Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München

Untersuchung der Pathogenität von *Burkholderia cenocepacia* H111 in einem *Caenorhabditis elegans* Modell

Manuela Köthe

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	UnivProf. Dr. W. Höll
Prüfer der Dissertation:	 UnivProf. Dr. L. Eberl, Universität Zürich / Schweiz UnivProf. Dr. KH. Schleifer

Die Dissertation wurde am 03.05.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.06.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungen

1	Einlei	itung	1
1.1	Burkh	olderia cenocepacia und die Gattung Burkholderia	2
	1.1.1	Taxonomie und Historie	2
	1.1.2	Verbreitung und Charakteristika	3
1.2	Muko	viszidose	4
	1.2.1	Eine ererbte Anfälligkeit für bakterielle Atemwegsinfektionen	4
	1.2.2	Der B. cepacia Komplex - eine zusätzliche Bedrohung	5
1.3	Quoru	im sensing	6
	1.3.1	<i>N</i> -Acyl-homoserinlacton gesteuertes Quorum sensing	6
	122	In Proteobakterien	6
	1.3.2	Quorum sensing und Pathogenital	8 0
	1.3.3	Quorum sensing in <i>B. cenocepucia</i> IIIII	9
1.4	Caenc	orhabditis elegans	11
	1.4.1	Allgemeine Beschreibung und Anatomie	11
	1.4.2	C. elegans als Modellorganismus	12
1.5	Ziele	der Arbeit	14
2	Mater	rial und Methoden	15
2.1	Standa	ardtechniken für das Arbeiten mit Bakterien	15
	2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	15
	2.1.2	Nährmedien	16
	2.1.3	Antibiotika und andere Medienzusätze	18
	2.1.4	Zellanzucht	19
	2.1.5	Stammhaltung und Reinheitskontrolle	19
	2.1.6	Zentrifugation	19
	2.1.7	Medien für die physiologische Charakterisierung	19
	2.1.8	Herstellung elektrokompetenter E. coll-Zellen	22
2.2	Arbeit	ten mit <i>C. elegans</i>	23
	2.2.1	C. elegans-Stämme	23
	2.2.2	Haltung und Vermehrung von C. elegans	24
	2.2.3	Stammhaltung	26
	2.2.4	Medien für die Pathogenitäts-Versuche	26
	2.2.5	Synchronisation der Wurmpopulation / Eipräparation	28
	2.2.6	Pathogenitatsversuche	<u>30</u>
	2.2.1	Koniokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	51

2.3	 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren 2.3.1 Behandlung von Geräten, Lösungen und Arbeitsflächen 2.3.2 Konzentrations- und Größenbestimmung von Nukleinsäuren 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese 2.3.4 Isolierung von DNS aus Bakterien 2.3.5 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen 	31 31 32 32 33 34
2.4	 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren 2.4.1 Schneiden mit Restriktions-Endonukleasen 2.4.2 Ligation mit T4-Ligase 2.4.3 Ligation in den Vektor pCR[®]2.1 TOPO[®] 2.4.4 Markierung von DNS-Fragmenten mit Digoxigenin 	34 34 35 35 35
2.5	 DNS-Übertragung in Bakterienzellen 2.5.1 Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i>-Zellen 2.5.2 Konjugation 2.5.3 Blau/Weiß-Selektion rekombinanter Zellen (X-Gal-Test) 	37 37 37 38
2.6	In vitro Amplifikation von DNS durch PCR 2.6.1 Primer 2.6.2 Standard-PCR 2.6.3 Arbitrary PCR	38 39 40 42
2.7	 DNS-DNS Hybridisierung 2.7.1 Transfer von DNS auf Membranen 2.7.2 Hybridisierung der DNS mit Digoxigenin-markierten Sonden 2.7.3 Kolorimetrische Detektion der Sonden 	43 44 45 46
2.8	Sequenzierung	47
2.9	 Nachweis und quantitative Bestimmung von Exoprodukten 2.9.1 AHL-Nachweis durch Kreuzausstrich mit Sensorstämmen 2.9.2 Quantitative Bestimmung der AHL-Produktion 2.9.3 Quantitative Bestimmung der Protease-Aktivität 2.9.4 Extraktion von Siderophoren 2.9.5 Dünnschichtchromatografie der Siderophore 2.9.6 Nachweis von HCN 	48 48 49 49 50 50 51
2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.11	Western Blot 2.11.1 Elektrophoretischer Transfer 2.11.2 Proteindetektion mit Hilfe von Antikörpern	54 54 55
2.12	Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	57

3	Ergebnisse	60
3.1	Pathogenitätstests mit <i>C. elegans</i> 3.1.1 Einfluss verschiedener Peptonmischungen auf die Virulenz	60
	von <i>B. cenocepacia</i> H111 auf PGS-Agar	63
3.2	Quorum sensing und Pathogenität von <i>B. cenocepacia</i> H111	65
	3.2.1 Protease als Virulenzfaktor	65
	3.2.2 Quorum sensing und Virulenz	65
	3.2.5 AKKumulation del Bakterien ini wurndarini 3.2.4 Eiltervorsuche auf PCS	00 60
	3.2.4 Filler versuche auf POS 3.2.5 <i>C</i> alagans nhm 2 und <i>B</i> canocanacia H111	71
	3.2.5 C. elegans prim-2 und D. cenocepucia 11111	71
	3.2.7 Finfluss von Ouorum sensing Hemmstoffen auf die Pathogenität	12
	y_{OD} <i>R</i> cenocenacia H111 und <i>P</i> aeruginosa PAO1	75
	3.2.8 Pathogenität weiterer <i>B. cenocepacia</i> H111 QS-Mutanten	77
3.3	Screening einer <i>B. cenocepacia</i> H111-Mutantenbank	
	nach Virulenzfaktoren mit C. elegans	79
	3.3.1 Genotypische Charakterisierung der Mutanten	79
	3.3.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten	84
	3.3.2.1 Pathogenität	84
	3.3.2.2 AHL-Produktion	85
	3.3.2.3 Protease-Produktion	85
	3.3.2.4 Siderophor-Produktion	87
	3.3.2.5 Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS)	93
	3.3.2.6 Expression von <i>aidA</i>	94
4	Diskussion	97
4.1	C. elegans als Pathogenitäts-Modell für B. cenocepacia H111	97
4.2	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Pathogenität von H111	
	im C. elegans-Modell	98
	4.2.1 Quorum sensing reguliert die Pathogenität von H111	98
	4.2.2 Proteasen sind als Virulenzfaktoren in <i>C. elegans</i> zu vernachlässigen	99
	4.2.3 Siderophore sind in <i>C. elegans</i> wirksam	101
	4.2.4 EPS – die Mitlaufer unter den Virulenzfaktoren	102
4.3	Die Pathogenität der einzelnen Mutanten	103
	4.3.1 Die Mutante B7 - eine neue Pathogenitäts-Insel in <i>B. cenocepacia</i> ?	103
	4.3.2 Purin- und Pyrimidin-Auxotrophie: Die Mutanten A4, D9 und D6	104
	4.3.3 Aminosäure-Auxotrophie: die Mutanten H2 und A11	105
	4.3.4 Mutanten mit verminderter AHL-Produktion: E5 und G3	107
	4.3.5 Die regulatorische Mutante G11	107
4.4	C. elegans im Vergleich mit anderen Pathogenitätsmodellen	108
4.5	Ausblick	110

5	5 Zusammenfassung 5 Literatur		111	
6			113	
7	Anha	ang	130	
	7.1	Sequenzen der das Transposon flankierenden DNS in den <i>B. cenocenacia</i> H111 Mutanten	130	
	7.2	Tabelle 3.4: Homologien der das Transposon flankierenden Sequenzen	135	
	7.3	Position der mutierten Gene im Stoffwechsel von		
		Ralstonia solanacearum (Ausschnitte)	137	
8	Publ	ikationen	142	

Danksagung

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AHL	N-Acyl-(L)-homoserinlacton(e)
bidest.	entionisiert und sterilfiltriert
Bcc.	Burkholderia cepacia Komplex
BCESM	"Burkholderia cepacia epidemic strain marker"
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	"bovine serum albumin" (Rinderserumalbumin)
C6-HSL	N-Hexanoyl-(L)-homoserinlacton
C8-HSL	N-Octanoyl-(L)-homoserinlacton
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CF	zystische Fibrose (Mukoviszidose)
CGD	"Chronic Granulomatous Disorder" (Chronische Granulomatose)
Cm	Chloramphenicol
dest.	entionisiert
DMF	Dimethylformamid
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig, Doppelstrang
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
et al.	"et alteri" (und andere)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
Gm	Gentamicin
Gv	Genomovar
h	Stunde
HDTMA	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-B-d-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
Konz.	Konzentration
1	Liter
LB	Luria-Bertani (ein Nährmedium)
Lsg.	Lösung
М	molar
MCS	"Multiple Cloning Site"
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min.	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar

NBT OD PCR PIA PIPES	Nitrotetrazoliumblau optische Dichte "Polymerase Chain Reaction" " <i>Pseudomonas</i> Isolation Agar" (ein Wachstums-Medium) Piperazindiethansulfonsäure
QS r	"Quorum sensing" resistent
rpm RE	"rounds per minute" (Umdrehungen pro Minute) Restriktions-Endonukleasen
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
Tab.	Tabelle
Tc TM	Tetracyclin "trademark" (Handelsmarke)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
wt	Wildtyp
w/v	Masseneinheit pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid

1 Einleitung

In Deutschland leiden etwa 8.000 Menschen an der erblich bedingten Stoffwechselkrankheit Mukoviszidose (Zystische Fibrose, CF), jedes Jahr werden 400 Kinder mit dieser Krankheit geboren (Pneumologie, Klinikum der Universität München, 2003). Verbesserte Behandlungsmethoden haben die Lebenserwartung der Patienten erheblich verlängert, jedoch ist die Krankheit immer noch tödlich. Ein Symptom bei Mukoviszidose ist die erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Atemwegsinfektionen (s. dazu auch 1.2.1); erwachsene Patienten sind in der Regel mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert. In dem Zeitraum von 1971-1981 wurde in Kanada eine Zunahme der Infektionen mit *Burkholderia cepacia** um fast das Doppelte beobachtet (Isles *et al.*, 1984). In Deutschland sind nur ca. 2-7 % der CF-Kranken von dieser Infektion betroffen (Zentrum für Kinderheilkunde, Uniklinikum Giessen, 2003), die Auswirkungen können jedoch dramatisch sein. Neben einer Verschlechterung der Lungenfunktion bei allen befallenen Patienten erleidet ein Teil der mit *B. cepacia** infizierten Patienten eine schwere Lungenentzündung mit fatalen Folgen ("*Cepacia* Syndrom"; Isles *et al.*, 1984).

Ungewöhnlich ist neben den möglichen schwerwiegenden Folgen einer Infektion mit Bakterien des *Burkholderia cepacia* Komplexes die Tatsache, dass es sich bei diesen Bakterien nicht um typische humanpathogene Stämme handelt. Burkholderien sind ubiquitär verbreitete Bodenbakterien, die man häufig in der Rhizosphäre von Tomaten, Mais oder Reis findet, wo sie die Pflanze durch die Produktion von Fungiziden vor Pilzbefall schützen. Entdeckt wurde *B. cepacia* jedoch aufgrund seiner pflanzenpathogenen Eigenschaften (s. 1.1.1).

Durch die mittlerweile umfangreichen Forschungen sind einige Virulenzfaktoren von *Burkholderia*-Stämmen bekannt, die allein jedoch nicht für die teilweise fatalen Folgen der Infektion verantwortlich sind (s. auch 1.3.2 und 1.3.3). Eine im Zusammenhang mit Pathogenität wichtige Eigenschaft einiger Bakterienarten ist das sog. Quorum sensing (s. 1.3), das die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren steuert.

^{*} *B. cepacia* wurde zu dieser Zeit den Pseudomonaden zugeordnet. Neuere Forschungen ergaben, dass es sich bei *B. cepacia* um einen Komplex verschiedener *Burkholderia*-Arten handelt, wozu auch *B. cenocepacia* gehört.

1.1 Burkholderia cenocepacia und die Gattung Burkholderia

1.1.1 Taxonomie und Historie

1950 wurde von W. Burkholder ein Zwiebelfäule ("sour skin") verursachendes Bakterium isoliert, das er zunächst, hauptsächlich aufgrund seiner polaren Begeißelung, unter der Bezeichnung Pseudomonas cepacia den Pseudomonaden zuordnete (Burkholder, 1950). Schon damals war offensichtlich, dass einige Merkmale, wie die Bildung eines wasserlöslichen gelben Pigmentes und Wachstum bis 42 °C, nicht mit denen anderer pflanzenpathogener Bakterien dieser Gruppe in Einklang standen. 1992 wude das Bakterium schließlich in Burkholderia cepacia umbenannt und aus der sehr heterogenen Gruppe der Pseudomonaden ausgegliedert (Yabuuchi et al., 1992). Die Gattung Burkholderia umfasst mittlerweile mehr als 30 Arten (Coenye und Vandamme, 2003) und wird den β-Proteobakterien zugeordnet. Stämme, die zunächst als B. cepacia identifiziert wurden, wurden aufgrund hoher 16S rDNS-(98-100 %) und recA- (94-95 %) Ähnlichkeit bei einer nur mäßigen DNS-DNS-Hybridisierungsrate (30-50 %) im so genannten B. cepacia Komplex (Bcc.) zusammengefasst (Vandamme et al., 1997). Da zu Beginn der taxonomischen Bestimmung von B. cepacia eine phänotypische Unterscheidbarkeit und damit eine Arteinteilung nicht möglich war, wurden die Stämme zunächst in sog. Genomovare (s. Tabelle 1.1) eingeteilt, wobei die Genomovare V und IX sich als bereits bekannte Arten herausstellten (Gillis et al., 1995, Imanaka et al., 1965). Mittlerweile sind alle Genomovare als eigene Arten mit den entsprechenden binären Bezeichnungen anerkannt und der Name "Burkholderia cepacia" wird ausschließlich für Vertreter des Gv I verwendet. Der Typstamm für B. cenocepacia (Gv III) ist der sequenzierte Stamm J2315 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B cenocepacia/) bzw. LMG16656, der für B. cepacia (Gv I) ist ATCC 25416 (Rodley et al., 1995).

In den folgenden Kapiteln wurde die Bezeichnung "*B. cepacia*" entsprechend der Literatur beibehalten, wenn nicht erkennbar war, ob es sich um verschiedene Vertreter des *Burkholderia cepacia* Komplexes oder ausschließlich um Vertreter des Gv I handelte. Bei eindeutiger Identifikation der Genomovare wurden die neuen Artnamen, bei Vertretern verschiedener Genomovare, wurde die Bezeichnung "Bcc.-Arten" verwendet.

Name	Genomovar	Referenz
B. cepacia	Ι	Vandamme et al., 1997
B. multivorans	II	Vandamme et al., 1997
B. cenocepacia	III	Vandamme et al., 1997; 2003
B. stabilis	IV	Vandamme <i>et al.</i> , 1997; 2000
B. vietnamiensis	V	Vandamme et al., 1997
B. dolosa	VI	Coenye <i>et al.</i> , 2001a; Vermis <i>et al.</i> , 2003
B. ambifaria	VII	Coenye et al., 2001
B. anthina	VIII	Vandamme et al., 2002
B. pyrrocinia	IX	Vandamme et al., 2002
B. ubonensis*		Yabuucchi et al., 2000

Tab. 1.1: Genomovare und neue Artnamen

* Die taxonomische Position von *B. ubonensis* innerhalb des *B. cepacia* Komplexes ist noch nicht vollständig geklärt (Coenye und Vandamme, 2003)

1.1.2 Verbreitung und Charakteristika

Im allgemeinen sind Burkholderia-Arten als pflanzenpathogene Bodenbakterien bekannt, sie kommen aber auch im Süß- und Salzwasser vor. Im Boden können Burkholderien durch die Besiedlung von Wurzeln, die Produktion von Antibiotika oder die Fähigkeit einiger Arten, Stickstoff zu fixieren, nutzbringend und wachstumsfördernd für die Pflanze sein. Die genetischen und physiologischen Hintergründe der bemerkenswerten Vielfältigkeit und Anpassungsfähigkeit von Burkholderien sind weitgehend unbekannt. Die meisten Burkholderia-Arten, darunter sowohl Arten aus dem B. cepacia Komplex als auch andere, besitzen zwei bis vier Replikons mit Gesamtgrößen von 4,7 bis zu mehr als 9 Mb; B. cepacia besitzt ein 8,1 Mb großes Genom, das sich auf drei Chromosomen und ein Plasmid verteilt (Cheng und Lessie, 1994; Rodley et al., 1995), gleiches gilt für B. cenocepacia J2315. Neben dem großen Genom könnte die beträchtliche Anzahl von Insertionssequenzen in einigen Stämmen eine Rolle für die Anpassungsfähigkeit spielen. Burkholderien können offenbar polychlorierte Biphenyle (PCB) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden (Nogales et al., 1999) und Herbizide abbauen (Kilbane et al., 1982); B. cepacia wächst auf PVC (Drabick et al., 1996) und auf rostfreiem Stahl (Vaisanen et al., 1998), in Färbelösungen (Gravel et al., 2002; Morel et al., 2003) und sogar in Desinfektionsmitteln (Oie und Kamiya, 1996; Garcia-Erce et al.,

2002). Dass auch Rohmilch (Moore *et al.*, 2001) und Gelatine (De Clerck und De Vos, 2002) mit *B. cepacia* verunreinigt sein können, ist daher nicht weiter verwunderlich. *B. cepacia* stellt grundsätzlich keine Gefahr für den Menschen dar, weshalb eine Nutzung als Biokontrollorganismus zur Bekämpfung von Pflanzenschädlingen oder zur Förderung des Pflanzenwuchses erwogen wird. Auch ein Einsatz in der Bodensanierung ist denkbar. Bisher wird von einer tatsächlichen Verwendung jedoch abgesehen, da einige *Burkholderia*-Arten als opportunistisch pathogene Krankenhauskeime Infektionen auslösen können und für immunsupprimierte Menschen sowie CGD- ("Chronic Granulomatous Disorder", Chronische Granulomatose, eine erbliche Immunschwäche-Krankheit) und Mukoviszidose-Kranke (siehe 1.2) sogar eine ernste Bedrohung darstellen.

1.2 Mukoviszidose

1.2.1 Eine ererbte Anfälligkeit für bakterielle Atemwegsinfektionen

Mukoviszidose (Zystische Fibrose, CF) ist der häufigste autosomal vererbte letale Gendefekt in der kaukasischen Bevölkerung und tritt mit einer Rate von 1:2.500 bei Neugeborenen auf (Bye et al., 1994). Das CFTR-Gen ("cystic fibrosis transmembrane conductance regulator") codiert ein Chloridionenkanal-Protein (Drumm et al., 1990), das, neben anderen Funktionen, Chloridionen in beiden Richtungen durch die Zellmembran transportiert sowie Bicarbonatund Natrium-Transporter-Kanäle reguliert (Pier, 2002). Im allgemeinen wird bei einem homozygoten Defekt des CFTR-Gens das CFTR-Protein in Lungenepithelzellen nur geringfügig oder gar nicht exprimiert. Dies führt zu einem dehydrierten Flüssigkeitsmantel der Zellen und verstärkter Schleimbildung (isotonisches Modell). Die Zilienbewegung der Epithelzellen ist durch die erhöhte Viskosität verlangsamt, Bakterien bleiben länger in den Luftwegen und können sich vorübergehend oder dauerhaft festsetzen (Pilewski und Frizzell, 1999). Während bei Kindern mit Mukoviszidose vornehmlich Staphylococcus aureus und später Haemophilus influenzae die Lunge besiedeln, findet man, geografisch unabhängig, bei 80-90 % der erwachsenen Patienten Pseudomonas aeruginosa (Hutchison und Govan, 1999). Für das Vorherrschen von P. aeruginosa in der CF-Lunge werden verschiedene Hypothesen bezüglich der Anheftung von P. aeruginosa an Epithelzellen (DiMango et al., 1998), der Rolle von CFTR bei der Immunantwort (Goldberg und Pier, 2000; Pier, 2000) und Reaktionen des Lungengewebes auf bestimmte Virulenzfaktoren von P. aeruginosa (Park et al., 2000) diskutiert. Im Gegensatz zu anderen Bakterien kann die Besiedelung der Lunge mit multi-resistenten

Einleitung

Pseudomonaden kaum durch Antibiotika kontrolliert werden. Die Folgen sind eine chronische Entzündung des Lungengewebes und eine immer weiter abnehmende Lungenfunktion, die die Lebenserwartung von Mukoviszidose-Kranken auf durchschnittlich ca. 30 Jahre begrenzen.

1.2.2 Der B. cepacia Komplex – eine zusätzliche Bedrohung

In dem Zeitraum von 1971-1981 wurde in zwei CF-Zentren in Nordamerika eine erhebliche Zunahme der Infektionen von Mukoviszidose-Kranken mit B. cepacia festgestellt (Isles et al., 1984). Die Ursachen für die Infektion mit Burkholderia-Arten sind umstritten und begründen sich nur zum Teil in einer verbesserten Diagnostik. Für verstärktes regionales Auftreten von B. cepacia-Infektionen sind wahrscheinlich multiresistente, leicht übertragbare Stämme verantwortlich (Johnson et al., 1994). In B. cenocepacia Stämmen, die sich in Kanada ausgebreitet hatten, wurde der sog. "B. cepacia epidemic strain marker" (BCESM) gefunden, der eine mögliche Sequenz für den negativen Transkriptionsregulator EsmR enthält (Mahenthiralingam et al., 1997) und Teil einer 31,7 kb großen Insel ist, auf der Gene für Pathogenität und Metabolismus codiert sind (Baldwin et al., 2004). ET12 (B. cenocepacia J2315), ein weiterer hochinfektiöser Gv III-Stamm, der sich über Kanada nach England ausgebreitet hatte, enthält zusätzlich Gene für einen sog. "cable-pilus" (Mahenthiralingam et al., 2000). Verschiedene "epidemische" Stämme haben jedoch auch eine große Ähnlichkeit mit Umweltisolaten (Coenye und LiPuma, 2002; LiPuma et al., 2002). In Nordamerika sind im Schnitt ca. 20 % der CF-Patienten mit Vertretern des B. cepacia Komplexes infiziert (Hutchison und Govan, 1999), wobei die Bakterien seltener allein, aber häufig als Co-Infektion bei einer schon bestehenden Infektion mit P. aeruginosa auftreten (Johansen et al., 1998). In Deutschland und anderen europäischen Ländern sind weniger als 10 % der CF-Patienten mit Burkholderia-Arten infiziert (Häussler et al., 2003; Cunha et al., 2003; Agodi et al., 2001; De Soyza et al., 2001). Die Infektion mit dem Bcc.kann nur vorübergehend und damit vergleichsweise harmlos sein, sie kann aber auch chronisch werden und dadurch zu einer ständigen Verschlechterung der Lungenfunktion führen. Im schlimmsten Fall kann sich das sog. Cepacia-Syndrom entwickeln, eine nekrotisierende Lungenentzündung, die innerhalb kurzer Zeit zum Tode führt. Dies ist bei ca. 20 % der infizierten Patienten der Fall (Isles et al., 1984). Vertreter aller Genomovare sowie B. gladioli und B. fungorum wurden bisher in den befallenen Patienten gefunden, die Mehrheit der Isolate bestand jedoch aus B. cenocepacia; am zweithäufigsten wurde B. multivorans isoliert (Bernhardt et al., 2003; LiPuma et al., 2001; Speert et al., 2002).

Infektionen mit *B. cenocepacia*-Stämmen werden mit einer Verschlimmerung der Krankheit und erhöhter Sterblichkeit in Zusammenhang gebracht, besonders tragisch ist jedoch die Tatsache, dass offenbar auch die Überlebenschancen nach einer Lungentransplantation geringer sind (Aris *et al.*, 2001; DeSoyza *et al.*, 2001, Ledson *et al.*, 2002). Die durchschnittliche Lebenserwartung von Patienten, die mit Bcc.-Vertretern infiziert sind, beträgt nur 15-20 Jahre. Aufgrund von Multiresistenzen und leichter Übertragbarkeit einiger *B. cepacia* Komplex-Arten (darunter z. B. auch *B. multivorans*), müssen mit dem Bcc. infizierte Patienten strikt von anderen Mukoviszidose-Kranken getrennt werden, was zusätzliche psychische und soziale Belastungen für die Patienten bedeutet.

1.3 Quorum sensing

Der Begriff Quorum sensing beschreibt die Fähigkeit von Bakterien, mit Hilfe verschiedener Signalmoleküle ihre eigene Populationsdichte wahrzunehmen und ihre Genexpression entsprechend umzustellen (Fuqua *et al.*, 2001). Man findet Quorum sensing Vorgänge in Grampositiven und Gram-negativen Bakterien (Novick *et al.*, 1999; Whitehead *et al.*, 2001) und möglicherweise auch in Archeen (Paggi *et al.*, 2003). Zu den am besten untersuchten Quorum sensing-Systemen gehören die durch *N*-Acyl-homoserinlactone (AHL) gesteuerten Systeme, wie man sie bei einigen alpha-, beta- und gamma-Proteobakterien findet.

1.3.1 N-Acyl-homoserinlacton-gesteuertes Quorum sensing in Proteobakterien

Bei Vertretern der alpha-, beta- und gamma-Proteobakterien reguliert Quorum sensing so unterschiedliche Eigenschaften wie z. B. die Biolumineszenz, das Schwärmen, die Bildung von Biofilmen, die Expression von Virulenzfaktoren, die Antibiotikasynthese und den konjugativen Plasmidtransfer (Miller und Bassler, 2001). In den meisten Fällen sind die regulierten Gene an Interaktionen mit einem eukaryotischem Wirt beteiligt (Parsek und Greenberg, 2000; s. auch 1.3.2). Die Wahrnehmung der Populationsdichte geschieht mit Hilfe spezieller Signalmoleküle, die zunächst als "autoinducer" bezeichnet wurden (Nealson *et al.*, 1970). Chemisch betrachtet handelt es sich dabei um *N*-Acyl-(L)-homoserinlactone (AHL), Fettsäurederivate, die sich in der Länge sowie Grad der Substitution und Sättigung ihrer Acyl-Seitenkette unterscheiden. AHL mit kurzen Seitenketten können frei durch die Zellwand diffundieren (Kaplan und Greenberg, 1985; Pearson *et al.*, 1999), größere Moleküle werden aktiv transportiert (Evans *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 1999). Aufgeklärt wurde der als "autoinduction" (Nealson et al., 1970) bezeichnete und dem Quorum sensing zugrunde liegende Regulationsmechanismus am Beispiel der Biolumineszenz von Vibrio fischeri. Während V. fischeri bei geringer Zelldichte nur wenig Licht emittiert, ist bei einer hohen Zelldichte (10¹⁰-10¹¹ Zellen/ml) ein blau-grünes Leuchten zu sehen. Ursache hierfür ist die AHL-regulierte Expression des Biolumineszenz-Operons luxICDABEG. Bei geringer Zelldichte wird das lux-Operon nur auf einem Grundniveau exprimiert, d. h. die AHL-Synthase LuxI produziert eine geringe Menge Signalmoleküle und über die Luziferase-Gene luxCDABE wird eine geringe Menge Licht emittiert. Mit steigender Zelldichte nimmt die AHL-Konzentration in der Umgebung zu, im Falle von V. fischeri z. B. auf mindestens 100 nM (Boettcher und Ruby, 1995). Bei einem Schwellenwert von 5 bis 50 nM (Eberhard et al., 1981) können die AHL an den in einem separaten Operon codierten Rezeptor LuxR binden. Das durch AHL aktivierte LuxR-Protein bindet an die sog. lux-Box, eine Sequenz 40 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart des luxICDABEG-Operons, und aktiviert damit dessen Transkription. Lichtemission und AHL-Synthese werden durch diesen positiven Rückkopplungsmechanismus in kurzer Zeit exponentiell gesteigert. Bei einer sehr hohen AHL-Konzentration reprimiert das aktivierte LuxR die weitere Transkription des *luxR*-Gens.

Aufgrund der Ähnlichkeit der AHL und der Quorum sensing-Systeme bei den verschiedenen Gram-negativen Bakterienarten, ist neben der intra- auch eine interspezies-Verarbeitung der Signalmoleküle sehr wahrscheinlich (Bassler, 2002). Dass AHL auch an LuxR-Homologe anderer Spezies binden können, wurde in vitro am Beispiel von *B. cepacia* und *P. aeruginosa* gezeigt (McKenney *et al.*, 1995). In gemischten Biofilmen von *P. aeruginosa* und Bakterien des Bcc., wie sie in der Lunge von chronisch co-infizierten Mukoviszidose-Patienten vorkommen, wurde nachgewiesen, dass *B. cenocepacia* vor allem längerkettige Signalmoleküle von *P. aeruginosa* aufnehmen und verarbeiten kann (Riedel *et al.*, 2001). Auch für *B. cepacia* wurde eine hohe Aktivität von CepR mit längerkettigen Homoserinlactonen nachgewiesen (Aguilar *et al.*, 2003).

Von verschiedenen Bakterien ist bekannt, dass sie AHL abbauen und auf diese Weise die Quorum sensing regulierte Pathogenität unterbinden können (Leadbetter und Greenberg, 2000; Dong *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2003). Eukaryoten wie die Rotalge *Delisea pulchra* produzieren AHL-ähnliche Hemmstoffe, die so mit dem Rezeptor interagieren, dass dieser beschleunigt abgebaut und folglich das Quorum sensing gestört wird (Givskov *et al.*, 1996, Manefield *et al.*, 2002). Einige Polyphenole wie Tannin und Ellagsäure können den Quorum sensing Prozess blockieren, jedoch ist ihr Effekt nicht so stark wie der der Furanone (Huber *et al.*, 2003). Auch Knoblauch und Himbeeren haben einen Effekt auf das Quorum sensing, wobei die molekularen Grundlagen erst seit kurzer Zeit genauer erforscht werden (Givskov, pers. Mitteilung; Huber, pers. Mitteilung).

1.3.2 Quorum sensing und Pathogenität

In pflanzen- und tierpathogenen Bakterien dient das Quorum sensing vermutlich der Minimierung der Immunantwort des Wirts. Die Produktion von Virulenzfaktoren wird verzögert, bis genügend Bakterien vorhanden sind, um einer Immunantwort zu widerstehen (Costerton et al., 1999). Beispiele für Quorum sensing-gesteuerte Virulenz findet man bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Zu den Gram-positiven Pathogenen gehören z. B. Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus und Enterococcus faecalis, zu den Gram-negativen P. aeruginosa, Erwinia carotovora, Agrobacterium tumefaciens, Serratia liquefaciens, Vibrio cholerae und E. coli O157:H7. Eines der am besten untersuchten Quorum sensing-Systeme ist das von P. aeruginosa. Dieses opportunistisch pathogene Bakterium ist ein häufiger Krankenhauskeim und verursacht gefährliche Lungenentzündungen bei immunsupprimierten Menschen oder Mukoviszidose-Kranken (s. 1.2.1) sowie Infektionen bei Patienten mit schweren Brandverletzungen, die in 80 % der Fälle tödlich verlaufen (Richard et al., 1994). Ursache der Pathogenität von P. aeruginosa ist seine Fähigkeit, verschiedene Virulenzfaktoren zu sekretieren, u. a. Proteasen, Elastasen, Rhamnolipide, Hämolysine, Exotoxin A und Exotoxin S, Siderophore und HCN. Durch das Zusammenwirken der Virulenzfaktoren wird Säuger-Gewebe erheblich geschädigt (Nicas und Iglewski, 1985; van Delden und Iglewski, 1998), ferner wird vermutet, dass Elastasen und Rhamnolipide zu einer Ausbreitung von P. aeruginosa in die Blutbahn beitragen (Pearson et al., 1997 und 2000). Die direkte Regulation der Virulenzfaktoren geschieht durch zwei Quorum sensing-Systeme, das LasRI- und das RhlRI-System. Das LasRI-System reguliert u. a. die Expression der beiden Elastasen LasA und LasB, Exotoxin A und alkalischer Protease (Toder et al., 1991; Passador et al., 1993; Gambello et al., 1993; Jones et al., 1993), es reguliert seine eigene Expression und die von rhll (Pesci und Iglewski, 1997). Das RhlRI System kontrolliert u. a. die Produktion von oberflächenaktiven Rhamnolipiden (Ochsner et al., 1994), Pyocyanin und HCN (Pessi und Haas, 2000). Eingebunden in das Quorum sensing-Netzwerk ist ein drittes System, das 2-Heptyl-3hydroxy-4-quinolon (*Pseudomonas* Quinolon Signal, PQS) als Signalmolekül verwendet (Pesci *et al.*, 1999). Das Las- und das Rhl-System unterliegen einer globalen Regulation durch das CRP ("CAMP receptor protein")-Homolog Vfr (Albus *et al.*, 1997), dem globalen Aktivator GacA (Reimmann *et al.*, 1997), der mit GacS (LemA) ein Zwei-Komponenten-System bildet, sowie dem Genprodukt von *rsaL* (de Kievit *et al.*, 1999). Die Transkription von *rhlI* wird durch den Sigma-Faktor RpoN positiv reguliert (Thompson *et al.*, 2003).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Quorum sensing-Mutanten von *P. aeruginosa* weniger pathogen sind als der Wildtyp-Stamm. So verursachte z. B. eine PAO1 *lasR*-Mutante im Mausmodell keine tödliche Lungenentzündung mehr (Tang *et al.*, 1996). Die PAO1 Quorum sensing-Mutanten *lasI* (PAO1-JP1) und *rhlI* (PDO100) sowie die *lasI-rhlI* Doppelmutante PAO1-JP2 waren ebenfalls weniger virulent im Mausmodell bezüglich der Auslösung von Lungenentzündungen (Pearson *et al.*, 2000) und der Infektion von Brandwunden (Rumbaugh *et al.*, 1999a und 1999b). Eine *gacA*-Mutante des klinischen Isolats PA14 war weniger virulent im Mausmodell bezüglich der Infektion von Brandwunden und ebenfalls weniger virulent in *Arabidopsis thaliana* (Rahme *et al.*, 1995). Dieselbe *gacA*-Mutante sowie eine PA14 *lasR*-, eine *lemA*- und eine *rpoN*-Mutante waren im *C. elegans*-Modell bzw. letztgenannte auch im Mausmodell attenuiert (Tan *et al.*, 1999b, Hendrickson *et al.*, 2001). In vitro Pathogenitäts-Studien zeigten außerdem, dass die Ursache für die verringerte Pathogenität von Quorum sensing-Mutanten nicht allein in dem Ausfall verschiedener Virulenzfaktoren zu sehen ist, sondern dass die AHL selbst als Virulenzfaktoren wirken und mit dem Immunsystem interagieren können (DiMango *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1996; Telford *et al.*, 1998).

1.3.3 Quorum sensing in *B. cenocepacia* H111

In *B. cenocepacia* H111 wird Quorum sensing durch die LuxI und LuxR Homologe CepI und CepR und, wie in den meisten Stämmen des Bcc., durch *N*-Octanoyl-homoserinlacton (C8-HSL) reguliert (Lewenza *et al.*, 1999, Gotschlich *et al.*, 2001). Außer C8-HSL wird von *B. cenocepacia* H111 sowie vielen Vertretern des Bcc. eine geringe Menge *N*-Hexanoyl-homoserinlacton (C6-HSL) produziert, dessen Funktion aber noch unklar ist. Auch das Quorum sensing-System von *B. cenocepacia* ist einer übergeordneten Regulation unterworfen. Bei den entsprechenden Genen handelt es sich um Orthologe der *E. coli*-Gene *yciR*, *yciL* und

suhB und sie wurden zum Zeitpunkt ihrer Charakterisierung demgemäß benannt (Huber *et al.*, 2002). Mittlerweile ist YciL seiner Funktion nach unter RsuA in das COG-System (,,<u>C</u>luster of <u>O</u>rthologous <u>G</u>roups of proteins") eingeordnet, weshalb im folgenden anstelle von *yciL* die Genbezeichnung *rsuA* verwendet wird.

Quorum sensing steuert in *B. cenocepacia* die Produktion klassischer Virulenzfaktoren wie Proteasen, Lipasen und den zu den Siderophoren gehörenden Ornibactinen (Lewenza *et al.*, 1999) sowie die Biofilm-Bildung und das Schwärmen (Huber *et al.*, 2001). Insgesamt sind mindestens 55 Proteine (ca. 6 %) in *B. cenocepacia* durch Quorum sensing reguliert (Riedel *et al.*, 2003), darunter FimA, das in *E. coli* die Hauptuntereinheit der als wichtige Virulenzfaktoren angesehenen TypI-Pili bildet, die Superoxiddismutasen SodA und SodB sowie AidA, ein Protein mit bisher unbekannter Funktion, dessen Ausfall jedoch zu einer Attenuierung im *C. elegans*-Modell führte (Merkl, 2003) Ferner wurde gezeigt, dass Quorum sensing die Expression von *rpoS* negativ reguliert (Aguilar *et al.*, 2003).



Abb. 1.1: Schematische Darstellung des QS-Regulons von *B. cenocepacia* H111 (Huber, 2002a; verändert). Die AHL-Synthase CepI produziert das Signalmolekül C8-HSL, welches frei durch die Zellwand diffundieren kann. Erreicht die C8-HSL-Konzentration einen kritischen Schwellenwert, so bindet das Signalmolekül an den Transkriptionsregulator CepR, der die Transkription von Zielgenen (z. B. für die Protease-Produktion) aktiviert. Außer der Transkription extrazellulärer Virulenzfaktoren kontrolliert CepR auch die Transkription von *cepI*. CepR übergeordnet sind die Regulatoren SuhB, RsuA und YciR.

Neben den durch Quorum sensing regulierten Virulenzfaktoren produziert *B. cenocepacia* klassische Virulenzfaktoren wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Exopolysaccharide (EPS), der hochinfektiöse Stamm *B. cenocepacia* J2315 produziert sog. cable-pili, die bei der Anheftung an Epithelzellen eine Rolle spielen, sowie ein Hämolysin (Hutchison *et al.*, 1998). H111 bildet jedoch nachgewiesenermaßen keine cable-pili (Bauer, 2003). Der Einfluss der verschiedenen Virulenzfaktoren auf die Pathogenität von *B. cenocepacia* ist noch nicht vollstländig untersucht, auch über infektionsauslösende Faktoren ist wenig bekannt. Im Falle der Proteasen und Lipasen konnte im Wurmmodell kein Einfluss auf die Pathogenität nachgewiesen werden (Köthe *et al.*, 2003).

1.4 Caenorhabditis elegans

1.4.1 Allgemeine Beschreibung und Anatomie

C. elegans ist ein frei lebender, terrestrischer Nematode (Rund- oder Fadenwurm, Älchen), den man weltweit in den gemäßigten Klimazonen findet. Er ernährt sich von Bakterien und hat unter optimalen Bedingungen (20 °C, ausreichende Nahrung) einen Lebenszyklus von drei Tagen. Der Körper ist ungegliedert und vollständig von einer Epidermis mit darüberliegender Cuticula bedeckt. Es sind ausschließlich Längsmuskeln vorhanden, die unter der Epidermis liegen. Der Verdauungsapparat durchzieht den ganzen Körper. Vorn befindet sich eine cuticularisierte Mundhöhle mit einer dickwandigen Mundkapsel, darauf folgt ein als Saugpumpe fungierender Schlund (Pharynx). Dieser ist ebenfals mit einer Cuticula ausgekleidet und im hinteren Teil zu einem besonders muskulären Bulbus mit drei ineinandergreifenden Zähnen ausbildet, die die aufgenommenen Mikroorganismen zermahlen ("grinder"). Der Darm ist in Mittel- und Enddarm unterteilt. Die Mitteldarmwand besteht aus einer einzigen Lage von gleichzeitig verdauenden und resorbierenden Zellen und ist gegen das Pseudocoel durch eine Basalmembran abgegrenzt. Dem Lumen zugewandt befindet sich eine Schicht Microvilli. Der Enddarm ist cuticularisiert.

Es existieren zwei Geschlechter, Hermaphroditen (XX) und Männchen (X0). Männchen entstehen spontan mit einer natürlichen Rate von 1:500 durch sog. "nondisjunction", dem Nicht-Trennen von Chromosomen in der Meiose. Beim hier verwendeten Stamm Bristol N2 beträgt der Anteil der Männchen 0,2 %. Hermaphroditen produzieren Oozyten und Spermien und vermehren sich durch Selbstbefruchtung. Sie können sich mit Männchen, aber nicht gegenseitig paaren. Beide Geschlechter leben nach Erreichen des Erwachsenenstadiums ca. 17 Tage. Während das Männchen während seines ganzen Lebens Spermien produziert, ist ein Hermaphrodit nur ca. 4 Tage lang fruchtbar und legt während dieser Zeit ca. 300 Eier. Durch Paarung können bis zu 1.000 Nachkommen gezeugt werden. Die Entwicklung vom Ei zum erwachsenen Wurm erfolgt über vier Larvenstadien, L1 bis L4, die sich nur in ihrer Größe unterscheiden (s. Abb. 1.2).



Abb 1.2: Erwachsener Wurm im Vergleich mit den vier Larvenstadien, Maßstab = 0,5 mm, Aufnahmen von J. Ahringer

Während des Wachstums häuten sich die Nematoden, sie können jedoch auch zwischen den Häutungen und nach der letzten Häutung wachsen. Bei Nahrungsmangel kann *C. elegans* beim Übergang vom zweiten zum dritten Larvenstadium spezialisierte L3-Stadien, sog. Dauerstadien, bilden. Larven im Dauerstadium nehmen keine Nahrung auf, sind resistent gegenüber Austrocknung und können bis zu drei Monaten überleben. Ist wieder Nahrung vorhanden, wird die normale Entwicklung über das L4-Stadium zum erwachsenen Tier fortgesetzt.

1.4.2 C. elegans als Modellorganismus

Anfang der 1960er Jahre wurde *C. elegans* von Sidney Brenner als Modellorganismus für die Erforschung der Entwicklung und des Nervensystems höherer Organismen ausgewählt. Zahlreiche Aspekte machen *C. elegans* zum geeigneten Modellorganismus: einfache Anatomie und geringe Größe, einfache Haltung auf Agarplatten oder in Flüssigkultur mit Bakterien als Nahrungsquelle, eine konstante, relativ niedrige Zellzahl beim adulten Tier und vor allem seine Transparenz, die es ermöglicht, die Entstehung und Entwicklung einzelner Zellen zu verfolgen. 1998 wurde als erstes tierisches Genom die komplette DNS-Sequenz von *C. elegans* publiziert (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), im Oktober 2002 wurden letzte Lücken in der Sequenz geschlossen. Mit ca. 97 Mio bp (ca. 20.000 Gene) ist das *C. elegans* Genom etwa dreißigmal kleiner als das des Menschen und halb so groß wie das von *Drosophila*. *C. elegans* ist ein diploider Organismus mit fünf Paaren autosomaler Chromosomen (I, II, III, IV, V) und - bei Hermaphroditen - einem Paar Geschlechtschromosom (XX). Trotz der geringen Größe des Genoms wurden bisher von 84 klonierten, krankheitsassoziierten humanen Genen 25 direkte Orthologe in *C. elegans* gefunden, 43 weitere Gene weisen eine große Ähnlichkeit mit Nematodengenen auf (Mushegian *et al.*, 1998).

1999 wurde C. elegans erstmals als Modell zur Untersuchung bakterieller Virulenzfaktoren verwendet (Tan et al., 1999a; s. auch 1.3.2). Anstelle der normalen Futterquelle, E. coli OP50, wurde C. elegans mit dem klinischen Isolat P. aeruginosa PA14 gefüttert. Dabei stellte sich heraus, dass die Produktion von Virulenzfaktoren durch P. aeruginosa und somit auch das Sterben der Würmer mediumabhängig ist. Auf dem üblicherweise verwendeten, leicht abgewandelten Wurm-Wachstums-Medium (NGMII) starb C. elegans innerhalb von 2-3 Tagen durch einen infektionsähnlichen Prozess, bei dem die Bakterien sich im Wurmdarm vermehren ("slow killing"), während das Sterben auf einem nährstoffreicheren Medium mit hoher Osmolarität (PGS) schon nach 4-24 h einsetzte ("fast killing") und allein durch die Exoprodukte der Bakterien ausgelöst werden konnte (Mahajan-Miklos et al., 1999). Eine dritte Form des Sterbens durch Lähmung wurde auf BHI-Medium ausgelöst ("paralytic killing", Darby et al., 1999). Ein Auswahlverfahren mit TnphoA-Mutanten von PA14 zeigte, dass unterschiedliche Faktoren für das schnelle oder langsame Sterben der Würmer verantwortlich waren. Mutanten, die beim schnellen Sterben der Würmer eine verringerte Virulenz zeigten, hatten in der Mehrzahl Defekte in der Phenazinproduktion, während Mutanten, die weniger infektiös waren, hauptsächlich Defekte in Quorum sensing-Genen aufwiesen (Mahajan-Miklos et al., 1999; Tan et al., 1999b). Auch die letale Paralyse wurde durch Quorum sensing-Mutanten nicht mehr ausgelöst (Darby et al., 1999). C. elegans erwies sich aus mehreren Gründen als geeignetes Modell: zum einen konnte eine große Zahl an Bakterien-Mutanten getestet werden, zum anderen erwiesen sich Mutanten, die bereits im Maus- oder Arabidopsis-Modell attenuiert waren, auch in C. elegans als weniger virulent. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, gezielt C. elegans-Mutanten einzusetzen, um näheres über die an einer Infektion beteiligten Wirtsgene herauszufinden.

1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte *C. elegans* als Modellorganismus für die Untersuchung der Pathogenität des klinischen Isolates *B. cenocepacia* H111 (Römling *et al.*, 1994) verwendet und die Methode etabliert werden. Der Stamm wurde aus einem Mukoviszidose-Patienten isoliert, der bereits mit *P. aeruginosa* infiziert war. Obwohl H111 zu der häufig gefährlichen Gv III-Gruppe gehört, verlief die Infektion asymptomatisch und der Stamm konnte achtzehn Monate nach der ersten Isolierung nicht mehr nachgewiesen werden.

Der Stamm H111 produziert im Gegensatz zu J2315 keine cable-pili und ist auch nicht invasiv (Steidle, pers. Mitteilung). Trotzdem konnte er über einen längeren Zeitraum in der Patientenlunge überleben. Da über die Virulenzfaktoren und den Einfluss von Quorum sensing auf die Pathogenität von *B. cenocepacia* bisher - im Gegensatz zu *P. aeruginosa* - nur wenig bekannt ist, sollen folgende Fragestellungen in dieser Arbeit geklärt werden:

- 1) Welchen Einfluss hat Quorum sensing auf die Pathogenität von *B. cenocepacia* H111?
- Welche Gene (Qs und nicht Qs-reguliert) spielen bei der Virulenz von *B. ceno-cepacia* H111 eine Rolle?
- Wie groß ist der Einfluss einzelner Virulenzfaktoren auf die Pathogenität von B. cenocepacia?
- Welche Auswirkungen haben QS-Hemmstoffe auf die Pathogenität von B. cenocepacia und P. aeruginosa im Wurmmodell?

2 Material und Methoden

2.1 Standardtechniken für das Arbeiten mit Bakterien

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2.1 zeigt sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, in Tabelle 2.2 sind die für Klonierungen, Komplementationen und Sequenzierung verwendeten Plasmide aufgeführt.

Stamm	Eigenschaften	Referenz	
E. coli:			
XL1-Blue	<i>recA⁻ thi hsdR1 supE44 relA1 lacF' proAB lacI^q</i>	Bullock et al., 1987	
	<i>lacZ</i> (M15 Tn <i>10</i> [Tet]		
DH5a	$supE44 \Delta lacU169(\phi 80 lacZ\Delta M15) hsdR17 recA1$	GibcoBRL	
	endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Hanahan, 1983	
TOP10	$F^{-}mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ\Delta M15$	Invitrogen	
	$\Delta lacX74 \ recA1 \ deoR \ araD139 \ \Delta(ara-leu)7697$		
	galU galK rpsL (Strr) endA1 nupG		
HB101	$recA$ thi pro leu $hsdR^{-}M^{+}$ Sm ^r	Boyer und Roulland-	
		Dussoix, 1969	
MT102	F ⁻ <i>thi araD</i> 139(ara-leu) Δ 7679 Δ (<i>lacIOPZY</i>)	T. Hansen, Novo	
	$galU gal'K r^{-} m^{+} Sm^{r}$	Nordisk A/S	
OP50	Uracil auxotroph, Nahrungquelle für C. elegans	Brenner, 1974	
B. cenocepacia:			
H111	CF Isolat, Gv III, Wildtyp	Römling et al., 1994,	
		Gotschlich et al., 2001	
H111-I	Km ^r , <i>cepI</i> ::Km Mutante von H111	Huber et al., 2001	
H111-R	Km ^r , <i>cepR</i> ::Km Mutante von H111	Huber <i>et al.</i> , 2001	
H111 gspE	Km ^r , <i>gspE</i> ::Km Mutante von H111	Huber et al., 2002	
H111 gspF	Km ^r , <i>gspF</i> ::Km Mutante von H111	Köthe et al., 2003	
H111 gspD	Km ^r , <i>gspD</i> ::Km Mutante von H111	Köthe et al., 2003	
H111 gspL	Km ^r , <i>gspL</i> ::Km Mutante von H111	Köthe et al., 2003	
G3	Km ^r , <i>lon</i> ::Km Mutante von H111	Antl, 2001; diese Arbeit	
E5	Km ^r , <i>rsuA</i> ::Km Mutante von H111	Huber et al., 2002	
H111 suhB	Km ^r , <i>suhB</i> ::Km Mutante von H111	Huber et al., 2002	
A4	Km ^r , <i>purD</i> ::Km Mutante von H111	diese Arbeit	
D9	Km ^r , <i>purF</i> ::Km Mutante von H111	diese Arbeit	
A11	Km ^r , <i>aroK</i> ::Km Mutante von H111	diese Arbeit	
B7	Km ^r , Mutante von H111	diese Arbeit	
D6	Km ^r , <i>pyrD</i> ::Km Mutante von H111	diese Arbeit	
H2	Km ^r , <i>ilvC</i> ::Km Mutante von H111	diese Arbeit	

Tab. 2.1: Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
P. aeruginosa		
PAO1	Wildtyp	Holloway, 1955
PAO1 JP2	Quorum sensing Mutante, $Hg^r Tc^r \Delta lasI \Delta rhlI$	Pearson et al., 1997

Tab. 2.2: Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCR2.1-TOPO	Klonierungsvektor, Ap ^r Km ^r pUC19 ori	Invitrogen
	lacZα	
pRK600	Helfer-Plasmid für triparentale Konjugation, Cm ^r oriColE1 RK2-Mob ⁺ RK2-Tra ⁺	Kessler et al., 1992
pBBR1MCS-5	broad-host-range Klonierungsvektor, oriT	Kovach et al., 1995
	$lacZ\alpha Gm^{r}$	
pBAH27	Gm ^r , pBBR1MCS-5 mit <i>cepR</i> -Gen von	Huber <i>et al.</i> , 2001
	B. cenocepacia H111	
pUC19	high-copy Klonierungs-Vektor, <i>lacZa</i> Apr	Yanisch-Perron et al., 1985
	pMB1 (mutiert)	
pSB403	biolumineszentes Sensorplasmid, Te ^r	Winson <i>et al.</i> , 1998
	<i>luxRI</i> ':: <i>luxCDABE</i> transkriptionelle Fusion	
pAS-C8	fluoreszentes Sensorplasmid, Gm ^r	Riedel <i>et al.</i> , 2001
	pBBR1MCS-5 mit P _{lasB} -gfp(ASV) P _{lac} -lasR	

2.1.1 Nährmedien

Die Nährmedien wurden mit einfach entionisiertem Wasser ($H_2O_{dest.}$) angesetzt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Lösungen und Puffer wurden mit entionisiertem und sterilfiltriertem Wasser ($H_2O_{bidest.}$) aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q-Plus, Millipore, Eschborn) hergestellt. Bei Festmedien wurden 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Nicht autoklavierbare Zusätze wurden sterilfiltriert (Sterilfilter Acrodisc 0,2 µm; Pall, Ann Arbor, USA) oder in 50 % EtOH oder DMF angesetzt und dem Medium nach dem Autoklavieren zugegeben. Die Lagerung der Nährmedien erfolgte bei 4 °C.

LB-Medium (Bertani, 1951; verändert)

Trypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

SOC-Medium (Sambrook et al., 1989)		
Trypton	2,0 % (w/v)	
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	
NaCl	10 mM	
MgCl ₂	10,0 mM	
MgSO ₄	10,0 mM	
Glukose	0,36 % (w/v)	

MgCl₂ und MgSO₄ wurden als 1 M Stammlösung getrennt autoklaviert und in das autoklavierte und abgekühlte Medium gegeben.

PIA (Pseudomonas Isolation Agar; Difco, Detroit, USA)

Der Agar enthält als selektiven Bestandteil das Breitband-Antibiotikum Irgasan[®] [5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)phenol]. Irgasan[®] inhibiert die Fettsäure-Biosynthese und kann von *P. aeruginosa* mit Hilfe der MexAB-OprM Effluxpumpe aus der Zelle herausbefördert werden (Schweizer, 1998). 45 g des Agars wurden nach Anleitung des Herstellers mit 980 ml H₂O und 20 ml Glycerin als Kohlenstoffquelle vermischt und autoklaviert.

Inhaltsstoffe pro Liter (lt. Hersteller):

Pepton	20 g
MgCl ₂	1,4 g
K_2SO_4	10,0 g
Irgasan [®]	0,025 g
Agar	13,6 g

ABC-Medium (Clark und Maaløe, 1967; verändert)

2 % (w/v)
6 % (w/v)
3 % (w/v)
3 % (w/v)

Komponente B:		
1 M MgCl ₂	2 ml	(Stammlsg: 20,33 g / 100 ml)
0,5 M CaCl ₂	0,2 ml	(Stammlsg. 7,351 g / 100 ml
0,01 M FeCl ₃	0,3 ml	(Stammlsg. 0,2703 g / 100 ml)
H ₂ O _{dest.}	ad 900 ml	

Komponente C:

1 M Citrat

Alle drei Komponenten wurden getrennt autoklaviert, um ein Ausfallen der Salze zu vermeiden. Anschließend wurden 100 ml A und als Kohlenstoffquelle 10 ml Citrat zu 900 ml B-Medium gegeben. Für ABC-Platten wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar zu 900 ml Komponente B gegeben.

2.1.3 Antibiotika und andere Medienzusätze

Die Antibiotika wurden i. d. R. als 1.000-fach konzentrierte Stammlösungen hergestellt und in 1 ml-Aliquots bei -20 °C gelagert. Isoleucin und Valin wurden bei RT gelagert. Die Zusätze wurden steril in die autoklavierten, höchstens 50 °C heißen Medien gegeben oder auf den fertigen Agar ausplattiert.

Antibiotikum	Endkonz.	Stammlösungen
Gentamicin	20 µg/ml	$20 \text{ mg}/\text{ml} \text{ in } H_2O_{bidest.}$ sterilfiltriert
Kanamycin	50 µg/ml	50 mg/ml in $H_2O_{bidest.}$ sterilfiltriert
Chloramphenicol	10 µg/ml	20 mg/ml in 100 % EtOH
Tetracyclin	15 µg/ml	15 mg/ml in 50 % EtOH
Nystatin	50 µg/ml	10 mg/ml in Ammoniumacetat/EtOH

andere Medienzusätze:

IPTG	100 mg/l	100 mg/ml in H2Obidest. sterilfiltriert
X-Gal	40 mg/l	40 mg/ml in DMF
Adenosin	500 µM	2,5 mM in 50 % EtOH
L-Isoleucin	50 µg/ml	25 mg/ml in H2Obidest. sterilfiltriert

L-Valin	$50 \ \mu g/ml$	50 mg/ml in $H_2O_{bidest.}$ sterilfiltriert
Cystein	500 µM	25 mM in H ₂ O _{bidest.} sterilfiltriert

2.1.4 Zellanzucht

E. coli, B. cenocepacia und P. aeruginosa wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln in 5 ml LB und den jeweiligen Zusätzen in Reagenzgläsern angezogen. Hierzu wurde mit einer sterilen Impföse oder Pipettenspitze eine Einzelkolonie von einer Platte ins Flüssigmedium überführt oder ein Aliquot aus einer Stammkultur entnommen. Für größere Zellmengen wurden 200 ml Medium in 1 l Erlenmeyer-Kolben mit einer 5 ml Übernachtkultur 2 %ig angeimpft.

2.1.5 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Für die Herstellung von Stammkulturen wurden 5 ml LB-Medium wie in 2.1.4 beschrieben angeimpft und inkubiert. Ein Aliquot der Flüssigkultur wurde 2:1 mit 50 %igem sterilem Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert. Stichproben wurden unter dem Mikroskop auf die Einheitlichkeit der Zellen hin überprüft.

2.1.6 Zentrifugation

Wenn nicht anders angegeben, wurden die in den folgenden Punkten erwähnten Zentrifugationsschritte in einer Heraeus-Tischzentrifuge (Biofuge pico) bei 13.000 rpm und RT durchgeführt.

2.1.7 Medien für die physiologische Charakterisierung

Für die phänotypische Charakterisierung der Bakterienmutanten wurden Medien verwendet, auf denen das Vorhandensein einer bestimmten Eigenschaft durch Hofbildung um die Kolonie oder eine veränderte Koloniemorphologie angezeigt wird.

Chromazurol S (CAS) – Agar (Schwyn und Neilands, 1987; verändert)

Dieser Agar wird zum universellen Nachweis von Siderophoren verwendet. Chromazurol S bildet mit Fe³⁺ und HDTMA (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) einen blauen Komplex unbekannter Struktur. Wird das Eisen durch einen starken Liganden, wie z. B. ein Siderophor, aus dem Komplex entfernt, erfolgt ein Farbumschlag zu orange. Siderophor-Produzenten

bilden einen orangefarbenen Hof im sonst blauen CAS-Agar, sofern die Konzentration der ins Medium abgegebenen Siderophore 10 μ M überschreitet, was bei der Anzucht von Mikroorganismen unter Eisenmangel i. d. R. der Fall ist.

CAS-Stammlösung:

60,5 mg Chromazurol S wurden in 50 ml H₂O_{bidest.} gelöst und 10 ml 1 mM FeCl₃-Lösung zugegeben. In 40 ml H₂O_{bidest.} wurden 72,9 mg HDTMA gelöst, zu der Chromazurol-Eisenlösung gegeben und die fertige Lösung wurde autoklaviert.

10 x MM9:

KH ₂ PO ₄	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
H ₂ O _{bidest.}	100 ml

10 x LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{dest.}	100 ml
autoklavieren	

PIPES-Agar

100 ml 10 x MM9 wurden in 500 ml $H_2O_{bidest.}$ gegeben und unter ständigem Rühren 31,1 g Piperazindiethansulfonsäure (PIPES) zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH auf 6,8 eingestellt. Die Pufferung durch PIPES ist wichtig, da das Medium bei pH-Werten über 7 grün wird. Mit $H_2O_{bidest.}$ wurde dann auf ein Volumen von 850 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 15 g Agar wurde das Medium autoklaviert.

Nach Abkühlung des PIPES-Agar auf ca. 50 °C wurden unter sterilen Bedingungen 30 ml 10 x LB-Medium, 10 ml 20 % Glukose (sterilfiltirert), 2 ml 1 M MgSO₄-Lösung (autoklaviert), 2 ml 1 M Na₂SO₄-Lösung (autoklaviert), 1 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung (autoklaviert) und 100 ml

CAS-Stammlösung zugegeben und die Platten wurden sofort gegossen. Bei Mikroorganismen, die empfindlich gegenüber HDTMA sind (Gram-positive), sollte überschüssiges HDTMA mit Perchlorat neutralisiert werden oder der CAS-Agar mit einem Kationenaustauscher überschichtet werden.

Magermilch-Agar (Gerhardt et al., 1981)

Das Medium diente der qualitativen Bestimmung von extrazellulärer Protease-Aktivität. Ist diese vorhanden, werden bei *B. cenocepacia* nach ca. 48-stündiger Inkubation klare Höfe um die Kolonien im sonst trüben Agar sichtbar. Die Höfe entstehen durch Hydrolyse des im Magermilch-Pulver enthaltenen Caseins.

Zur Herstellung von 1 l Magermilch-Agar wurden die für 1 l LB-Medium benötigten Bestandteile (s. 2.1.2) abgewogen, in 600 ml $H_2O_{dest.}$ gelöst und autoklaviert. In den restlichen 400 ml Wasser wurden 2 % Magermilchpulver gelöst und bei 1 Bar bzw. 110 °C 10 min autoklaviert. Beide Lösungen wurden steril zusammengegeben und in Petrischalen gegossen.

Tributyrin-Agar (Anderson, 1939)

Das Medium diente dem qualitativen Nachweis lipolytischer Aktivität. Tributyrin wird durch Lipasen abgebaut, es entstehen nach ca. 24-stündiger Inkubation klare Höfe um die Kolonien herum.

Nach Anleitung des Herstellers (Merck, Darmstadt) wurden 20 g Fertigmedium und 10 ml Tributyrin (Glycerin-Tributyrat) in 1 l $H_2O_{dest.}$ gelöst und autoklaviert. Durch häufiges Schütteln während des Abkühlens bildet sich eine Emulsion. Diese ist ab 50 °C stabil. Die Platten sollten nach dem Gießen schnell abkühlen.

Inhaltsstoffe pro Liter (lt. Hersteller):	
Pepton aus Fleisch	2,5 g
Pepton aus Casein	2,5 g
Hefeextrakt	3,0 g
Agar	12,0 g
pH = 7,5	

YEM-Agar (Sage et al., 1990)

Mit Hilfe des im Agar enthaltenen Mannits bilden *Burkholderia*-Stämme vermehrt extrazelluläre polymere Substanzen (EPS, früher: extrazelluläre Polysaccharide). EPS-positive Stämme haben nach 48-stündiger Inkubation eine extrem schleimige Oberfläche. Ist die Koloniemorphologie nicht eindeutig, können EPS-positive von EPS-negativen Stämmen zusätzlich durch die Zugabe von Kongo-Rot ins Medium unterschieden werden. Bei EPS-negativen Stämmen kann der Indikator in die Zellen eindringen und diese rot färben, EPS-positive Stämme erscheinen nur leicht rot bzw. rosa. Zu beachten ist, dass Kongo-Rot ein pH-Indikator ist, der bei pH 3,0-5,2 von blauviolett nach rot umschlägt.

Hefe-Extrakt	0,05 %
Mannit	0,4 %
Kongo-Rot	0,01 %
Agar	1,5 %

2.1.8 Herstellung elektrokompetenter E. coli-Zellen (Dower et al., 1988; verändert)

Neben der chemisch ausgelösten Kompetenz können Bakterien durch Einwirkung eines kurzen Stromstoßes in die Lage versetzt werden, DNS aufzunehmen. Dies kann durch Öffnung der Zelle für eine passive Diffusion der DNS geschehen oder dadurch, dass Medium zusammen mit der DNS in die Zelle fließt; der genaue Mechanismus der DNS-Aufnahme ist nicht bekannt (Dower *et al.*, 1988). Entscheidende Parameter der Elektrotransformation sind die elektrische Feldstärke E und die Länge des Stromstoßes, die sog. Zeitkonstante τ . Dabei muss ein Optimum zwischen beiden Parametern gefunden werden, da bei zu hoher Feldstärke zu viele Zellen absterben und bei zu niedriger Feldstärke trotz längerer Zeitkonstante nur eine niedrige Transformationsrate erreicht wird. Die Transformationsrate (= Anzahl Transformanten/Anzahl überlebende Zellen) ist außerdem abhängig von der DNS-Konzentration, wobei in einem Bereich von 10 pg/ml bis 7,5 µg/ml die Transformationsrate linear mit der DNS-Menge ansteigt. Die Transformations-Effizienz (= Anzahl Transformation] bist abhängig von der Zellkonzentration in der Elektroporationsküvette. Für eine maximale Transformations-Effizienz sollte eine hohe Zellkonzentration (2-4 x 10¹⁰ Zellen/ml) verwendet werden (Dower *et al.*, 1988). Die Wachstumsphase der Zellen bei der Ernte hat ebenfalls Einfluss auf die Transformationseffizienz. Die Zellen sollten in der Mitte der logarithmischen Phase ($OD_{600} = 0.5-1.0$) geerntet werden.

200 ml LB-Medium wurden mit einer *E. coli* DH5 α - oder XL1-Blue-Vorkultur angeimpft und auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen der o. g. OD₆₀₀ wurde die Kultur in Eiswasser abgekühlt und abzentrifugiert (5.000 x g, 20 min, 4 °C, Zentrifuge: Sorvall RC 5B Plus). Die Zellen wurden 2 x mit 200 ml eiskaltem GT-Puffer gewaschen, in 40 ml eiskaltem GT-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (5.000 x g, 10 min, 4 °C). Nach nochmaligem Waschen mit 40 ml eiskaltem GT-Puffer wurde das Zellpellet in 450 µl eiskaltem GT-Puffer aufgenommen, in 150 µl Aliquots schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

GT-Puffer

Glycerin	10 %
Tris-HCl	8 mM
pH 7,4	

2.2 Arbeiten mit C. elegans

2.2.1 *C. elegans*-Stämme

Tabelle 2.3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans* Stämme. Gemäß den Richtlinien für die *C. elegans* Nomenklatur (Horvitz *et al.*, 1979) bestehen die Genbezeichnungen aus drei kursiv geschriebenen Buchstaben und einer durch einen Bindestrich angehängten arabischen Ziffer. Die Gennamen beziehen sich auf den ursprünglich entdeckten und/oder auffälligsten Phänotypen, z. B. *phm-2* für "pharyngeal muscle". Die genaue Position der Mutation wird durch ein oder zwei kursive Buchstaben sowie eine kursive arabische Ziffer angegeben, wobei sich die Buchstaben auf das Labor beziehen, in dem die Mutane isoliert wurde. Stammnamen werden durch zwei nicht kursive Großbuchstaben und eine Ziffer angegeben. Die Buchstaben bezeichnen das Herkunftslabor des Stammes.

Stamm	Phänotyp	Referenz
Bristol N2	Wildtyp	Brenner, 1962
phm-2 (ad597) I	Defekt in kontraktiler Struktur des Pharynxmuskels, Grinder kann nicht vollständig nach vorn bewegt werden	Avery, 1993
srf-3 (yj10)	Oberflächenprotein, veränderte Oberflächen- Antigenstruktur, Dauerstadien empfindlicher gegenüber SDS, Würmer sind resistent gegenüber Infektionen mit <i>Microbacterium</i> <i>nematophilum</i> und <i>Yersinia pestis</i>	Politz, 1990; Hodgkin, 2000; Darby, 2003
srf-3 (e2789)	Oberflächenprotein, resistent gegenüber Infektionen mit <i>M. nematophilum</i>	Hodgkin, unveröffentlicht
BR 2563	komplementierte srf-3-Mutante	Höflich, pers. Mitteilung
BR 2564	komplementierte <i>srf</i> -3-Mutante	Höflich, pers. Mitteilung

Tab. 2.3: C. elegans-Stämme

2.2.2 Haltung und Vermehrung von C. elegans

C. elegans wurde auf NGM- ("nematode growth medium") Agarplatten von 5,5 cm Durchmesser (Greiner, Frickenhausen) mit *E. coli* OP50 als Nahrungsquelle bei 20 °C im Kühl-Brutschrank (Binder, Tuttlingen) gehalten. *E. coli* OP50 ist Uracil-auxotroph und bildet daher auf Minimalmedium ohne Uracil nur einen dünnen Rasen, der die Beobachtung der Würmer erleichtert. Ist eine genaue Beobachtung nicht notwendig, kann durch Uracil-Zugabe zum Medium normales *E. coli*-Wachstum ausgelöst und einem zu schnellen "Leerfressen" der Futterplatten vorgebeugt werden.

Zur Herstellung der NGM-Futterplatten wurden 5-10 ml LB mit *E. coli* OP50 angeimpft und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer deutlich sichtbaren Trübung inkubiert. Je 100 µl der Kultur wurden auf die Agarplatten getropft und die Platten nach dem Trocknen bei 37 °C ÜN inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Platten in Plastik verpackt und bei 4 °C aufbewahrt. Zur Erhaltung der Stämme wurde alle 3-4 Tage aus einer NGM-Platte mit Würmern ein Stück Agar mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und auf eine auf RT erwärmte NGM-Futterplatte übersetzt. Werden die Würmer bei einer niedrigeren Temperatur gehalten (11 oder 16 °C) kann der Transfer in größeren Abständen erfolgen.

NGM ("nematode growth medium", Nematoden-Wachstums-Medium)

(Brenner, 1974; verändert)	
NaCl	0,30 % (w/v)
Trypton	0,25 % (w/v)
Agar	1,7 % (w/v)

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C wurden folgende Zusätze steril in das Medium gegeben:

1 M CaCl ₂	0,5 ml
1 M MgSO ₄	0,5 ml
Uracil (2 mg/ml)	0,5 ml
1 M Kalium-Phosphat-Puffer	12,5 ml
Cholesterin (10 mg/ml) in EtOH _{abs.}	0,25 ml
Nystatin (10 mg/ml)	2,5 ml

1 M Kalium-Phosphat-Puffer

KH ₂ PO ₄	108,3 g
K ₂ HPO ₄	35,6 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l
pH = 6,0	

Die Salzlösungen und der Puffer wurden vor der Zugabe in das Medium autoklaviert, Uracil sterilfiltriert. Nystatin wurde in Ammoniumacetat/Ethanol (1:1) gelöst. Während Cholesterin für die Entwicklung von *C. elegans* unerlässlich ist, können Wildtyp-Würmer auch ohne Magnesium und Calcium gehalten werden. Nystatin kann bei häufigem Öffnen der Platten vorbeugend gegen Pilzbefall zugegeben werden. Um einer zu schnellen Austrocknung der Agarplatten im Brutschrank vorzubeugen, wurden die Petrischalen zu ca. 2/3 mit dem Medium gefüllt.

2.2.3 Stammhaltung (Brenner, 1974)

Zum längerfristigen Aufbewahren wurde *C. elegans* bei -80°C in 1,8 ml Cryoröhrchen (Nunc, Roskilde, DK) eingefroren. Besonders geeigent sind hierfür ausgehungerte L1-Stadien. Pro Röhrchen wurden die Würmer mit 0,6 ml S-Puffer von der Platte gespült und in das Röhrchen pipettiert, dann wurden 0,6 ml S-Puffer mit 30 % Glycerin zugegeben und durch Schwenken gut vermischt. Die Röhrchen wurden in einer Styroporschachtel bei -80 °C mindestens 12 h eingefroren. Durch das Styropor erfolgt das Herunterkühlen der Röhrchen verlangsamt, was für das Überleben der Würmer wichtig ist. Bevor die Röhrchen permanent eingefroren werden, sollte eines wieder aufgetaut werden, um zu kontrollieren, ob die Würmer überlebt haben. Hierzu wurde das Röhrchen bei RT stehen gelassen bis der Inhalt vollständig aufgetaut war. Dann wurden 400 μ l S-Puffer zugegeben, um das Glycerin in der Wurmsuspension zu verdünnen. Das Röhrchen wurde 30 min bei RT stehen gelassen, dann wurde der Vorgang wiederholt. Auf eine unbewachsene NGM-Platte wurden dann einige Tropfen der Wurmsuspension gegeben und mit einigen Tropfen S-Puffer verdünnt. Die restlichen Würmer aus dem Röhrchen sollten ebenfalls auf eine Platte gegeben werden, da sie sonst absterben.

S-Puffer (1 l)

0,05 M K ₂ HPO ₄	129 ml
0,05 M KH ₂ PO ₄	871 ml
NaCl	5,85 g
pH = 6,0	
autoklavieren	

S-Puffer mit 30 % Glycerin

wie oben plus 30 % (v/v) Glycerin

2.2.4 Medien für die Pathogenitäts-Versuche

Für die slow-killing-Versuche wurde ein abgewandeltes NG-Medium (NGMII) mit einem höheren Peptonanteil verwendet. Die Wahl der Proteinquelle ist entscheidend für das Überleben der Würmer, da aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der verschiedenen Peptonmischungen (Aminosäureanteile, zusätzliche Bestandteile wie NaCl oder Eisen) die Bakterien offenbar unterschiedlich pathogen sind (s. Tab. 3.1).

Das für die fast-killing-Versuche verwendete PGS spiegelt durch die hohe Osmolarität die Bedingungen in der CF-Lunge wider.

In beide Medien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen dieselben Zusätze gegeben wie in NGM mit Ausnahme von Uracil. Beide Medien wurden für einzelne Zählversuche in Petrischalen mit 5,5 oder 3 cm Durchmesser gegossen. Für das Screening auf Virulenzfaktoren von *B. cenocepacia* wurde NGMII in 24er Multiplatten (Greiner, Frickenhausen) gegossen.

NGMII (Tan et al., 1999a)

NaCl	0,30 % (w/v)
Bacto TM Pepton	0,35 % (w/v)
Agar	1,7 % (w/v)

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C Zugabe der in 2.2.2 aufgeführten Zusätze.

PGS ("peptone-glucose-sorbi	itol") (Tan et al., 1999b)
NaCl	1,0 % (w/v)
Bacto TM Pepton	1,0 % (w/v)
Glukose	1,0 % (w/v)
Sorbit	0,15 M
Agar	1,7 % (w/v)

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C Zugabe der in 2.2.2 aufgeführten Zusätze.

BHI-Medium ("brain heart infusion agar", "Hirn-Herz-Aufguss" Agar)

Für die Versuche zum Sterben der Würmer durch Paralyse wurde BHI-Medium verwendet. Das Medium wurde ohne weitere Zusätze nach Angaben des Herstellers (BD Biosciences, Sparks, USA) angesetzt und in Petrischalen mit 5,5 cm Durchmesser gegossen.

Inhaltsstoffe pro Liter (laut Hersteller):Hirn-Herz-Aufguss (von Frischgewebe)8,0 gpeptisch abgebautes Tiergewebe5,0 gpankreatisch abgebautes Casein16,0 gNaCl5,0 gGlukose2,0 gNa2HPO42,5 gAgar13,5 g

Zusätze zur Komplementation der Mutanten oder zur Hemmung des Quorum sensing wurden auf den fertigen Agar ausplattiert oder nach dem Autoklavieren steril in den abgekühlten Agar gegeben.

2.2.5 Synchronisation der Wurmpopulation / Eipräparation

(Sulston und Hodgkin, 1988; verändert)

Die Eipräparation diente der Synchronisation der Wurmpopulation, d. h. alle Würmer befinden sich im gleichen Wachstumsstadium. Sie kann aber auch zur Entfernung bakterieller Verunreinigungen aus einer Wurmkultur durchgeführt werden. Bei der Eipräparation macht man sich die Tatsache zunutze, dass die Eier unempfindlich gegenüber Natrium-Hypochlorit sind, während die Würmer sterben und sich auflösen. Eine Platte mit vielen graviden Würmern und Eiern wurde mit 4 ml sterilem $H_2O_{bidest.}$ durch mehrfaches Pipettieren abgespült, das Wasser mit den Würmern und Eiern wurde auf drei 2 ml ERG aufgeteilt. In jedes ERG wurden 500 µl Hypochloritlösung gegeben und die Reaktionsgefäße wurden 8-10 min lang in Abständen gevortext, bis die Würmer sich aufgelöst hatten. Nach 30 s Zentrifugation bei 3.200 U/min in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge Pico, Kendro, Langenselbold) hatte sich ein lockeres Eipellet gebildet. Der Überstand wurde vorsichtig bis auf ca. 100 µl abgenommen und 1 ml steriles $H_2O_{bidest.}$ hinzugefügt. Die Eier wurden erneut gevortext und wie zuvor abzentrifugiert.

Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Eipellet in einigen Tropfen M9-Puffer resuspendiert und auf eine Agarplatte oder in eine Flüssigkultur gegeben.

Hypochloritlösung für 4 ml Wurmsuspension		
H ₂ O _{bidest.}	0,6 ml	
Na-Hypochlorit (12 % Cl)	0,5 ml	
6 M NaOH	0,4 ml	
M9-Puffer		
KH ₂ PO ₄	3 g	
Na ₂ HPO ₂	6 g	
NaCl	5 g	
1 M MgSO ₄	1 ml	
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 1	

Die Dauer der Entwicklung vom Ei zum gewünschten Wurmstadium kann außer durch die Temperatur auch durch die Art der Aufzucht beeinflusst werden. Wurden die Eier auf NGM Futterplatten gegeben und bei 20 °C inkubiert, dauerte die Entwicklung zum L4-Stadium ca. 2,5 Tage. Da die Würmer unterschiedlich schnell wachsen, bzw. die Eier zum Zeitpunkt der Isolierung unterschiedlich weit entwickelt sind, ist die Wurmpopulation jedoch nicht 100 %ig synchron. Eine bessere Synchronisation kann erreicht werden, wenn die Eier zunächst 1-2 Tage auf NGM ohne Bakterien inkubiert werden. Aufgrund des Nahrungsmangels bleiben die Würmer in ihrer Entwicklung im L1-Stadium stehen und wachsen erst bei Zugabe von *E. coli* (dies kann durch Auftropfen einer Flüssigkultur geschehen) weiter. Die Eier können auch in M9-Puffer mit *E. coli* OP50 gegeben werden. Die Entwicklung dauert dann ca. 4 Tage bei 20 °C. Hierzu wurden ca. 30 ml M9 sowie eine Spatelspitze eines *E. coli* OP50 Pellets in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben, so dass sich die Kultur sichtbar trübte. Zur Belüftung wurde der Kolben langsam (80 U/min) auf einem Rundschüttler (Heidolph, Schwabach) bewegt.
2.2.6 Pathogenitätsversuche

Für die slow und fast killing Versuche wurden 100 μ l (ca. 1.5 x 10⁴ CFU/ml) einer *B. ceno*cepacia LB-Flüssigkultur auf Testplatten mit 5,5 cm Durchmesser ausplattiert und die Platten bei 37 °C 24 h inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platten wurden die synchronisierten Würmer mit 1 ml M9 von der Futterplatte heruntergespült und 20-30 Würmer auf die Platten getropft. Würmer aus einer M9-Flüssigkultur wurden direkt aus der Kultur auf die Testplatten getropft. Dabei können durch kreisförmiges Schwenken und kurzes Stehenlassen der Kultur die Würmer zunächst in der Mitte des Kolben-Bodens gesammelt werden, um dann eine größere Zahl zu pipettieren. Nach dem Trocknen der Testplatten wurden die Würmer unter dem Mikroskop (Zeiss Stemi SV6, Zeiss, Göttingen) bei 32- bis 50-facher Vergrößerung gezählt. Die Platten wurden bei 20 °C inkubiert und die Würmer zu den angegebenen Zeitpunkten gezählt. Als tot wurden solche Würmer gezählt, die sich auch nach Berühren mit einem "Wurmhaken" (abgeflachter Platindraht) nicht mehr bewegten. Wahlweise wurden für die Versuche auch Platten mit 3 cm Durchmesser oder 6er Multiplatten (Greiner, Frickenhausen) verwendet. Auf diese Platten wurden 50 µl einer log-Phasen Kultur ausplattiert und es wurde weiter verfahren wie oben. Für das Screening der B. cenocepacia-Mutantenbank auf Virulenzfaktoren wurden 24er Multiplatten mit je 50 µl einer LB Übernachtkultur angeimpft. Die Platten wurden geschwenkt, um die Bakterienkultur gleichmäßig über die gesamte Agaroberfläche zu verteilen und bei 37 °C ÜN inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden wie zuvor 20-30 Würmer auf die Platten getropft. Nach 48 h wurden die Platten nach lebenden Würmern abgesucht und von einer Masterplatte die Bakterienmutanten für Zählversuche ausgewählt, auf denen eine deutliche Zahl Würmer überlebt, bzw. sich vermehrt hatte.

Zur Untersuchung des paralytischen Sterbens wurden 20 µl einer ÜN-Kultur auf 5,5 cm BHI-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 30 °C inkubiert, nach dem Abkühlen wurden ca. 10 adulte Würmer mit dem Wurmhaken auf die Platten übersetzt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und die Würmer zu den angegebenen Zeitpunkten beobachtet. Paralysierte Würmer bewegten sich auch nach dem Aufklopfen der Platten auf den Tisch nicht mehr, lagen i. d. R. langgestreckt auf dem Agar und zeigten keine Pumpbewegung des Pharynx mehr.

2.2.7 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Alle Aufnahmen von *C. elegans* und GFP-markierten Bakterien wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Göttingen) bei 40- oder 64-facher Vergrößerung (LD Achroplan 40 x oder Plan-Neofluar 64x / 1.3 Ölobjektiv) gemacht. Die Betrachtung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 543 nm (Argon-Laser und Helium-Neon1-Laser), es wurde der Filtersatz FS09 verwendet. Die Würmer wurden durch Phasenkontrastaufnahmen mit demselben Objektiv sichtbar gemacht und Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme übereinandergelegt (Programm LSM510).

Die zu untersuchenden Würmer wurden mit einem Wurmhaken von der Agarplatte gepickt und in einen Tropfen M9-Puffer gegeben, wo durch die starke Bewegung des Wurms die meisten außen anhaftenden Bakterien abgewaschen wurden. Zur weiteren Betrachtung wurde *C. elegans* in einen Tropfen M9 mit Natriumazid (Endkonzentration 20 mM) auf einen Objektträger mit schwarzer Epoxidharzbeschichtung (Marienfeld, Lauda-Königshofen) überführt. Die Beschichtung verhindert, dass die Würmer beim Auflegen des Deckglases zerquetscht werden.

Eine andere Methode war die Betäubung der Würmer mit Chloroform. Die Würmer wurden zunächst mit dem Wurmhaken auf eine unbewachsene Agarplatte überführt, wo durch die Bewegung außen anhaftende Bakterien abgestreift wurden. Die geöffnete Agarplatte mit *C. elegans* wurde in eine große Glas-Petrischale gestellt, dazu eine kleine Glasschale mit etwas Chloroform. Die große Petrischale wurde geschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Nach ca. 1 min bewegten sich die Würmer nicht mehr und wurden mit dem Wurmhaken in einen Tropfen M9 auf den Objektträger überführt.

2.3 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.3.1 Behandlung von Geräten, Lösungen und Arbeitsflächen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen bei 121 °C 20 min autoklaviert. Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 96 %igem EtOH gespült, Lösungen sterilfiltriert (s. 2.1.3), Arbeitsflächen wurden mit 70 %igem EtOH gereinigt.

2.3.2 Konzentrations- und Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNS-Lösungen wurde durch Messung ihrer Absorption bei 260 bzw. 280 nm (Pharmacia Biotech Ultrospec[®]3000-Fotometer) bestimmt. Näherungsweise entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 ca. 50 µg doppelsträngiger DNS/ml (Cryer *et al.*, 1975). Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurden Verunreinigungen durch Proteine berücksichtigt. Als Richtwert für "reine" DNS-Lösungen gilt ein Verhältnis E_{260} : $E_{280} > 1,8$. Die Lösungen wurden 50- bis 80-fach verdünnt und nach sorgfältiger Durchmischung in Mikroquarzküvetten gemessen.

Die Größenbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Vergleich mit den Standards GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder oder GeneRulerTM DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) auf einem 1,0 %igen Agarose-Gel.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Sie diente zur Größen- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren sowie zur präparativen Auftrennung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.

Die bei neutralem pH-Wert negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit der Probe immer umgekehrt proportional zum Zehner-Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Helling *et al*,. 1974). Geschmolzene Agarose bildet beim Festwerden eine Matrix, deren Porengröße von der Konzentration der Agarose bestimmt wird. Die Laufgeschwindigkeit eines DNS- Fragments hängt von der Größe dieser Gelporen, der angelegten Spannung und der Salzkonzentration des Puffers ab. Kleinere DNS-Moleküle laufen schneller durchs Gel als große, außerdem unterscheiden sich superhelikale, oc- ("open circular", offen ringförmig) DNS und lineare DNS gleichen Molekulargewichts in ihrem Laufverhalten. Je nach den angelegten Bedingungen läuft die superhelikale Form schneller durchs Gel als lineare und oc-Form, da sie kompakter ist.

Es wurden 1,0 %ige Gele in einfach konzentriertem TAE-Puffer verwendet, die Elektrophorese wurde bei 100-120 mA für 50-70 min in einer Elektropohorese-Kammer durchgeführt. Zur Beschwerung und Markierung der Lauffront wurden die Proben mit 1/5 Vol. Lade-Puffer gemischt. Die Gele wurden für ca. 10 min in einem Wasserbad mit 10 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und danach 5 min gewässert, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Die Färbung der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe von UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) auf einem Transilluminator (biostep GmbH, Jahnsdorf) sichtbar gemacht, fotografiert (Dokumentationsprogramm: Phoretix Grabber v.3.0, Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle upon Tyne, GB) und auf einem Thermodrucker (Mitsubishi CP700D) ausgedruckt.

<u>TAE-Puffer (50 x)</u>

Tris	40 mM
EDTA	2 mM
Eisessig	57 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l
pН	8,5

DNS-Lade-Puffer

EDTA, 0,2 M, pH 8,0	40 mM
Ficoll 400	1,5 g
Bromphenolblau	10 mg
H ₂ O _{bidest.}	5 ml

2.3.4 Isolierung von DNS aus Bakterien

Plasmid-DNS aus *E. coli* und *B. cenocepacia* wurde mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) der Firma Qiagen (Hilden) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Größere Plasmidmengen wurden mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit (50) isoliert. Die hohe Reinheit der Plasmid-DNS wird durch durch Anheftung der DNS an die Silica-Gel-Membran der Säule nach dem letzten Zentrifugationsschritt erreicht. Bei hoher Salzkonzentration bindet die DNS an die Membran, während Verunreinigungen durch Waschen der Säule mit einem ethanolhaltigen Puffer entfernt werden. Durch einen niedrig konzentrierten Puffer oder Wasser kann die DNS dann wieder von der Säule eluiert werden.

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden 4 ml einer Übernachtkultur verwendet, für die Isolierung von Plasmiden aus *B. cenocepacia* wurden 2 ml einer Kultur verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, um ein Verstopfen der Säule durch die

besonders in der Stationärphase produzierten Exoprodukte zu vermeiden.

Chromosomale DNS aus *B. cenocepacia* wurde mit dem QIAGEN DNEasyTissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Wie bei der Isolierung von Plasmid-DNS wurden Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, verwendet.

2.3.5 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Durch Agarose-Gelelektrophorese präparativ aufgetrennte DNS-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Das Reinigungsprinzip beruht auf dem Lösen der Agarose in einer hochkonzentrierten Salzlösung mit Silica-Gel Partikeln, die die Nukleinsäuren adsorbieren. Durch eine niedrig konzentrierte Salzlösung oder H₂O_{bidest.} wurden die Nukleinsäuren wieder von den Gelpartikeln gelöst. Die Gelpartikel wurden abzentrifugiert, wobei die Nukleinsäuren im Überstand gelöst blieben.

2.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.4.1 Schneiden mit Restriktions-Endonukleasen

Für die analytische Restriktion von Plasmiden werden sog. TypII-Restriktions-Endonukleasen verwendet, die aus verschiedenen Prokaryonten stammen. TypII-RE schneiden die DNS an einer für das jeweilige Enzym spezifischen, i. d. R. palindromischen, Erkennungssequenz. Dabei wird durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindung zwischen zwei Basen beider DNS-Stränge die ds-DNS in Fragmente bestimmter Größe geschnitten.

Analytische Restriktionen von Plasmiden wurden i. d. R. in einem 10 μ l-Ansatz durchgeführt, wobei 0,5-1,0 μ g in H₂O_{bidest.} gelöste Plasmid-DNS sowie 1 U Enzym eingesetzt wurden. Der Ansatz wurde 2 h oder ÜN bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert und dann vollständig auf ein 1,0 %iges Agarosegel aufgetragen. Für präparative Restriktionen wurden die Ansätze entsprechend auf 20-50 μ l vergrößert.

2.4.2 Ligation mit T4-Ligase

Die T4 DNS Ligase kann sowohl überhängende ("sticky") als auch glatte ("blunt") DNS-Enden ligieren. Dabei wird die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe zweier benachbarter Nukleotide katalysiert. Vektorund Insert-DNS wurden für blunt end- und sticky end-Ligationen in 10 µl-Ansätzen im Verhältnis 1:3 unter Hinzufügen von 1-1,5 U T4 DNS-Ligase (Promega, Mannheim) eingesetzt. Die hierfür benötigte Menge an Insert-DNS wurde wie folgt ermittelt:

 $\frac{\text{ng Vektor x kb Insert x 3}}{\text{kb Vektor}} = \text{ng Insert}$

Die Ligationen wurden bei 16 °C 15-20 h inkubiert.

2.4.3 Ligationen in den Vektor pCR[®]2.1 TOPO[®]

Zur schnellen Überprüfung und Sequenzierung wurden PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Groningen, NL) kloniert. Voraussetzung hierfür ist die Amplifikation des PCR-Produktes mit der *Taq*-Polymerase. Der Vektor liegt in linearisierter Form mit einem einzelnen überhängenden 3'-Thymidin vor. Kovalent an den Vektor gebunden ist die Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus. Durch die Matrizen-unabhängige terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase wird ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts gehängt. Mit Hilfe der Topoisomerase ist eine schnelle Ligation des Adenosin an das überhängende Thymidin möglich. Das PCR-Produkt kann durch Restriktion mit *Eco*RI aus dem Vektor isoliert werden. Ligation und Transformation in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.4.4 Markierung von DNS-Fragmenten mit Digoxigenin

("Random Priming" Markierung)

Für nicht-radioaktive Hybridiserungssexperimente wurden DNS-Sonden mit Hilfe des "Digoxigenin-dUTP-DNA-labeling-Kit" (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) nach der Methode des "Random Priming" markiert. Ähnlich wie bei der PCR (s. 2.6) wird einzelsträngige DNS des Fragmentes, das im folgenden als Sonde eingesetzt werden soll, als Matrize ("Template") verwendet. An diese Matrize wird ein markierter komplementärer DNS-Strang synthetisiert. Die Synthese erfolgt durch das sog. "Klenow-Fragment", eine DNS-Polymerase I aus *E. coli*, deren 5'-3'-Exonuklease-Aktivität proteolytisch entfernt wurde. Neben einem Gemisch aus Hexanukleotiden mit statistischer Basensequenz als Startermoleküle ("Primer") wird ein Gemisch der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP und Digoxigenin-dUTP verwendet. Das Digoxigenin, das über ein "Spacer-Molekül" mit dUTP verbunden ist, wird vom Klenow-Fragment in die neu synthetisierten DNS-Stränge eingebaut. Die als Primer verwendeten Hexanukleotide lagern sich an unterschiedlichen Stellen entlang der Matrize an, so dass DNS-Sonden verschiedener Länge entstehen. Die DIG-markierten Basen der Sondenmoleküle können bei nachfolgenden Hybridisierungsexperimenten durch Antikörper nachgewiesen werden.

Als Matrize wurde ein durch PCR amplifiziertes und gelgereinigtes Fragment verwendet. Dieses wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort für 5 min auf Eis inkubiert, um ein erneutes Anlagern der DNS-Einzelstränge zu verhindern.

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis wie folgt zusammenpipettiert:

DNS-Fragment	15 μl (0,01-3 μg)
Hexanukleotid-Gemisch	2 µl (3,12 µg)
dNTP-Markierungsgemisch	2 μ l (= je 2 nmol dATP, dCTP, dGTP,
	1,3 nmol dTTP; 0,7 nmol DIG-dUTP)
Klenow-Fragment	1 μl (Endkonz. 100 U/ml)

Nach Inkubation des Ansatzes für 20 h bei 37 °C wurde die Sonde mit 96 %igem EtOH gefällt und vor ihrem Einsatz hitzedenaturiert (10 min, 95 °C).

2.5 DNS-Übertragung in Bakterienzellen

Plasmid-DNS wurde durch Elektroporation in kompetente *E. coli* DH5 α oder XL1-Blue-Zellen transformiert. In *B. cenocepacia* wurde Plasmid-DNS durch Konjugation ("triparental mating") transformiert.

2.5.1 Elektroporation kompetenter E. coli-Zellen (Dower et al., 1988)

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit ca. 1 µg DNS gemischt und in eine sterile Elektroporations-Küvette (Equibio, peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegeben. Evtl. vorhandene Luftblasen wurden durch Aufklopfen der Küvette entfernt und die Küvette wurde bis zum Stromstoß auf Eis gekühlt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, sollte die Zeitkonstante ca. 4,5 ms betragen. Nach der Elektroporation wurde sofort 1 ml SOC-Medium in die Küvette gegeben, die Bakterien-Lösung in ein ERG umgefüllt und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

2.5.2 Konjugation

Ist eine Elektroporation nicht möglich, kann ein Plasmid auch durch Konjugation übertragen werden. Dabei wird Plasmid-Einzelstrang-DNS mit Hilfe der *tra*-Gene und des *oriT* (mob) von einem Donor-Stamm zum Rezipienten übertragen. Die *oriT*-Region enthält Erkennungssequenzen für die Bindung der RP4-Proteine TraJ, TraI und TraK, die gemeinsam ein Entwinden der DNS sowie einen Einzelstrangbruch direkt hinter der TraI-Erkennungssequenz herbeiführen. Die Einzelstrang-Plasmid DNS kann dann unter Mitwirkung von TraI und anderen Enzymen durch einen "rolling circle"-Mechanismus in die Rezipientenzelle übertragen werden. Enthält ein Plasmid keine *tra*-Gene, jedoch einen *oriT* (wie z. B. pBBR1MCS-5), kann die Konjugation in Anwesenheit eines dritten Plasmids (*tra*⁺ *oriT*⁺) durch sog. "triparental mating" stattfinden. Dieses dritte Plasmid (pRK600) wurde durch den Helferstamm *E. coli* HB101 zur Verfügung gestellt.

Donor, Helfer und Rezipient wurden in 5 ml LB mit den entsprechenden Antibiotika ÜN angezogen und am Morgen in frisches LB mit Antibiotikum überimpft. Bei Erreichen der späten log-Phase wurden jeweils 4 ml der Kulturen abzentrifugiert (6000 rpm, 5 min) und die Pellets in jeweils 1 ml LB durch Pipettieren resuspendiert. Die OD₆₀₀ einer 1:20 Verdünnung wurde gemessen, das resuspendierte Pellet erneut abzentrifugiert und so resuspendiert, dass die OD₆₀₀ jeweils 20 betrug. Donor- und Helferstamm wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 10 min bei RT stehengelassen. Das Donor-Helfer-Gemisch wurde dann ebenfalls im Verhältnis 1:1 mit dem Rezipienten gemischt und in Tropfen auf LB-Agar ohne Antibiotikum aufgebracht. Nach Inkubation bei 37 °C ÜN wurden die Tropfen mit einer sterilen Impföse vom Agar abgekratzt, in 0,9 % NaCl resuspendiert und 1:10 bzw. 1:100 verdünnt auf Selektivplatten ausplattiert.

2.5.3 Blau/Weiß Selektion rekombinanter Zellen (X-Gal-Test)

Die für die Transformation verwendeten *E. coli*-Stämme DH5 α , XL1-Blue und TOP10 sind durch eine Deletion im *lacZ*-Gen, (*lacZ* Δ M15) gekennzeichnet und können daher keine aktive β -Galaktosidase mehr bilden. Dies wird erst durch Komplementation der α -Untereinheit der β -Galaktosidase auf Klonierungs-Vektoren wie pCR2.1 TOPO oder pUC19 möglich. Stämme, die einen solchen Vektor tragen, können das Glukoseanalogon X-Gal spalten. Dabei wird ein Farbstoff freigesetzt, der durch Luftoxidation blau wird und die Zellen anfärbt. Die Transkription des Enzyms kann durch Bindung von IPTG an den sog. Lac-Repressor *lacI* induziert (negative Kontrolle) werden. IPTG muss bei *lac1*^q-Stämmen wie *E. coli* XL1-Blue zusätzlich ins Medium gegeben werden. Stämme, die kein *lac1*^q enthalten, wie *E. coli* TOP10, benötigen kein IPTG. In der α -Untereinheit der β -Galaktosidase der Blau/Wei β -Klonierungsvektoren befindet sich eine MCS. Wird ein Gen in diese MCS kloniert, kann kein aktives Enzym mehr gebildet werden, die Kolonien bleiben farblos.

2.6 In vitro Amplifikation von DNS durch PCR

Durch PCR kann eine spezifische DNS-Sequenz (Zielsequenz) um den Faktor 10^6 angereichert werden (Saiki *et al.*, 1988). Benötigt werden neben der die Zielsequenz tragenden DNS ("Template") zwei Oligonukleotide ("Primer"), die die Zielsequenz flankieren, ein Gemisch der vier in der DNS enthaltenen Dinukleotide sowie eine hitzestabile DNS-Polymerase. Die Primer sind so ausgerichtet, dass die Polymerase die Region zwischen ihnen synthetisiert. In einer sich wiederholenden Abfolge dreier verschiedener Temperaturzyklen [1 = Hitzedenaturierung der DNS (Template und neue Sequenzen), 2 = Anlagerung der Primer an die Zielsequenz und 3 = Verlängerung der Primer durch die DNS-Polymerase] wird die Zielsequenz verdoppelt. Da die verlängerten Produkte ebenfalls zu den Primern komplementär sind und diese binden können, erfolgt mit jedem Durchgang eine Verdoppelung der DNS-Menge. Die

Folge ist ein exponentieller Anstieg der Menge des Zielfragments (ca. 2^n) wobei (n) die Anzahl der Zyklen darstellt.

Durch die Isolierung von hitzestabilen Polymerasen (Saiki *et al.*, 1988) wurde es möglich, die PCR durchzuführen, ohne nach jeder Hitzedenaturierung der DNS neues Enzym in den PCR-Ansatz geben zu müssen. Zudem können durch höhere Annealing-Temperaturen unspezifische PCR-Produkte weitgehend vermieden werden. Die Dauer (z) der DNS-Synthese wird durch die Synthese-Geschwindigkeit der Polymerase und die Länge der Zielsequenz bestimmt. Die *Taq*-Polymerase hat eine Synthesegeschwindigkeit von 1 kb/min.

2.6.1 Primer

Es wurden hochreine Primer der Firma MWG Biotech (Ebersberg) mit 20 zur Ziel-DNS komplementären Basen und den entsprechenden Schnittstellen für spätere Restriktionen verwendet. Die Schmelztemperatur T_m wurde folgendermaßen (Thein und Wallace, 1986) berechnet:

$$T_{m}(^{\circ}C) \equiv 2 x (N_{A} + N_{T}) + 4 x (N_{G} + N_{C})$$

 $T_m =$ Schmelztemperatur

N = Anzahl der Basen Adenin (_A), Guanin (_G), Cytosin (_C), Thymin (_T) im Primer, wobei nur die zum Template komplementären Basen gezählt wurden.

Die Anlagerungs-Temperatur $T_{ann.}$ lag zwischen 55 und 61 °C und wurde nach der Formel von Chester und Marshak (1993) berechnet:

$$\Gamma_{\text{ann.}}$$
 (°C) = 69,3 + 0,41 (% GC) - (650 / Anz. N)

T_{ann.} = Anlagerungs- ("annealing") Temperatur

- % GC = prozentualer Gehalt der Basen Guanin und Cytosin in der zum Template komplementären Primersequenz
- Anz. N = Anzahl der zum Template komplementären Nukleotide

In der folgenden Tabelle sind alle für die Amplifikation von Genen oder zur Sequenzierung verwendeten Primer aufgeführt. Komplementäre Basen sind in Großbuchstaben angegeben, Basen für die nachfolgende Restriktion in Kleinbuchstaben und unterstrichen, zusätzliche Basen, die für ein Schneiden der Restriktionsenzyme am Ende einer Sequenz notwendig sind, sind ebenfalls in Kleinbuchstaben angegeben.

Primer	Sequenz 5'-3'	Komplementär zu
Kan res-r	ATG AGC CAT ATT CAA CGG G	b 1-19 von <i>aph</i> aus Tn <i>903</i>
Kan res-v	ACC GAG GCA GTT CCA TAG G	b 693-711 von <i>aph</i> aus Tn903
Uni-v	GTA AAA CGA CGG CCA GT	M13mp18 MCS
Uni-r	GAA ACA GCT ATG ACC ATG	M13mp18 MCS
lon1	gc <u>tet aga</u> CAA TTC GTT GTG GCG GCC TC	b 39-58 stromaufwärts vom Transkriptionsstart des <i>lon</i> - Gens aus <i>B. cenocepacia</i> J2315
lon3	gc <u>tet aga</u> AGC ACG ACG GCG TTC AGG G	3-22 b stromabwärts vom Transkriptionsstop von <i>lon</i> aus <i>B. cenocepacia</i> J2315
i-end	GCC AGA TCT GAT CAA GAG AC	b 9-28 des i-Endes von mini- Tn5
luxCext2	AGT CAT TCA ATA TTG GCA GG	b 102-121 von <i>luxC</i> aus <i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>luxC</i> int2	GGATTGCACTAAATCATCAC	b 55-74 von <i>luxC</i> aus <i>Photorhabdus luminescens</i>
arb6	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC	unspezifische DNS-Bindung (O'Toole und Kolter, 1998)
arb2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	komplementär zum 5'-Ende von arb6 (O'Toole und Kolter, 1998)

Tab.	2.4	: Prim	er

2.6.2 Standard-PCR

Zu Beginn der PCR wurden Template-DNS und Primer 7 Minuten bei 95 °C denaturiert. In den folgenden Zyklen wurde die Denaturierungsdauer auf 40 s verkürzt, um eine Hitzeschädigung der Polymerase und des Templates zu vermeiden. Nach der Denaturierung wurde der Reaktionsansatz auf die für die jeweiligen Primer spezifische Anlagerungstemperatur (T_{ann}) abgekühlt. Standardmäßig wurde die *Taq*-Polymerase (TAKARA, Shuzo, J) verwendet. Die Anlagerungsdauer betrug i. d. R. 45 s. Die Temperatur des dritten Schritts (DNS-Synthese) wird durch die Polymerase vorgegeben. Für *Taq*-Polymerase beträgt sie 72 °C.

Für die Erzielung einer möglichst hohen Produktmenge sollten 25-30 Zyklen eingestellt werden, für den Nachweis bestimmter Sequenzen durch PCR genügen weniger Zyklen. Der letzte DNS-Syntheseschritt wurde auch bei kurzen Sequenzen für 10 Minuten durchgeführt, um eine vollständige Synthese der Zielsequenz zu gewährleisten.

PCR-Bedingungen:

Erste Denaturierung	95 °C 7 min
20-30 Zyklen:	
1. Denaturierung	(95 °C 40 s
2. Primer-Annealing	T _{ann.} °C 45 s
3. DNS-Synthese (Elongation)	72 °C (z) min/1 kb)
letzter Syntheseschritt	72 °C 10 min

Die Amplifikation wurde in 20 oder 50 µl-Ansätzen in den PCR-Geräten "PTC 100TM" (MJ Research, Waltham, USA) und "Mastercycler gradient" (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Zusammensetzung eines 100 μl PCR-Ansatzes: 500-1000 ng DNS Template (0,5 - 1 μl) 0,1 μM Primer (je 1 μl) je 100 μM dNTP (1 μl dNTP-Mix) 10 μl Polymerase-Puffer 9 U *Taq*-Polymerase H₂O_{bidest.} ad 100 μl 2.6.3 Arbitrary PCR (Caetano-Annolles, 1993; O'Toole und Kolter, 1998)

Die arbitrary PCR wurde verwendet, um die Insertionsstelle des Transposons im Genom der Mutanten zu bestimmen. Hierzu wurde zunächst mit den Primern *luxC*ext2 und arb6 die das o-Ende des Transposons flankierende DNS-Region amplifiziert. Der Primer *luxC*ext2 bindet spezifisch im *luxC*-Gen des Transposons, der Primer arb6 bindet unspezifisch im Genom. Da während dieser Amplifikation auch unerwünschte PCR-Produkte entstehen, wurden mit einer zweiten PCR speziell die relevanten Produkte amplifiziert. Die Produkte der ersten PCR wurden aufgereinigt und als Template in der zweiten PCR mit den Primern *luxC*int2 und arb2 und stringenteren Bedingungen verwendet. Der Primer *luxC*int2 bindet ebenfalls im *luxC*-Gen des Transposons, jedoch näher am Übergang zwischen Transposon und Chromosom, die Sequenz des Primers arb2 entspricht dem 5'-Ende von arb6. Dieses Prinzip der nach innen versetzten Primerbindungsstellen wird auch als "nested PCR" bezeichnet.



Abb. 2.1: Primer-Bindungsstellen und *Sph*I-Schnittstelle im Transposon mini-Tn5 Km2*luxCDABE*

1. PCR:

Anfangsdenaturierung:	95 °C	5 min
6 Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	30 sec
Primer-Annealing	30 °C	30 sec
Elongation	72 °C	1,5 min
30 Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	30 sec
Annealing	45 °C	30 sec
Elongation	72 °C	2 min
Letzter Syntheseschritt	72 °C	7 min

<u>2. PCR:</u>		
30 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	45 °C	30 sec
Elongation	72 °C	2 min
End-Elongation	72 °C	7 min

Es wurde eine relativ niedrige Annealingtemperatur gewählt, um dem degenerierten Primer die Bindung an die chromosomale DNS trotz mismatches zu ermöglichen.

2.7 DNS-DNS Hybridisierung

Zum Nachweis bestimmter DNS-Sequenzen im Chromosom wurde eine DNS-DNS Hybridisierung durch Southern Blotting (Southern, 1975) durchgeführt. Im Wesentlichen sind dazu drei Schritte notwendig. Zuerst wird die durch Restriktionsenzyme geschnittene, genomische DNS auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.3.4) und von dort auf eine positiv geladene Membran übertragen. Da DNS-Moleküle über 10 kb Größe aufgrund ihrer geringen Mobilität nur schwer auf die Membran übertragen werden, erfolgt zusätzlich zur Restriktion eine Hydrolyse. Durch Inkubation des Gels in 250 mM HCl wird die DNS partiell depuriniert. Bei der darauffolgenden Einwirkung einer stark alkalischen Lösung werden die Phosphodiesterbindungen an den depurinierten Stellen hydrolysiert und es entstehen kleinere, leichter übertragbare DNS-Fragmente. Zudem wird ds-DNS in Einzelstränge aufgespalten. Im zweiten Schritt wird die Membran mit für die gesuchte Sequenz spezifischen, markierten, einzelsträngigen DNS-Sonden inkubiert, im dritten Schritt werden die mit der fixierten DNS hybridisierten Sonden sichtbar gemacht.

Eine sichtbare Hybridisierung ist abhängig vom Anteil des Genoms, der zur Sonde komplementär ist, der Größe der Sonde und der Menge genomischer DNS, die auf der Membran fixiert ist. Unter idealen Bedingungen kann eine einzelne Kopie eines Gens sichtbar gemacht werden. Hierzu müssen jedoch, je nach Gesamtgröße des Genoms, bis zu 10 μ g DNS auf die Membran übertragen und mit einer Sonde hybridisiert werden, die mehrere hundert Nukleotide lang ist (Sambrook *et al.*, 1989). Sehr kurze Sonden erschweren den Nachweis oder machen ihn sogar unmöglich. Für das hier verwendete DIG-System wird der colorimetrische Nachweis von 0,1 pg homologer DNS in einem Southern Blot auf einer Nylonmembran angegeben, was einer einzelnen Kopie eines Gens in weniger als 1 µg humaner genomischer DNS entspricht (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim).

2.7.1 Transfer von DNS auf Membranen

Durch Restriktion verdaute, auf einem Agarosegel aufgetrennte DNS (100 mA, ca. 2 h) wurde mit Hilfe eines Druck-Blotters (PosiBlot[®], Stratagene, La Jolla, USA) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Nylon 6,6 Biodyne[®] PLUS 0,45 µm; PALL, Dreieich) übertragen. Im Vergleich zum von Southern (1975) entwickelten Kapillar-Blotting, bei dem die DNS-Übertragung über Nacht geschieht, ist diese Technik wesentlich schneller (ca. 1 h bei 80 mm Hg).

Das Agarose-Gel wurde in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt (s. 2.3.3), danach entfärbt und fotografiert. Zur Depurinierung und Hydrolyse der DNS wurde das Gel nacheinander in folgenden Lösungen leicht geschüttelt:

Depurinierungslsg.	HCl	0,25 M	ca. 15 min.
Denaturierungslsg.	NaCl	1,5 M	ca. 30 min.
	NaOH	0,5 M	
Neutralisierungslsg.	Tris-HCl	1,0 M	ca. 30 min.
(pH 7,5)	NaCl	1,5 M	

Auf die in unsterilem $H_2O_{dest.}$ eingeweichte Transferplatte der Blot-Apparatur wurde ein feuchtes Filterpapier (Whatman 3M), darauf die ebenfalls mit $H_2O_{dest.}$ befeuchtete Nylonmembran und darauf die zur Blotapparatur gehörende Maske luftblasenfrei aufgelegt. Auf die Maskenöffnung bzw. die Nylonmembran wurde das Agarose-Gel gelegt, darauf ein in Transferpuffer eingeweichtes Filterpapier (Whatman 3M) und zuletzt der zur Blot-Apparatur gehörige, in Transferpuffer eingeweichte Schwamm. Die Blotapparatur wurde luftdicht geschlossen und die DNS bei einem Druck von ca. 80 mm Hg (ca. 10,6 kPa) vom Gel auf die Nylonmembran übertragen (ca. 1 h).

Transferpuffer (20 x SSC)	NaCl	3,0 M
(pH 7,0)	Na ₃ -Citrat	0,3 M

Die Membran wurde mit H₂O_{dest.} gespült, kurz auf Filter-Papier getrocknet und zur Fixierung der DNS 3 min mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) bestrahlt. Im getrockneten Zustand konnte die Membran auch bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.7.2 Hybridisierung der DNS mit Digoxigenin-markierten Sonden

Die Anlagerung der Sonde an die genomische DNS geschieht bei einer Temperatur, die 20-25 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Hybrid-DNS liegt. Die Schmelztemperatur kann nach folgender Gleichung (Bolton und McCarthy, 1962) abgeschätzt werden:

$$T_m = 81.5 \text{ °C} - 16.6 (\log_{10}[Na^+]) + 0.41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 0.63 (\% \text{ Formamid}) - (600/1)$$

l = Länge der Hybrid-DNS in Basenpaaren

Die Gleichung gilt für Na⁺-Konzentrationen zwischen 0,01 M und 0,4 M. Für höher konzentrierte Lösungen ist sie nicht mehr genau. Desgleichen gilt sie für DNS mit einem GC-Gehalt zwischen 30 und 75 %.

Um ein unspezifisches Binden der Sonde an die Membran zu verhindern, wird vor der eigentlichen Hybridisierung eine sog. Prähybridisierung (Blockierung, "blocking") durchgeführt, bei der die Membran vollständig mit DNS abgedeckt wird. Als Blockierungsreagenz werden denaturierte DNS-Fragmente aus Lachssperma, Hefezellen oder Magermilchpulver benutzt.

Zur Prähybridisierung wurde die Nylonmembran zusammen mit ca. 20 ml Prähybridiserungslösung in eine Hybridisierungsröhre gegeben und für 1 h in einem Hybridisierungsofen bei 68 °C inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde abgegossen und 20 ml Hybridisierungslösung mit 5-25 ng/ml hitzedenaturierter DIG-markierter Sonde wurden (s. 2.4.4) zu der Membran gegeben. Die Membran wurde 4 h oder über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungsofen (Bachhofer, Reutlingen) inkubiert. Prähybridisierungslsg.

SSC	5 x
N-Laurylsarkosyl	0,1 % (w/v)
SDS	0,02 % (w/v)
Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim)	1 % (w/v)
H ₂ O _{bidest.}	

Um ungebundene und unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurde die Membran nach der Hybridisierung mit Niedrigsalzpuffern gewaschen: 2 x für 5 min mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur und danach 2 x 15 min. bei 68 °C mit Waschlösung 2.

<u>Waschlösung 1</u>	SSC	2 x
	SDS	0,1 % (w/v)
Waschlösung 2	SSC	0,5 x
	SDS	0,1 % (w/v)

2.7.3 Kolorimetrische Detektion der Sonden

Die Detektion der mit der fixierten DNS hybridisierten Sonden erfolgte mit Hilfe des "DIG Nucleic Acid Detection Kit" (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim).

Ein Konjugat aus Anti-Digoxigenin Antikörpern und Alkalischer Phosphatase (Anti-Digoxigenin-AP) bindet an die hybridisierte Sonde. In einem zweiten Schritt werden kolorimetrische Substrate der alkalischen Phosphatase (NBT und BCIP) umgesetzt und bewirken eine violettbraune Färbung der Membran an den Stellen, an denen eine Hybridisierung stattgefunden hat.

Die Membran wurde zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der Antikörper für 30 min in ca. 20 ml Blockierungslösung bei RT inkubiert. Dann wurde die Blockierungslösung entfernt und die Membran in Antikörperlösung für weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Antikörperlösung wurde entfernt und überschüssiges Antikörper-Konjugat wurde durch zweimaliges 15-minütiges Waschen der Membran mit DIG1-Puffer bei RT entfernt. Die Membran wurde durch Schwenken in Detektionspuffer für 2 min äquilibriert, dann wurden in 10 ml

Detektionspuffer 45 μ l NBT und 35 μ l BCIP gegeben und dieser mit der Membran zusammen in Folie eingeschweißt. Die Färbung der Banden erfolgte bei RT im Dunkeln ohne Schwenken. Nach vollständiger Entwicklung aller Banden wurde der Detektionspuffer entfernt, die Membran mit H₂O_{dest.} gespült und getrocknet.

DIG1-Puffer	Tris-HCl	0,1 M
(pH 7,5)	NaCl	0,1 M
Blockierungslsg.	DIG1-Puffer	100 ml
	Blockingreagenz	1 % (w/v)
	(Boehringer Mannh	eim)
Antikörperlsg.	DIG 1-Puffer	
<u></u>	Anti-DIG	150 mU/ml (Endkonzentration)
<u>Detektionspuffer</u>	Tris-HCl	0,1 M
(pH 9,5)	NaCl	0,1 M

2.8 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt. Zur Bestimmung der Insertionsstelle des Transposons in das Genom wurde eine arbitrary PCR (s. 2.6.3) durchgeführt, die PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1[®] TOPO[®] kloniert (s. 2.4.3) und der Vektor mit den Primern UniV und UniR sequenziert. Zusätzlich wurde die genomische DNS der Mutanten mit dem Restriktionsenzym *Sph*I verdaut und in den Vektor pUC19 ligiert. Durch Restriktion mit *Sph*I wird aus dem Transposon die Kanamycin-Resistenz zusammen mit einem Stück genomischer DNS unbekannter Größe herausgeschnitten. Nach der Elektroporation des ligierten Vektors pUC19 in *E. coli* können die transformierten Bakterien auf Kanamycin selektiert werden. Die Inserts wurden mit dem i-End-Primer (s. 2.6.1) sequenziert.

2.9 Nachweis und quantitative Bestimmung von Exoprodukten

2.9.1 AHL-Nachweis durch Kreuzausstrich mit Sensorstämmen

Zum schnellen qualitativen Nachweis der AHL-Bildung diente der Kreuzausstrich mit einem Sensorstamm. Es wurden die Sensorstämme *E. coli* MT102 (pSB403) (Winson *et al.*, 1998) oder *Pseudomonas putida* F117 (pAS-C8) (Riedel *et al.*, 2001) verwendet. Das Sensorplasmid pSB403 enthält das AHL-Rezeptorgen *luxR* aus *V. fischeri* sowie eine transkriptionelle Fusion der *luxI* Promotorregion an die Biolumineszenz-Gene *luxCDABE* aus *Photorhabdus luminescens*. Die Spezifität des Sensorplasmids ist vom Rezeptorgen abhängig. Da das Quorum sensing System von *V. fischeri* auf *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserinlacton (3-oxo-C6-HSL) beruht, ist die Empfindlichkeit für dieses Signalmolekül sowie für strukturell verwandte AHL wie z. B. *N*-Hexanoyl-homoserinlacton (C6-HSL) am größten. Es können jedoch auch längerkettige AHL wie *N*-Octanoyl-homoserinlacton (OHL) und *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-homoserinlacton (3-oxo-C12-HSL) detektiert werden (Winson *et al.*, 1998; Geisenberger *et al.*, 2000).

Das Sensorplasmid pAS-C8 wurde speziell zur Detektion von C8-HSL konstruiert, es ist jedoch gleichermaßen sensitiv für C10-HSL (Riedel *et al.*, 2001). Neben dem *B. cenocepacia* AHL-Rezeptorgen *cepR* enthält es eine translationelle Fusion des *cepI*-Promotors mit gfp(ASV) und wurde in den AHL-negativen Stamm *P. putida* F117 transformiert.

Zum Nachweis der AHL-Produktion wurden die zu untersuchenden Stämme in geringem Abstand (1-2 mm) zum Sensorstamm auf LB-Agar ausgestrichen. Die Platte wurde bei 30 °C über Nacht inkubiert. Produziert der Teststamm AHL, so diffundieren diese durch den Agar zum Sensorstamm, werden von diesem aufgenommen und induzieren durch Bindung an den Rezeptor die Expression der jeweiligen Reportergene.

Die Biolumineszenz des pSB403 Sensorplasmids wurde mit einer ultrasensitiven Photonenkamera (Modell C2400-40, Hamamatsu, Herrsching) sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz des GFP kann bei Anregung mit blauem Licht von 480 nm Wellenlänge (Halogenlampe Intralux[®] 5000-1; Volpi AG, Schlieren, CH, mit Blau-Anregungsfilter F44-001, AHF-Analysentechnik, Tübingen) in einer Dunkelkammer mit bloßem Auge wahrgenommen werden.

2.9.2 Quantitative Bestimmung der AHL-Produktion

Quantitative Bestimmungen der AHL-Produktion wurden mit dem Sensorstamm *E. coli* MT102 (pSB403) oder *P. putida* F117 (pAS-C8) in Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, DK) durchgeführt. Der Sensorstamm *E. coli* (pSB403) wurde in flüssigem LB angezogen und, sobald er sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand, 1:1 mit den zu bestimmenden Proben (zellfreie Kulturüberstände) vermischt und bei 30 °C 4-6 Stunden oder über Nacht inkubiert. Bei Verwendung von *P. putida* F117 (pAS-C8) wurden 100 µl Sensorstamm (log-Phase) mit 10 µl Kulturüberstand vermischt und bei 30 °C inkubiert. Als Standard wurde kommerziell erhältliches C8-HSL in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Biolumineszenz bzw. Fluoreszenz (bei Verwendung von *P. putida* (pAS-C8)) wurde mit dem Lambda Fluoro 320 Plus Lesegerät (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA) bestimmt und mit Hilfe der zugehörigen KC4 Software derselben Firma ausgewertet. Nach Abzug der Hintergrundlumineszenz (-fluoreszenz) wurden die ermittelten Werte als RLU ("relative light units") bzw. RFU ("relativ fluorescence units") aufgetragen.

2.9.3 Quantitative Bestimmung der Protease-Aktivität

Für die quantitative Bestimmung der Protease-Aktivität wurden LB Kulturen der entsprechenden Stämme ÜN angezogen und am nächsten Tag deren OD_{600} bestimmt. Die Kulturen wurden abzentrifugiert, die Überstände sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten oder eingefroren. In ERG (2 ml) wurden jeweils 250 µl Azocasein und 150 µl Überstand gemischt und bei 37 °C 3-4 h inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,2 ml TCA abgestoppt. Nach 15-minütigem Stehenlassen bei RT wurden die ERG zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm), 700 µl der Überstände wurden mit 1,4 ml NaOH vermischt und die OD dieser Mischungen wurde bei 440 nm gemessen. Für die Bestimmung der relativen Protease-Aktivität wurden die gemessenen Werte durch die Werte für die OD₆₀₀ der Kultur geteilt.

Materialien

2 % Azocasein in 50 mM Na-Phosphat, pH 7,510 % Trichloressigsäure (TCA)1 M NaOH

2.9.4 Extraktion von Siderophoren

Von Burkholderien ist bekannt, dass sie bis zu vier verschiedene Arten von Siderophoren produzieren: Salicylsäure, Cepabactin, Ornibactine und Pyochelin (Wang *et al.*, 1984; Meyer *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1995; Sokol, 1986). Da die Siderophore in ihrer Struktur sehr unterschiedlich sind, gibt es keine einheitliche Prozedur für ihre Isolierung (Neilands, 1995). Siderophore können *per se* oder als Eisen-Chelat isoliert werden. Letzteres hat den Vorteil der besseren Sichtbarkeit durch die Färbung.

Siderophore können mit polaren Lösungsmitteln aus einem Kulturüberstand ausgeschüttelt werden. Für die Extraktion von Siderophoren aus *B. cenocepacia* H111 wurden die Bakterien in 200 ml NGMII ohne Nystatin und Uracil angezogen (24 h 37 °C), die Mutanten *purD* und *purF* wurden jeweils mit 500 μ M Adenosin komplementiert. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (5.000 x g 30 min 4 °C) und die Überstände mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von ca. 2,0 angesäuert, um eine bessere Stabilität der Siderophore zu gewährleisten. Die Extraktion erfolgte durch zweimaliges Ausschütteln mit jeweils 80 ml (0,4 Vol.) Dichlormethan. Die Lösungen wurden mit wasserfreiem MgSO₄ getrocknet, gefiltert, das Lösungsmittel in einem Vakuumrotationsverdampfer (Laborata 4000, Heidolph, Schwabach) entfernt und die Extrakte in jeweils 250 μ l Methanol aufgenommen.

2.9.5 Dünnschichtchromatografie der Siderophore

Das extrahierte Siderophorgemisch wurde durch Dünnschichtchromatografie aufgetrennt. Jeweils 16-20 µl Extrakt wurden auf eine Kieselgel 60 DC-Platte (Art. Nr. 5721, VWR, Darmstadt) aufgetragen, als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform / Essigsäure / Ethanol im Verhältnis 90:5:2,5 (Visca *et al.*, 1993). Nach beendetem Lauf und Trocknung der DC-Platte können Pyochelin und Salicylsäure unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Pyochelin erscheint gelbgrün (Cox und Graham, 1979), Salicylsäure blau (Visca *et al.*, 1993). Zusätzlich können die einzelnen Siderophore mit einem Eisensprühreagenz sichtbar gemacht werden. Pyochelin erscheint rotbraun (Cox und Graham, 1979), Salicylsäure rot-violett (Visca *et al.*, 1993) und Ornibactine braun (Cox und Graham, 1979). Die Rf-Werte betragen in diesem Laufmittel für Salicylsäure 0,74 (Farmer und Thomas, 2004), für Pyochelin I 0,35 und für Pyochelin II 0,37 (Ankenbauer *et al.*, 1991) und für Cepabactin 0,51 (Meyer *et al.*, 1989). Salicylsäure kann außerdem durch Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen Produkt

identifiziert werden.

Eisensprühreagenz

0,1 M FeCl₃

0,1 M HCl

2.9.6 Nachweis von HCN (Guilbault und Kramer, 1966; verändert)

p-Nitrobenzaldehyd reagiert mit Zyanidionen zu dem reduzierend wirkenden Cyanohydrin. Dieses kann mit verschiedenen Komponenten farbige Produkte bilden. Mit o-Dinitrobenzol reagiert Cyanohydrin zu einem blau-violettem Produkt (o-Nitrophenylhydroxylamin-Dianion). Die Reaktionen können als Nachweis von Zyanid und bei Erstellung einer Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Zyanid verwendet werden.

Zum Nachweis der Zyanidproduktion in *P. aeruginosa* PAO1 und *B. cenocepacia* H111 wurden jeweils 20 μ l einer LB-Übernachtkultur auf BHI-, NGMII- und PGS-Agar in einer kleinen Petrischale (Durchmesser 3 cm) ausplattiert. Die kleine Schale wurde in eine größere gestellt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurde der Deckel der kleinen Petrischale abgenommen, in den Deckel wurde 1 ml 4 M NaOH gegeben und zu der Kultur in die große Schale gestellt. Die große Schale wurde mit dem Deckel und zusätzlich mit Parafilm verschlossen und bei 30 °C weitere 4 h lang inkubiert. Zur Messung des Zyanids wurde die Natronlauge aus der Schale auf 0,09 M mit H₂O_{dest.} verdünnt. Im Fall von PAO1 wurde die Probe nach dem Verdünnen mit 0,09 M NaOH noch einmal 1:100 und 1:300 verdünnt, um im linearen Messbereich (bis ca. 1,5 nM Cyanid) zu bleiben. 210 μ l der auf 0,09 M verdünnten Zyanid-haltigen NaOH wurden mit 700 μ l Färbelösung vermischt, eine halbe Stunde bei RT stehen gelassen und bei einer Wellenlänge von 578 nm im Fotometer gemessen.

Färbelösung

- 0,1 M o-Dinitrobenzol in Ethylen-glycol-monomethylether
- 0,2 M p-Nitrobenzaldehyd in Ethylen-glycol-monomethylether

Die Lösungen wurden frisch angesetzt und 1:1 gemischt

2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Schrägger und v. Jagow, 1987)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine durch das anionische Detergenz Natrium-Dodecylsulfat denaturiert und nach Molekülgröße aufgetrennt. Die Peptidketten lagern sich an das SDS an, wobei anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen: ca. 1,4 g SDS pro Gramm Protein. Zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungsstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen ergibt sich eine lineare Beziehung, so dass mit Hilfe von Markerkproteinen eine Eichkurve aufgestellt und die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine bestimmt werden können. Die SDS-PAGE wird bevorzugt in Porengradientengelen durchgeführt, da die Gradientengele im Vergleich zu homogenen Gelen einen stärkeren Siebeffekt aufweisen und deshalb bei der Auftrennung sehr scharfe Banden erzielt werden.

Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gele bestehen aus zwei getrennten Gelen, die sich in Porengröße und pH-Wert unterscheiden. Die Proben gelangen zunächst in ein 5% iges Sammelgel (pH 6,8) mit großen Poren, in dem sich alle Proteine in einer scharfen Bande konzentrieren. Sie erreichen dann gleichzeitig das Trenngel (pH 8,8) mit kleinen Poren, wo es zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht kommt. Die Konzentration des Trenngels richtet sich nach der Größe der zu trennenden Proteine. Sie kann von 15 % igen Gelen für sehr kleine Proteine bis zu 7,5 % igen Gelen für sehr große Proteine reichen. Da das AidA-Protein mit 18 kDa relativ klein ist, wurde ein 15 % iges Gel verwendet.

Herstellung der Gele: <u>Acrylamid-Stammlösung</u> Acrylamid 30 % (w/v) Bisacrylamid 0,8 % (w/v) Trenngelpuffer (TG)

Tris-HCl	18,2 g
SDS 10 % (w/v)	4 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
рН 8,8	

Sammelgelpuffer (SG)

Tris-HCl	6,1 g
SDS 10 % (w/v)	4 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
pH 6,8	

Pipettierschema für 3 Gele:

Gel	Acrylamid	Gelpuffer	H ₂ O _{bidest}	APS/TEMED
5 % SG	3,34 ml	5 ml	11,6 ml	150 / 15 μl
15 % TG	20 ml	10 ml	10 ml	250 / 25 μl

Vor dem Gießen der Gele wurden die Glasplatten mit 96 %igem EtOH gründlich gesäubert. Dann wurde das Trenngel zwischen die beiden mit Agarose abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit 96 % Ethanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde der Ethanol wieder entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Wichtig ist das luftblasenfreie Einsetzen des Gelkamms. Bereits gegossene Gele können in feuchtes Küchenpapier und Frischhaltefolie eingewickelt bei 4 °C ca. 4 Wochen aufbewahrt werden.

Probenauftrag und Elektrophorese

Die zu analysierenden Stämme wurden in jeweils 100 μ l LB in einer Mikrotiterplatte angezogen. Nach Messung der OD₆₀₀ wurden 5 μ l der Kultur mit 15 μ l Auftragspuffer vermischt und 10 min bei 100 °C in Wasserbad denaturiert. Die gesamte Probenmenge wurde auf das Gel aufgetragen, die Elektrophorese bei 30-40 mA in einfach konzentriertem Elektrophorese-Puffer durchgeführt. Die Elektrophorese ist beendet, wenn die Bromphenolblau-Front die untere Gelkante erreicht hat (ca. 1,5 h).

<u>Auftragspuffer (4 x)</u>		Elektrophorese-F	Elektrophorese-Puffer (10 x)	
Glycerin	7,5 ml	Tris-HCl	30,3 g	
β -Mercaptoethanol	2,5 ml	Glycin	144,1 g	
SDS	1,2 g	SDS	10,0 g	
Bromphenolblau (1 %)	200 µl	H ₂ O _{bidest.}	ad 1.000 ml	
Tris-HCl	0,4 g			
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 ml			

pH 6,8 mit HCl einstellen

2.11 Western Blot

2.11.1 Elektrophoretischer Transfer

Die durch SDS PAGE getrennten Proteine wurden elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Polyvinylidin-Difluorid-Membran (PVDF, Immobilon-P, 0,45 μ m Porengröße, Millipore, Eschborn) transferiert. Der Transfer erfolgte in einer horizontalen, semitrockenen Transferkammer (Nova-Blot 2117 250, LKB Pharmacia, Freiburg). Zunächst wurde das Gel 20 min bei Raumtemperatur in Transferpuffer geschwenkt, währenddessen wurden 9 Blatt 3MM Whatman-Papier (Whatman, Maidstone, England) auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten, in Transferpuffer getränkt und auf die mit H₂O_{bidest} befeuchtete Kohle-Anode der Blot Apparatur gelegt. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol, anschließend in Transferpuffer geschwenkt und luftblasenfrei auf den Filterpapierstapel aufgelegt. Dann wurde das Gel auf die Membran aufgelegt und mit weiteren 9 Lagen von in Transferpuffer getränktem Filterpapier bedeckt. Letzte Luftblasen wurden sorgfältig mit Hilfe eines Rollers entfernt. Nach dem Auflegen der mit H₂O_{bidest} befeuchteten Graphit-Kathode erfolgt der Proteintransfer bei 0,8 mA pro cm² Gelfläche für 1 h bei Raumtemperatur.

Elektrophorese-Puffer (10 x)

Tris-HCl	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10,0 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1.000 ml

Transferpuffer	
Tris-HCl	5,8 g
Glycin	2,9 g
SDS	0,37 g
Methanol	200 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1.000 ml
рН 8,3	

2.11.2 Proteindetektion mit Hilfe von Antikörpern (Blake et al., 1984)

Die auf die PVDF-Membran geblotteten Proteine wurden mit spezifischen (primären) Antikörpern markiert. Die in dieser Arbeit verwendeten anti-AidA-Antikörper wurde mit Hilfe des aufgereinigten AidA-Proteins von der Firma pab productions (Herbertshausen) hergestellt und von Dr. B. Huber zur Verfügung gestellt.

An die primären Antikörper binden sekundäre Antikörper, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind und somit die Detektion durch die Umsetzung chromogener Substrate ermöglichen. Hierzu wurden sekundäre Anti-Rabbit-IgG (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

TBS-Puffer	
Tris-HCl	10 mM
NaCl	50 mM
рН 7,5	
TBS-T-Puffer	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	500 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)
Triton X100	0,2 % (v/v)
рН 7,5	

Material und Methoden

Blocking-Puffer

BSA 3 % (w/v) TBS-Puffer ad 100 ml

Binde-Puffer

Blocking-Puffer 1:1 mit TBS-Puffer verdünnt.

<u>Reaktionspuffer</u>	
Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
рН 9,5	

Alle Reaktionsschritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur. Die geblottete Membran wurde zweimal für 10 min in TBS-Puffer gewaschen, 1 h in Blocking-Lösung inkubiert, dann zweimal mit TBS-T-Puffer und einmal mit TBS-Puffer für je 10 min gewaschen. Nach Zugabe von 20 ml Bindepuffer mit den primären Antikörpern (anti-AidA 1:10.000 verdünnt) wurde die Membran für 1 Stunde oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal mit TBS-T-Puffer und einmal mit TBS-Puffer für jeweils 10 min gewaschen. Nach Zugabe von 20 ml Bindepuffer mit den sekundären Antikörpern (anti-Rabbit-IgG 1: 2.000 verdünnt), wurde die Membran für 1 h inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Membran in TBS-T-Puffer für 5 min und einmaligem Waschen der Membran in Rekationspuffer für 10 min wurden 200 μ l NBT/BCIP (Roche, Mannheim) zu 10 ml Reaktionpuffer gegeben und die Membran solange in der Substratlösung inkubiert, bis Farbbanden sichtbar wurden (1 bis 5 min). Die Reaktion wurde mit 0,5 M EDTA abgestoppt, die Membran kurz in H₂O_{dest} gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet. Das Ergebnis wurde durch Einscannen der Membran dokumentiert.

2.12 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Für Wachstums- und Selektionsmedien sowie Lösungen, Puffer und Reaktionsansätze wurden Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme der folgenden Firmen verwendet:

Acrylamid	Pharmacia Biotech
Adenosin	Acros Organics
Agarose	Eurogentech
Agar	Nierle GmbH
Bacto TM Pepton	Difco
BCIP	Sigma
Bisacrylamid	Pharmacia Biotech
Brain Heart Infusion	Difco
Bromphenolblau	Serva
BSA	Sigma
C8-HSL	Fluka
CaCl ₂	VWR
CHCl ₃	VWR
Cholesterin	Sigma
Chromazurol-S	Sigma
Citrat	VWR
Cystein	Sigma
Dichlormethan	VWR
o-Dinitrobenzol	Sigma
DMF	VWR
EDTA	Serva
Eisessig	Riedel-de-Haën
Ethidiumbromid	Roth
EtOH absolut	VWR
Ethylen-glycol-monomethylether	Aldrich
FeCl ₃	VWR
Ficoll 400	Sigma
Glukose	VWR

Glycerin	Fluka
Glycerin-Tributyrat	Merck
HCl	VWR
HDTMA	Sigma
Hefeextrakt	Oxoid
HEPES	Sigma
IPTG	Biomol
L-Isoleucin	Sigma
KAc	VWR
KCN	Aldrich
K ₂ HPO ₄	J. T. Baker
KH ₂ PO ₄	J. T. Baker
Kongo-Rot	Schuchardt
N-Laurylsarcosyl	Sigma
Magermilchpulver	Saliter
Mannit	J. T. Baker
β-Mercapto-Ethanol	AppliChem
Methanol	J. T. Baker
MgCl ₂	VWR
MgSO ₄	VWR
Na ₂ HPO ₄	VWR
NaN ₃	VWR
$(NH_4)_2SO_4$	VWR
NaCl	Roth
Natriumhypochlorit (12 % Cl)	Roth
NaOH	J. T. Baker
NBT	AppliChem
p-Nitrobenzaldehyd	Sigma
NH4Cl	VWR
PIPES	Sigma
Saccharose	VWR
SDS	Serva

D-Sorbit	Sigma
TEMED	Pharmacia Biotech
Tris-HCl	AppliChem
Triton X100	Sigma
Trypton	Oxoid
Tween 20	Serva
Uracil	Sigma
L-Valin	Sigma
X-Gal	Biomol

Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Antibiotika von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil werden Versuche mit *C. elegans* und *B. cenocepacia* H111 bzw. *P. aeruginosa* PAO1 zum Thema Quorum sensing und Pathogenität beschrieben. Dabei wurden unterschiedliche Wachstumsmedien für die Bakterien und ihre Auswirkungen auf *C. elegans* getestet (s. 3.1). Ferner wurde die Wirkung von Quorum sensing Hemmstoffen auf die Pathogenität von *B. cenocepacia* H111 und *P. aeruginosa* PAO1 und die Empfindlichkeit von *C. elegans*-Mutanten gegenüber Infektionen mit *B. cenocepacia* H111 untersucht.

Im zweiten Teil (ab 3.3) wurden die Erkenntnisse aus den zuvor mit *C. elegans* durchgeführten Versuchen für ein Screening auf Pathogenitätsfaktoren von *B. cenocepacia* H111 verwendet. Aus einer *B. cenocepacia* H111-Mutantenbank wurden im *C. elegans*-Modell attenuierte Mutanten selektiert und geno- sowie phänotypisch charakterisiert.

Teil 1

3.1 Pathogenitätstests mit C. elegans

C. elegans wird im Labor auf einem Minimalmedium (NGM) mit *E. coli* OP50 als Nahrungsquelle gehalten. Wird statt *E. coli P. aeruginosa* PA14 als Nahrungsquelle auf NGM mit leicht erhöhtem Peptongehalt (NGMII) ausplattiert, sterben die Würmer nach 2-3 Tagen an einer Infektion ("slow killing") (Tan *et al.*, 1999). Dabei waren Mutanten, die im Maus- und Arabidopsis-Modell weniger pathogen waren, auch in *C. elegans* attenuiert, darunter Mutanten mit Insertionen in den Quorum sensing Genen *lasR* und *gacA*. Ziel der ersten Pathogenitäts-Versuche mit *C. elegans* war es, Faktoren, die für die Pathogenität von *P. aeruginosa* in der Lunge von CF-Kranken verantwortlich sind, anhand eines einfachen Modells zu charakterisieren. Da aufgrund des gestörten Chloridionen-Transports der Salzgehalt in der CF-Lunge erhöht ist, wurde das PGS-Medium entwickelt, das diese Bedingungen simulieren sollte (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999). Wurde *P. aeruginosa* auf PGS ausplattiert, starb *C. elegans* innerhalb von 4 bis 24 h durch den Einfluss von diffundierbaren Toxinen ("fast killing"). Zu diesen Toxinen gehörten u. a. Phenazine.

Gemäß der Versuche von Tan *et al.* (1999 a, b) und Mahajan-Miklos *et al.* (1999) wurde das *C. elegans*-Modell für Versuche mit dem klinischen Isolat *B. cenocepacia* H111 verwendet. Für die Pathogenitätstests wurden Larven im L4-Stadium oder adulte Tiere verwendet.

Synchronisierte Wurmpopulationen wurden auf die Testplatten transferiert und über einen Zeitraum von 72 bzw. 144 h beobachtet.



Abb. 3.1: a) adulter Wurm mit Eiern auf NGMI, Vergrößerung 105,6-fach b) verschiedene Larvenstadien und Eier auf NGMI, Vergrößerung 80-fach

Entsprechend den Ergebnissen für *P. aeruginosa* PA14 starb *C. elegans* auf NGMII mit *B. cenocepacia* H111 durch einen infektionsähnlichen Vorgang. Dabei wurde häufig eine trapezartige Verformung des Schwanzendes beobachtet und im Endstadium ein Aufquellen des gesamten Wurmdarms (s. Abb. 3.2). Im Verlauf der Infektion verlangsamten sich die Pump-Frequenz des Pharynx sowie die Kriechbewegung. Die Würmer bewegten sich häufig nur noch, wenn sie angestoßen wurden, im späteren Verlauf der Infektion wurde häufig nur noch der Kopf bewegt. Eine weitere Beobachtung war der sog. Eiablage-Defekt. Adulte Würmer können ihre Eier nicht mehr ablegen, statt dessen schlüpfen die Larven im adulten Wurm, der daraufhin stirbt.



Abb. 3.2: *C. elegans* auf NGMII mit einem *B. cenocepacia* H111-Rasen. a) Wurm mit trapezförmig verformtem Schwanzende (Pfeil), b) durch die Infektion ist der Wurmdarm durchgängig aufgequollen. Vergrößerung: 105,6-fach

Auf PGS-Medium wurde den Versuchen mit *P. aeruginosa* entsprechend ein schnelleres Sterben der Würmer beobachtet. Jedoch traten im Zusammenhang mit diesem Medium zwei Schwierigkeiten auf. Da *C. elegans* empfindlich auf hohe Osmolarität reagiert, waren die Würmer auf PGS von vornherein beeinträchtigt. Es wurde beobachtet, dass die Würmer unmittelbar nachdem sie auf den Agar transferiert worden waren, bewegungslos liegenblieben und erst später herumkrochen. Da die Würmer schon nach einigen Stunden starben, wurde ein Aufquellen des Darms wie auf NGMII i. d. R. nicht beobachtet. Typischerweise krümmten die Würmer sich auf dem Agar zusammen oder rollten sich auf (Abb. 3.3). Eine zweite Schwierigkeit bestand darin, dass die Toxizität der Bakterien offenbar stark von der für den Agar verwendeten Peptonmischung abhing. Verschiedene Produkte wurden daraufin getestet und ihre Zusammensetzung so weit wie möglich verglichen (s. 3.1.1).



Abb. 3.3: C. elegans auf PGS mit B. cenocepacia H111. Vergrößerung 105,6-fach

Von Darby und Mitarbeitern wurde eine weitere Art des Wurmsterbens auf BHI-Medium mit *P. aeruginosa* PAO1 beobachtet. Innerhalb von 4 Stunden wurde *C. elegans* unter dem Einfluss von Cyanid gelähmt und starb (Darby *et al.*, 1999). Eine Bestimmung der HCN-Produktion von *B. cenocepacia* H111 mit *P. aeruginosa* PAO1 als Positivkontrolle ergab, dass der Stamm H111 kein Cyanid produzierte. Zudem entwickelte H111 auf BHI auch nicht dieselbe Pathogenität wie auf NGMII; in Vorversuchen kam es zu einer Vermehrung von *C. elegans*. Versuche zur Cyanidbildung wurden daher mit dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt. Dabei war es wichtig, die Platten während des Versuchs geschlossen zu halten. Die Deckel der Platten können zusätzlich mit Parafilm abgedichtet werden. Innherhalb kurzer Zeit, nachdem die Würmer auf den Agar transferiert worden waren, war eine Verlangsamung der Kriech- und Pumpbewegungen bis zur vollständigen Bewegungslosigkeit zu beobachten. Tote Würmer lagen langgestreckt oder leicht gekrümmt auf dem Agar, ihre Gestalt war normal, auch am Wurmdarm waren keine Veränderungen zu erkennen.

Ergebnisse



Abb. 3.4: Durch Cyanid gestorbene Würmer auf BHI-Medium mit einem Rasen von *P. aeruginosa* PAO1, Vergrößerung 105,6-fach

3.1.1 Einfluss verschiedener Peptonmischungen auf die Virulenz von *B. cenopacia* H111 auf PGS-Agar

Auf PGS-Agar werden die Nematoden durch diffundierbare Stoffe, vermutlich leicht flüchtige Toxine und nachgewiesenermaßen Phenazine getötet (Mahajan-Miklos et al., 1999). Da die Bildung von Siderophoren von der Eisenkonzentration des Mediums abhängt, wurden verschiedene Peptonmischungen im fast killing Versuch getestet. Auf PGS mit Bacto-Casamino-Acids starben die Würmer innerhalb von 24 h (s. Tab. 3.1), jedoch stellte sich heraus, dass C. elegans auf diesen Testplatten auch ohne Bakterien beeinträchtigt war. Nach dem Auftropfen auf die Platten waren die Würmer zunächst unbeweglich, innerhalb von 24 h erholten sich nur ca. 54 % und zeigten normale Beweglichkeit. Ursache hierfür könnte der hohe NaCl-Gehalt der Peptonmischung gewesen sein, der zusätzlich zum Sorbit die Osmolarität stark erhöhte. Im Gegensatz dazu bewegten sich die Würmer auf NGMII mit Bacto Casamino Acids sofort, es gab auch nach 24 h keine unbeweglichen Würmer. Auf PGS mit Bacto-Pepton bewegten sich die Würmer 2 h nach dem Auftropfen normal, mit B. cenocepacia H111 wurden sie nach ca. 4 h unbeweglich und starben. Zusätzlich wurde ein unterschiedlich starkes Wachstum der Bakterien auf den verschiedenen PGS-Mischungen beobachtet. Mit Special Pepton bildeten die Bakterien nach 24 stündiger Inkubation bei 37 °C größere Kolonien als auf den übrigen PGS-Platten, was jedoch offenbar keinen Einfluss auf deren Pathogenität hatte. Eine mögliche Ursache der verringerten Pathogenität auf PGS mit Special-Pepton könnte der relativ hohe Eisenanteil sein (s. Tab. 3.2), der eine Siderophor-Bildung unterdrückt. Diese Frage wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Peptonmischung	tote Würmer nach 24 h [%]		
Caseinhydrolysat (Invitrogen, Pepton 140)	100		
Trypton (Oxoid, L42)	76-93		
Pepton aus Casein (Roth, Nr. 8952)	86-100		
Bacto Casamino Acids (BD, Nr. 223050)	91-100		
Special Pepton (Oxoid, L72)*	20-55		
Bacto-Pepton (BD, Nr. 211840)	100		

Tabelle 3.1: Abhängigkeit der Wurmsterblichkeit auf PGS vom Peptonbestandteil

* die Testplatten wurden ohne zusätzliches NaCl hergestellt

Da die Hersteller z. T. auf genaue Analysen der Peptonmischungen verzichten oder unterschiedliche Kriterien bei der Analyse anlegen, war ein Vergleich der Zusammensetzung der verschiedenen Produkte schwierig. Zudem können auch Unterschiede bei einzelnen Chargen auftreten. Angegeben sind daher nur Stoffe, von denen ein Einfluss auf die Befindlichkeit der Würmer bekannt ist oder Stoffe, die einen Einfluss auf die bakterielle Virulenz haben. So ist z. B. bekannt, dass *C. elegans* eine Umgebung mit hoher Osmolarität meidet (Culotti und Russell, 1978) und hohe Salzkonzentrationen zu einem Schrumpfen des Wurms führen (Lamitina *et al.*, 2004). Bakterien hingegen produzieren bei Eisenmangel im Medium Siderophore, die als Virulenzfaktoren gelten. Cystein (Cys) ist ein Ausgangsstoff für die Biosynthese von Siderophoren. Histidin (His) wurde aufgrund des stark unterschiedlichen Vorhandenseins in den Peptommischungen ebenfalls aufgeführt.

 Tabelle 3.2: Vergleich wichtiger Bestandteile von Peptonmischungen

	NaCl [%]	Fe [ppm]	His [%]	Cys [%]
Caseinhydrolysat (Invitrogen, Pepton 140)	2,8	12,5	2,3	0,25
Trypton (Oxoid, L42)	0,3	54,0	0	0,22
Pepton aus Casein (Roth, Nr. 8952)	k. A.	k. A.	2,0	k. A
Bacto Casamino Acids (BD, Nr. 223050)	12,1	gering	1,8	0,1
Special Pepton (Oxoid, L72)	3,5	51,0	k. A.	0,33
Bacto-Pepton (BD, Nr. 211840)	1,7	k. A.	0,2	

k. A. = keine Angabe

3.2 Quorum sensing und Pathogenität von B. cenocepacia H111

3.2.1 Protease als Virulenzfaktor

Protease gilt als ein klassischer Virulenzfaktor im Zusammenhang mit bakterieller Pathogenität. Die Bildung von Protease ist in *B. cenocepacia* H111 Quorum sensing reguliert. Zu Beginn der Untersuchung der Pathogenität von *B. cenocepacia* wurden Protease-negative Transposon-Insertions-Mutanten auf ihre Virulenz im *C. elegans*-Modell getestet. Abbildung 3.5 zeigt Stämme mit Mutationen in Genen des sog. "general secretory pathway" (*gsp*) oder Typ II Sekretionsweg (Pugsley, 1993), über den in *Burkholderia pseudomallei* Protease, Lipase und Phospholipase ausgeschieden werden (DeShazer *et al.*, 1999). Die Mutanten zeigten auf Magermilch-Agar keine Protease-Produktion (Antl, 2000) und verringerte bis gar keine Lipaseaktivität. Die *gsp*-Mutanten sind weder auf NGMII noch auf PGS attenuiert. Demnach haben in diesem Modell über den Typ II Sekretionsweg ausgeschiedene Virulenzfaktoren wie Protease und Lipase keine Relevanz.



Abb. 3.5: C. elegans auf NGMII (a) und PGS (b) mit B. cenocepacia H111 gsp-Mutanten

3.2.2 Quorum sensing und Virulenz

Unter den Protease-negativen Mutanten, die im Wurm-Modell getestet wurden, befanden sich auch die beiden Quorum sensing-Mutanten H111-I und H111-R (Huber *et al.*, 2001). H111-I wurde durch gerichtete Mutation des AHL-Synthase-Gens *cepI* erzeugt, H111-R durch gerichtete Mutation des AHL-Rezeptorgens *cepR*. Beide Mutationen hatten einen Ausfall der AHL-Produktion zur Folge (Antl, 2000) und damit auch einen Ausfall bzw. eine starke Verringerung der durch Quorum sensing regulierten Virulenzfaktoren wie Protease und Siderophore (Huber *et al.*, 2001; s. auch Abb. 3.24 und 3.25). H111-I war im slow- und im fast-killing Test
deutlich attenuiert, die Mutation konnte in beiden Fällen durch Zugabe von C8-HSL komplementiert werden. Auf PGS erfolgte die Komplementation jedoch verzögert. Die Mutante H111-R war auf NGMII ebenfalls attenuiert, es starben jedoch mehr Würmer als beim Stamm H111-I. Im fast-killing Versuch war H111-R geringgradig attenuiert.

Das Signalmolekül *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserinlacton (3-oxo-C12-HSL) von *P. aeruginosa* löst in menschlichen Fibroblasten eine Immunantwort und Entzündungserscheinungen aus (Smith *et al.*, 2002). Es wurde daher überprüft, ob C8-HSL eine ähnliche Wirkung auf *C. elegans* hat. Dazu wurde C8-HSL auf NGMII-Agar und PGS-Agar ohne Bakterien ausplattiert und *C. elegans* auf die Platten transferiert. Als Kontrolle dienten NGMII- und PGS-Agar ohne Bakterien und AHL. Es wurde kein vermehrtes Wurmsterben bzw. kein verändertes Verhalten von *C. elegans* auf den Platten mit AHL festgestellt.



Abb. 3.6: *C. elegans* auf NGMII (a) und PGS (b) mit den QS-Mutanten H111-I (weiße Dreiecke) und H111-R (weiße Quadrate). Als Positivkontrolle diente H111 (ausgefüllte Kreise), als Negativkontrolle *E. coli* OP50 (weiße Kreise). Ausgefüllte Dreiecke: H111-I mit C8-HSL, ausgefüllte Quadrate: der in trans komplementierte Stamm H111-R (pBAH27) (*cepR*⁺). Daten aus fünf unabhängigen Versuchen.

3.2.3 Akkumulation der Bakterien im Wurmdarm

Aus den Zählversuchen ging hervor, dass *C. elegans* nach 2-3 Tagen starb, wenn er auf NGMII-Agar mit *B. cenocepacia* H111 gehalten worden war. Eine häufige Beobachtung war das Aufquellen des Wurmdarms. Um den Verbleib der Bakterien im Wurm genauer zu untersuchen, wurde *C. elegans* auf einem GFP-markierten H111 Wildtyp-Stamm gehalten. Die Würmer wurden nach 3 h und nach 24 h unter dem CLSM beobachtet. Bereits nach 3 h hatte

sich eine große Menge Bakterien im Darm angesammelt (Abb. 3.7), noch deutlicher ist das Ergebnis nach 24 h (Abb. 3.8). Zu diesem Zeitpunkt war der gesamte Wurmdarm mit Bakterien angefüllt, ebenso der Grinder, in dem die Bakterien normalerweise zermahlen werden. Im Vergleich dazu befanden sich in *C. elegans*, nachdem er 24 h auf NGMII mit *E. coli* MT102 gehalten worden war, nur in der Mundhöhle Bakterien, weder im Darm noch im hinteren Teil des Pharynx waren intakte Bakterien sichtbar (Abb. 3.9).

Würmer, die auf PGS mit dem GFP-markierten H111 Wildtyp-Stamm gehalten worden waren, zeigten ein ähnliches Ergebnis. Obwohl bereits deutliche Lähmungserscheinungen erkennbar waren, waren kaum Bakterien im Darm sichtbar, auch das für die Haltung auf NGMII charakteristische Anschwellen wurde nicht beobachtet (ohne Abb.). Punkt 3.2.3 behandelt diese Beobachtung näher.



Abb. 3.7: *C. elegans* auf NGMII mit *B. cenocepacia* H111 nach 3 h. Gezeigt sind zwei Würmer, a1) mittlerer Teil, a2) und b) Kopf mit Grinder (Pfeile)



Abb 3.8: *C. elegans* auf NGMII mit *B. cenocepacia* H111 nach 24 h. a1-a3) Schwanz, mittlerer Teil und Kopf Wurm a; b) Schwanz Wurm b



Abb. 3.9: C. elegans nach 24 h auf NGMII mit E. coli MT102, Kopf

Wurde *C. elegans* auf NGMII mit der im Zählversuch deutlich attenuierten Quorum sensing Mutante H111-I gehalten, waren nach 24 h im hinteren Teil des Darm keine Bakterien nachweisbar (Abb. 3.10 a). Auch nach 48 h auf NGMII mit H111-I waren nur im vorderen Bereich der Mundhöhle, aber nicht im terminalen Bulbus Bakterien erkennbar (Abb. 3.10 b). Eine geringe Menge Bakterien konnte offenbar den Grinder passieren und sich im hinteren Darmbereich ansammeln, jedoch war diese Ansammlung nicht mit der des H111 Wildtyps zu vergleichen (Abb. 3.10 c).



Abb. 3.10: a) *C. elegans* nach 24 h auf NGMII mit H111-I, Schwanz; b) *C. elegans* nach 48 h auf H111-I, Kopf, c) Schwanz

Es stellte sich die Frage, ob *C. elegans* sich von der Infektion wieder erholt, wenn er, nachdem er sich von H111 ernährt hatte, auf eine Platte mit *E. coli* übersetzt wurde. Abb. 3.11 zeigt einen Wurm, der, nachdem er sich 24 h auf einer NGMII-Platte mit H111 aufgehalten hatte, für 6 h auf einer Platte mit *E. coli* OP50 gehalten wurde. H111 war noch immer in hoher Dichte im Darm vorhanden, jedoch nicht so stark wie in Abb. 3.8.



Abb. 3.11: *C. elegans* nach 24 h auf NGMII mit H111 Wildtyp und 6 h NGMII mit *E. coli* OP50. a) Schwanz, b) mittlerer Teil, c) Kopf

3.2.4 Filterversuche auf PGS

Zählversuche und Beobachtungen auf PGS-Agar sowie Beobachtungen unter dem CLSM mit dem GFP markierten H111 Wildtyp zeigten, dass die Würmer starben, noch bevor sich eine Infektion entwickeln konnte. Eine häufige Beobachtung auf PGS waren Lähmungserscheinungen bzw. ein Zusammenrollen oder "Zusammenklappen" der Würmer. Es wurde daher untersucht, ob diffundierbare Toxine, ähnlich wie bei *P. aeruginosa*, in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Auf den PGS-Agar wurden autoklavierte Nitrozellulose-Filter gelegt und darauf die Bakterien ausplattiert und inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Filter entfernt und L4-Stadien auf den Agar getropft. Kurz nach dem Auftropfen waren die Würmer auf allen Platten unbeweglich und erlangten dann unterschiedlich schnell und zu unterschiedlichen Anteilen wieder ihre normale Beweglichkeit (Abb. 3.12). Auf den Agarplatten, auf denen Filter mit dem H111 Wildtyp und den gsp-Mutanten inkubiert worden waren, zeigten die Würmer die für PGS typische Haltung (s. Abb. 3.3). Nach 4 h war ein Teil der Würmer eingeschränkt beweglich und konnte den Kopf bewegen oder langsam herumkriechen. Nach 24 h bewegten sich 40 bis 80 % der Würmer wieder normal. Agar, auf denen die Quorum sensing Mutanten H111-I und H111-R oder E. coli OP50 gewachsen waren, hatte keinen Einfluss auf die Beweglichkeit der Würmer. Nach 4 h bewegten sich fast alle Würmer normal, erst nach 24 h verringerte sich der Anteil der sich bewegenden Würmer leicht, möglicherweise aufgrund von Nahrungsmangel. Der Versuch zeigt, dass B. cenocepacia H111 Stoffe produziert, die durch Quorum sensing reguliert und entweder in ihrer Wirkung oder ihrer Beständigkeit relativ kurzlebig sind. Es wurde untersucht, ob Cyanid für den beschriebenen Effekt auf die Würmer verantwortlich war, das Ergebnis war jedoch negativ. B. cenocepacia H111 produzierte weder auf PGS noch auf NGMII oder BHI Cyanid. Der für spätere Versuche verwendete Stamm P. aeruginosa PAO1 wurde dabei als Positivkontrolle verwendet. Er produzierte nur auf BHI, aber nicht auf PGS oder NGMII Cyanid.



Abb. 3.12: Filterversuche auf PGS mit *B. cenocepacia* H111 *gsp-* und Quorum sensing Mutanten; hellgrau: 4 h, dunkelgrau: 24 h, I = H111-I, R = H111-R, OP50 = *E. coli* OP50

3.2.5 C. elegans phm-2 und B. cenocepacia H111

Wie die Abb. 3.10 zeigt, konnte der Stamm H111-I den Grinder nicht oder kaum passieren. Die Vermutung lag nahe, dass dies die Ursache für das Überleben von *C. elegans* auf H111-I war.

Der *C. elegans*-Stamm *phm*-2 hat aufgrund einer Mutation in einem Gen des Pharynxmuskels einen nicht mehr voll funktionsfähigen Grinder. Ein vollständiges Schließen der Mahlwerkzeuge ist nicht mehr möglich, so dass die Bakterien den Wurmdarm in intakter Form erreichen können (Avery, 1993). *C. elegans phm*-2 wurde auf NGMII mit H111-I gehalten und beobachtet. Verglichen mit dem Wildtyp starben auf der I-Mutante nach 48 h weniger als halb so viele Würmer (Abb. 3.13). Die überlebenden Würmer bewegten sich normal oder leicht verlangsamt und hatten sich nach 72 h vermehrt. Wurde *C. elegans phm*-2 auf H111-I mit C8-HSL gehalten, waren nach 48 h ca. 90 % der Würmer tot (ohne Abb.).



Abb. 3.13: *C. elegans phm-2* auf NGMII mit *B. cenocepacia* H111. Gefüllte Kreise: H111-I, offene Kreise: H111 Wildtyp, Dreiecke: *E. coli* OP50. Durchschnittswerte aus vier unabhängigen Versuchen

Zum Nachweis, dass H111-I tatsächlich im Darm vorlag, wurde *C. elegans phm*-2 auf einer GFP-markierten I-Mutante gehalten und unter dem Mikroskop beobachtet. Die Mutante füllte nach 48 h den gesamten Wurmdarm (Abb. 3.14), die Würmer bewegten sich normal oder etwas verlangsamt. Da die Würmer permanent Nahrung aufnahmen und somit ständig neue Bakterien in den Darm gelangten, war nicht erkennbar, inwieweit sich der Stamm H111-I

tatsächlich im Darm festgesetzt hatte. Zur Klärung dieser Frage wurden *phm*-2-Würmer, nachdem sie sich 48 h von H111-I ernährt hatten, auf *E. coli* OP50 übersetzt und beobachtet. Nach 24 h auf *E. coli* OP50 befand sich noch immer eine größere Menge H111-I im Darm, jedoch deutlich weniger als bei ausschließlicher Ernährung mit H111-I (Abb. 3.15). Nach weiteren 48 h auf *E. coli* OP50 waren Bewegung und Vermehrung der Würmer normal, nach 72 h auf *E. coli* OP50 lebten alle Würmer und hatten sich normal vermehrt. Dies zeigt, dass außer der Produktion von Virulenzfaktoren offenbar auch die Fähigkeit, sich in *C. elegans* festzusetzen, zur Pathogenität des Stammes H111 beiträgt.



Abb. 3.14: *C. elegans phm-*2 auf NGMII mit H111-I nach 48 h, a) Schwanz, b) mittlerer Teil, c) Kopf



Abb. 3.15: *C. elegans phm*-2 nach 48 h auf NGMII mit H111-I und ca. 24 h auf *E. coli* OP50, a) Schwanz, b) Kopf, c) Kopf mit Grinder

3.2.6 C. elegans srf-Mutanten

Die Haut von Nematoden spielt nicht nur bei der Fortbewegung sondern auch bei der Nährstoffaufnahme, als Schutz vor Austrocknung und vor Pilzen und Bakterien, die sich von Nematoden ernähren, eine wichtige Rolle. Es handelt sich bei ihr nicht um ein einfaches Exoskelett, sondern vielmehr um ein azelluläres biochemisches Kompartiment, das aus strukturierten und nicht-strukturierten Komponenten besteht. Die nicht-strukturierten Komponenten sind, von innen nach außen betrachtet, die Hypodermis (Epidermis), die hauptsächlich aus Kollagen und kollagenähnlichen Molekülen bestehende Cuticula, die membran-ähnliche Epicuticula und als äußere Schicht ("Mantel") eine 5-20 nm starke, in allen Stadien vorhandene Glycocalyx. Die Glycocalyx ist, wahrscheinlich aufgrund von Zucker-Sulfat-Gruppen, polyanionisch und enthält außer Kohlenhydraten Mucin-ähnliche Proteine (Zuckerman *et al.*, 1979; Blaxter, 1993). Bei parasitischen Nematoden wirkt sie antigenisch. Während die Cuticula nur vor jeder Häutung neu gebildet wird, werden die Bestandteile der Glycocalyx ständig produziert und über den exkretorischen bzw. sekretorischen Apparat oder transcuticuläre Routen an die Umgebung abgegeben.

1986 wurden bei genetischen Kreuzungsexperimenten mit *C. elegans* Phänotypen mit einem geschwollenen Schwanzende entdeckt und als "dar" ("deformed anal region") bezeichnet (Sulston und Hodgkin, 1988). Später stellte sich heraus, dass die Schwellung durch das bisher unbekannte coryneforme Bakterium *Microbacterium nematophilum* ausgelöst wurde (Hodgkin *et al.*, 2000). Die Infektion der rektalen und post-analen Hautpartien führte zum Anschwellen des hypodermalen Gewebes, war jedoch nicht tödlich und wurde zum größten Teil auf die Nachkommen übertragen.

C. elegans srf- ("surface") Mutanten haben eine veränderte Oberflächen-Antigenstruktur, bisher sind 9 verschiedene *srf-*Mutanten bekannt. *srf-*3-Mutanten erwiesen sich als resistent gegenüber Infektionen mit *Microbacterium nematophilum* (Hodgkin *et al.*, 2000), wobei der Stamm *e2689* völlig resistent war, während *yj10* sich als schwächeres Allel herausstellte (Baumeister, pers. Mitteilung). Die beiden "rescue"-Mutanten BR2563 und 2564 waren wieder gleichermaßen empfindlich gegenüber Infektionen mit *M. nematophilum* (Höflich, pers. Mitteilung). Es wird vermutet, dass durch die Mutation die Anheftung oder Erkennung durch *M. nematophilum* gestört wurde und daher keine Infektion mehr ausgelöst werden konnte. Versuche mit *B. cenocepacia* H111 zeigten, dass die beiden *srf-*3 Mutanten auch gegenüber H111 resistenter waren als der N2 Wildtyp (Abb. 3.16), wobei der Stamm *e2689* sich als resistenter erwies als *yj10*.

Im späteren Verlauf des Versuchs (72 h Inkubation) starben jedoch sämtliche *yj10*-Mutanten und ca. 70 % der *e2689*-Mutanten. Gegenüber dem N2 Wildtyp und *yj10* setzten bei *e2689* sämtliche Krankheitssymptome wie Schwellung des Schwanzendes oder verlangsamte Bewegung zeitlich verzögert ein. Während bei *yj10* wie auch bei den Wildtyp-Würmern nach 24 h schon deutliche Schwellungen des Schwanzendes sichtbar waren, sahen die *e2689*-Mutanten zu diesem Zeitpunkt noch normal aus und bewegten sich auch normal. Nach 48 h waren auch bei *e2689* Schwellungen erkennbar. Im weiteren Verlauf des Versuchs vermehrten sich die *e2689*-Mutanten geringfügig, jedoch zeigten einige Larven bereits Krankheitssymptome. Bei den *yj10*-Mutanten gab es keine Nachkommen. In den beiden *srf*-rescue Mutanten BR2563 und 2564 konnte der Defekt vollständig komplementiert werden (Abb. 3.17). Dieses Ergebnis deckt sich ebenfalls mit den Versuchen mit *M. nematophilum*.



Abb. 3.16: *C. elegans* N2 Wildtyp und Mutanten nach 48 h auf NGMII mit *B. cenocepacia* H111, weiß: *C. elegans srf*-3 (*e2789*), hellgrau: *srf*-3 (*yj10*), dunkelgrau: *phm*-2, schwarz: N2 Wildtyp. Durchschnittswerte aus drei Versuchen.



Abb 3.17: *C. elegans* N2 Wildtyp und Mutanten nach 24 h auf NGMII mit *B. cenocepacia* H111, schwarz: N2 Wildtyp, weiss: *srf*-3 (*e2789*), hellgrau: *srf*-3 (*yj10*), dunkelgrau: BR2563, grau schraffiert: BR2564. Durchschnittswerte aus drei Versuchen.

3.2.7 Einfluss von Quorum sensing Hemmstoffen auf die Pathogenität von *B. cenocepacia* H111 und *P. aeruginosa* PAO1

Die von der Alge *Delisea pulchra* gebildeten halogenierten Furanone (de Nys *et al.*, 1993) waren aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit AHL-Molekülen in der Lage, den Quorum sensing Prozess zu hemmen (Givskov *et al.*, 1996). Quorum sensing steuert in *B. cenocepacia* nicht nur die Produktion zahlreicher Virulenzfaktoren, sondern auch die spätere Phase der Biofilm-Bildung (Huber *et al.*, 2001). Haben Bakterien bei einer Infektion erst einmal einen Biofilm gebildet, sind sie weitaus weniger empfindlich gegenüber Antibiotika und der Immunabwehr (Schierholz *et al.*, 1999). Es liegt demnach nahe, Quorum sensing Hemmstoffe zur Verhinderung der Biofilmbildung einzusetzen, um die Bakterien dann erfolgreicher mit Antibiotika bekämpfen zu können. Im slow-killing Modell mit *B. cenocepacia* H111 wurden zwei synthetische Quorum sensing Hemmstoffe getestet. Die Hemmstoffe wurden auf NGMII-Agar ausplattiert und zusätzlich zur Anzucht der Bakterien in das Medium gegeben. Durchschnnittswerte aus drei Versuchen zeigten, dass bei Zugabe der Hemmstoffe nach 24 h weitaus weniger Würmer gestorben waren als ohne (Abb. 3.18).



Abb. 3.18: *C. elegans* auf NGMII mit *B. cenocepacia* H111: schwarz: ohne Hemmstoff, grau: Hemmstoff Nr. 192, weiß: Hemmstoff Nr. 306

P. aeruginosa PAO1 produziert auf BHI-Agar Cyanid, das *C. elegans* innerhalb von ca. 4 h umbringt (Gallagher und Manoil, 2001). Die Cyanid-Produktion in *P. aeruginosa* ist ebenfalls durch Quorum sensing reguliert. Wie zuvor *B. cenocepacia* H111 wurde *P. aeruginosa* PAO1 mit jeweils einem Hemmstoff angezogen und auf BHI mit demselben Hemmstoff ausplattiert. Durchschnittswerte aus fünf Versuchen zeigten, dass bei Vorhandensein der Hemmstoffe bis zu 40 % weniger Würmer gestorben waren (Abb. 3.19).



Abb. 3.19: *C. elegans* auf BHI mit *P. aeruginosa* PAO1: schwarz: PAO1 ohne Hemmstoff, grau: PAO1 mit Hemmstoff Nr. 306, weiß: PAO1 mit Hemmstoff Nr. 408

Als natürlicher Hemmstoff wurde Knoblauchextrakt getestet. Bei Vorhandensein des Extrakts starben auf BHI-Agar mit *P. aeruginosa* PAO1 weniger als halb so viele Würmer wie ohne Extrakt (Abb. 3.20). Als Kontrolle diente die Quorum sensing Mutante PAO1 JP2, die durch Deletion der Gene *lasI* und *rhlI* keine AHL mehr produziert.



Abb. 3.20: *C. elegans* nach 24 h auf BHI mit *P. aeruginosa* PAO1, Durchschnitt aus vier unabhängigen Versuchen. Schwarz: BHI mit *P. aeruginosa* PAO1, grau: BHI mit 2 % Knoblauchextrakt und *P. aeruginosa* PAO1, weiß: BHI mit 2 % Knoblauchextrakt und der QS-Doppelmutante PAO1 JP2.

3.2.8 Pathogenität weiterer B. cenocepacia H111 QS-Mutanten

Außer den beiden Hauptbestandteilen des Quorum sensing Systems von *B. cenocepacia*, der AHL-Synthase CepI und dem Rezeptor CepR, sind bisher drei weitere übergeordnete Quorum sensing-Regulatoren bekannt: RsuA, SuhB und YciR (Huber *et al.*, 2002). Der Einfluss von zwei Regulatoren auf die Pathogenität von *B. cenocepacia* wurde im *C. elegans*-Modell getestet. Eine H111 *suhB*-Mutante war auf PGS weniger pathogen als der Wildtyp (40 % tote Würmer nach 24 h), auf NGMII war die Attenuierung geringer (Merkl, 2003; Antl, 2000), obwohl die AHL-Produktion der *suhB*-Mutante war verringert, eine Protease-Aktivität wurde auf Magermilch-Agar nicht nachgewiesen. Komplementation der Mutante in trans stellte die AHL-Produktion sowie Siderophor- und Protease-Aktivität wieder her.

Ergebnisse

Eine *rsuA*-Mutante war auf NGMII ebenfalls nicht vollständig attenuiert (s. Abb. 3.22). Wie die *suhB*-Mutante zeigte auch die *rsuA*-Mutante eine verringerte AHL-Produktion, keine Protease-Aktivität und keine Siderophor-Produktion.

Teil 2

3.3 Screening einer *B. cenocepacia* H111-Mutantenbank nach Virulenzfaktoren mit *C. elegans*

Nach erfolgreicher Etablierung des slow-killing Modells für *C. elegans* und *B. cenocepacia* H111 in Einzelversuchen wurde das Modell in einem Screening mit dem Ziel der Bestimmung von möglichen Virulenzgenen von *B. cenocepacia* H111 verwendet. Es wurden ca. 1.000 Mini-Tn*5*-Insertionsmutanten auf 24er Multiplatten getestet. Auffällige Mutanten, d. h. solche Mutanten, auf denen nach 48 h noch lebende Würmer vorhanden waren bzw. auf denen eine Vermehrung stattgefunden hatte, wurden näher charakterisiert. Um einen Defekt im Quorum sensing System als Ursache der Attenuierung auszuschließen, wurden zunächst Kreuzausstriche mit den Sensorstämmen *P. putida* F117 (pAS-C8) oder *E. coli* MT102 (pSB403) durchgeführt. Außerdem wurde das Wachstum der Stämme auf LB, PIA, ABC und ABG-Agar getestet (Tab. 3.3). Die Mutanten wurden dann genotypisch und phänotypisch charakterisiert, einzelne Mutanten wurden komplementiert.

3.3.1 Genotypische Charakterisierung der Mutanten

Für die genotypische Charakterisierung der Mutanten wurde durch Restriktion mit *Sph*I und Southern Blotting mit einer DIG-markierten Kanamycin-Sonde (Primer Kan res-r und Kan res-v) sichergestellt, dass das Transposon nur einmal ins Genom integriert war. Dies war bei allen Mutanten der Fall (Abb. 3.21).



Abb. 3.21: Southern Blots mit chromosomaler DNS der im *C. elegans* Screening isolierten Mutanten. M = Marker (*Hind*III geschnittene λ -DNS)

Die Insertionsstellen des Transposons wurden mit Hilfe zweier verschiedener Techniken bestimmt: *Sph*I-Klonierung und arbitrary PCR. Bei der *Sph*I-Klonierung wurde durch Restriktion der genomischen DNS mit dem Enzym *Sph*I ein Stück genomischer DNS mitsamt dem sog. i-Ende des Transposons und der Kanamycin-Resistenz herausgeschnitten (Abb. 2.1). Die gesamte verdaute DNS wurde in den Vektor pUC19 ligiert und die Zellen, die den Vektor mit dem i-Ende enthielten, auf LB mit Kanamycin selektiert. Mit dem i-End-Primer wurde dann das an das i-Ende des Transposons anschließende DNS-Stück sequenziert.

Die zweite Möglichkeit zur Bestimmung der Insertionsstelle war die sog. arbitrary PCR mit den Primern *luxC*ext2, arb6 und *luxC*int2. Bei dieser Technik wurde das an das o-Ende des Transposons anschließende DNS-Stück amplifiziert. Durch anschließende Klonierung des PCR-Produktes in den Vektor pCR2.1 TOPO und Sequenzierung mit den Primern UniV und UniR wurde die Insertionsstelle bestimmt. Die Sequenzen befinden sich im Anhang (Punkt 7.1)

Der Stamm *B. cenocepacia* H111 ist nicht sequenziert, einzelne zu einem früheren Zeitpunkt sequenzierte DNS-Teilstücke zeigten jedoch eine hohe Ähnlichkeit zu dem sequenzierten Stamm *B. cenocepacia* J2315. Da sehr kurze DNS-Sequenzen bei einem Datenbankabgleich häufig keine genauen Ergebnisse liefern, wurden die Sequenzen der H111-Mutanten zunächst mit der von *B. cenocepacia* J2315 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_cenocepacia/) verglichen. Da zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit die Sequenz des Stammes J2315 noch nicht vollständig annotiert war, wurde ein Datenbankabgleich mit dem entsprechenden DNS-Abschnitt von *B. cenocepacia* J2315 mit den Programmen BLASTX und BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 im Anhang aufgeführt. Zusätzlich wurden mit dem Programm "Neural Network Promoter Prediction" (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) mögliche Promotoren bestimmt.

Transposon-Insertionsstellen

Im folgenden sind die durch die Transposon-Insertion unterbrochenen Gene einschließlich ihrer Umgebung dargestellt. Den Abbildungen liegt das Genom von *B. cenocepacia* J2315 zugrunde, von dem Teilstücke in BLASTX verglichen wurden. Die Gene sind durch die grauen Pfeile dargestellt, mögliche Promotoren durch schwarze Pfeile. Die ungefähren Trans-

poson-Insertionsstellen sind durch einen schwarzen Balken markiert. In der Regel bestanden die größten Übereinstimmungen mit dem bereits annotierten Genom von *B. fungorum*. Die Gene von *B fungorum* sind unter der Bezeichnung "Bcep" durchnummeriert und in COGs ("cluster of orthologous groups of proteins") eingeteilt. Der besseren Verständlichkeit halber sind anstelle der Gen- oder COG-Nummern die Funktionen der Proteine angegeben, sofern sie bekannt sind. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die COGs auch Paraloge enthalten, deren Funktion nicht genau der des bekannten Proteins entspricht. Im Anhang (Punkt 7.3) befinden sich Karten der Stoffwechselwege von *Ralstonia solanacearum*, dessen Nukleotidsequenz in weiten Teilen der von H111 bzw. J2315 entspricht. Sie zeigen die Einbindung der mutierten Gene in den Stoffwechsel.

Mutante A4 (purD)



purD: Phosphoribosylamin-Glycin Ligase (Purin-Biosynthese, *B. fungorum*) *hemF*: Coproporphyrinogen III Oxidase (Häm-Biosythese, *B. fungorum*) *cafA*: Ribonukleasen G and E (*B. fungorum*)

Mutante A11 (aroK)



hofQ: Typ II Sekretionsweg (COG4796)

aroK: Shikimat Kinase (Tryptophan-, Phenylalanin-/Tyrosin-, Ubichinon- u. Menachinon-Biosynthese, *B. fungorum*)

aroB: 3-Dehydroquinat Synthetase (gleiche Biosynthesewege wie aroK, B. fungorum)

dgt: dGTP Triphosphohydrolase (Funktion unbek., *B. fungorum*)

ugpB: periplasmatische Komponente ABC Zuckertransport-System (B. fungorum)

Mutante B7

Von der Mutante B7 wurden die an das i- und an das o-Ende des Transposons angrenzenden Genomabschnitte sequenziert. Für beide Sequenzen ergaben sich nur vergleichsweise geringe Übereinstimmungen mit dem Genom von Burkholderia cenocepacia J2315 (ca. 60 %). Auch beim Vergleich Genomen anderer Burkholderiaceae der Sequenzen mit den (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom table.cgi) ergaben sich keine signifikanten Übereinstimmungen. Eine Suche mit BLASTX ergab für die o-Ende Sequenz eine Identität von 41 % (58 % Positive) mit einem hypothetischen Protein von B. fungorum (Bcep8051). Für die i-Ende Sequenz lagen die Identitäten beim Abgleich in BLASTX unter 40 %. Der GC-Gehalt lag mit 50,1 (o-Ende) bzw. 53,4 % (i-Ende) unter dem von J2315 (66,9 %).

Mutante D9 (purF)



folC: Folylpolyglutamat-Synthase (*B. fungorum*)

purF: Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (B. fungorum)

metC: Cystathionin beta-Lyasen/Cystathionin gamma-Synthasen (*B. fungorum*), Methionin-Biosynthese





rsuA: 16S rRNA Uridin-516 Pseudouridylatsynthase und verwandte Pseudouridylatsynthasen

(B. fungorum)

Bcep0899: nicht charakterisiertes, in Bakterien konserviertes Protein

nusA: Transkriptioneller Elongationsfaktor (B. fungorum)



clpP: Untereinheit einer ATP-abhängigen Clp-Protease (*B. fungorum*) *clpX*: ATP-abhängige Clp-Protease, ATPase Untereinheit (*B. fungorum*) *lon*: ATP-abhängige Lon-Protease (*B. fungorum*)

Mutante G11 (cysB2)



*cysB*2 : Transkriptionsregulator (*B. fungorum*), Transkriptionsregulator eines möglichen *cys*-Regulons (*Ralstonia solanacearum*)

livK : periplasmatische Komponente eines ABC-Transporters für verzweigte Aminosäuren

(B. fungorum)

lysR : Transkriptionsregulator (B. fungorum)

Mutante H2 (ilvC)



ilvB : Enzyme, die Thiamin-Pyrophosphat benötigen (Acetolaktat-Synthase, Pyruvat-Dehydrogenase (Zytochrome), Glyoxylat-Carboligase, Phosphonopyruvat-Decarboxylase) (Isoleucin-, Valin- und Leucin-Biosynthese, *B. fungorum*)

- *ilvC*: Ketolsäure-Reduktoisomerase (Isoleucin-, Valin-, Leucin- und CoenzymA-Biosynthese, *B. fungorum*)
- pssA: Phosphatidylserin-Synthase (B. fungorum)
- leuA: Isopropylmalat/Homocitrat/Citramalat-Synthase (Leucin-Biosynthese, B. fungorum)

3.3.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

3.3.2.1 Pathogenität

Die Mutanten wurden in fünf unabhängien Einzelversuchen auf ihre Pathogenität auf NGMII untersucht und die Zahl der toten Würmer nach 48 h ermittelt. Während beim H111 Wildtyp zu diesem Zeitpunkt ca. 90 % der Würmer tot waren, waren es bei den Mutanten nur zwischen 20 und 60 %, auf B7 starben keine Würmer (Abb. 3.22). Nach 72 Stunden waren auf H111 sämtliche Würmer tot, es gab keine Nachkommen. Die Platten mit den Mutanten wurden nach fünf Tagen erneut untersucht. Auf den Mutanten A4, A11, B7, D6 und H2 hatten sich die überlebenden Würmer normal vermehrt, auf der Mutante D9 befanden sich einzelne L3 und L4-Stadien, auf der Mutante E5 überwogen ebenfalls die jüngeren Larvenstadien, viele Würmer hatten ein trapezförmig erweitertes Schwanzende. Auf Platten mit der Mutante G11 waren die Larvenstadien L1 bis L4 vorhanden, sie bewegten sich jedoch langsamer. Auf der Mutante G3 befanden sich hauptsächlich L2-Stadien, selten L4. Die Würmer zeigten z. T. wie bei der Mutante E5 ein trapezförmig verformtes Schwanzende. Die Purin-auxotrophen Mutanten D9 und A4 wurden zusätzlich auf NGMII mit Adenosin ausplattiert. Bei der Mutante D9 wurde dadurch die Pathogenität vollständig wiederhergestellt, bei der Mutante A4 starben mehr als doppelt so viele Würmer wie auf dem Agar ohne Adenosin, jedoch erreichte die Zahl der toten Würmer nicht ganz die des Wildtyps (Abb. 3.22).



Abb. 3.22: *C. elegans* auf NGMII mit den im Screening ausgewählten Mutanten. Dargestellt sind Durchschnittswerte aus fünf unabhängigen Einzelversuchen. Ad = Zugabe von Adenosin

3.3.2.2 AHL-Produktion

Die AHL-Produktion wurde mit dem Sensorstamm *P. putida* F117 (pAS-C8) gemessen (Abb. 3.23). Die Stämme wurden in NGMII angezogen und es wurden die Überstände von Übernachtkulturen gemessen, die alle eine OD_{600} von ca. 0,7 hatten. Als Negativ-Kontrolle diente der Stamm H111-R, der praktisch keine AHL produziert. Eine reduzierte AHL-Produktion zeigte der Stamm E5 (*rsuA*, Huber *et al.*, 2002). Die Stämme G3, A4 und D6 erreichten nur eine OD_{600} von 0,2 bzw 0,48 und 0,4. Eine Messung der AHL-Produktion von H111 und A4 bei einer OD_{600} von 0,27 ergab für A4 einen gegenüber dem Wildtyp verringerten Wert (ohne Abb.). Bei D6 hängt die verminderte AHL-Produktion vermutlich mit dem allgemein langsameren und verminderten Wachstum zusammen.



Abb. 3.23: AHL-Produktion der Mutanten. Gemessen wurde die Fluoreszenz des Sensor-Stammes *P. putida* F117 (pAS-C8) nach 3-stündiger Inkubation mit den sterilfiltrierten Kultur-Überständen der Mutanten. Es wurden Dreifachmessungen durchgeführt.

3.3.2.3 Protease-Produktion

Proteasen sind bakterielle Virulenzfaktoren, die an der Gewebepenetration beteiligt sind. Sehr gut untersucht ist die Protease-Produktion von *P. aeruginosa*. Die Elastase LasB, eine Zink-Metalloprotease, baut neben Fibrin und Collagen auch Elastin ab, das ein wichtiger Bestandteil von Blutgefäßen ist und einen Großteil des Lungengewebes ausmacht. Ihre Aktivität ist 10-mal höher als die der ebenfalls von *P. aeruginosa* produzierten alkalischen Protease. Die

Elastase LasA ist eine Serin-Protease, die Strangbrüche im Elastin verursacht und es damit angreifbar macht für andere Proteasen, wie z. B. alkalische Proteasen, LasB oder neutrophile Elastasen (Van Delden und Iglewski, 1998). Die Produktion von LasA und LasB ist in *P. aeruginosa* durch den AHL-Rezeptor LasR reguliert. Eine *P. aeruginosa lasR*-Mutante war sowohl im AKR/J Mausmodell, wie auch in *C. elegans* attenuiert (Mahajan-Miklos *et al.*, 2000), was den Schluss nahelegte, dass die nicht mehr vorhandene Elastase-Aktivität zur Attenuierung beiträgt.

B. cenocepacia H111 zeigte auf Magermilch-Agar proteolytische Aktivität, die jedoch im Vergleich zu *P. aeruginosa* gering war, wie eine Messung mit Azocasein als Substrat ergab (ohne Abb.). Ob H111 eine extrazelluläre Zink-Metalloprotease produziert, ist nicht bekannt, aber wahrscheinlich. Ein Sequenzvergleich mit der dem Stamm H111 sehr ähnlichen Sequenz von *B. cenocepacia* J2315 ergab, dass J2315 ein zu der Zink-Metalloprotease ZmpA von *B. cenocepacia* K56-2 homologes Gen besitzt; die Bedeutung von ZmpA für die Pathogenität verschiedener *B. cenocepacia*-Stämme variierte jedoch stark (Corbett *et al.*, 2003).

Die Bildung von Proteasen ist in *B. cenocepacia* H111 Quorum sensing reguliert. Zu Beginn der Untersuchung der Pathogenität von H111 wurden Protease-negative Transposon-Insertions-Mutanten auf ihre Virulenz im *C. elegans*-Modell getestet. Abbildung 3.5 zeigt Stämme mit Mutationen in Genen des sog. "general secretory pathway" (*gsp*) oder Typ II Sekretionsweg (Pugsley, 1993), über den in *Burkholderia pseudomallei* Protease, Lipase und Phospholipase ausgeschieden werden (DeShazer *et al.*, 1999). Die Mutanten zeigten auf Magermilch-Agar keine Protease-Bildung (Antl, 2000) und verringerte bis gar keine Lipase-aktivität. Die *gsp*-Mutanten waren weder auf NGMII noch auf PGS attenuiert.

Bei den im Screening isolierten Mutanten zeigte sich nach 48-stündiger Inkubation der Magermilchplatten bei den Stämmen A11, G11 und H2 dem Wildtyp vergleichbare Höfe (Abb. 3.24). Die AHL-Produktion dieser Stämme entspricht ebenfalls der des Wildtyps. Die Stämme D6 und E5 bildeten keine Höfe, obwohl sie eine noch relativ hohe AHL-Aktivität aufwiesen Es ist daher zu vermuten, dass die Mutationen einen direkten Einfluss auf die Protease-Bildung haben, der stärkere Auswirkungen hat als die verminderte AHL-Produktion. Die Mutanten A4, D9 und G3 bilden gegenüber dem Wildtyp verringerte Höfe. Auch bei der

Mutante B7 ist die Hofbildung etwas verringert, jedoch noch stärker vorhanden als bei den zuvor genannten Mutanten.



Abb. 3.25: Protease-Aktivität auf Magermilch-Agar. Es wurden jeweils 5 μ l LB-Kultur mit einer OD₆₀₀ von ca. 1 aufgetropft. Die Platte wurde 48 h bei 37 °C inkubiert. Die Größe der Höfe zeigt eine im Vergleich zu H111 gleiche, verringerte oder nicht vorhandene Protease-Aktivität.

3.3.2.4 Siderophor-Produktion

Unter Eisenmangel-Bedingungen produzieren die meisten aerob und fakultativ anaerob wachsenden Bakterien Eisen-Chelatoren (Siderophore), um schwerlösliches Fe^{3+} zu komplexieren. In einem eukaryotischen Wirt (z. B. dem Menschen) müssen pathogene Bakterien mit Eisenbinde-Proteinen des Wirts um das in sehr geringer Konzentration vorhandene freie Eisen (10⁻¹⁸ M im Serum) konkurrieren. Von Bakterien des Bcc. ist bekannt, dass sie bis zu vier verschiedene Siderophore produzieren: Salicylsäure, Pyochelin, Cepabactin und Ornibactine (Wang *et al.*, 1984; Sokol, 1986; Meyer *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1995). Für mindestens einen *B. cenocepacia*-Stamm ist die Bildung von Ornibactinen, Salicylsäure und Pyochelin nachgewiesen, bei klinischen Isolaten des Bcc. wurden am häufigsten Ornibactine und Salicylsäure gefunden (Darling *et al.*, 1998). Siderophore gelten als wichtige bakterielle Virulenz-

faktoren. So löste z. B. das von *P. aeruginosa* produzierte Phenazinpigment Pyocyanin in vitro in Verbindung mit der Bildung von reaktivem Sauerstoff und der Verringerung des intrazellulären cAMP-Levels eine beschleunigte Apoptose von Neutrophilen aus (Usher *et al.*, 2002). Das ebenfalls von *P. aeruginosa* produzierte Pyochelin katalysiert als Ferripyochelin die Bildung von Hydroxylradikalen aus H₂O₂ und Superoxid (Britigan *et al.*, 1992). Im *C. elegans* fast-killing Modell und im Mausmodell (AKR/J) waren *P. aeruginosa* Mutanten mit gestörter Phenanzinsynthese weniger virulent (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; 2000).

Die Siderophor-Produktion der im *C. elegans* Test weniger pathogenen Mutanten wurde zunächst auf CAS-Agar überprüft. Als Positivkontrolle diente H111, als Negativkontrolle wurden die beiden Quorum sensing Mutanten H111-I und H111-R verwendet (Abb. 3.25). Bis auf die Mutante G3 (*lon*) zeigten alle Stämme gegenüber H111 eine veränderte Siderophor-Produktion. Die Gelbfärbung der Höfe bei H111-I und A11 (*aroK*) kann durch eine Ansäuerung des Mediums verursacht werden (Hartmann, persönliche Mitteilung). Im Fall von A11 wurde die Ansäuerung des Mediums durch den Indikator Kongo-Rot bestätigt (s. 3.29).

Salicylsäure ist als einziges Siderophor auf CAS-Agar nicht sichtbar. Da die Biosynthese der verschiedenen Siderophore in *B. cenocepacia* nur teilweise bekannt ist und ein unmittelbarer Zusammenhang von Mutation und Siderophor-Produktion nicht bei allen Mutanten erkennbar war, wurden verschiedene Möglichkeiten der Komplementation untersucht. Die Mutanten A4 (*purD*) und D9 (*purF*) konnten teilweise (A4) bzw. vollständig durch Zugabe von Adenosin komplementiert werden, H2 (*ilvC*) wurde mit Valin und Isoleucin komplementiert (Abb. 3.26). Da Cystein ein wichtiger Bestandteil bei der Biosynthese von Pyochelin ist, wurde der Effekt von Cystein auf die Siderophor-Produktion der verschiedenen Mutanten ebenfalls getestet (Abb. 3.26 und 3.27). Nur bei G11 (*cysB2*) konnte die Siderophor-Produktion mit Cystein komplementiert werden, H2 bildete einen gegenüber H111 verkleinerten Hof, A4 hatte eine veränderte Koloniefärbung. Auf die Mutanten D9 und A11 hatte Cystein keinen Einfluss (ohne Abb.). Jedoch konnte A11 mit Cystein und Salicylsäure vollständig komplementiert werden (Abb. 3.26). Färbung und Größe des Hofs von A11 entsprachen in diesem Fall genau der von H111. Auf B7 hatte weder die Zugabe von Adenosin noch von Cystein oder Cystein und Salicylsäure einen Einfluss (ohne Abbildung).

Ergebnisse



Abb. 3.25: Siderophor-Produktion der *B. cenocepacia* H111-Mutanten auf CAS-Agar. Es wurden jeweils 5 μ l einer LB-Kultur mit einer OD₆₀₀ von ca. 1 aufgetropft und die Platte wurde 48 h bei 37 °C inkubiert.



Abb. 3.26: Komplementation der Mutanten auf CAS-Agar. Obere Reihe: Die Mutanten A4 (*purD*), D9 (*purF*), H2 (*ilvC*) und A11 (*aroK*) auf CAS-Agar ohne Zusätze, untere Reihe: CAS-Agar mit verschiedenen Zusätzen: für A4 und D9 mit Adenosin; für H2 mit Isoleucin (ile) und Valin (val) und für A11 mit Cystein (cys) und Salicylsäure (SA). Wie zuvor wurden 5 μ l einer LB-Kultur mit einer OD₆₀₀ von ca. 1 auf die Platte gebracht und diese 48 h bei 37 °C inkubiert.

Ergebnisse



Abb. 3.27: Komplementation der Mutanten A4, D9, G11 und H2 mit Cystein. Obere Reihe: die Mutanten auf CAS-Agar ohne Zusätze, untere Reihe: die Mutanten auf CAS-Agar mit Cystein. Bakterienmenge und Inkubation wie zuvor.

Zur genaueren Charakterisierung der gebildeten Siderophore und des Effekts der Komplementation wurden einige Mutanten in NGMII angezogen, die Überstände mit Dichlormethan extrahiert und die Extrakte durch Dünnschichtchromatografie aufgetrennt (Abb. 3.28 a-f). Die Siderophore Pyochelin und Salicylsäure können anhand ihrer Färbung unter UV-Licht und ihrer Rf-Werte identifiziert werden (s. 2.9.5). Pyochelin leuchtet unter UV-Licht gelbgrün, Salicylsäure bläulich. Pyochelin kommt in Form zweier Stereoisomere, Pyochelin I und II, vor.

H111 produzierte die Siderophore Pyochelin I und II sowie Salicylsäure. Oberhalb der Salicylsäure waren drei Banden erkennbar, die nicht identifiziert werden konnten (Abb. 3.28 e, f), B7 zeigte oberhalb der Salicylsäure zwei Banden (3.28 b, d). Verschiedene Fakten deuten darauf hin, dass es sich bei diesen Banden um Ornibactine handeln könnte (Darling *et al.*, 1998). B7 erzeugte auf CAS einen orange-farbenen Hof, obwohl in der DC keine Pyocheline nachgewiesen wurden. Salicylsäure ist auf CAS nicht sichtbar und das vierte von Stämmen des Bcc. produzierte Siderophor, Cepabactin, konnte bei einem Vergleich mit dem Cepabactin-positiven Gv I Typ-Stamm *B. cepacia* ATCC25416 in H111 nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.28 e, f). Die DC des Extrakts von ATCC25416 zeigte unter UV-Licht zwischen Salicylat und Pyochelin eine dunkle, vermutlich aufgrund einer zu großen Extrakt-Menge, verschmierte Bande, die ungefähr auf der für Cepabactin angegebenen Höhe lief und sich beim Besprühen mit einer FeCl₃-Lösung bräunlich verfärbte (ohne Abb.). Bei H111 war diese Bande auch nach dem Besprühen mit FeCl₃ nicht erkennbar. G11 bildete auf CAS einen verkleinerten Hof, der bei Zugabe von Cystein genauso groß war wie der des Wildtyps. Die DC zeigte entsprechend eine verstärkte Pyochelin-Produktion bei Zugabe von Cystein ins Wachstumsmedium (Abb. 3.28 e, f). Auch ohne Cystein war die Pyochelin-Produktion jedoch stärker als bei H111-R (3.28 a-d), der auf CAS ebenfalls einen verkleinerten Hof bildete. Auffällig war außerdem die von G11 produzierte große Menge an Salicylsäure, die bei Cysteinzugabe geringer wurde. Von den beiden Quorum sensing Mutanten H111-I und H111-R produzierte nur H111-R eine geringe Menge Pyochelin II, was mit dem verkleinerten Hof auf dem CAS-Agar übereinstimmt (Abb. 3.25). H111-I produzierte keine Siderophore und erzeugte auf CAS einen schmalen gelben Hof. Die Mutante A11 produzierte ebenfalls keine Siderophore, verursachte aber eine Ansäuerung des Mediums.

Für die Purin-auxotrophe Mutante D9 war die DC nicht eindeutig. Die zweite Extraktion zeigte eine H111 vergleichbare Produktion von Pyochelin I und eine geringe Menge Salicylsäure, während die erste Extraktion nur eine verringerte SA-Produktion zeigte (Abb. 3.28 a-d). Auf CAS-Agar war eine geringe Hofbildung sichtbar, jedoch nicht in der von H111 verursachten Färbung (Abb. 3.25). Durch Zugabe von Adenosin wurde die Salicylsäureproduktion verstärkt, bei der zweiten Extraktion war kein Pyochelin sichtbar, während bei der ersten schwache Banden in der Höhe von Pyochelin I und II zu sehen waren. Dies stimmt mit der dem Wildtyp entsprechenden Hofbildung auf CAS bei Zugabe von Adenosin überein. A4, die zweite Purin-auxotrophe Mutante, bildete auf CAS-Agar keinen Hof (Abb. 3.25) und einen sehr kleinen violett-farbenen Hof bei Zugabe von Adenosin (Abb. 3.26). Die DC zeigte, dass, wie bei D9, die Salicylsäureproduktion durch Adenosin verstärkt wurde. Nur sehr schwach vorhanden waren die beiden Banden für Pyochelin I und II (Abb. 3.28, a-d).

Ergebnisse



Ergebnisse



Abb. 3.28: Dünnschicht-Chromatografie der extrahierten Siderophore unter UV-Licht: a, b und e ohne Filter, c, d und f mit Gelbfilter. 25416 = ATCC25416, * = Zugabe von Cystein (G11) oder Adenosin (A4, D9) ins Wachstumsmedium, D9 wurde zweimal angezogen und extrahiert, D9-1 = erste Extraktion, D9-2 = zweite Extraktion, SA = Salicylat, P1 = Pyochelin I, P2 = Pyochelin II

3.3.2.5 Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS)

Im Gegensatz zu Kapsel-Polysacchariden sind EPS nicht kovalent an die Zelloberfläche gebunden. Von Bakterien des Bcc. produzierte EPS-Bestandteile sind z. B. Levan und ein acetyliertes saures Polysaccharid mit einem verzweigten Heptasaccharid ("Cepacian"), das offenbar charakteristisch für Stämme des Bcc. ist (Richau *et al.*, 2000; Sist *et al.*, 2003). Kürz-lich wurde in *B. cepacia* IST408 ein 16,2 kb großes Gencluster für die EPS-Biosynthese ("*bce* locus") durch Sequenzierung EPS-negativer Mutanten und Vergleich mit *B. cenocepacia* J2315 charakterisiert. Es enthält Gene für die Biosynthese von Zucker-Nukleotiden, Glycosyltransferasen und Gene für Polymerisierung und Export (Moreira *et al.*, 2003). Die Fähigkeit, EPS zu produzieren, scheint zumindest bei klinischen Bcc. Isolaten in der Mehrheit vorhanden zu sein. In einer portugisischen CF-Klinik produzierten z. B. 80 % der Patienten-Isolate EPS

(Richau *et al.*, 2000). Ähnlich dem Alginat von *P. aeruginosa* wird die Produktion von EPS als ein Faktor betrachtet, der das Festsetzen von *Burkholderia* in der Lunge verstärkt (Chung *et al.*, 2003). Allgemein wird die Bildung extrazellulärer polymerer Substanzen als ein Weg betrachtet, wie sich Bakterien vor Umwelteinflüssen oder in einem eukaryotischen Wirt vor Angriffen des Immunsystems schützen können.

Die Produktion von EPS der attenuierten Mutanten wurde auf Mannit-Agar (YEM) mit Kongo-Rot getestet, als Positivkontrolle diente H111, als Negativkontrolle *P. aeruginosa* PA14 (Abb. 3.29). Die Mutanten B7, G11 (*cysB2*), G3 (*lon*) und E5 (*rsuA*) waren positiv und hatten nach 48-stündiger Inkubation eine extrem schleimige Oberfläche. A4 (*purD*) und A11 (*aroK*) waren negativ und verursachten eine Ansäuerung des Mediums. Durch den Umschlag des Indikators Kongo-Rot nach blauviolett wurde die rote Koloniefärbung, die fehlende EPS-Produktion anzeigen sollte, überdeckt. Die EPS-Produktion von D9 (*purF*) und H2 (*ilvC*) war vermindert, beide Stämme verursachten einen Farbumschlag des Indikators.



Abb. 3.29: EPS-Produktion auf YEM mit Kongo-Rot. EPS-positive Stämme (H111, G11, B7) sind deutlich schleimig, die blauviolette Färbung der Stämme A11, H2, A4 und D9 deutet auf eine Ansäuerung des Mediums hin.

3.3.2.6 Expression von aidA

Das Gen *aidA* ("autoinducer dependent") wurde zuerst in *R. solanacearum* entdeckt, wo es durch das LuxR-Homolog SolR reguliert wird (Flavier *et al.*, 1997). Das Gen hatte keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Genen und dem Protein konnte keine Funktion zugeordnet werden. Bei einer Untersuchung Quorum sensing regulierter Gene in *B. cenocepacia* H111 wurde ein Protein gefunden, das zu 53 % identisch mit AidA von *R. solanacearum* war

(Riedel *et al.*, 2003). Eine H111 *aidA*-Mutante (H111-A) produzierte dem Wildtyp vergleichbare Mengen an AHL sowie an AHL-regulierten Exoprodukten und zeigte AHL-regulierte phänotypische Eigenschaften wie Biofilm-Bildung und Schwärmen (Huber pers. Mitteilung). In slow killing Versuchen mit *C. elegans* war H111-A deutlich attenuiert (24 % tote Würmer nach 48 h; Feldmann, 2004). Da AidA offenbar eine wichtige Rolle bei der Virulenz in *C. elegans* spielt, wurden die attenuierten Mutanten auf die Expression von AidA getestet. Sämtliche Mutanten zeigten eine gleichstarke Expression wie der Wildtyp, nur die im Wurmversuch sehr gut attenuierte Mutante B7 zeigte einen Ausfall von AidA. Die regulatorische Mutante E5 (*rsuA*) zeigte eine verringerte Expression (Abb. 3.30).



Abb. 3.30: Expression von *aidA*. M = Marker, E5 = *rsuA*, wt = H111 Wildtyp

Ergebnisse

Stamm	Genotyp	Vermehrung der Würmer	% tote Würmer nach 48 h	AHL- Produktion	Protease- Aktivität	Siderophor -Bildung	EPS- Produktion	Expression von <i>aidA</i>	Wachstum auf: LB/PIA ABC ABG		uf: ABG
H111	wt	-	89 (+/-4)	+	+	+	+	+	+/+	+	+
A4	$\Delta purD$	+	24 (+/-4)	<1	<	-	-	+	~/+	<	-
A11	$\Delta aroK$	+	25 (+/- 4)	+	+	-	-	+	+/+	-	-
B7	unbekannt	+	0	+	<	<	+	-	+/+	+	+
D6	$\Delta pyrD$	+	23 (+/-7)	<1	-	-	-	+	~/~	-	-
D9	$\Delta purF$	<	44 (+-/10)	+	<1	<	<	+	+/+	-	-
E5	$\Delta rsuA$	+	29 (+/-9)	<	-	-	+	<	+/+	+	+
G1	$\Delta cepR$	+	7 (+/-5)	-	-	<	+	-	+/+	n.g.	n.g.
G3	Δlon	<	46 (+/-10)	<1	-	+	+	+	+/+	+	+
G11	$\Delta cysB2$	+	62 (+/-8)	+	+	<	+	+	+/+	+	+
H2	$\Delta i l v C$	+	21 (+/-9)	+	+	-	<	+	+/+	-	-

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der phänotypischen Merkmale der attenuierten Mutanten

¹ verringerte Produktion aufgrund von verlangsamtem Wachstum n.g. = nicht getestet

4. Diskussion

4.1 *C. elegans* als Pathogenitäts-Modell für *B. cenocepacia* H111

C. elegans hat sich als geeignetes Pathogenitäts-Modell für *B. cenocepacia* H111 erwiesen. Die Bakterien waren in der Lage, intakt in den Wurmdarm zu gelangen und dort eine Infektion auszulösen (Abb. 3.2, 3.7, 3.8). Dies ist nicht selbstverständlich, wenn man bedenkt, dass *C. elegans* sich von Mikroorganismen ernährt und neben einem schnell arbeitenden Verdauungsapparat auch antibakterielle Abwehrmechanismen besitzt. So dienen die Zähne zwar dem Aufbrechen von Bakterien, jedoch kann diese Aufgabe auch vom Darm allein übernommen werden, wie *C. elegans phm*-2 Mutanten zeigen, die trotz einer Funktionsstörung in der Pharynxmuskulatur auf *E. coli* normal leben und sich vermehren (Avery, 1993). Der Darm enthält neben Lysosomen sowie Asparat- und Cystein-Proteasen z. B. auch Lektine, Saposinähnliche Proteine und Peptide mit antibakterieller Aktivität und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr (Ewbank, 2002). Ein Bakterium, das *C. elegans* infiziert, muss also zunächst Lyse und Verdauung entkommen, bevor es sich festsetzen und den Wirt kolonisieren kann.

Die Fähigkeit, Infektionen in *C. elegans* auszulösen, wurde auch bei anderen Gram-negativen und Gram-positiven opportunistisch pathogenen Bakterien beobachtet, neben *P. aeruginosa* PA14 (Tan *et al.*, 1999a) z. B. auch bei *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens* und *B. pseudomallei* (Sifri *et al.*, 2003; 2002; Kurz *et al.*, 2003; 2000; O'Quinn *et al.*, 2001). *B. cenocepacia* H111 setzte sich im Wurmdarm fest und konnte sich dort vermehren, ein Verhalten, das bei *P. aeruginosa* PA14 sowie bei *E. faecalis* und *S. enterica* beobachtet wurde (Tan *et al.*, 1999a; Sifri *et al.*, 2002; Aballay *et al.*, 2000). Der Stamm *P. aeruginosa* PAO1 wurde bei Parallelfütterung mit H111 nur in sehr geringer Zahl im Darm nachgewiesen (diese Arbeit, ohne Abb.). Die Infektion durch H111 tötete *C. elegans* innerhalb von 2, maximal 3 Tagen (Abb. 3.5) und damit ähnlich schnell wie eine Infektion mit *P. aeruginosa* PA14. Eine Vermehrung der Würmer fand nicht statt. Im Falle eines anderen Gv III-Stammes, *B. cenocepacia* K56-2, war *C. elegans* noch in der Lage, sich zu vermehren und starb erst nach ca. 3 Tagen (Cardona, pers. Mitteilung).

4.2 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Pathogenität von H111 im *C. elegans*-Modell

4.2.1 Quorum sensing reguliert die Pathogenität von H111

Die beiden *B. cenocepacia* H111 Quorum sensing Mutanten H111-I und H111-R erwiesen sich im *C. elegans* Modell als weniger infektiös, H111-I war zusätzlich auf PGS-Agar attenuiert (Abb. 3.6). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den unter 4.2.2 erwähnten Versuchen mit *P. aeruginosa* PA14 und *E. faecalis* sowie Versuchen mit *S. aureus* (Sifri *et al.*, 2003). Für *P. aeruginosa* wurde bereits in verschiedenen Modellen die Notwendigkeit des Quorum sensing Systems für die volle Pathogenität nachgewiesen (s. 1.3.2), ebenso für *B. cenocepacia* (Sokol *et al.*, 2003). Einen ähnlichen Effekt wie die direkte Mutation der Quorum sensing Gene hatte die Zugabe von QS Hemmstoffen ins Medium. Sowohl *P. aeruginosa* PAO1 als auch *B. cenocepacia* H111 waren unter dem Einfluss der Hemmstoffe in *C. elegans* attenuiert (Abb. 3.18-3.20).

Die *cep1* Mutante H111-I war nicht mehr in der Lage, den Grinder zu passieren (Abb. 3.10). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu einer *E. faecalis* Quorum-sensing Mutante, die ebenso im Darm von *C. elegans* nachgewiesen wurde wie der Wildtyp, jedoch weniger virulent war (Sifri *et al.*, 2002). In Versuchen mit *C. elegans phm-2* wurde nachgewiesen, dass die Attenuierung von H111-I nicht auf der mangelnden Fähigkeit beruht, in den Darm zu gelangen. *phm-2*-Würmer, deren Darm vollständig mit H111-I gefüllt war, zeigten dieselbe Beweglichkeit wie Wildtyp-Würmer, überlebten deutlich länger als bei einer Kolonisierung mit H111 und waren in der Lage, sich zu vermehren (s. 3.2.5). Ein Teil der Würmer starb dennoch, was zeigt, dass das *cep* Quorum sensing System zwar einen großen Teil der Pathogenität von H111 reguliert, jedoch nicht ausschließlich dafür verantwortlich ist.

Ein weiterer Faktor im Zusammenhang mit bakterieller Pathogenität ist die Fähigkeit, sich im Wirt festzusetzen. Diese Fähigkeit ist bei opportunistisch pathogenen Bakterien unterschiedlich ausgeprägt. Für *S. aureus* wurde z. B. eine geringe Persistenz im *C. elegans* Modell nachgewiesen. Nachdem die Würmer 24 h auf einem GFP-markierten Stamm gehalten worden waren, konnte 2 h nach dem Übersetzen auf einen nicht-markierten Stamm keine Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden (Sifri *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu war H111 noch 6 h nach dem Übersetzen auf *E. coli* OP50 in hoher Dichte im Darm sichtbar, ebenso die QS-Mutante H111-I, die sogar noch nach 24 h nachweisbar war (Abb. 3.15). Dabei lagen die Bakterien vor allem im Enddarm in hoher Dichte vor, da sie dort nicht wie im Mitteldarm den Verdauungsenzymen ausgesetzt waren und in der Cuticula offenbar mögliche Anheftungspunkte vorliegen. Eine ähnliche Persistenz wie H111 zeigte das Gram-positive Bakterium *E. faecalis*, für das zusätzlich eine kontinuierliche und deutliche Vermehrung in *C. elegans* nachgewiesen wurde (Garsin *et al.*, 2001). Die Fähigkeit von H111, sich in *C. elegans* festzusetzen, scheint durch den Verlust des Quorum sensing Systems nicht entscheidend beeinträchtigt zu sein (s. dazu auch 4.2.4) wohl aber dessen Virulenz.

Umgekehrt ist H111 offenbar weniger virulent, wenn gewisse Angriffspunkte im Wirt fehlen, wie Versuche mit *C. elegans srf*-Mutanten, die eine veränderte Oberflächen-Antigenstruktur aufweisen (Hodgkin *et al.*, 2000), gezeigt hatten (Abb. 3.16, 3.17). Die Mutante *srf*-3 (*e2689*) war zwar gegen H111 nicht völlig resistent wie im Fall von *M. nematophilum* (Hodgkin *et al.*, 2000), überlebte jedoch länger auf NGMII mit H111 als der Wildtyp-Wurm und vermehrte sich sogar geringfügig. Während die Infektion mit *M. nematophilum* jedoch auch bei Wildtyp-Würmern nicht zum Tode führt, ist eine Infektion mit H111 tödlich. Die Versuche mit den *srf*-Mutanten deuten darauf hin, dass bei der Erkennung bestimmter Regionen und/oder der Festsetzung von *B. cenocepacia* und *M. nematophilum* in *C. elegans* möglicherweise ähnliche Mechanismen vorliegen, jedoch bei *B. cenocepacia* H111 zusätzlich Virulenz-Faktoren wirkten, die auch bei der Mehrheit der *e2689*-Mutanten zum Tode führten.

4.2.2 Proteasen sind als Virulenzfaktoren in C. elegans zu vernachlässigen

Im *C. elegans* Modell waren die Protease-negativen *gsp*-Mutanten des Stammes H111 ebenso pathogen wie der Wildtyp (Abb. 3.5), ein Ergebnis, das sich mit den Versuchen von O'Quinn *et al.* (2001) deckt, in denen eine *B. pseudomallei gspD*-Mutante in *C. elegans* ebenfalls nicht attenuiert war. Auch im Fall von *Serratia marcescens* zeigten Protease-negative Mutanten keine veränderte Pathogenität im *C. elegans*-Modell (Kurz *et al.*, 2003). In Auswahlverfahren mit *P. aeruginosa* PA14- und *B. pseudomallei*-Mutantenbanken wurden ebenfalls keine Protease-negativen Stämme identifiziert (Tan *et al.*, 1999b; Gan *et al.*, 2002), was jedoch auch damit erklärt werden könnte, dass die Untersuchungen in beiden Fällen nicht das gesamte Genom der jeweiligen Stämme abgedeckt hatten. Ausgangsbasis für die Pathogenitätstests in

C. elegans mit Protease-negativen Mutanten war die Tatsache, dass eine Elastase-negative *P. aeruginosa lasR* Quorum sensing Mutante sowohl in der Maus wie auch in *C. elegans* attenuiert war. Jedoch zeigte sich auch in *P. aeruginosa*, dass für die Attenuierung im Wurm-modell nicht allein die mangelnde Protease-Produktion verantwortlich sein konnte (s. o.).

In *Enterococcus faecalis* ist die Expression von extrazellulärer Gelatinase (GelE) und Serin-Protease (SprE) durch das *fsr* Quorum sensing System reguliert. Während eine *fsrB*-Mutante in *C. elegans* deutlich attenuiert war, waren eine *sprE* und eine *gelE*-Mutante nur geringgradig (ca. 10 % mehr überlebende Würmer bei den Mutanten als beim Wildtyp) attenuiert (Sifri *et al.*, 2002). Im Mausmodell dagegen war die *gelE*-Mutante deutlich attenuiert (Singh *et al.*, 1998). Ebenfalls deutlich attenuiert in *C. elegans* war eine *S. aureus sspA*-Mutante, die keine V8 Serin-Protease mehr bildete (Sifri *et al.*, 2003). Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Virulenz von Proteasen können vielfältige Ursachen haben. Zum einen wurden von den untersuchten Bakterien verschiedene Arten von Proteasen produziert, zum anderen können erhebliche Unterschiede in ihrer Aktivität vorliegen. So ist z. B. die proteolytische Aktivität der LasB-Elastase von *P. aeruginosa* 10-mal höher als die der alkalischen Protease des selben Bakteriums. Eine große Rolle spielen sicherlich auch unterschiedliche Spezifitäten der Proteasen in den verschiedenen in vivo Modellen.

Die Elastasen von *P. aeruginosa* gehören zur Gruppe der Zink-Metalloproteasen, die Elastin, Fibrin und Collagen abbauen. Der *B. cenocepacia* Gv III-Stamm K56-2 produziert eine Zink-Metalloprotease (ZmpA), die ihrer Struktur nach über das *gsp*-System sekretiert wird. Eine entsprechende Mutante war aufgrund geringerer Persistenz weniger virulent in der Ratte (Corbett *et al.*, 2003), dagegen wurden vom Gv III-Stamm Pc715j und der zugehörigen *zmpA*-Mutante gleiche CFU in der Ratte nachgewiesen. Auch bei der Gelatinase von *E. faecalis* handelt es sich um eine Zink-Metalloprotease. *B. pseudomallei* produziert ebenfalls eine Zink-Metalloprotease (Corbett *et al.*, 2003), deren Ausfall jedoch offenbar in *C. elegans* nicht zur Attenuierung der Virulenz beiträgt (O'Quinn *et al.*, 2001).

Offenbar entfalten Zink-Metalloproteasen in Säugern eine stärkere Wirkung als in *C. elegans*, was sich vielleicht zum Teil mit der stärkeren Spezialisierung der Gewebe (Lungengewebe besteht hauptsächlich aus Elastin) erklären lässt. In einem Alfalfa-Modell war die K56-2

zmpA-Mutante z. B. genauso virulent wie der Wildtyp-Stamm (Bernier *et al.*, 2003). Pharynx und Darm von *C. elegans* sind mit Basalmembranen bedeckt, die Kollagen-haltig (Graham *et al.*, 1997) und damit ebenfalls ein potentielles Ziel von Elastasen sind. Sie scheinen jedoch nicht in so starkem Maß angegriffen zu werden, wie dies beim Lungengewebe der Fall ist. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Protease-Aktivität für die Pathogenität im *C. elegans*-Modell keine Rolle spielt.

4.2.3 Siderophore sind in *C. elegans* wirksam

Da Siderophore auch in *C. elegans* als Virulenzfaktor eine Rolle spielen (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999), wurde die Siderophor-Produktion aller im *C. elegans* Versuch attenuierten Mutanten untersucht. Fast alle im *C. elegans*-Screening identifzierten Mutanten produzierten weniger oder keine Siderophore (Abb. 3.25). Zusätzlich wurde die Siderophor-Produktion der beiden QS-Mutanten H111-I und H111-R untersucht. H111-I produzierte keine Siderophore mehr und war sowohl auf NGMII als auch auf PGS attenuiert, bei H111-R war die Siderophor-Produktion nur verringert, der Stamm war auf NGMII, nicht aber auf PGS attenuiert (Abb. 3.6). Die ebenfalls auf PGS getesteten und dort nicht attenuierten *gsp*-Mutanten zeigten auf CAS-Agar eine H111 entsprechende Siderophor-Produktion (Antl, 2000; diese Arbeit, ohne Abb.).

Versuche mit *P. aeruginosa* PA14 hatten gezeigt, dass Mutanten mit verringerter Pyocyanin-Produktion im *C. elegans*-Modell auf PGS-Agar attenuiert waren. Eine Mutante mit verringerter Pyocyanin-Produktion war zuvor im Arabidopsis-Modell identifiziert worden, und auch im AKR/J-Mausmodell waren PA14-Mutanten mit verringerter Phenazinsynthese weniger virulent (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; 2000).

Die virulente Wirkung von Siderophoren beruht auf der Besonderheit, dass von ihnen gebundenes Eisen noch immer als Katalysator bei der Bildung gewebsschädigender Radikale wirken kann. In der Lunge von Wirbeltieren müssen Bakterien mit wirtseigenen Eisen-Transport- und Speicherproteinen, wie z. B. Ferritin, um das Eisen konkurrieren (Turi *et al.*, 2004) und produzieren zu diesem Zweck Siderophore. In vielen klinischen Isolaten des Bcc. wurde die Produktion von Pyochelin nachgewiesen (Sokol, 1986). Sowohl für das von *P. aeruginosa* produzierte Phenazinpigment Pyocyanin wie auch für Pyochelin ist die Bildung von reaktivem
Sauerstoff (Usher *et al.*, 2002) bzw. Hydroxylradikalen nachgewiesen (Britigan *et al.*, 1992). Bolm *et al.* (2004) zeigten in einer Studie, dass *C. elegans* unter Einwirkung von H_2O_2 als einzigem Toxin stirbt. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass *C. elegans* Dauerstadien, die resistent gegenüber oxidativem Stress sind, auch resistent gegenüber PA14 im fast killing Versuch waren (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999). Versuche mit den *C. elegans* Mutanten *mev-*1 und *age-*1 bestätigten den Einfluss von oxidativem Stress auf PGS. Die gegenüber oxidativem Stress empfindlicheren *mev-*1-Mutanten starben auf PGS mit H111 schneller als Wildtyp-Würmer, während die unempfindlicheren *age-*1-Würmer länger als der Wildtyp überlebten (Ebrecht, pers. Mitteilung).

Insgesamt hat sich bestätigt, dass auch im Stamm H111 Siderophore einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Gesamt-Virulenz haben. Nicht nachgewiesen werden konnte eine dem Stamm *B. cenocepacia* K56-2 entsprechende negative Regulation von Ornibactinen durch CepR (Lewenza und Sokol, 2001). Auf CAS-Agar zeigte H111-R insgesamt eine verminderte Siderophor-Aktivität (Abb. 3.25), die durch das Ergebnis der Dünnschichtchromatografie bestätigt wurde (Abb. 3.28 b, d). Pyochelin I war unter UV-Licht nicht mehr sichtbar und die Menge an Pyochelin II war im Vergleich zu H111 stark reduziert. Eine Ornibactin-Produktion konnte, möglicherweise aufgrund einer zu geringen Menge, nicht nachgewiesen werden.

4.2.4 EPS – die Mitläufer unter den Virulenzfaktoren

Aus den durchgeführten Versuchen ergab sich kein einheitliches Bild bezüglich der Rolle von EPS bei der Virulenz von H111. Dass die EPS-Produktion allein keinen Anteil an der Gesamtvirulenz von H111 hatte, zeigte am eindeutigsten die Mutante B7. Sie war stärker attenuiert als die beiden QS-Mutanten, obwohl sie genauso viel EPS wie der Wildtyp produzierte (Abb. 3.29). Dieses Ergebnis wird durch Versuche mit einer *P. aeruginosa* PA14 *algD*-Mutante bestätigt. Die Mutante produzierte kein Alginat mehr und war weder in *C. elegans*, noch in Pflanzen oder Mäusen attenuiert (Yorgey *et al.*, 2001). Auf den Mutanten A11, E5 und H2 starb ein ähnlicher Prozentsatz Würmer (Abb. 3.22), A11 produzierte jedoch keine EPS, die EPS-Produktion von E5 entsprach der des Wildtyps und die von H2 war verringert (Abb. 3.29). Die QS-Mutante H111-I produzierte auf Mannit-Agar gleiche Mengen an EPS wie der Wildtyp. Sie war in *C. elegans* auch nach längerer anschließender Inkubation auf *E. coli* noch nachweisbar. Da EPS des Bcc. ebenso wie Alginat von *P. aeruginosa* mit der Persistenz der Bakterien in der Lunge Zusammenhang gebracht wird (Pier *et al.*, 1984; Chung *et al.*, 2003), wäre eine weitere Untersuchung dieser Funktion im Wurmmodell interessant. Grundsätzlich kann jedoch keine Angabe darüber gemacht werden, ob und wenn ja in welchem Maß eine EPS-Produktion im Wurmdarm vorliegt, da hierfür spezielle Bedingungen wie ein niedriger Stickstoffgehalt und hohe Kohlenstoff-Verfügbarkeit notwendig sind.

4.3 Die Pathogenität der einzelnen Mutanten

4.3.1 Die Mutante B7 - eine neue Pathogenitäts-Insel in *B. cenocepacia*?

Die Mutante B7 war mit 0 % toten Würmern im Pathogenitätstest am besten attenuiert. Die Würmer zeigten keine Anzeichen einer Infektion und vermehrten sich normal. Da B7 gleiche Mengen an AHL wie der Wildtyp produzierte, konnte eine Attenuierung aufgrund des Ausfalls von cepI und cepR ausgeschlossen werden (Abb. 3.23). Hinweise auf die mögliche Funktion des oder der durch die Mutation ausgefallenen Gene lieferten die phänotypischen Tests. Zwar produzierte B7 die gleiche Menge AHL wie H111, jedoch zeigten sich auf Magermilch- und CAS-Agar leicht verringerte Aktivitäten der QS regulierten Exoprodukte Protease und Siderophore (Abb. 3.24, 3.25). In der DC konnte kein Pyochelin, aber eine normale Salicylsäureproduktion nachgewiesen werden (Abb. 3.29 d, f). Interessant war der komplette Ausfall der Expression des ebenfalls durch Quorum sensing regulierten Gens aidA (Abb. 3.30). Da eine *aidA*-Mutante (H111-A) im Wurmversuch mit nur 24 % toten Würmern gut attenuiert war (Merkl, 2003), ist anzunehmen, dass ein Teil der Attenuierung von B7 durch den Ausfall von aidA verursacht war. Durch Komplementation in trans war H111-A wieder genauso pathogen wie H111 (Feldmann, 2004). An der Protease- und Siderophor-Produktion ist aidA jedoch nicht beteiligt, H111-A zeigte auf Magermilch- und CAS-Agar gleich große Höfe wie der Wildtyp (Huber, pers. Mitteilung).

Die Mutation von B7 liegt in einem Genomabschnitt, der mit 50-53 % einen sehr viel geringeren GC-Gehalt aufweist, als den für *B. cenocepacia* J2315 angegebenen von ca. 67 %. Aus der Sequenzierung geht nicht hervor, ob durch die Transposon-Insertion ein komplettes Operon oder nur ein einzelnes Gen ausgefallen ist. Zusammen mit den phänotypischen Tests ergibt sich die Vermutung, dass das Transposon in eine Pathogenitäts-Insel insertiert ist, die neben anderen, unbekannten Faktoren, auch die Expression von *aidA* reguliert. Der GC-Gehalt von *aidA* weicht mit 58 % (Huber, pers. Mitteilung) ebenfalls von dem Durchschnittswert für J2315 ab. Da die phänotypischen Merkmale nicht mit denen der H111-A Mutante zusammenpassen, ist weiterhin zu vermuten, dass die Mutation ein regulatorisches Gen getroffen hat, das zwar keinen direkten Einfluss auf die Quorum sensing Gene *cepI* und *cepR* hat, aber einen (anteiligen) Einfluss auf QS regulierte Gene.

In verschiedenen *Burkholderia cenocepacia* Stämmen, darunter K56-2 und J2315, wurde kürzlich eine 31,7 kb große Pathogenitäts-Insel mit niedrigem GC-Gehalt identifiziert, die außer dem BCESM (,,<u>Burkholderia cepacia epidemic strain marker</u>") auch Virulenzgene enthält (Baldwin *et al.*, 2004). Auf der als cci (,,*B. cenocepacia* island") bezeichneten Insel befinden sich auch die QS Gene *cciI* und *cciR*. Der bei B7 an das Transposon angrenzende DNS-Abschnitt ist jedoch in der Sequenz von J2315 nicht vorhanden und H111 enthält wahrscheinlich keinen BCESM (Feldmann, pers. Mitteilung). Ebenfalls in J2315, aber auch in anderen Stämmen des Bcc., wurde die Existenz von möglichen Pathogenitäts-Inseln nachgewiesen, die im Gegensatz zu cci ein Gencluster enthalten, das starke Ähnlichkeit mit Kapsel-Genclustern pathogener Bakterien hat (Parsons *et al.*, 2003). Diese Studie zeigte auch die hohe genomische Variabilität zwischen Stämmen innerhalb eines Genomovars.

4.3.2 Purin- und Pyrimidin-Auxotrophie: Die Mutanten A4, D9 und D6

Die Mutanten A4 und D9 sind in den Genen *purD* und *purF* mutiert, deren Produkte im Stoffwechselweg von *R. solanacearum* direkt aufeinander folgen (s. 7.3). Während A4 und D9 auf NGMII-Agar ein H111 vergleichbares Wachstum aufwiesen, war das von D6 (*pyrD*) schwächer, weshalb diese Mutante hier nicht weiter diskutiert wird. In flüssigem NGMII erreichten A4 und D9 nur teilweise dieselbe OD wie der Wildtyp. Zugabe von Adenosin komplementierte den Wachstumsdefekt in D9 vollständig, jedoch nicht in A4. Da *purD* in J2315 möglicherweise am Anfang eines Operons liegt, sind downstream- Effekte nicht auszuschließen. Siderophor-, Protease- und EPS-Produktion waren bei beiden Mutanten beeinträchtigt, bei D9 ließ sich die Siderophor-Produktion durch Zugabe von Adenosin komplementieren (Abb. 3.26). Eine generelle Ursache für den Mangel an Exoprodukten könnte deren späte Expression sein. Die für die mRNS-Synthese verfügbaren Purine sind zu diesem Zeitpunkt möglicherweise aufgebraucht, was zu einer Einstellung der Protein-Synthese führen würde. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse ist jedoch anzunehmen, dass die eigentlichen Ursachen für die Attenuierung nicht so sehr in der verminderten Produktion von

Virulenzfaktoren, sondern eher in der verminderten Überlebensfähigkeit der Bakterien im Wurm zu sehen sind.

Für *Listeria monocytogenes* wurde eine bis zu 100-fach erhöhte Expression der Gene *purH*, *purD* und *pyrE* in Makrophagen-ähnlichen J774-Zellen nachgewiesen. Eine *purD*-Mutante war jedoch trotz des wahrscheinlichen Mangels an Nukleotiden im Cytosol in der Lage, sich in J774-Zellen zu teilen. Das Wachstum der Mutanten wurde in BHI verglichen, wo sich keine Unterschiede zum Wildtyp ergaben (Klarsfeld *et al.*, 1994). Auch A4 und D9 waren in der Lage, in BHI normal zu wachsen. In einer Studie zur Attenuierung von *P. aeruginosa* STM (,,signature-tagged mutagenesis") Mutanten im Ratten-Modell wurden neben Mutanten mit Defekten in bekannten Virulenzgenen auch Mutanten mit Defekten in den Genen *purD*, *purH*, *purL* und *pyrF* isoliert. Auf die Rolle dieser Gene im Zusammenhang mit der Virulenz von *P. aeruginosa* wurde nicht näher eingegangen (Potvin *et al.*, 2003). Für *Salmonella typhimurium* wurde *purD* als essentiell für Überleben und Wachstum in Makrophagen nachgewiesen. (Fields *et al.*, 1986; Bäumler *et al.*, 1994; Buchmeier und Libby, 1997).

4.3.3 Aminosäure-Auxotrophie: die Mutanten H2 und A11

Beide Aminosäure-auxotrophe Mutanten zeigten ähnliche Phänotypen: kein Wachstum auf Minimalmedium, keine Siderophor-Aktivität, aber normale Protease- und AHL-Produktion (Tab. 3.3). EPS wurden von A11 (*aroK*) gar nicht und von H2 (*ilvC*) vermindert produziert (Abb. 3.29). Beide Mutanten exprimierten *aidA* und der Anteil toter Würmer auf NGMII betrug bei beiden um die 20 % (Tab. 3.3). Wie schon zuvor erwähnt, können mangelnde Siderophor- und EPS-Produktion für die relativ gute Attenuierung der Mutanten im Wurm nicht allein verantwortlich sein. Dies zeigt z. B. ein Vergleich mit der Mutante D9 (*purF*), die ebenfalls nur eingeschränkt Siderophore und EPS bildete, aber mit 44 % toten Würmern und nur geringer Vermehrung der Würmer virulenter war, als die beiden Aminosäure-auxotrophen Mutanten.

Bei A11 steht der Ausfall der Shikimat-Kinase (*aroK*) in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Ausfall der Siderophor-Produktion. In *P. aeruginosa* wird Pyochelin aus Salicylat und Cystein gebildet (Quadri, 2000). Salicylat wird wiederum aus Chorismat gebildet (Serino *et al.*, 1995). In *R. solanacearum* ist Shikimat-3-phosphat ein Vorläuferprodukt von Chorismat

und in *P. aeruginosa* wird Shikimat durch die Isochorismat-Synthase PchA in Isochorismat, das Ausgangsprodukt für die Salicylat-Synthese, umgewandelt (Serino *et al.*, 1995). Dementsprechend zeigte die Dünnschicht-Chromatografie weder Pyochelin noch Salicylat (Abb. 3.28 b, d). *aroK* gehört nicht zu den kürzlich identifizierten Genen für die Synthese von Cepacian in *B. cepacia* und *B. cenocepacia* (Moreira *et al.*, 2003), jedoch scheint die Produktion aromatischer Aminosäuren für die EPS-Synthese eine Rolle zu spielen. So wurde in derselben Studie außer Genen des sog. *bce-* (,,<u>B. cepacia complex exopolysaccharide</u>) Genclusters, auch eine EPS-negative *B. cepacia aroC*-Mutante identifiziert. In einem Screening nach EPS-negativen Mutanten von *V. cholerae* wurde u. a. ebenfalls eine *aroK*-Mutante identifiziert. Die Pathogenität dieser *V. cholerae* Mutante wurde nicht untersucht (Rashid *et al.*, 2003).

In *E. coli* reguliert das Zwei-Komponenten-System CpxR-P u. a. die Stressantwort, die Biofilm-Bildung, Virulenz und Invasivität. Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch das *aroK*-Operon von CpxR-P reguliert wird. Über die Bedeutung von *aroK* ist in diesem Zusammenhang jedoch nichts bekannt (De Wulf *et al.*, 2002).

Auch für die Mutante H2 ist der Zusammenhang zwischen der Mutation von *ilvC* (mögl. Ketolsäure-Reduktoisomerase) und der verringerten Pathogenität nicht eindeutig. Einziges Beispiel hierfür in der Literatur ist eine Sinorhizobium meliloti ilvC-Mutante, die sich u. a. aufgrund fehlender Aktivierung der Nodulations-Gene nodABC in Alfalfa-Wurzeln als nichtinfektiös erwiesen hatte. Versuche zeigten auch, dass durch die *ilvC*-Mutation zusätzlich zum Nod-Faktor andere, für eine effektive Nodulation notwendige Moleküle betroffen sein müssen. (Lopez et al., 2001). Für das ilvC-Gen von Hefezellen wird eine Funktion bei der Stabilisierung mitochondrieller DNS diskutiert und für das Enzym eine Funktion als RNS-Bindeprotein (Hentze, 1994; Zelenaya-Troitskaya et al., 1995). Auch der Zusammenhang zwischen der Mutation und der fehlenden Siderophor-Produktion ist unklar. Das Enzym findet sich in den Stoffwechselwegen von R. solanacearum sowohl im Syntheseweg für Valin und Isoleucin wie auch in dem für Panthotenat und CoA. CoA ist an der Pyochelin-Synthese beteiligt (Quadri, 2000). Außer dem Mangel an möglichen Zwischenprodukten auf dem Weg zur Siderophor-Synthese ist es jedoch auch möglich, dass durch den Mangel an Isoleucin und Valin wichtige Enzyme für die Siderophor-Produktion nicht exprimiert werden können. Der Defekt in der Siderophor-Produktion ließ sich durch Zugabe von Valin und Isoleucin vollständig, durch Cystein teilweise komplementieren. Da *ilvC* am Anfang eines möglichen Operons steht, sind auch hier downstream-Effekte nicht auszuschließen. Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass, wie im Fall der Purin-Auxotrophie, eine Aminosäure-Auxotrophie das Überleben von H111 im Wurmdarm beeinträchtigt.

4.3.4 Mutanten mit verminderter AHL-Produktion: E5 und G3

Die Mutanten E5 (*rsuA*) und G3 (*lon*) produzierten ungefähr gleiche Mengen an AHL; verglichen mit dem Wildtyp waren die Werte jedoch um ca. 1/4 niedriger (Abb. 3.23). Während bei G3 die Ursache in einem verlangsamten Wachstum gesehen werden kann, handelte es sich bei E5 eindeutig um einen spezifischen Quorum sensing Effekt, da QS-regulierte Faktoren wie Protease-Aktivität, Siderophor-Produktion und *aidA*-Expression denen der AHL negativen Mutanten H111-I und H111-R entsprachen (Tab. 3.3). Frühere Versuche hatten bereits die dem Cep-System übergeordnete Funktion von *rsuA* nachgewiesen (Huber *et al.*, 2002). Bei G3 entsprachen die Expression von *aidA* und die Protease-Aktivität der von H111. Die normale *aidA*-Expression von G3 trotz verringerter AHL-Menge lässt darauf schließen, dass außer dem Cep-System noch andere Faktoren an der Regulation der *aidA*-Expression beteiligt sind. Dies zeigt auch die Mutante B7, die ja eine normale AHL-Produktion, aber keine *aidA*-Expression aufweist. G3 zeigte außerdem als einzige Mutante eine normale Siderophor-Produktion (Abb. 3.25).

Die geringere Expression von *aidA* trägt offenbar mehr zur Attenuierung bei als eine verminderte AHL-Produktion oder verlangsamtes Wachstum. Während auf der Mutante E5 nur 29 % der Würmer starben, waren es bei G3 46 % (Tab. 3.3). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die unterschiedliche Vermehrung der Würmer. Während diese auf E5 normal war, war sie auf G3 verringert. Takaya *et al.* (2003) zeigten, dass eine *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium lon*-Mutante in BALB/c Mäusen hochgradig attenuiert war. Grund für die Attenuierung war die mangelnde Fähigkeit, eine systemische Infektion in den Mäusen auszulösen und in Makrophagen zu überleben.

4.3.5 Die regulatorische Mutante G11

Diese Mutante war im Wurm-Versuch nur geringgradig attenuiert (Abb. 3.22). Zudem war G11 (*cysB2*) von allen Mutanten die einzige, deren Phänotyp in allen getesteten Merkmalen,

außer der Siderophor-Produktion, dem Wildtyp entsprach (Tab. 3.3). Die geringe Attenuierung könnte folglich den Anteil der Siderophor-Produktion an der Gesamt-Pathogenität widerspiegeln. Aus der DC ging jedoch hervor, dass G11 immer noch Pyochelin I und II produzierte, wenn auch in geringerem Maß als der Wildtyp (Abb. 3.28 e, f). Die Salicylsäureproduktion war dagegen erhöht. Zugabe von Cystein resultierte auf CAS-Agar in einem dem Wildtyp vergleichbaren Hof (Abb. 3.27). Ursache hierfür war vermutlich die verstärkte Produktion von Pyochelin I, wie die DC zeigte. Auffällig ist, dass die DC beim Wildtyp drei Banden oberhalb der Salicylsäure zeigte, die weder bei G11 noch bei G11 mit Cystein erschienen. Da es sich bei diesen Banden möglicherweise um Ornibactine handelt, könnte der Regulator einen Einfluss auf die Ornibactin-Produktion haben. Trotz der noch relativ starken pathogenen Wirkung der Mutante waren die überlebenden Würmer in der Lage, sich zu vermehren. Es kann angenommen werden, dass durch die Mutation außer der Siderophor-Produktion auch noch andere Pathogenitätsmechanismen betroffen sind, die eine Vermehrung der Würmer bei Kolonisierung mit dem Wildtyp verhinderten.

Insgesamt ist anzumerken, dass die hier ermittelten phänotypischen Merkmale die Attenuierung der verschiedenen Mutanten im Wurmversuch nicht vollständig erklären können. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Mutationen weitergehende Effekte haben, die z. B. die Überlebensfähigkeit der Bakterien im Wurm, die Festsetzung oder bisher unbekannte Infektionsmechanismen beeinflussen.

4.4 *C. elegans* im Vergleich mit anderen Pathogenitätsmodellen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche haben gezeigt, dass *C. elegans* ein geeignetes Modell für bakterielle Pathogenität darstellt. Die Funktion bereits bekannter Pathogenitätsfaktoren wie Quorum sensing oder des *lon*-Gens konnte bestätigt werden, zusätzlich wurden neue Faktoren identifiziert. Dabei muss beachtet werden, dass das Screening nicht komplett war, da das Genom von *B. cenocepacia* ca. 8.000 Gene umfasst und in dieser Arbeit nur 1.000 Mutanten untersucht wurden. Der Einfluss einzelner Virulenzfaktoren wie z. B. Protease, Lipase und Siderophore zeigte sich in *C. elegans* gar nicht oder in nur sehr geringem Maß. Insgesamt wurde deutlich, dass eine bakterielle Infektion nicht auf die Summe einzelner Virulenzfaktoren reduziert werden kann, sondern ein sehr komplexer Prozess ist, an dem Virulenzfaktoren zwar beteiligt, aber insgesamt noch sehr viel mehr Faktoren wie Anheftung an Wirtszellen und Überleben im Wirt ausschlaggebend sind. Die Eigenschaften der im Screening isolierten Mutanten zeigen dies besonders gut. Es handelt sich fast durchweg um Gene, die bisher hauptsächlich durch ihre Funktion im normalen Zell-Stoffwechsel definiert sind, und die nur zum Teil in anderen Modellen wie der Maus oder *A. thaliana* als Virulenz-faktoren identifiziert wurden. Am interessantesten dürfte die Mutante B7 sein, da sie voll-kommen harmlos war und durch ihre vollständige geno- und phänotypische Charakterisierung die Pathogenitätsmechanismen von H111 in *C. elegans* aufgeklärt werden könnten. Gleichzeitig gab diese Mutante einen Hinweis auf das Vorhandensein einer möglichen Pathogenitäts-insel in H111. *ilvC* und *purD* wurden auch im Arabidopsis- bzw. Ratten-Modell mit Pathogenität in Zusammenhang gebracht (Lopez *et al.*, 2001; Potvin *et al.*, 2003) *aroK* jedoch bisher nicht.

Da bakterielle Virulenzfaktoren offensichtlich unterschiedlich stark in den verschiedenen Modellen wirken, empfiehlt sich für deren genaue Untersuchung die Verwendung verschiedener Modelle. Universelle Faktoren wie das Quorum sensing sind dagegen in jedem der gängigen Modelle nachweisbar. *C. elegans* bietet als Modell den großen Vorteil, dass bereits sehr viele definierte Mutanten vorliegen und dass relativ schnell und einfach weitere Mutanten erzeugt werden können. Wie das Beispiel der *phm-2* und *srf-3* Mutanten zeigt, können auf diese Weise Wechselwirkungen zwischen Wirt und Bakterium anhand einzelner Gene untersucht werden.

Naturgemäß stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit von mit dem *C. elegans*-Modell erhaltenen Ergebnissen auf den Menschen (s. dazu auch 1.4.2). Es hat sich gezeigt, dass die Fähigkeit, im Wirt zu überleben, für die bakterielle Pathogenität von Bedeutung ist. In Wirbeltieren ist vorrangig das angeborene Immunsystem für die Erkennung und Vernichtung von Mikroorganismen zuständig, häufig kann es auch allein eine Infektion verhindern (Medzhitov und Janeway, 1998; Barton und Medzhitov, 2002). Ein Mäusen oder Menschen vergleichbares Immunsystem fehlt in *C. elegans*, jedoch sind Homologe einzelner Komponenten der TOLL/TLR-Wege und ein p38 MAP-Kinase-Weg vorhanden und es gibt zahlreiche Hinweise auf Gene, die mit diesen Wegen zu tun haben und deren Ausfall *C. elegans* empfindlicher gegenüber pathogenen Bakterien macht (Kurz und Ewbank, 2003; Kim *et al.*, 2002). Da dasselbe Bakterium Infektionen in verschiedenen Organismen auslösen kann, liegt die Vermutung

nahe, dass gewisse Entzündungsmechanismen sich früh in der Evolution ausgebildet haben und konserviert sind. Die Reaktion des Wirts müsste demnach ebenfalls konserviert sein und es besteht die Möglichkeit, diese Mechanismen in einem vergleichsweise einfachen Organismus wie *C. elegans* zu erkennen und dadurch ein besseres Verständnis bakterieller Infektionen im Menschen zu erlangen.

4.5 Ausblick

Für die Auslösung einer bakteriellen Infektion sind - von Seiten des Bakteriums - drei Punkte ausschlaggebend: die Erkennung des Wirts, das Festsetzen und Überleben im Wirt und die Expression von Virulenzfaktoren. Der Anheftung und Festsetzung im Wirt dienen bei Bakterien z. B. die Ausbildung von Pili und mucosen Exoprodukten (Alginat, EPS) sowie die Biofilm-Bildung. Da B. cenocepacia H111 keine cable-pili ausbildet, wäre die Untersuchung der Rolle von Fimbrien bei der Festsetzung in C. elegans interessant, umso mehr als sich gezeigt hat, dass das Strukturgen für die Ausbildung von Typ I Fimbrien, fimA, Quorum sensing reguliert ist (Riedel et al., 2003). Ebenso könnte die Rolle weiterer QS regulierter Gene bei der Pathogenität von H111 untersucht werden und damit ein vollständigeres Bild der Ursachen der Attenuierung von H111 QS-Mutanten in C. elegans liefern. aidA ist ein QS reguliertes Gen, das einen großen Anteil an der Attenuierung hat, die molekularbiologischen Mechanismen sind jedoch unklar. Weiterhin wäre zu klären, ob die hier identifizierten Gene eine universelle Bedeutung für die bakterielle Pathogenität haben. Weitere Versuche mit anderen Modellen wären hier aufschlussreich. Ebenfalls sinnvoll wäre eine genauere Untersuchung der Mutante B7. Da die bisher vorliegende Sequenz keinerlei Ähnlichkeit mit Sequenzen anderer Organismen hat, würden sich evtl. neue Erkenntnisse hinsichtlich Virulenzfaktoren oder Pathogenitätsmechanismen ergeben. Hierfür müsste geklärt werden, ob die Sequenz tatsächlich Teil einer Pathogenitätsinsel ist, und wenn ja, welche Funktionen den einzelnen Genen dieser Insel zugeordnet werden können. Für die Untersuchung der Wirtsantwort könnten weitere C. elegans-Mutanten mit H111 getestet werden. Eine interessante Variante dieser Versuche ist die direkte Expression bakterieller Virulenzgene in C. elegans und die Analyse des sich daraus ergebenden Phänotyps (Darby und Falkow, 2001).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Nematode *Caenorhabditis elegans* zur Untersuchung der Pathogenität von *Burkholderia cenocepacia* als Infektionsmodell etabliert. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass *B. cenocepacia* bei Patienten mit Mukoviszidose gefährliche Lungenentzündungen auslösen kann. Die Behandlung der Betroffenen wird durch die leichte Übertragbarkeit der Stämme sowie multiple Antibiotika-Resistenzen erschwert.

Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit vom verwendetem Medium unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren wirksam werden, die entweder zu einem langsamen ("slow killing") oder schnellen Sterben ("fast killing") von *C. elegans* führen. *B. cenocepacia* produziert spezielle Signalmoleküle (*N*-Acyl-homoserinlactone; AHL), die der Zellkommunikation (Quorum sensing; QS) dienen und verschiedene Prozesse in der Zelle regulieren. Es wurde nachgewiesen, dass die Pathogenität von *B. cenocepacia* durch dieses QS-System reguliert wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Pathogenität von QS Mutanten nicht auf der mangelnden Expression der als Virulenzfaktoren geltenden extrazellulären Proteasen und Lipasen beruht, sondern, dass weitere Pathogenitätsfaktoren oder –mechanismen durch den Ausfall des QS-Systems betroffen sein müssen. Als ein wichtiger Virulenzfaktor konnte das QS-regulierte Gen *aidA* identifiziert werden, dessen Deletion eine verminderte Pathogenität im Wurmmodell zur Folge hatte. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch den Einsatz spezifischer QS-Hemmstoffe die Pathogenität von *B. cenocepacia* und dem bei Patienten mit Mukoviszidose vorherrschenden Stamm, *P. aeruginosa*, erheblich vermindert wird, womit sich neue Mögichkeiten zur Bekämpfung dieser bakteriellen Infektionen ergeben.

In weiterführenden Untersuchungen wurden Virulenzfaktoren von *B. cenocepacia* identifiziert, die nicht durch das QS-System reguliert sind. Hierfür wurden ca. 1.000 *B. cenocepacia* Tn5-Insertionsmutanten im *C. elegans*-Modell hinsichtich ihrer Pathogenität untersucht und die attenuierten Mutanten genetisch charakterisiert. Zudem wurden die Mutanten auf die Produktion bekannter Virulenzfaktoren wie Protease, EPS und Siderophore hin getestet. Diese Untersuchungen bestätigten die Bedeutung der Gene *cepR* und *rsuA*, die beide für Faktoren der QS-Kaskade kodieren, für die Pathogenität des Organismus. Zudem wurden auch Mutanten isoliert, deren AHL-Produktion der des Wildtyps entsprach, deren Pathogenität zum Teil jedoch erheblich vermindert und in einem Fall sogar vollständig aufgehoben war.

Nur eines der mutierten Gene (*aroK*) steht in unmittelbarem Zuasammenhang mit der Produktion von Virulenzfaktoren, andere Gene sind höchstwahrscheinlich für das Überleben im Wirt essentiell. Insgesamt wiesen fünf Mutanten Aminosäure- oder Purin-Auxotrophien auf, in einer Mutante war ein *lysR*-ähnliches regulatorisches Gen (*cysB*2) ausgefallen, in einer anderen das Gen für die Lon-Protease. Die Sequenz der Mutante B7 wies keine Homologien zu bekannten Genen auf. Der stark reduzierte GC-Gehalt des sequenzierten Fragments im Vergleich zum gesamten *B. cenocepacia* Genom lässt das Vorhandensein einer Pathogenitätsinsel im untersuchten Stamm vermuten.

Insgesamt wurde gezeigt, dass einzelne Virulenzfaktoren von *B. cenocepacia* in *C. elegans* keine (Protease- und Lipase-Aktivität sowie EPS-Produktion) oder nur eine geringe Rolle (Siderophore) spielen und dass die Pathogenität dieses Bakteriums durch ein komplexes Zusammenwirken verschiedener Faktoren und Mechanismen reguliert ist, die erst zum Teil aufgeklärt sind.

6 Literatur

Aballay, A., Yorgey, P., Ausubel, F. M. (2000) *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. Curr. Biol. 10: 1539-1542

Aballay, A., Drenkard, E., Hilbun, L. R., Ausubel, F. M. (2003) *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. Curr. Biol. 13: 47-52

Agodi, A., Mahenthiralingam, E., Barchetta, M., Giannino, V., Sciacca, A., Stefani, S. (2001) *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. J. Clin. Microbiol. 39: 2891-2896.

Aguilar, C., Bertani, I., Venturi, V. (2003) Quorum sensing System and Stationary-Phase Sigma Factor (*rpoS*) of the Onion Pathogen *Burkholderia cepacia* Genomovar I Type Strain, ATCC 25416. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1739-1747

Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. H., Iglewski, B. H. (1997) Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 179: 3928-3935

Anderson, J. A. (1939) The use of tributyrin agar in dairy bacteriology. Ber. 3. Int. Microbiol. Kongress, 3: 726-728

Ankenbauer, R. G., Staley, A. L., Rinehart, K. L., Cox, C. D. (1991) Mutasynthesis of siderophore analogues by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1878-1882

Antl, M. (2001) Untersuchung der Virulenz von *Burkholderia cepacia* H111 im *Caenorhabditis elegans* Pathogenitätsmodell. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München

Aris, R. M., Routh, J. C., LiPuma, J. J., Heath, D. G., Gilligan, P. H. (2001) Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex: survival linked to genomovar type. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 164: 2102-2106

Arora, S. K., Dasgupta, N., Lory, S., Ramphal, R. (2000) Identification of two distinct types of flagellar cap proteins, FliD, in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 68: 1474-1479

Avery, L. (1993) The genetics of feeding in Caenorhabditis elegans. Genetics 133: 897-917

Bäumler, A. J., Kusters, J., Stojiljkovic, I., Heffron, F. (1994) *Salmonella typhimurium* Loci involved in Survival within Macrophages. Infect. Immun. 62: 1623-1630

Baldwin, A., Sokol, P. A., Parkhill, J., Mahenthiralingam, E. (2004) The *Burkholderia cepacia* Epidemic Strain Marker Is Part of a Novel Genomic Island Encoding Both Virulence and Metabolism-Associated Genes in *Burkholderia cenocepacia*. Infect. Immun. 72: 1537-1547

Barton, G. M., Medzhitov, R. (2002): Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. Curr. Opin. Immunol. 14: 380-383

Bassler, B. (2002) Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Cell 109: 421-424

Bauer, R. (2003) Untersuchungen zur Verbreitung der Oberflächenstrukturproteine Fimbrien, *cable-pili* und Flagellen innerhalb des *B. cepacia* Komplexes. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München

Bernhardt, S. A., Spilker, T., Coffey, T., LiPuma, J. J. (2003) *Burkholderia cepacia* Complex in Cystic Fibrosis: Frequency of Strain Replacement during Chronic Infection. Clin. Infect. Dis. 37: 780–785

Bernier, S. P., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Ohman, D. E., Sokol, P. A. (2003) Comparative Analysis of Plant and Animal Models for Characterization of *Burkholderia cepacia* Virulence. Infect. Immun. 71: 5306-5313

Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 62: 293-300

Boettcher, K. J., Ruby, E. G. (1995) Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. J. Bacteriol. 177: 1053-1058

Bolton, E. T., McCarthy, B. J. (1962) A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 1390-1397

Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of restriction and modification in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41: 459-472

Brenner, S. (1974) The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics 77: 71-94

Britigan, B. E., Roeder, T. L., Rasmussen, G. T., Shasby, D. M., McCormick, M. L., Cox, C. D. (1992) Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. J. Clin. Invest. 90: 2187-2196

Buchmeier, N. A., Libby, S. J. (1997) Dynamics of growth and death within a *Salmonella typhimurium* population during infection of macrophages. Can. J. Microbiol. 43: 29-34

Bullock, W. O., Fernandes, J. M., Stuart, J. M. (1987): XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. BioTechniques 5: 376-379

Burkholder, W. H. (1950) Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology 40: 115-117

Bye, M. R., Ewig, J. M., Quittell, L. M. (1994) Cystic fibrosis. Lung 172: 251-270

Caetano-Annolles, G. (1993) Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers PCR. Methods Appl. 3: 85-94.

Cheng, H. P., Lessie, T. G. (1994) Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. J. Bacteriol. 176: 4034-4042

Chatterjee, D. K., Chakrabarty, A. M. (1982) Genetic rearrangements in plasmids specifying degradation of chlorinated benzoic acids. Mol. Gen. Genet. 188: 279–285

Chung, J. W., Altman, E., Beveridge, T. J., Speert, D. P. (2003) Colonial Morphology of *Burkholderia cepacia* Complex Genomovar III: Implications in Exopolysaccharide Production, Pilus expression, and Persistence in the Mouse. Infect. Immun. 71: 904-909

Clark, J. D., Maaløe, O. (1967) DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 23: 99-112

Coenye, T., LiPuma, J. J., Henry, D., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert, D. P., Vandamme, P. (2001a) *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 271-279

Coenye, T., Mahenthiralingam, E., Henry, D., LiPuma, J. J., Laevens, S., Gillis, M., Speert D. P., Vandamme P. (2001b) *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1481-1490

Coenye, T. LiPuma, J. J. (2002) Population structure analysis of *Burkholderia cepacia* genomovar III: varying degrees of genetic recombination characterize major clonal complexes. Microbiol. 149: 77-88

Coenye, T., Vandamme, P. (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environ. Microbiol. 5: 719-729

Corbett, C. R., Burtnick, M. N., Kooi, C., Woods, D. E., Sokol, P. A. (2003) An extracellular zinc metalloprotease gene of *Burkholderia cepacia*. Microbiology 149: 2263-2271

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322

Cox, C. D., Graham, R. (1979) Isolation of an iron binding compound from *Pseudomonas* aeruignosa. J. Bacteriol. 137: 357-364

Cox, C. D.(1982) Effect of pyochelin on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 36: 17-23

Cryer, D. R., Eccleshall, R., Marmur, L. (1975) Isolation of yeast DNA. In: Prescott, D. M. (ed) Methods in Cell Biology 12: 39-44

Culotti, J. G., Russell, R. L. (1978) Osmotic avoidance defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* Genetics 90: 243-256

Cunha, M. V., Leitão, J. H., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Lito, L., Barreto, C., Salgado, M. J., Sá-Correia, I. (2003) Molecular Analysis of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from a Portuguese Cystic Fibrosis Center: a 7-Year Study. J. Clin. Microbiol. 41: 4113-4120

Darby, C., Cosma, C. L., Thomas, J. H., Manoil, C. (1999) Lethal paralysis of *Caenorhabditis* elegans by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 21: 15202-15207

Darby, C., Falkow, S. (2001) Mimicry of a G Protein Mutation by Pertussis Toxin Expression in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. Infect. Immun. 69: 6271-6275

Darby, C. (2003) Novel genes defined by resistance to plague bacteria biofilm. International Worm Meeting 2003, 288

Darling, P., Chan, M., Cox, A. D., Sokol, P. A. (1998) Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. Infect. Immun. 66: 874-877

De Clerck, E., De Vos, P. (2002) Study of the bacterial load in a gelatine production process focused on *Bacillus* and related endospore forming genera. Syst. Appl. Microbiol. 25: 611-617

de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L., Iglewski, B. H. (1999) RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 9636-9641

de Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1994) Analysis and contrstruction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. Methods Enzymol. 235: 386-405

de Nys, R., Wright, A. D., König, G. M., Sticher, O. (1993) New halogenated furanones from the marine alga *Delisea pulchra (cf. fimbriata)*. Tetrahedron 49: 11213–11220.

DeShazer, D., Brett, P. J., Burtnick, M N., Woods, D., E. (1999) Molecular characterization of genetic loci required for secretion of exoproducts in *Burkholderia pseudomallei*. J. Bacteriol. 181: 4661-4664

De Soyza, A., McDowell, A., Archer, L., Dark, J. H., Elborn, S. J., Mahenthiralingam, E., Gould, K., Corris, P. A. (2001) *Burkholderia cepacia* complex genomovars and pulmonary transplantation outcomes in patients with cystic fibrosis. Lancet 358: 1780-1781

De Wulf, P., McGuire, A. M., Liu, X., Lin, E. C. C. (2001) Genome-wide Profiling of Promoter Recognition by the Two-component Response Regulator CpxR-P in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 277: 26652-26661

DiMango, E., Zar, H. J., Bryan, R., Prince, A. (1995) Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. J. Clin. Invest. 96: 2204-2210

DiMango, E., Ratner, A. J., Bryan, R., Tabibi, S., Prince, A. (1998) Activation of NF-kappa B by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. J. Clin. Invest. 101: 2598-2605

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., Zhang, L. H. (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acyl-homoserine lactone Quorum sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3526-3531

Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucl. Acids Res. 16: 6127-6145

Drabick, J. A., Gracely, E. J., Heidecker, G. J., LiPuma, J. J. (1996) Survival of *Burkholderia cepacia* on environmental surfaces. J. Hosp. Infect. 32: 267-276

Drumm, M. L., Pope, H. A., Cliff, W. H., Rommens, J. M., Marvin, S. A., Tsui, L.-C., Collins, F. S., Frizzel, R. A., Wilson, J. M. (1990) Correction of the cystic fibrosis defect *in vitro* by retrovirus-mediaed gene transfer. Cell. 62: 1227-1233

Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., Oppenheimer, N. J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. Biochem. 20: 2444-2449

Ederer, G. M., Matsen, J. M. (1972) Colonization and infection with *Pseudomonas cepacia*. J. Infect. Dis. 125: 613-618

Engebrecht, J., Nealson, K., Silverman, M. (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. Cell: 32: 773-781

Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezou, J., Poole, K. (1998) Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing *in Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 180: 5443-5447

Farmer, K. L., Thomas, M. S. (2004) Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* mutants deficient in pyochelin production: pyochelin biosynthesis is sensitive to sulfur availability. J. Bacteriol. 186: 270-277.

Feldmann, F. (2004) Identifikation von Virulenzfaktoren von *Burkholderia cenocepacia* H111 im *Caenorhabditis elegans* Modell. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München

Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., Heffron, F. (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5189-5193

Fuqua C., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annu. Rev. Genet. 35: 439-68

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

Gambello, J. J., Kaye, S., Iglewski, B. H. (1993) LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotxin A expression. Infect. Immun. 61: 1180-1184

Gan, Y.-H., Chua, K. L., Chua, H. H., Liu, B., Hii, C. S., Chong, L. H., Tan, P. (2002) Characterization of *Burkholderia pseudomallei* infection and identification of novel virulence factors using a *Caenorhabditis elegans* host system. Mol. Microbiol. 44: 1185-1197

Garcia-Erce, J. A. Grasa, J. M., Solano, V. M., Gimeno, J. J., Lopez, A., Hernandez, M. J., Marco, M. L., Arribas, J. L., Giralt, M. (2002) Bacterial contamination of blood components due to *Burkholderia cepacia* contamination from chlorhexidine bottles. Vox. Sang. 83: 70-71

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

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., Phillips, G. B. (1981) Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T., Fernandez, M. P. (1995) Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. Int. J. Syst. Bact. 45: 274-289

Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S. (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactonemediated procaryotic signalling. J. Bacteriol. 178: 6618-6622

Goldberg, J. B., Pier, G. B. (2000) The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas* aeruginosa infections in cystic fibrosis. Trends Microbiol. 8: 514-520

Gotschlich, A., Huber, B., Geisenberger, O., Tögl, A., Steidle, A., Riedel, K., Hill, P., Tümmler, B., Vandamme, P., Middleton, B., Camara, M., Williams, P., Hardman, A., Eberl, L. (2001) Synthesis of multiple *N*-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. Syst. Appl. Microbiol. 24: 1-14

Graham, P. L., Johnson, J. J., Wang, S., Sibley, M. H., Gupta, M. C., Kramer, J. M. (1997) Type IV collagen is detectable in most, but not all, basement membranes of *Caenorhabditis elegans* and assembles on tissues that do not express it. J. Cell. Biol. 137: 1171-1183

Gravel, D., Sample, M. L., Ramotar, K., Toye, B., Oxley, C., Garber, G. (2002) Outbreak of *Burkholderia cepacia* in the adult intensive care unit traced to contaminated indigo-carmine dye. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 23: 103-106

Guilbault, G., Kramer, D. N. (1966) Ultra Sensitive, Specific Method for Cyanide Using p-Nitrobenzaldehyd and o-Dinitrobenzene. Anal. Chem. 38: 834-836

Hanahan, D., (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580

Häußler, S., Lehmann, C., Breselge, C., Rohde , M., Claßen, M., Tümmler, B., Vandamme, P., Steinmetz, I. (2003) Fatal Outcome of Lung Transplantation in Cystic Fibrosis Patients due to Small-Colony Variants of the *Burkholderia cepacia* Complex. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22: 249–253

Helling, R. B., Goodman, H. M., Boyer, H. W. (1974): Analysis of endonuclease R-*Eco*RI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J. Virol. Nov;14(5):1235-44

Hendrickson E. L., Plotnikova, J., Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G., Ausubel, F. M. (2001) Differential Roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *rpoN* Gene in Pathogenicity in Plants, Nematodes, Insects, and Mice. J. Bacteriol. 183: 7126-7134

Hentze, M. W. (1994) Enzymes as RNA binding proteins: A role for (di)nucleotide-binding domains? Trends Biochem. Sci. 19:101-103

Hodgkin, J., Kuwabara, P. E., Corneliussen, B. (2000) A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Current Biology 10: 1615-1618.

Holloway, B. W. (1995) Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 13: 572-581

Horvitz, H. R., Brenner, S., Hodgkin, J., Herman, R. K. (1979) A uniform genetic nomenclature for the nematode *Caenorhabditis elegans*. Mol. Gen. Genet. 175 :129-133

Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, Molin, S., Eberl, L. (2001) The *cep* Quorum sensing system of *Burkholderia cepacia* controls biofilm formation and swarming motility. Microbiol. 147: 2517-2528

Huber, B. (2002a) Identifizierung von Genen in *Burkholderia cepacia*, die für die Formation von Biofilmen auf abiotischen Oberflächen von Bedeutung sind. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München

Huber, B., Riedel, K., Köthe, M., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L. (2002) Genetic Analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111. Mol. Microbiol. 46: 411-426

Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., Polster, J. (2003) Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum sensing. Z. Naturforsch. 58c: 879-884

Hutchison, M. L., Poxton, I. R., Govan, J. R. (1998) *Burkholderia cepacia* produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes. Infect. Immun. 66: 2033-2039.

Hutchison, M. L., Govan, J. R. W. (1999) Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. Microbes Infect. 1: 1005-1014

Imanaka, H., Kousaka, M., Tamura, G., Arima, K. (1965) Studies on pyrrol-nitrin, a new antibiotic. Taxonomic studies on pyrrolnitrin-producing strains. J. Antibiot. 18: 205-206

Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., Levison, H. (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. J. Pediatr. 104: 206-210

Johansen, H. K., Kovesi, T. A., Koch, C., Corey, M., Høiby, N., Levison, H. (1998) *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* infection in cystic fibrosis patients treated in Toronto and Copenhagen. Pediatr. Pulmonol. 26: 89-96

Jones, A., Yu, B., Bainton, M. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J. R., Golby, P., Reeves, P. J., Stephens, S. M. K., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B., Williams, P. (1993) The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. EMBO J. 12: 2477-2482

Johnson, W. M., Tyler, S. D., Rozee, K. R. (1994) Linkage analysis of geographic and clinical clusters in *Pseudomonas cepacia* infections by multilocus enzyme electrophoresis and ribotyping. J. Clin Microbiol. 32: 924-930

Kaplan, H. P., Greenberg, E. P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. J. Bacteriol. 163: 1210-1214

Kilbane, J. J., Chatterjee, D. K., Karns, J. S., Kellogg, S. T., Chakrabarty, A. M. (1982) Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. Appl. Env. Microbiol. 44: 72-78

Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, F., Emerson, F. E., Garsin, D. A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Tan, M.-W., Ausubel, F. M. (2002) A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. Science 297: 623-626

Klarsfeld, A. D., Goossens, P. L, Cossart, P. (1994) Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. Mol. Microbiol. 13: 585-597

Köthe, M., Antl, M., Huber, B., Stoecker, K., Ebrecht, D., Steinmetz, I., Eberl, L. (2003) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the *cep* Quorum sensing system. Cell. Microbiol. 5: 343-351

Kovach, M., E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., Peterson, K. M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 175-176

Kurz, C. L., Chauvet, S., Adrès, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G. P. F., Uh, M., Celli, J., Filloux, A., de Bentzmann, S., Steinmetz, I., Hoffmann, J. A., Finlay, B. B., Gorvel, J.-P., Ferrandon, D., Ewbank, J. J. (2003) Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. EMBO J. 22: 1451-1460

Kurz, C. L., Ewbank, J. J. (2003) *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innante immunity. Nature 4: 380-390

Lamitina, S. T., Morrison, R., Moeckel, G. W., Strange, K. (2004) Adaptation of the nematode *Caenorhabditis elegans* to extreme osmotic stress. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 286: C785-C791.

Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., Zhang, L. H. (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Mol. Microbiol. 47: 849-860

Leadbetter, J. R., Greenberg, E. P. (2000) Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by *Variovorax paradoxus*. J. Bacteriol. 18: 6921-6926

Ledson, M. J., Gallagher, M. J., Jackson, M., Hart, C. A., Walshaw, M. J. (2002) Outcome of *Burkholderia cepacia* colonisation in an adult cystic fibrosis centre. Thorax 57: 142-145

Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P., Sokol, P. A. (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J. Bacteriol. 181: 748-756

Lewenza, S., Sokol, P. A. (2001) Regulation of Ornibactin Biosynthesis and *N*-Acyl-L-Homoserine Lactone Production by CepR in *Burkholderia cepacia*. J. Bacteriol. 183: 2212-2218

LiPuma, J. J., Spilker, T., Gill, L. H., Campbell, P. W., Liu, L., Mahenthiralingam, E. (2001) Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 164: 92-96

LiPuma, J. J., Spilker, T., Coenye, T., Gonzalez, C. F. (2002) An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. Lancet 359: 2002-2003

Lopez, J. C., Grasso, D. H., Frugier, F., Crespi, M. D., Aguilar, O. M. (2001) Early symbiotic responses by *Sinorhizobium meliloti ilvC* mutants in alfalfa. Mol. Plant Microbe Interact. 14: 55-62

Mahajan-Miklos, S. Tan, M.-W., Rahme, L. G., Ausubel, F. M. (1999) Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa – Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model. Cell 96: 47-56

Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G., Ausubel, F. M. (2000) Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. Mol. Microbiol. 37: 981-988

Mahenthiralingam, E., Simpson, D. A., Speert, D. P. (1997) Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 35: 808-816

Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y., Vandamme, P. (2000) DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. J. Clin. Microbiol. 38: 3165-3173

Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S. (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. Microbiol. 145: 283-291

Manefield, M., Bovbjerg Rasmussen, T., Hentzer, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2002) Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. Microbiol. 148: 1119–1127

McKenney, D. K., Brown, E., Allison, D. G. (1995) Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. J. Bacteriol. 177: 6989-6992

Medzhitov, R., Janeway, C. A. (1998) Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. Semin. Immunol. 10: 351-353

Merkl, C. (2003) Untersuchung der Virulenz verschiedener *Burkholderia cepacia*-Mutanten in einem *Burkholderia cepacia-Caenorhabditis elegans* Pathogenitätsmodell. Bachelor-Arbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München

Meyer, J. M., Hohnadel, D., Hallé, F. (1989) Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. J. Gen. Microbiol. 135: 1479-1487

Meyer, J. M., Van, V. T., Stintzi, A., Berge, O., Winkelmann, G. (1995) Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*). Biometals 8: 309-317

Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55: 165-199

Moore, J. E., McIlhaton, B., Shaw, A., Murphy, P. G., Elborn, J. S. (2001) Occurrence of *Burkholderia cepacia* in foods and waters: clinical implications for patients with cystic fibrosis. J. Food Prot. 64: 1076-1078

Moreira, L. M., Videira, P. A., Sousa, S. A., Leitão, J. H., Cunha, M. V., Sá-Correia, I. (2003) Identification and physical organization of the gene cluster involved in the biosynthesis of

Burkholderia cepacia complex exopolysaccharide. Biochem. Biophys. Res. Comm. 312: 323-333

Morel, P. C., Roubi, N., Talon, D. R., Bertrand, X. (2003) Contamination of trypan blue with *Burkholderia cepacia* in a cornea bank. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 24: 198-202

Mushegian, A. R., Garey, J. R., Martin, J., Liu, L. X. (1998) Large-scale taxonomic profiling of eukaryotic model organisms: a comparison of orthologous proteins encoded by the human, fly, nematode, and yeast genomes. Genome Res. 8: 590-598

Nealson, K. H., Platt, T., Hastings, J. W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J. Bacteriol. 104: 1101-1105

Neilands, J. B. (1995) Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. J. Bacteriol. Chem. 270: 26723-26726

Nicas, T. I., Iglewski, B. H. (1985) The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 31: 387-392

Nogales, B., Moore, E. R., Abraham, W. R., Timmis, K. N. (1999) Identification of the matabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. Environ. Microbiol. 3: 199-212

Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A., Reiser, J. (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 176: 2044-2054

Oie, S., Kamiya, A. (1996) Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. Am. J. Infect. Control 24: 389-395

O'Quinn, A. L., Wiegand, E. M., Jeddeloh, J. A. (2001) *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis. Cell. Microbiol. 3: 381-393

Pankhurst, C. L., Philpott-Howard, J. (1996) The environmental risk factors associated with medical and dental equipment in the transmission of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* in cystic fibrosis patients. J. Hosp. Infect. 32: 249-255

Park, P. W., Pier, G. B., Preston, M. J., Goldberger, O., Fitzgerald, M. L., Bernfield, M. (2000) Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 275: 3057-3062

Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gramnegative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8789-8793

Parsons, Y. N., Banasko, R., Detsika, M. G., Duangsonk, K., Rainbow, L., Hart, C. A., Winstanley, C. (2003) Suppression-subtractive hybridisation reveals variations in gene

distribution amongst the *Burkholderia cepacia* complex, including the presence in some strains of a genomic island containing putative polysaccharide production genes. Arch. Microbiol. 179: 214-223

Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., Iglewski, B. H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. Science 260: 1127-1130

Pearson, J. P., Pesci, E. C., Iglewski, B. H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol. 179: 5756-5767.

Pearson, J. P., Van Delden, C., Iglewski, B. H. (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. J. Bacteriol. 181: 1203-1210

Pearson, J. P., Feldman, M., Iglewski, B. H., Prince, A. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cellto-cell signalling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. Infect. Immun. 68: 4331-4334

Pesci, E. C., Iglewski, B. H. (1997) The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. Trends Microbiol. 5: 132-135

Pesci, E. C, Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., Iglewski, B. H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6940-6949

Pessi, G, Haas, D. (2000) Transcriptional control of the hydrogn cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the Quorum sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol 182: 6940-6949

Pier, G. B., Elcock, M. E. (1984) Nonspecific immunoglobulin synthesis and elevated IgG levels in rabbits immunized with mucoid exopolysaccharide from cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Immunol. 133: 734-739

Pier, G. B. (2000) Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8822-8828

Pier, G. B. (2002) CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. Curr. Opin. Microbiol. 5: 81-86

Pilewski, J. M., Frizzell, R. A. (1999) Role of CFTR in airway disease. Physiol. Rev. 79: 215-255

Pirhonnen, M., Flego, D., Heikiheimo, R., Palva, E. T. (1993) A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. EMBO J. 12: 2467-2476

Politz, S. M., Philipp, M., Estevez, M., O'Brien, P. J., Chin, K. J. (1990) Genes that can be mutated to unmask hidden antigenic determinants in the cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2901-2905

Potvin, E., Lehoux, D. E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K. L., Sanschagrin, F., Lau, G. W., Levesque, R. C. (2003) In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. Mol. Microbiol. 5: 1294-1308

Pugsley, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 50-108

Quadri L. E. N. (2000) Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. Mol. Microbiol. 37: 1-12

Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G., Ausubel, F. M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 268: 1899-1902

Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., Haas, D. (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide and lipase. Mol. Microbiol. 24: 309-319

Richard, P., Le Floch, R., Chamoux, C., Pannier, M., Espaze, E., Richet, H. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiple resistant strains. J. Infect. Dis. 170: 377-383

Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Gotschlich, A., Wu, H., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L. (2001) N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. Microbiol. 147: 3249-3262

Riedel, K., Arévalo-Ferro, C., Reil, G., Görg, A., Lottspeich, F., Eberl, L. (2003) Analysis of the Quorum sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* H111 by proteomics. Electrophoresis 24: 740-750

Rodley, P. D., Römling, U., Tümmler, B. (1995) A physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain. Mol. Microbiol. 17: 57-67

Römling, U., Fiedler, B., Bosshammer, J., Grothues, D., Greipel, J., von der Hardt, H., Tümmler, B. (1994) Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 170: 1617-1621

Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H., Hamood, A. N. (1999a) Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. Infect. Immun. 67: 5854-5862

Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H., Hamood, A. N. (1999b) Contribution of the regulatory gene *lasR* to the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection of burned mice. J. Burn Care Rehabil. 20: 42-49

Sacherer, P., Défago, G., Haas, D. (1994) Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. FEMS Microbiol. Lett. 116: 155-160

Sage, A., Linker, A., Evans, L. R., Lessie, T. G. (1990) Hexose phosphate metabolism and exopolysaccharide formation in *Pseudomonas cepacia*. Curr. Microbiol. 20: 191-198

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Schierholz, J. M., Beuth, J., König, D., Nürnberger, A., Pulverer, G. (1999) Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. Zentbl. Bakteriol. 289: 165-177

Schweizer, H. P. (1998) Intrinsic Resistance to Inhibitors of Fatty Acid Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* Is Due to Efflux: Application of a Novel Technique for Generation of Unmarked Chromosomal Mutations for the Study of Efflux Systems. Antimicrob. Agents Chemotherapy 42: 394-398

Schwyn, B., Neilands, J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160: 47-56

Serino, L., Reimmann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P., Haas, D. (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Gen. Genet. 249: 217-228

Sifri, C. D., Mylonakis, E., Singh, K. V., Qin, X., Garsin, D. A., Murray, B. E., Ausubel, F. M., Calderwood, S. B. (2002) Viurlence Effect of *Enterococcus faecalis* Protease Genes and the Quorum-Sensing Locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and Mice. Infect. Immun. 70: 5647-5650

Sifri, C. D., Begun, J., Ausubel, F. A., Calderwood, S. B. (2003) *Caenorhabditis elegans* as a Model Host für *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. Infect. Immun. 71: 2208-2217

Singh, K. V., Qin, X., Weinstock, G. M., Murray, B. E. (1998) Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. J. Infect. Dis. 178: 1416-1420

Sist, P., Cescutti, P., Skerlavaj, S., Urbani, R., Leitão, J. H., Sá-Correia, I., Rizzo, R. (2003) Macromolecular and solution properties of Cepacian: the exopolysaccharide produced by a strain of *Burkholderia cepacia* isolated from a cystic fibrosis patient. Carbohydr. Res. 338: 1861-1867

Smith, A. W., Iglewski, B. H. (1989) Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. Nucl. Acids. Res. 17: 10509

Smith, R. S., Kelly, R., Iglewski, B. H., Phipps, R. P. (2002) The *Pseudomonas* autoinducer *N*-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. J. Immunol. 169: 2636-2642.

Sokol, P. A. (1986) Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. J. Clin. Microbiol. 23: 560-562

Sokol, P. A., Lewis, C. J., Dennis, J. J. (1992) Isolation of a novel siderophore from *Pseudomonas cepacia*. J. Med. Microbiol. 36: 184-189

Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517

Speert, D. P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M., Mahenthiralingam, E. (2002) Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. Emerg. Infect. Dis. 8: 181-187

Stephan, H., Freund, S., Beck, W., Jung, G., Meyer, J.-M., Winkelmann, G. (1993) Ornibactins – a new family of siderophores from *Pseudomonas*. Biometals 6: 93-100

Sulston, J., Hodgkin, J. (1988) In: The Nematode *Caenorhabditis elegans* (ed. W. B. Wood), S. 587. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Swartzman, E., Kapoor, S., Graham, A. F., Meighen, E. A. (1990) A new *Vibrio fischeri lux* gene preceds a bidirectional termination site for the *lux* operon. J. Bacteriol. 172: 6797-6802

Tan, M.-W., Mahajan-Miklos, S., Ausubel, F. M. (1999a) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 715-720

Tan, M.-W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G., Ausubel, F. M. (1999b) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 2408-2413

Tang, H. B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B., Prince, A. (1996) Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. Infect. Immun. 64: 37-43

Takaya, A., Suzuki, M., Matsui, H., Tomoyasu, T., Sashinami, H., Nakane, A., Yamamoto, T. (2003) Lon, a Stress-Induced ATP-Dependent Protease, Is Critically Important for Systemic *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection of Mice. Infect.. Immun. 71: 690-696

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome Sequence of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. A Platform for Investigating Biology. Science 282: 2012-2018

Thein, S. L., Wallace, R. B. (1986) Human genetic diseases: A practical approach. IRL Press, Herndon, Virginia

Toder, D. S., Gambello, J. J., Iglewski, B. H. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. Mol. Microbiol. 5: 2003-2010

Turi, J. L., Yang, F., Garrick, M. C., Piantadosi, C., Ghio, A. J. (2004) The iron cycle and oxidative stress in the lung. Free Radic. Biol. Med. 36: 850-857

Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D., Dessaux, Y. (2003) Novel bacteria degrading *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. Microbiol. 149: 1981-1989

Usher, L. R., Lawson, R. A., Geary, I., Taylor, C. J., Bingle, C. D., Taylor, G. W., Whyte, M. K. B. (2002) Induction of Neutrophil Apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin: A Potential Mechanism of Persistent Infection. J Immunology 168: 1861-1868

Vaisanen, O. M., Weber, A., Bennasar, A., Rainey, F. A., Busse, J. J., Salkinoja-Salonen, M. S. (1998) Microbial communities of printing paper machines. J. Appl. Microbiol. 84: 1069-1084

Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K., Govan, J. R. (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., Speert, D. P. (2000) Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). J. Clin. Microbiol. 38: 1042-1047

Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Goris, J., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J., Govan, J. R. W. (2003) *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. - a new twist to an old story. Res. Microbiol. 154: 91-96

Van Delden, C., Iglewski, B. H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerging Infect. Dis. 4. 551-560

Vermis, K., Coenye, T., LiPuma, J. J., Nelis, H. J., Vandamme, P. (2003) *Burkholderia dolosa* sp. no., a formal name for *Burkholderia cepacia* genomovar V (eingereicht)

Visca, P., Ciervo, A., Sanfilippo, V., Orsi, N. (1993) Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. J. Gen. Microbiol. 139: 1995-2001

Wang, L. H., Tu, S. C., Lusk, R. C. (1984) Apoenzyme of *Pseudomonas cepacia* salicylate hydroxylase. Preparation, fluorescence property, and nature of flavin binding. J. Biol. Chem. 259: 1136-1142

Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., Jørgensen, F., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P., Stewart, G. S. A. B. (1998) Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigation of *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. FEMS Microbiol. Lett. 163: 185-192

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M. (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 36: 1251-1275. Erratum in: Microbiol. Immunol. 1993;37(4):335.

Yabuuchi, E., Kawamura, Y., Ezaki, T., Ikedo, M. Dejsirilert, S., Fujiwara, N., Naka, T., Kobayashi K. (2000) *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. Microbiol. Immunol. 44: 307-317

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119

Yorgey, P., Rahme, L. G., Tan, M.-W., Ausubel, F. M. (2001) The roles of *mucD* and alginate in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in plants, nematodes and mice. Mol. Microbiol. 41: 1063-1076

Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P. S., Butow, R. A. (1995) An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. EMBO J. 14: 3268-3276

7 Anhang

7.1 Sequenzen der das Transposon flankierenden DNS in den *B. cenocepacia* H111 Mutanten

Die Insertionsstelle des Transposons wurde durch Amplifikation der das o-Ende des Transposons flankierenden DNS oder durch Klonierung des i-Endes des Transposons mit der daran angrenzenden DNS ermittelt. Entsprechend ist bei den Sequenzen angegeben, ob es sich um an das i- oder o-Ende angrenzende DNS handelt. Bei der i-Ende-Sequenz ist, wenn vorhanden, die *Sph*I-Schnittstelle kursiv gedruckt, die pUC19-Sequenz normal und der relevante, das i-Ende des Transposon flankierende Sequenzabschnitt fett gedruckt. Bei der o-Ende-Sequenz ist die Sequenz des Topo-Vektors normal, die des Transposons kursiv und die das o-Ende des Transposons flankierende Sequenz ebenfalls fett gedruckt. Die Sequenzen sind alphabetisch gemäß den Koordinaten der Mutanten geordnet.

A4 = purD

i-Ende

o-Ende

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCT GGAATTCGCCCTT*GGATTGCACTAAATCATCACCTTCGGGAAAGATTTCAACCTGGCCGT* TAATAATGAATGAATTTTTTTTAGTCATACGTATCCTCCAAGCCTGAATTCCCCGGATCC GTCGACCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGCGCCG CACTTGTGTATAAGAGTCAGCGCTCGACACGGTCGAGCTCGACTGGGATCGCCGCGCCG GCTCAGCGTCTCAGAGACTGTACTAGTCGACGCGTGGCCAAGGGCGAATTCTGCAGATAT CCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAG TCGTATTACAATTC

A11 = aroK

i-Ende

B7 = unbekannt

i-Ende

o-Ende

D6 = pyrD

o-Ende

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCT GGAATTCGCCCTT*GGATTGCACTAAATCATCACCTTCGGGAAAGATTTCAACCTGGCCGT* TAATAATGAATGAAATTTTTTTTAGTCATACGTATCCTCCAAGCCTGAATTCCCCGGATCC GTCGACCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGCGCCG CACTTGTGTATAAGAGTCAG**GGATGGCGCAGCCATCGACGGCCTCGCGGCCTCG** GGCGTCCATGATACCGTACTAGTCGACGCGTGGCCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCAT CACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCG

D9 = purF

o-Ende

E5 = rsuA

i-Ende

AGCCGGTCACCATCAAGCCGACCGCTTCGAACATCCGGCGCACTTCACGGTTGCGGCCTT CGGCCAGCGCGACGTGATACCAGTGGTTCGTGCCTTCGCCGCGCCATCGCGGATGCGCA GGAAATTCGCCGGACCGTCTTCGAGCTCGACCCGTGCAGCAGCTTCTGCCGCATGCCTG CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACA ACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCC TTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCG CAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTAT TTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCA GCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATC CGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC ATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGT CATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC CCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA

Anhang

G1 = cepR

o-Ende

G3 = lon

i-Ende

G11 = cysB2

i-Ende

o-Ende

H2 = ilvC

i-Ende

o-Ende

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCT GGAATTCGCCCTT*GGATTGCACTAAATCATCACCTTCGGGAAAGATTTCAACCAGGCCGT* TAATAATGAATGAATTTTTTTTAGTCATACGTATCCTCCAAGCCTGAATTCCCCGGATCC GTCGACCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGCGGCCG CACTTGTGTATAAGAGTCAGATGCCACACCTGATCGCGGGTGCGCAGAACAAGTCGGGCG CGGCGCGCGACATCGCGCTGTCGTACGCGGCAGCGAACGGCGTCAGCTCAAGTGTACTAG TCGACGCGTGGCCAAGGGCGAATTCTGCCGCGACTCGAGTCGCGCCGCTCGAGCA TGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTC

Koordi- naten	Mikrotiter- platte	Tn- Abschnitt	Sequenz- Länge [b]	Identität J2315	Identität, Positive (Protein)	Identität (Nukleotide)
A4	19/10/99-1	o-Ende	79	49/50 = 98 %	J2315er Sq: 355/424 (83 %), 382/424 (90 %) <i>B. fungorum</i> P.r.aGlycin-Ligase	ungefähre Ins.stelle: aa 219 o. 220
		i-Ende	464	463/464 = 99 %	139/154 (90 %), 146/154 (94 %) <i>B. fungorum</i> Phosphoribosyl- amin-Glycin Ligase, ZP_00028719	347/411 (84 %) <i>R. solanacearum</i> <i>purD</i> mögl. Phosphoribosylamin- Glycin-Ligase
A11	22/11/99-7	i-Ende	759	750/756 = 99 %	134/153 (87 %), 145/153 (94 %) <i>B. fungorum</i> Shikimat Kinase ZP_00028981	151/187 (80 %) <i>R. solanacearum</i> <i>aroK</i> ungefähre Ins.stelle: aa 154
B7	19/10/99-3	o-Ende	445	keine	25/71 (35 %), 38/71 (53 %), cons. hyp. Protein <i>Staph. aureus</i> 34/81 (41 %), 47/81 (58 %) hyp. Protein <i>B. fungorum</i>	< 40 %
		i-Ende	764	keine	< 40 %	< 40 %
D6	19/10/99-1	o-Ende	76	43/43 = 100 %	195/255 (76 %), 207/255 (81 %) <i>B. fungorum</i> Dihydroorotat Dehydrogenase	J2315er Sq: 121/151 (80 %) <i>P. putida pyrD</i> = Dihydroorotat Dehydrogenase
D9	19/10/99-1	o-Ende	480	462/479 = 96 %	140/153 (91 %), 145/153 (94 %) <i>B. fungorum</i> Glutamin- Phosphoribosylpyrophosphat- Amidotransferase, ZP_00031780	343/397 (86 %) <i>R. solanacearum</i> <i>purF</i> = mögl. Amidophospho- ribosyltransferase-Protein, ungefähre Ins.stelle: aa 258

7.2 Tab. 3.4: Homologien der das Transposon flankierenden Sequenzen

Anhang

Anhang

Koordi- naten	Mikrotiter- platte	Tn- Abschnitt	Sequenz- Länge [b]	Identität J2315	Identität, Positive (Protein)	Identität (Nukleotide)
E5	6/10/99-5	i-Ende	179	179/180 = 99 %	55/58 (94 %), 57/58 (98 %) <i>B. fungorum</i> 16S rRNA Uridin- 516 Pseudouridylat Synthase und verwandte Pseudouridylat Synthasen ZP_00028127	59/70 (84 %) <i>S. typhimurium</i> LT2 <i>yciL</i> = mögl. gr. ribosomale UE Pseudouridin Synthase
G1	7/10/99-6	o-Ende	342	311/311 = 100 %	<i>B. cenocepacia</i> H111 AHL- Rezeptor CepR AAG61129	<i>B. cenocepacia</i> AHL-Rezeptorgen <i>cepR</i> AF330018
G3	6/10/99-5	i-Ende	494	492/494 = 99 %	145/147 (98 %), 146/147 (99 %) <i>B. fungorum</i> ATP-abhängige Lon Protease ZP_00028286	429/491 (87 %) <i>R. solanacearum</i> <i>lon</i> = mögl. ATP-abhängige Protease, ungefähre Ins.stelle: aa 430
G11	19/10/99-2	i-Ende	766	761/763 = 99 %	201/222 (90 %), 210/222 (94 %) Transkriptionsregulator <i>B. fungorum</i> ZP_00033643	333/414 (80 %) <i>R. solanacearum</i> <i>cysB</i> 2 = mögl. <i>cys</i> -Regulon Transkriptions-regulator, ungefähre Ins.stelle: aa 223
H2	7/10/99-6	o-Ende	140	80/81 = 98 %	25/27 (92 %), 27/27 (100 %) <i>B. fungorum</i> Ketolsäure Redukto- isomerase, ZP_00029660	< 40 %
		i-Ende	772	771/771 = 100 %	142/148 (95 %), 145/148 (97 %) <i>B. fungorum</i> Ketolsäure Redukto- isomerase, Ins.stelle aa 147	387/441 (87 %) <i>R. solanacearum</i> <i>ilvC</i> , mögl. Ketolsäure Redukto- isomerase

aa = Aminosäure

Ins.stelle = Insertionsstelle P.r.a. = Phosphoribosylamin

7.3 Position der mutierten Gene im Stoffwechsel von Ralstonia solanacearum (Ausschnitte)

Die folgenden Ausschnitte aus dem Stoffwechselweg von *R. solanacearum* beruhen auf Angaben der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Die vollständigen Karten finden sich unter <u>http://www.genome.ad.jp/kegg/</u>.

Purin-Metabolismus: A4 (purD) und D9 (purF)


Anhang

Glutamat-Metabolismus: D9 (purF)



Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese: A11 (aroK)





Anhang

Pantothenat- und CoA-Biosynthese: H2 (*ilvC*)



8 Publikationen

Huber, B., Riedel, K., Köthe, M., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L. (2002) Genetic Analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111. Mol. Microbiol. 46: 411-426

Köthe, M., Antl, M., Huber, B., Stoecker, K., Ebrecht, D., Steinmetz, I., Eberl, L. (2003) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the *cep* Quorum sensing system. Cell. Microbiol. 5: 343-351

Huber, B., Feldmann, F., Köthe, M., Wopperer, J., Vandamme, P., Riedel, K., Eberl, L. (2004) Identification of a novel virulence factor in *Burkholderia cenocepacia* H111 required for efficient slow killing of *Caenorhabditis elegans* (eingereicht)

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei Prof. Schleifer für die Möglichkeit bedanken, die Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen. Weiterhin gilt mein Dank Prof. Leo Eberl für sein Interesse an meiner Arbeit und seine stete Motivation.

Kathrin Riedel und Birgit Huber danke ich fürs Korrekturlesen, zahlreiche Gaumenfreuden von Kuchen über Plätzchen bis zum Sieben-Gänge-Menü sowie beider Hilfsbereitschaft und Geduld bei Computer- und Labor-Fragen. Melanie Antl danke ich für ihre Einführung in die Arbeit mit *C. elegans* und die Gepflogenheiten des Eberl-Labors, Anette Steidle für zahlreiche Freizeitaktivitäten in Freising und nette Mittagspausen im damals noch spärlich besetzten Kaffeeraum.

Ein Danke auch an meine fleißigen Diplomandinnen (und Bachelor-Studentin), Kirsten Hofacker, Dagmar Wersing, Claudia Merkl und Rike Feldmann, die viele interessante Ergebnisse produziert und Leben in die Bude gebracht haben. Insbesondere Rike danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der "Suche nach der goldenen Mutante" und das gemeinsame Durchstehen der Biolog-Tagung. Catalina Arévalo-Ferro danke ich für ihre gute Laune, gute Wein- und Café-Tips sowie Nachhilfe im Inline-Skating und Yoga-Stunden. Beate Schumacher danke ich für ihre Geduld und Kompetenz bei allen Laborproblemen und die erfrischende Wirkung ihres Tees, Frau Widhopf für das professionelle Ausbessern meines Laborkittels, was mich vor weiteren Lästereien bewahrte. Allen standhaften Mensa-Verweigerern danke ich für ausgesprochen nette Mittagspausen bei guter Unterhaltung, den "Isos" für ihr Mitwirken beim Showprogramm der Weihnachtsfeiern und allen Mitgliedern des Eberl-Labors und den anderen Arbeitsgruppen für jede Menge Spaß und die sehr nette und ausgeglichene Arbeits-Atmosphäre.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre stete Unterstützung und Umzugshilfe bedanken und besonders bei meiner Mutter für die zahlreichen "Care Pakete", die die Postbeamten zwischen Hamburg und München auf Trab hielten. Meinem Freund Gerhard danke ich für viele lebenserfahrene Tips und sein geduldiges Ausharren an einsamen Wochenenden.