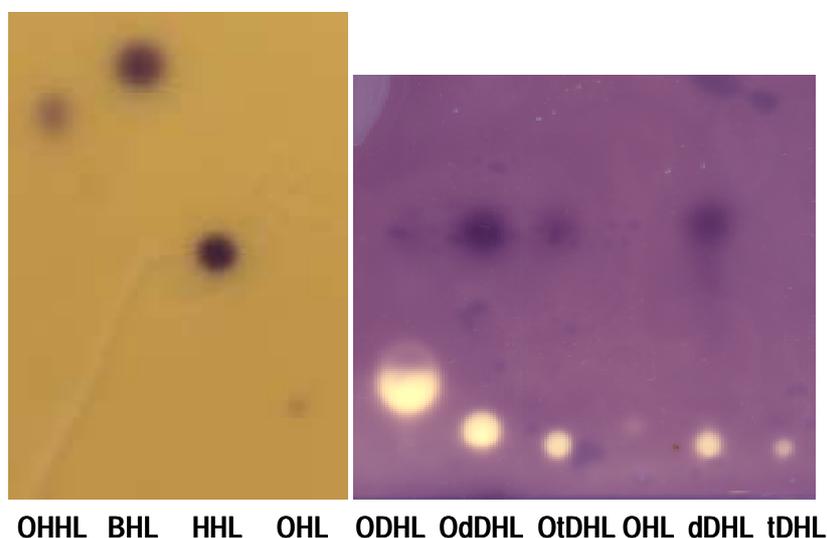
### C.1.2 Der AHL-Sensor *Chromobacterium violaceum* CV026

Bei diesem Sensor handelt es sich um eine spezielle Mutante, bei der die AHL-Synthase, die beim Wildtyp die Herstellung von HHL katalysiert und damit für die Produktion des violetten Pigments Violacein verantwortlich ist, ausgeschaltet wurde (McClellan *et al.*, 1997). Dieses System weist folglich auch für dieses AHL-Molekül die höchste Sensitivität auf (siehe Tabelle C.2). Langkettige AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von mindestens 8 Kohlenstoffatomen können in einem sogenannten `Reverse Assay`, einer speziellen Modifikation dieser Methode nachgewiesen werden. Dabei erfolgt die Detektion der verschiedenen AHL-Moleküle anhand der hellen Flecken in der violetten Agarschicht, die durch die Inhibierung der Violaceinsynthese in *C. violaceum* CV026 bei gleichzeitiger Anwesenheit von 1  $\mu$ M OHHL verursacht wird (Abbildung C.3). Das AHL-Molekül OHL mit einer C8-Seitenkette wurde sowohl im `Forward-`, als auch im `Reverse Assay` in den gleichen Mengen auf die DC-Platten aufgetragen, um die Sensitivitäten beider Methoden für dieses Molekül unmittelbar miteinander vergleichen zu können. Wie ein Vergleich der DC-Analysen zeigt, konnte die eingesetzte OHL Menge ausschließlich im `Forward Assay`

nachgewiesen werden. Tabelle C.2 faßt die auf die DC-Platte aufgetragenen AHL Mengen zusammen.

**Tabelle C.2:** Detektierbare Mengen ausgewählter synthetischer AHL-Moleküle unter Verwendung des Sensors *C. violaceum* CV026 im `Forward` (<sup>1</sup>)- und `Reverse Assay` (<sup>2</sup>)

AHL-Molekül	Formel	Eingesetzte Menge [Mol]	R <sub>f</sub> -Wert (+/- 10%)
OHHL <sup>1</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	1,4 x 10 <sup>-10</sup>	0,68
ODHL <sup>2</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	4,0 x 10 <sup>-8</sup>	0,18
OdDHL <sup>2</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	4,0 x 10 <sup>-8</sup>	0,07
OtDHL <sup>2</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	1,3 x 10 <sup>-7</sup>	0,02
BHL <sup>1</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	1,8 x 10 <sup>-9</sup>	0,77
HHL <sup>1</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	1,0 x 10 <sup>-11</sup>	0,47
OHL <sup>1,2</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	4,4 x 10 <sup>-10</sup>	0,23
dDHL <sup>2</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	1,1 x 10 <sup>-7</sup>	0,02
tDHL <sup>2</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub>	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	0,01



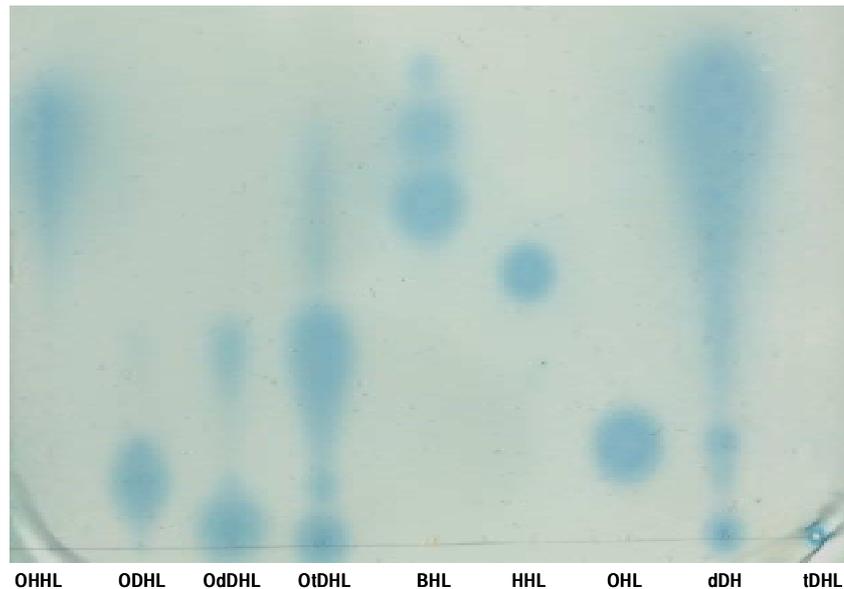
**Abbildung C.3:** Detektion ausgewählter synthetischer AHL Moleküle nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung und Visualisierung mit dem Sensor *C. violaceum* CV026 im `Forward` (links) und `Reverse Assay` (rechts). Von den verschiedenen AHL-Molekülen wurden die in Tabelle C.2 angegebenen Mengen, welche im Routineeinsatz nachgewiesen werden konnten, eingesetzt. Zur Durchführung des `Reverse Assay` wurde dem Weichagar OHHL in einer Endkonzentration von 1 µM zugegeben.

### C.1.3 Der AHL-Sensor *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372)

Dieser Sensor basiert auf einem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm, der neben dem induzierend wirkenden OOHL-Pheromon noch weitere z.T. auch antagonistisch wirkende AHL-Moleküle mit unterschiedlichen chemischen Strukturen produziert. Durch die Überexpression von *traR* und der Kopplung des  $\beta$ -Galaktosidase Gens mit dem *traI*-Promotor wurde ein Sensor konstruiert, der die höchste Sensitivität für OOHL aufweist, darüberhinaus aber auch weitere AHL-Moleküle sehr sensitiv detektiert (Zhu *et al.*, 1998) (siehe Tabelle C.3). Abbildung C.4 zeigt, daß auch bei dieser Analyse in den synthetisch hergestellten AHL-Lösungen von OdDHL, OtDHL, BHL und dDHL Signale detektiert wurden, die von Nebenprodukten, die bei der Herstellung der AHL-Moleküle entstehen können, stammen.

**Tabelle C.3:** Detektierbare Mengen ausgewählter synthetischer AHL-Moleküle mit dem Sensor *A. tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372).

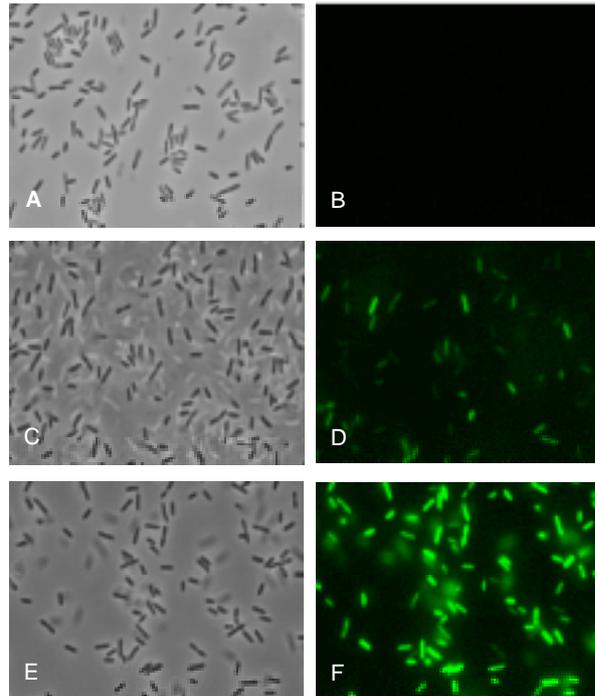
AHL-Molekül	Formel	Eingesetzte Menge [Mol]	R <sub>f</sub> -Wert (+/- 10%)
OHHL	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	4,0 x 10 <sup>-13</sup>	0,68
ODHL	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	5,6 x 10 <sup>-11</sup>	0,18
OdDHL	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	1,7 x 10 <sup>-9</sup>	0,07
OtDHL	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	1,8 x 10 <sup>-8</sup>	0,02
BHL	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	2,9 x 10 <sup>-7</sup>	0,77
HHL	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	1,5 x 10 <sup>-9</sup>	0,47
OHL	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	2,6 x 10 <sup>-11</sup>	0,23
dDHL	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	7,1 x 10 <sup>-8</sup>	0,02
tDHL	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub>	1,6 x 10 <sup>-7</sup>	0,01



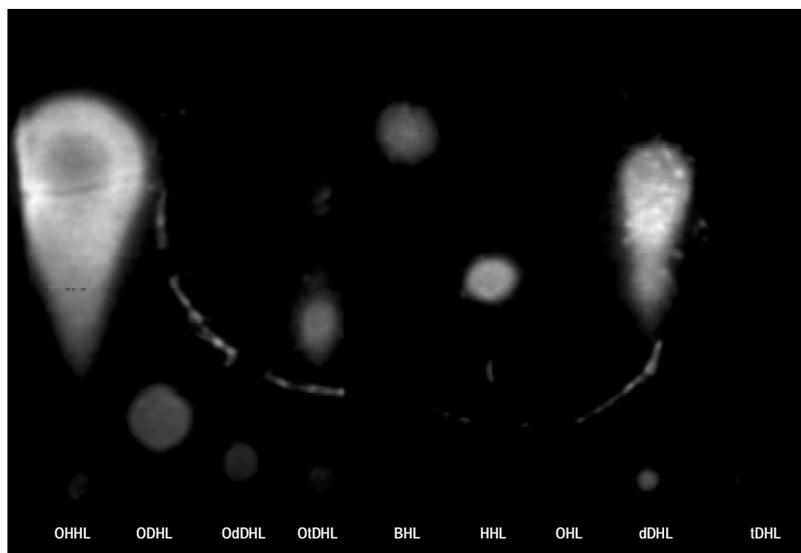
**Abbildung C.4:** Detektion ausgewählter synthetischer AHL-Moleküle nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Visualisierung mit dem Sensor *A. tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372). Von den verschiedenen AHL-Molekülen wurden die in Tabelle C.3 angegebenen Mengen, welche im Routineeinsatz nachgewiesen werden konnten, eingesetzt. Als Substrat für die  $\beta$ -Galactosidase wurden dem Weichagar 60  $\mu$ g/ml X-Gal zugegeben.

#### C.1.4 Der AHL-Sensor *E. coli* JM105 (pJBA89)

Das Sensorplasmid pJBA89 zeigt ein vergleichbares AHL-Detektionsprofil wie der Sensor pSB403 (Abbildung C.1), da bei der Konstruktion beider Plasmide die *lux* Kontrollregion von *P. fischeri* verwendet wurde. Im Gegensatz zu dem biolumineszenten Plasmid pSB403 wurde bei dem Sensor pJBA89 das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Reporter verwendet. Diese Eigenschaft des Sensors pJBA89 erlaubte aufgrund der relativ hohen Sensitivität gegenüber zahlreichen AHL-Molekülen in Kombination mit Epifluoreszenzmikroskopie erstmals den Nachweis von AHL-Molekülen auf Einzelzellebene (Eberl, 1999; Andersen *et al.*, 2000). Abbildung C.5 zeigt die GFP-bedingte Fluoreszenz des Sensors, der in LB-Medium mit verschiedenen OHHL-Konzentrationen kultiviert wurde. Die Bilder bestätigen eine deutliche Korrelation zwischen zugegebener OHHL-Menge und der Fluoreszenzintensität des Sensors. Die Verwendung dieses Sensors in Kombination mit der Dünnschicht-Chromatographie erwies sich allerdings in der praktischen Anwendung als problematisch, da mit dem zur Verfügung stehenden Beleuchtungssystem keine gleichmäßige Anregung der gesamten Agarfläche realisiert werden konnte (Abbildung C.6). In der Folge war die Detektion insbesondere schwächerer Signale und die Dokumentation mit dem Kamerasystem routinemäßig nur schwer möglich.



**Abbildung C.5:** Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* JM105 (pJBA89) Über-Nacht-Kulturen, die in LB-Medium mit 0, 10 bzw. 100 nM OHHL und 100 µg/ml Ampicillin zur Stabilisierung des Sensorplasmids angezogen wurden. A, C, E: Phasenkontrastaufnahme; B, D, F: Fluoreszenzaufnahme desselben Bildausschnittes unter Verwendung des Filtersatzes F41-012.



**Abbildung C.6:** Detektion ausgewählter synthetischer AHL-Moleküle nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung und Visualisierung mit dem Sensor *E. coli* JM105 (pJBA89). Von den verschiedenen AHL-Molekülen wurden jeweils die gleichen Mengen, die auch zur Charakterisierung des Sensorplasmids pSB403 verwendet wurden, eingesetzt, um die Nachweisempfindlichkeit beider Systeme direkt vergleichen zu können. Die eingesetzten AHL-Molekülmengen sind in Tabelle C.1 angegeben.

## C.2 Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Produktion von AHL-Molekülen am Beispiel von *P. aeruginosa*

### C.2.1 Der Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die AHL-Produktion in *P. aeruginosa*

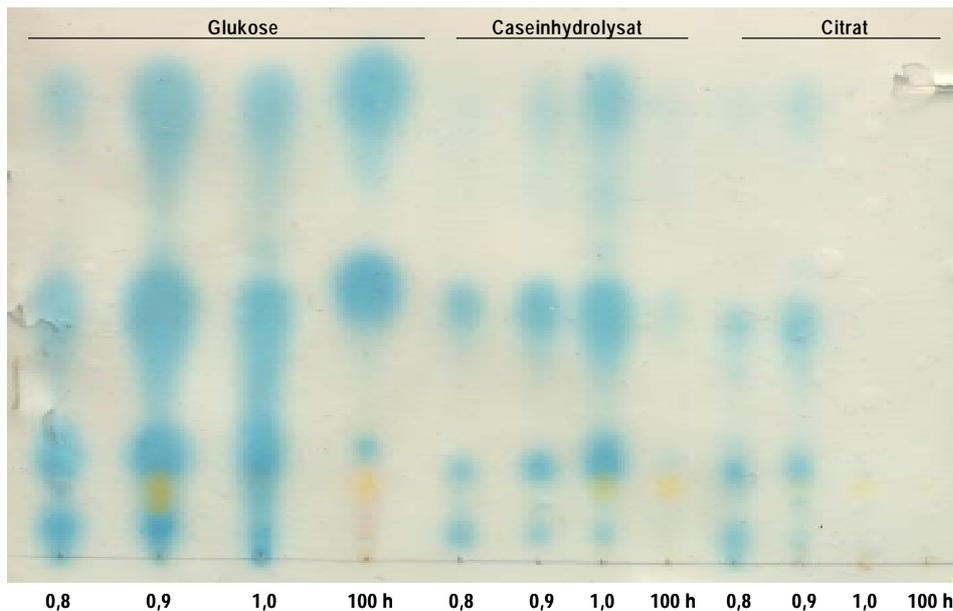
Bei Arbeiten zur Aufklärung der AHL-Biosynthese in *Vibrio harveyi* wurde gezeigt, daß ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Nährstoffversorgung und Physiologie der Bakterienzellen einerseits und der AHL-kontrollierten Lichtemission andererseits besteht. Beispielsweise konnte durch die Zugabe bestimmter Fettsäuren die zelleigene Fettsäurebiosynthese gehemmt werden, wodurch die Produktion von AHL-Molekülen nachhaltig gestört war (Cao und Meighen, 1993).

Inwiefern sich verschiedene Nährstoffbedingungen bei Pseudomonaden auf die Produktion von AHL-Molekülen auswirken, sollte durch die Verwendung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen im Kulturmedium untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Stamm *P. aeruginosa* PAO in AB-Minimalmedium mit Glukose (0,2%), Caseinhydrolysat (0,2 %) bzw. Citrat (15mM) angezogen und je ein Viertel der Kultur beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Phase bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,8, 0,9, 1,0 bzw. nach hundertstündiger Kultivierung, also während der stationären Phase, entnommen und die produzierten AHL-Moleküle extrahiert. Um die AHL-Profile der unterschiedlichen Proben miteinander vergleichen zu können, wurden je 10 µl der AHL-Extrakte auf eine DC-Platte aufgetragen und zur Detektion der AHL-Moleküle der *Agrobacterium*-Sensor eingesetzt.

Die Durchmesser der einzelnen Spots belegen, daß bei den in Glukose kultivierten *P. aeruginosa* PAO Zellen während des gesamten Experiments die höchste Produktion an AHL-Molekülen beobachtet werden konnte (Abbildung C.7). Die Versuche bestätigen zudem, daß in Medien mit Glukose oder Caseinhydrolysat die höchste AHL-Konzentration bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,9 und 1,0 erhalten wurden. Die Signale auf der DC-Platte stimmen gut mit den  $R_f$ -Werten von OHHL (0,68), OOHL (0,41), ODHL (0,18) und OdDHL (0,07) überein. Interessanterweise zeigte der Überstand der Glukosekultur, der während der stationären Phase geerntet wurde, eine ähnliche Konzentration an OHHL und OOHL wie sie auch bei den beiden Proben während der spätlogarithmischen Phase gefunden wurde. Im Gegensatz dazu nahmen jedoch die Mengen der längerkettigen AHL-Moleküle ODHL und OdDHL stark ab. Verglichen mit den in Glukose angezogenen Bakterienzellen produzierten die in

Caseinhydrolysat kultivierten Zellen zwar die gleichen AHL-Moleküle, jedoch zu allen Zeitpunkten in geringeren Mengen. Die zunehmenden Signalintensitäten zeigen, wie die Konzentration an AHL-Molekülen in den Extrakten während der logarithmischen Wachstumsphase mit zunehmender Zelldichte der Kultur ansteigt. In dem während der stationären Phase geernteten Kulturüberstand konnten dagegen lediglich noch Spuren der AHL-Moleküle nachgewiesen werden. Im Unterschied zu der Situation bei Glukose nahmen hier auch die Mengen der kürzerkettigen AHL-Moleküle HHL und OHHL ab. *P. aeruginosa* PAO Zellen, die in Medium mit Citrat als Kohlenstoffquelle angezogen wurden, zeigen bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 und 0,9 ähnliche AHL-Profile wie sie bei Caseinhydrolysat zu den entsprechenden Zeitpunkten ermittelt wurden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Glukose und Caseinhydrolysat konnten jedoch bereits bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 keine AHL-Moleküle mehr in den AHL-Extrakten der Citrat-Kulturen nachgewiesen werden.

Bei der Suche nach einer Erklärung für dieses Phänomen wurden auch die pH-Werte der abzentrifugierten Kulturüberstände verglichen. Dabei wurde festgestellt, daß sich der pH-Wert der Überstände im Laufe der Kultivierung bei den untersuchten Nährmedien unterschiedlich entwickelte. Während bei den mit Glukose und Caseinhydrolysat supplementierten Medien lediglich ein geringer Anstieg des pH-Wertes vom Ausgangswert 6,4 um maximal 0,3 beobachtet werden konnte, wurde beim Citrat-Medium bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 bereits eine Zunahme des pH-Wertes um 1,2 und bis zum Ende der Kultivierung um mehr als 1,5 gemessen.

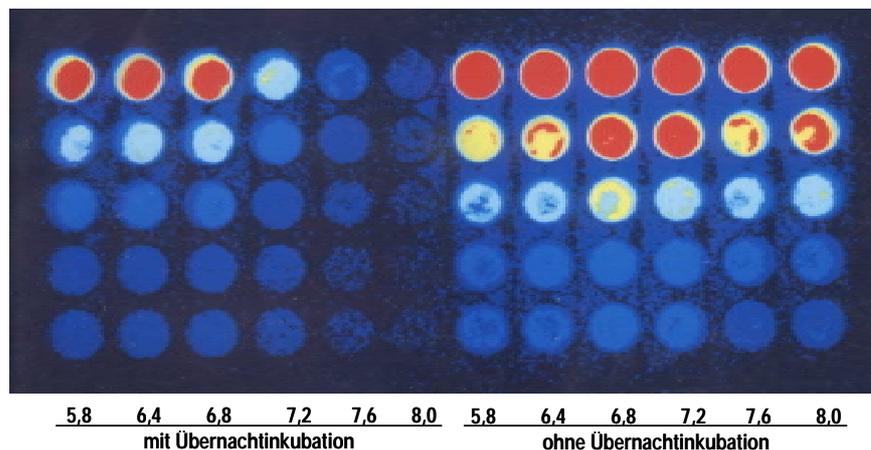


**Abbildung C.7:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Nachweis von AHL-Molekülen, die von *P. aeruginosa* PAO bei Anzucht in Kulturmedium mit Glukose, Caseinhydrolysat bzw. Citrat zu unterschiedlichen Wachstumsphasen ( $OD_{600nm}$ : 0,8, 0,9, 1,0 bzw. nach 100 h Kultivierung) produziert wurden. Zur Detektion der AHL-Moleküle wurde der *Agrobacterium*-Sensor verwendet. Als Substrat für die  $\beta$ -Galactosidase wurde dem Weichagar 60  $\mu$ g/ml X-Gal zugegeben.

### C.2.2 Der Einfluß des pH-Wertes auf die AHL-Produktion in *P. aeruginosa*

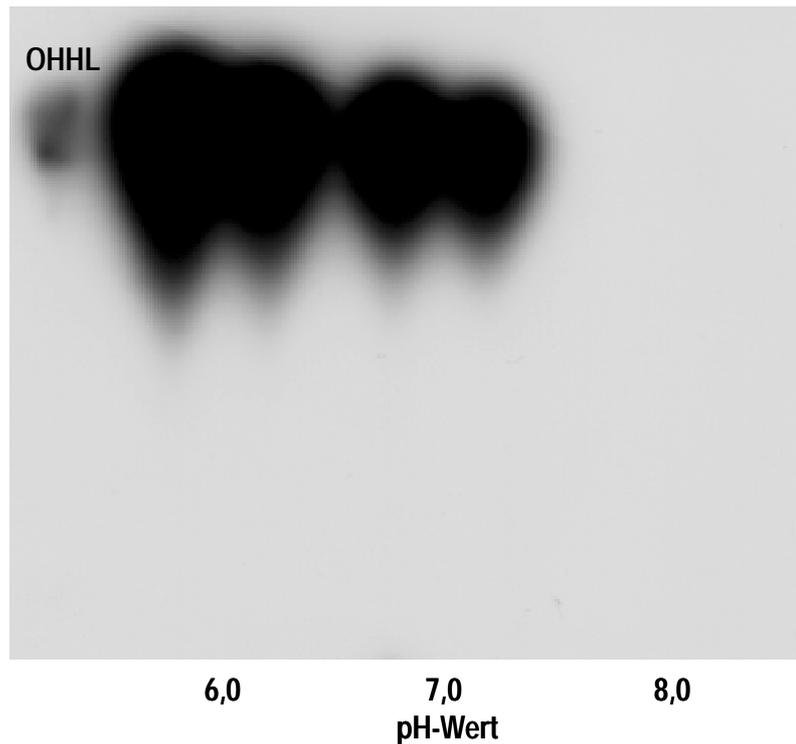
Um den im vorangegangenen Experiment beobachteten Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität der AHL-Moleküle näher zu untersuchen, wurden zunächst Versuche mit synthetisch hergestelltem OHHL durchgeführt. Dieses Molekül stand zum einen für die praktischen Arbeiten in ausreichender Menge zur Verfügung und zum anderen weisen die beiden leistungsfähigsten Biosensoren, nämlich *E. coli* MT102 (pSB403) und *A. tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372), die höchste Empfindlichkeit für dieses Molekül auf, so daß Konzentrationsänderungen sehr sensitiv verfolgt werden können. In einem ersten Versuch wurde ein Aliquot einer OHHL-Lösung in Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M) bei pH-Werten zwischen 5,8 und 8,0 über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l von jedem Ansatz in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte vorgelegt, mit 100  $\mu$ l *E. coli* MT102 (pSB403) Sensor gemischt und dann wie unter 'B.3.3.7 Nachweis von AHL-Molekülen mittels Mikrotiterplatten-Assay' beschrieben weiterverfahen. Um pH-abhängige Lichtemissionsunterschiede des Sensors ausschließen zu können, wurde in einem Kontrollansatz die gleiche OHHL-Menge den verschiedenen Pufferlösungen zugegeben und

anschließend ohne Inkubation mit dem Sensor gemischt. Wie in Abbildung C.8 zu sehen ist, nimmt bei den über Nacht inkubierten Proben die Signalintensität des Sensors mit steigendem pH-Wert kontinuierlich ab. Ein Vergleich mit dem nicht inkubierten Kontrollversuch zeigt, daß die gleiche Menge OHHL unabhängig vom pH-Wert des Phosphatpuffers in allen sechs Ansätzen die gleiche Lichtemission induziert.



**Abbildung C.8:** Lichtemissionsprofil eines Mikrotiterplatten-Assays unter Verwendung des Sensors *E. coli* MT102 (pSB403). In den Kavitäten auf der linken Seite wurden je 100 µl Sensor mit 100 µl OHHL-Lösung, die über Nacht bei pH 5,8, 6,4, 6,8, 7,2, 7,6 bzw. 8,0 inkubiert wurden, gemischt. Die Kavitäten auf der rechten Seite wurden mit Mischungen derselben Zusammensetzung beschickt, jedoch wurden hier die AHL-Moleküle nicht in den entsprechenden Natrium-Phosphat-Puffern über Nacht inkubiert. Die Lichtemission des Sensors wurde nach vierstündiger Inkubation mit dem CCD-Kamerasystem C2400-40 dokumentiert.

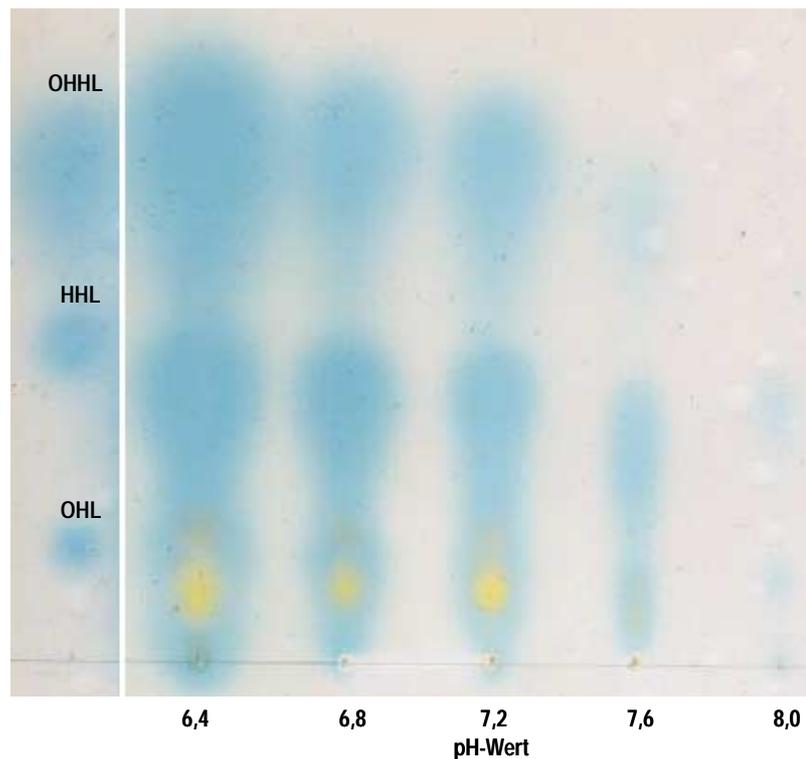
In einem weiteren Versuch wurde ein Aliquot einer OHHL-Lösung in Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M) mit den pH-Werten 6,0, 7,0 und 8,0 über Nacht inkubiert und anschließend die AHL-Moleküle extrahiert. Von jedem Extrakt wurden 10 µl für eine analytische Dünnschicht-Chromatographie eingesetzt und der Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) für die Detektion der isolierten AHL-Moleküle verwendet. Die Signale an Positionen auf der DC-Platte, wie sie für OHHL zu erwarten waren, nahmen in ihrer Intensität mit zunehmender Alkalität deutlich ab. Neben den detektierten OHHL-Signalen konnten keine weiteren Signale, die auf Abbauprodukte mit AHL-Aktivität schließen lassen, detektiert werden (Abbildung C.9).



**Abbildung C. 9:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion von synthetischem OHHL, das nach zwölfstündiger Inkubation in Natrium-Phosphat-Puffern mit den pH-Werten 6,0, 7,0 bzw. 8,0 mittels Dichlormethanextraktion aufkonzentriert wurde. Von den als Duplikat hergestellten AHL-Extrakten wurden je 10  $\mu$ l eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Sensor *E. coli* MT102 (pSB403). In der ersten Spur wurden 85  $\mu$ g OHHL als Referenz aufgetragen. Die weiteren Spuren zeigen AHL-Extrakte, die bei pH 6,0, 7,0 und 8,0 inkubiert wurden.

Um zu untersuchen, ob der mit dem synthetischen AHL-Molekül beobachtete pH-Effekt auch auf die AHL-Produktion bei *P. aeruginosa* übertragbar ist, wurde der Stamm *P. aeruginosa* PAO in AB-Minimalmedium mit 0,2% Glukose bei pH-Werten zwischen 6,4 und 8,0 kultiviert, wobei die verschiedenen pH-Werte über die Phosphatpufferkomponente des AB-Minimalmediums eingestellt wurden.

Die Kulturen wurden bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 inkubiert und anschließend die AHL-Moleküle aus den zentrifugierten Kulturüberständen extrahiert. Die pH-Werte der einzelnen Ansätze stiegen im Laufe der Kultivierung um maximal 0,3 an. Je 10  $\mu$ l der Extrakte wurden für die DC-Analyse verwendet und die aufgetrennten AHL-Moleküle mit dem *Agrobacterium*-Sensor detektiert.

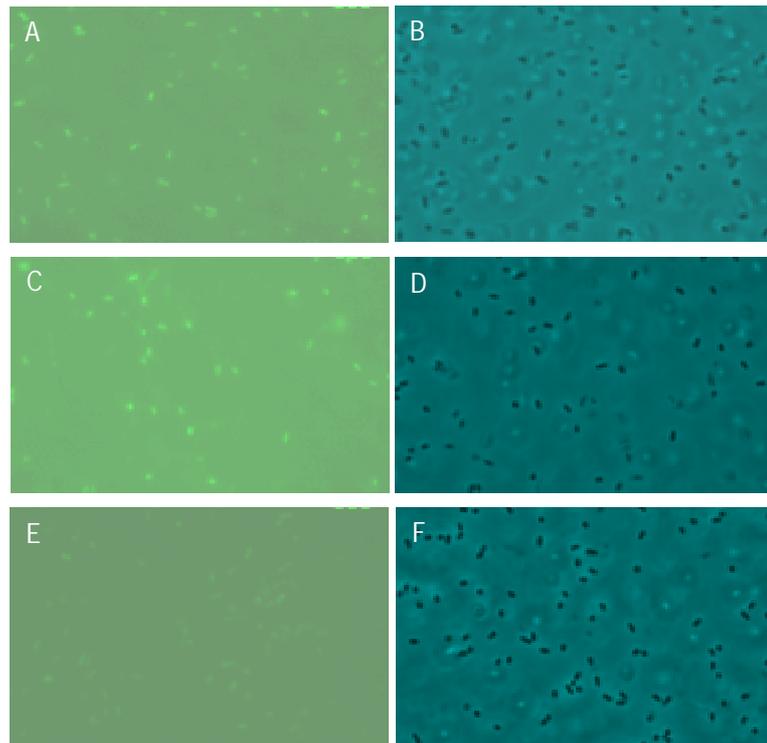


**Abbildung C.10:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion von AHL-Molekülen, die aus *P. aeruginosa* PAO AB-Minimalmedium-Kulturen mit pH-Werten von 6,4 bis 8,0 isoliert wurden. Von jedem AHL-Extrakt wurden 10  $\mu$ l auf die DC-Platte aufgetragen und der *Agrobacterium*-Sensor zum Nachweis der Homoserinlactone verwendet. In der ersten Spur wurden synthetisch hergestelltes OHL (20  $\mu$ g), HHL (0,3  $\mu$ g) und OHHL (85 pg) als Referenz aufgetragen. Als Substrat für die  $\beta$ -Galactosidase wurde dem Weichagar 60  $\mu$ g/ml X-Gal zugegeben.

Die Untersuchung bestätigt einen Zusammenhang zwischen pH-Wert des Kulturmediums und der Menge an AHL-Molekülen in den Kulturüberständen. Wie Abbildung C.10 zeigt, nehmen die unterschiedlichen AHL-Molekültypen mit zunehmendem pH-Wert deutlich ab, so daß in dem Überstand der Kultur, die bei pH 8,0 angezogen wurde, nur noch sehr geringe Mengen nachgewiesen werden konnten. Auch bei dieser Testreihe konnten keinerlei Abbauprodukte mit AHL-Aktivität detektiert werden.

Um zu untersuchen, ob sich diese pH-Sensitivität der AHL-Moleküle auch auf Einzelzellebene beobachten läßt, wurde das auf dem *las*-System basierende AHL-Sensorplasmid JB646 verwendet (Andersen *et al.*, 2000). Dieses GFP-Sensorplasmid wurde in *P. aeruginosa* PAO überführt und dient als quantitativer Indikator für die von diesem Bakterienstamm selbst produzierten AHL-Moleküle. Der Stamm wurde in AB-Minimalmedium bei den pH-Werten 6,0, 7,0 und 8,0 bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 kultiviert, und anhand der Fluoreszenzintensität der einzelnen Bakterien konnte auf die intrazelluläre

Konzentration der AHL-Moleküle geschlossen werden. Die epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung C.11) wurden bei einer Belichtungszeit von 10 Sekunden mit einer CCD-Kamera (C5985) aufgenommen. Es zeigte sich, daß die Zellen, die bei pH 6,0 und 7,0 angezogen wurden, eine sehr ähnliche Fluoreszenzintensität aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigen die Bilder eine deutlich schwächere Fluoreszenz für die Zellen, die bei pH 8,0 kultiviert wurden.

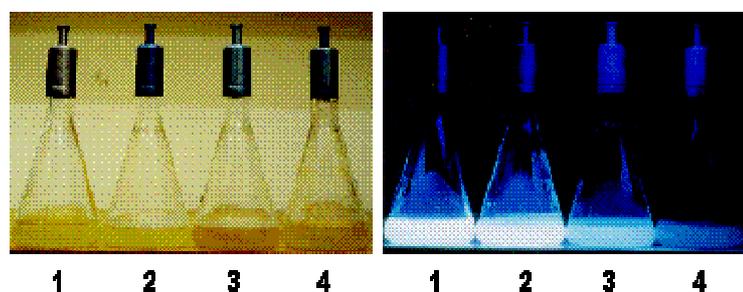


**Abbildung C.11:** Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* JB646 (pJBA140) Über-Nacht-Kulturen, die in AB-Minimalmedium mit den pH-Werten 6,0 (A, B), 7,0 (C, D) bzw. 8,0 (E, F) kultiviert wurden. Zur Stabilisierung des Sensorplamids wurde den Kulturen 20 mg/l Gentamycin zugegeben. A, C, E: Fluoreszenzaufnahme unter Verwendung des Filtersatzes F41-012; B, D, F: Phasenkontrast desselben Bildausschnittes.

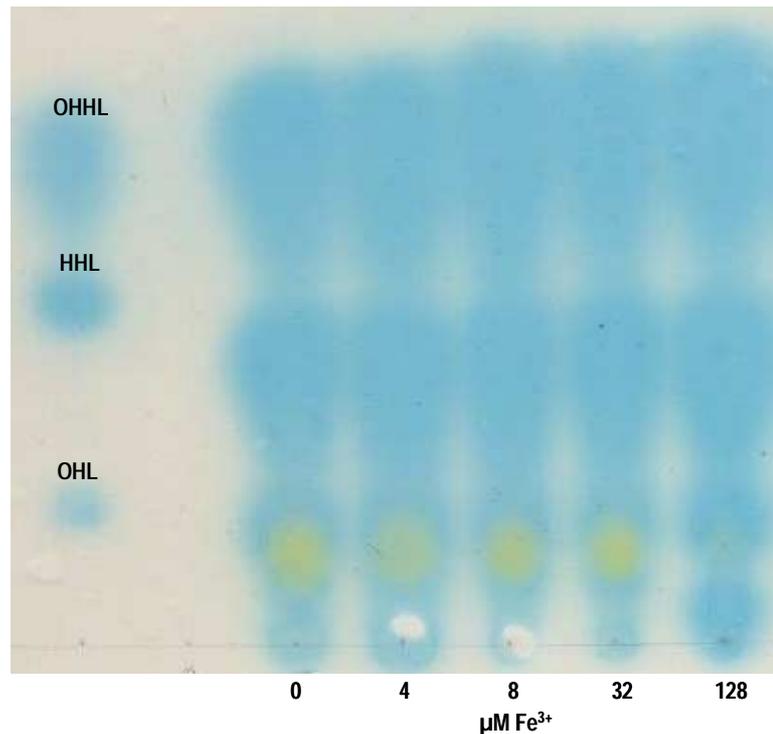
### C.2.3 Der Einfluß der Eisen-Konzentration auf die AHL-Produktion in *P. aeruginosa*

Es wurde von Cox *et al.* (1993) gezeigt, daß viele Virulenzfaktoren ihre maximale Konzentration nur unter limitierten Eisenbedingungen im Nährmedium erreichen. Beispiele hierfür sind neben den eisenbindenden Proteinen Pyochelin und Pyoverdin auch das Exotoxin A und die Exoproteasen Elastase bzw. die alkalische Protease. Pyoverdin ist ein wasserlösliches, gelb-grün fluoreszierendes Siderophor mit einer sehr hohen Affinität für Eisen und dadurch für die chronische Infektion von Mukoviszidosepatienten von zentraler

Bedeutung (Haas *et al.*, 1991). Die Synthese dieser Substanz wird über die Konzentration an Eisen im Nährmedium gesteuert, so daß in einem eisenarmen Medium Pyoverdin in relativ hohen Konzentrationen, in einem eisenreichen Medium dagegen nur in sehr geringen Mengen synthetisiert wird. Abbildung C.12 zeigt Aufnahmen von *P. aeruginosa* PAO Kulturen, die in AB-Minimalmedium angezogen wurden und denen dem verschiedene  $\text{Fe}^{3+}$ -Mengen zur Einstellung bestimmter Konzentrationen (0, 8, 32 und 128  $\mu\text{M}$ ) zugegeben wurden. Bei Bestrahlung der Kulturen mit kurzwelligem Licht ( $\lambda=380\text{ nm}$ ) zeigten die Kulturen unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten, welche die verschiedenen Konzentrationen an produziertem Pyoverdin anzeigen. Da aus früheren Untersuchungen bekannt ist, daß die Synthese von Pyoverdin darüberhinaus auch durch 'quorum sensing' reguliert wird (Cox, 1993), wurden die AHL-Moleküle aus den Überständen von *P. aeruginosa* PAO Kulturen extrahiert, die in AB-Minimalmedium mit 0, 4, 8, 32 oder 128  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  kultiviert wurden. Die Stämme wurden bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,0 inkubiert und zur Detektion der verschiedenen AHL-Moleküle der *Agrobacterium*-Sensorstamm verwendet. Es wurden je 10  $\mu\text{l}$  der AHL-Extrakte auf die DC-Platte aufgetragen. Das einheitliche Erscheinungsbild der fünf AHL-Profile belegt, daß in allen Ansätzen unabhängig von der zugegebenen  $\text{Fe}^{3+}$  Menge sowohl die Art als auch die Menge der AHL-Moleküle sehr ähnlich sind (Abbildung C.13). Zur Bestimmung der Pyoverdinkonzentration in den Kulturen wurde die optische Dichte der zellfreien Kulturüberstände bei einer Wellenlänge von 380 nm gemessen. Dabei wurden für die verschiedenen  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentrationen folgende Werte erhalten: 1,0 (0  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ ), 0,7 (4  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ ), 0,7 (8  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ ), 0,5 (32  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ ) und 0,3 (128 $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ ). Die ermittelten Absorptionswerte bestätigen eine Abnahme der Pyoverdinkonzentration mit zunehmender Menge an verfügbarem Eisen und korrelieren damit gut mit der oben beschriebenen Fluoreszenz der Kulturen.



**Abbildung C.12:** Aufnahmen von *P. aeruginosa* PAO Kulturen, die in AB-Minimalmedium, dem 0  $\mu\text{M}$  (1), 8  $\mu\text{M}$  (2), 32  $\mu\text{M}$  (3) bzw. 132  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  (4) zugegeben wurde, bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,0 angezogen wurden. links: Tageslichtaufnahme, rechts: Detektion der Pyoverdinfluoreszenz bei einer Anregung der Kulturen mit einer Wellenlänge von 380 nm.



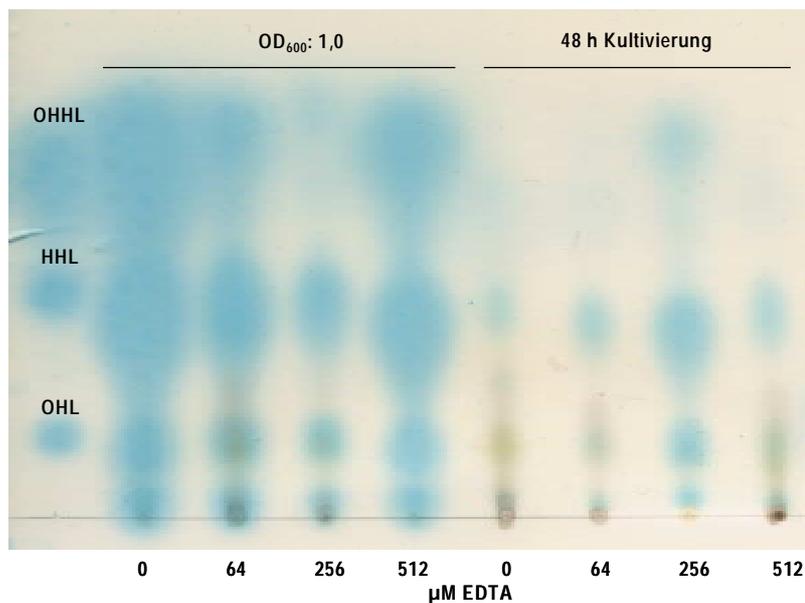
**Abbildung C.13:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion von AHL-Molekülen, die aus *P. aeruginosa* PAO AB-Minimalmedium-Kulturen, denen jeweils 0, 4, 8, 32 bzw. 128  $\mu\text{M Fe}^{3+}$  zugegeben worden war, isoliert wurden. Die AHL-Moleküle wurden aus den Kulturüberständen bei einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,0 extrahiert und von jedem AHL-Extrakt wurden 10  $\mu\text{l}$  auf die DC-Platte aufgetragen. Zum Nachweis der AHL-Moleküle wurde der *Agrobacterium*-Sensor verwendet. Als Substrat für die  $\beta$ -Galactosidase wurde dem Weichagar 60  $\mu\text{g/ml}$  X-Gal zugegeben. In der ersten Spur wurden synthetisch hergestelltes OHL (20  $\mu\text{g}$ ), HHL (0,3  $\mu\text{g}$ ) und OHHL (85  $\mu\text{g}$ ) als Referenz aufgetragen.

#### C.2.4 Der Einfluß von EDTA auf die AHL-Produktion in *P. aeruginosa*

In früheren Studien wurde gezeigt, daß *P. aeruginosa* zur Auslösung einer akuten oder chronischen Lungenentzündung nicht nur sehr gut in den Atemwegssekreten von Mukoviszidosepatienten wächst, sondern daß diese Sekrete direkt in die Produktion von Virulenzfaktoren eingreifen, indem sie die Expression bestimmter Gene steuern (Wang *et al.*, 1996). EDTA (Ethylendiamintetraacetat) ist in der Lage, mit Metallionen wie zum Beispiel Eisen, Zink, Magnesium und Calcium stabile Chelat-Komplex zu bilden. EDTA weist somit ähnliche Eigenschaften wie bestimmte Phospholipide ( z.B. Monopalmitoylphosphatidinsäure, MPPA), die in der Lunge vor allem dann in hohen Konzentrationen vorkommen, wenn Lungengewebe im Laufe einer Entzündung beschädigt wird (persönliche Mitteilung Cohen, University of Rhode Island, USA). Da MPPA sehr teuer und nur schwer zu beschaffen ist, wurde bei den durchgeführten Untersuchungen das preiswertere EDTA verwendet.

Um den Einfluß von Komplexbildnern auf die Produktion von AHL-Molekülen zu untersuchen, wurde der Stamm *P. aeruginosa* PAO in LB-Flüssigmedium, dem 0, 64, 256 oder 512  $\mu\text{M}$  EDTA zugegeben wurde, bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,0 bzw. für die Dauer von 48 h kultiviert. Von jedem AHL-Extrakt wurden 10  $\mu\text{l}$  für die analytische Dünnschicht-Chromatographie verwendet und die AHL-Moleküle mit dem *Agrobacterium*-Sensor detektiert.

In allen AHL-Extrakten, die aus den Zellkulturüberständen bei einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,0 hergestellt wurden, fanden sich unabhängig von der zugegebenen Menge an EDTA die gleichen, für *P. aeruginosa* typischen AHL-Molekültypen (Abbildung C.14). Die Mengen der produzierten AHL-Moleküle variierten zwischen den einzelnen Ansätzen mit Ausnahme des auffallend schwachen OHHL-Signals im Ansatz mit 256  $\mu\text{M}$  EDTA nur gering. Nach 48 h Inkubation erreichten die *P. aeruginosa* Kulturen eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  zwischen 1,1 (512  $\mu\text{M}$  EDTA) und 1,8 (0  $\mu\text{M}$  EDTA), wobei die Konzentration an AHL-Molekülen in den Ansätzen zumeist deutlich abnahm (Abbildung C.14).



**Abbildung C.14:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion von AHL-Molekülen, die aus *P. aeruginosa* PAO LB-Medium-Kulturen, denen 0, 64, 256 bzw. 512  $\mu\text{M}$  EDTA zugegeben worden war, isoliert wurden. Die AHL-Moleküle wurden aus den Kulturüberständen bei einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,0 und nach einer Kultivierungszeit von 48 h extrahiert. Von jedem AHL-Extrakt wurden 10  $\mu\text{l}$  auf die DC-Platte aufgetragen und der *Agrobacterium*-Sensor zum Nachweis der AHL-Moleküle verwendet. Als Substrat für die  $\beta$ -Galactosidase wurde dem Weichagar 60  $\mu\text{g/ml}$  X-Gal zugegeben. In der ersten Spur wurden synthetisch hergestelltes OHL (20  $\mu\text{g}$ ), HHL (0,3  $\mu\text{g}$ ) und OHHL (85  $\mu\text{g}$ ) als Referenz aufgetragen.

### C.3 Die Produktion von AHL-Molekülen bei klinischen *P. aeruginosa* Isolaten

#### C.3.1 AHL-Profile ausgewählter *P. aeruginosa* Isolate verschiedener Mukoviszidosepatienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die AHL-Profile von über 70 *P. aeruginosa* Isolaten, die zumeist aus Patienten mit Mukoviszidose (synonym: Zystische Fibrose, CF) an der Medizinischen Hochschule Hannover isoliert wurden, untersucht. Da aus vorangegangenen Arbeiten bekannt war, daß Bakterien, die in Minimalmedium mit Glukose (0,2%) angezogen werden, sowohl die höchste Konzentration als auch die meisten AHL-Molekültypen produzierten, wurden die Isolate in diesem Kulturmedium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 kultiviert und die AHL-Moleküle aus den Überständen extrahiert. Die Kombination aus dünnschichtchromatographischer Auftrennung der verschiedenen AHL-Moleküle und deren Detektion mit verschiedenen Sensorsystemen erlaubte anschließend den Nachweis der verschiedenen AHL-Moleküle in den konzentrierten Extrakten. Wie die Abbildung C.15 (A, B) zeigt, unterscheiden sich die untersuchten *P. aeruginosa* Stämme erheblich sowohl hinsichtlich der chemischen Struktur als auch der Mengen an produzierten AHL-Molekülen. Durch die Verwendung des Sensors *E. coli* MT102 (pSB403) konnten bis zu sechs verschiedene AHL-Moleküle in bestimmten Stämmen nachgewiesen werden, während unter den gleichen Kultivierungsbedingungen bei anderen *P. aeruginosa* Stämmen keine AHL-Moleküle detektiert werden konnten. Aufgrund der spezifischen R<sub>f</sub>-Werte für die unterschiedlichen AHL-Typen und dem Vergleich mit entsprechenden, synthetisch hergestellten Referenzsubstanzen war eine vorläufige Identifizierung der einzelnen AHL-Moleküle möglich. Die AHL-Signale, die sich an der für OdDHL, OOHL, HHL und OHHL zu erwartenden Position befinden, sind in Abbildung C.15 (A) angegeben. Diese Ergebnisse stimmen auch mit früheren Studien überein, die gezeigt haben, daß LasI neben der Synthese von OdDHL auch für die Produktion kleinerer Mengen von OOHL und OHHL verantwortlich ist (Pearson *et al.*, 1994) und daß RHLI die Synthese von BHL und HHL in einem molaren Verhältnis von 15:1 steuert (Winson *et al.*, 1995). Während BHL in den *P. aeruginosa* Extrakten mit dem Sensorplasmid pSB403 wegen der Insensitivität dieses Sensors für dieses kurzkettige AHL-Molekül nicht nachgewiesen werden konnte, so war die Detektion dieses Moleküls jedoch mit Hilfe des *Chromobacterium*-Sensors möglich (Abbildung C.15(B)).

Interessanterweise konnten unter Verwendung des Sensors *E. coli* MT102 (pSB403) zwei zusätzliche Signale detektiert werden, deren Positionen auf der DC-Platte charakteristisch für OtDHL und ODHL sind. Darüberhinaus zeigten die AHL-Profile einiger Stämme die Produktion eines bisher nicht identifizierten AHL-Moleküls mit einem  $R_f$ -Wert zwischen OHHL und HHL. Besonders hohe Konzentrationen dieses Moleküls wurden in den Kulturüberständen der Isolate gefunden, die in Abbildung C.15 (G, H) gezeigt sind.

### C.3.2 Longitudinaler Verlauf der AHL-Produktion bei chronischer Infektion mit *P. aeruginosa*

An der Medizinischen Hochschule Hannover wurden über einen Zeitraum von mehr als zehn Jahren über 40 *P. aeruginosa* Isolate aus den Sputa von fünf Patienten gesammelt. Diese Bakterien wurden eingesetzt, um zu untersuchen, ob sich die AHL-Produktion bei *P. aeruginosa* im Laufe einer chronischen Infektion verändert. Um sicherzustellen, daß es sich bei den aus den jeweiligen Patienten isolierten Stämmen während des gesamten Untersuchungszeitraumes tatsächlich um denselben *P. aeruginosa* Klon handelt, wurden alle Isolate einer Restriktionsfragmentgrößenbestimmung mit dem Enzym SpeI unterzogen (Römling *et al.*, 1994). Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde darauf geachtet, sämtliche Stämme unter standardisierten Wachstumsbedingungen im Hinblick auf Kulturmedienzusammensetzung, Sauerstoffversorgung und Temperatur zu kultivieren, um die AHL-Profile der verschiedenen Isolate objektiv miteinander vergleichen zu können. Da einzelne Stämme nur in AB-Minimalmedium, dem 0,2% Caseinhydrolysat zugesetzt wurde, die für die Herstellung der AHL-Extrakte festgesetzte  $OD_{600nm}$  von 1,0 erreichten, wurde dieses modifizierte Minimalmedium routinemäßig verwendet. Die AHL-Moleküle der verschiedenen Isolate wurden wie aus den zentrifugierten Kulturüberständen extrahiert und nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung mit den beiden Sensoren *E. coli* MT102 (pSB403) und *C. violaceum* CV026 detektiert.

Vergleicht man die AHL-Profile verschiedener *P. aeruginosa* Isolate, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus Sputa eines Patienten isoliert wurden, so wird deutlich, daß weder die Mengen noch die Art der produzierten AHL-Moleküle sich im Verlauf einer chronischen Infektion wesentlich änderten (siehe Abbildung C.15 (C, D)). In einzelnen Fällen konnten kleinere Unterschiede der produzierten OHHL- und ODHL-Mengen beobachtet

werden, diese Abweichungen lagen jedoch stets im Bereich der standardmäßig auftretenden Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten.

### **C.3.3 Longitudinaler Verlauf der AHL-Produktion bei Co-Infektion des Patienten mit *B. cepacia***

Infektionen mit *Burkholderia cepacia* treten in der Regel nur bei Patienten auf, die bereits mit *P. aeruginosa* kolonisiert sind. In vielen Fällen verschlechtert sich durch diese Co-Infektion die Prognose für den Patienten erheblich. Etwa 20% der Patienten erkranken an dem sogenannten ‘*B. cepacia* Syndrom’, einer Lungenentzündung mit zumeist fatalem Krankheitsverlauf (Govan und Deretic, 1996). Da in der Vergangenheit gezeigt wurde, daß *B. cepacia* selbst ein ‘quorum sensing’ System zur Regulation seiner Virulenzfaktoren einsetzt (Lewenza *et al.*, 1999) und zudem die Produktion dieser Virulenzfaktoren durch zellfreie *P. aeruginosa* Kulturüberstände stimuliert werden kann, sollte hier der Einfluß einer *B. cepacia* Co-Infektion auf die Produktion von AHL-Molekülen bei *P. aeruginosa* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die AHL-Profile von *P. aeruginosa* Isolaten analysiert, die im Abstand von etwa sechs Monaten aus Sputa von zwei Patienten isoliert wurden und bei denen eine Co-Infektion mit *B. cepacia* vorlag. Die beiden Patienten (P1 und P2), die an der Medizinischen Hochschule Hannover in Behandlung waren, wurden über einen Zeitraum von zehn (P1) bzw. elf (P2) Jahren beobachtet. Bei Patient P2 blieb die Produktion von AHL-Molekülen offensichtlich unbeeinflusst von der Gegenwart des co-kolonisierenden *B. cepacia* Stammes. Sowohl im Hinblick auf die produzierten Mengen als auch auf die verschiedenen AHL-Molekültypen ergab sich nach der Sekundärinfektion keine wesentliche Änderung. (Abbildung C.15 (E, F)). Im Gegensatz dazu konnte bei Patient P1 ab dem Zeitpunkt, an dem erstmals *B. cepacia* neben *P. aeruginosa* isoliert werden konnte, eine drastische Veränderung der AHL-Produktion bei *P. aeruginosa* beobachtet werden. Während der zwölf Monate langen Co-Infektionsperiode sind die Mengen aller AHL-Molekültypen erheblich reduziert und erst 18 Monate, nachdem *B. cepacia* letztmalig aus einer Sputumprobe des Patienten isoliert werden konnte, zeigten die isolierten *P. aeruginosa* Stämme wieder die gleichen AHL-Profile wie vor der Infektion (Abbildung C.15 (G, H)).

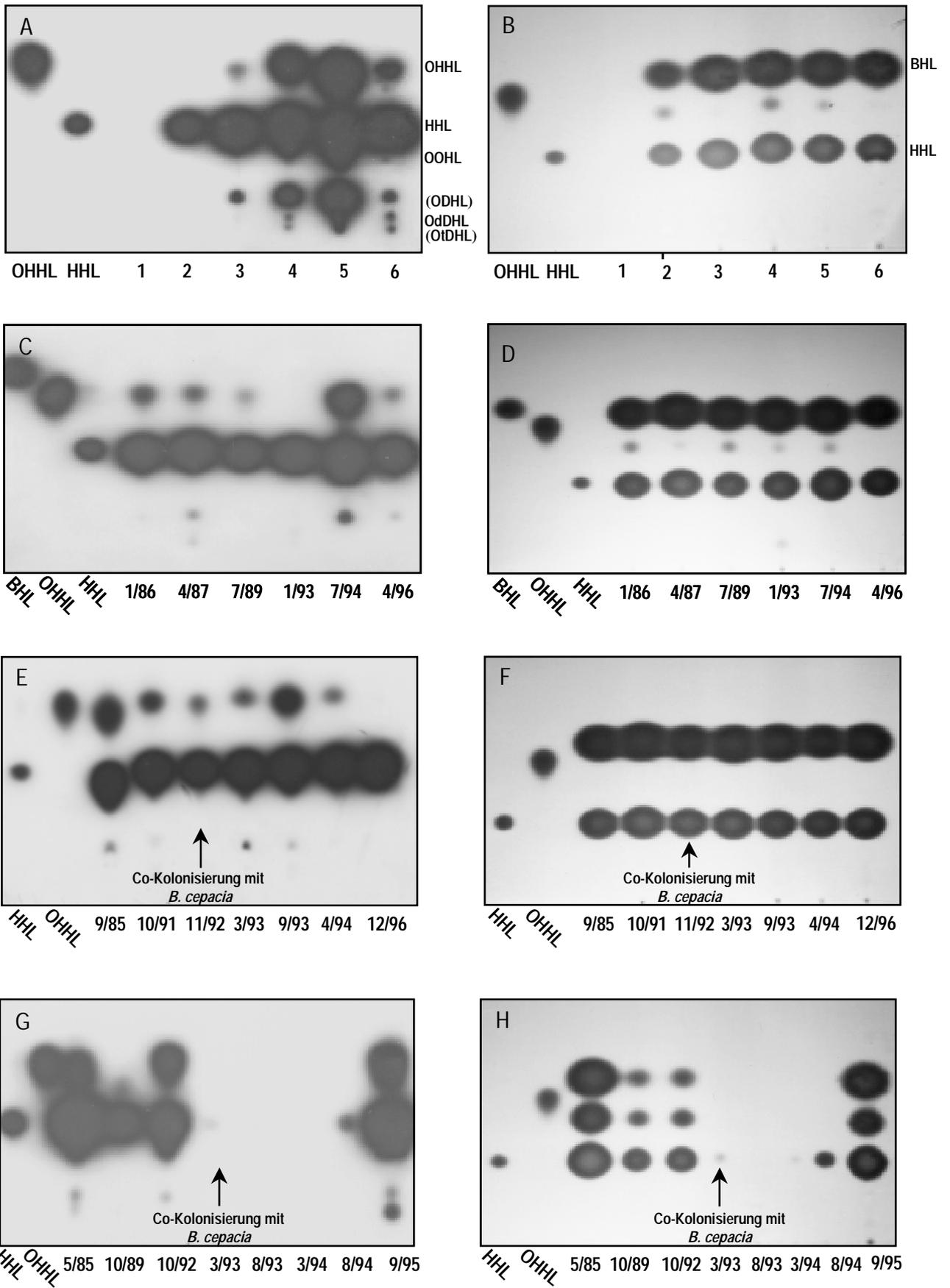
Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden die AHL-Profile der beiden *B. cepacia* Stämme von Patient P1 und P2 analysiert. Es zeigte sich, daß der *B. cepacia* Stamm, der aus Patient P1 isoliert worden war, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lewenza *et al.*

(1999) ein AHL-Molekül produziert, das in der DC-Analyse ein für OHL typisches Signal lieferte. Darüberhinaus konnte in demselben AHL-Extrakt ein zweites Signal detektiert werden, das aufgrund seines  $R_f$ -Wertes als HHL identifiziert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten in den Kulturüberständen des *B. cepacia* Stammes aus Patient P2, der mittlerweile seit sieben Jahren mit *P. aeruginosa* und gleichzeitig mit *B. cepacia* infiziert ist, keine AHL-Moleküle nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Gegenwart eines co-kolonisierenden *B. cepacia* Stammes, der selbst AHL-Moleküle produziert, die 'quorum sensing' abhängige Regulation in *P. aeruginosa* in der Weise beeinflußt, daß bestimmte Mutanten dominieren, die unter standardisierten Wachstumsbedingungen nur noch geringe Mengen an AHL-Molekülen produzieren.

---

**Abbildung C.15:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion von AHL-Molekülen, die von verschiedenen klinischen *P. aeruginosa* Isolaten produziert wurden. Die untersuchten Stämme wurden in LB-Medium mit 0,2% Glukose (A, B) bzw. 0,2% Caseinhydrolysat (C-G) bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 angezogen und die AHL-Moleküle aus den abzentrifugierten Kulturüberständen extrahiert. Von jedem Extrakt wurden je 10  $\mu$ l auf die DC-Platte aufgetragen. Als Referenzsubstanzen dienten beim biolumineszenten Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) (A, C, E, G) 85 pg OHHL, 7 ng HHL und 20  $\mu$ g BHL bzw. beim Sensor *C. violaceum* CV026 (B, D, F, H) 16 ng OHHL, 2 ng HHL und 3  $\mu$ g BHL. (A, B; 1-6): AHL-Profile ausgewählter, klinischer *P. aeruginosa* Isolate. Die Positionen der AHL-Moleküle sind gekennzeichnet. Da die Produktion von OtDHL und ODHL in *P. aeruginosa* bisher noch nicht beschrieben wurde, sind die entsprechenden Bezeichnungen in Klammern gesetzt. (C, D): AHL-Profile von klinischen *P. aeruginosa* Stämmen, die im Laufe von zehn Jahren aus Sputa eines Patienten isoliert wurden. (E-H): AHL-Profile von *P. aeruginosa* Stämmen, die aus zwei Patienten, welche zu den angegebenen Zeitpunkten mit einem AHL-negativen (E, F) bzw. einem AHL-produzierenden (G, H) *B. cepacia* co-infiziert wurden.



#### C.4 Vergleich der AHL-Produktion bei Vertretern verschiedener *B. cepacia* Genomovare

Der Ausdruck Genomovar wurde 1995 von Ursing *et al.* erstmals verwendet, um phänotypisch ähnliche, jedoch genotypisch unterschiedliche Gruppen eines bestimmten Bakterienstammes zu beschreiben. Innerhalb der Gattung *Burkholderia* findet sich eine derartige Situation in Form des sogenannten *B. cepacia* Komplexes, der sich aus fünf Genomovaren zusammensetzt (Vandamme *et al.*, 1997).

Erste Untersuchungen des *B. cepacia* `quorum sensing`-Systems ließen vermuten, daß dieses Bakterium OHL, BHL und HHL produziert (McKenney *et al.*, 1995). Vor kurzem konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, daß von einem Stamm, der dem Genomovar III angehört, ausschließlich OHL synthetisiert wird (Lewenza *et al.*, 1999). Um zu klären, ob diese Variabilität in der Produktion von AHL-Molekülen, die auch bei den beiden *B. cepacia* Isolaten aus den Patienten P1 und P2 (siehe C.3.3 `Longitudinaler Verlauf der AHL-Produktion bei Co-Infektion des Patienten mit *B. cepacia*`) beobachtet werden konnte, auf Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen bzw. Genomovaren beruht, wurden die AHL-Profile ausgewählter *B. cepacia* Stämme, die zuvor phäno- und genotypisch im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Vandamme (Universität Gent, B) charakterisiert wurden, untersucht. Alle *Burkholderia* wurden dazu standardmäßig in AB-Minimalmedium mit 0,2% Glukose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 kultiviert. Insgesamt wurden die Kulturüberstände von 25 Vertretern der Gattung *Burkholderia*, darunter 2 Vertreter von Genomovar I, sechs Vertreter von Genomovar II, sechs Vertreter von Genomovar III, zwei Vertreter von Genomovar IV, fünf Vertreter von *B. vietnamiensis*, zwei Vertreter von *B. gladioli* und zwei Vertreter einer Gruppe, die phylogenetisch zwischen *Burkholderia* und *Ralstonia* (persönliche Mitteilung, Vandamme) steht, extrahiert und mittels analytischer Dünnschicht-Chromatographie detektiert.

Abbildung C.16 zeigt ausgewählte Vertreter der untersuchten Bakteriengruppen. Die beiden Vertreter von Genomovar I (LMG1222, R-1464) zeigten sehr unterschiedliche AHL-Profile. Während Stamm LMG1222 HHL und OHL in Mengen, wie man sie auch bei vielen anderen der untersuchten *Burkholderia* fand, produzierte, konnte in dem Extrakt von Stamm R-1464 nur ein sehr schwaches Signal an der für OHL typischen Position detektiert werden.

Für die Vertreter von Genomovar II (LMG13013, LMG16660, LMG17588, LMG1822, LMG18824, LMG18825) konnte, was die Menge an produzierten AHL-Molekülen angeht,

ein einheitlicheres Bild gewonnen werden. Die AHL-Extrakte aller sechs untersuchten Stämme lieferten - wenn überhaupt - nur äußerst schwache AHL-Signale. Im Vergleich zur Signalintensität des *B. cepacia* Typstammes (LMG1222) waren die Signale mindestens 20 mal schwächer. Die geringsten AHL-Mengen wurden in den Extrakten von Stamm LMG13010 detektiert. Darin konnte nur ein AHL-Molekül nachgewiesen werden, dessen Signal am besten mit dem  $R_f$ -Wert von ODHL ( $R_f$ -Wert 0,18) übereinstimmt. Die Extrakte der übrigen Stämme (LMG16660, LMG17588, LMG18822, LMG18824, LMG18825) lieferten bis zu drei, unterschiedlich stark ausgeprägte AHL-Signale. Im Falle des *B. cepacia* Stammes LMG17588 konnten neben schwachen Signalen für OHL und HHL auch Spuren eines weiteren Signals detektiert werden, dessen  $R_f$ -Wert jedoch mit 0,55 zu keinem bisher beschriebenen AHL-Molekül paßt.

Von den sechs untersuchten Stämmen (LMG12615, LMG14271, LMG16659, LMG18826, LMG18827, LMG18863), die dem Genomovar III angehören, zeigten drei (LMG14271, LMG16659, LMG18827) typische Mengen an HHL und OHL. Die drei übrigen Isolate (LMG12615, LMG18826, LMG18863) zeigten nur äußerst schwache Signale an diesen Positionen. In einem Fall (LMG12615) konnte auch hier, wie bereits bei Stamm LMG17588, ein zusätzliches Signal mit einem  $R_f$ -Wert von 0.55 detektiert werden.

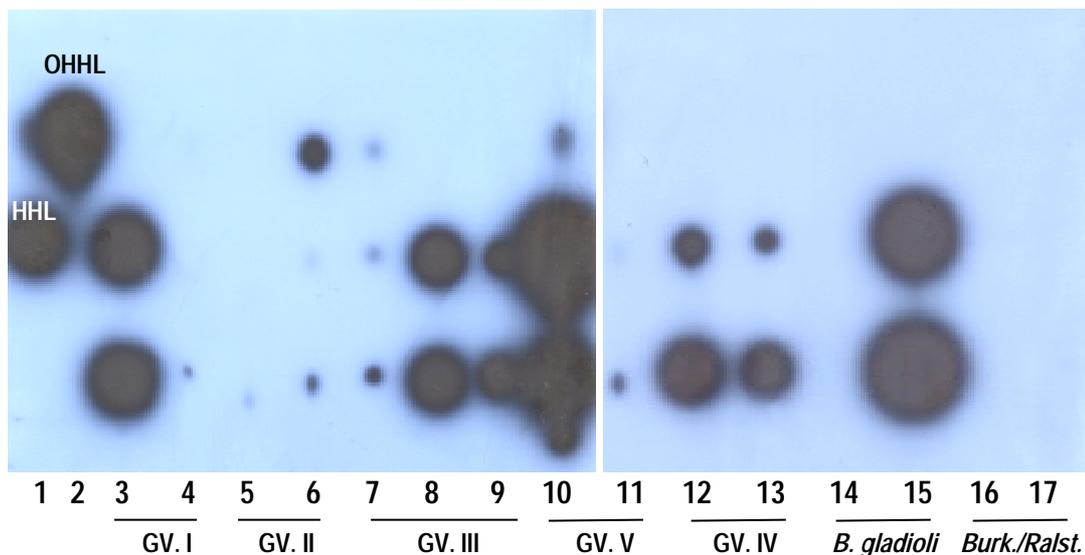
Von *B. vietnamiensis* (Genomovar V) wurden insgesamt fünf Stämme (LMG6998, LMG10929, LMG16232, LMG18835, LMG18836) untersucht. Bei allen Stämmen konnte die Produktion von HHL und OHL nachgewiesen werden; bei einem Vertreter (LMG16232) allerdings nur in sehr geringen Mengen. Zusätzlich zu diesen beiden AHL-Molekülen konnten in den AHL-Extrakten des Stammes LMG10929 mindestens drei weitere Signale detektiert werden. Die  $R_f$ -Werte von zwei dieser Signale entsprechen den typischen Positionen von DHL und OOHL. Bei dem dritten Signal mit einem  $R_f$ -Wert von 0,55 handelt es sich wahrscheinlich um das schon zuvor bei Vertretern von Genomovar II und III beobachtete Molekül, dessen Struktur zur Zeit ungeklärt ist.

Die beiden Bakterienstämme (LMG14291, LMG7000), die dem Genomovar IV angehören, zeigen, sowohl was die Typen als auch die Mengen an produzierten AHL Molekülen anbelangt, ein sehr ähnliches Muster. In beiden Fällen konnten Signale nachgewiesen werden, die sich an für HHL und OHL charakteristischen Positionen befinden.

Die beiden untersuchten *B. gladioli* Stämme (LMG18157, LMG2216) lieferten ein sehr heterogenes Bild. Während in den AHL-Extrakten des Stammes LMG2216 keinerlei AHL-Signal nachgewiesen werden konnten, produzierte der andere Stamm (LMG18157) die

größten Mengen an HHL und OHL, die bei allen untersuchten Burkholderien gefunden wurden.

Die beiden Vertreter der Gruppe, die phylogenetisch zwischen *Burkholderia* und *Ralstonia* angesiedelt ist (LMG16407, R-1465), konnte mit dem hier routinemäßig verwendeten Nährmedium selbst dann nicht bis zu der erforderlichen OD<sub>600nm</sub> von 1,0 kultiviert werden, wenn es mit Caseinhydrolysat (0,2%) angereichert wurde. Da beide Stämme lediglich bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von je 0,5 kultiviert werden konnten, wurde versucht, AHL-Moleküle aus diesen Kulturüberständen zu isolieren. Es konnten jedoch für keinen der beiden Stämme entsprechende Signale detektiert werden. Da in Kreuzstrich-Assays beide Stämme unter Verwendung des AHL-Sensors *E. coli* MT102 (pSB403) zwar schwache, jedoch eindeutig positive Signale lieferten, ist davon auszugehen, daß auch diese Bakteriengruppe in der Lage ist, AHL-Moleküle zu produzieren.



**Abbildung C.16:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion von AHL-Molekülen, die von ausgewählten Vertretern der *B.cepacia* Genomovare (GV) I-V, *B. gladioli* bzw. von zwei Stämmen, die phylogenetisch zwischen den Gattungen *Burkholderia* und *Ralstonia* angesiedelt sind, stammen. Die untersuchten Stämme wurden in AB-Minimalmedium mit 0,2% Glukose bzw. 0,2% Caseinhydrolysat (LMG16407, R-1465) - soweit möglich - bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 kultiviert und die AHL-Moleküle aus den Kulturüberständen extrahiert. Von den konzentrierten AHL-Extrakten wurden unterschiedliche Mengen auf die DC-Platte aufgetragen, da in Vorversuchen eine stark unterschiedliche Konzentration an AHL-Molekülen in den jeweiligen AHL-Extrakten gefunden wurde: (3) LMG1222 (GV I), 5 µl; (4) R-1465 (GV I), 30 µl; (5) LMG13010 (GV II), 30 µl; (6) LMG17588 (GV II), 30 µl; (7) LMG12615 (GV III), 30 µl; (8) LMG16659 (GV III), 5µl; (9) LMG14271 (GV III), 10µl; (10) LMG10929 (*B. vietnamiensis*), 5µl; (11) LMG16232 (*B. vietnamiensis*), 30 µl; (12) LMG7000 (GV IV), 10 µl; (13) LMG14291 (GV IV), 10µl ; (14) LMG2216 (*B. gladioli*), 30 µl; (15) LMG18157 (*B. gladioli*), 2,5 µl; (16) LMG16407 [*Burkholderia/Ralstonia*], 30 µl; (17) R-1465 [*Burkholderia/Ralstonia*], 30 µl. Zum Nachweis der AHL-Moleküle wurde der biolumineszente Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) und 7 ng HHL (1) bzw. 85 pg OHL (2) als Referenzen verwendet.

## C.5 Isolierung und Charakterisierung AHL-Molekülproduzierender Bakterien aus der Rhizosphäre von Tomaten

### C.5.1 Isolierung von Bakterien aus der Tomatenrhizosphäre

Die von Döbereiner (1995) beschriebene Methode erlaubt es, Bakterien gezielt aus der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen zu isolieren. Die im Rahmen dieser Untersuchungen verwendeten Tomatenpflanzen wurden von der Arbeitsgruppe Hartmann (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, München, D) zur Verfügung gestellt. Der nach einer speziellen Aufarbeitung des zerkleinerten Wurzelmaterials gewonnene Bakterienextrakt wurde auf verschiedene Nährmedien mit unterschiedlichen Selektivitäten ausplattiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden vereinzelt, mikroskopisch auf ihre Reinheit überprüft und archiviert. Nach 3-tägiger Inkubation wurde die Anzahl der Kolonien auf den verschiedenen Nährmedien ermittelt, um so die Eignung der verschiedenen Medien für eine Kultivierung von Rhizosphärenisolate vergleichen zu können. Wie die Ergebnisse von Tabelle C.4 zeigen, konnten mit allen Nährmedien Bakterien aus der Tomatenrhizosphäre kultiviert werden. Erwartungsgemäß wurden auf den komplexeren Nährmedien (LB-, SYK-, LMG2-Medium) mehr Kolonien pro ml Bakterienextrakt erhalten als auf den beiden verwendeten Minimalmedien (Minimalmedium-Succinat, -Fructose).

**Tabelle C.4:** Vergleich verschiedener Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien aus der Tomatenrhizosphäre.

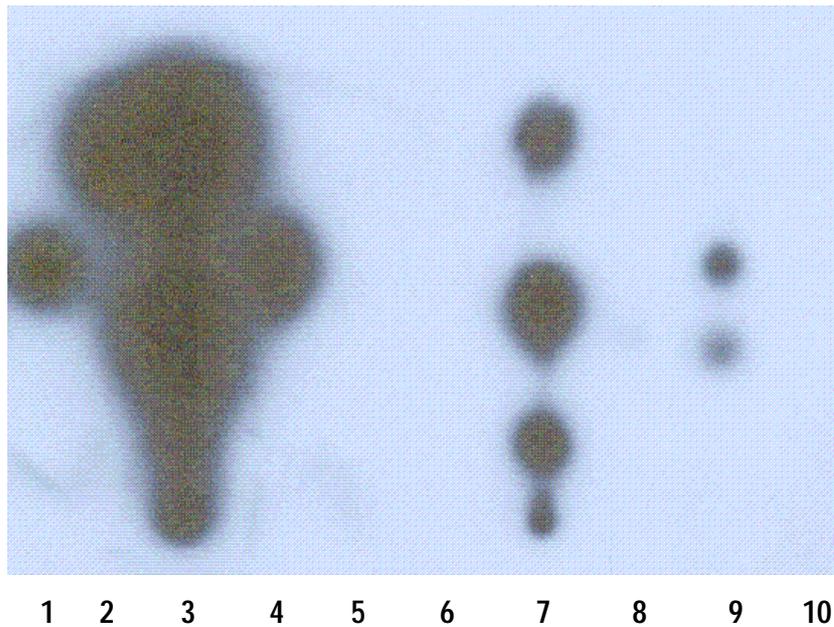
Kultivierungsmedium	Kolonien /ml Bakterienextrakt
LB-Medium	$1 \times 10^4$
SYK-Medium	$5 \times 10^3$
LMG2-medium	$1,5 \times 10^4$
Minialmedium-Succinat	$7 \times 10^2$
Minimalmedium-Fruktose	$3 \times 10^3$

### C.5.2 Untersuchung der Bakterienisolate auf die Produktion von AHL-Molekülen

Von den auf verschiedenen Nährmedien erhaltenen Bakterienisolaten wurden 60 Stämme ausgewählt, die in Kreuzstrich-Assays mit den Sensorstämmen *E. coli* MT102 (pSB403) und

*C. violaceum* CV026 auf die Produktion von AHL-Molekülen getestet wurden. Um ein breites Spektrum an verschiedenen Bakterienspezies zu untersuchen, wurden Isolate von verschiedenen Nährmedienplatten und mit möglichst unterschiedlicher Koloniemorphologie ausgewählt. Unter Verwendung der hochsensitiven Photonenkamera konnte bei 13 Isolaten die Produktion von AHL-Molekülen anhand der Lichtemission des biolumineszenten Sensorplasmids pSB403 nachgewiesen werden. Von diesen Stämmen waren 3 zudem in der Lage, die Synthese von Violacein im *Chromobacterium*-Sensor anzuregen (Isolat 1, 2 und 7). Um sich ein genaueres Bild von den Typen und den Mengen der produzierten AHL-Moleküle machen zu können, wurden die AHL-positiven Stämme in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 kultiviert und anschließend die produzierten AHL-Moleküle aus den abzentrifugierten Kulturüberständen extrahiert. Da die Dichlormethanextrakte sehr unterschiedliche Konzentrationen an AHL-Molekülen aufwiesen, wurden Vorversuche durchgeführt, um möglichst gleiche AHL-Mengen auf die DC-Platte auftragen zu können. Dabei wurde festgestellt, daß in den Extrakten von fünf Stämmen die AHL-Konzentration zu niedrig für eine zweifelsfreie Detektion war. In den AHL-Extrakten der übrigen acht Stämme konnten unter Verwendung der beiden Biosensoren *E. coli* MT102 (pSB403) und *A. tumefaciens* A136 die Produktion verschiedener AHL-Moleküle nachgewiesen werden. Abbildung C.17 zeigt AHL-Profile der Isolate 1, 2, 5 und 7, die mit dem *E. coli*-Sensor detektiert werden konnten. Die Stämme 1 und 5 zeigen die Produktion von mindestens vier verschiedenen AHL-Molekülen, deren Wanderungsgeschwindigkeit am besten mit den R<sub>f</sub>-Werten von OdDHL, ODHL, OOHL und OHHL übereinstimmt. Bei den von Stamm 2 bzw. 7 produzierten AHL-Molekülen handelt es sich wahrscheinlich um HHL bzw. einer Mischung aus HHL und OOHL.

Im Falle der Isolate 3, 4, 6 und 8 konnten nur durch den Einsatz des *Agrobacterium*-Sensors AHL-Moleküle detektiert werden. Die sehr diffusen Spots wiesen in allen Fällen R<sub>f</sub>-Werte zwischen 0,47 und 0,41 auf und deuten somit auf die Produktion von HHL und/oder OOHL in den entsprechenden Isolaten hin (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung C.17:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion von AHL-Molekülen, die von Bakterienisolaten aus der Tomatenrhizosphäre stammen. Die untersuchten Stämme wurden in LB-Medium bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 kultiviert und die AHL-Moleküle aus den zentrifugierten Kulturüberständen extrahiert. Von den konzentrierten AHL-Extrakten wurden die angegebenen Mengen auf die DC-Platte aufgetragen: (3) Isolat 1, 0,3  $\mu$ l; (4) Isolat 2, 20  $\mu$ l; (5) Isolat 3, 30  $\mu$ l; (6) Isolat 4, 30  $\mu$ l; (7) Isolat 5, 2  $\mu$ l; (8) Isolat 6, 30  $\mu$ l; (9) Isolat 7, 3  $\mu$ l; (10) Isolat 8, 30  $\mu$ l. Zum Nachweis der AHL-Moleküle wurde der biolumineszente Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) verwendet und als Referenzen 7 ng HHL (1) bzw 85 pg OHHL (2) auf die DC-Platte aufgetragen.

### C.5.3 Identifizierung der Rhizosphärenisolate

Zur Klärung der phylogenetischen Zugehörigkeit der AHL-positiven Bakterien aus der Tomatenrhizosphäre wurde die 16S-rDNS der Isolate sequenziert. Die 16S-rDNS wurde dazu mit den Primern 616V und 630R (siehe `B.9.4 Primer`) amplifiziert und die aufgereinigten PCR-Produkte direkt sequenziert. Unter Verwendung des Licor-Systems wurden von den einzelnen Isolaten zwischen 970 und 1430 Basen sequenziert und mit Hilfe des Software-Pakets `ARB` die Bakterien phylogenetisch zugeordnet. Tabelle C.5 zeigt die Zuordnung der Rhizosphärenisolate zu Organismengruppen gemäß ihrer 16S-rRNS Sequenz.

**Tabelle C.5:** Identifizierung der Rhizosphärenisolate und produzierte AHL-Moleküle, nachgewiesen mit den AHL-Sensoren *E. coli* MT102 (pSB403) und *A. tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372).

Rhizosphärenisolat	Organismus	Anzahl sequenzierter Basen	Produzierte AHL-Moleküle
Isolat 1	<i>Rahnella aquatilis</i>	970	OdDHL, ODHL, OOHL, OHHL
Isolat 2	<i>Enterobacter agglomerans</i>	1013	HHL
Isolat 3	<i>Enterobacter sakazakii</i>	981	HHL/OOHL
Isolat 4	<i>Enterobacter agglomerans</i>	1036	HHL/OOHL
Isolat 5	<i>Pseudomonas putida</i>	1430	OdDHL, ODHL, OOHL, OHHL
Isolat 6	<i>Burkholderia</i> sp.	1035	HHL/OOHL
Isolat 7	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1030	HHL, OOHL
Isolat 8	<i>Burkholderia</i> sp.	1018	HHL/OOHL

## D. Diskussion

### D.1 Nachweis von AHL-Molekülen mit bakteriellen Biosensoren nach dünn- schichtchromatographischer Auftrennung

Die Detektion von AHL-Molekülen mit bakteriellen Biosensoren im Anschluß an eine Umkehrphasen-Dünnschicht-Chromatographie (DC) nach der von Shaw *et al.* (1997) entwickelten Methode gibt Aufschluß darüber, ob und in welchen Konzentrationen AHL-Moleküle in den Kulturüberständen der untersuchten Bakterien vorhanden sind. Mit dieser Technik kann somit innerhalb von zwei bis drei Tagen ohne großen apparativen Aufwand jedes kultivierbare Bakterium auf die Produktion von AHL-Molekülen hin untersucht werden. Eine vorläufige Identifikation der verschiedenen AHL-Moleküle erfolgt dabei anhand der für jedes Molekül charakteristischen Wanderungsgeschwindigkeit während der dünn-  
schichtchromatographischen Auftrennung ( $R_f$ -Wert) und durch den Vergleich mit synthetisch hergestellten Referenzsubstanzen. Für eine genauere Aufklärung der AHL-Molekülstrukturen kann die beschriebene Methode mit verschiedenen chemischen Analysetechniken kombiniert werden. Für eine massenspektroskopische Analyse kann man beispielsweise AHL-Moleküle im Rahmen einer präparativen Dünnschicht-Chromatographie aus dem abgekratzten Trennschichtmaterial der DC-Platten extrahieren und die aufgereinigten Substanzen in einer Tandem Massenspektroskopie (MS) mit synthetischen Referenzen vergleichen (Swift *et al.*, 1997). Eine eindeutige stereochemische Analyse unbekannter Substanzen ist jedoch auch mittels MS nicht möglich. Zur Aufklärung der stereochemischen Verhältnisse neuer Moleküle werden zumeist  $^3\text{H}$ -Protonen- und  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanzspektroskopie (NMR) eingesetzt (Bainton *et al.*, 1992).

Den oben beschriebenen Vorteilen, die sich aus der Verwendung von Biosensoren zum Nachweis von AHL-Molekülen ergeben, stehen jedoch auch verschiedene Einschränkungen gegenüber, die beim Einsatz dieser Technik berücksichtigt werden müssen. Zunächst ist zu beachten, daß beim Einsatz von Biosensoren zur Detektion von AHL-Molekülen der Nachweis auf die Moleküle beschränkt ist, auf die der verwendete Biosensor reagiert. Im Falle des Sensorplasmids pSB403 und des Sensors *A. tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372) konnte gezeigt werden, daß beide Systeme die ausgewählten AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von C4 bis C14 detektieren können und somit in der Lage sind, ein breites Spektrum an AHL-Molekülen zu detektieren. Das Sensorplasmid pSB1075 und der

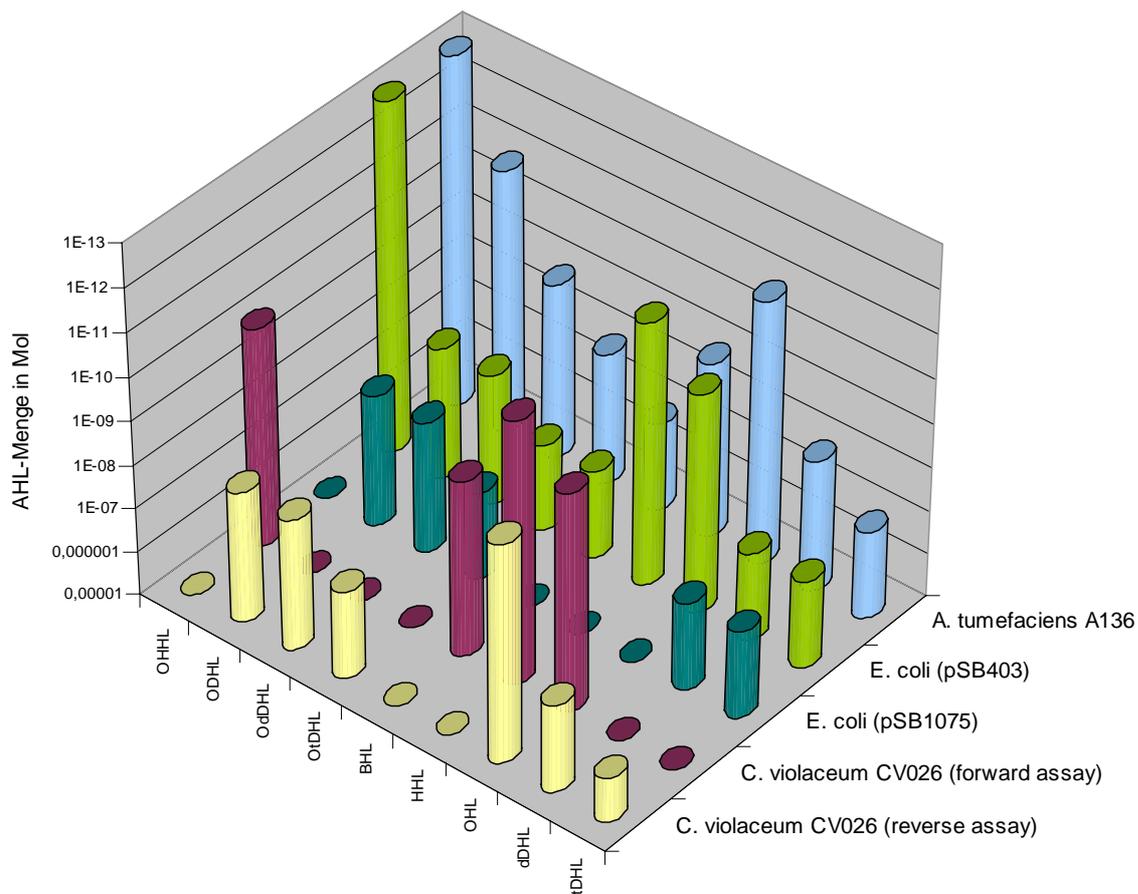
*C. violaceum* CV026 Sensor erwiesen sich dagegen als sehr spezifisch für bestimmte AHL-Moleküle. Mit dem Sensorplasmid pSB1075 wurden AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von C10 bis C14 nachgewiesen. Der *C. violaceum* CV026 Sensor reagierte auf AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von C4 bis C8 oder bei Verwendung des sogenannten `Reverse Assay`, einer speziellen Variante zur Detektion langkettiger AHL-Moleküle, auf AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von C10 bis C14. Je weniger Ähnlichkeit die AHL-Moleküle mit dem für den Rezeptor optimal passenden Molekül aufweisen desto unempfindlicher ist der Nachweis. Durch eine künstliche Erhöhung der Rezeptorkonzentration in der Zelle (z.B. durch den Einsatz von Sensorplasmiden mit hoher Kopienzahl) ist es möglich, die Spezifität der Rezeptor-AHL-Bindung zu erniedrigen und somit das Spektrum an nachweisbaren AHL-Molekülen zu vergrößern (Zhang *et al.*, 1993; Kuo *et al.*, 1996; Eberhard *et al.*, 1996; Shaefer *et al.*, 1996; Passador *et al.*, 1996).

Abbildung D.1 zeigt die Sensitivitäten und Spezifitäten der bei dieser Arbeit verwendeten AHL-Sensoren gegenüber den getesteten AHL-Molekülen. Die dargestellten Nachweisgrenzen beziehen sich auf den Einsatz der Biosensoren im Anschluß an eine analytische DC bei den unter `B.3.3.3 Detektion von AHL-Molekülen mittels Dünnschicht-Chromatographie` beschriebenen Standardbedingungen. Je nach Einsatzzweck kann somit der passende Biosensor verwendet werden. Für `cross-streak` Assays zum Screening größerer Mengen von Bakterienstämmen auf die Produktion von AHL-Molekülen haben sich wegen ihrer einfachen Handhabung vor allem der *E. coli* MT102 (pSB403) und der *C. violaceum* CV026 Sensor bewährt. In der Regel wurden für derartige Untersuchungen beide Sensoren verwendet, da sich deren Nachweisempfindlichkeiten sehr gut ergänzen. Bei DCs hat sich zudem der *A. tumefaciens* A136 Sensor wegen seiner hohen Sensitivität als sehr nützlich erwiesen. Um mit diesem Sensor optimale Ergebnisse zu erzielen, ist allerdings ein spezielles Nährmedium und eine sorgfältige zweitägige Vorkultivierung nötig, die den Einsatz dieses Sensors im Vergleich zu den anderen etwas aufwendiger machen.

Bei der Auswertung analytischer DCs muß stets bedacht werden, daß man aus dem Fehlen eines Signals nicht schließen kann, daß der untersuchte Bakterienstamm ein bestimmtes bzw. überhaupt keine AHL-Moleküle produziert. Dieser Organismus könnte entweder AHL-Moleküle herstellen, die von den zur Verfügung stehenden Biosensoren nicht detektiert werden oder die Mengen der produzierten AHL-Moleküle könnten zu gering für eine mögliche Detektion sein (Shaw *et al.*, 1997). Um das Vorkommen und die Funktion von AHL-Molekülen in Zukunft noch besser beschreiben zu können, wird es nötig sein, neue Biosensoren zu entwickeln, die noch empfindlicher auf die verschiedenen AHL-Moleküle

reagieren. Von Thomson *et al.* (2000) wurde beispielsweise ein völlig neuer Sensor entwickelt, der auf dem `quorum sensing`-System von *Serratia marcescens* basiert, das neben der Produktion des Antibiotikums Carbapenem auch die Herstellung des roten Pigments Prodigiosin kontrolliert. Mit diesem Sensor können AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge zwischen C4 und C8 sehr empfindlich detektiert werden, insbesondere auch das AHL-Molekül OBHL, dessen Nachweis zuvor wegen der geringen Sensitivität der übrigen Biosensoren gegenüber diesem Molekül kaum möglich war.

Neben den AHL-Molekülen wurde mittlerweile eine zweite Gruppe chemischer Substanzen entdeckt, die in der Lage sind, AHL-Biosensoren zu aktivieren. Dabei handelt es sich um zyklische Dipeptide, deren Detektionslimit bei einer Konzentration von ca. 0,2 mM liegt und somit um ein vielfaches höher als beispielsweise die Nachweisgrenze von OHHL (ca. 1,0 nM) ist. Da diese Moleküle jedoch ähnliche physikochemische Eigenschaften wie kurzkettenige AHL-Moleküle aufweisen und damit ähnliche  $R_f$ -Werte bei chromatographischen Analysen ergeben, ist für eine eindeutige Identifizierung interessanter Moleküle die chemische Strukturanalyse mit MS- und NMR-Techniken notwendig. Bisher wurden zyklische Dipeptide in den Kulturüberständen von *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* und *Proteus mirabilis* entdeckt (Holden *et al.*, 1999). Außerdem konnte in verschiedenen Versuchen gezeigt werden, daß einige dieser Moleküle eine kompetitive Wirkung zu OHHL/LuxR-induzierter Biolumineszenz aufweisen und daher möglicherweise um dieselbe Bindungsstelle am LuxR-Zielprotein konkurrieren. Obwohl die genaue physiologische Funktion dieser Moleküle noch geklärt werden muß, handelt es sich dabei vermutlich um eine neue Gruppe von Signalmolekülen, die möglicherweise mit den `quorum sensing`-Systemen der oben genannten Bakterien interagieren können (Holden *et al.*, 1999).



**Abbildung D.1:** Sensitivitäten und Spezifitäten der verwendeten AHL-Sensoren gegenüber ausgewählten AHL-Molekülen. Die Höhen der Säulen spiegeln die Nachweisempfindlichkeit gegenüber den angegebenen AHL-Molekülen wider. Zur Erstellung des Diagramms wurden die in den Tabellen C.1-C.3 angegebenen AHL-Mengen verwendet, die im Routineinsatz von den jeweiligen AHL-Sensoren in Kombination mit der Dünnschicht-Chromatographie detektiert werden konnten. Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der Sensoren wurde höchstens 1  $\mu$ Mol der verschiedenen AHL-Moleküle eingesetzt.

## D.2 Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Produktion von AHL-Molekülen am Beispiel von *P. aeruginosa*

Aufgrund eigener Erfahrungen bei der Untersuchung AHL-Molekülproduzierender Bakterien und einer Reihe von Anhaltspunkten, die sich aus früheren Studien zum Thema AHL-vermittelte Kommunikation ergeben, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluß verschiedener physiologischer Parameter auf die Produktion von AHL-Molekülen untersucht. Durch Variation der Kohlenstoffkomponente des verwendeten Nährmediums konnten in verschiedenen Versuchen erhebliche Auswirkungen auf die Konzentration der

unterschiedlichen AHL-Moleküle in den Überständen der untersuchten *P. aeruginosa* Kulturen beobachtet werden. Dabei führte sowohl die Verwendung von Caseinhydrolysat als auch von Citrat als Kohlenstoffquelle zu einer erheblich reduzierten Menge an AHL-Molekülen im Vergleich zu den Kulturen, die in Nährmedium mit Glukose angezogen wurden.

Für die Produktion der AHL-Moleküle ist in *P. aeruginosa* wie in den meisten anderen bisher untersuchten Gram-negativen Bakterien eine *N*-Acyl-L-homoserinlacton-Synthase (LuxI Homolog) verantwortlich, welche die Herstellung von AHL-Molekülen aus den beiden Komponenten Acyliertes Acyl-Carrierprotein (Acyl-ACP) und S-Adenosylmethionin (AdoMet) katalysiert (Parsek *et al.*, 1999). Da Acyl-ACP während der Fettsäurebiosynthese gebildet wird, hat der Zellstoffwechsel unmittelbaren Einfluß auf die Synthese der verschiedenen AHL-Moleküle, wie Untersuchungen an *V. harveyi* (Cao und Meighen, 1993) und *A. tumefaciens* (Val und Cronan, 1998) gezeigt haben. Hier konnte durch die externe Zugabe von Fettsäuren die Synthese von AHL-Molekülen um bis zu 60% reduziert werden. Offensichtlich scheint sich die Zugabe von freien Aminosäuren und wasserlöslichen Peptiden, die hier in Form von Caseinhydrolysat dem Nährmedium zugegeben wurden, in ähnlicher Weise auf die Synthese der AHL-Moleküle auszuwirken. Diese Beobachtung ist insbesondere für die praktische Arbeit von Bedeutung, da es sich bei Caseinhydrolysat um eine Kohlenstoffquelle handelt, die in vielen häufig verwendeten Nährmedien den Hauptbestandteil ausmacht.

Im Laufe der Untersuchungen zum Einfluß der Kohlenstoffquelle Citrat auf die Produktion von AHL-Molekülen zeichnete sich ab, daß der pH-Wert des Nährmediums während der Kultivierung einen weiteren entscheidenden Parameter darstellt, der bei der Anzucht der Bakterien berücksichtigt werden muß.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zum Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität der AHL-Moleküle wurde deutlich, daß bereits eine geringe Änderung des pH-Wertes um +/- 0,5 in dem für die meisten Bakterien physiologisch relevanten Bereich von pH 6 bis pH 8 merkliche Auswirkungen auf die Konzentration an AHL-Molekülen hatte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen früherer Studien wurden jedoch bei den durchgeführten DC-Analysen, die sowohl die Auswirkung verschiedener pH-Werte auf synthetisch hergestelltes OHHL als auch auf AHL-Extrakte von *P. aeruginosa* Kulturüberständen beschrieben, keinerlei Signale entdeckt, die von Abbauprodukten der AHL-Moleküle stammen könnten. Bei Arbeiten zur AHL-Produktion in *A. tumefaciens* wurde von Zhu *et al.* (1998) in AHL-

Extrakten der Kulturüberstände ein Signal detektiert, das aufgrund seines Wanderungsverhaltens auf der DC-Platte keinem bisher bekannten AHL-Molekül zugeordnet werden konnte. Ein Signal mit demselben  $R_f$ -Wert konnte jedoch durch Inkubation von synthetisch hergestelltem OOHL in alkalischen Lösungen bei pH 13 erzeugt werden. Bei dieser Behandlung kommt es durch eine spontane Hydrolyse der AHL-Moleküle zu einer Öffnung des Lactonrings und damit zur Umwandlung der Moleküle zu 3-oxo-C8-Homoserin. Wie die DC-Analysen bewiesen, werden diese Molekülstrukturen mit dem *A. tumefaciens*-Sensor A136 ebenfalls detektiert. Nach Ansicht der Autoren läßt sich dies damit erklären, daß diese Substanzen entweder in ihrer azyklischen Form von dem Sensor nachgewiesen werden können oder daß sie während der Trocknung der DC-Platte wieder einen Lactonring ausbilden.

Eine Erklärung für das Ausbleiben dieser Abbauprodukte bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten ist womöglich in den verschiedenen pH-Bereichen zu finden, bei denen die Versuche durchgeführt wurden. Während die Entstehung der von Zhu *et al.* (1998) beschriebenen Abbauprodukte durch stark alkalischen Bedingungen (pH 13) begünstigt wird, kamen bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche lediglich Puffer bzw. Kulturmedien mit pH-Werten von pH 6 bis 8 zum Einsatz.

Obwohl man über die Versorgung von Bakterien mit Nährstoffen im Verlauf einer bakteriellen Infektion noch wenig weiß, so wurde doch die Rolle von Eisen während dieses Prozesses bereits eingehend erforscht (Barclay, 1985). Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß während einer *P. aeruginosa* Infektion Eisenmangel auftritt. Ursache dafür sind verschiedene organische Komplexe (Transferrin, Lactoferrin, Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex) des Wirtsorganismus, die sowohl intra- als auch extrazelluläres Eisen binden und damit die Konzentration an frei verfügbarem Eisen niedrig halten (van Asbeck *et al.*, 1983; Finkelstein *et al.*, 1983). Um die für den eigenen Stoffwechsel notwendigen Eisenkonzentrationen zu mobilisieren, verfügen die meisten Bakterien über sogenannte Eisenchelatierende Verbindungen, die als Siderophore bezeichnet werden.

In *P. aeruginosa* ist bisher die Produktion der beiden Siderophore Pyochelin (Cox, 1980) und Pyoverdin (Cox und Adams, 1985) beschrieben worden. Von den beiden Verbindungen stellt Pyoverdin das größere und komplexere Molekül dar und ist mit seinem Chromophor, der sich aus einer Peptidkette, die mit einem Hydroxychinolinrest verbunden ist, zusammensetzt, für die typische Farbe und die gelb-grüne Fluoreszenz von *P. aeruginosa* verantwortlich (Budzikiewicz, 1993). Die an der Pyoverdinbiosynthese beteiligten Gene wurden kartiert und

drei bestimmten Bereichen auf dem PAO-Chromosom zugewiesen (Hohnadel *et al.*, 1986; Stinzi *et al.*, 1996). Frühere Studien haben zudem gezeigt, daß die Produktion von Pyoverdin durch Eisenmangel aktiviert wird (Meyer und Abdallah, 1978). Dafür verantwortlich ist ein Regulatorprotein, das zum Fur-Repressor homolog ist, der die Produktion von Siderophoren in *E. coli* steuert (Prince *et al.*, 1993). Das Fur-Protein induziert jedoch die Pyoverdinsynthese nicht direkt, sondern kontrolliert die Genexpression des alternativen Sigmafaktors PvdS, dessen Produktion für die Transkription einer Reihe weiterer Pyoverdin-Gene Voraussetzung ist (Cunliffe *et al.*, 1995; Leoni *et al.*, 1996). Daß noch ein weiterer Regulator, nämlich LasR, Einfluß auf die Produktion von Pyoverdin ausübt, konnten Stinzi *et al.* (1980) durch Untersuchungen an *P. aeruginosa* zeigen und damit eine Verbindung zwischen dem 'quorum sensing'-System und dem Eisenmetabolismus in *P. aeruginosa* nachweisen. Experimente mit *P. aeruginosa* PAO ließen in *lasR* Mutanten eine verminderte Pyoverdinproduktion erkennen, und zudem konnte in einer *lasI* Mutante, die im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls geringere Mengen an Pyoverdin produzierte, durch die externe Zugabe von OdDHL die Siderophorproduktion gesteigert werden. Vor diesem Hintergrund, daß offensichtlich das 'quorum sensing'-System neben der Eisenkonzentration wesentlichen Einfluß auf die Siderophorproduktion hat, wurde in vorliegender Arbeit untersucht, ob *P. aeruginosa* PAO in Nährmedien mit verschiedenen Eisenkonzentrationen unterschiedliche Mengen oder Typen an AHL-Molekülen produziert. Gleichzeitig wurde die Pyoverdinkonzentration in den Kulturüberständen ermittelt. Es zeigte sich, daß mit zunehmender Eisenkonzentration des Mediums die Siderophorkonzentration deutlich abnahm. Daß in den AHL-Extrakten der verschiedenen Ansätze bei allen Eisenkonzentrationen dieselben AHL-Molekülmengen gefunden wurden, ist ein Hinweis, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen die unterschiedlichen Pyoverdinkonzentrationen nicht mit der Konzentration an AHL-Molekülen im Kulturüberstand korrelieren. Die Ähnlichkeit der verschiedenen AHL-Profile bestätigt hingegen, daß die Konzentration der AHL-Moleküle in erster Linie von der Zelldichte und nicht von der Eisenmenge abhängt. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ist wohl davon auszugehen, daß dem 'quorum sensing'-System bei der Regulation der Pyoverdinproduktion eher eine Aufgabe in der Feinabstimmung zukommt. Auch die Tatsache, daß sowohl die *lasR* als auch die *lasI* Mutante noch ca. 60 % der Wildtyp-Pyoverdinmenge produzieren (Stinzi *et al.*, 1980), macht deutlich, daß andere Regulatoren bei der Siderophorproduktion in *P. aeruginosa* eine übergeordnete Rolle spielen dürften.

Eine niedrige Eisenkonzentration ist jedoch nur eines von mehreren möglichen Umweltsignalen, die bei einer bakteriellen Infektion die Expression von Virulenzfaktoren

induzieren können. Bei *in vitro* Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa* in Atemwegsmucus wurden zwei Gene, *np20* und *migA*, identifiziert, die erst in Gegenwart des Atemwegssekrets induziert werden (Lory *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Bei *np20* handelt es sich um ein Gen, das Homologien zu verschiedenen Transkriptionsaktivatoren aufweist, und *migA* zeigt Ähnlichkeiten zu Genen, die an der Biosynthese der O-Seitenkette der Lipopolysaccharidschicht der bakteriellen Zellwand beteiligt sind. Da die Expression dieser beiden Gene unbeeinflusst von der Konzentration an verfügbarem Eisen ist, müssen andere Umweltsignale möglicherweise im Zusammenspiel mit dem `quorum sensing`-System für die Regulation dieser Virulenzfaktoren verantwortlich sein. Von der Arbeitsgruppe Cohen (University of Rhode Island, USA) wurde das Lungenphospholipid Monopalmitoyl-Phosphatidinsäure (MPPA) entdeckt und charakterisiert, das sich durch die fortschreitende Gewebeerstörung im Laufe einer *P. aeruginosa* Infektion in den betroffenen Organen und damit auch in den Atemwegssekreten ansammelt und dabei die weitere Synthese der Elastase hemmt, ohne jedoch das Wachstum der Bakterien oder die Siderophorsynthese zu beeinflussen. Interessanterweise wurde in einigen Arbeiten gezeigt, daß eine Vielzahl von *P. aeruginosa* Stämmen, die aus Sputa chronisch infizierter Patienten isoliert wurden, erheblich weniger Elastase und alkalische Protease produzieren als die Stämme, mit welchen sich die Patienten ursprünglich infizierten (Fegan *et al.*, 1990; Jagger *et al.*, 1983; Luzar und Montie, 1985). Es kann daher vermutet werden, daß es im Verlauf einer chronischen Infektion für *P. aeruginosa* von Vorteil ist, nur bestimmte Virulenzfaktoren zu produzieren, um im Wirt persistieren zu können.

Bei Untersuchungen zur Wirkungsweise der Phospholipide wurde anhand von MPPA festgestellt, daß diese Substanzen in der Lage sind, sowohl Calcium als auch Magnesium zu komplexieren und sich damit ähnlich wie EDTA (Ethylendiamintetraacetat) verhalten, das ebenfalls in der Lage ist, neben anderen Kationen auch mit Calcium und Magnesium reversibel Chelatkomplexe zu bilden. Es wurde gezeigt, daß *P. aeruginosa* Kulturen, die in LB-Medium mit 2 bis 128 µM EDTA kultiviert wurden, ein normales Wachstum und eine normale Pyoverdinsynthese aufwiesen. Während jedoch in Gegenwart von 2 bis 16 µM EDTA normale Konzentrationen an Exoprotease gefunden wurden, zeigten die zellfreien Überstände der übrigen Ansätze mit höheren EDTA-Konzentrationen keine Exoproteaseaktivität. Da in weiteren Versuchen gezeigt werden konnte, daß die Zugabe von 32 bis 128 µM EDTA zu zellfreien Überständen von spätlogarithmischen *P. aeruginosa* LB-Kulturen keinen inhibierenden Einfluß auf die Proteaseaktivität der einzelnen Ansätze hatte, kann davon ausgegangen werden, daß EDTA und wahrscheinlich auch MPPA nicht die

Aktivität der Protease, sondern vor allem ihre Sekretion oder Synthese beeinflussen (Cohen, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollten klären, ob unterschiedliche EDTA-Konzentrationen in Nährmedien Einfluß auf die Menge an AHL-Molekülen in den Kulturüberständen haben und damit für die verminderte Expression verschiedener Virulenzfaktoren während einer chronischen Infektion verantwortlich sein könnten. Da in keinem der untersuchten Kulturüberstände wesentliche Unterschiede in der Konzentration an AHL-Molekülen als Reaktion auf die unterschiedlichen EDTA-Mengen im Nährmedium festgestellt wurden, gibt es momentan keinen Beleg für die Wirkungsweise von EDTA oder MPPA.

### D.3 AHL-Produktion klinischer *P. aeruginosa* Isolate

*P. aeruginosa* ist ein opportunistisch humanpathogener Keim, der vor allem bei immunsupprimierten Patienten häufige Ursache schwerer Infektionen ist (Pollack, 1990). Insbesondere im Zusammenhang mit der Erbkrankheit Mukoviszidose stellt dieser Erreger ein ernstes Problem dar, da es hier zu einer chronischen Kolonisierung der Atemwege mit einhergehender Zerstörung der betroffenen Organe kommt (Govan und Deretic, 1996). Für die Expression zahlreicher Virulenzgene ist in *P. aeruginosa* ein `quorum sensing`-System verantwortlich, daß auf den LuxR/LuxI homologen Regulatoren LasR/LasI und RhlR/RhII beruht (Bainton *et al.*, 1992; Gambello und Iglewski, 1991). Mit der Entdeckung des *luxI* homologen Gens *lasI* konnte gezeigt werden, daß diese Autoinducer-Synthese neben geringen Mengen an OHHL und OOHL vor allem OdDHL produziert (Passador *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1994). Die zweite bisher in *P. aeruginosa* charakterisierte Autoinducersynthese RhII ist für die Synthese der beiden Moleküle BHL und HHL in einem Verhältnis von 15:1 verantwortlich (Pearson *et al.*, 1995; Winson *et al.*, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, daß die Expression des Rhl `quorum sensing`-Systems vom Las `quorum sensing`-System abhängig ist (Latifi *et al.*, 1996), so daß beide Systeme Teil einer hierarchisch organisierten `quorum sensing`-Kaskade sind (Williams *et al.*, 1996). Wie die DC-Analysen der AHL-Extrakte, die aus den Kulturüberständen ausgewählter *P. aeruginosa* Isolate gewonnen wurden, zeigen, konnte für einige der untersuchten Stämme (AHL-Profil 4-6 in Abbildung C.15, A/B) mit den beiden Sensoren *E. coli* (pSB403) und *C. violaceum* CV026 die Produktion aller bisher in *P. aeruginosa* identifizierter AHL-Moleküle (BHL, OHHL, HHL, OOHL, OdDHL) anhand ihrer spezifischen  $R_f$ -Werte bestätigt werden. Interessanterweise

wurden noch zwei zusätzliche Spots identifiziert, die sich an den für ODHL ( $R_f$ -Wert: 0,18) und OtDHL bzw. dDHL (beide  $R_f$ -Wert: 0,02) charakteristischen Positionen auf der DC-Platte befinden. Ähnliche *P. aeruginosa* AHL-Profile wurden bereits von Shaw *et al.* (1997) mit Hilfe des *A. tumefaciens* NT1 (pDCI41E33) Sensors bei der Analyse von *P. aeruginosa* PAO1 Extrakten gefunden. Allerdings war mit der in dieser Arbeit verwendeten Sensorkombination eine differenziertere Detektion der verschiedenen AHL-Moleküle möglich. So erlaubte der *E. coli* Sensor einen sehr viel aussagekräftigeren Nachweis insbesondere der länger-kettigen AHL-Moleküle und mit dem *C. violaceum* Sensor konnte auch BHL, das von den anderen Sensoren nur sehr insensitiv detektiert wird, nachgewiesen werden. Ob die beiden langkettigen AHL-Moleküle ODHL und OtDHL bzw. dDHL von einer der beiden bisher beschriebenen Autoinducer-Synthasen LasI und RhlI produziert werden oder ob möglicherweise eine dritte, noch nicht charakterisierte Autoinducer-Synthase für deren Herstellung verantwortlich ist, ist zur Zeit noch unklar und muß in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Wie gezeigt werden konnte, variiert die Produktion an AHL-Molekülen zwischen verschiedenen *P. aeruginosa* Isolaten sehr stark. Es konnten sogar Isolate identifiziert werden, die unter den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kultivierungsbedingungen nur noch so geringe Mengen an AHL-Molekülen herstellen, daß diese mit den beiden Sensoren kaum mehr nachgewiesen werden konnten. Um eindeutig zu klären, ob diese Bakterien überhaupt in der Lage sind, detektierbare Mengen an AHL-Molekülen zu produzieren, wurden sie unter individuell optimierten Wachstumsbedingungen angezogen und die hergestellten AHL-Extrakte zusätzlich konzentriert. In vielen Fällen wirkte sich beispielsweise Glycerin als Kohlenstoffquelle günstig auf die Menge an produzierten AHL-Molekülen aus, so daß zumindest schwache Signale mit einem für HHL typischen  $R_f$ -Wert detektiert werden konnten. Dadurch konnte gezeigt werden, daß alle untersuchten *P. aeruginosa* Isolate zur Produktion von AHL-Molekülen befähigt sind.

Das Auftreten von Stämmen, in deren Überständen lediglich HHL gefunden werden konnte, ist genaugenommen mit dem oben beschriebenen Regulationssystem, wonach das Rhl `quorum sensing`-System mit den dazugehörigen AHL-Molekülen HHL und BHL unter der Kontrolle des Las `quorum sensing`-Systems mit den AHL-Molekülen OdDHL, OoHL und OHHL steht, nicht zu vereinbaren. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte eine sehr niedrige Konzentration der von LasI produzierten AHL-Moleküle sein, so daß diese zwar in den Kulturüberständen vorhanden sind, von den Sensoren aber nicht detektiert werden können. Es könnten aber auch alternative Regulationsmechanismen für die Herstellung der

von RhlI produzierten AHL-Moleküle in diesen Stämmen wirksam sein. Sowohl *lasI* als auch *rhlI* Mutanten produzieren immer noch geringe Mengen an Rhamnolipiden und Elastase und eine völlige Unterdrückung beider Phänotypen ist nur in einer *lasI/rhlI* Doppelmutante möglich (Pearson *et al.*, 1997). Es ist daher wohl davon auszugehen, daß beide Systeme auch unabhängig voneinander funktionstüchtig sind und sich zumindest teilweise ersetzen können. So zeigte Pesci *et al.* (1997), daß obwohl LasR/OddHDL und RhlR/BHL bevorzugt an die Promotoren von *lasB* bzw. *rhlAB* binden, LasR/OddHDL auch die Expression von *rhlAB* und RhlR/BHL auch die Produktion von LasB steuern kann.

Bei Patienten, die an Mukoviszidose leiden, durchläuft *P. aeruginosa* im Verlauf einer chronischen Infektion der Atemwege zahlreiche phänotypische Veränderungen als Anpassung an die speziellen Lebensbedingungen in der Lunge. Derartige *P. aeruginosa* Stämme synthetisieren beispielsweise große Mengen des Exopolysaccharides Alginate (Fegan *et al.*, 1990), gewöhnlich fehlen ihnen Pili und Flagellen (Mahenthiralingam *et al.*, 1994). Sie weisen keine O-spezifischen Lipopolysaccharide auf (Hancock *et al.*, 1983) und produzieren nur noch geringe Mengen der extrazellulären Virulenzfaktoren (Burke *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 1986; Woods *et al.*, 1991). Da von vielen dieser Virulenzfaktoren bekannt ist, daß sie über `quorum sensing`-Systeme reguliert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die AHL-Produktion zahlreicher *P. aeruginosa* Stämme, die über einen Zeitraum von zehn bis elf Jahren aus Sputa von chronisch infizierten Mukoviszidosepatienten isoliert wurden, analysiert. Der Vergleich der AHL-Profile der *P. aeruginosa* Isolate macht deutlich, daß weder die Mengen noch die Typen der produzierten AHL-Moleküle sich wesentlich unterscheiden, wenn die jeweiligen Stämme unter standardisierten Wachstumsbedingungen kultiviert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die phänotypischen Anpassungen als Reaktion auf die Bedingungen in der Lunge während einer chronischen Infektion ihre Ursache nicht in einer veränderten AHL-Konzentration haben können. Nachdem in der Vergangenheit bereits mehrere Regulatoren entdeckt wurden, die neben den LuxRI-homologen Proteinen entscheidenden Einfluß auf die Produktion von Virulenzfaktoren haben, könnten möglicherweise diese für die phänotypischen Veränderungen verantwortlich sein. Neben den Genprodukten von *rsaL*, *vfr*, *gacA* wurde vor allem der Einfluß von RpoS untersucht. Während frühere Arbeiten berichten, daß der alternative Sigmafaktor RpoS, der für die allgemeine Stressantwort der Zelle verantwortlich ist, in *P. aeruginosa* durch die beiden `quorum sensing`-Systeme reguliert wird (Latifi *et al.*, 1996), zeigen neueste Untersuchungen an einer *rpoS* Mutante, daß die Transkription von *rpoS* nicht nur unabhängig

von RhlR/RhlI sein dürfte, sondern sogar die Synthese von RhlI reprimiert (Whiteley *et al.*, 2000). Abgesehen von der widersprüchlichen Situation, was die genauen hierarchischen Verhältnisse zwischen den beiden Regulationssysteme RhlI und RpoS anbelangt, bestätigen beide Studien die wichtige Rolle des alternativen Sigmafaktors bei der Regulation der Produktion verschiedener Virulenzfaktoren. In *P. aeruginosa* wird ebenso wie in *E. coli* das *rpoS* Gen beim Übergang der Kultur in die stationäre Wachstumsphase induziert und da von *E. coli* bekannt ist, daß RpoS die Expression von über 35 Genen verstärkt (Loewen und Hengge-Aronis, 1994) dürfte dieser Regulator in *P. aeruginosa* eine ähnlich zentrale Bedeutung haben. So zeigte eine *P. aeruginosa* *rpoS* Null-Mutante einen Defekt in der allgemeinen Stressantwort und eine gestörte Regulation mehrerer Exoprodukte, darunter Pyocyanin und Exotoxin A (Jorgensen *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 1999).

Bei der Bewertung der Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit im Zusammenhang mit Isolaten aus Mukoviszidosepatienten erhalten wurden, muß jedoch stets berücksichtigt werden, daß sämtliche Untersuchungen unter *in vitro* Bedingungen durchgeführt wurden und daß sich vermutlich bestimmte Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen nur bei Kultivierung der Isolate unter *in situ* Bedingungen ausprägen würden. Um diesem Problem zu begegnen, wurden vor kurzem AHL-Sensoren eingesetzt, die auf dem grün fluoreszierenden Protein basieren (Andersen *et al.*, 2000). Diese neuen Sensoren ermöglichten zum ersten Mal, AHL-abhängige Genexpression auf Einzelzellebene in Lungengewebe infizierter Mäuse nachzuweisen (Wu *et al.*, 2000).

In vorliegender Arbeit wurden auch die AHL-Profile mehrerer *P. aeruginosa* Stämme verglichen, die aus zwei Patienten isoliert worden waren, die zusätzlich mit *B. cepacia* infiziert waren. Interessanterweise unterscheiden sich beide *B. cepacia* Stämme deutlich in der Menge der produzierten AHL-Moleküle und nehmen daher möglicherweise auch unterschiedlich Einfluß auf die AHL-Produktion der co-kolonisierenden *P. aeruginosa* Stämme. Im Falle des Mukoviszidosepatienten, der mit dem *B. cepacia* Stamm (*B. cepacia* H111) infiziert war, der OHL und HHL produzierte, konnte eine stark verringerte AHL-Produktion der *P. aeruginosa* Isolate beobachtet werden. Obwohl der molekulare Mechanismus für diese auffällige Veränderung noch unklar ist, könnte AHL-vermittelte Kommunikation zwischen den beiden Bakteriengattungen möglicherweise die Ursache dafür sein, daß sich unter diesen Bedingungen eine *P. aeruginosa* Mutante mit einer verminderten AHL-Produktion etablieren könnte. Von McKenney *et al.* (1995) wurde bereits intergenerische Kommunikation zwischen *P. aeruginosa* und *B. cepacia* beschrieben. Es

konnte in diesem Fall gezeigt werden, daß konzentrierte, zellfreie Kulturüberstände von *P. aeruginosa* PAO1 Einfluß auf die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren in *B. cepacia* hatten.

Mit Hilfe der sogenannten Ausschlußhybridisierung (Wassill, 1999) - einer speziellen Hybridisierungstechnik, die es erlaubt, auch geringe genotypische Unterschiede zwischen nahverwandten Stämmen zu detektieren - wurde untersucht, ob minimale Sequenzunterschiede aufgrund von Mutationen für die unterschiedlich stark ausgeprägte AHL-Produktion bei verschiedenen *P. aeruginosa* Isolaten verantwortlich sind. Mit dieser neuen Methode wurden jene *P. aeruginosa* Stämme untersucht, die vor und nach Co-Infektionen mit dem AHL-positiven *B. cepacia* Stamm H111 isoliert wurden. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen konnten jedoch keine Hinweise auf Sequenzunterschiede relevanter Gene erhalten werden. Möglicherweise ist die genannte Ausschlußhybridisierungstechnik zu insensitiv, um einzelne Punktmutationen nachzuweisen, die für die unterschiedlichen Phänotypen verantwortlich sein könnten.

#### **D.4 Vergleich der AHL-Produktion bei Vertretern verschiedener *B. cepacia* Genomovare**

Der Vergleich der AHL-Profile der untersuchten Vertreter verschiedener *B. cepacia* Genomovare bzw. phylogenetisch nah verwandter Arten hat gezeigt, daß teilweise erhebliche Unterschiede in Menge und Art der produzierten AHL-Moleküle bei den einzelnen Stämmen beobachtet werden können. Als Faustregel kann jedoch gesagt werden, daß *B. cepacia* zumeist OHL und in geringeren Mengen HHL produziert.

Diese Untersuchungen ergaben auch, daß Bakterienstämme des Genomovars II (syn.: *B. multivorans*) keine oder nur sehr geringe Mengen an AHL-Molekülen produzieren. Es wird momentan versucht, die *luxR* und *luxI* homologen Gene, *cepR* und *cepI*, zu klonieren und zu sequenzieren, um so weitere Informationen über die zugrundeliegenden Ursachen dieses Phänomens zu erhalten. Von besonderem Interesse sind auch einige Stämme des Genomovars V (syn.: *B. vietnamiensis*), die durch ihre besondere Fähigkeit zur Produktion eines zusätzlichen langkettigen AHL-Moleküls auffielen. Die Klonierung der *cepI* Gene in Expressionsvektoren und die anschließende Analyse der produzierten AHL-Moleküle nach heterologer Expression in *E. coli* sollen zeigen, ob möglicherweise weitere *luxI* homologe

Gene in diesen Stämmen für die Produktion langkettiger AHL-Moleküle verantwortlich sind (Gotschlich, persönliche Mitteilung).

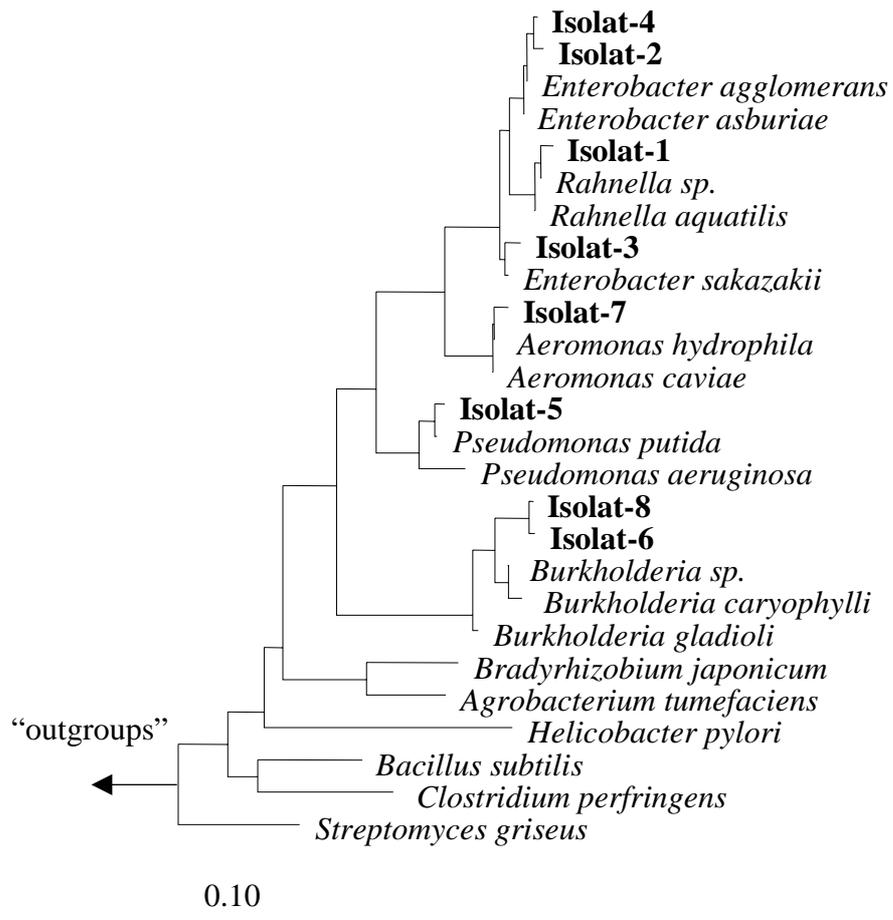
Im Vergleich zu dem mittlerweile umfangreichen Wissen über die Rolle von AHL-Molekülen bei der Regulation der Genexpression in *P. aeruginosa* steht die Aufklärung des `quorum sensing`-Systems von *B. cepacia* noch ziemlich am Anfang. Erste Untersuchungen an nicht näher charakterisierten *B. cepacia* Stämmen von McKenney *et al.* (1995) deuteten die positiven Reaktionen von drei Biosensoren, die unterschiedliche Sensitivitäten für bestimmte AHL-Moleküle aufwiesen, mit dem Vorhandensein von OHHL, BHL und HHL in den Überständen dieser beiden Stämme. Die beiden Moleküle OHHL und BHL konnten jedoch bei keinem der in dieser Arbeit untersuchten Stämme aus den zellfreien Überständen extrahiert werden. Die Ursache dafür dürfte wohl darin zu finden sein, daß die Schlußfolgerungen von McKenney *et al.* mit dem aktuellen Kenntnisstand über die Reaktionsspezifität der verwendeten Biosensoren kaum mehr vereinbar sind. Mittlerweile konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, daß diese Sensoren neben den natürlich vorkommenden AHL-Molekültypen auch andere AHL-Moleküle detektieren und daß deswegen eine genauere Identifizierung der produzierten AHL-Moleküle nur durch Einbeziehung weiterer analytischer Methoden wie etwa der DC oder MS möglich ist (McClellan *et al.*, 1997; Winson *et al.*, 1998). Kürzlich konnte OHL in Kulturüberständen von einem Vertreter des Genomovar III zweifelsfrei nachgewiesen werden (Lewenza *et al.*, 1999). Außerdem weisen die Autoren darauf hin, daß in verschiedenen *B. cepacia* Umweltisolaten noch weitere AHL-Moleküle gefunden werden konnten. Diese Resultate stimmen sehr gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, wonach OHL neben HHL jenes AHL-Molekül ist, das bei nahezu allen untersuchten AHL-positiven *B. cepacia* Stämmen gefunden wird.

#### **D.5 Isolierung und Charakterisierung AHL-Molekülproduzierender Bakterien aus der Rhizosphäre von Tomaten**

Um zu untersuchen, wie verbreitet AHL-produzierende Bakterien in der Rhizosphäre von Tomaten sind, wurden insgesamt 60 Isolate mit den beiden Biosensoren *E. coli* MT102 (pSB403) und *C. violaceum* CV026 durchgemustert. Während in den Kreuzausstrichen 13 Stämme deutliche Signale lieferten, konnte bei der anschließend durchgeführten DC-Analyse nur in den Extrakten von acht Isolaten eine für die Detektion ausreichende Menge an AHL-Signalmolekülen nachgewiesen werden. Die zu geringe Konzentration an AHL-Molekülen in

den Überständen dieser Stämme könnte möglicherweise durch den Einsatz von LB-Medium, wie es standardmäßig für die Herstellung der Dichlormethanextrakte bei diesem Versuch verwendet wurde, bedingt sein. Es ist daher möglich, daß diese Bakterien größere Mengen an AHL-Molekülen erzeugen, wenn sie unter anderen Nährstoffbedingungen angezogen werden. Möglicherweise produzieren diese Bakterien auch mehr AHL-Moleküle, wenn sie als kompakter Biofilm, wie z.B auf festen Nährböden, wachsen. Da sich in einem Biofilm die einzelnen Zellen in unmittelbarem Kontakt zueinander befinden, müßte es aufgrund der positiven Rückkopplungseffekte der `quorum sensing`-Systeme zu einer erheblich gesteigerten Produktion von AHL-Molekülen kommen. In der Arbeitsgruppe Molin (Department of Microbiology, Technical University of Denmark, Lyngby, DK) wurden spezielle Durchflußkammern entwickelt, die es erlauben, Bakterien unter definierbaren Bedingungen als Biofilm zu kultivieren. Diese neue Technik wird zur Zeit zur Aufklärung dieser Fragestellung eingesetzt.

Zur Identifikation der acht Rhizosphärenisolate wurde die 16S-rDNS sequenziert und aufgrund der Sequenzdaten ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Die acht Isolate können somit sechs verschiedenen Bakterienspezies zugeordnet werden. Entsprechend der verwendeten Selektivmedien, die neben verschiedenen Vollmedien bei der Isolierung der Bakterien aus der Rhizosphäre verwendet wurden, konnten erwartungsgemäß sowohl Vertreter der Gattung *Pseudomonas* als auch der Gattung *Burkholderia* gefunden werden. Bei den übrigen Isolaten handelte es sich um Vertreter der Gattungen *Aeromonas*, *Rahnella* und *Enterobacter*. Mit Ausnahme der Gattung *Rahnella* wurden für Vertreter der übrigen Gattungen die AHL-Systeme mit den entsprechenden AHL-Molekülen bereits charakterisiert (Swift *et al.*, 1993; Swift *et al.*, 1997; Nasser *et al.*, 1998; Pierson *et al.*, 1998; Lewenza *et al.*, 1999). Die Produktion von AHL-Molekülen in Zusammenhang mit *Rahnella* wurde jedoch bei Swift *et al.* (1993) bereits erwähnt. Es fehlt jedoch bis jetzt eine genau Charakterisierung der *luxR/ luxI* homologen Gene. Zur Veranschaulichung der Zugehörigkeit der Isolate zu den jeweiligen Bakterienspezies wurde aufgrund der erhaltenen Sequenzdaten ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abbildung D.2).



**Abbildung D.2:** Phylogenetisches Dendrogramm berechnet nach der `Neighbour-Joining` Methode der 16S-rDNA Sequenzen der untersuchten Rhizosphärenisolate unter Verwendung eines Sequenzfilters, der nur Alignmentpositionen berücksichtigt, die bei 50 % der im Datensatz vorhandenen Bakterien vorhanden sind.

## **E. Zusammenfassung**

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, daß zahlreiche Bakterien über komplexe Zell-Zell-Kommunikationssysteme zur Regulation verschiedener Zielgene verfügen. Die Übertragung von Information findet bei diesen Systemen mittels kleiner Signalmoleküle statt. Bei den Gram-negativen Bakterien sind *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL) die am besten untersuchte Gruppe von Signalmolekülen und werden in einem Prozeß, der als 'quorum sensing' bezeichnet wird, von den Bakterien zur Bestimmung der eigenen Populationsdichte verwendet.

In vorliegender Arbeit wurden die Spezifitäten und Sensitivitäten der AHL-Sensoren *E. coli* MT102 (pSB403), *E. coli* MT102 (pSB1075), *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372) und *E. coli* JM105 (pJBA89) in Kombination mit der von Shaw *et al.* (1997) entwickelten Methode gegenüber AHL-Molekülen ermittelt und verglichen. Die Untersuchungen ergaben erhebliche Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität der einzelnen Sensorsysteme.

Es wurde der Einfluß verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Produktion von AHL-Molekülen am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa* analysiert. Diese Untersuchungen ergaben, daß das Nährmedium einen entscheidenden Einfluß auf die Konzentration an AHL-Molekülen in den Kulturüberständen hat. Es stellte sich zudem heraus, daß AHL-Moleküle unter alkalischen Bedingungen instabil sind und daß die im Medium eingesetzte Kohlenstoffquelle einen entscheidenden Einfluß auf den pH-Wert stationärer Kulturen ausübt. Demgegenüber zeigten unterschiedliche Eisen- und EDTA-Konzentrationen in den Nährmedien keinen Einfluß auf die Konzentration an AHL-Molekülen in den Kulturüberständen.

Auf der Basis dieser Untersuchungen wurden umfangreiche Analysen zur Produktion von AHL-Molekülen bei *P. aeruginosa* Stämmen durchgeführt, welche von chronisch infizierten Mukoviszidosepatienten stammten. Anhand dieser Stämme, die über einen Zeitraum von bis zu elf Jahren isoliert wurden, konnte gezeigt werden, daß weder die Mengen noch die Typen an AHL-Molekülen sich im Verlauf einer chronischen Infektion wesentlich ändern. Eine interessante Ausnahme stellte der Fall eines Patienten dar, der mit einem *B. cepacia* Stamm co-infiziert wurde, der selbst AHL-Moleküle produzierte. Die *P. aeruginosa* Isolate dieses

Patienten wiesen eine deutliche Reduzierung in den Mengen der produzierten AHL-Moleküle auf.

Um zu klären, wie verbreitet die Fähigkeit zur Produktion von AHL-Molekülen bei der Gattung *Burkholderia* ist, wurden repräsentative Stämme der diversen *B. cepacia* Genomovare untersucht. Wie sich herausstellte, produziert der überwiegende Teil der untersuchten Stämme OHL und in geringeren Mengen HHL. Auffallenderweise synthetisieren alle getesteten Vertreter von *B. multivorans* keine oder nur sehr geringe Mengen an AHL-Molekülen.

Desweiteren wurden AHL-molekülproduzierende Bakterien aus der Rhizosphäre von Tomaten isoliert und die produzierten AHL-Moleküle charakterisiert. Zur Identifizierung der isolierten Organismen wurde die 16S-rDNS sequenziert. Die Isolate konnten den Gattungen *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* und *Rahnella* zugeordnet werden.

## F. Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and D.J. Lippman.** 1997. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* **25**:3389-3402
- Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M. and S. Molin.** 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2240-2246
- Andersen, J.B., Eberl, L., Geisenberger, O., Molin, S. and M. Givskov.** 2000. Development of *gfp*-based *N*-acyl-homoserine lactone monitors for detection of bacterial communication. **submitted**
- Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G. P., Stewart, G.S. and P. Williams.** 1992. *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.* **288**:997-1004
- Bainton, N.J., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Stead, P., Gledhill, L., Hill, P.J., Rees, C.E., Winson, M.K., Salmond, G.P., Stewart, G.S. et al.** 1992. A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene.* **116**:87-91
- Barber, C.E., Tang, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Wilson, T.J.G., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P. and M.J. Daniels.** 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* **24**:555-566
- Barclay, R.** 1985. The role of iron in infection. *Med. Lab. Sci.* **42**:166
- Belandreau, J. and R. Knowles.** 1978. Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. (Y.R. Dommergues and S.V. Krupa, eds.), p. 243, Elsevier, Amsterdam
- Budzikiewicz, H.** 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**:209-228
- Burke, V., Robinson, J.O., Richardson, C.J. and C.S. Bundell.** 1991. Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathology* **23**:145-148
- Cao, J.G. and E.A. Meighen.** 1989. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.* **264**:21670-21676
- Cao, J.G. and E.A. Meighen.** 1993. Biosynthesis and stereochemistry of the autoinducer controlling luminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **175**:3856-3862
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and D.C. Prasher.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* **263**:802-805

- Chhabra, S.R., Stead, P., Bainton, N.J., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. and B.W. Bycroft.** 1993. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* ATCC39048 by analogues of *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. J. Antibiot. **46**:441-454
- Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P. and E.W. Nester.** 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected crown gall tumors. Proc. Natl. acad. Sci. USA. **71**:3672-3676
- Clark, J.D. and O. Malaoe.** 1967. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **23**:99-112
- Clough, S.J., Schell, M.A. and T.P. Denny.** 1994. Evidence for involvement of a volatile extracellular factor in *Pseudomonas solanacearum* virulence gene expression. Mol. Plant-Microbe Interact. **7**:621-630
- Coenye, T., Schouls, L.M., Govan, J.R.W., Kersters, K. and P. Vandamme.** 1999. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**: 1657-1666
- Coenye, T., Falsen, E., Hoste, B., Ohlen, M., Goris, J., Govan, J.R.W., Gillis, M. and P. Vandamme.** 2000. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. . Int. J. Syst. Bacteriol. **50**:887-899
- Cox, C.D.** 1980. Iron reductases from *Pseudomonas aeruginosa* . J. Bacteriol. **141**:199
- Cox, C.D.** 1993. Iron and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. In R.B.Jr. Fick (ed.), *Pseudomonas aeruginosa*, the opportunist: pathogenesis and disease. p. 41-58. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- Cox, C.D. and P. Adams.** 1985. Siderophore activity of pyoverdinin for *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. **48**:130
- Cryer, D.R., Eccleshall, R. and L. Marmur.** 1975. Isolation of yeast DNA. In Prescott, D.M. (eds.) Methods in Cell Biology. **12**:39-44
- Cunliffe, H.E., Merriman, T.R. and I.L. Lamont.** 1995. Cloning and characterisation of *pvdS*, a gene required for pyoverdinin synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: PvdS is probably an alternate sigma factor. J. Bacteriol. **177**:2744-2750
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and E.P. Greenberg.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. **280**:295-298
- Doudoroff, M.** 1942. Studies on the luminous bacteria: nutritional requirements of some species. J. Bacteriol. **109**:1101-1105

- Dunny, G.M. and S.C. Winans.** 1999. Bacterial life: neither lonely nor boring. *In* Dunny, G.M. and S.C. Winans (eds.), Cell-Cell Signaling in Bacteria. p. 1-5. American Society of Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H. and N.J. Oppenheimer.** 1981. Structural identification of the autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*. **20**:2444-2449
- Eberhard, A., More, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C. and S.C. Winans.** 1996. Enzymatic synthesis of a quorum sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*. **272**:1655-1658
- Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S. and M. Givskov.** 1996. Involvement of *N*-acyl-L-homoserin lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* **20**:127-136
- Eberl, L.** 1999. *N*-Acyl homoserinlactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **22**:493-506
- Fegan, M., Francis, P., Hayward, A.C., Davis, G.H. and J.A. Fuerst.** 1990. Phenotypic conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1143-1146
- Finkelstein, R.A., Sciortino, C.V. and M.A. MacIntosh.** 1983. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* **5**:759
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A. and T.P. Denny.** 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **26**:252-259
- Flavier, A.B., Ganova-Raeva, L.M., Schell, M.A. and T.P. Denny.** 1997. Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum* : control of *N*-acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.* **179**:7089-7097
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and E.P. Greenberg.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR- LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275
- Fuqua, C. and S.C. Winans.** 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* **176**:2796-2806
- Fuqua, W.C. and S.C. Winans.** 1996. Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J. Bacteriol.* **178**:435-440

**Gamard, P., Sauriol, F., Benhamou, N., Belanger, R.R. and T. C. Paulitz.** 1997. Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. J. Antibiotics. **50**:742-749

**Gambello, M.J. and B.H. Iglewski.** 1991. Cloning and characterisation of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene , a transcriptional activator of elastase expression. J. Bacteriol. **173**:3000-3009

**Gilligan, P.H.** 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. **4**:35-51

**Glessner, A., Smith, R.S., Iglewski, B.H. and J.B. Robinson.** 1999. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum -sensing systems in control of twitching motility. J. Bacteriol. **181**:1623-1629

**Govan, J.R. and V. Deretic.** 1996. Microbiol pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol. Rev. **60**:539-574

**Gray, K.M., Pearson, J.P., Downie, A., Boboye, B.E.A. and P. Greenberg.** 1996. Cell-to-cell signalling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. J. Bacteriol. **178**:372-376

**Greenberg, E.P.** 1997. Quorum sensing in gram-negative bacteria. ASM News. **63**:371-377

**Haas, B., Braut, J., Marks, J., Zanker, S.C. and D. Castignetti.** 1991. Siderophore presence in sputa of cystic fibrosis patients. Infect. Immun. **59**:3997

**Hancock, R.E., Mutharia, L.M., Chan, M., Darveau, R.P., Speert, D.P. and G.B. Pier.** 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chain. Infect. Immun. **42**:170-177

**Hardmann, A.M., Stewart, G.S. and P. Williams.** 1998. Quorum sensing and cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non -pathogenic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. **74**:199-210

**Hiltner, L.** 1904. Arb. Dtsch. Landwirt. Ges. **98**:59

**Hohnadel, D., Haas, D. and J.M. Meyer.** 1986. Mapping of mutations affecting pyoverdinin production in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. **36**:195

**Holden, M.T.G., Chhabra, S.R., DeNys, R., Stead, P., Bainton, N.J., Hill, P.J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B. et al.** 2000. Quorum sensing cross talk: isolation and chemical characterisation of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Mol. Microbiol. **33**:1254-1266

- Horinouchi, S. and T. Beppu.** 1992. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**:377-398
- Kuo, A., Callahan, S.M. and P.V. Dunlap.** 1996. Modulation of luminescence operon expression by N-octanoyl-L-homoserine lactone in *ainS* mutants of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **178**:971-976
- Larsen, G.Y.T., Stull and J.L. Burns.** 1993. Marked phenotypic variability in *Pseudomonas cepacia* isolated from a patient with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**:788-792
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. and A. Lazdunski.** 1996. A hierarchical quorum sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* **21**:1137-1146
- Leoni, L., Ciervo, A., Orsi, N. and P. Visca.** 1996. Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: effect of Fur and PvdS on promoter activity. *J. Bacteriol.* **178**:2299-2313
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P. and P.A. Sokol.** 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*. *J. Bacteriol.* **181**:748-756
- Lindum, P.W., Anthoni, U., Christopherson, C., Eberl, L., Molin, S. and M. Givskov.** 1998. N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **180**:6384-6388
- Loewen, P.C. and R. Hengge-Aronis.** 1994. The role of the sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:53-80
- Luzar, M.A. and T.C. Montie.** 1985. Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **50**:572-576
- Mahenthalingam, E., Campbell, M.E. and D.P. Speert.** 1994. Non-motility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **62**:596-605
- Mahenthalingam, E., Campbell, M.E., Henry, D.A. and D.P. Speert.** 1996. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2914-2920
- Mahenthalingam, E., Coenye, T., Chung, J.W., Speert, D.P., Govan, J.R.W., Taylor, P. and P. Vandamme.** 2000. *J. Clin. Microbiol.* **38**:910-913
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. and P. Williams.** 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology.* **143**:3703-3711

- McKenney, D., Brown, K.E. and D.G. Allison.** 1995. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. J. Bacteriol. **177**:6989-6992
- Meyer, J.-M. and M.A. Abdallah.** 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physiochemical properties. J. Gen. Microbiol. **107**:319-328
- Millar-Jones, L., Ryley, H.C., Paull, A. and M.C. Goodchild.** 1998. Transmission and prevalence of *Burkholderia cepacia* in Welsh cystic fibrosis patients. Respir. Med. **92**:178-183
- Murray, V.** 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. **17**:164-175
- Nasser, W., Bouillant, M.L., Salmond, G. and S. Reverchon.** 1998. Characterisation of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules. Mol. Microbiol. **29**:1391-1405
- Nealson, K.H., Platt, T. and J.W. Hastings.** 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J. Bacteriol. **104**:313-322
- O'Toole, G.A. and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. **30**:295-304
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E.Jr. and E.P. Greenberg.** 1999. Acyl-homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**:4360-4365
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and B.H. Iglewski.** 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. Science. **260**:1127-1130
- Passador, L., Tucker, K.D., Guertin, K.R., Journet, M.P., Kende, A.S. and B.H. Iglewski.** 1996. Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI. J. Bacteriol. **178**:5995-6000
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. and E.P. Greenberg.** 1994. Structure of the autoinducer required for the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**:197-201
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. and E.P. Greenberg.** 1995. A second *N*-acyl homoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**:1490-1494
- Pearson, J.P., Everett, C.P. and B.H. Iglewski.** 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol. **179**:5756-5767

- Pesci, E.C. and B.H. Iglewski.** 1997. The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. Trends Microbiol. **5**:132-134
- Pierson, L.S.III and E.A. Pierson.** 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. FEMS Microbiol. Lett. **136**:101-108
- Pierson, L.S.III, Keppenne, V.D. and D.W. Wood.** 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-48 is regulated by PhzR in response to cell-density. J. Bacteriol. **176**:3966-3974
- Pierson, L.S.III., Wood, D.W. and E.A. Pierson.** 1998. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. **207-225**
- Piper, K.R., Von Bodman, S.B. and S.K. Farrand.** 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Nature. **362**:448-450
- Prince, R.W., Cox, C.D. and M.L. Vasil.** 1993. Coordinate regulation of siderophore and exotoxine A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. J. Bacteriol. **175**:2589-2598
- Qualls, G.T., Stephens, K. and D. White.** 1978. Morphogenetic movements and multicellular development in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. Dev. Biol. **66**:270
- Römling, U., Fiedler, B., Bosshammer, J., Grothues, D., Greipel, J., von der Hardt, H. and B. Tümmler.** 1994. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. J. Infect. Dis. **170**:1616-1621
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.H., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and H.A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **293**:487-491
- Sajjan, U.S., Sun, L., Goldstein, R. and J.F. Forstner.** 1995. Cable (Cbl) type II pili of cystic fibrosis associated *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*: nucleotide sequence of the *cblA* major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. J. Bacteriol. **177**: 1030-1038
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. and A. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**:5463-5467
- Schäfer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E.Jr. and E.P. Greenberg.** 1996. 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. USA. **93**:9505-9509

- Schripsema, J., Karel, E., De Rudder, E., van Vliet, T.B., Kankhorst, P.P., De Vroom, E., Kijne, J.W. and A.A. Van Brussel.** 1996. Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of *N*-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and quorum sensing co-transcription factors. *J. Bacteriol.* **178**:366-371
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E.Jr., Rinehart, K.L. and S.K. Farrand.** 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thinlayer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:6036-6041
- Speert, D.P., Bond, M., Woodman R.C. and J.C. Curnutte.** 1994. Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: role of non –oxidative killing by neutrophils in host defence. *J. Infect. Dis.* **170**:1524-1531
- Stinzi, A., Evans, K., Meyer, J.-M. and K. Poole.** 1998. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: *lasR/lasI* mutants exhibit reduced pyoverdinin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**:341-345
- Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K. and R.B. Wallace.** 1981. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences. *In* Brown, D.D. and C.F. Fox (Eds.), *Developmental Biology Using Purified Genes.* p. 683-693. Academic Press, New York
- Swift, S., Winson, M.K., Chan, P.F., Bainton, N.J., Birdsall, M., Reeves, P.J., Rees, C.E., Chhabra, S.R., Hill, P.J., Throup, J.P. et al.** 1993. A novel strategy for the isolation of *luxI* homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **10**:511-520
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S. and G.S. Stewart.** 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologues AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acyl homoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* **179**:5271-5281
- Thomson, N.R., Crow, M.A., McGowan, S.J., Cox, A. and G.P.C. Salmond.** 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol. Microbiol.* **36**:539-556
- Thorne, S.H. and H.D. Williams.** 1999. Cell density-dependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli: identification of the role of an *N*-acyl homoserine lactone in adaption to stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* **181**:981-990
- Val, D.L. and J.E.J. Cronan.** 1998. *In vivo* evidence that *S*-adenosylmethionine and fatty acid synthetic intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J. Bacteriol.* **180**:2644-2651
- van Asbeck, B.S. and J. Verhoef.** 1983. Iron and host defense. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **2**:6

- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K. and J.R.W. Govan.** 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1188-1200
- Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, B., De Vos, P., Henry, D. and D.P. Speert.** 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J. Clin. Microbiol.* **38**:1042-1047
- Van Delden, C. and B.H. Iglewski.** 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:551-560
- Von Bodman, S.B. and S.K. Farrand.** 1995. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-Acyl homoserine lactone autoinducer. *J. Bacteriol.* **177**:5000-5008
- Wang, J., Lory, S., Ramphal, R. and S. Jin.** 1996. Isolation and characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* genes inducible by respiratory mucus derived from cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* **22**:1005-1012
- Wassill, L.C.** 1999. Entwicklung verbesserter Ausschlußhybridisierungstechniken und deren Anwendung zur Konstruktion stammspezifischer PCR-Systeme für lebensmittelrelevante und pathogene Mikroorganismen. Doktorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München.
- Whiteley, M., Parsek, M.R. and E.P. Greenberg.** 2000. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**:4356-4360
- Williams, P., Stewart, G.S.A.B., Camara, M., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Salmond, G.P.C. and B.W. Bycroft.** 1996. Signal transduction through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. In T. Nakazawa (ed.). *Molecular Biology of Pseudomonads*, p.195-206.. ASM Press. Washington, D.C. USA
- Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G.P., Bycroft, B.W. et al.** 1995. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:9427-9431
- Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jorgensen, F., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P. and G.S. Stewart.** 1998. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:185-192
- Wood, D.W., Gong, F., Daykin, M., Williams, P. and L.S. Pierson.** 1997. N-Acyl homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* **179**:7663-7670

**Wood, D.W. and L.S. III Pierson.** 1996. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene*. **168**:49-53

**Woods, D.E., Schaffer, M.S., Rabin, H.R., Campbell, G.D. and P.A. Sokol.** 1986. Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J. Clin. Microbiol.* **24**:260-264

**Woods, D.E., Sokol, P.A., Bryan, L.E., Storey, D.G., Mattingly, S.J., Vogel, H.J., and H. Ceri.** 1991. *In vivo* regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J. Infect. Dis.* **163**:143-149

**Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Heydorn, A., Mathee, K., Moser, C., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N. and M. Givskov.** 2000. Detection of *N*-acyl-L-homoserine lactones in lung tissues infected with *Pseudomonas aeruginosa* associated with pulmonary infection in cystic fibrosis. submitted

**Zhang, L., Murphy, P.J., Kerr, A. and M.E. Tate.** 1993. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by *N*-acyl-L-homoserin lactones. *Nature*. **362**:446-448

**Zhu, J., Beaber, J.W., More, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A. and S.C. Winans.** 1998. Analogs of the autoinducer 3-oxo-octanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **180**:5398-5405

## G. Publikationsliste

**Eberl, L., Schulze, R., Ammendola A., Geisenberger, O., Erhart, R., Sternberg, C., Molin, S. and R. Amann.** 1997. Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**:77-83

**Eberl, L., Ammendola, A., Geisenberger, O., Schultze, R., Givskov, M., Sternberg, C., Molin, S., and K.-H. Schleifer.** 1998. Use of green fluorescent protein for online, single cell detection of bacteria introduced into activated sludge microcosms. *Biofilm 3, Online Journal*, [URL:http://www.bdt.org.br/bioline/bf](http://www.bdt.org.br/bioline/bf).

**Geisenberger, O., Ammendola, A., Christensen, B.B., Molin, S., Schleifer, K.-H., and L. Eberl.** 1999. Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and *in situ* identification of recipients. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:9-17

**Geisenberger, O., Givskov, M., Riedel, K., Hoiby, N., Tümmler, B., and L. Eberl.** 2000. Produktion of *N*-acyl-L-homoserine lactones by *P. aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:273-278

**Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin S., and M. Givskov.** 2000. Gfp based *N*-acyl-homoserine lactone sensor systems for detection of bacterial communication. **Submitted**

**Gotschlich, A., Huber, B., Geisenberger, O., Steidle, A., Riedel, K., Bycroft, B., Hardman, A., Hill, P., Vandamme, P., and L. Eberl.** 2000. The ability to produce *N*-acyl-L-homoserine lactones is widespread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. **In preparation**



Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Prof. K.-H. Schleifer im Zeitraum von Oktober 1997 bis September 2000 angefertigt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei

Prof. Dr. K.-H. Schleifer für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsmöglichkeit an seinem Lehrstuhl, sowie sein Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Leo Eberl für eine sehr gute Betreuung, seine engagierte Motivation und die zahlreichen Einladungen, nicht nur zu den `5 Uhr`-Sitzungen.

Dr. Aldo Ammendola für die vielen kleinen und großen Hilfen während der letzten Jahre und das freundschaftliche Verhältnis auch außerhalb des Labors.

meinen `Labormädels` Anette Steidle, Astrid Gotschlich, Birgit Huber und Kathrin Riedel für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, unzählige Gefälligkeiten und ihre stete `schwesterliche` Sorge um mein Wohlbefinden.

Beate Schumacher für ihre Hilfsbereitschaft und manch nettes Wort im Alltagsstress.

meinem `Salmonellenpartner` Michael Schmid für seine geduldige Hilfe bei Computerfragen (meist Problemen!), seinen bewundernswerten Einsatz beim Nachweis von Salmonellen auch in `grobkörnigem` Probenmaterial und seine Ausdauer bei abendlichen Unternehmungen.

Thomas Ohnesorg für seinen `männlichen` Beistand und die vielen nützlichen Tips für die - neben der Mikrobiologie - wichtigen Dinge im Leben.

allen aktuellen und ehemaligen Diplomanden des `Eberl`- Labors für ihre tatkräftige Unterstützung und ihren Beitrag, den Spaß an der Laborarbeit nie zu verlieren.

allen `Isotoplern` für viele aufschlußreiche Ratschläge und die nach wie vor willkommenen Einladungen zu zahlreichen Unternehmungen und Festivitäten.

allen `Wagners` für die sehr angenehme Zusammenarbeit, die vielen beantworteten Fragen und die Einladungen zu unvergessenen, feucht-fröhlichen Runden.

Michael Givskov, Phil Hill und ihren Arbeitsgruppen für eine sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Reischenbeck für die Realisierung verschiedener `Extrawünsche`.