

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

**Nachweis, Verbreitung und Bedeutung
von *N*-Acyl-*L*-homoserinlactonen
bei Vertretern des *Burkholderia cepacia* Komplexes**

Astrid Susanne Gotschlich

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. (komm.) Dr. W. Nitsch, em.

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer
2. apl. Prof. Dr. A. Hartmann, Ludwig-
Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 14.05.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26.06.2001 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG.....	1
A.1 Zell-Zell Kommunikation bei gram-negativen Bakterien.....	1
A.2 „Quorum Sensing“ in <i>Burkholderia cepacia</i>	4
A.3 Taxonomische Differenzierung von <i>Burkholderia cepacia</i> -ähnlichen Bakterien.....	5
A.4 Pathogenität innerhalb des <i>Burkholderia cepacia</i> Komplexes.....	7
A.5 Ziele der Arbeit.....	9
B. MATERIAL UND METHODEN	10
B.1 Bakterien und Plasmide.....	10
B.2 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung.....	13
B.2.1 Nährmedien.....	13
B.2.2 Indikatormedien.....	14
B.2.3 Hemm- und Zusatzstoffe.....	16
B.2.4 Kultivierung, Zellernte und Bestimmung der Optischen Dichte.....	17
B.2.5 Stammhaltung.....	17
B.3 Nachweis von <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlactonen mit bakteriellen Reportersystemen.....	18
B.3.1 Bakterielle Reportersysteme.....	18
B.3.1.1 Sensorplasmide pSB403 und pSB1075.....	18
B.3.1.2 Sensorplasmid pAS-C8.....	18
B.3.2 Identifizierung AHL-produzierender Bakterien mittels Kreuzstrich-Assay.....	19
B.3.3 Nachweis von AHL-Molekülen mittels Mikrotiterplatten-Assay.....	19
B.3.4 Identifizierung von AHL-Molekülen mittels Dünnschicht-Chromatographie (DC).....	20
B.3.4.1 Isolierung von AHL-Molekülen aus Zellkulturüberstand.....	20
B.3.4.2 Auftrennung von AHL-Molekülen mittels DC.....	20
B.3.4.3 Detektion von AHL-Molekülen mit Sensorbakterien.....	21
B.4 Nachweis von Biofilmformation.....	22
B.5 Molekulargenetische Methoden.....	23
B.5.1 Isolierung von DNS.....	23
B.5.1.1 Schnelltest zur Isolierung chromosomaler DNS.....	23
B.5.1.2 Isolierung chromosomaler DNS mit dem DNeasy™ Tissue Kit.....	24
B.5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS (Zhou <i>et al.</i> , 1990; modifiziert).....	24
B.5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNS mit QIAprep Spin Isolierungskits.....	25
B.5.2 Aufreinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNS.....	25
B.5.2.1 Reinigung von DNS durch Tropfendialyse.....	25
B.5.2.2 Reinigung und Konzentrierung von DNS durch Ethanol-fällung.....	26
B.5.2.3 Reinigung von DNS durch Phenolextraktion.....	26
B.5.2.4 Reinigung von DNS durch präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	26
B.5.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNS mittels Spektralphotometrie.....	27
B.5.3 Analyse von DNS mittels Gelelektrophorese.....	27
B.5.3.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese.....	27
B.5.3.2 Gelanfärbung und Dokumentation.....	28
B.5.3.3 Konzentrations- und Größenbestimmung von DNS-Fragmenten.....	28
B.5.4 Nachweis von DNS mittels Southern-Blot-Hybridisierung.....	29
B.5.4.1 Herstellung einer DIG-markierten Polynukleotidsonde.....	29
B.5.4.2 Southern-Blot (Southern, 1975; modifiziert).....	29
B.5.4.3 Hybridisierung mit einer DIG-markierten Polynukleotidsonde.....	31
B.5.4.4 Kolorimetrische Detektion.....	31
B.5.4.5 Stripping der Membran.....	32

B.5.5 Enzymatische Modifikation von DNS	33
B.5.5.1 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen	33
B.5.5.2 Dephosphorylierung von linearen DNS-Fragmenten	34
B.5.5.3 Ligation von DNS-Molekülen	34
B.5.6 Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR (Saiki <i>et al.</i> , 1988)	35
B.5.6.1 DNS-Polymerasen	35
B.5.6.2 PCR-Primer	36
B.5.6.3 Kapillar-PCR	37
B.5.6.4 Gradienten-PCR	37
B.5.6.5 Aufreinigung von PCR-Produkten	39
B.5.6.6 Klonierung von PCR-Produkten	39
B.5.7 Transfer von DNS in gram-negative Bakterien	40
B.5.7.1 DNS-Transfer in <i>Escherichia coli</i> durch Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988)	40
B.5.7.2 DNS-Transfer durch Konjugation (Kristensen <i>et al.</i> , 1995; modifiziert)	41
B.5.8 DNS-Sequenzanalyse nach dem „Cycle Sequencing“-Protokoll (Murray, 1989)	42
B.5.8.1 PCR-Standardreaktionsansatz	42
B.5.8.2 Sequenzierprimer	43
B.5.8.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
B.5.8.4 Detektion und Analyse von DNS-Sequenzen	45
B.5.9 Auswertung von Sequenzdaten	45
B.5.9.1 Vergleichende Anordnung von Sequenzen	45
B.5.9.2 Rekonstruktion von Stammbäumen	45
B.5.10 Knock-out Mutagenese mit Hilfe von homologer Rekombination	46
C. ERGEBNISSE	47
C.1 Phänotypische Charakterisierung von Isolaten des <i>B. cepacia</i> Komplexes	47
C.1.1 Synthese von AHL-Molekülen innerhalb des <i>B. cepacia</i> Komplexes	47
C.1.2 Synthese von extrazellulären Produkten innerhalb des <i>B. cepacia</i> Komplexes	53
C.1.2.1 Protease-Produktion	53
C.1.2.2 Lipase-Produktion	54
C.1.2.3 Chitinase-Produktion	54
C.1.2.4 Siderophor-Produktion	55
C.2 Genotypische Charakterisierung von Isolaten des <i>B. cepacia</i> Komplexes	55
C.2.1 Nachweis der <i>cepIR</i> Gene in Isolaten des <i>B. cepacia</i> Komplexes	56
C.2.1.1 Nachweis des <i>cepI</i> Gens mittels Southern-Blot-Hybridisierung	57
C.2.1.2 Nachweis des <i>cepR</i> Gens mittels Southern-Blot-Hybridisierung	58
C.2.2 Genetische Analyse der <i>cepIR</i> Gene aus Genomovaren des <i>B. cepacia</i> Komplexes	59
C.2.2.1 Amplifikation des <i>cepIR</i> Locus und Klonierung in pCR [®] 2.1-TOPO	59
C.2.2.2 Sequenzanalyse der <i>cepI</i> Gene aus Genomovaren des <i>B. cepacia</i> Komplexes	60
C.2.2.3 Sequenzanalyse der <i>cepI</i> Gene aus <i>B. multivorans</i> Stämmen und <i>B. pseudomallei</i> E8	61
C.2.2.4 Sequenzanalyse der <i>cepR</i> Gene aus Genomovaren des <i>B. cepacia</i> Komplexes	64
C.2.2.5 Phylogenetische Analyse der <i>cepIR</i> Gene aus Genomovaren des <i>B. cepacia</i> Komplexes	66
C.3 Funktionelle Analyse des <i>cepI</i> Gens aus Genomovaren des <i>B. cepacia</i> Komplexes	67
C.3.1 Konstruktion von <i>cepI</i> -Expressionsvektoren	68
C.3.2 Heterologe Expression von CepI in <i>Escherichia coli</i>	69

C.4 Erzeugung einer Knock-out Mutation im <i>cepI</i> Gen von <i>B. cepacia</i>	74
C.4.1 Auswahl eines geeigneten <i>Burkholderia</i> Stammes	75
C.4.2 Sequenzanalyse des <i>cepIR</i> Locus von <i>B. cepacia</i> H111	76
C.4.3 Konstruktion des <i>cepI</i> Integrationsvektors.....	77
C.4.4 Mutagenese im <i>cepI</i> Gen von <i>B. cepacia</i> H111	80
C.4.5 Genotypischer Nachweis der <i>cepI</i> Mutation in <i>B. cepacia</i> H111	81
C.4.6 Funktionelle Komplementation der <i>cepI</i> Mutante <i>B. cepacia</i> H111-I.....	83
C.5 Charakterisierung der <i>cepI</i> Mutante <i>B. cepacia</i> H111-I.....	86
C.5.1 AHL-Synthese in <i>B. cepacia</i> H111-I	86
C.5.2 Synthese von extrazellulären Produkten in <i>B. cepacia</i> H111-I.....	88
C.5.3 Biofilmbildung durch <i>B. cepacia</i> H111-I.....	90
D. DISKUSSION	92
D.1 AHL-Produktion innerhalb des <i>B. cepacia</i> Komplexes	92
D.1.1 AHL-Produktion bei <i>B. multivorans</i>	93
D.1.2 AHL-Produktion bei <i>B. vietnamiensis</i>	95
D.2 Korrelation zwischen AHL-Produktion und Exoprodukt-Synthese innerhalb des <i>B. cepacia</i> Komplexes.....	95
D.2.1 Phänotypische Charakterisierung von Vertretern des <i>B. cepacia</i> Komplexes.....	96
D.2.2 Phänotypische Charakterisierung der <i>cepI</i> Mutante <i>B. cepacia</i> H111-I.....	97
D.3 Vergleichende Sequenzanalyse und phylogenetische Analyse von <i>cepIR</i> innerhalb des <i>B. cepacia</i> Komplexes.....	98
D.4 Bedeutung der AHL-Synthese für die Pathogenität von <i>B. cepacia</i>	100
E. ZUSAMMENFASSUNG.....	104
F. ANHANG	106
G. LITERATURVERZEICHNIS.....	110
H. PUBLIKATIONSLISTE	122

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

A	Adenin, Ampere
Abb.	Abbildung
AHL	<i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BHL	<i>N</i> -(butanoyl)-L-homoserinlacton
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
C4-HSL	<i>N</i> -(butanoyl)-L-homoserinlacton
C6-HSL	<i>N</i> -(hexanoyl)-L-homoserinlacton
C8-HSL	<i>N</i> -(octanoyl)-L-homoserinlacton
C14-HSL	<i>N</i> -(tetradecanoyl)-L-homoserinlacton
°C	Grad Celsius
Cm	Chloramphenicol
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DHL	<i>N</i> -(decanoyl)-L-homoserinlacton
dDHL	<i>N</i> -(dodecanoyl)-L-homoserinlacton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
F	Farad
Fa.	Firma
G	Guanin
g	Gramm, Fallbeschleunigung
Gfp	Grün fluoreszierendes Protein
Gv.	Genomovar
h	Stunde
HHL	<i>N</i> -(hexanoyl)-L-homoserinlacton
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest.}	destilliertes, entionisiertes und filtriertes Wasser
HSL	Homoserinlacton
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactosid
K	Kilo
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Milli, Meter, Mol
μ	Mikro
MCS	multiple Klonierungsstelle

min	Minute
N	Stickstoff
n	Nano
OD	Optische Dichte
ODHL	<i>N</i> -(3-oxodecanoyl)-L-homoserinlacton
OdDHL	<i>N</i> -(3-oxododecanoyl)-L-homoserinlacton
OHHL	<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)-L-homoserinlacton
OHL	<i>N</i> -(octanoyl)-L-homoserinlacton
O	Operator
3-Oxo-C6-HSL	<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)-L-homoserinlacton
3-Oxo-C10-HSL	<i>N</i> -(3-oxodecanoyl)-L-homoserinlacton
3-Oxo-C12-HSL	<i>N</i> -(3-oxododecanoyl)-L-homoserinlacton
P	Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RBS	Ribosomenbindestelle
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RFL	relative Fluoreszenz
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimps alkalische Phosphatase
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Tc	Tetracyclin
tDHL	<i>N</i> -(tetradecanoyl)-L-homoserinlacton
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten, Uracil
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Ω	Ohm
W	Watt
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

A. EINLEITUNG

A.1 Zell-Zell Kommunikation bei gram-negativen Bakterien

Die Etablierung biochemischer und genetischer Methoden im Zuge der modernen Biotechnologie hat seit den 70er Jahren entscheidend zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die dem Phänomen des multizellulären Verhaltens von Bakterien zugrundeliegen, beigetragen. Intensive Forschungsarbeit auf diesem Gebiet hat gezeigt, daß viele Bakterien ausgeklügelte interzelluläre Kommunikationssysteme benutzen, die auf kleinen Signalmolekülen beruhen und dazu dienen, die Expression bestimmter Zielgene zu kontrollieren. In gram-negativen Bakterien sind die am besten untersuchten Signalmoleküle *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHLs), die sich vor allem durch die Länge und Modifikation der Acyl-Seitenkette unterscheiden. Bisher wurden AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von vier bis vierzehn Kohlenstoffatomen beschrieben, die entweder keinen Substituenten oder eine Oxo- bzw. Hydroxygruppe an der C3-Position trägt (Abb. A.1).

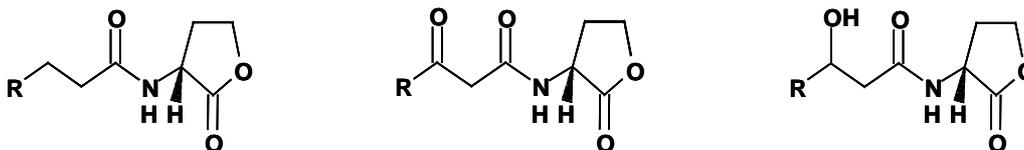


Abb. A.1: Typische Strukturformeln der bisher identifizierten *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHLs).

Die oftmals auch „Autoinducer“ genannten Signalmoleküle werden von den Bakterien eingesetzt, um die eigene Populationsdichte zu erkennen, wobei dieser Prozeß als „Quorum Sensing“ bezeichnet wird. Die kleinste Einheit, die in Abhängigkeit von der Zelldichte interzelluläre Reaktionen auslösen kann, stellt per Definition das „Quorum“ dar (Fuqua *et al.*, 1994). Das erste AHL-abhängige „Quorum Sensing“ System wurde für *Vibrio fischeri* beschrieben, wo es den Phänotyp der Biolumineszenz kontrolliert (Nealson *et al.*, 1970; Nealson, 1977). Bei geringer Populationsdichte produzieren die Zellen durch die konstitutive Aktivität der AHL-Synthase LuxI einen niedrigen Basalwert an *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlacton (3-Oxo-C6-HSL). Da 3-Oxo-C6-HSL durch die Zellmembran frei diffundieren kann, ist es in gleicher Konzentration innerhalb und außerhalb der Zellen vorhanden (Kaplan und Greenberg, 1985), was somit bei ansteigender Zelldichte zur Akkumulation von AHL-Molekülen im Wachstumsmedium führt. Wenn ein bestimmter Schwellenwert erreicht ist, bindet 3-Oxo-C6-HSL an das zugehörige Rezeptorprotein LuxR. Der Komplex aus LuxR und 3-Oxo-C6-HSL bindet daraufhin an einen 20 bp großen „inverted repeat“, die sogenannte

lux Box. Diese regulatorische Erkennungssequenz befindet sich in der Promotorregion von *luxI* und kontrolliert die transkriptionelle Aktivierung des gesamten *lux* Operons. Da *luxI* für die AHL-Synthase kodiert und das erste Gen in dem Operon darstellt, findet ein positiver Rückkoppelungseffekt statt, der in einer sehr rasch ansteigenden Biolumineszenz resultiert. Als Konsequenz der Zelldichte-abhängigen Regulation ist der biolumineszente Phänotyp bei *V. fischeri* nur im Lichtorgan bestimmter Meeresfische anzutreffen, wo die Bakterienzellen in einer großen Dichte vorliegen. Bei freilebenden Zellen im Meerwasser dagegen findet aufgrund der geringen Zelldichte nur eine schwache Lichtemission statt. Ein vereinfachtes, allgemeines Schema des „Quorum Sensing“ Prozesses ist in Abb. A.2 wiedergegeben.

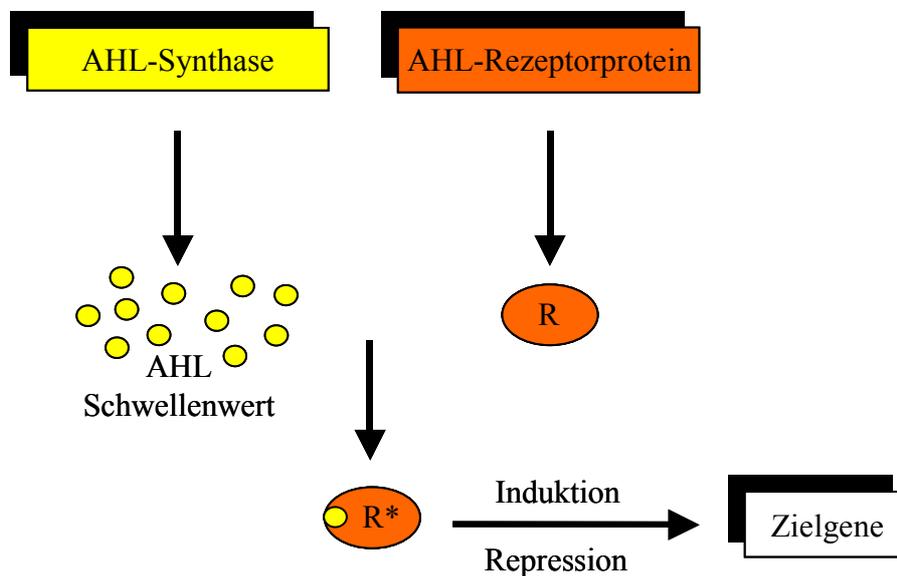


Abb. A.2: Schematische Darstellung des „Quorum Sensing“ Prozesses.

In den letzten Jahren wurden AHL-abhängige „Quorum Sensing“ Systeme, die auf LuxI/LuxR Homologen basieren, in einer Vielzahl von gram-negativen Bakterien identifiziert, wo sie ein breites Spektrum an unterschiedlichen Funktionen regulieren (Swift *et al.*, 1994; Salmond *et al.*, 1995; Fuqua *et al.*, 1996; Hardman *et al.*, 1998; Eberl, 1999). Zu den Zelldichte-abhängigen, AHL-kontrollierten Phänotypen zählen neben der Biolumineszenz in *Vibrio* sp. (Nealson *et al.*, 1970; Nealson, 1977; Cao und Meighen, 1989; Martin *et al.*, 1989; Bassler *et al.*, 1993) z.B. der konjugative Plasmidtransfer in *Agrobacterium tumefaciens* (Piper *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993), die Synthese von Antibiotika in *Erwinia carotovora* und *Pseudomonas aureofaciens* (Bainton *et al.*, 1992; Pierson *et al.*, 1994), Motilität in *Serratia liquefaciens* und *P. aeruginosa* (Eberl *et al.*, 1996; Lindum *et al.*, 1998; Glessner *et al.*, 1999), Biofilmformation in *P. aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* (Davies

et al., 1998; O'Toole und Kolter, 1998; Huber *et al.*, 2001) und Synthese verschiedenartiger Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *Erwinia* sp. (Passador *et al.*, 1993; Lewenza *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1993).

Darüberhinaus ist es aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der AHLs, der genetischen Konservierung der regulatorischen Elemente und der Kolonisierung gemeinsamer Habitate wahrscheinlich, daß die Möglichkeit zu intergenerischer Kommunikation besteht. Tatsächlich häufen sich die Indizien für AHL-vermittelten „cross-talk“ zwischen verschiedenen Bakterienspezies, z.B. in der Rhizosphäre (Pierson und Pierson, 1996; Steidle, unveröffentlicht). Ein weiteres Beispiel, das auf intergenerische Kommunikation mittels AHL-Moleküle hinweist, stellen die Beobachtungen von McKenney *et al.* (1995) dar, wonach zellfreie Kulturüberstände von *P. aeruginosa* die AHL-regulierte Virulenzfaktor-Produktion in *B. cepacia* verstärken. Neueste Ergebnisse von Riedel *et al.* (2001, unveröffentlicht) erbrachten auch einen direkten Nachweis für AHL-vermittelten „cross-talk“ in gemischten Biofilmen von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* sowohl in artifiziellen Durchflußkammern als auch im Lungengewebe der Maus. Vor kurzem konnte außerdem gezeigt werden, daß bakterielle AHL-Moleküle wahrscheinlich sogar Interaktionen mit Eukaryoten ermöglichen. Arbeiten von Telford *et al.* (1998) beschreiben, daß ein von *P. aeruginosa* produziertes AHL-Molekül (3-Oxo-C12-HSL) starke immunomodulatorische Wirkung besitzt, indem es sowohl die Makrophagen- als auch die T-Zell-Antwort durch Reprimierung der Cytokin-Ausschüttung beeinflusst.

Die intensive Forschungsarbeit insbesondere der letzten Jahre hat deutlich gemacht, daß eine Vielzahl der AHL-abhängigen Regulationssysteme eine beträchtliche Komplexität hinsichtlich der involvierten Komponenten aufweisen. Das am besten untersuchte Beispiel ist die hierarchische Autoinduktionskaskade in *P. aeruginosa*, die basierend auf zwei interagierenden „Quorum Sensing“ Systemen zahlreiche Phänotypen reguliert. Während beide Systeme an der Regulation von Elastase, alkalischer Protease und dem Xcp Sekretionsapparat beteiligt sind, werden andere Phänotypen ausschließlich von einem der beiden Systeme kontrolliert. Außerdem konnte gezeigt werden, daß das *las* „Quorum Sensing“ System für die Expression von *rhlR* nötig ist und somit in der Signal-Hierarchie über dem *rhl* System plaziert ist (Latifi *et al.*, 1996; Pesci und Iglewski, 1997). Auch in einer Reihe anderer Vertreter, darunter *Rhizobium* sp., *E. chrysanthemi* und *V. anguillarum*, wird das Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen AHL-Synthasen bzw. „Quorum Sensing“ Systemen vermutet (Rosemeyer *et al.*, 1998; Lithgow *et al.*, 2000; Nasser *et al.*, 1998; Milton *et al.*, 1997). Neben der Anwesenheit mehrerer LuxI-homologer AHL-Synthasen mit überlappenden Aktivitäten in

einem Organismus wurde überdies bereits die Existenz einer zweiten und dritten Familie von AHL-Synthasen beschrieben, die keine Homologie zur LuxI Proteinfamilie aufweisen, und zu denen AinS von *V. fischeri* und LuxM von *V. harveyi* bzw. HdtS von *P. fluorescens* gezählt werden (Gilson *et al.*, 1995; Laue *et al.*, 2000).

Ferner wird angenommen, daß AHL-abhängige Regulationssysteme oftmals Bestandteil komplexer regulatorischer Netzwerke sind und innerhalb dieser auf einer niederen Ebene platziert sind. Es wurden bereits einige regulatorische Faktoren identifiziert, die entweder die Expression oder die Aktivität der LuxI/LuxR Homologen beeinflussen. Beispielsweise ist für *Agrobacterium tumefaciens* und *Ralstonia solanacearum* bekannt, daß eine Aktivierung der AHL-Synthese zusätzliche externe Signale aus der Umwelt benötigt (Fuqua und Winans, 1994; Flavier *et al.*, 1997a und b). Bei diesen Faktoren handelt es sich um ein pflanzliches Opin bzw. ein Fettsäurederivat, welches jeweils die Stimulierung eines übergeordneten Transkriptionsregulators bewirkt und auf diesem Weg die AHL-vermittelte Genregulation beeinflusst. Der Sinn derartiger zusätzlicher Regulationsmechanismen ist wohl darin zu sehen, daß „Quorum Sensing“ Kaskaden somit nur unter ganz bestimmten Umweltbedingungen ausgelöst werden.

A.2 „Quorum Sensing“ in *Burkholderia cepacia*

Kürzlich wurde ein *luxIR* homologes „Quorum Sensing“-System, *cepIR*, für *B. cepacia* Genomovar III K56-2 (LMG 18863) beschrieben, das die Synthese einer extrazellulären Protease und des Siderophors Ornibactin kontrolliert (Lewenza *et al.*, 1999). Mit der Konstruktion von gerichteten *cepI* und *cepR* Mutanten konnte in einer weiterführenden Arbeit gezeigt werden, daß *cepI* für die Synthese von *N*-Octanoyl-L-homoserinlacton (C8-HSL) und *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (C6-HSL) verantwortlich ist und einer positiven Regulation durch CepR unterliegt (Lewenza und Sokol, 2001). Außerdem wurde ein positiver regulatorischer Effekt von CepR auf die Produktion von extrazellulärer Protease deutlich, ein negativer regulatorischer Effekt dagegen auf Ornibactin und CepR selbst. Ein Einfluß auf die Synthese der Siderophore Pyochelin und Salicylsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Transkriptionelle Fusionen der Gene *pvdA*, *pvdD* (diese Gene sind in die Synthese von Ornibactin involviert), *cepI* und *cepR* mit *lacZ* bewiesen, daß *cepR* die Expression von *pvdA* und *cepIR* auf der Transkriptionsebene reguliert. Ein definitiver Beweis dafür, daß CepR diese Gene direkt kontrolliert, konnte jedoch nicht erbracht werden. Es wird angenommen, daß ein Komplex aus C8-HSL und CepR durch Bindung an eine *lux* Box ähnliche Sequenz in der Promotorregion der Zielgene die Transkription induziert bzw. reprimiert (Lewenza *et al.*,

1999; Abb. A.3). Eine derartige 20 bp umfassende regulatorische Erkennungssequenz konnte bisher nur strangaufwärts von *cepI* identifiziert werden, wo sie mit der -35 Region des Promotors teilweise überlappt. In anderen, potentiell CepR-regulierten Zielgenen wurden bisher keine weiteren *lux* Box-ähnlichen Sequenzen aufgefunden.

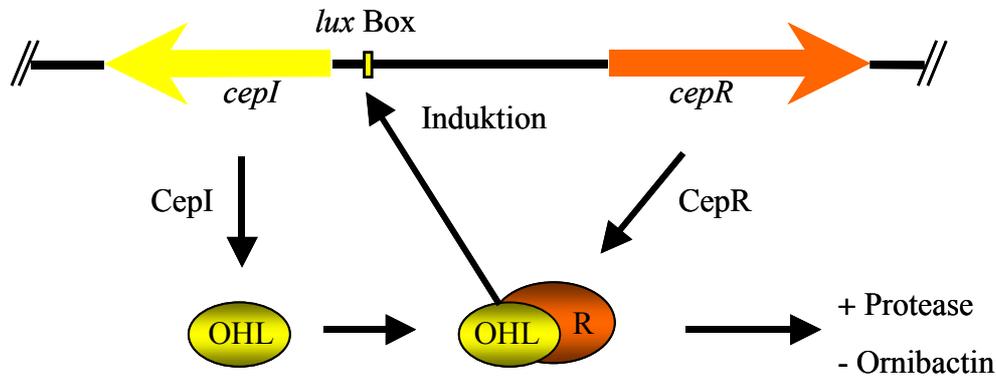


Abb. A.3: Schematische Darstellung des „Quorum Sensing“ Systems in *B. cepacia* Genomovar III K56-2 (LMG 18863) nach Lewenza *et al.* (1999).

A.3 Taxonomische Differenzierung von *Burkholderia cepacia*-ähnlichen Bakterien

Zahlreiche Studien der letzten Jahre belegen, daß die korrekte Identifizierung von *Burkholderia* sp., besonders in der Mukoviszidose-Diagnostik, ein großes Problem darstellt (Henry *et al.*, 1997; Van Pelt *et al.*, 1999; Shelly *et al.*, 2000). Konventionelle, kommerziell erhältliche Identifizierungssysteme wie API 20 NE, RapID NF Plus, Vitek, Microscan, u.ä. können in der Regel eine sichere Identifizierung von Isolaten aus der Sputumkultur nicht gewährleisten (Van Pelt *et al.*, 1999; Shelly *et al.*, 2000). Die Resultate derartiger Testsysteme müssen durch zusätzliche Methoden wie z.B. biochemische oder molekulare Tests abgesichert werden, da eine Identifizierung von *B. cepacia* aufgrund rein phänotypischer Merkmale häufig zu sowohl positiv- als auch negativ-falschen Ergebnissen führen kann (Shelly *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2001). Zum Einen liegt dies an der Existenz phänotypisch sehr ähnlicher Spezies wie *Ralstonia* sp., *Alcaligenes* sp. oder *Pandoraea* sp., die ebenfalls die Lunge von Mukoviszidose-Patienten besiedeln können (Vandamme *et al.*, 1999; Coenye *et al.*, 1999a; 2000). Andererseits haben ausführliche taxonomische Studien zu *B. cepacia*-ähnlichen Bakterien offenbart, daß es sich dabei um eine sehr heterogene Gruppe von Organismen handelt, die nun unter dem Begriff „*B. cepacia* Komplex“ zusammengefasst wird (Vandamme *et al.*, 1997). Dieser Komplex umfasst mindestens sieben eng verwandte genomische Spezies bzw. sogenannte „Genomovare“ (Gillis *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1997; Vandamme *et*

al., 2000; Coenye *et al.*, 2001; Coenye *et al.*, in Druck). Der Begriff Genomovar (Gv.) wurde von Ursing *et al.* (1995) eingeführt, um phänotypisch ähnliche aber genotypisch unterschiedliche Gruppen von Stämmen zu beschreiben. Aufgrund von phänotypischen Differenzierungskriterien konnten kürzlich eigene Speziesnamen für die Genomovare II, IV, V und VII als *B. multivorans*, *B. stabilis* (Vandamme *et al.*, 1997; 2000), *B. vietnamiensis* (Gillis *et al.*, 1995) und *B. ambifaria* (Coenye *et al.*, in Druck) eingeführt werden (Tab. A.1). Die Möglichkeit einfacher differenzierender Tests bezüglich der *B. cepacia* Genomovare I, III und VI steht noch aus, so daß für diese eine Identifizierung des Genomovar-Status derzeit nur mit Hilfe eines komplexen Ansatzes durchführbar ist, der phäno- und genotypische Tests wie Proteinprofil- und Fettsäureanalyse, physiologische Tests, DNS-DNS-Hybridisierung (Vandamme *et al.*, 1997), RAPD „fingerprinting“ (Mahenthiralingam *et al.*, 1996), AFLP (Coenye *et al.*, 1999b), RFLP des 16S rRNS PCR-Produkts und *recA* PCR (Mahenthiralingam *et al.*, 2000a) einbezieht. Da Genomovar I den Typstamm LMG 1222^T beinhaltet, ist der Speziesname *B. cepacia* diesem Genomovar vorbehalten.

<i>Burkholderia cepacia</i> Komplex	
Genomovar (Gv.)	Speziesname
I	<i>B. cepacia</i> (mit Typstamm LMG 1222 ^T)
II	<i>B. multivorans</i>
III (-A/-B)	<i>B. cepacia</i>
IV	<i>B. stabilis</i>
V	<i>B. vietnamiensis</i>
VI	<i>B. cepacia</i>
VII	<i>B. ambifaria</i>

Tab. A.1: Derzeitige Einteilung des *Burkholderia cepacia* Komplexes in Genomovare bzw. Spezies. Die Bezeichnung III (-A/-B) bezeichnet die mögliche Unterteilung von *B. cepacia* Gv. III in zwei Subgruppen aufgrund der Taxonomie von *recA*.

Die Zuverlässigkeit der Identifizierung von *Burkholderia* sp. sowie der Differenzierung innerhalb der verschiedenen Genomovare erscheint äußerst wichtig im Hinblick auf Patientenmanagement und Infektionskontrolle bei Mukoviszidose (LiPuma *et al.*, 1998), da man einen Zusammenhang zwischen Genomovar-Status und pathogenem Potential vermutet (Vandamme *et al.*, 1997; Mahenthiralingam *et al.*, 2000a und b).

A.4 Pathogenität innerhalb des *Burkholderia cepacia* Komplexes

Ursprünglich wurde *B. cepacia* als ubiquitär in Boden und Wasser vorkommendes pflanzenpathogenes Bakterium beschrieben, das Weichfäule in Zwiebeln hervorruft (Burkholder, 1950). Seit den 80er Jahren jedoch haben Vertreter des *B. cepacia* Komplexes als opportunistisch humanpathogene Organismen in immunsupprimierten Patienten und Personen mit Mukoviszidose oder progressiver septischer Granulomatose an Bedeutung gewonnen (Govan und Deretic, 1996; Govan *et al.*, 1996; Govan und Vandamme, 1998). Für Mukoviszidose-Patienten, die an einer genetisch bedingten Dysfunktion der exokrinen Drüsen leiden und durch den daraus folgenden Sekretstau in den Bronchien besonders anfällig für chronische bakterielle Infektionen der Lunge sind, stellt *B. cepacia* inzwischen neben *P. aeruginosa* den wichtigsten Keim dar. Es ist auffällig, daß *B. cepacia* fast ausschließlich als Co-Infektion zu bereits mit *P. aeruginosa* kolonisierten Patienten auftritt, und tatsächlich häufen sich Hinweise auf eine synergistische Wechselwirkung zwischen den beiden Organismen (Saiman *et al.*, 1990; McKenney *et al.*, 1995; Riedel *et al.*, unveröffentlicht). Eine Kolonisierung mit *B. cepacia* kann zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen führen: zu einer chronischen Infektion ohne bzw. mit lediglich einer langsamen Verschlechterung der Lungenfunktion oder in ca. 20 % der Fälle zu einem rapiden Verfall, dem sogenannten „*B. cepacia* Syndrom“ mit tödlichem Verlauf (Isles *et al.*, 1984). Aufgrund der durch einen aktiven Efflux hervorgerufenen Multiresistenz der meisten Vertreter des *B. cepacia* Komplexes gegenüber den üblichen Antibiotika (Burns *et al.*, 1996) ist eine effektive antimikrobielle Therapie fast unmöglich. Zusammen mit der Tatsache, daß höchst infektiöse Stämme wie die ET12-Linie (Johnson *et al.*, 1994) existieren und eine Übertragung durch nosokomiale oder soziale Kontakte bewiesen ist (Govan *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1995), hat dies zu stringenten Maßnahmen - wie z.B. die Abtrennung *B. cepacia*-infizierter Patienten in Rehabilitationszentren - hinsichtlich einer Infektionskontrolle geführt (LiPuma *et al.*, 1998). Alle bisher beschriebenen Genomovare des *B. cepacia* Komplexes vermögen Infektionen in Mukoviszidose-Patienten hervorzurufen (Vandamme *et al.*, 1997; Mahenthiralingam *et al.*, 2000a), wobei bisherige Untersuchungen umfassender Sammlungen von Isolaten implizieren, daß bevorzugt *B. cepacia* Genomovar III aus Mukoviszidose-Patienten isoliert wird und *B. multivorans* (Gv.II) der zweithäufigste Vertreter ist (Vandamme *et al.*, 1997; Mahenthiralingam *et al.*, 2000a). Im Gegensatz dazu scheinen *B. cepacia* Genomovar I und VI, sowie *B. vietnamiensis* und *B. ambifaria* weniger typisch für Infektionen in Patienten mit Mukoviszidose zu sein (Mahenthiralingam *et al.*, 1996; Vandamme *et al.*, 1997; Coenye *et al.*, 2001 und in Druck). Allerdings wurde die Abundanz jedes Genomovars noch nicht ausreichend bestimmt und es

muß bedacht werden, daß möglicherweise Variationen innerhalb verschiedener Patientenspopulationen bestehen. Epidemiologische Studien der letzten Jahre haben gezeigt, daß ebenfalls in erster Linie *B. cepacia* Genomovar III und *B. multivorans* für Epidemie-ähnliche Verbreitungen bei Mukoviszidose-Patienten verantwortlich sind (Vandamme *et al.*, 1997; Mahenthiralingam *et al.*, 2000a und b). Auf der Suche nach molekularen Anhaltspunkten für eine leichte Übertragbarkeit konnte bisher nur „BCESM“ (*B. cepacia* epidemic strain marker) als mutmaßlicher DNS-Marker in *B. cepacia* Genomovar III identifiziert werden (Mahenthiralingam *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 2001), der im Gegensatz zu anderen postulierten genetischen Markern wie dem „cable pilus“ Gen *cblA* (Sajjan *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1995) und bestimmten Insertionselementen (Tyler *et al.*, 1996) tatsächlich spezifisch und konserviert in epidemischen *B. cepacia* Stämmen vorhanden zu sein scheint.

Zu den mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren, die von Vertretern des *B. cepacia* Komplexes synthetisiert werden können, zählen Siderophore (Ornibactin, Cepabactin, Pyochelin und Salicylsäure), Lipase, Protease und verschiedene andere Exoenzyme (Darling *et al.*, 1998; Lonon *et al.*, 1988; McKevitt *et al.*, 1989; Gessner und Mortensen, 1990; Yohalem und Lorbeer, 1994). Die genauen pathogenen Mechanismen, die zur Virulenz von *B. cepacia* beitragen, sind bisher nicht charakterisiert. Es wurde jedoch beschrieben, daß *B. cepacia* z.B. die Apoptose von Phagozyten und die Ausschüttung von Cytokinen induzieren kann (Hutchison *et al.*, 1998; 2000; Palfreyman *et al.*, 1997), sowie die Fähigkeit zur Zellinvasion besitzt (Burns *et al.*, 1996; Martin und Mohr, 2000).

Im starken Kontrast zu der dargelegten pathogenen Relevanz steht der potentielle Einsatz von Vertretern des *B. cepacia* Komplexes zum Abbau von Herbiziden und Pestiziden oder die Verwendung als biologisches Fungizid („biocontrol agent“). Die Tatsache, daß der *B. cepacia* Komplex ein großes gesundheitliches Risiko für Personen mit Mukoviszidose birgt, aber andererseits von wirtschaftlichem Interesse ist, stellt ein schwerwiegendes Problem dar, das kontrovers diskutiert wird (Govan und Vandamme, 1998; Holmes *et al.*, 1998; Govan *et al.*, 2000).

A.5 Ziele der Arbeit

Um Aufschluß über die Verbreitung der AHL-Produktion innerhalb der verschiedenen *B. cepacia* Genomovare zu erlangen, sollten Vertreter des *B. cepacia* Komplexes unterschiedlicher Herkunft hinsichtlich ihrer AHL-Synthese untersucht werden. Darüberhinaus sollte die phänotypische Charakterisierung der Stämme bezüglich Protease-, Lipase-, Chitinase-, und Siderophor-Synthese eine mögliche Korrelation zwischen AHL-Produktion und Synthese von extrazellulären Produkten aufzeigen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sowie die Konstruktion einer definierten, AHL-defizienten *cepI* Mutante sollten zur Identifizierung AHL-regulierter Phänotypen in *B. cepacia* beitragen.

Ferner sollte eine genetische Analyse der *cepIR* Loci aufzeigen, ob Genomovar-spezifische Phänotypen innerhalb des *B. cepacia* Komplexes genotypisch determiniert sind. Dazu sollte in einem ersten Schritt der Nachweis vorhandener *cepIR*-homologer Gene mittels Southern-Blot-Hybridisierung erfolgen. In einem weiteren Schritt sollten *cepI* und *cepR* je eines repräsentativen Vertreters pro Genomovar einer vergleichenden Sequenzanalyse und *cepI* zusätzlich einer funktionellen Analyse unterzogen werden.

B. MATERIAL UND METHODEN

B.1 Bakterien und Plasmide

Tab. B.1: Verwendete Bakterien

Stammbezeichnung	Eigenschaften	Herkunft / Referenz ^b
<i>Burkholderia cepacia</i> Gv.I		
LMG 6963	Boden-Isolat	Australien, 1968; Palleroni <i>et al.</i> , 1981
LMG 1222 ^T	<i>Allium cepa</i> -Isolat	USA, 1948; Palleroni <i>et al.</i> , 1981
LMG 14087	Wundabstrich-Isolat	GB, 1988; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 14095	CF-Isolat	GB, 1974; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 16663 / C1963	CF-Isolat	GB, Hardman
LMG 18821 / CEP509	CF-Isolat	Australien, 1997; Mahenthiralingam <i>et al.</i> , 2000
<i>Burkholderia multivorans</i> , Gv.II		
LMG 13010 ^T	CF-Isolat	Belgien, 1992; Revets <i>et al.</i> , 1996
LMG 16660 / C1576	CF-Isolat, Epidemie-Referenz Glasgow	GB, 1995; Whiteford <i>et al.</i> , 1995
LMG 16665 / C1962	Hirnabszess-Isolat	GB, 1995; Hobson <i>et al.</i> , 1995
LMG 17588 / CEP144	Boden-Isolat	USA; Stanier <i>et al.</i> , 1966
LMG 18822 / C5393	CF-Isolat	Kanada, 1996; Mahenthiralingam <i>et al.</i> , 1996
LMG 18824 / FC0147	CGD-Isolat	Kanada; Speert <i>et al.</i> , 1994
LMG 18825 / CF-A1-1	CF-Isolat, epidemisch	GB, 1998; Millar-Jones <i>et al.</i> , 1998
LMG 18945 / 97/35	CF-Isolat	GB, 1998, Vandamme
R-139 / C1524	CF-Isolat	GB, Vandamme
R-654 / C4297	CF-Isolat	Kanada, Vandamme
R-1914 / C1991	CF-Isolat	GB, Vandamme
R-6268 / H59	CF-Isolat	Tümmler, MHH
R-6269 / H115	CF-Isolat	Tümmler, MHH
R-6275 / H158	CF-Isolat	Tümmler, MHH
R-6278 / H174	CF-Isolat	Tümmler, MHH
R-6284 / H191	CF-Isolat	Tümmler, MHH, 1996
<i>Burkholderia cepacia</i> Gv.III		
LMG 6981	Bronchiallavage-Isolat	1985; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 6988	Beinwunde-Isolat	Schweden, 1972; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 6993	Boden-Isolat	Trinidad, 1960, Vandamme
LMG 12615 / 81/92	CF-Isolat, epidemisch, ET12 Linie	GB, 1992; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 14271 / A3P	CF-Isolat	Belgien, 1993; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 16654 / J415	CF-Isolat	GB, 1984; Glass <i>et al.</i> , 1986
LMG 16655 / C1335	CF-Isolat	GB, 1988, Vandamme
LMG 16657 / C1340	CF-Isolat	GB, Vandamme
LMG 16659 / C1394	CF-Isolat, Epidemie-Referenz Manchester	GB; Simpson <i>et al.</i> , 1994
LMG 18826 / BC7	CF-Isolat, epidemisch, ET12-Linie	Kanada, 1997; Sajjan <i>et al.</i> , 1995
LMG 18827 / C5424	CF-Isolat, epidemisch, ET12-Linie	Kanada, 1996; Mahenthiralingam <i>et al.</i> , 1996
LMG 18863 / K56-2	CF-Isolat, epidemisch, ET12-Linie	Kanada, 1999; Lewenza <i>et al.</i> , 1999
R-651 / C1257	CF-Isolat, epidemisch	Kanada, Vandamme
R-6108 / AD0979	CF-Isolat, epidemisch, ET12 Linie	Neuseeland, Vandamme
R-6274 / H147	CF-Isolat	Tümmler, MHH
R-6282 / H111	CF-Isolat	Tümmler, MHH, 1993
H111-I	Km ^R ; <i>cepI</i> ::Km Mutante von H111	diese Arbeit
H111-R	Km ^R ; <i>cepR</i> ::Km Mutante von H111	Huber <i>et al.</i> , 2001
R-6285 / BC2a	CF-Isolat	GB, Hardman
<i>Burkholderia stabilis</i> , Gv.IV		
LMG 6997	Ohr-Isolat	Schweden, 1974; Vandamme <i>et al.</i> , 2000
LMG 7000	Blut-Isolat	Schweden, 1983; Vandamme <i>et al.</i> , 2000
LMG 14291 / B4P	CF-Isolat	Belgien, 1993; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 18138 / E20	CF-Isolat	Belgien, 1995; Vandamme <i>et al.</i> , 2000
R-136 / J1750	CF-Isolat	USA; Vandamme <i>et al.</i> , 2000
R-3338 / M71-40	CF-Isolat	Deutschland, 1997; Vandamme <i>et al.</i> , 2000
R-6270 / H118	CF-Isolat	Tümmler, MHH

MATERIAL UND METHODEN

Stammbezeichnung	Eigenschaften	Herkunft / Referenz ^b
R-6273 / H145	CF-Isolat	Tümmeler, MHH
R-6276 / H162	CF-Isolat	Tümmeler, MHH
R-6277 / H173	CF-Isolat	Tümmeler, MHH
R-6279 / H177	CF-Isolat	Tümmeler, MHH
R-6280 / H193	CF-Isolat	Tümmeler, MHH
R-6281 / H177E	Wasserabfluss-Isolat	Tümmeler, MHH
R-10033 / H175	CF-Isolat	Tümmeler, MHH, 1996
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> , Gv.V		
LMG 6998	Blut-Isolat	Schweden, 1978; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 6999	Nackenabszess-Isolat	Schweden, 1980; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 10929 ^T	Reisrhizosphäre-Isolat	Vietnam, 1990; Gillis <i>et al.</i> , 1995
LMG 16232	CF-Isolat	Schweden, 1993; Vandamme <i>et al.</i> , 1997
LMG 18835 / CEP40	CF-Isolat	USA; Larsen <i>et al.</i> , 1993
LMG 18836 / FC0441	CGD-Isolat	Kanada, 1997; Mahenthiralingam <i>et al.</i> , 2000
R-128 / J1697	CF-Isolat	USA, Vandamme
R-723 / PC30	CF-Isolat	USA, Vandamme
R-921	CF-Isolat	Schweden, Vandamme
<i>Burkholderia cepacia</i> Gv.VI		
LMG 18941 / FC348	CF-Isolat	USA, 1996, Vandamme
LMG 18942 / PC534	CF-Isolat	USA, 1997, Vandamme
LMG 18943 / AU0645	CF-Isolat	USA, 1998, Vandamme
LMG 18944 / PC688	CF-Isolat	USA, 1997, Vandamme
LMG 18946 / AU0018	CF-Isolat	USA, 1997, Vandamme
<i>Burkholderia cepacia</i> , neues Gv.		
LMG 16670 / J2552	<i>C. palmata</i> -Rhizosphäre-Isolat	GB, Hardman
R-3976 / J2863	Boden-Isolat	GB, Hardman
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>recA thi pro leu hsdR</i> M ⁺ Sm ^R	Kessler <i>et al.</i> , 1992
<i>Escherichia coli</i> MT102	F ⁻ <i>thi araD139, ara-leu</i> Δ7697 Δ(<i>lacIOPZY</i>) <i>galU gal</i> 'K r ⁺ m ⁺ Sm ^R	T. Hansen, Novo Nordisk A/S

MHH: Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

LMG: Laboratorium Microbiologie Gent Culture Collection, Universiteit Gent, Ghent, Belgien

R: "Research collection", Peter Vandamme, Belgien

CF: Zystische Fibrose, Mukoviszidose

CGD: progressive septische Granulomatose

Gv.: Genomovar

^T: Typstamm

Tab. B.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft / Referenz ^b
pCR [®] 2.1-TOPO pRK600	Ap ^R , Km ^R ; <i>lacZα</i> ; Klonierungsvektor Cm ^R ; ColE1 <i>oriV</i> RP4 <i>tra</i> ⁺ RP4 <i>oriT</i> ⁺ ; Helfer-Plasmid für konjugativen Transfer	Invitrogen, Carlsbad, USA Figurski <i>et al.</i> , 1979
pSB403	Tc ^R ; <i>luxRI</i> ':: <i>luxCDABE</i> transkriptionelle Fusion; biolumineszentes AHL-Sensorplasmid	Winson <i>et al.</i> , 1998
pSB1075	Tc ^R ; <i>lasRI</i> ':: <i>luxCDABE</i> transkriptionelle Fusion; biolumineszentes AHL-Sensorplasmid	Winson <i>et al.</i> , 1998
pAS-C8	Gm ^R ; <i>cepRI</i> ':: <i>gfp</i> (ASV) transkriptionelle Fusion; fluoreszierendes AHL-Sensorplasmid	Riedel <i>et al.</i> , eingereicht
pBBR1MCS-5 pEX18Gm	Gm ^R ; <i>mob</i> ⁺ , <i>lacZα</i> ; Klonierungsvektor Gm ^R ; <i>oriT</i> ⁺ , <i>sacB</i> ⁺ ; "gene replacement" Vektor mit MCS von pUC18	Kovach <i>et al.</i> , 1995 Hoang <i>et al.</i> , 1998
pEX19Gm	Gm ^R ; <i>oriT</i> ⁺ , <i>sacB</i> ⁺ ; "gene replacement" Vektor mit MCS von pUC19	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pCarol	Km ^R ; <i>npt</i> -Kassette als <i>Bam</i> HI-Fragment in pGEM-3Zf(+)	Maier, 1999
pBAH33	Gm ^R , Km ^R ; pEX19Gm-Derivat; <i>cepR</i> knock-out Vektor	Huber <i>et al.</i> , 2001
pQE-32	Ap ^R ; His-Tag, T5 Expressionsvektor	Stüber <i>et al.</i> , 1990
pCR- <i>cepI</i> _{H111}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepI</i> mit <i>lux</i> box aus H111 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepI</i> ₁₆₆₆₀	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepI</i> mit <i>lux</i> box aus LMG 16660 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pBBR- <i>cepI</i> _{H111}	Gm ^R ; <i>cepI</i> mit <i>lux</i> box aus H111 als <i>Eco</i> RI-Fragment in pBBR1MC-5	diese Arbeit
pBBR- <i>cepI</i> ₁₆₆₆₀	Gm ^R ; <i>cepI</i> mit <i>lux</i> box aus LMG 16660 als <i>Eco</i> RI-Fragment in pBBR1MC-5	diese Arbeit
pEX-igR	Gm ^R ; intergenerische Region mit <i>cepR</i> ' aus H111 als <i>SacI/EcoRI</i> -Fragment in pEX18Gm	diese Arbeit
pEX-igR- <i>cepI</i> '	Gm ^R ; <i>cepI</i> ' aus H111 als <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI-Fragment in pEX-igR	diese Arbeit
pEX-ko- <i>cepI</i> _{H111}	Gm ^R , Km ^R ; <i>npt</i> -Kassette als <i>Bam</i> HI-Fragment in pEX-igR- <i>cepI</i> ; <i>cepI</i> knock-out Vektor für H111	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> _{1222T}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus LMG 1222 ^T in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> _{13010T}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus LMG 13010 ^T in pCR [®] 2.1-TOPO	Tögl, 2000
pCR- <i>cepIR</i> ₁₄₂₉₁	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus LMG 14291 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> ₁₆₆₆₀	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus LMG 16660 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> ₁₇₅₈₈	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus LMG 17588 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> ₁₈₈₂₂	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus LMG 18822 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> ₁₈₉₄₃	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus LMG 18943 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> _{H111}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus H111 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> _{H191}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus H191 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> _{R-139}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus R-139 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> _{R-921}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus R-921 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepIR</i> _{E8}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepIR</i> aus <i>B. pseudomallei</i> E8 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepI</i> * ₁₆₆₆₀	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepI</i> aus LMG 16660 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepI</i> * ₁₇₅₈₈	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepI</i> aus LMG 17588 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepI</i> * ₁₈₈₂₂	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepI</i> aus LMG 18822 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepI</i> * _{R-139}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepI</i> aus R-139 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepI</i> * _{H191}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepI</i> aus H191 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- <i>cepI</i> * _{13010T}	Ap ^R , Km ^R ; <i>cepI</i> aus LMG 13010 ^T in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pQE- <i>cepI</i> * _{H111}	Ap ^R ; <i>cepI</i> aus H111 in pQE-32	diese Arbeit
pQE- <i>cepI</i> * _{R-921}	Ap ^R ; <i>cepI</i> aus R-921 in pQE-32	diese Arbeit
pQE- <i>cepI</i> * ₁₆₆₆₀	Ap ^R ; <i>cepI</i> aus LMG 16660 in pQE-32	diese Arbeit
pQE- <i>cepI</i> * _{13010T}	Ap ^R ; <i>cepI</i> aus LMG 13010 ^T in pQE-32	diese Arbeit
pQE- <i>cepI</i> ' _{H111}	Ap ^R ; artifizuell verkürztes <i>cepI</i> aus H111 in pQE-32	diese Arbeit
pCR- Δ <i>cepI</i> _{H193}	Ap ^R , Km ^R ; Δ <i>cepI</i> mit <i>lux</i> box aus H193 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit
pCR- Δ <i>cepR</i> _{H111}	Ap ^R , Km ^R ; Δ <i>cepR</i> aus H111 in pCR [®] 2.1-TOPO	diese Arbeit

B.2 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung

B.2.1 Nährmedien

Es wurden ausschließlich durch Autoklavieren sterilisierte Nährmedien verwendet. Die Sterilisation erfolgte in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven bei 121 °C und 1,2 bar Überdruck für 20 min. Hitzelabile Substanzen, wie Hemm- und Zusatzstoffe, wurden sterilfiltriert (Porengröße 0.22 µm, Millipore, Eschborn, D) und anschließend den autoklavierten Lösungen zugegeben. Die eingesetzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. Qualität bezogen. Alle Nährmedien wurden mit destilliertem Wasser zubereitet, zur Verfestigung enthielten sie gegebenenfalls 16 g/l Agar (Gibco BRL, Eggenstein, D).

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

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	4 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
pH	7,4

SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989), modifiziert

Caseinhydrolysat	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ x 6 H ₂ O	0,25 g
Glukose	0,36 g
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
pH	7,0

Soft-Agar

Caseinhydrolysat	1,5 g
Hefeextrakt	0,75 g
NaCl	0,75 g
Agar	1 g
H ₂ O _{dest.}	ad 150 ml
pH	7,4

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

A ₁₀ :	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
	Na ₂ HPO ₄	60 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
	NaCl	30 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
B:	1 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2 ml
	0.5 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.2 ml
	0.01 M FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0.3 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 900 ml

Kohlenstoffquelle:

C:	Natriumcitrat x 2 H ₂ O (Stammlsg. 1 M)	10 mM
G:	Glukose (Stammlsg. 20 %)	0,2 %

Die einzelnen Bestandteile des AB-Minimalmediums wurden separat sterilisiert und nach dem Autoklavieren vereinigt. Für die Herstellung von 1000 ml AB-Minimalmedium wurden 100 ml A₁₀-Lösung mit 900 ml B-Lösung gemischt und als Kohlenstoffquelle -jeweils sterilfiltriert- Natriumcitrat- (*Burkholderia* sp.) oder Glukose (*Escherichia coli*) in der angegebenen Endkonzentration zugegeben.

B.2.2 Indikatormedien

Um *Burkholderia* sp. auf die Synthese bestimmter Exoenzyme und Siderophore zu überprüfen, wurden die Stämme auf entsprechenden Indikatorplatten angezüchtet.

Magermilch-Agar

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	4 g
H ₂ O _{dest.}	ad 500 ml
Magermilch	20 g
H ₂ O _{dest.}	ad 500 ml
pH	6,8

Die beiden Einzelkomponenten wurden getrennt voneinander sterilisiert, da die Magermilch-Komponente nur einer Sterilisation bei max. 1 bar für 10 min unterzogen werden darf. Die Vereinigung der Komponenten erfolgte nach dem Autoklavieren. Proteaseaktivität der zu testenden Stämme wird nach Anzucht bei 30 °C für 48 h durch die Bildung eines klaren Hofes um die Bakterienkolonie angezeigt.

Tributylin-Agar

Tributylin-Fertigagar	20 g
Glyzerintributyrat	10 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Vor dem Autoklavieren wurde der Fertigagar (Merck, Darmstadt, D) zuerst in einem siedenden Wasserbad gelöst und dann das Glyzerintributyrat (Merck KgaA, Darmstadt, D) zugegeben. Das sterilisierte Medium wurde vor dem Plattengießen unter häufigem Schwenken auf ca. 50 °C abgekühlt. Lipaseaktivität der zu testenden Stämme wird nach Anzucht bei 30 °C für 24 h durch die Bildung eines klaren Hofes um die Bakterienkolonie angezeigt.

Chitin-Agar (Connell *et al.*, 1998), modifiziert

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	4 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
pH	7,4
Ethylenglycolchitin (Stammlsg. 1 %)	0,0375 %
Trypanblau (Stammlsg. 1 %)	0,01 %

Nach dem Autoklavieren wurde dem LB-Medium Ethylenglycolchitin (gelöst in H₂O_{bidest.}, sterilfiltriert) und Trypanblau (gelöst in H₂O_{bidest.}) in den angegebenen Endkonzentrationen zugefügt. Beide Zusätze wurden von der Fa. Sigma (Deisenhofen, D) bezogen. Chitinaseaktivität der zu testenden Stämme wird nach Anzucht bei 30 °C für 24 h durch die Bildung eines klaren Hofes um die Bakterienkolonie angezeigt.

Chromazurol S (CAS)-Agar (Schwyn und Neilands, 1987), modifiziert

Zuerst werden die folgenden Einzelkomponenten hergestellt:

10 x LB:	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
	pH	7,4
10 x MM9:	NH ₄ Cl	1 g
	KH ₂ PO ₄	0,3 g
	NaCl	0,5 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
CAS-Stammlsg.:	Chromazurol S	60,5 mg
	H ₂ O _{dest.}	50 ml
	1 mM FeCl ₃ x 6 H ₂ O	10 ml
	Hexadecyltrimethyl- ammoniumbromid (HDTMA)	72,9 mg
	H ₂ O _{dest.}	40 ml

Herstellung der CAS-Stammlsg.: Chromazurol S in H₂O_{dest.} lösen, FeCl₃ x 6 H₂O-Lsg zugeben und mischen, in HDTMA-Lsg einrühren und autoklavieren. 10 x LB und 10 x MM9 ebenfalls getrennt autoklavieren.

PIPES-Agar:	10 x MM9	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	500 ml
	Piperazindiethan- sulfonsäure (PIPES)	31,1 g
	4 N NaOH	pH 6,8
	H ₂ O _{dest.}	ad 850 ml
	Agar	16 g

Herstellung des PIPES-Agar: 10 x MM9 mit H₂O_{dest.} mischen, unter ständigem Rühren PIPES zugeben und pH auf 6,8 einstellen durch langsame Zugabe von 4 N NaOH (PIPES löst sich schwer!), mit H₂O_{dest.} auf 850 ml auffüllen. Nach Zugabe von 16 g Agar autoklavieren und auf ca. 50 °C abkühlen lassen.

Folgende Komponenten zugeben und sofort Platten gießen:

10 x LB (vorgewärmt)	30 ml
Glukose 20 %	10 ml
1 M MgSO ₄	2 ml
1 M Na ₂ SO ₄	2 ml
0,1 M CaCl ₂	1 ml
CAS-Stammlsg. (vorgewärmt)	100 ml

Die Platten müssen einen blauen Farbton aufweisen. Die Produktion von Siderophoren der zu testenden Stämme wird nach Anzucht bei 30 °C für 24 h durch einen Farbumschlag nach rot-orange um die Bakterienkolonie herum angezeigt.

B.2.3 Hemm- und Zusatzstoffe

Zur Herstellung von Selektivmedien und zur Plasmidstabilisierung bei der Kultivierung plasmidhaltiger Stämme wurden die in Tab. B.3 aufgeführten Antibiotika (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) in den entsprechenden Endkonzentrationen verwendet. Um eine blau/weiß Farbselektion von Rekombinanten in Anwesenheit des LacZ α Peptids zu ermöglichen, wurde das Festmedium mit X-Gal (Merck KGaA, Darmstadt, D) in einer Endkonzentration von 40 μ g/ml versetzt.

Für die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* wurde der induzierbare Expressionsvektor QIAexpress[®] pQE-32 (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Induktion des über *lac*-Operator-Sequenzen regulierten T5-Promotors erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase bei OD₆₀₀ von ca. 0,2 durch Zugabe von 2 mM IPTG Endkonzentration (Merck KGaA, Darmstadt, D). Die Kulturen wurden weiterinkubiert und nach ca. 4 h geerntet.

Tab. B.3: Hemm- und Zusatzstoffe

Medienzusatz	Abk.	Endkonzentration		Lösungsmittel
		<i>E. coli</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	
Ampicillin	Ap	100 µg/ml		H ₂ O _{bidest.}
Chloramphenicol	Cm	10 µg/ml		Methanol
Gentamycin	Gm	20 µg/ml	25-50	H ₂ O _{bidest.}
Kanamycin	Km	50 µg/ml	50-100	H ₂ O _{bidest.}
Tetracyclin	Tc	10-20 µg/ml		Methanol
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid	X-Gal	40 µg/ml		N,N-Dimethylformamid
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactosid	IPTG	0,2-2 mM		H ₂ O _{bidest.}

Die sterilfiltrierten Hemm- oder Zusatzstoffe wurden den autoklavierten Nährmedien nach deren Abkühlung auf ca. 45 °C (Festmedien) oder kurz vor Inokulation (Flüssigmedien) zugegeben. Die Aufbewahrung dieser Medien erfolgte lichtgeschützt und nicht länger als sechs Wochen.

B.2.4 Kultivierung, Zellernte und Bestimmung der Optischen Dichte

Die Anzucht der aeroben Mikroorganismen erfolgte entweder auf agarhaltigen Nährböden in Petrischalen oder als Flüssigkultur auf einem Rundschüttler in Reagenzgläsern bzw. in Erlenmeyerkolben. Alle *Burkholderia* sp. wurden bei 30 °C kultiviert, *E. coli* Stämme bei 37 °C.

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

B.2.5 Stammhaltung

Auf festen Nährmedien kultivierte *Burkholderia* sp. wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und jede Woche überimpft, *E. coli* Stämme bei 4 °C bis zu sechs Wochen gelagert. Als Schutz vor Austrocknung und Sekundärinfektion diente ein Verschluss der Petrischalen mit Parafilm.

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

B.3 Nachweis von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen mit bakteriellen Reportersystemen

B.3.1 Bakterielle Reportersysteme

Die Produktion von AHL-Molekülen durch Stämme des *B. cepacia* Komplexes wurde mithilfe verschiedener Biosensoren untersucht. Diese Sensoren sind derartig konstruiert, daß die Anwesenheit von AHL-Molekülen eine sichtbare Reaktion induziert. Als Reportergene dienen entweder die Biolumineszenzgene *luxCDABE* oder das *gfp*-Gen für die Expression des grün fluoreszierenden Proteins „Gfp“. Jeder der Sensoren besitzt die Fähigkeit, aufgrund der entsprechenden Spezifität des LuxR Homologen, bestimmte AHL-Moleküle zu detektieren.

B. 3.1.1 Sensorplasmide pSB403 und pSB1075 (Winson *et al.*, 1998)

Die Reporterfunktion der Sensorplasmide pSB403 und pSB1075 basiert auf der Anwesenheit der Biolumineszenzgene *luxCDABE* von *Photobacterium luminescens*. Die bakterielle Luziferase wird aufgrund ihrer nicht-invasiven und nicht-destruktiven Eigenschaften gerne als Reportersystem für Genexpressionsstudien verwendet. Sie besteht aus zwei ungleichen Untereinheiten α und β , die von den Genen *luxA* und *luxB* kodiert werden. Die Gene *luxC*, *luxD* und *luxE* kodieren für Proteine, welche Tetradekansäuren aus dem Fettsäurebiosyntheseweg abzweigen und in langkettige Aldehyde umwandeln, die bei der Lumineszenzreaktion als Substrat dienen (Meighen *et al.*, 1994). Die Luziferase oxidiert diese Substrate zusammen mit FMNH₂ in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und es entsteht dabei ein angeregtes, instabiles Zwischenprodukt (4a-Hydroxyflavin), das seine Anregungsenergie durch die Emission von Photonen abbaut (Wilson *et al.*, 1998).

Das Sensorplasmid pSB403 enthält das *luxR* Gen von *Vibrio fischeri* zusammen mit der *luxI* Promotorregion als transkriptionelle Fusion zu den Genen *luxCDABE* von *P. luminescens*. Da das Quorum Sensing System von *V. fischeri* auf *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-HSL (3-Oxo-C6-HSL) beruht, zeigt das Sensorplasmid die höchste Sensitivität gegenüber diesem AHL-Molekül und nahe verwandten AHLs wie z.B. *N*-Hexanoyl-L-HSL (C6-HSL).

In Analogie liegt bei dem Sensorplasmid pSB1075 eine transkriptionelle Fusion der relevanten Komponenten des *lasIR* Operons von *P. aeruginosa* mit *luxCDABE* vor. Somit besitzt dieser Sensor die höchste Sensitivität gegenüber *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-HSL (3-Oxo-12-HSL), spricht aber auch spezifisch auf AHL-Moleküle mit einer Acyl-Seitenkettenlänge von C10 und C14 an. Es handelt sich hierbei also um einen Sensor für ausschließlich „langkettige“ AHLs. Da jedoch pSB1075 nicht deutlich sensitiver auf diese langkettigen AHLs reagiert als pSB403 (Geisenberger *et al.*, 2000), wurde letzterer für die Routine-Analyse eingesetzt.

B.3.1.2 Sensorplasmid pAS-C8 (Steidle, 2000)

Bei dem Sensorplasmid pAS-C8 handelt es sich um ein Derivat des Plasmids pBBR1-MCS5. Im Gegensatz zu den Sensorplasmiden der pSB-Reihe beruht die Reporterfunktion hier auf dem grün fluoreszierenden Protein (Gfp) aus *Aequorea victoria*. Bei dem verwendeten Gfp handelt es sich um eine sogenannte 'red-shifted' Gfp-Variante (RS-Gfp), die mit einem Absorptionsmaximum von 500 nm und einem Emissionsmaximum von 511 nm ein etwa 20-fach stärkeres Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Wildtyp-Gfp aufweist. Um für Genexpressionsstudien eine möglichst sensitive AHL-Nachweisempfindlichkeit zu gewährleisten, wurde bei der Konstruktion des Sensors zudem eine spezielle, instabile RS-Gfp-Modifikation gewählt, die durch Veränderungen am C-Terminus des Proteins Bindungsstellen für endogen

vorhandene Proteasen aufweist. Dies führt in *E. coli* zu einer Verringerung der Halbwertszeit des Gfp-Proteins von ursprünglich mehr als 24 h auf ungefähr 45 min (Andersen *et al.*, 1998). Für die Erlangung der AHL-Sensorfunktion liegt *cepR* in Verbindung mit der translationalen Fusionseinheit *cepI* Promotor - *gfp* Gen vor. Als Konsequenz besitzt der Sensor die höchste Sensitivität gegenüber *N*-Octanoyl-L-HSL (C8-HSL), da es sich dabei um die Hauptkomponente des „Quorum Sensing“ Systems von *B. cepacia* handelt.

B.3.2 Identifizierung AHL-produzierender Bakterien mittels Kreuzstrich-Assay

Mit dieser Technik wurden Stämme des *B. cepacia* Komplexes durch senkrechtes Ausstreichen gegen einen der biolumineszenten AHL-Sensoren auf einer LB-Agarplatte hinsichtlich AHL-Produktion getestet. Dies ist möglich, da AHL-Moleküle frei durch den Agar diffundieren und somit den Biosensor aktivieren können. Um ein homogenes Wachstum des Sensorstamms zu erreichen, wurde die Spitze einer sterilen 1 ml Glaspipette mit einer exponentiell gewachsenen Flüssigkultur benetzt und die anhaftende Flüssigkeit auf einem ca. 1 cm breiten Streifen über die Mitte einer Agarplatte verteilt. Sobald die aufgetragene Flüssigkeit vollständig angetrocknet war, wurden die zu testenden Bakterienstämme mit einer Impföse rechtwinklig zum Sensorstamm ausgestrichen. Um eine gegenseitige Wachstumsbehinderung der Stämme auszuschließen, wurde darauf geachtet, die Teststämme zwar in unmittelbarer Nähe, aber ohne direkten Kontakt zum Sensorstamm aufzubringen. Bei dem Assay konnte auf die Zugabe von entsprechenden Antibiotika für die Reportersysteme in die LB-Agarplatten verzichtet werden, da die jeweiligen Plasmide ausreichend stabil sind.

Die Agarplatten wurden bei 30 °C inkubiert und nach 24 h und 48 h ausgewertet. Zur Detektion der Biolumineszenzsignale wurde eine ultrasensitive Photonenkamera verwendet. Dieses zweiteilige Detektionssystem besteht aus einem Photomultiplier und der CCD-Kamera C2400-40 (Hamamatsu, Herrsching, D). Im Photomultiplier erfolgt die Erfassung einzelner Photonen an einer Photokathode, deren Signale nach Verstärkung über eine Anode zur CCD-Kamera weitergeleitet werden. Über diese Kamera ist es möglich, mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ARGUS20/HPD-CP (Version 5.1) Aufnahmen in digitalisierter Form zu erhalten. Das Kamerasystem wurde auf eine lichtdichte 'Darkbox' (Unit1, DK) montiert, um störendes Licht aus der Umgebung auszuschließen.

B.3.3 Nachweis von AHL-Molekülen mittels Mikrotiterplatten-Assay

Der Mikrotiterplatten-Assay eignet sich zum schnellen Nachweis von AHL-Molekülen in Überständen von stationär gewachsenen Bakterienkulturen. Der entsprechende Sensorstamm wurde in LB-Medium unter Selektionsdruck bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert und je 100 µl der Bakteriensuspension in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde, DK) vorgelegt. In die erste Kavität einer Reihe wurden dann 100 µl des zu testenden sterilfiltrierten Überstandes pipettiert, gründlich gemischt und 100 µl davon in die jeweils nächste Kavität weitergegeben. Auf diese Weise wurde eine Verdünnungsreihe der Probe angefertigt. Die Platten wurden, je nach verwendetem Sensor, 3-4 h (*lux*-Sensor) bzw. 6 h (*gfp*-Sensor) bei 30 °C inkubiert. Zur Detektion der induzierten Biolumineszenz wurde die Photonenkamera verwendet (vgl. B.3.2). Durch Vergleich mit der Lichtemission von parallel mitgeführten synthetischen AHLs bekannter Konzentration war zusätzlich optisch eine quantitative Einschätzung möglich. Die Detektion der induzierten Fluoreszenz, abgegeben von den Sensorzellen bei 515 nm, erfolgte mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät Lambda fluoro 320 Plus (MWG Biotech, Ebersberg) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=474$ nm.

Dieses Verfahren ermöglichte durch die quantitative Auswertung der emittierten relativen Fluoreszenz (RFL) eine vergleichende Quantifizierung der AHL-Produktion.

B.3.4 Identifizierung von AHL-Molekülen mittels Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Bei dieser Technik ist eine genauere Charakterisierung bzw. Identifizierung der vorhandenen AHLs möglich, da die AHL-Moleküle vor der Detektion entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Zu diesem Zweck werden die AHLs aus zellfreiem Kulturüberstand extrahiert und aufkonzentriert, mittels DC aufgetrennt und schließlich auf der DC-Platte mithilfe von Sensorbakterien visualisiert.

B.3.4.1 Isolierung von AHL-Molekülen aus Zellkulturüberstand

Die AHL-Extrakte der zu untersuchenden Bakterienstämme wurden aus 250 ml Zellkulturüberstand gewonnen. Der zellfreie Überstand wurde nach dem Zentrifugieren in einen 1000 ml Scheidetrichter überführt und 100 ml Dichlormethan (Merck, Darmstadt, D) zugegeben. Beide Flüssigkeiten wurden durch kräftiges Schütteln ca. 2 min lang gründlich durchmischt. Aus Sicherheitsgründen (Explosionsgefahr!) wurde der Schüttelkolben nach jeweils ca. 20 sec belüftet, um einen ausreichenden Druckausgleich zu gewährleisten. Sobald sich beide Phasen deutlich voneinander getrennt hatten, wurde die untere Dichlormethan-Phase in einem 500 ml Erlenmeyerkolben aufgefangen. Die obere, wässrige Phase wurde erneut mit Dichlormethan gemischt, wie oben beschrieben behandelt, und schließlich wurden beide Extrakte vereinigt. Verschlepptes Wasser konnte durch Zugabe von wasserfreiem Magnesiumsulfat (Sigma, Steinheim, D) aus der organischen Phase entfernt werden. Dazu wurde der Dichlormethan-Wasser-Emulsion unter kräftigem Rühren soviel Trockenmittel zugegeben (einige Eßlöffel), bis sich die organische Phase vollständig klärte. Die über 3 MM Whatman-Papier (Whatman, Maidstone, GB) gefilterten Extrakte wurden dann im Rotations-evaporator (Heidolph, D) bei einer Wasserbadtemperatur von 42 °C ohne Anlegen eines Vakuums eingedampft und der Rückstand in 250 µl Ethylacetat (Merck, Darmstadt, D) aufgenommen.

B. 3.4.2 Auftrennung von AHL-Molekülen mittels DC

Die Dünnschicht- oder Planarchromatographie stellt ein chromatographisches Verfahren dar, bei dem ein Sorptionsmittel als stationäre Phase, ein Lösungsmittel oder auch Lösungsmittelgemisch (häufig Laufmittel genannt) als mobile Phase und die Probenmoleküle beteiligt sind. Die stationäre Phase befindet sich bei der beschriebenen Adsorptionschromatographie als dünne Schicht auf einem geeigneten Träger, wie z.B. Glas. An dieser Schicht erfolgt die Trennung durch Elution der Probe mit dem Laufmittel. Für eine verbesserte Auftrennung hydrophober Substanzen wird die sogenannte Umkehrphasen-Chromatographie verwendet, da hier unpolare Substanzen stärker zurückgehalten werden. Bei dieser Modifikation kommt folglich im Gegensatz zur üblichen Adsorptionschromatographie eine unpolare stationäre Phase zum Einsatz. Die mobile Phase dagegen ist polar.

Zur Auftrennung der extrahierten AHLs wurden Umkehrphasen-DC-Platten (RP-18 F_{254s}, 20x20 cm, Merck, Darmstadt, D) verwendet. Entlang einer Auftragslinie wurden 1,5 cm entfernt vom unteren Rand und von den beiden Seitenrändern der DC-Platte im Abstand von ca. 2 cm zwischen 0,3 µl und 30 µl der Proben aufgetropft und mit einem kalten Luftstrom getrocknet. Die Auftrennung der unterschiedlichen AHL-Moleküle fand bei Kammerfüllung

in einer DC-Trogkammer statt. Die Seitenwände der Kammer wurden dazu mit 1 MM Whatman-Papier (Whatman, Maidstone, GB) ausgekleidet und der Boden max. 1 cm hoch mit dem Laufmittel, bestehend aus 60 % Methanol und 40 % H₂O_{dest.}, bedeckt. Die abgeschlossene Sättigung der Kammer mit Lösungsmitteldampf konnte am Auftreten von Kondensattropfen am Kammerdeckel erkannt werden. Die DC-Platte konnte nun in die Kammer gestellt werden, wobei zu beachten war, daß die Auftragslinie der Proben deutlich über dem Flüssigkeitsspiegel lag. Die hier beschriebene Kombination von DC-Platte und Laufmittel benötigte ca. 4 h bis die Lösungsmittelfront den oberen Rand der DC-Platte in ca. 2 cm Entfernung erreicht hatte. Die Platte wurde dann aus der Kammer genommen, die exakte Höhe der Lösungsmittelfront markiert und anschließend mit kalter Luft getrocknet. Die beschickte DC-Platte konnte gegebenenfalls in Frischhaltefolie eingewickelt bei -20 °C gelagert werden. Da die chemisch modifizierte Schicht der verwendeten DC-Platten eine fluoreszierende Substanz enthält, ist es möglich, die erfolgreiche Auftrennung der UV-Licht absorbierenden AHL-Moleküle mit Hilfe einer UV-Handlampe ($\lambda=254$ nm) zu überprüfen.

B.3.4.3 Detektion von AHL-Molekülen mit Sensorbakterien

Zur Visualisierung der Position der unterschiedlichen AHL-Moleküle auf der DC-Platte wurde diese mit einer dünnen Schicht aus Softagar, beimpft mit dem Sensorstamm *E. coli* MT102 (pSB403), überlagert. Die DC-Platte wurde dazu in einen speziell angefertigten Plexiglasrahmen, der zuvor mit Küchenfolie ausgelegt worden war, eingesetzt und mit Hilfe einer nivellierbaren Unterlage horizontal ausbalanciert. Anschließend wurden 10 ml der exponentiell gewachsenen Sensorkultur dem max. 45 °C warmen Softagar zugegeben und gemischt, ohne dabei Luftblasen zu erzeugen. Es wurde dann gerade soviel von dem flüssigen Agar über die DC-Platte gegossen, daß ein ca. 3 mm dicker Film die gesamte Plattenoberfläche bedeckte. Beim Überschichten war darauf zu achten, kein Kieselgel von der Plattenoberfläche abzulösen. Das Ausgießen des Agars erfolgte daher stets vom Rand der DC-Platte her aus möglichst geringer Höhe. Kleinere Luftblasen konnten durch kurzes Abflammen mit der Bunsenbrennerflamme entfernt werden. Sobald sich der Agar verfestigt hatte, wurde die DC-Platte aus dem Rahmen genommen und in einer Kunststoffbox, die mit befeuchtem Küchenpapier ausgelegt worden war, bei 30 °C inkubiert.

Das Sensorplasmid pSB403 zeigte nach ca. 12 h Inkubation bei 30 °C die stärkste Lichtemission. Bei längerer Kultivierung wurden die Signale zunehmend diffuser und somit schwieriger zu unterscheiden. Zur Dokumentation der biolumineszenten Flecken wurde die DC-Platte luftblasenfrei in Küchenfolie eingewickelt und für ca. 5 min ein Röntgenfilm (X-Ray-90, AGFA-Gevaert, München, D) aufgelegt. Der belichtete Röntgenfilm wurde dann - gemäß den Herstellerangaben auf den verwendeten Chemikalien- (Adefo-Chemie, Nürnberg, D) entwickelt und fixiert.

Für eine Identifizierung der detektierten AHL-Moleküle wurde der jeweilige R_f -Wert („retention factor“) der Signale auf der DC-Platte bzw. dem Röntgenfilm ermittelt. Der R_f -Wert ist definiert als das Verhältnis der Wanderungsgeschwindigkeit v einer Substanz i zur Wanderungsgeschwindigkeit des Laufmittels v_M bzw. das ihrer Laufstrecke z_i zur Laufstrecke des Laufmittels (= Abstand Start - Laufmittelfront). Da selbst unter konstanten Bedingungen die R_f -Werte bei der konventionellen DC leicht schwanken können, wurden zum Vergleich stets synthetische Referenz-AHLs mit bekanntem R_f -Wert und Konzentration mitgeführt. Somit war zusätzlich eine quantitative Abschätzung möglich.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten synthetischen AHLs wurden überwiegend von der Arbeitsgruppe Williams (University of Nottingham, UK) nach der von Chhabra *et al.* (1993) beschriebenen Methode hergestellt. Außerdem wurden die AHLs mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und ihre Struktur durch Massenspektroskopie und NMR-Spektroskopie

bestätigt. Einige der Pheromonanaloga können seit kurzem über die Firma Fluka Chemie AG (Buchs, CH) bezogen werden.

B.4 Nachweis von Biofilmformation

Das Vermögen von *Burkholderia* Stämmen, einen Biofilm auszubilden, wurde mit leichten Modifizierungen so untersucht wie kürzlich von O'Toole und Kolter (1998) bzw. Pratt und Kolter (1998) beschrieben. Für den Assay wurden die Stämme in Polystyrol-Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen, D) in 100 µl ABC-Medium angeimpft und 48 h bei 30 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden gegen Verunreinigungen und Austrocknung mit Küchenfolie oder Parafilm geschützt. Vorhandene Biofilmformation konnte durch Anfärben der in den Kavitäten adhäsieren Zellen mit Kristallviolett nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde zuerst das Medium vorsichtig abpipettiert und dann 100 µl einer 1 % (w/v) wässrigen Lösung von Kristallviolett zugefügt. Nach einer Färbezeit von ca. 20 min bei RT wurde die Farblösung entfernt und die Mikrotiterplatten vorsichtig und sorgfältig mit H₂O_{dest.} gewaschen. Da die auftretende Farbintensität der Stärke an gebildetem Biofilm entspricht, ging normalerweise bereits optisch aus dem Assay hervor, ob ein Biofilm gebildet worden war. Die Mikrotiterplatten können lichtgeschützt gelagert werden. Für eine anschließende quantitative Auswertung der Biofilmformation wurde das in den Zellaggregaten angereicherte Kristallviolett mit einem 80:20 (v/v) Ethanol/Aceton Gemisch in Lösung gebracht und die Absorption bei einer OD_{570 nm} photometrisch vermessen. Der Wert der optischen Dichte korreliert mit der Menge des gelösten Farbstoffs und folglich mit der Stärke des gebildeten Biofilms.

B.5 Molekulargenetische Methoden

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

B.5.1 Isolierung von DNS

B.5.1.1 Schnelltest zur Isolierung chromosomaler DNS

Das Prinzip dieser schnellen Präparation kleiner Mengen an chromosomaler DNS ist der Zellaufschluß durch alkalische Lyse in Gegenwart von Detergenz. Die chromosomale DNS (sowie die RNS) wird von den vorhandenen Zellresten und denaturierten Proteinen mittels organischer Extraktion und anschließender Ethanol-fällung abgetrennt. Die auf diese Weise isolierte DNS ist qualitativ nicht hochwertig, da sie oftmals Verunreinigungen enthält. Um die Ausbeute bei der Isolierung von chromosomaler DNS aus *Burkholderia* sp. zu optimieren, war darauf zu achten, daß die verwendeten Kulturen bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 geerntet wurden.

Lösungen:

Saline-EDTA-Puffer	0,15 M NaCl 0,01 M EDTA pH 8,0
Natriumacetat-Lösung	5 M Natriumacetat
SDS-Lösung	25 % (w/v) Natriumdodecylsulfat nicht autoklaviert
Chisom	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v)
Chloroform/Phenol	1:1 (v/v)
Ethanol	70 % EtOH und EtOH _{abs.} , jeweils eiskalt
Lysozym-Puffer	100 mM Tris/HCl 50 mM EDTA pH 8,0
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Hühnerei-Lysozym ad 1 ml Lysozym-Puffer
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml Proteinase K

RNase-Lösung

RNase-It™ Cocktail 1000 U/ml (Stratagene, Heidelberg)

Durchführung:

- 2-10 ml Flüssigkultur 10 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 500 µl Saline-EDTA resuspendieren
- 40 µl Lysozym- und 2 µl Proteinase K-Lösung zugeben und 45 min bei 37 °C inkubieren
- 40 µl SDS-Lösung (25 % ig) zufügen und bei 60 °C inkubieren bis deutliche Lyse erfolgt (mind. 10 min)
- mit 190 µl Na-Acetat und 750 µl Chisom mischen und 30 min bei 14000 rpm (Kühlzentrifuge, 4 °C) zur Phasentrennung zentrifugieren
- obere, wässrige Phase vorsichtig (mit abgeschnittener gelber Pipettenspitze) in neues ERG überführen und mit 2 Vol. eiskaltem EtOH_{abs.} versetzen
- chromosomale DNS mind. 10-60 min bei -20 °C fällen
- DNS 15 min bei 14000 rpm (4 °C) abzentrifugieren, ÜS verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70 %igem EtOH waschen, erneut zentrifugieren (s. o.), ÜS verwerfen
- Pellet trocknen (z.B. 10 min in der Sterilbank)
- DNS in 100 µl H₂O_{bidest.} aufnehmen
- 1.5 µl RNase zusetzen und 45 min bei 37 °C inkubieren
- mit 100 µl Chloroform/Phenol ausschütteln, 15 min bei 14000 rpm zur Phasentrennung zentrifugieren
- obere Phase vorsichtig abheben, mit 1/9 Vol. Na-Acetat und 2.5 Vol. EtOH_{abs.} versetzen
- chromosomale DNS mind. 10-60 min bei -20 °C fällen, abzentrifugieren und mit 70 %igem EtOH waschen (s. o.)
- Pellet trocknen (s. o.)
- in 50-100 µl H₂O_{bidest.} aufnehmen und bei 4 °C lagern

B.5.1.2 Isolierung chromosomaler DNS mit dem DNeasy™ Tissue Kit

Für die Gewinnung hochwertiger chromosomaler DNS wurde das kommerziell verfügbare Isolierungskit *DNeasy™ Tissue Kit* der Fa. QIAGEN (Hilden, D) verwendet. Alle benötigten Puffer und Lösungen werden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Prinzip der Isolierungsmethode ist der Zellaufschluß durch alkalische Lyse und eine anschließende DNS-Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an einer Silica-Gel-Membran. Eine organische Extraktion oder Ethanol-fällung der DNS ist nicht nötig. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben gemäß beigefügtem Handbuch.

B.5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS nach Zhou *et al.* (1990, modifiziert)

Diese schnelle Präparation kleiner DNS-Mengen für analytische Zwecke beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Zellreste, denaturierte Proteine und chromosomale DNS werden durch Zentrifugation pelletiert. Die Plasmid-DNS (sowie die RNS) wird anschließend mit Ethanol gefällt und ist qualitativ nicht hochwertig.

Lösungen:

TENS-Lösung

10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA
100 mM NaOH

	0,5 % (w/v) SDS
NaCl-Lösung	0,9 % (w/v) NaCl
Natriumacetat-Lösung	5 M Natriumacetat pH 5,2
Ethanol	70 % EtOH und EtOH _{abs.} , jeweils eiskalt

Durchführung:

- dicke Spatelspitze ÜN gewachsener Bakterien von Selektivplatte abnehmen und in 100 µl NaCl-Lösung in ERG resuspendieren
- 300 µl TENS-Lösung zugeben und kurz vortexen
- 150 µl Natriumacetat-Lösung zugeben und kurz vortexen
- 2 min bei 14.000 rpm zentrifugieren, ÜS in neues ERG überführen
- 900 µl eiskalten EtOH_{abs.} zugeben und gut mischen
- 2 min bei 14.000 rpm zentrifugieren, ÜS verwerfen
- Pellet mit eiskaltem 70 %igen EtOH zweimal waschen, zentrifugieren (s. o.), ÜS jeweils verwerfen
- Pellet trocknen (z.B. 10 min in Sterilbank)
- in 20-40 µl H₂O_{bidest.} resuspendieren
- ca. 1/10 des Gesamtvolumens für Analyse einsetzen

B.5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNS mit QIAprep Spin Isolierungskits

Für die Gewinnung hochwertiger Plasmid-DNS für präparative Zwecke (DNS-Sequenzierung, Klonierung) wurden die kommerziell verfügbaren Plasmid-Isolierungskits *QIAprep Spin Miniprep* bzw. *Midiprep* der Fa. QIAGEN (Hilden, D) verwendet. Alle benötigten Puffer und Lösungen werden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Prinzip der Isolierungsmethode ist der Zellaufschluß durch alkalische Lyse und eine anschließende DNS-Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Die Präparation erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers gemäß beigefügtem Handbuch.

B.5.2 Aufreinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNS

B.5.2.1 Reinigung von DNS durch Tropfdialyse

Zur Entfernung störender Salze aus DNS-Lösungen geringer Volumina (bis 30 µl) wurde diese für ca. 20 min auf einer Membran (Porendurchmesser 0,025 µm; Millipore) gegen H₂O_{bidest.} dialysiert. Die aufgetropfte DNS-Lösung verliert die enthaltenen Salze und nimmt Wassermoleküle auf, d. h. es kommt zu keiner Konzentrierung der DNS.

B.5.2.2 Reinigung und Konzentrierung von DNS durch Ethanolfällung

Zur Konzentrierung von DNS-Lösungen bzw. zur Entfernung unerwünschter Salze diente eine Fällung der DNS mit EtOH und anschließende Aufnahme in gewünschtem Puffer.

Durchführung:

- DNS-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH = 4,5) aufsalzen und vortexen
- 2 - 3 Vol. eiskalten EtOH_{abs} zugeben, mischen, bei -20 °C ca. 30 min inkubieren (je länger die Inkubationszeit, desto mehr Kopräzipitation von Salzen)
- 30 min zentrifugieren (14000 rpm, 4 °C)
- ÜS vorsichtig abheben, Pellet mit 0,5 ml eiskaltem 70 %igen EtOH waschen (14000 rpm, 4 °C, 5 min)
- Pellet ca. 10 min in der Vakuumzentrifuge oder länger bei RT trocknen
- Pellet für längere Aufbewahrung in TE oder für anschließende Ligation, Transformation o.ä. in H₂O_{bidest.} lösen

B.5.2.3 Reinigung von DNS durch Phenolextraktion

Zur Entfernung störender Proteine wurden DNS-Lösungen einer Phenolbehandlung unterzogen. Die anschließende Extraktion mit einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 ("Chisom") diente zur Entfernung der Phenolreste aus der wässrigen DNS-Lösung.

Durchführung:

- DNS-Lösung falls nötig ad 50 µl auffüllen, um Verluste gering zu halten
- mit 1 Vol. einer Mischung aus Phenol (ist zur Äquilibrierung mit TE, pH = 8,0 überschichtet) und Chisom im Verhältnis 1:1 versetzen und gut vortexen
- 5 min bei 14000 rpm zentrifugieren zur Phasentrennung
- untere, organische Phenolphase komplett in frisches ERG überführen und evtl. verschleppte DNS-Reste mit 1 Vol. TE extrahieren (vortexen, zentrifugieren s. o.)
- Phenolphase abziehen und verwerfen, Oberphase mit der wässrigen Phase der ersten Extraktion vereinigen
- vereinigte wässrige Phasen mit 1 Vol. Chisom versetzen, vortexen, zentrifugieren (s. o.)
- untere, organische Phase abziehen und verwerfen
- Chisombehandlung wiederholen
- EtOH-Fällung zur Gewinnung der DNS aus der wässrigen Phase (s. B.5.2.2)

B.5.2.4 Reinigung von DNS durch präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung und anschließender Aufreinigung von DNS-Fragmenten, die in weiteren molekulargenetischen Arbeitsschritten (z.B. Ligation) eingesetzt werden sollten. Sie wurde im Prinzip wie die unter B.5.3.1 beschriebene analytische Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, wobei folgende Punkte im Hinblick auf eine schonende Behandlung der DNS-Probe modifiziert wurden:

- dicke Kämme verwenden wegen größerem Proben-Fassungsvol. (40-50 µl)

- Elektrophorese in frischem 1x TAE-Puffer bei konstanter Stromstärke von nur ca. 80 mA durchführen
- Agarosegel max. 5 min in frischer Ethidiumbromidlösung unter Zugabe von UV-Safe™ (MWG-Biotech, Ebersberg, D) färben, anschließend wässern
- Agarosegel nur kurze Zeit mit UV-Licht bestrahlen und entsprechenden Gelbereich mit sauberem Skalpell ausschneiden
- Überführung des Agarose-Gelstücks in frisches 1.5 ml ERG
- Elution des DNS-Fragments mit kommerziell verfügbaren Aufreinigungskits wie QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, D) oder Prep-A-Gene® DNA Purification Kit (BIO-RAD, München, D) nach Herstellerangaben
- Reinigungseffizienz mit analytischem Agarosegel überprüfen

B.5.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNS mittels Spektralphotometrie

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Die zu vermessende DNS wurde in Quarzküvetten ($d = 1$ cm, Hellma, Mühlheim) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm, sowie für eine Reinheitskontrolle bei $\lambda = 230$ nm und $\lambda = 280$ nm, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ photometrisch bestimmt (Pharmacia LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer, Freiburg, D). Die Berechnung der Konzentration doppelsträngiger DNS ist über folgende Näherung möglich (Cryer *et al.*, 1975):

1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml

Die Bestimmung von Verunreinigungen der DNS erfolgte durch die Bildung der Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bzw. $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$, da Verunreinigungen der DNS mit Protein oder Phenol die Absorption bei 280 nm erhöhen, Verunreinigungen mit RNS dagegen die Absorption bei 230 nm. Für eine nicht verunreinigte DNS-Probe nimmt der Absorptionskoeffizient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ einen Wert größer 2,0 und der Absorptionskoeffizient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ einen Wert größer 1,8 ein (Marmur, 1961).

B.5.3 Analyse von DNS mittels Gelelektrophorese

Die analytische Agarose-Gelelektrophorese dient zur Analyse der DNS bezüglich ihrer Größe und Konzentration. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld zur Anode, wobei eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe erfolgt. Die Migrationsgeschwindigkeit der linearen DNS-Fragmente ist dem Logarithmus ihres Molekulargewichts invers proportional. Je nach Agarosekonzentration und Gellänge kann die optimale Auftrennung bestimmter Fragmentgrößen beeinflusst werden.

B.5.3.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

50x TAE-Puffer 2 M Tris-HCl
 1 M Eisessig
 0.1 M EDTA

ad 1000 ml H₂O_{dest.}

pH 8,8

bei 4 °C aufbewahren, zum Gebrauch 1:50 mit H₂O_{dest.} verdünnen

10x Auftragspuffer 50 % (w/v) Glyzerin
 0.25% (w/v) Bromphenolblau
 0.25% (w/v) Xylencyanol
 50 mM EDTA (pH 8,0)

Alternative: *6x Loading Dye Solution* der Fa. MBI-Fermentas, Vilnius, Litauen

Agarosegel 1,0 - 1,2 % (w/v) Agarose in 100 ml 1x TAE

EtBr-Färbebad 10 ml UV-Save (MWG-Biotech, Ebersberg, D)
 50 µl EtBr-Lösung
 ad 500 ml H₂O_{dest.}

Durchführung:

- Herstellung des Gels: Agarose in 1x TAE-Puffer aufkochen bis klare, homogene Lösung entsteht
- Lösung nach Abkühlen auf Handwärme in abgeklebte Wanne mit Probenkämmen gießen und auf ebener Unterlage bis zur Trübung verfestigen lassen
- Klebestreifen lösen, Wanne mit dem Gel in Elektrophorese-Apparatur einsetzen und mit 1x TAE-Puffer 1-2 mm überschichten
- Kamm erst kurz vor Auftragen der Proben vorsichtig ziehen
- DNS-Proben zu 1/10 mit 10x Auftragspuffer (alternativ: zu 1/6 mit *6x Loading Dye Solution* der Fa. MBI-Fermentas, Vilnius, Litauen) versetzen und in Geltaschen pipettieren
- Elektrophorese bei konstanter Stromstärke von 80-120 mA durchführen
- Elektrophorese beenden, wenn sich Bromphenolblaumarker etwa 1 cm vom Gelende entfernt befindet (Bromphenolblau verhält sich wie ca. 300 bp großes DNS-Fragment, Xylencyanol wie ca. 4000 bp großes DNS-Fragment)

B.5.3.2 Gelanfärbung und Dokumentation

Mithilfe des in Nukleinsäuremoleküle interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (EtBr) ist es möglich, DNS-Fragmente nach Auftrennung in Agarosegelen zu detektieren. Zur Anfärbung wurde das Agarosegel 10-30 min in ein EtBr-Bad (Endkonzentration 1 mg/l H₂O_{dest.}) gelegt und anschließend ca. 5 min in H₂O_{dest.} entfärbt. Die Detektion der DNS-Banden erfolgte unter UV-Licht (λ=302 nm) mittels Transilluminator (Bachofer, Reutlingen, D), die Dokumentation mittels Video-Dokumentationssystem (CS-1, Cybertech, Berlin, D).

B.5.3.3 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNS-Fragmenten

Aufgrund des invers proportionalen Verhaltens der Wanderungsgeschwindigkeit von linearisierten DNS-Fragmenten zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts ist es möglich, die Größe der Fragmente anhand der R_f-Werte von Fragmenten bekannter Größe zu bestimmen. In dieser Arbeit erfolgte die Größenbestimmung durch Vergleich mit dem im

Agarosegel mitgeführten DNS-Längenstandard *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen). Da die Fragmente des Standards, bezogen auf 0,5 µg eingesetzte DNS-Menge, laut Herstellerangaben definierte Massen besitzen, konnten sie außerdem gegebenenfalls zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Die Auswertung erfolgte über einen optischen Vergleich der Bandenintensitäten.

B.5.4 Nachweis von DNS mittels Southern-Blot-Hybridisierung

B.5.4.1 Herstellung einer DIG-markierten Polynukleotidsonde

Zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten Polynukleotidsonde wurde das *Random Primed DNA Labeling Kit* (Boehringer, Mannheim, D) verwendet. Mit dieser Markierungsmethode wird jedes 20. bis 25. Nukleotid durch Einbau von Digoxigenin-11-dUTP mithilfe der Klenow-Polymerase markiert. Template-DNS mit einer Größe von 200 bis 1000 bp kann auf diese Weise effizient markiert werden und somit als Sonde dienen.

Material:

DIG-High-Prime (Boehringer, Mannheim, D)
 0,2 M EDTA, pH 8,0
 Trockeneis-EtOH-Bad

Durchführung:

- 1 µg Template-DNS (gereinigtes PCR-Produkt oder aufgereinigter, präparativer Restriktionsverdau) mit H₂O_{bidest.} ad 16 µl Gesamtvolumen bringen und 10 min in kochendem Wasserbad denaturieren
- anschließend sofort in Trockeneis-EtOH-Bad schockgefrieren
- 4 µl DIG-High-Prime zugeben, mischen und ÜN bei 37 °C inkubieren
- Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA abstoppen und 10 min bei 65°C inkubieren

B.5.4.2 Southern-Blot (Southern, 1975; modifiziert)

Die in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten DNS-Fragmente werden durch aufeinanderfolgende Säure- und Alkalibehandlung fragmentiert und denaturiert. Die so entstandenen einzelsträngigen Teilstücke werden mithilfe einer Posi-Blot Apparatur (Stratagene, Heidelberg, D) durch Überdruck auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und anschließend fixiert, wobei das Bandenmuster des Agarosegels erhalten bleibt.

Lösungen und Material:

Puffer A (Depurinierung)	0,25 N HCl
Puffer B (Denaturierung)	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Puffer C (Neutralisierung)	1 M Tris/HCl 1,5 M NaCl pH 7,5 mit konz. HCl

Waschlösung 1

2x SSC	→ 5 ml 20x SSC
0,1 % SDS	→ 500 µl 10 % SDS
	ad 50 ml H ₂ O _{bidest.}

Waschlösung 2

0,5x SSC	→ 1,25 ml 20x SSC
0,1 % SDS	→ 500 µl 10 % SDS
	ad 50 ml H ₂ O _{bidest.}

1x Blocking

→ 10 ml 10x Blocking
ad 100 ml Maleinsäurepuffer

Detektionspuffer

0,1 M Tris/HCl
0,1 M NaCl
pH 9,5

Farblösung

NBT-Stammlösung	200 µl
	ad 10 ml Detektionspuffer

Antikörper-Lösung

150 mU/ml Anti-DIG-AP-Konjugat	4 µl
	ad 20 ml 1x Blocking

Durchführung:

- außer Maleinsäure- und Detektionspuffer alle Lösungen frisch herstellen
- Hybridisierungslösung nach Hybridisierung entfernen, Membran 2 x 5 min mit je 25 ml Waschlösung 1 bei RT rotierend waschen
- anschließend 2 x 15 min mit je 25 ml Waschlösung 2 bei 68 °C rotierend waschen
- alle folgenden Schritte erfolgen bei RT in Hybridisierungsröhre rotierend: Membran 5 min in 20 ml Maleinsäurepuffer waschen
- Membran 30 min in 100 ml 1 x Blocking-Lösung inkubieren
- Anti-DIG-AP-Konjugat in 1 x Blocking-Lösung auf 150 mU/ml verdünnen und Membran für 30 min in 20 ml Antikörper-Lösung inkubieren
- Membran 2 x 15 min in 100 ml Maleinsäurepuffer waschen
- Membran 2-5 min in 20 ml Detektionspuffer equilibrieren
- Membran in 10 ml frischer Farblösung im Dunkeln inkubieren (Membran muß mit Flüssigkeit bedeckt sein, nicht schütteln!)
- nach Erreichen der gewünschten Farbintensität der Banden (Inkubationszeit 30 min bis ÜN) Reaktion durch Waschen in 50 ml H₂O_{dest.} abstoppen, Membran trocknen
- Ergebnis durch Einscannen der Membran dokumentieren

B.5.4.5 Stripping der Membran

Nach der kolorimetrischen Detektion mit NBT kann eine Nylonmembran - auch nach dem Trocknen - 1 bis 2 mal mit einer anderen Sonde rehybridisiert werden. Zu diesem Zweck müssen vorher das Farbstoffpräzipitat und die gebundenen Sondenmoleküle in einem als „Stripping“ bezeichneten Vorgang entfernt werden.

bei 65 °C für 10 min. Ansonsten mußte die DNS-Probe über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese (s. B.5.2.4) aufgereinigt werden.

B.5.5.2 Dephosphorylierung von linearen DNS-Fragmenten

Um in einem Ligationsansatz intermolekulare gegenüber intramolekularer Ligation zu begünstigen (s. B.5.5.3), kann linearisierte Vektor-DNS vor Einsatz in eine Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps („SAP“, Boehringer, Mannheim, D) bei 37 °C behandelt werden. Die daraus resultierende Dephosphorylierung der 5'-Enden verringert die Wahrscheinlichkeit der Religation durch intramolekulare Phosphodiesterbindung. Da die Puffer der Restriktionsendonukleasen die Aktivität der alkalischen Phosphatase aus Shrimps nicht beeinträchtigen, konnte die Dephosphorylierung einem Restriktionsverdau bei 37 °C direkt angeschlossen werden.

Durchführung:

Einem Restriktionsverdau bei 37 °C werden in der letzten Stunde der Inkubation etwa 10 U SAP pro 0.5 µg linearisierter Vektor-DNS direkt zum Ansatz zugegeben. Ein Zufügen des speziellen SAP-Puffers ist in diesem Fall nicht nötig. Durch anschließende Inkubation bei 65 °C für 15 min konnte die SAP inaktiviert werden. Die Aufreinigung des Ansatzes für weitere Anwendungen erfolgte über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese (s. B.5.2.4). Lag die optimale Inkubationstemperatur des Restriktionsverdaus nicht bei 37 °C, mußte anders vorgegangen werden. Entweder konnte das Restriktionsenzym hitzeinaktiviert werden oder es mußte eine Inaktivierung über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese (s. B.5.2.4) vorgenommen werden, so daß im Anschluß daran jeweils eine Dephosphorylierung bei 37 °C möglich war. In diesem Fall mußte dem Dephosphorylierungsansatz 1/10 Vol. 10x konzentrierter SAP-Puffer zugegeben werden.

B.5.5.3 Ligation von DNS-Molekülen

Die T4-DNS-Ligase (Boehringer, Mannheim, D) ist in der Lage, sowohl kompatible überhängende als auch glatte Enden linearisierter DNS-Fragmente kovalent zu verknüpfen. Dabei kommt es zur Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den freien 3'-OH-Gruppen und 5'-Phosphatgruppen der DNS-Enden.

Durchführung:

- linearisierten Vektor und zu inserierendes DNS-Fragment im molaren Verhältnis 1:3 mischen
- bei kohäsiven Enden 10 min auf 65 °C erhitzen und anschließend auf Eis abkühlen, um Effizienz der Ligation zu erhöhen
- 2 µl 10x Ligasepuffer und Ligase (1 U bei überstehenden Enden, 2 U bei glatten Enden) zugeben, mit H₂O_{bidest.} ad 20 µl auffüllen
- Inkubationsbedingungen: überhängende Enden 2 h bis ÜN bei 16 °C ligieren
 glatte Enden ÜN bis 2 Tage bei RT ligieren
- evtl. nochmals Zugabe von Ligase und Inkubation für weitere 2-4 h bei RT
- Ligationsansatz vor Transformation mittels Elektroporation (s. B.5.7.1) durch Tropfendialyse gegen H₂O_{bidest.} von Salzen befreien (s. B.5.2.1)

Zur Überprüfung des Ligationserfolgs wurde vor und nach der Ligation jeweils ein Aliquot aus dem Ansatz entnommen und beide nebeneinander auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Wurde eine relative Abnahme der Edukte bzw. eine Entstehung von größeren Produkten beobachtet, so hatte Ligation stattgefunden.

B.5.6 Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR (Saiki *et al.*, 1988)

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

Eine zyklische Wiederholung der Einzelschritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) bewirkt eine exponentielle Vermehrung des von den Primerbindungsstellen flankierten DNS-Abschnitts. Auf diese Weise lassen sich spezifische PCR-Fragmente (Amplikons) generieren, die für weitere molekulargenetische Arbeiten, wie z.B. Konstruktion von Vektoren, verwendet werden können. Der gezielte Austausch von Basen bzw. der Einbau von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in den Primern ermöglicht ferner die Herstellung von spezifisch modifizierten Amplikons für entsprechende Aufgabenstellungen.

B.5.6.1 DNS-Polymerasen

Je nach Anforderung wurden verschiedene DNS-Polymerasen verwendet, wobei immer auf die zugehörigen beigefügten Puffer und dNTPs zurückgegriffen wurde. Die optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich $MgCl_2$ -Konzentration, Annealing-Temperatur und Elongationszeit wurden für die jeweilige „template“-DNS empirisch herausgefunden.

- **Taq-Polymerase** (Promega, Wisconsin, USA)

Die Besonderheit dieser DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ist ihre extreme Thermostabilität, denn trotz eines Temperaturoptimums von 74 °C bleibt das Enzym auch nach Inkubation bei 94 °C vollständig funktionsfähig. Da die Taq-Polymerase keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität aufweist, erfolgt die Replikation der DNS-Matrize zwar sehr schnell, aber mit einer vergleichsweise hohen Fehlerrate von 2.6×10^{-5} . Folglich eignet sich diese DNS-Polymerase nicht für DNS-Sequenzierungsreaktionen, sie wurde vor allem bei Kontroll-PCRs angewendet.

- **Taq/Pwo Polymerasengemisch** (Boehringer, Mannheim, D)

Das kommerziell erhältliche *Expand™ High Fidelity PCR System* (Boehringer, Mannheim, D) enthält ein Enzym-Gemisch aus Taq- und Pwo-Polymerase. Die Kombination dieser Enzyme gewährleistet laut Hersteller die Amplifizierung von PCR-Fragmenten bis zu einer Größe von 12 kb. Aufgrund der 3'→5'-Exonukleaseaktivität der Pwo-DNS-Polymerase verringert sich die Fehlerrate auf 8.5×10^{-6} . Folglich wurde dieses Polymerasengemisch für Vektor-konstruktionen (Expressionsvektoren, „gene replacement“-Vektoren) verwendet.

• **TaKaRa Ex Taq™ Polymerase** (TaKaRa, Shuzo Co., Japan)

Die TaKaRa Ex Taq™ Polymerase aus *Thermus aquaticus* wurde für die Amplifikation von großen PCR-Produkten mit einer Länge von mehr als 4 kb entwickelt. Das Enzym weist eine geringe 3' → 5'-Exonukleaseaktivität auf und wurde in erster Linie für DNS-Sequenzierungsreaktionen eingesetzt.

B.5.6.2 PCR-Primer

Die verwendeten PCR-Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg, D) synthetisiert, HPSF (*High purified saltfree*)-gereinigt und in lyophilisierter Form geliefert. Die Primer-DNS wurde in einem Vol. von H₂O_{bidest.} gelöst, daß die Konzentration der so gewonnenen Stammlösung 100 pmol/µl betrug. Die daraus hergestellte Arbeitslösung wies eine Konzentration von 15 pmol/µl auf. Beide Primer-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert. Eine photometrische Konzentrationsbestimmung der Primer-Lösungen erfolgte nach folgender Formel:

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

V_m = MeßVol. (1000 µl)

V_p = ProbenVol. (2 µl)

d = Schichtdicke (1 cm)

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

Die optimale Annealing-Temperatur der Primer ist abhängig von der Länge und Basensequenz der eingesetzten Oligonukleotide und muß empirisch bestimmt werden. Als Faustregel jedoch kann die Temperatur für stringentes Annealing bei 2 - 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) des Primers angesetzt werden, für unstringentes Annealing weitere 10 - 15 °C unter T_m. Die Berechnung von T_m erfolgte näherungsweise nach der „2+4“-Regel nach Suggs *et al.* (1981):

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

Dabei stehen A, T, G und C für die jeweilige Anzahl der Basen im Primer. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, daß sich ein T_m zwischen 50 und 60 °C ergibt.

Tab. B.4: Verwendete PCR-Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	Schnittstelle 5'	Amplikon
cepI-1V	CCCTGTAAGAGTTACCAGTT	-	<i>ΔcepI</i> + <i>lux</i> box
cepI-1R	GATATCGATCCAGCACGCCACGAC	-	(0,62 kb)
cepR-3V	CTGGATGGCGCACTACCAGGC	-	<i>ΔcepR</i> (0,45 kb)
cepR-3R	ACGTGGAAGTTGACCGTCCGC	-	<i>ΔcepR</i> (0,45 kb)
cepIR-V	GGAAACGCGCGTTCCGGCTCAGGCGGCGATAGC	-	<i>cepIR</i> (2,16 kb)
cepIR-R	CGTGAGCTGGACCGCGAAGGAAGCGGAGCC	-	<i>cepIR</i> (2,16 kb)
cepI-4V	ACGACGCGCCCCGTATCTGC	-	<i>ΔcepI</i> (0,26 kb)
cepI-4R	TGCGCGTGTATGCCGATCC	-	<i>ΔcepI</i> (0,26 kb)
cepI-0V	ATGCAGACCTTCGTTACAGAGG	-	<i>cepI</i> (0,6 kb)
cepI-0R	AACGCGCGTTCCGGCTCAGG	-	<i>cepI</i> (0,6 kb)
cepI-V-Exp	TGCGGATCCAGACCTTCGTTACAGAGG	<i>Bam</i> HI	<i>cepI</i> (0,6 kb)
cepI-R-Exp	CCCAAGCTTCCGGCTCAGGCGGCGATAG	<i>Hind</i> III	<i>cepI</i> (0,6 kb)
cepI-R-ExpStop	CCCTTCGAATTCTCAGACGGCGGCCG	<i>Hind</i> III	<i>cepI</i> (0,3 kb)
cepI-V- <i>Bam</i> HI	CGGGATCCCGCCTTCGTTACAGGAAGGG	<i>Bam</i> HI	<i>ΔcepI</i> (0,61 kb)
cepI-R- <i>Hind</i> III	CCCAAGCTTGGGCGCGGTTCCGGCTCAGG	<i>Hind</i> III	<i>ΔcepI</i> (0,61 kb)
igR-R- <i>Sac</i> I	CGAGCTCGGGATGTCCTCGGATCTGTGC	<i>Sac</i> I	<i>lux</i> box + <i>igR</i> +
igR-V- <i>Eco</i> RI	GGAATTCCAGTATTCGAATCCGAGCCGC	<i>Eco</i> RI	<i>ΔcepR</i> (0,84 kb)

B.5.6.3 Kapillar-PCR

Die Kapillar-PCR-Technik (*Rapid Cycler* Idaho Technologies, Idaho Falls, USA) stellt eine Alternative zu konventionellen Thermocyclern dar. Die Temperaturregulation mittels einer starken Lichtquelle verkürzt die Reaktionszeit im Vergleich zu konventionellen PCR-Techniken signifikant aufgrund einer rascheren Wärmeübertragung.

Das Reaktionsgemisch wurde in einem 1,5 ml ERG pipettiert, in eine 50 µl fassende Glaskapillare gesogen und die Enden über einer Bunsenbrennerflamme versiegelt. Nach Beendigung des Programms wurden die Kapillarenenden mit einem Glasschneider aufgeschnitten und die PCR-Lösung in ein frisches ERG überführt. Zur Analyse wurden 5 µl PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

Reaktionsansatz Kapillar-PCR:

10x BSA	5 µl
10x MgCl ₂ (20 mM, Polymerase-Puffer)	5 µl
dNTP-Mix (8 mM)	5 µl
Template-DNS (100 ng/µl)	1 µl
Primer (15 pmol/µl)	je 1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl

Standardprogramm Kapillar-PCR:

Startdenaturierung:	15 sec	94 °C
30 bis 35 Zyklen:		
Denaturierung:	15 sec	94 °C
Annealing:	20 sec	X °C
Elongation:	30 sec	72 °C
Finale Elongation:	60 sec	72 °C
Slope = 9,0 / Dauer ca. 60 min		

B.5.6.4 Gradienten-PCR

Mithilfe einer Gradienten-PCR (*Mastercycler[®] Gradient*, Eppendorf, Hamburg, D) ist es möglich, mit wenig Zeitaufwand die optimale Annealing-Temperatur der eingesetzten Primer auf experimentellem Weg herauszufinden. Da in diesem Thermocycler die einzelnen Reaktionsplätze differenziert eingestellt werden können, besteht die Möglichkeit, während eines Programms gleichzeitig verschiedene Annealing-Temperaturen zu testen. Der Temperaturgradient umfaßte normalerweise eine Spanne zwischen 5 °C ober- und unterhalb

des errechneten Primer-Schmelzpunktes. Die PCR-Reaktionen wurden in dünnwandigen 200 µl-PCR-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, D) angesetzt.

Standardreaktionsansatz Gradienten-PCR:

10x Polymerase-Puffer (Mg ²⁺ -haltig)	5 µl
dNTP-Mix (je 2.5mM)	4 µl
Template-DNS (100 ng/µl)	1 µl
Primer (15 pmol/µl)	je 1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µl
<i>TaKaRa Ex Taq</i> TM Polymerase	0,3 µl

Standardprogramm Gradienten-PCR:

Startdenaturierung:	5 min	94 °C
30 bis 35 Zyklen:		
Denaturierung:	25 sec	94 °C
Annealing:	30 sec	X °C (+/- 5 °C)
Elongation:	45 sec	72 °C
pro Zyklus	+ 1 sec	
Finale Elongation:	10 min	72 °C

Für die Amplifikation von DNS-Fragmenten aus *Burkholderia sp.* hat sich ein modifizierter PCR-Reaktionsansatz bzw. PCR-Programm bewährt. Es erwies sich als optimal, wenn als Quelle chromosomaler *Burkholderia*-DNS lebende Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt wurden. Dies konnte entweder in Form von 1 µl einer Flüssigkultur oder einer Resuspension von Zellmaterial (abgenommen von einer Agarplatte) in NaCl erfolgen. Der Reaktionsansatz darf nach Zugabe der Zellen keine Trübung aufweist, da in diesem Fall die Amplifikation fehlschlägt. Die Spezifität der Amplifikate wurden außerdem durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) und Rinder Serum-Albumin (BSA) erreicht, da auf diesem Wege eine Auflösung der DNS-Sekundärstrukturen, ein Abfangen von PCR-Inhibitoren und eine Stabilisierung der DNS-Polymerase gewährleistet wurden. Darüberhinaus verminderte ein Absenken der MgCl-Konzentration im Reaktionsansatz eine unspezifische Primerbindung.

Reaktionsansatz Gradienten-PCR für *Burkholderia sp.*:

10x Polymerase-Puffer (Mg ²⁺ -frei)	5 µl
10x MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTP-Mix (je 2.5mM)	4 µl
DMSO	3 µl
BSA	3 µl
Primer (15 pmol/µl)	je 1 µl

Template-DNS: Zellmaterial	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µl
<i>TaKaRa Ex Taq</i> TM Polymerase	0,3 µl

Programm Gradienten-PCR für *Burkholderia* sp.:

Startdenaturierung:	10 min	94 °C
30 bis 35 Zyklen:		
Denaturierung:	30 sec	94 °C
Annealing:	45 sec	X °C (+/- 5 °C)
Elongation:	45 sec	72 °C
pro Zyklus	+ 1 sec	
Finale Elongation:	15 min	72 °C

B.5.6.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Abtrennung von PCR-Reaktionsbestandteilen wie Primer und Puffer erfolgte mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers. Bei Auftreten von unspezifischen PCR-Nebenprodukten wurde die Ziel-DNS über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese und nachfolgende Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN, Hilden, FRG) gereinigt.

B.5.6.6 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von gereinigten PCR-Amplifikaten wurde das *TOPO TA Cloning*[®] *Kit* (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet, das auf chemokompetenten *E. coli* TOP 10 Zellen und dem Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO basiert. Dieser spezielle Klonierungsvektor trägt an den freien 3'-Enden Desoxythymidin, so daß eine Ligation von Taq-Polymerase generierten PCR-Produkten möglich ist. Nur diese DNS-Polymerase weist nämlich eine template-unabhängige terminale Transferaseaktivität auf, durch die an die 3'-Enden des PCR-Produkts Desoxyadenosin angehängt wird, was die Voraussetzung für die Ligation durch die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase ist.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben laut beiliegendem Arbeitsprotokoll. Verschiedene Aliquots des Transformationsansatzes (50-200 µl) wurden auf LB-Agarplatten (100 mg/l Ampicillin) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Da der verwendete Vektor eine blau/weiß Selektion von Rekombinanten ermöglicht, wurde das Festmedium mit X-Gal-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, D) in einer Endkonzentration von 40 µg/ml versetzt. Am folgenden Tag wurden weiße Kolonien gepickt, Plasmid-DNS präpariert (s. B.5.1.2) und der Ligationserfolg mittels Restriktionsverdau mit *EcoRI* überprüft.

B.5.7 Transfer von DNS in gram-negative Bakterien

B.5.7.1 DNS-Transfer in *Escherichia coli* durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

Kurze Hochspannungsimpulse bewirken eine reversible lokale Desintegration der bakteriellen Cytoplasmamembran. Dies führt zu einer kurzfristig erhöhten Durchlässigkeit für Makromoleküle und kann somit einen Transfer von DNS in entsprechend elektrotransformierbare („kompetente“) Bakterienzellen nachsichziehen. Bei *E. coli* liegt die Transformationseffizienz zu den unten angegebenen Bedingungen bei etwa 10^9 - 10^{10} Transformanten pro μg DNS.

Herstellung elektrotransformierbarer Zellen (Hanahan, 1983, modifiziert):

Um *E. coli* Zellen für die Elektroporation vorzubereiten, werden sie in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Anschließend wird die Ionenstärke der Bakteriensuspension durch Waschen bei 4 °C so weit erniedrigt, daß die Zellen für eine Elektroporation eingesetzt werden können.

Lösungen und Material:

LB-Medium	500 ml
H₂O_{bidest}	1000 ml
Glyzerin	10 %
Trockeneis/Ethanol-Bad	
Eis	

Durchführung:

- 500 ml LB-Medium in 1 l Schikanekolben aus ÜN-Kultur des Empfängerstammes (*E. coli* MT102 oder *E. coli* XL1-Blue) 1:1000 beimpfen
- Inkubation bei 37 °C unter starkem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7
- alle folgenden Schritte auf Eis durchführen: Kultur 15 min in Eis/Wasser-Bad abkühlen
- Zellernte durch Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C in einem Sorvall SLA-3000 SuperLite Rotor.
- 2x Waschen der Zellen mit je 250 ml eiskaltem H₂O_{bidest}.
- erneute Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C
- Waschen der Zellen mit 50 ml eiskalter 10 %iger Glyzerinlösung
- erneute Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C, ÜS verwerfen
- Abschätzung des PelletVol.s und Resuspension in gleichem Vol. eiskalter 10 %iger Glyzerinlösung (ca. 2 ml)
- Portionierung der Zellsuspension in 60-80 μl Aliquots, unmittelbares Schockgefrieren in Trockeneis/Ethanolbad und Lagerung bei -50 bis -80 °C

Elektroporation (Dower *et al.*, 1988):

Durchführung:

- DNS-Lösung mit hohem Salzgehalt (z.B. Ligationsansatz) vor Elektroporation einer 20 minütigen Tropfendialyse (Dialysemembran der Porengröße 0.025 μm , Millipore, Eschborn, D) gegen H₂O_{bidest} unterziehen (s. B.5.2.1)
- Auftauen der aliquotierten elektrokompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis
- Zugabe der salzfreien DNS-Lösung (0.1-0.5 μg) und 15 min Inkubation auf Eis

- DNS-Zellsuspension luftblasenfrei in vorgekühlte Elektroporationsküvette (EquiBio, Boughton Monchelsea Kent, UK, Elektrodenabstand 2 mm) überführen
- Küvette sorgfältig trocknen und möglichst rasch in Halterung des Elektroporationsgerätes (Gene Pulser II™, BIO-RAD, München, D) stellen
- Anlegen einer elektrischen Spannung (2.5 kV, Gene Pulser 25 μ FD, Pulse Controller 200 Ω); die Zeitkonstante bei *E. coli* sollte 4.5 bis 5.0 msec betragen
- unmittelbare Zugabe von 900 μ l SOC-Medium (RT) und Überführung des Elektroporationsansatzes in frisches ERG
- Inkubation bei 37 °C für 60 min auf einem Schüttler (200 rpm)
- Ausplattieren von 50-200 μ l auf selektive Nährmedien und Inkubation bei 37 °C ÜN
- restliche Zellen können bei 4 °C einen Tag gelagert und entsprechende Volumina erneut ausplattiert werden

B.5.7.2 DNS-Transfer durch Konjugation (Kristensen *et al.*, 1995; modifiziert)

Außer durch Elektroporation können Plasmide mittels Konjugation mit einer hohen Transfer-rate in Zielbakterien überführt werden, wobei Art des Plasmids, Eigenschaften von Donor- bzw. Empfängerorganismus und Reaktionsbedingungen die Übertragungsrate entscheidend beeinflussen (Stotzky *et al.*, 1990; Veal *et al.*, 1992). Auf festen Oberflächen kann man im Vergleich zu Flüssigmedium häufig eine zusätzliche Erhöhung der Transferrate um einige Größenordnungen beobachten (Bradley *et al.*, 1980).

In vorliegender Arbeit wurde der konjugative Transfer von Plasmid-DNS in einem triparentalen Konjugationsansatz auf einer festen Agaroberfläche durchgeführt (Kristensen *et al.*, 1995, modifiziert). Dabei kommt es in Gegenwart eines Helferplasmids pRK600 (Figurski *et al.*, 1979) zu einer Übertragung der Plasmid-DNS von einem Donor- in einen Rezipientenstamm. Mithilfe von Selektivmedien konnten Transkonjuganten auf einfache Weise gegen Donor und Empfänger selektioniert werden.

Durchführung:

- Donor, Rezipient und Helferstamm *E. coli* HB101 (pRK600) ÜN in 5 ml Selektivmedium anziehen
- Stämme in 10 ml Selektivmedium überimpfen und in später exponentieller Wachstumsphase (OD₆₀₀ von ca. 0,9) ernten
- Zellernte (2-3x 2 ml, je nach Zelldichte) durch Zentrifugation für 5 min bei 6000 rpm
- vorsichtige Resuspension der Zellen in 1 ml LB-Medium (nicht vortexen!)
- erneute Zentrifugation für 5 min bei 6000 rpm, ÜS verwerfen
- Zellen vorsichtig in 400-600 μ l (je nach Zelldichte, Donor und Helfer sollten ähnliche Dichte aufweisen) LB-Medium resuspendieren
- 100 μ l Donor- und 100 μ l Helferstamm in 1.5 ml ERG vermischen und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 200 μ l Donor/Helfer-Gemisch in frisches 1.5 ml ERG überführen, mit 200 μ l Rezipientenkultur versetzen
- diese Endmischung in Form von Tropfen (je 50 μ l) auf vorgewärmte LB-Agarplatte aufbringen und mind. 4 h oder ÜN bei 37 °C inkubieren
- Zellmaterial mit sterilen Einmal-Impfösen von Plattenoberfläche nehmen und in 2 ml NaCl-Lösung (0.9 %ig) resuspendieren

- 50-200 µl des Konjugationsansatzes auf Selektivmedien (Selektion auf Donor-Plasmid im Rezipienten und Selektion gegen *E. coli*!) ausplattieren, ÜN-Inkubation bei 30 °C (Rezipient *B. cepacia*) bzw. 37 °C (Rezipient *E. coli*)
- restlicher Konjugationsansatz kann mit ½ des Vol.s 50 %igem Glycerin vermischt und bei –80 °C gelagert werden

B.5.8 DNS-Sequenzanalyse nach dem „Cycle Sequencing“-Protokoll (Murray, 1989)

Die nicht-radioaktive DNS-Sequenzanalyse nach dem „Cycle Sequencing“-Protokoll stellt eine Kombination aus enzymatischer Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und dem Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion mit einer thermostabilen DNS-Polymerase dar. Beim „Cycle Sequencing“ kommt es durch Verwendung eines einzigen Primers zur linearen Amplifikation des gewünschten Produkts. In vier ansonsten identischen Ansätzen werden der Polymerase neben den als Substrat dienenden vier Desoxynukleotiden (dNTP) zusätzlich jeweils eine Art von Didesoxynukleotiden (ddNTP) angeboten. Das Sequenzierprodukt besteht folglich aus unterschiedlich langen Kopien eines DNS-Stranges, wobei die Länge durch den zufälligen Einbau von zum Syntheseabbruch führenden Didesoxynukleotiden bestimmt ist. Im Verlauf der Amplifikationszyklen entstehen eine Vielzahl von DNS-Fragmenten, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Längen durch eine hochauflösende, denaturierende Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel bis auf eine Base genau aufgetrennt werden können. Aus der Abfolge des Bandenmusters der vier Spuren kann die Nukleotidsequenz bestimmt werden.

Die Visualisierung der Sequenzierprodukte erfolgte durch die Verwendung von Oligonukleotidprimern, die an ihren 5'-Enden mit dem Infrarot-Farbstoff IRD800 markiert waren (MWG-Biotech, Ebersberg, D). Der in dieser Arbeit zur Plasmid-DNS-Sequenzierung verwendete vollautomatische Sequenzanalysator *LI-COR*[®] 4200 (LI-COR Inc., Lincoln, USA) detektiert diese Markierung mittels Laser-Abtastung.

B.5.8.1 PCR-Standardreaktionsansatz

Zur DNS-Sequenzanalyse wurde das *ThermoSequenase*[™] *fluorescent labelled primer cycle sequencing kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) verwendet. Der enthaltene Nukleotidmix weist alle für die Amplifikationsreaktion notwendigen Komponenten mit Ausnahme der infrarotmarkierten Oligonukleotidprimer auf: Desoxynukleotide mit zugehörigen Didesoxynukleotiden, Puffer und die DNS-Polymerase-Thermosequenase.

Durchführung:

- in die ersten vier Reihen einer V-Boden Mikrotiterplatte (Biozym, Oldendorf, D) je 2 µl Nukleotidmix in Reihenfolge A, C, G, T vorlegen
- DNS-Mastermix mit *QIAprep*-isolierter Plasmid-DNS herstellen:

Plasmid-DNS	2-4 µl
Primer (1,25 pmol/µl)	5 µl
	ad 20 µl H ₂ O _{bide} st.

- je 6 µl des DNS-Mastermix zu vorgelegten Nukleotidmischen pipettieren, möglichst luftblasenfrei mischen

- Mikrotiterplatte mit hitzestabiler Folie (*Microseal "A" Film*, MJ Research, USA) sorgfältig verschließen
- PCR-Reaktion nach folgendem Programm (Dauer 1 h) in einem *PTC-100 Thermocycler* mit Mikrotiterplatteneinsatz und heizbarem Deckel (MJ Research, Watertown, USA) durchführen:

Startdenaturierung:	3 min	94 °C
25 Zyklen:		
Denaturierung:	30 sec	94 °C
Annealing:	30 sec	60 °C
Elongation:	1 min	72 °C
Finale Elongation:	2 min	72 °C

- nach Programmende Reaktionen sofort auf Eis stellen und durch Zugabe von 2,5 µl Auftragspuffer abstoppen
- Reaktionen unmittelbar vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel 5 min bei 94 °C denaturieren und sofort wieder auf Eis stellen

B.5.8.2 Sequenzierprimer

Für die Sequenzanalyse mit dem Sequenzanalysator *LI-COR*[®] 4200 (LI-COR Inc., Lincoln, USA) wurden Oligonukleotidprimer verwendet, die an ihren 5'-Enden über einen Succinimidester mit dem Infrarot-Farbstoff IRD800 markiert waren (MWG-Biotech, Ebersberg, D). Ein Teil der Sequenzanalyse wurde bei der Fa. SEQUIERVE (Vaterstetten, D) in Auftrag gegeben, die mit ABIprism-Sequenzierautomaten (Perkin Elmer, USA) arbeitet. Somit war bei den für diese Sequenzanalyse verwendeten Oligonukleotidprimern keine Modifikation nötig. Alle für diese Arbeit relevanten Primer sind in Tab. B.4 aufgeführt.

Tab. B.4: Verwendete Sequenzierprimer

5' IRD800-Modifikation	Primersequenz (5'→3')	Zielsequenz
Universal M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	Klonierungsvektor
Universal M13 Reverse (-20)	CAGGAAACAGCTATGAC	Klonierungsvektor
Universal M13 Forward (-40)	GGTTTTCCAGTCACGACG	Klonierungsvektor
Universal M13 Reverse (-40)	CGGATAACAATTTACACAGG	Klonierungsvektor
cepIS-IV	GCGGTGCCGATAGCGC	<i>cepI</i> H111
cepRS-1R	TCGACTGCGCGACGCC	<i>cepR</i> H111
ohne Modifikation	Primersequenz (5'→3')	Zielsequenz
cepRS-16660	CGAGTCGATCTCGATGTAG	<i>cepR</i> LMG 16660 / H111
cepI-0R	AACGCGGTTCCGGCTCAGG	<i>cepI</i> LMG 1222 ¹
cepIR-R	CGTGAGCTGGACCGCGAAGGAAGCGGAGCC	<i>cepR</i> LMG 1222 ¹
cepRS-1222	GATAGGTATCGAAGATGGC	<i>cepR</i> LMG 1222 ¹
cepIS- Bpsm	TGAACGAAGGTCTGCATGG	<i>cepI B. pseudomallei</i> E8
cepRS-Bpsm	CAGCTCGACTGCGCGAC	<i>cepR B. pseudomallei</i> E8
cepRS-14291	CGCACCGTCGAATCGATC	<i>cepR</i> LMG 14291
cepRS-18943	CGCACCGTCGAATCGATG	<i>cepR</i> LMG 18943

B.5.8.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösungen:

10x TBE-Puffer

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

0,8x TBE-Puffer

10x TBE-Puffer	80 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Gellösung für 4,3 %iges PAA-Gel von 66 cm Länge

Harnstoff	21 g
H ₂ O _{bidest.}	32 ml
Long Ranger Gel Solution	4,3 ml (FMC Bioproducts, Rockland, USA)
DMSO	500 µl
10x TBE-Puffer	5 ml
APS (10 %)	350 µl
TEMED	50 µl

Silanlösung

Silan	50 µl
EtOH _{abs}	10 ml

Eisessig

Durchführung:

- Gelplatten und Spacer sorgfältig mit SDS (10 %), H₂O_{dest.} und EtOH_{abs.} reinigen
- oberen Rand der Glasplatten (Kammbereich) silanisieren: 165 µl Silanlösung und 5 µl Eisessig auf Platten tropfen, mit EtOH-getränktem Zellstoff verreiben und 15 min ruhen lassen
- anschließend Platten mit EtOH-getränktem Zellstoff abreiben
- Gelapparatur fusselfrei (Schallplattenreiniger verwenden!) zusammenbauen und im 20°-Winkel in dafür vorgesehene Halterung legen
- Gellösung 5 min in einem Ultraschallbad entgasen, erst jetzt APS und TEMED luftblasenfrei zugeben und sorgfältig vermischen
- Gellösung zügig in eine 100 ml Kunststoffspritze aufziehen und durch einen Sterilfilter (*MilleX-Gs*, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Eschborn, D) zwischen die Glasplatten gießen
- sobald die Gelfront das Plattenende erreicht, Gelapparatur horizontal legen
- Vorkamm einsetzen und Gel ca. 1 h auspolymerisieren lassen
- Gelapparatur von Gelresten befreien und in das *LI-COR*[®]-Sequenziergerät einsetzen
- Puffertank und unteres Pufferreservoir mit 1 l 0,8x TBE-Puffer beladen

- Vorkamm vorsichtig ziehen und Vorlauf starten, um Gel auf vorgeschriebene Lauf-temperatur von 45 °C zu erwärmen
- über die Optionen *Autogain* und *Autofocus* des Softwarepakets *BaseImageIR Data collection V4.0* (LI-COR Inc., Lincoln, USA) Unregelmäßigkeiten im Gel abgleichen und korrekte Focusebene einstellen
- nach Beendigung des Vorlaufs Geltaschen gründlich spülen, um Harnstoffablagerungen zu entfernen, und anschließend 48-Zahn-Haifischkamm einsetzen
- je 1,5 µl der frisch denaturierten Sequenzierreaktionen auftragen und Gellauf starten (Dauer 12 h, nach Angaben des Herstellers bei 2000 V, 20 mA und 40 W)

B.5.8.4 Detektion und Analyse von DNS-Sequenzen

Die durch den Infrarot-Farbstoff markierten Banden werden von einem Laser-Scanner detektiert. Die Verarbeitung dieser Signale durch die *BaseImage Software* (LI-COR[®] Inc., Lincoln, USA) liefert ein 8-bit Graustufenbild im tif-Format (tagged image file). Dieses konnte mit Hilfe des Programms *BaseImage Image Analysis* ausgewertet, korrekturgelesen und die DNS-Sequenzen schließlich als Text-Datei gespeichert werden. Die Suche nach Homologien mit bekannten DNS-Abschnitten ermöglichten die frei zugänglichen Datenbanken im *World-Wide-Web*. In dieser Arbeit wurde überwiegend die vom *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* angebotene Suchmaschine *BLAST* verwendet (Madden *et al.*, 1996; Altschul *et al.*, 1997). Mithilfe des Programms *BankIt* konnten Sequenzen hinterlegt und zugehörige *NCBI-GenBank-Zugangsnummern* für Publikationszwecke erhalten werden.

Die DNS-Sequenzanalyse wie beispielsweise die Suche nach Restriktionsschnittstellen, Übersetzung in Aminosäuresequenz oder Alignment in international anerkannten Formaten (z.B. Clustal V) erfolgte mit der DNAMAN Software (Lynnon BioSoft Copyright[®] Version 4.13, Quebec, Kanada).

B.5.9 Auswertung von Sequenzdaten

B.5.9.1 Vergleichende Anordnung von Sequenzen

Um phylogenetische Aussagen treffen zu können, ist es notwendig, die erhaltenen Sequenzdaten in ein sogenanntes Alignment bereits bekannter Sequenzen einzupassen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des ARB-Programmpakets (Ludwig und Strunk, 1997) so zueinander angeordnet, daß sich homologe Positionen an den gleichen Stellen befinden. In den variablen Sequenzbereichen dienen kleinere Gruppen konservierter Basenfolgen als Orientierung bei der Bestimmung homologer Positionen, die durch Sekundärstrukturanalysen erleichtert wird.

B.5.9.2 Rekonstruktion von Stammbäumen

Die Stammbäume zur Darstellung von phylogenetischen Verwandtschaften wurden nach der „parsimony“- , „neighbor-joining“, oder „maximum likelihood“-Methode erstellt. Alle Baumberechnungsverfahren sind Teil des ARB-Pakets (Ludwig und Strunk, 1997). Dieses Programm erlaubt eine Auswahl der Alignmentpositionen nach den unterschiedlich stark konservierten Bereichen, um den Einfluß der variablen Positionen sichtbar zu machen. Die

Matrix der paarweisen Distanzwerte diente als Grundlage zur Stammbaumrekonstruktion nach der „neighbor-joining“-Methode (Saitou und Nei, 1987). Mittels „parsimony“- und „maximum likelihood“-Analysen wurde die Topologie der Stammbäume überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Referenzsequenzen wurden der *NCBI-GenBank* entnommen.

B.5.10 Knock-out Mutagenese mit Hilfe von homologer Rekombination

Für die Erzeugung einer definierten *cepI* Mutante diente die von Schweizer und Hoang (1995) beschriebene, auf pEX-Vektoren basierende „gene replacement“ Methode. Hierbei wird mittels zweier aufeinanderfolgender Rekombinationsereignisse („double cross-over“) ein im Chromosom befindliches spezifisches Gen durch Insertion einer inaktivierten Kopie ersetzt (Abb. B.1).

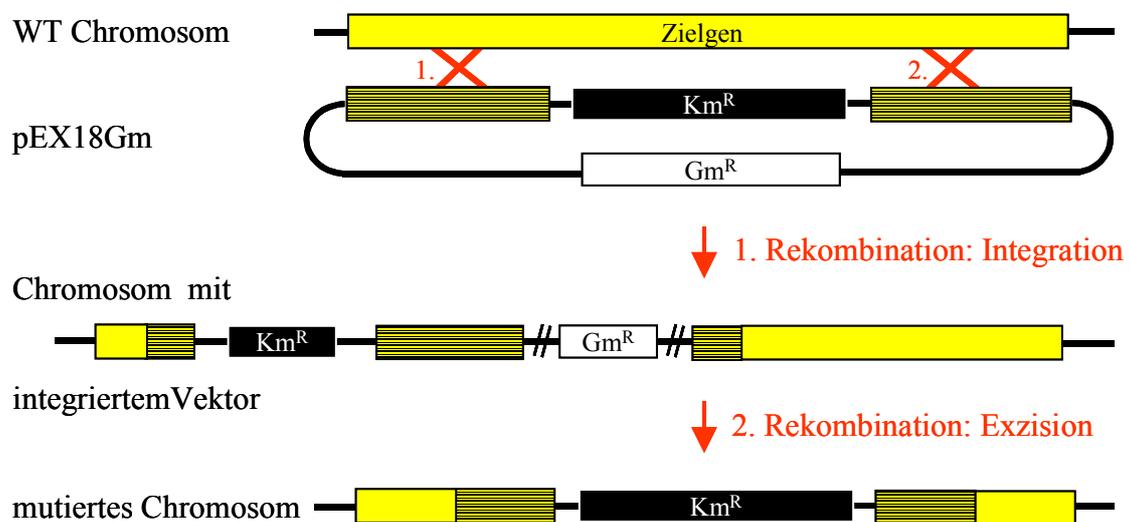


Abb. B.1: Allgemeiner Mechanismus des „gene replacement“ Prozesses am Beispiel des Vektors pEX18Gm. Bei einem ersten Rekombinationsereignis, hervorgerufen durch dem Zielgen homologe Nukleotidsequenzen im Vektor, integriert der gesamte Vektor in das Chromosom. Ein zweites homologes Rekombinationsereignis veranlaßt die Exzision von Vektor-Teilabschnitten und führt somit zu einer Insertionsinaktivierung des Zielgens durch die Integration einer Fusionskassette (hier mittels Km^R).

In dieser Arbeit wurde mit dem Vektor pEX18Gm (Hoang *et al.*, 1998) gearbeitet, der Resistenz gegenüber Gentamycin vermittelt. Zur Inaktivierung des Zielgens (*cepI*) wurde das Kanamycin-Resistenzgen *npt* eingesetzt. Für die Konstruktion des Integrationsvektors wurde der Km -Resistenzmarker mit zwei *cep* DNS-Sequenzen flankiert. Folglich wurden in den Vektor pEX18Gm in aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten, alle durchgeführt in *E. coli* XL1-Blue, drei Fragmente inseriert. In die dafür generierten PCR-Amplifikate wurden über die Primer Restriktionsschnittstellen integriert, um jeweils eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen. Um einen effizienten Verdau an den endständigen Restriktionsschnittstellen zu sichern, waren einige zusätzliche Basen am 5'-Ende der Primer notwendig (Tab. B.4).

Der fertige Integrationsvektor wurde durch konjugativen Transfer (s. B.5.7.2) in das Zielbakterium überführt. Echte „double cross-over“ Mutanten konnten anhand der entsprechenden Antibiotika-Resistenz bzw. -Sensitivität selektioniert werden. Die korrekte genetische Struktur von ausgewählten Mutanten wurde anschließend mittels Southern-Blot-Hybridisierung überprüft.

C. ERGEBNISSE

C.1 Phänotypische Charakterisierung verschiedener Isolate des *B. cepacia* Komplexes

Es ist bekannt, daß in zahlreichen gram-negativen Bakterien die Produktion von Virulenzfaktoren über einen „Quorum Sensing“-Mechanismus reguliert wird (Salmond *et al.*, 1995; Fuqua *et al.*, 1996). *B. cepacia* ist in der Lage, mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren wie Siderophore und verschiedene Exoenzyme in Abhängigkeit von der Zelldichte zu synthetisieren (Lonon *et al.*, 1988; McKevitt *et al.*, 1989; Gessner und Mortensen, 1990; Yohalem und Lorbeer, 1994; Darling *et al.*, 1998). Erst kürzlich wurde ein „Quorum Sensing“-System, *cepIR*, für *B. cepacia* Gv.III K56-2 (LMG 18863) beschrieben, das in die Regulation der Synthese von extrazellulären Enzymen und des Siderophors Ornibactin involviert ist (Lewenza *et al.*, 1999; Lewenza und Sokol, 2001). Es wird angenommen, daß in *B. cepacia* ein Komplex aus C8-HSL und CepR die Expression einer extrazellulären Protease stimuliert, die Expression von Ornibactin hingegen reprimiert. Ein Einfluß auf die Expression der Siderophore Pyochelin und Salicylsäure konnte nicht nachgewiesen werden (Lewenza und Sokol, 2001). Die genaue regulatorische Rolle von *cepRI* bezüglich der Produktion von extrazellulären Pathogenitätsdeterminanten ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Während die erste Studie von Lewenza *et al.* (1999) ausschließlich die Synthese von C8-HSL für *B. cepacia* aufzeigte, konnte innerhalb der Arbeitsgruppe zudem die Synthese von C6-HSL für Vertreter von *B. cepacia* nachgewiesen werden (Geisenberger, 2000).

Um Aufschluß über die Verbreitung der AHL-Produktion innerhalb der verschiedenen *B. cepacia* Genomovare zu erlangen, wurden 70 Vertreter des *B. cepacia* Komplexes unterschiedlicher Herkunft untersucht (Tab. B.1). Darüberhinaus wurden die Stämme hinsichtlich Protease-, Lipase-, Chitinase-, und Siderophor-Synthese charakterisiert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen AHL-Produktion und Produktion von extrazellulären Faktoren aufzuzeigen. Die aus dieser phänotypischen Charakterisierung gewonnenen Ergebnisse sollten dazu beitragen, AHL-regulierte Phänotypen *B. cepacia* zu identifizieren. Außerdem war von Interesse, ob bezüglich der untersuchten Phänotypen eine Homogenität innerhalb der verschiedenen Genomovare ersichtlich ist.

C.1.1 Synthese von AHL-Molekülen innerhalb des *B. cepacia* Komplexes

Um herauszufinden, wie weit die Produktion von AHL-Molekülen innerhalb des *B. cepacia* Komplexes verbreitet ist, wurden 70 *Burkholderia* Stämme mit Hilfe des Kreuzstrich-Assays getestet (Abb. C.1). Als Sensorstämme dienten sowohl *E. coli* MT102 (pSB403) als auch

E. coli MT102 (pSB1075), so daß aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten ein „Screening“ auf die Synthese von „kurzkettigen“ AHLs (Seitenkettenlänge C4-C8) und „langkettigen“ AHLs (Seitenkettenlänge C10 und länger) möglich war.

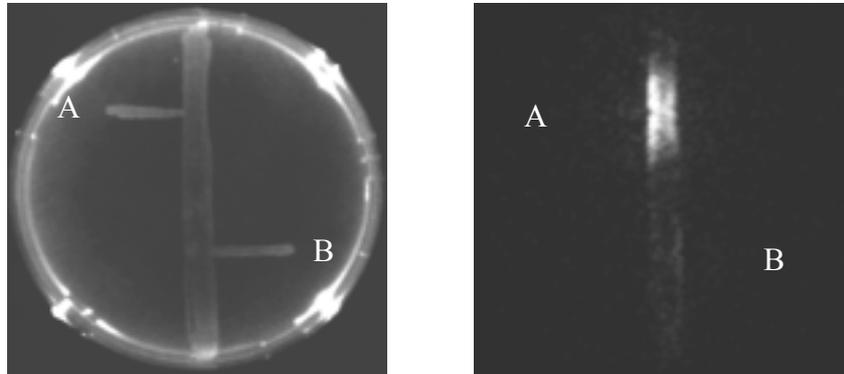


Abb. C.1: Exemplarische Darstellung des Kreuzstrich-Assays mit Vertretern des *B. cepacia* Komplexes gegen den Sensorstamm *E. coli* MT102 (pSB403). Die Biolumineszenz-Reaktion des Sensorstammes (senkrecht ausgestrichen), hervorgerufen durch anwesende AHL-Moleküle, beweist AHL-Synthese in dem überprüften Stamm (A). Fehlende Aktivierung deutet auf fehlende Produktion der entsprechenden AHLs in dem Teststamm hin (B). Die Dokumentation (links Tageslichtaufnahme, rechts Biolumineszenzaufnahme) erfolgte mit dem CCD-Kamerasystem C2400-40 und dem ARGUS20/HPD-CP-Softwarepaket (Hamamatsu Photonics, Herrsching).

Von den untersuchten Stämmen riefen 47 eine Aktivierung des Sensorstammes *E. coli* MT102 (pSB403) hervor, was auf die Synthese von kurzkettigen AHL-Molekülen schließen läßt. Wie aus Tabelle C.1 hervorgeht, aktivieren alle Vertreter der Genomovare I (6) und VI (5) und von *B. vietnamiensis* (9), sowie die meisten Vertreter von *B. stabilis* (13/15) und beide Vertreter des neuen Genomovars (R-3976 and LMG 16670) diesen Sensor. Im Gegensatz dazu konnte keiner der 16 Vertreter von Genomovar II (*B. multivorans*) den Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) aktivieren, was auf fehlende bzw. nicht nachweisbare AHL-Synthese schließen läßt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Ergebnissen einer anderen Arbeit (Geisenberger, 2000), die belegen, daß unabhängig von Mediumzusammensetzung und Wachstumsphase für dieses Genomovar keine AHL-Produktion gezeigt werden kann.

In Anlehnung an die Untersuchungen von Tögl (2000) und Geisenberger (2000) kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den detektierten Molekülen jeweils um die für die Genomovare des *B. cepacia* Komplexes charakteristischen AHLs, nämlich C6-HSL (HHL) und C8-HSL (OHL), handelt (Abb. C.2).

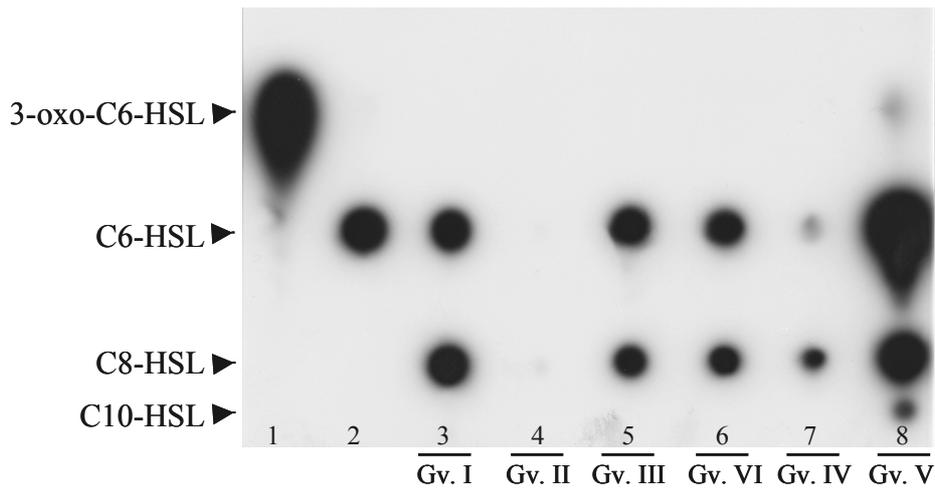


Abb. C.2: Analyse der AHL-Produktion von ausgewählten Stämmen der verschiedenen Genomovare des *B. cepacia* Komplexes, angezogen in ABC-Medium.: LMG 1222^T, Gv.I (Spur 3); LMG 16660, Gv.II (Spur 4); H111, Gv.III (Spur 5); LMG 18943, Gv.VI (Spur 6); LMG 14291, Gv.IV (Spur 7); LMG 10929^T, Gv.V (Spur 8). Die AHLs der Extrakte aus zellfreien Kulturüberständen wurden mittels DC aufgetrennt und durch einen Softagar-Overlay, angeimpft mit dem biolumineszenten Sensor *E. coli* MT102 (pSB403), nachgewiesen. Die Volumen der enthaltenen Extrakte sind äquivalent zu 3 ml (Spur 5) bzw. 5 ml (Spuren 3, 6, 8) bzw. 10 ml (Spur 7) bzw. 30 ml (Spur 4) Kultur. Synthetische AHL-Standards sind in den Spuren 1 (3-Oxo-C6-HSL) und 2 (C6-HSL) aufgetragen.

Eine Aktivierung des Sensorstammes *E. coli* MT102 (pSB1075) konnte nur bei fünf Stämmen beobachtet werden (LMG 6998, LMG 6999, LMG 10929^T, R-128, R-921), die alle dem Genomovar V (*B. vietnamiensis*) angehören (Tab. C.1). Aufgrund der äußerst geringen Sensitivität des Sensorstammes *E. coli* MT102 (pSB1075) gegenüber „kurzkettigen“ AHLs (Geisenberger, 2000) kann eine Kreuzreaktivität des Sensors mit diesen AHL-Molekülen ausgeschlossen werden. Folglich deutet eine Aktivierung des Sensors auf die Produktion mindestens eines „langkettigen“ AHLs hin.

Um diese Annahme abzusichern, wurde mit dem AHL-Extrakt aus dem Kulturüberstand von *B. vietnamiensis* R-921 eine DC-Analyse unter Verwendung von *E. coli* MT102 (pSB403) durchgeführt. Diese ergab - laut ermittelten R_F -Werten - eindeutige Signale für C6-HSL (HHL) und C8-HSL (OHL). Zusätzlich wurde ein Signal detektiert, dessen R_F -Wert mit dem von C10-HSL (DHL) übereinstimmt (vgl. Abb. C.20, Spur 7).

Um eine einwandfreie Identifizierung der von *B. vietnamiensis* produzierten AHLs zu erreichen, wurde der AHL-Extrakt von *B. vietnamiensis* R-921 einer chemischen Analyse unterzogen (durchgeführt von Dr. Andrea Hardman, University of Nottingham, GB). Mittels Flüssig-Chromatographie in Verbindung mit Massenspektrometrie konnte nicht nur die Anwesenheit von C6-HSL (HHL) und C8-HSL (OHL), sondern auch von C10-HSL (DHL) im Extrakt bestätigt werden (Abb. C.3). Darüberhinaus wurden geringere Mengen an 3-Oxo-

C10-HSL (ODHL), C12-HSL (dDHL) und C14-HSL (tDHL) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

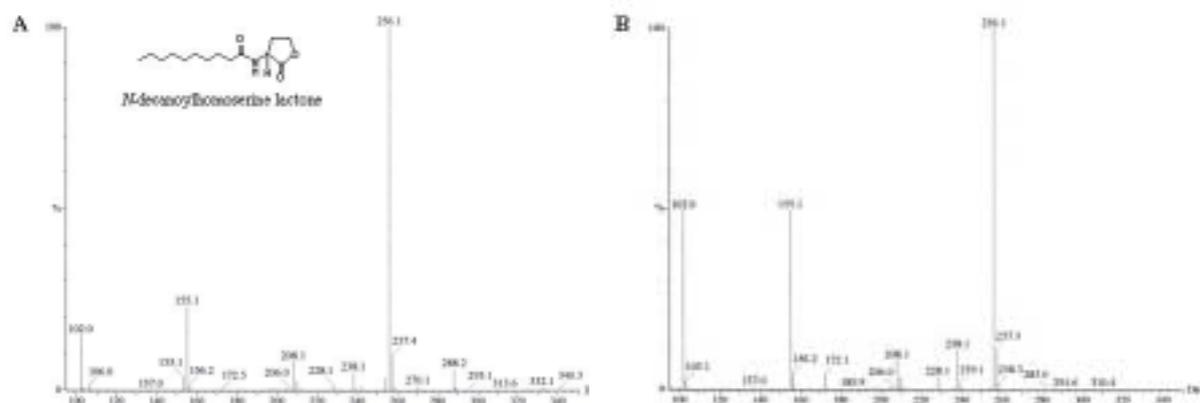


Abb. C.3: Exemplarische Darstellung (A) des Massenspektrums von synthetischem C10-HSL und (B) des Massenspektrums einer aus dem Kulturüberstand von R-921 aufgereinigten Komponente [(M+H) 256 Peak], das nicht von dem des synthetischen C10-HSL unterscheidbar ist.

ERGEBNISSE

Stammbezeichnung ^a	Synthese von ^b					Hybridisierungssignale (kb)	
	AHLs ^c	Protease	Chitinase	Lipase	Siderophore	<i>cepI</i>	<i>cepR</i>
<i>B. cepacia</i> Gv.I (6)	6	3	5	6	4		
LMG 6963	+	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
LMG 1222 ^T	+	+	+	+	+	n.b.	n.b.
LMG 14087	+	+	+	+	+	4.3	4.3
LMG 14095	+	-	+	+	-	4.3	4.3
LMG 16663 / C1963	+	-	-	+	-	n.b.	n.b.
LMG 18821 / CEP509	+	-	+	+	+	2.4	2.4/1.9
<i>B. multivorans</i> , Gv.II (16)	0	0	0	16	12		
LMG 13010 ^T	-	-	-	+	+	n.b.	n.b.
LMG 16660 / C1576	-	-	-	+	+	2.0	2.0/1.2
LMG 16665 / C1962	-	-	-	+	-	2.0	n.b.
LMG 17588 / CEP144	-	-	-	+	+	n.b.	n.b.
LMG 18822 / C5393	-	-	-	+	+	2.0	2.0/1.2
LMG 18824 / FC0147	-	-	-	+	+	n.b.	n.b.
LMG 18825 / CF-A1-1	-	-	-	+	+	n.b.	n.b.
LMG 18945 / 97/35	-	-	-	+	-	2.0	2.0/1.2
R-139 / C1524	-	-	-	+	+	2.0	2.0/1.2
R-654 / C4297	-	-	-	+	-	2.0	2.0/1.2
R-1914 / C1991	-	-	-	+	-	2.0	2.0/1.2
R-6268 / H59	-	-	-	+	+	2.0	2.0/1.2
R-6269 / H115	-	-	-	+	+	2.4	2.4
R-6275 / H158	-	-	-	+	+	2.4	n.b.
R-6278 / H174	-	-	-	+	+	2.0	n.b.
R-6284 / H191	-	-	-	+	+	2.0	2.0/1.2
<i>B. cepacia</i> Gv.III (17)	13	11	16	16	14		
LMG 6981	+	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
LMG 6988	+	+	+	+	+	3.2	3.2/1.9
LMG 6993	+	-	+	+	+	4.3	4.3
LMG 12615 / 81/92	+	-	+	+	+	2.4	2.4/1.9
LMG 14271 / A3P	+	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
LMG 16654 / J415	+	+	-	-	-	n.b.	n.b.
LMG 16655 / C1335	-	-	+	+	+	4.3	4.3
LMG 16657 / C1340	+	-	+	+	-	2.4/3.2	2.4/1.9/3.2
LMG 16659 / C1394	+	-	+	+	+	2.4	2.4/1.9
LMG 18826 / BC7	-	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
LMG 18827 / C5424	-	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
LMG 18863 / K56-2	+	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
R-651 / C1257	-	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
R-6108 / AD0979	+	-	+	+	-	2.4	2.4/1.9
R-6274 / H147	+	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
H111 / R-6282	+	+	+	+	+	2.4	2.4/7.5
R-6285 / BC2a	+	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
<i>B. stabilis</i> , Gv.IV (15)	13	9	15	15	4		
LMG 6997	+	+	+	+	-	2.4	2.4/1.9
LMG 7000	+	+	+	+	-	2.4	2.4/1.9
LMG 14291 / B4P	+	-	+	+	+	2.4	2.4/1.9
LMG 18138 / E20	-	-	+	+	+	2.4	2.4/1.9
R-136 / J1750	+	+	+	+	-	n.b.	n.b.
R-3338 / M71-40	+	-	+	+	+	2.4/3.2	2.4/1.9/3.2
R-6270 / H118	+	-	+	+	-	2.4	2.4/1.9
R-6272 / H134	+	-	+	+	-	2.4	2.4/1.9
R-6273 / H145	+	+	+	+	-	2.4	2.4/1.9
R-6276 / H162	+	+	+	+	-	2.4	2.4/1.9
R-6277 / H173	-	-	+	+	-	2.4	2.4/1.9

ERGEBNISSE

Stammbezeichnung ^a	Synthese von ^b					Hybridisierungssignale (kb)	
	AHLs ^c	Protease	Chitinase	Lipase	Siderophore	<i>cepI</i>	<i>cepR</i>
R-6279 / H177	+	+	+	+	-	2.4	2.4/1.9
R-6280 / H193	+	+	+	+	-	2.4	2.4/1.9
R-6281 / H177E	+	+	+	+	+	2.4	2.4/1.9
R-10033 / H175	+	+	+	+	-	2.4	2.4/1.9
<i>B. vietnamiensis</i> , Gv.V (9)	9	0	0	8	9		
LMG 6998	+ ^d	-	-	-	+	n.b.	n.b.
LMG 6999	+ ^d	-	-	+	+	n.b.	n.b.
LMG 10929 ^T	+ ^d	-	-	+	+	2.8	2.8/2.5
LMG 16232	+	-	-	+	+	2.1	2.1/2.5
LMG 18835 / CEP40	+	-	-	+	+	n.b.	n.b.
LMG 18836 / FC0441	+	-	-	+	+	n.b.	n.b.
R-128 / J1697	+ ^d	-	-	+	+	2.1	2.1/2.7
R-723 / PC30	+	-	-	+	+	2.1	2.1/2.7
R-921	+ ^d	-	-	+	+	2.1	2.1/2.7
<i>B. cepacia</i> Gv.VI (5)	5	0	5	5	5		
LMG 18941 / FC348	+	-	+	+	+	2.4	2.4/2.8
LMG 18942 / PC534	+	-	+	+	+	2.4	2.4/2.8
LMG 18943 / AU0645	+	-	+	+	+	2.4	2.4/2.8
LMG 18944 / PC688	+	-	+	+	+	2.4	2.4/2.8
LMG 18946 / AU0018	+	-	+	+	+	2.4	2.4/2.8
<i>B. cepacia</i> , neues Gv. (2)	2	0	0	2	0		
LMG 16670 / J2552	+	-	-	+	-	n.b.	n.b.
R-3976 / J2863	+	-	-	+	-	n.b.	n.b.

H: Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

LMG: Laboratorium Microbiologie Gent Culture Collection, Universiteit Gent, Ghent, Belgien

R: "Research collection", Peter Vandamme, Belgien

Gv.: Genomovar

^T Typstamm

^a Zahlen in Klammern geben Anzahl der untersuchten Stämme an

^b Zahlen in Spalten geben Anzahl der positiven Stämme an

^c Detektion mit Sensor pSB403

^d Stämme, die zusätzlich C10-HSL (DHL) produzieren (Detektion mit Sensor pSB1075)

+ bezeichnet positive Stämme; - bezeichnet negative Stämme

n.b.: nicht bestimmt

Tab. C.1: Aufstellung aller bezüglich Synthese von AHLs, Protease, Lipase, Chitinase und Siderophore getesteten Stämme des *B. cepacia* Komplexes mit den entsprechenden phänotypischen Merkmalen und den *cepI*- bzw. *cepR*-spezifischen Southern-Blot-Hybridisierungssignalen.

C.1.2 Synthese von extrazellulären Produkten innerhalb des *B. cepacia* Komplexes

Wie bereits erwähnt, gelten eine Reihe von extrazellulären Produkten, die von *B. cepacia* synthetisiert werden können, als mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren (Lonon *et al.*, 1988; McKevitt *et al.*, 1989; Gessner und Mortensen, 1990; Yohalem und Lorbeer, 1994; Darling *et al.*, 1998). Es handelt sich dabei in erster Linie um Exoenzyme und Siderophore, die sowohl für Pflanze als auch Mensch pathogenes Potential besitzen. Von Lewenza *et al.* (1999; 2001) wurde kürzlich beschrieben, daß das Quorum Sensing System *cepIR* von *B. cepacia* Gv.III K56-2 (LMG 18863) einen gewissen Einfluß auf die Expression von Exoprodukten hat.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte untersucht werden, inwiefern eine Korrelation zwischen AHL-Produktion und Synthese von extrazellulären Produkten innerhalb des *B. cepacia* Komplexes besteht. Deshalb wurden die Stämme, nachdem sie bereits auf AHL-Synthese überprüft worden waren (s. Kap. C.1.1), nun mit Hilfe entsprechender Indikatorplatten hinsichtlich Protease-, Lipase-, Chitinase- und Siderophor-Produktion getestet. Außerdem sollte aufgezeigt werden, ob - resultierend aus Genomovarzugehörigkeit oder Isolat-herkunft - spezifische Unterschiede bezüglich der Synthese von Pathogenitätsfaktoren vorhanden sind. Allgemein wird nämlich davon ausgegangen, daß sich die Vertreter der verschiedenen Genomovare möglicherweise stark hinsichtlich Pathogenität und Übertragbarkeit unterscheiden (Vandamme *et al.*, 1997; Mahenthiralingam *et al.*, 2000a und b).

C.1.2.1 Protease-Produktion

Alle Isolate wurden wie in B.2.2 beschrieben durch Anzucht auf Magermilchplatten auf die Produktion von extrazellulärer Protease überprüft (Abb. C.4). Protease-Aktivität konnte für die meisten Stämme von *B. cepacia* Gv.I (3/6) und Gv.III (11/17) und *B. stabilis* (9/15) nachgewiesen werden. Dagegen zeigten alle Vertreter von *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* und *B. cepacia* Gv.VI, sowie die beiden Vertreter des neuen *B. cepacia* Genomovars, keine proteolytische Aktivität (Tab. C.1).

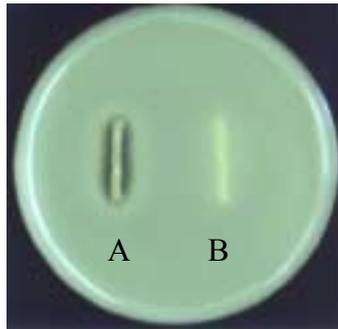


Abb. C.4: Exemplarische Darstellung des Nachweises von extrazellulärer Protease-Aktivität für Vertreter des *B. cepacia* Komplexes. Die Bildung eines klaren Hofes um die Kolonie bei Inkubation auf einer Magermilch enthaltenden Agarplatte zeigt proteolytische Aktivität des Stammes *B. cepacia* Gv.III H111 an (A), während fehlende Protease-Produktion bei Stamm *B. multivorans* LMG 16660 keine Hofbildung induziert (B).

C.1.2.2 Lipase-Produktion

Zum Nachweis der Synthese von extrazellulärer Lipase wurden die Isolate, wie in B.2.2 beschrieben, auf Tributyrinplatten angezüchtet (Abb. C.5). Mit Ausnahme von zwei Stämmen (*B. vietnamiensis* LMG 6998 und *B. cepacia* Gv.III LMG 16654) besaßen alle Stämme lipolytische Aktivität (Tab. C.1).

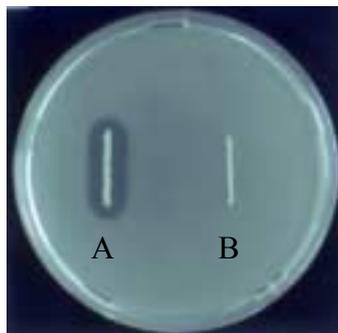


Abb. C.5: Exemplarische Darstellung des Nachweises von extrazellulärer Lipase-Aktivität für Vertreter des *B. cepacia* Komplexes. Die Bildung von einem klaren Hof um die Kolonie bei Inkubation auf einer Tributyrin enthaltenden Agarplatte zeigt lipolytische Aktivität des Stammes *B. cepacia* Gv.III H111 an (A), während eine fehlende Hofbildung bei Stamm *B. vietnamiensis* LMG 6998 auf nicht vorhandene Lipase-Aktivität schließen läßt (B).

C.1.2.3 Chitinase-Produktion

Die Produktion von extrazellulärer Chitinase wurde, wie in B.2.2 beschrieben, durch Anzucht der Stämme auf Chitinplatten nachgewiesen (Abb. C.6). Chitinolytische Aktivität konnte für alle Vertreter von *B. stabilis* und *B. cepacia* Gv.VI gezeigt werden. Mit jeweils einer Ausnahme (LMG 16663 bzw. LMG 16654) produzierten auch alle Stämme von *B. cepacia* Gv.I und Gv.III Chitinase. Im Gegensatz dazu wurden alle Vertreter von *B. multivorans* und

B. vietnamiensis, sowie die beiden Vertreter des neuen *B. cepacia* Genomovars, Chitinase-negativ getestet (Tab. C.1).

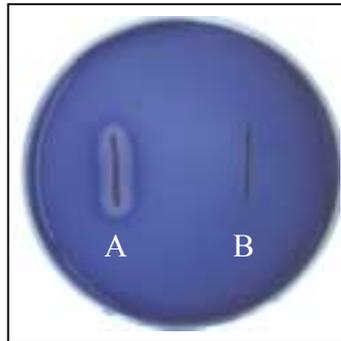


Abb. C.6: Exemplarische Darstellung des Nachweises von extrazellulärer Chitinase-Aktivität für Vertreter des *B. cepacia* Komplexes. Die Bildung eines klaren Hofes um die Kolonie bei Inkubation auf einer Agarplatte, die ein Chitinderivat und einen blauen Farbstoff enthält, zeigt chitinolytische Aktivität des Stammes *B. cepacia* Gv.III H111 an (A), während die Hofbildung aufgrund von fehlender Chitinase-Produktion bei Stamm *B. vietnamiensis* R-921 ausbleibt (B).

C.1.2.4 Siderophor-Produktion

Als Indikatorplatten (s. B.2.2) für die Synthese von Siderophoren, darunter Ornibactin, dienten sog. CAS-Platten (ohne Abb.). Siderophor-Aktivität wurde in allen *B. vietnamiensis* und *B. cepacia* Gv.VI zugehörigen Stämmen, sowie in den meisten Stämmen von *B. multivorans* (12/16), *B. cepacia* Gv.I (4/6) und Gv.III (14/17) detektiert. Dagegen produzierten weder die Vertreter von *B. cepacia* Gv.VI noch die beiden Vertreter des neuen *B. cepacia* Genomovars, und nur vier von 15 getesteten *B. stabilis* Stämmen Siderophore (Tab. C.1).

C.2 Genotypische Charakterisierung von Isolaten des *B. cepacia* Komplexes

Die phänotypische Charakterisierung in Kap. C.1 hat aufgezeigt, daß Genomovar-spezifische Phänotypen innerhalb des *B. cepacia* Komplexes vorhanden sind. Besonders auffällig sind die offensichtlich fehlende AHL-Produktion in allen Vertretern des Genomovars II (*B. multivorans*) und die zusätzliche Synthese langkettiger AHL-Moleküle in vielen Vertretern des Genomovars V (*B. vietnamiensis*). Für den Großteil der restlichen Vertreter dagegen wurde die Synthese von C6-HSL und C8-HSL nachgewiesen.

Basierend auf der Identifizierung der in *B. cepacia* K56-2 für AHL-Produktion verantwortlichen Gene *cepIR* (Lewenza *et al.*, 1999), stellt sich somit die Frage, ob die beobachteten Genomovar-spezifischen Charakteristika durch *cepIR*-homologe Gene determiniert sind. Um dies abzuklären, sollten die *Burkholderia* Isolate im Hinblick auf die *cep* Loci genotypisch

charakterisiert werden. Zuerst sollten vorhandene *cepIR*-homologe Gene mittels Southern-Blot-Hybridisierung nachgewiesen werden. Daraufhin sollten stellvertretend einige identifizierte *cepI*- bzw. *cepR*-homologe Gene einer weiterführenden genetischen Analyse, beruhend auf Sequenzanalyse und phylogenetischer Analyse, unterzogen werden.

C.2.1 Nachweis der *cepIR* Gene in Isolaten des *B. cepacia* Komplexes

Es sollte abgeklärt werden, ob in den Vertretern des gesamten *B. cepacia* Komplexes in Analogie zu *B. cepacia* Gv.III K56-2 *cepIR*-homologe Gene vorhanden sind. Von besonderem Interesse war, ob die Genomovar II (*B. multivorans*) Stämme, die einheitlich keine detektierbaren Mengen an AHLs produziert hatten, *cepIR*-homologe Gene tragen. Außerdem warf die Tatsache, daß Vertreter von *B. vietnamiensis* zusätzlich langkettige AHLs produzierten, die Frage auf, ob in diesem Genomovar grundsätzlich *cepIR*-homologe Gene oder möglicherweise zusätzliche *cepIR*-homologe Gene anwesend sind.

Aus diesen Gründen wurde ein Großteil der *Burkholderia* Isolate einer Southern-Blot-Analyse (s. B.5.4) unterzogen, wobei als Sonden DNS-Fragmente dienten, die Teile des *cepI* bzw. des *cepR* Gens darstellten (Abb. C.7). Die chromosomale DNS der Bakterienstämme wurde jeweils mit dem Restriktionsenzym *PstI* verdaut, da sich dieses Enzym aufgrund des Restriktionsmusters als besonders geeignet für die Analyse erwies. Abb. C.7 verdeutlicht die mutmaßlichen Bindungsstellen der Sonden *cepI* und *cepR* anhand des *cepIR* Operons von LMG 18863 (Lewenza *et al.*, 1999).

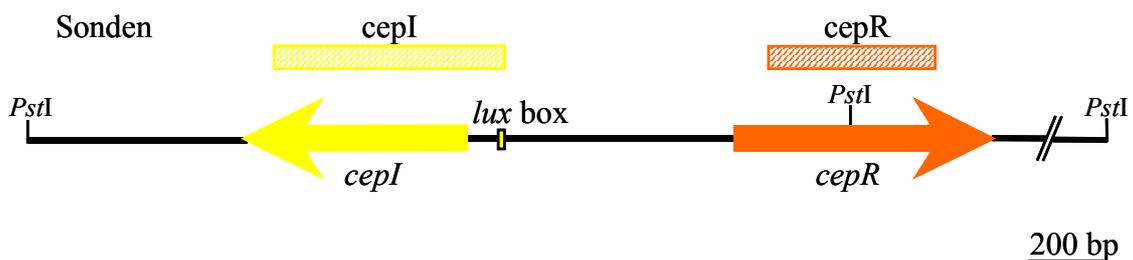


Abb. C.7: Schematische Darstellung des *cepIR* Locus von *B. cepacia* Gv.III LMG 18863 (Lewenza *et al.*, 1999) mit den voraussichtlichen Bindungsstellen der Sonden *cepI* und *cepR* (schraffierte Balken), die für den Nachweis von homologen *cepIR* Genen in Vertretern des gesamten *B. cepacia* Komplexes mittels Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzt wurden. Die Position der *lux* Box Sequenz in der Promotorregion von *cepI* ist angegeben. Die Lage von *PstI*-Restriktionsschnittstellen ist gekennzeichnet.

C.2.1.1 Nachweis des *cepI* Gens mittels Southern-Blot-Hybridisierung

Für den Nachweis des *cepI* Gens in Vertretern des *B. cepacia* Komplexes diente die 0,62 kb große, DIG-markierte Sonde *cepI* (B.5.4.1), die aus dem Stamm *B. stabilis* H193 durch PCR mit den Primern *cepI-1V/cepI-1R* hervorgegangen war (B.5.6.2). Überraschenderweise konnte in allen untersuchten 53 *Burkholderia* Stämmen jeweils ein Hybridisierungssignal mit der Sonde *cepI* detektiert werden, unabhängig davon, ob es sich um AHL-Produzenten handelte oder nicht (s. Tabelle C.2). Es fiel auf, daß die Sonde innerhalb eines jeweiligen Genomovars des *B. cepacia* Komplexes recht einheitlich mit einer bestimmten Fragmentgröße hybridisierte. In *B. cepacia* Gv.III (13/17), *B. stabilis* (14/15) und zwei von vier getesteten *B. cepacia* Gv.I Stämmen detektierte die Sonde *cepI* chromosomale DNA-Fragmente mit einer Größe von schätzungsweise 2,4 kb (Abb. C.8, Spuren 2, 4, 6). Bei je zwei Vertretern der *B. cepacia* Genomovare I (LMG 14087 und LMG 14095) und III (LMG 6993 und LMG 16655) betrug die Größe des detektierten Fragments 4,3 kb (Abb. C.8, Spuren 3, 5), hervorgerufen durch die fehlende *PstI* Schnittstelle innerhalb des *cepR* Gens, wie aus der *cepR*-Hybridisierung im folgenden Kapitel hervorging (s. C.2.1.2). Für *B. multivorans*, *B. cepacia* Gv.VI und *B. vietnamiensis* dagegen wurden Fragmentgrößen von 2 kb (10/16) bzw. 2,4 kb (5/5) bzw. 2,1 kb (4/9) sichtbar (Abb. C.8, Spuren 7 bzw. 9 bzw. 8). Abb. C.8 zeigt diese charakteristischen Hybridisierungssignale der Sonde *cepI* für repräsentative Vertreter eines jeden Genomovars des *B. cepacia* Komplexes. Die detaillierten Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung mit der Sonde *cepI* für alle untersuchten Stämme sind aus Tab. C.1 ersichtlich.

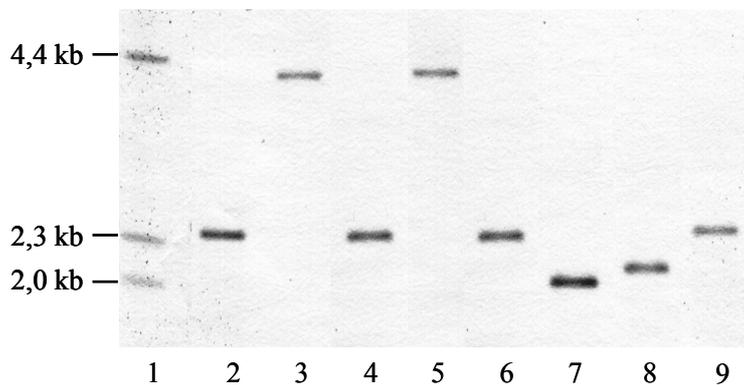


Abb. C.8: Southern-Blot-Hybridisierung *PstI*-verdauter chromosomaler DNS von ausgewählten Vertretern des *B. cepacia* Komplexes mit der *cepI*-spezifischen Sonde. Die Spuren 2-9 zeigen die Hybridisierungsprofile der Stämme (Spur 2) LMG 18821, Gv.I; (Spur 3) LMG 14087, Gv.I; (Spur 4) LMG 18863, Gv.III; (Spur 5) LMG 16655, Gv.III; (Spur 6) LMG 14291, Gv.IV; (Spur 7) LMG 16660, Gv.II; (Spur 8) R-921, Gv.V und (Spur 9) LMG 18943, Gv.VI. Spur 1 enthält *HindIII*-verdauete lambda DNS als Marker.

C.2.1.2 Nachweis des *cepR* Gens mittels Southern-Blot-Hybridisierung

Die DIG-markierte Sonde *cepR* (B.5.4.1), die für den Nachweis des *cepR* Gens in Vertretern des *B. cepacia* Komplexes eingesetzt wurde, war mit einer Größe von 0,45 kb mittels PCR mit den Primern *cepR*-3V/*cepR*-3R aus dem Stamm *B. cepacia* Gv.III H111 generiert worden (B.5.6.2). Bei der Hybridisierung mit der Sonde *cepR* konnten bei den meisten Stämmen (46/53) erwartungsgemäß zwei Hybridisierungssignale detektiert werden, was auf eine *Pst*I-Schnittstelle innerhalb des *cepR* Gens (Lewenza *et al.*, 1999; Abb. C.7) zurückzuführen ist. Wie unter C.2.1.1 bereits erläutert, war in fünf Stämmen aufgrund der fehlenden *Pst*I-Schnittstelle innerhalb von *cepR* nur ein einziges *cepR*-Signal sichtbar.

Zusätzlich zu den *cepI*-Fragmenten, die bereits Signale mit der Sonde *cepI* hervorgebracht hatten, hybridisierte die Sonde *cepR* außerdem mit einem Fragment der Größe 1,9 kb (Abb. C.9, Spuren 2, 4, 6) in Stämmen der *B. cepacia* Genomovare I (2/4) und III (13/16) und *B. stabilis* (14/14). Im Gegensatz dazu betrug die zusätzlich detektierte Fragmentgröße 1,2 kb (Abb. C.9, Spur 7) für die Vertreter von *B. multivorans* (8/9), 2,7 kb (Abb. C.9, Spur 8) für *B. vietnamiensis* (3/5) und 2,8 kb (Abb. C.9, Spur 9) für *B. cepacia* Gv.VI (5/5). Aus Abb. C.9 werden die charakteristischen Hybridisierungssignale der Sonde *cepR* für die repräsentativen Vertreter eines jeden Genomovars des *B. cepacia* Komplexes ersichtlich. Die detaillierten Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung mit der Sonde *cepR* für alle untersuchten Stämme sind ebenfalls in Tab. C.1 aufgeführt.

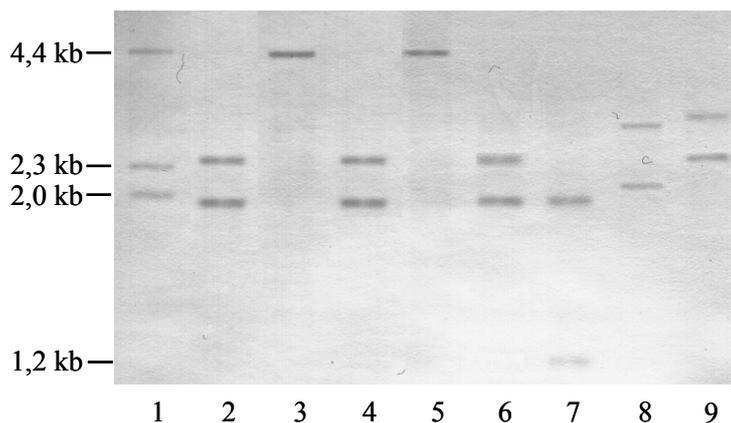


Abb. C.9: Southern-Blot-Rehybridisierung der *Pst*I-verdauten chromosomalen DNS der ausgewählten Vertreter des *B. cepacia* Komplexes (vgl. Abb. C.8) mit der *cepR*-spezifischen Sonde. Die Spuren 2-9 zeigen die Hybridisierungsprofile der Stämme (Spur 2) LMG 18821, Gv.I; (Spur 3) LMG 14087, Gv.I; (Spur 4) LMG 18863, Gv.III; (Spur 5) LMG 16655, Gv.III; (Spur 6) LMG 14291, Gv.IV; (Spur 7) LMG 16660, Gv.II; (Spur 8) R-921, Gv.V und (Spur 9) LMG 18943, Gv.VI. Spur 1 enthält *Hind*III-verdaute lambda DNS als Marker.

Eine Besonderheit im Hybridisierungsbild zeigten zwei Stämme, nämlich LMG 16657 (Gv.III) und R-3338 (Gv.IV, *B. stabilis*), da bei ihnen sowohl mit der Sonde *cepI* als auch mit der Sonde *cepR* noch ein zusätzliches Fragment der Größe 3,2 kb detektiert werden konnte (Tab. C.1), was möglicherweise auf einen zweiten *cepIR* Locus hindeutet.

C.2.2 Genetische Analyse der *cepIR* Gene aus Genomovaren des *B. cepacia* Komplexes

Da die Southern-Blot-Analyse im vorangegangenen Kapitel deutlich gemacht hat, daß der Mangel an AHL-Produktion nicht auf Abwesenheit der *cepIR* Loci beruht, wurden die Gene *cepI* und *cepR* einer weiterführenden genetischen Analyse unterzogen. Zu diesem Zweck wurden die *cepIR* Gene je eines repräsentativen Vertreters pro Genomovar mittels PCR amplifiziert und kloniert. Die anschließende vergleichende Sequenzanalyse sollte abklären, ob eventuell vorhandene Mutationen im *cepIR* Operon von *B. multivorans* für die fehlende AHL-Synthese verantwortlich sein könnten. Außerdem sollte der Sequenzvergleich mögliche genotypische, Genomovar-spezifische Charakteristika der *cepIR* Gene aufdecken. Eine nachfolgende phylogenetische Analyse sollte Hinweise auf die Verwandtschaftsverhältnisse der Genomovare untereinander geben.

C.2.2.1 Amplifikation des *cepIR* Locus und Klonierung in pCR[®]2.1-TOPO

Als repräsentative Vertreter des jeweiligen Genomovars, deren *cep* Loci amplifiziert und in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert werden sollten, waren die Stämme LMG 1222^T (Gv.I), LMG 16660 (Gv.II, *B. multivorans*), H111 (Gv.III), LMG 14291 (Gv.IV, *B. stabilis*), R-921 (Gv.V, *B. vietnamiensis*) und LMG 18943 (Gv.VI) ausgewählt geworden. Außerdem sollte im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Ivo Steinmetz (MHH, Hannover) der Stamm *B. pseudomallei* E8 untersucht werden. Ausgehend von der bereits bekannten Nukleotidsequenz des *cepIR* Locus aus dem Gv.III Stamm *B. cepacia* K56-2 (Lewenza *et al.*, 1999; Genbank-Zugangsnummer AF019654) wurden die PCR-Primer *cepIR-V* und *cepIR-R* abgeleitet, die den gesamten Locus in einer Länge von 2160 bp amplifizieren (Abb. C.10).

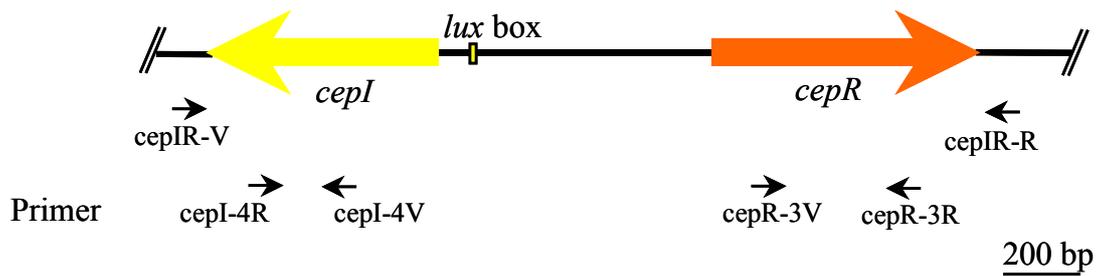


Abb. C.10: Schematische Darstellung des *cepIR* Locus von *B. cepacia* Gv.III LMG 18863 (Lewenza *et al.*, 1999) mit den Bindestellen der PCR-Primer, die für die Klonierung der homologen *cepIR* Gene (*cepIR-V/cepIR-R*) bzw. für eine Kontroll-PCR in konservierten Bereichen der Gene (*cepI-4R/cepI-4V* und *cepR-3V/cepR-3R*) aus Vertretern des gesamten *B. cepacia* Komplexes verwendet wurden.

Da bei allen verwendeten Stämmen PCR-Amplifikate mit einer Größe (2,16 kb) analog zu *B. cepacia* K56-2 entstanden, wurde davon ausgegangen, daß in diesen Vertretern die identische genetische Struktur des *cep* Locus vorliegt. Dies wurde in der anschließenden Sequenzanalyse der *cepIR* Gene bestätigt (s. C.2.2.3 bis C.2.2.5).

Eine erfolgreiche Klonierung konnte durch Restriktionsverdau der erhaltenen Klone mit *EcoRI* bzw. *PstI* und einer Kontroll-PCR mit intern im Amplifikat bindenden Primerpaaren überprüft werden. Diese Primerpaare (*cepI-4R/cepI-4V* bzw. *cepR-3V/cepR-3R*) wurden so gewählt, daß sie jeweils in der konservierten Region innerhalb von *cepI* bzw. *cepR* binden (vgl. Abb. C.10).

C.2.2.2 Sequenzanalyse der *cepI* Gene aus Genomovaren des *B. cepacia* Komplexes

Nach erfolgreicher Klonierung der amplifizierten *cep* Loci jeweils eines repräsentativen Vertreters pro Genomovar des *B. cepacia* Komplexes mit einer Größe von 2,16 kb wurde die Nukleotidsequenz des *cepI* Gens bestimmt. Die analysierten Nukleotidsequenzen sind in der Datenbank *GenBank* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* hinterlegt, und die zugehörigen Zugangsnummern in Tab. F.1 aufgelistet. Die Größe des *cepI* Gens belief sich bei allen Vertretern auf 609 Nukleotide, was einem abgeleiteten Genprodukt von 202 Aminosäuren entspricht. Die Sequenzanalyse dieser mutmaßlichen *CepI* Proteine aller Genomovare des *B. cepacia* Komplexes ergab eine Identität von ca. 72 % zueinander, da 145 der insgesamt 202 AS-Positionen in den analysierten Vertretern identisch waren (Abb. C.11).

ERGEBNISSE

LMG 1222 (Gv. I)	1	MRTFVHEEGRLPHELAADLGRYRRRVFVEQLGWALPSANESFERDQFDRDDTVYVFARNA
LMG 16660 (Gv. II)	1	MQTFVHEEGRQLPMPQATELARYRHRVFEVEQLGWTLPESADEGIDRDAFDHDDTVYVVARDG
H111 (Gv. III)	1	MQTFVHEEGRLPHELAADLGRYRRRVFVEQLGWALPSANVSFERDQFDRDDTVYVFARNA
LMG 18863 (Gv. III)	1	MQTFVHEEGRLPHELAADLGRYRRRVFVEQLGWALPSANESFERDQFDRDDTVYVFARNA
LMG 14921 (Gv. IV)	1	MRTFVHEEGRLPHELAADIGRYRRRVFVEQLGWALPSANESFERDQFDRDDTVYVFARNA
R-921 (Gv. V)	1	MRTFVHEEGRLPSELAELGRYRRRVFVEQLGWALPSANERFEHDQFDRDDTVYVFARDA
LMG 18943 (Gv. VI)	1	MQTFVHEEGRLPYELAADLGRYRRRVFVEQLGWALPSANEAFERDQFDRDDTVYVMARNA
		* . * * * * * . * * . * . . . * * * . * * * . * * * * . * * * * . * * . * * * * * * * * *
LMG 1222 (Gv. I)	61	GGDMCGCARLLPTTRPYLLKSLFADLIAEDMPLPQSAAVWELSRFAATDDEGGPGNAEWA
LMG 16660 (Gv. II)	61	SGEMCGCARLLPTTRPYLLETLEFADLIAPDLPLPRSAAVWELSRFAASGADGGASGADWA
H111 (Gv. III)	61	DGDMCGCARLLPTTRPYLLKSLFADLIAEDMPLPQSAAVWELSRFAATDDEGGPGNAEWA
LMG 18863 (Gv. III)	61	DGDMCGCARLLPTTRPYLLKSLFADLVAEDMPLPQSAAVWELSRFAATDDEGGPGNAEWA
LMG 14921 (Gv. IV)	61	DGDMCGCARLLPTTRPYLLGSLFADLIAEDMPLPQSAAVWELSRFAATDDESGSGNAEWA
R-921 (Gv. V)	61	GGDVCGCARLLPTTRPYLLESLEFADLIAEDVALPQSAAVWELSRFAATGDEGGAGNADWA
LMG 18943 (Gv. VI)	61	AGEMCGCARLLPTTQPYLLESLEFADLVAQDVPLPKSAAVWELSRFAATADENGPGNAEWA
		* . . *
LMG 1222 (Gv. I)	121	VRPMLAAVVECAAQLGARQLIGVTFASMERLFRRIGIHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDI
LMG 16660 (Gv. II)	121	VRPMLAAVVACAAERGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDI
H111 (Gv. III)	121	VRPMLAAVVECAAQLGARQLIGVTFASMERLFRRIGIHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDI
LMG 18863 (Gv. III)	121	VRPMLAAVVECAAQLGARQLIGVTFASMERLFRRIGIHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDI
LMG 14921 (Gv. IV)	121	VRPMLAAVVECAAQLGARQLIGVTFASMERLFRRIGIHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDI
R-921 (Gv. V)	121	VRPMLAVVVECAAQLGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDI
LMG 18943 (Gv. VI)	121	VRPMLAAVVECAAQLGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDI
		* *
LMG 1222 (Gv. I)	181	DPQTFAALGIEPGQARQAIAA
LMG 16660 (Gv. II)	181	DPQTFAALGIEPERIARPAIAA
H111 (Gv. III)	181	DPQTFAALGIEPGQARQAIAA
LMG 18863 (Gv. III)	181	DPQTFAALGIEPGQARQAIAA
LMG 14921 (Gv. IV)	181	DPQTFAALGIEPGQASRQAIAA
R-921 (Gv. V)	181	DPQTFAALGITPGRAARQAIAA
LMG 18943 (Gv. VI)	181	DPQTFAALGIEGPAARQAIAA
		* *

Abb. C.11: Vergleichendes CLUSTAL V Alignment der CepI Sequenzen von repräsentativen Vertretern verschiedener Genomovare („Gv.“) des *B. cepacia* Komplexes. Aminosäurepositionen, die in allen sieben aufgeführten Sequenzen identisch sind wurden mit einem Stern (*) versehen, ähnliche Positionen mit einem Punkt (.). Entsprechend Parsek *et al.* (1997) sind die zehn Positionen, die in allen Mitgliedern der LuxI-Proteinfamilie identisch sind, durch eine schwarze Markierung hervorgehoben. Die graue Markierung kennzeichnet die sieben Positionen, die in 90 % der Homologen konserviert sind und in den restlichen Mitgliedern ähnlich sind.

Außerdem wurde deutlich, daß die abgeleiteten CepI Proteine mit nur einer Ausnahme jeweils die zehn Aminosäuren aufweisen, die in Vertretern der LuxI-Proteinfamilie als absolut konserviert gelten (Parsek *et al.*, 1997). Die Ausnahme stellt ein Austausch von Glutaminsäure gegen Asparaginsäure an Position 43 des CepI von *B. multivorans* LMG 16660 dar (Abb. C.11).

C.2.2.3 Sequenzanalyse der *cepI* Gene aus *B. multivorans* Stämmen und

B. pseudomallei E8

Um herauszufinden, ob der vorhandene Aminosäure-Austausch an Position 43 des CepI bei Vertretern von Genomovar II (*B. multivorans*) konserviert ist, wurde von vier weiteren *B. multivorans* Stämmen jeweils die *cepI* Nukleotidsequenz bestimmt (s. Tab. F.1). Zu diesem Zweck wurde zuerst eine Amplifikation und Klonierung des gesamten *cep* Locus aus den Stämmen LMG 18822, R-139, LMG 17588 und H191 durchgeführt (vgl. C.2.2.1). Ausgehend von den klonierten *cep* Loci wurden dann die *cepI* Gene mit den Primern cepI-0V/cepI-0R gesondert amplifiziert und in pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Außerdem wurde noch die bereits bekannte Nukleotidsequenz des *cepI* von *B. multivorans* LMG 13010^T (Tögl, 2000) in die vergleichende Sequenzanalyse integriert.

Es zeigte sich, daß der Austausch einer Glutaminsäure gegen eine Asparaginsäure an Position 43 von CepI in allen untersuchten *B. multivorans* Stämmen erfolgt war (Abb. C.12). Desweiteren wurde deutlich, daß es sich bei *B. multivorans* LMG 13010^T bezüglich der abgeleiteten CepI Sequenz um einen recht ungewöhnlichen Vertreter handelt. Einzig dieser Stamm weist in seiner *cepI*-Nukleotidsequenz ein Stopcodon (UGA an Position 100 der Aminosäuresequenz) auf, das jedoch den Leserahmen nicht zerstört. Bei allen anderen analysierten CepI Proteinen hingegen kodiert das Triplet an dieser Stelle für Tryptophan. Außerdem besitzt die Proteinsequenz einige weitere Abweichungen vom *B. multivorans* Konsensus, was folglich die Identität der CepI Sequenzen untereinander von 94 % auf 88 % herabsetzt (Abb. C.12).

Erstaunlicherweise stellte sich im Zuge der CepI Sequenzanalyse auch heraus, daß das *cepI* homologe Gen aus *B. pseudomallei* E8 eine sehr hohe Ähnlichkeit mit den *cepI* Genen der *B. multivorans* Stämme besitzt. Auf Nukleotidebene weist das *cepI* homologe Gen aus *B. pseudomallei* E8 nur eine einzige Abweichung (Position 347) vom Nukleotidkonsensus der *B. multivorans cepI* Gene auf. Darauf beruhend stimmt die abgeleitete AS-Sequenz des Genprodukts zu 100 % mit dem CepI Konsensus von *B. multivorans* überein (Abb. C.12). Der für *B. multivorans* charakteristische AS-Austausch ist ebenfalls vorhanden. Im Gegensatz zu allen *B. multivorans* Vertretern handelt es sich bei dem involvierten *B. pseudomallei* Stamm allerdings um einen AHL-Produzenten, der die für den *B. cepacia* Komplex typischen AHLs C6-HSL und C8-HSL synthetisiert (Geisenberger, persönliche Mitteilung).

ERGEBNISSE

LMG 16660	MQTFVHEGRQLPMPQATELARYRHRVFVEQLGWTLPSADEGIDRDAFDHDDTVYVVAR
LMG 18822	MQTFVHEGRQLPIAQATELARYRHRVFVEQLGWTLPSADEGIDRDAFDHDDTVYVVAR
R-139	MQTFVHEGRQLPIAQATELARYRHRVFVEQLGWTLPSADEGIDRDAFDHDDTVYVVAR
LMG 17588	MQTFVHEGRQLPIAQATELARYRHRVFVEQLGWTLPSADEGIDRDAFDHDDTVYVVAR
R-6284	MQTFVHEGRQLPMPQATDVARYRHRVFVEQLGWTLPSADEGIDRDAFDHDDTVYVVAR
<i>B. ps.mallei</i>	MQTFVHEGRQLPIAQATELARYRHRVFVEQLGWTLPSADEGIDRDAFDHDDTVYVVAR *****.***.*****
LMG 13010	MQTFVHEGRQLPIAEATELARYRHRVFVEQLGWTLPSADEGIDRDAFDHDDTVYVIAR *****.***.*****
LMG 16660	SGEMCGCARLLPTTRPYLLETFLFADLIAPDLPLPRSAAVWELSRFAASGADGGASGADWA
LMG 18822	SGAMCSCARLLPTTRPYLLETFLFADLIAPDLPLPRSAAVWELSRFAASGADGGASGADWA
R-139	SGAMCSCARLLPTTRPYLLETFLFADLIAPDLPLPRSAAVWELSRFAASGADGGASGADWA
LMG 17588	SGEMWGCARLLPTTRPYLLETFLFADLIAPDLPLPRSAAGWELLRFAASDADGGASGADWA
R-6284	SGAMCSCARLLPTTRPYLLETFLFADLIAPDLPLPRSAAVWELSRFAASGADGGASGADWA
<i>B. ps.mallei</i>	SGEMCGCARLLPTTRPYLLETFLFADLIAPDLPLPRSAAVWELSRFAASGADGGASGADWA ** * ***** ** *****
LMG 13010	SGELCGCARLLPTTRPYLLETFLFADLIAPDLPLPRSTAVELSRFAASGPDGGATGADWA ** . ***** *
LMG 16660	VRPMLAAVVACAAERGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDL
LMG 18822	VRPMLAAVVACAAERGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDL
R-139	VRPMLAAVVACAAERGARQLIGVTFASKERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDL
LMG 17588	VRPMLAAVVACAAERGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDL
R-6284	VRPMLAAVVACAAERGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDL
<i>B. ps.mallei</i>	VRPMLAAVVACAAERGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHAHRAGPPKQVDGRLVVACWIDL *****
LMG 13010	VRPMLAAVVSCAAERGARQLIGVTFASMERLFRRIGVHTHRAGPPKQVDGRQVVACWIDL *****.*****.*****
LMG 16660	DPQTF AALGIEPERIARPAIAA
LMG 18822	DPQTF AALGIEPERIARPAIAA
R-139	DPQTF AALGIEPERIARPAIAA
LMG 17588	DPQTF AALGIEPERIARPAIAA
R-6284	DPQTF AALGIEPERIARPAIAA
<i>B. ps.mallei</i>	DPQTF AALGIEPERIARPAIAA *****
LMG 13010	DPQTF AALGIEPERIAQARIAA *****.***

Abb. C.12: Vergleichendes CLUSTAL V Alignment der CcpI Sequenzen von sechs *B. multivorans* (Gv.II) und einem *B. pseudomallei* („*B. ps.mallei*“) Stamm. Aminosäurepositionen, die in den sechs bzw. sieben aufgeführten Sequenzen identisch sind, wurden mit einem Stern (*) versehen, ähnliche Positionen mit einem Punkt (.). Die schwarze Markierung kennzeichnet einen für *B. multivorans* charakteristischen Aminosäure-Austausch (E → D: Glutaminsäure gegen Asparaginsäure) an Position 43. Das ungewöhnliche „in frame“ Stop-codon in der Sequenz des *B. multivorans* Typstamms an Position 100 ist durch rote Markierung hervorgehoben.

C.2.2.4 Sequenzanalyse der *cepR* Gene aus Genomovaren des *B. cepacia* Komplexes

Da jeweils der gesamte *cep* Locus aus je einem repräsentativen Vertreter pro Genomovar des *B. cepacia* Komplexes kloniert worden war, konnte auch eine vergleichende *cepR* Sequenzanalyse durchgeführt werden. Die Größe des *cepR* Gens betrug in allen Vertretern 720 Nukleotide (s. Tab. F.1). Die Analyse der abgeleiteten CepR Proteine ergab mit 211 identischen Positionen von insgesamt 239 Aminosäuren eine noch höhere Identität (88 %) als für die ermittelten CepI Proteine (Abb. C.13).

Von Fuqua *et al.* (1996) wurden sieben völlig konservierte Aminosäuren in Vertretern der LuxR-Proteinfamilie identifiziert. Wie auch schon vor kurzem für *B. cepacia* Gv.III K56-2 gezeigt wurde (Lewenza *et al.*, 1999), befindet sich an einer dieser konservierten Positionen ein Austausch in den CepR Sequenzen aller Genomovare. Es handelt sich dabei um einen Austausch von Prolin gegen Serin an Position 77. Der Austausch der konservierten Glutaminsäure gegen Asparaginsäure an der Position 180 jedoch, der für *B. cepacia* K56-2 postuliert wurde, konnte in keiner weiteren der bestimmten CepR Sequenzen entdeckt werden (Abb. C.13).

Das *cepR* homologe Gen aus *B. pseudomallei* E8 weist, wie auch das *cepI* homologe Gen aus diesem Stamm, die höchste Identität zu jenem von *B. multivorans* auf. Mit nur einer Abweichung (Position 169 der Nukleotidsequenz) zeigt es absolute Übereinstimmung mit der *cepR* Sequenz von *B. multivorans* LMG 16660. Allerdings ruft diese Abweichung einen AS-Austausch an einer hoch konservierten Stelle der LuxR-Proteinfamilie (Fuqua *et al.*, 1996) hervor (Threonin gegen Alanin, Position 57), der bei allen analysierten CepR Sequenzen der *B. cepacia* Genomovare nicht zu finden ist (Abb. C.13).

C.2.2.5 Phylogenetische Analyse der *cepIR* Gene aus Genomovaren des *B. cepacia* Komplexes

Nachdem aus der vergleichenden *cepIR* Sequenzanalyse für die repräsentativen Vertreter einige Genomovar-spezifische Unterschiede ersichtlich geworden waren (s. C.2.2.3 bis C.2.2.5), sollte nun eine phylogenetische Analyse, betreffend diese Gene, Hinweise auf den Verwandtschaftsgrad der Genomovare untereinander geben. Aufgrund der hohen Identität der abgeleiteten *CepI* bzw. *CepR* AS-Sequenzen zueinander wurden die phylogenetischen Stammbäume auf der Basis der entsprechenden Nukleotidsequenzen berechnet. Abb. C.14 zeigt das jeweils endgültige Ergebnis des Baumberechnungsverfahrens für die *cepI* bzw. die *cepR* Gene der repräsentativen Vertreter eines jeden Genomovars.

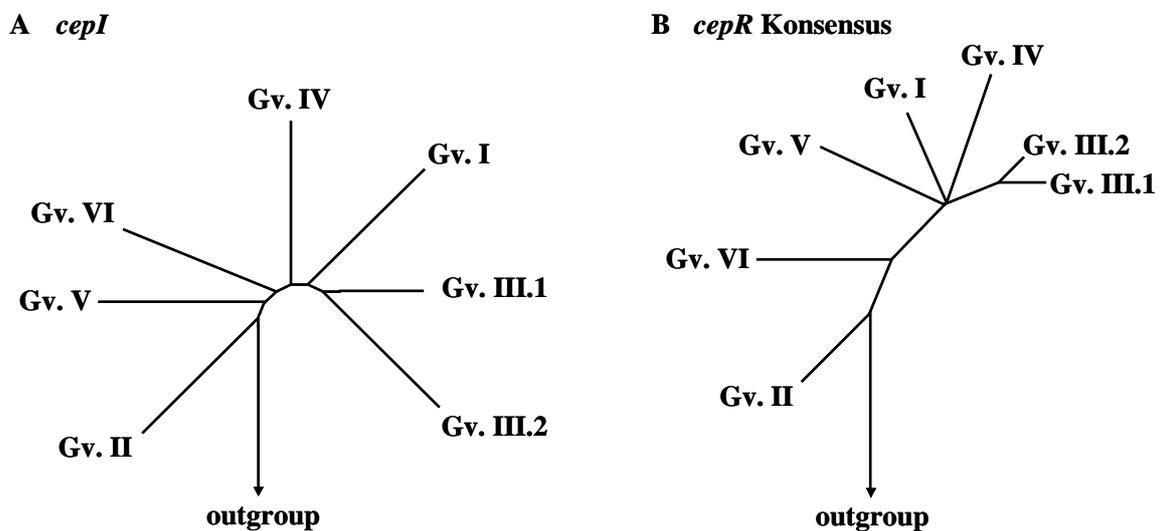


Abb. C.14: Phylogenetische Dendrogramme für (A) die *cepI* bzw. (B) die *cepR* Gene jedes ausgewählten Vertreters der verschiedenen Genomovare des *B. cepacia* Komplexes. Die Vertreter sind LMG 1222¹ (Gv.I), LMG 16660 (Gv.II), LMG 18863 (Gv.III.1), H111 (Gv.III.2), LMG 14291 (Gv.IV), R-921 (Gv.V) und LMG 18943 (Gv.VI). Als Berechnungsmethoden dienen „maximum likelihood“, „neighbour joining“ und „parsimony“ unter Verwendung der entsprechenden LMG 18863 Nukleotidsequenz als Filter. Als „outgroup“ wurden *luxI*- bzw. *luxR*-homologe Sequenzen aus der Gruppe der α -Proteobakterien, β -Proteobakterien, Enterobakterien und Pseudomonaden gewählt. Das Dendrogramm für die repräsentativen *cepR* Gene stellt einen Konsensus aus den drei genannten Berechnungsmethoden dar.

Für die *cepI* Gene führten alle drei alternativ angewendeten Berechnungsmethoden - „maximum likelihood“, „neighbour joining“ und „parsimony“ - zu einer identischen Baum-Topologie. Die repräsentativ für jedes Genomovar gewählten *cepI* Gene trennen sich klar voneinander ab, und auch eine Abtrennung der Gene des *B. cepacia* Komplexes von den homologen Genen der „outgroup“ wird deutlich. Die *cepI* Phylogenie innerhalb des *B. cepacia* Komplexes basiert auf insgesamt 174 Nukleotiden, die sich von der *cepI* Konsensussequenz (609 Nukleotide) unterscheiden. Davon handelt es sich bei 98 Nukleotiden

um die jeweils dritte Position (sog. „wobble“ Position) eines Triplets, bei 33 Nukleotiden um die zweite Triplettsposition und bei den restlichen 43 Nukleotiden um die erste Position.

Bei dem phylogenetischen Stammbaum für die *cepR* Gene handelt es sich um einen Konsensus aus den drei genannten Berechnungsmethoden. Da sich für die repräsentativen *cepR* Gene der *B. cepacia* Genomovare I, IV (*B. stabilis*) und V (*B. vietnamiensis*) keine übereinstimmende Auflösung errechnen ließ, wurde eine Konsensus-Topologie gewählt, die eine Mehrfachverzweigung für diese drei Genomovare aufweist. Die Abtrennung zu den homologen Genen der „outgroup“ ist wieder vorhanden. Die *cepR*-Phylogenie innerhalb des *B. cepacia* Komplexes beruht auf insgesamt 150 Nukleotiden, die von der Konsensussequenz (720 Nukleotide) abweichen. Der überragende Teil (112 dieser Nukleotide) stellt „wobble“ Positionen dar, während nur 13 Nukleotide die zweite und 25 die erste Triplettsposition beschreiben.

Eine detaillierte Beschreibung der Verwandtschaftsgrade der involvierten Gene zueinander gibt die jeweilige Distanzmatrix für die *cepI* bzw. *cepR* Gene wieder (Tab. C.2).

	<i>cepI</i> <i>cepR</i>						
	H111	LMG 18863	LMG 14291	R-921	LMG 18943	LMG 1222 ^T	LMG 16660
H111 (Gv.III)	1,00						
LMG 18863 (Gv.III)	0,98	1,00					
LMG 14291 (Gv.IV)	0,93	0,93	1,00				
R-921 (Gv.V)	0,87	0,87	0,86	1,00			
LMG 18943 (Gv.VI)	0,89	0,90	0,89	0,85	1,00		
LMG 1222 ^T (Gv.I)	0,97	0,96	0,94	0,88	0,90	1,00	
LMG 16660 (Gv.II)	0,83	0,83	0,82	0,81	0,82	0,83	1,00

Tab. C.2: Berechnete Distanzmatrix-Werte für die *cepI* (oberer Wert) bzw. *cepR* (unterer Wert) Gene jedes repräsentativen Vertreters der verschiedenen *B. cepacia* Genomovare.

C.3 Funktionelle Analyse des *cepI* Gens aus Genomovaren des *B. cepacia* Komplexes

Die vorausgegangene genotypische Charakterisierung der verschiedenen Genomovare des *B. cepacia* Komplexes hatte ergeben, daß in allen Vertretern ein *cepIR* Locus vorhanden ist, dessen *cepI*- und *cepR*-Gen jeweils starke Homologie zu den bekannten *cepIR* Genen von

B. cepacia Gv.III K56-2 aufweist. Nun sollte untersucht werden, ob die Sequenzvariationen innerhalb der CepI Proteine, vor allem in Hinblick auf *B. multivorans* und *B. vietnamiensis*, für die Unterschiede in Menge bzw. Art der synthetisierten AHL-Moleküle verantwortlich sind. Von speziellem Interesse war, inwieweit der Austausch der Glutaminsäure gegen Asparaginsäure an Position 43 der CepI aller Genomovar II (*B. multivorans*) Stämme Bedeutung für die fehlende AHL-Produktion hat.

Es galt somit zu klären, ob bzw. welche AHL-Moleküle von den CepI Proteinen aus den verschiedenen Genomovaren synthetisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen *cepI* Gene in einen Expressionsvektor kloniert, heterolog in *E. coli* XL1-Blue exprimiert und die synthetisierten AHL-Moleküle anschließend analysiert. Der besondere Vorteil des heterologen *E. coli* Expressionssystem war in diesem Fall darin zu sehen, daß eine funktionelle Analyse des jeweiligen CepI Proteins, unabhängig und unbeeinflusst von *Burkholderia*-spezifischen regulatorischen Faktoren, möglich war.

C.3.1 Konstruktion von *cepI*-Expressionsvektoren

Ausgehend von den entsprechenden bereits klonierten *cepIR* Loci wurden die *cepI* Gene der Stämme *B. multivorans* LMG 16660 (Gv.II), *B. vietnamiensis* R-921 (Gv.V) und *B. cepacia* Gv.III H111 mittels PCR unter Verwendung des Primerpaars *cepI*-V-Exp/*cepI*-R-Exp, amplifiziert. Die Primer waren so gewählt worden, daß sie *cepI* ohne strangaufwärts liegende *lux* Box amplifizieren und nach erfolgter Klonierung der korrekte Leserahmen des kodierten Proteins erhalten bleibt. Außerdem waren die Primer an den 5'-Enden mit den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI bzw. *Hind*III versehen worden, um eine gerichtete Ligation des 0,6 kb großen Amplikons in den *Bam*HI/*Hind*III geöffneten Expressionsvektor QIAexpress[®] pQE-32 (QIAGEN, Hilden) zu ermöglichen. Unter Kontrolle des starken, IPTG-induzierbaren Promotors T5 und durch die Anwesenheit einer synthetischen Ribosomenbindestelle waren somit eine fehlerlose und effiziente CepI Expression gewährleistet. Das Konstruktionsschema für die beschriebenen *cepI*-Expressionsvektoren ist in Abb. C.15 dargestellt.

In Analogie zu dieser Vorgehensweise wurde auch das *cepI* Gen von LMG 13010^T (*B. multivorans*), das laut Sequenzanalyse des entsprechenden *cepIR* Locus ein UGA-Stopcodon (Position 100 der AS-Sequenz) trägt, in den Expressionsvektor pQE-32 kloniert (Abb. C.16). Es sollte überprüft werden, wie sich dieses - vermutlich durch Translationsstop verkürzte - CepI Protein (100 anstatt 239 Aminosäuren Länge) im Vergleich zu den anderen CepI Proteinen bezüglich der Synthese von AHL-Molekülen verhält. Als Kontrolle wurde zusätzlich noch ein verkürztes *cepI* Gen, das mittels PCR mit dem Primerpaar *cepI*-V-

Exp/cepI-R-ExpStop unter Verwendung des *cepIR* Locus von H111 (*B. cepacia* Gv.III) als „template“ erhalten worden war, in den Expressionsvektor pQE-32 kloniert (Abb. C.17). Das resultierende Amplikon war durch die gewählten Primer artifiziell auf eine Länge von 0,3 kb verkürzt und das kodierte CepI Protein folglich in seiner Größe dem mutmaßlichen CepI von LMG 13010^T nachempfunden.

C.3.2 Heterologe Expression von CepI in *Escherichia coli*

Die unterschiedlichen *cepI*-Expressionsvektoren wurden jeweils durch Elektroporation in den heterologen Wirt *E. coli* XL1-Blue transferiert. Nach Induktion der CepI Expression mit 2 mM IPTG konnte die AHL-Produktion der Klone entweder durch Kreuzstrich-Assays oder DC-Analyse der AHL-Extrakte mit Hilfe der Biosensoren überprüft werden. Für die DC-Analyse wurden die Zellen, welche den entsprechenden Vektor trugen, zunächst bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,2$ angezogen. Nach Induktion der CepI Expression durch Zugabe von 2 mM IPTG wurden die Kulturen dann bei einer $OD_{600} = 1,0$ geerntet, und die AHLs wie beschrieben aus dem zellfreien Kulturüberstand extrahiert. Abb. C.18 zeigt die AHL-Profile der *E. coli* XL1-Blue Klone, welche die AHL-Synthasen von *B. cepacia* Gv.III, *B. multivorans* bzw. *B. vietnamiensis* exprimieren.

In allen drei Fällen führte die Expression von *cepI* in *E. coli* zur Produktion von vergleichbaren Mengen an C6-HSL und C8-HSL. Somit wird deutlich, daß die AHL-Synthase CepI von *B. multivorans* analog zu CepI von *B. cepacia* Gv.III ebenfalls grundsätzlich die Fähigkeit zur Synthese von C6-HSL und C8-HSL besitzt. Außerdem zeigt sich, daß die CepI AHL-Synthase von *B. vietnamiensis* nur C6-HSL und C8-HSL produziert, während sie die Produktion von C10-C14-HSL nicht zu steuern scheint. Interessanterweise erzeugte die heterologe Expression von CepI der verschiedenen Genomovare einen zusätzlichen Spot auf der DC-Platte. Laut Vergleich des R_f -Werts mit synthetischen AHL Standards handelt es sich dabei höchstwahrscheinlich um *N*-Heptanoyl-homoserinlacton (C7-HSL). Dieses Molekül wurde kürzlich in zellfreien Kulturüberständen von *Rhizobium leguminosarum* Biovar identifiziert (Lithgow *et al.*, 2000).

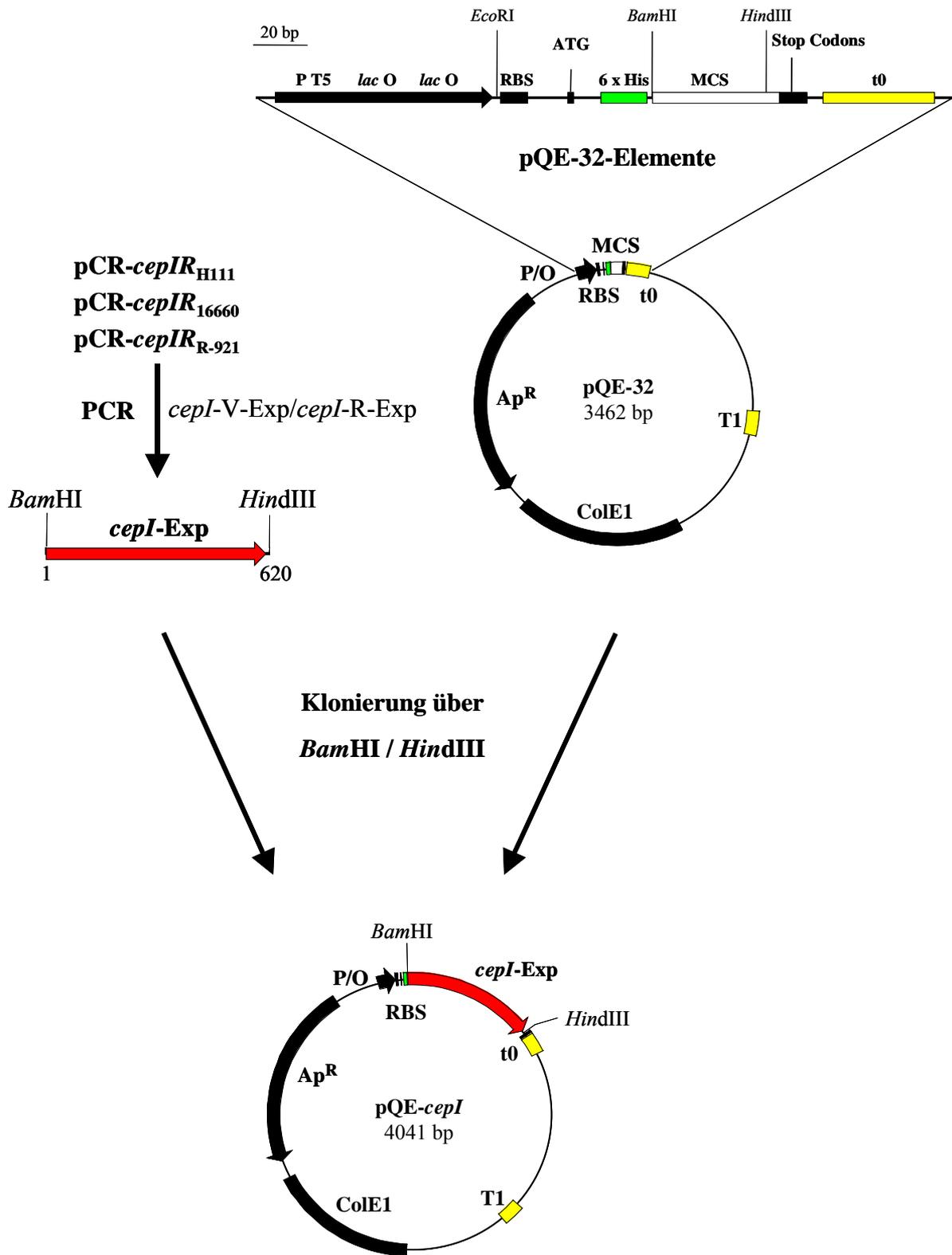


Abb. C.15: Konstruktionsschema der Expressionsvektoren pQE-*cepI* für die CepI Proteine der Stämme *B. cepacia* H111, *B. multivorans* LMG 16660 und *B. vietnamiensis* R-921.

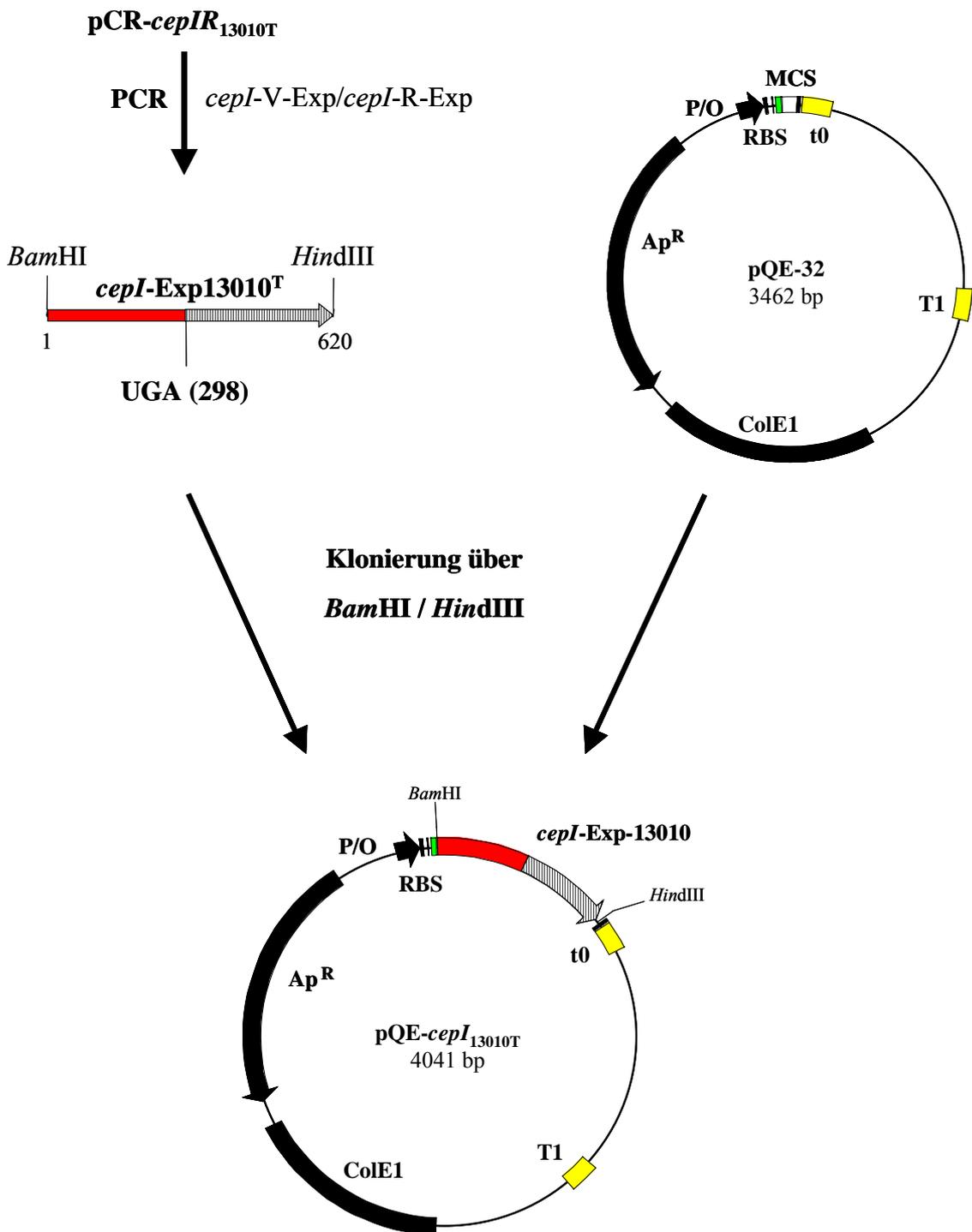


Abb. C.16: Konstruktionsschema des Expressionsvektors *pQE-cepI_{13010T}* für das CepI Protein von *B. multivorans* LMG 13010^T.

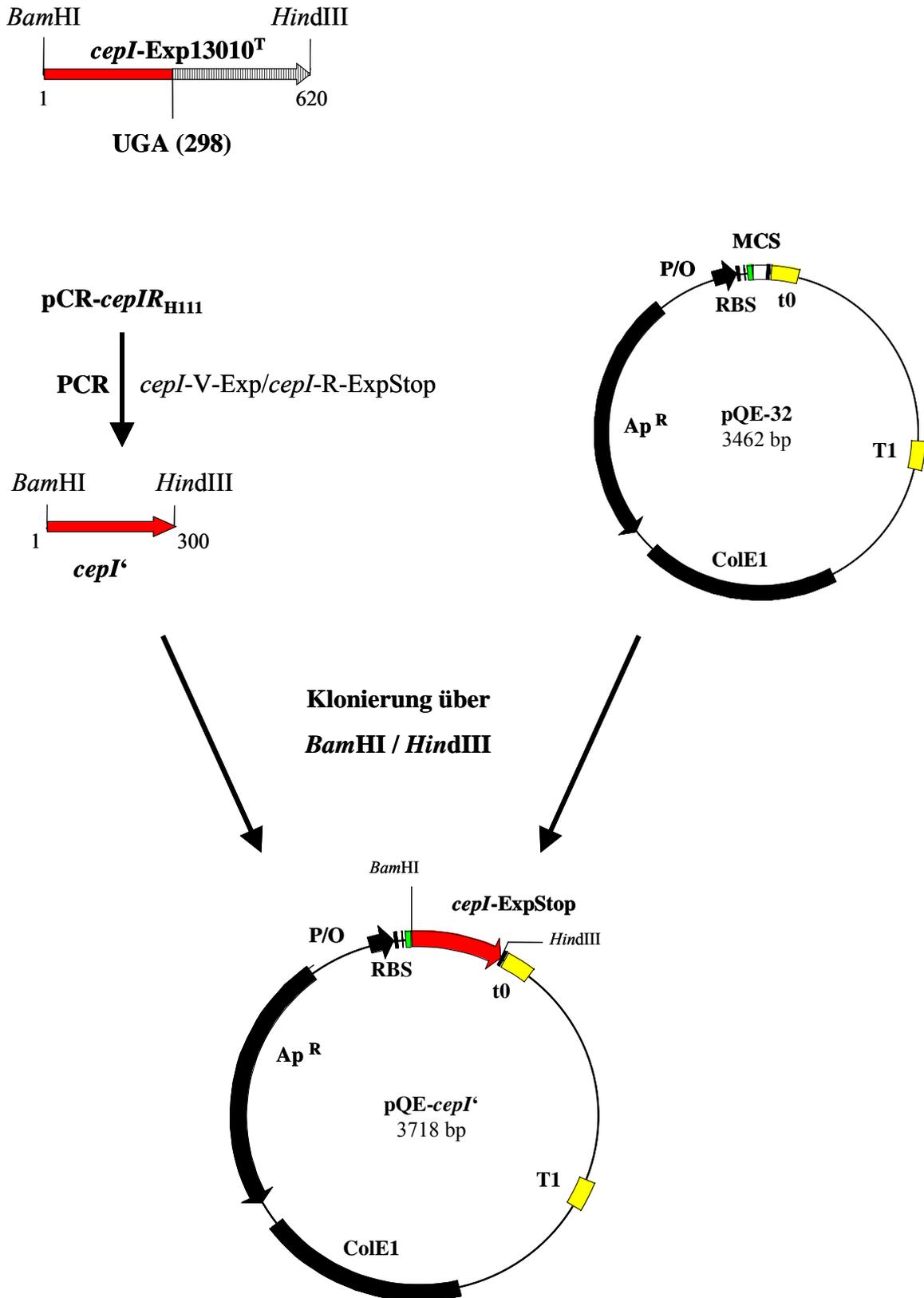


Abb. C.17: Konstruktionsschema des Expressionsvektors *pQE-cepI'* für das artifiziell verkürzte CepI Protein von *B. cepacia* H111.

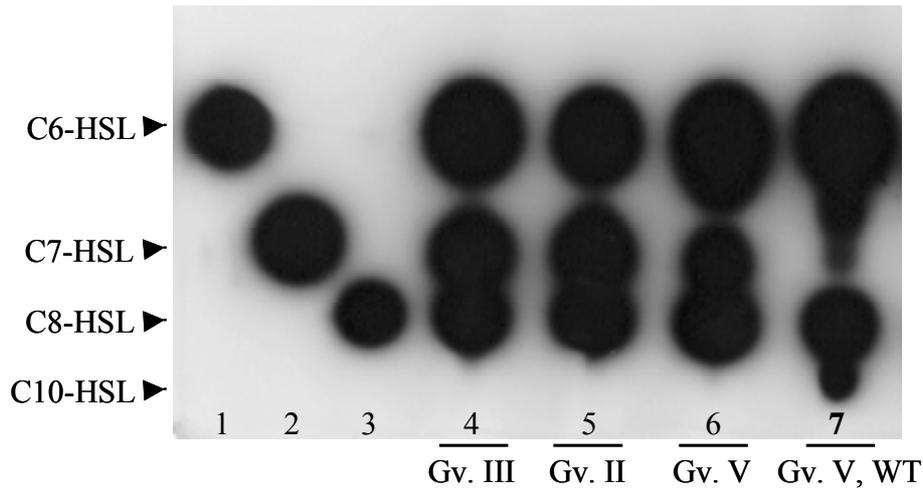


Abb. C.18: Analyse der AHL-Produktion von *E. coli* XL1-Blue Klonen, die *cepI* von verschiedenen Genomovaren des *B. cepacia* Komplexes exprimieren: Gv.III (Spur 4), Gv.II (Spur 5) und Gv.V (Spur 6). Die AHLs der Extrakte aus zellfreien Kulturüberständen wurden mittels DC aufgetrennt und durch einen Softagar-Overlay, angeimpft mit dem biolumineszenten Sensor *E. coli* MT102 (pSB403), nachgewiesen. Die Spuren 4-6 enthalten Extrakte von *E. coli* XL1-Blue mit pQE-*cepI*_{H111} (Gv.III), pQE-*cepI*₁₆₆₆₀ (Gv.II) bzw. pQE-*cepI*_{R-921} (Gv.V), deren Volumen äquivalent zu 2 ml Kultur (Spur 4) bzw. 3 ml Kultur (Spur 5) bzw. 6 ml Kultur (Spur 6) sind. Spur 7 zeigt den Wildtyp-Extrakt entsprechend 7 ml des zellfreien Kulturüberstand von *B. vietnamiensis* R-921, angezogen in LB-Medium. Synthetische AHL-Standards sind in den Spuren 1 (C6-HSL), 2 (C7-HSL) und 3 (C8-HSL) aufgetragen.

Die beiden *E. coli* Klone, die die Expressionsvektoren pQE-*cepI*_{13010T} bzw. pQE-*cepI* trugen und somit aufgrund der *cepI* Nukleotidsequenz verkürzte CepI Proteine exprimieren sollten, wurden mittels Kreuzstrich-Assay gegen den biolumineszenten Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) auf AHL-Produktion getestet. Der Assay wurde in diesem Fall auf 2 mM IPTG enthaltenden LB-Platten durchgeführt, um die Induktion der CepI Expression zu gewährleisten. Es wurde erwartet, daß beide Klone keine AHLs synthetisieren können, da vorzeitiger Translationsstop bzw. artifiziell verkürztes *cepI* Gen zur Expression stark verkürzter und folglich inaktiver CepI Proteine führen sollte. Allerdings zeigte sich, daß zwar das deletierte *cepI*_{H111} tatsächlich AHL-negativ ist, jedoch das *cepI*_{13010T} mit dem UGA Stopcodon an Position 100 der Aminosäuresequenz und weiteren Mutationen für eine funktionstüchtige AHL-Synthase kodiert. Wie aus Abb. C.19 hervorgeht, regt *E. coli* XL1-Blue (pQE-*cepI*_{13010T}) den Sensorstamm zu Biolumineszenz an, während *E. coli* XL1-Blue (pQE-*cepI*) keine Aktivierung hervorruft.

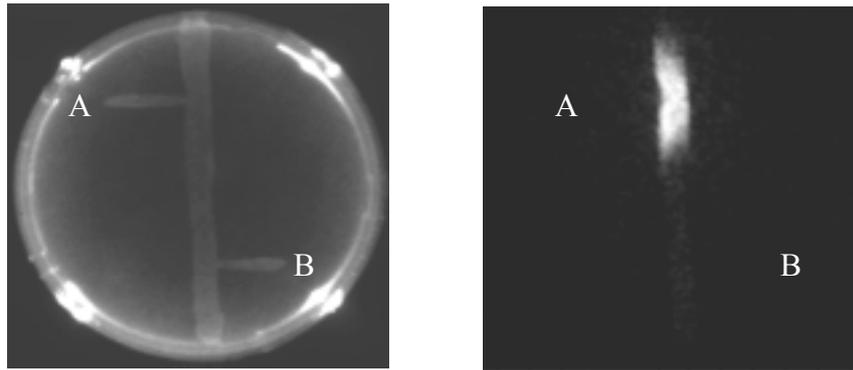


Abb. C.19: Kreuzstrich-Assay mit den Klonen (A) *E. coli* XL1-Blue (pQE-*cepI*_{13010T}) und (B) *E. coli* XL1-Blue (pQE-*cepI'*) gegen den biolumineszenten Sensor *E. coli* MT102 (pSB403). Aktivierung des Sensorstammes durch *E. coli* XL1-Blue (pQE-*cepI*_{13010T}) beweist AHL-Produktion aufgrund einer funktionellen AHL-Synthase, fehlende Aktivierung durch *E. coli* XL1-Blue (pQE-*cepI'*) ist auf inaktive AHL-Synthase zurückzuführen. Die Dokumentation (links Tageslichtaufnahme, rechts Biolumineszenzaufnahme) erfolgte mit dem CCD-Kamerasystem C2400-40 und dem ARGUS20/HPD-CP-Softwarepaket (Hamamatsu Photonics, Herrsching).

C.4 Erzeugung einer Knock-out Mutation im *cepI* Gen von *B. cepacia*

Die phänotypische Charakterisierung der 70 Vertreter des *B. cepacia* Komplexes bezüglich AHL-, Exoenzym- und Siderophor-Produktion hatte keine eindeutigen Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Synthese von AHLs und der Synthese dieser potentiellen Pathogenitätsfaktoren ergeben (s. C.1). Um Aufschluß über mögliche AHL-regulierte Phänotypen im *B. cepacia* Komplex zu erhalten, sollte nun durch gerichtete Mutation im *cepI* Gen eines geeigneten Vertreters die AHL-Synthase inaktiviert werden. Die nachfolgende vergleichende Charakterisierung der erzeugten AHL-defizienten Mutante gegenüber dem AHL-produzierenden Wildtyp sollte helfen, AHL-regulierte Funktionen, besonders in Hinblick auf die Pathogenität des Organismus, aufzuklären. Außerdem war der Einsatz der AHL-defizienten Mutante als AHL-Biosensor in Untersuchungen zu intergenerischer Kommunikation geplant.

Als Methode für die Mutagenese erschien das auf pEX-Vektoren basierende „gene replacement“ System (Schweizer und Hoang, 1995) vielversprechend, da dieses schon mehrfach erfolgreich für gerichtete Mutagenese in *P. aeruginosa* (Hoang *et al.*, 1998) und auch in *P. putida* (Rothballe, 2000) eingesetzt worden war. Hierbei wird mittels zweier aufeinanderfolgender Rekombinationsereignisse („double cross-over“) ein im Chromosom befindliches spezifisches Gen durch Insertion einer inaktivierten Kopie ersetzt (vgl. Abb. B.1).

Voraussetzung für die chromosomale Insertionsinaktivierung von *cepI* über homologe Rekombination war die Konstruktion eines geeigneten Vektors. Nach erfolgter Mutagenese

und Selektion der *cepI* Mutanten wurde die generierte Mutation geno- und phänotypisch bestätigt.

C.4.1 Auswahl eines geeigneten *Burkholderia* Stammes

Zuerst mußte ein Stamm gefunden werden, der für die Konstruktion einer *cepI* Mutanten geeignet ist. Wichtigste Voraussetzung war natürlich, daß es sich bei dem gewählten Vertreter um einen möglichst typischen AHL-Produzenten handelte. Außerdem sollte der Wildtyp-Stamm nach Möglichkeit klinische Relevanz haben, da Studien mit der zugehörigen *cepI* Mutante besonders in Hinblick auf veränderte Virulenz interessant erschienen. Tatsächlich ausschlaggebend jedoch war das Vorhandensein von Antibiotika-Sensitivitäten, da die erwünschte genetische Manipulation nur unter Zuhilfenahme entsprechender Selektionsmarker möglich war. Tab. C.3 verdeutlicht die Schwierigkeit, Vertreter des *B. cepacia* Komplexes genetisch zu manipulieren, da fast ausnahmslos Multiresistenz gegenüber den als Selektionsmarker üblichen Antibiotika festzustellen war.

Stamm	Wachstum auf Antibiotikum (µg/ml)							
	Ap 100	Cb 600	Cm 25	Gm 25	Km 50	Rif 150	Sm 50	Tc 10
H111	+	+	-	-	-	+	-	+
H118	+	+	+	+	+	+	+	+
H134	+	+	+	+	+	+	+	+
H145	+	+	+	+	+	+	+	+
H147	+	+	+	+	+	+	+	+
H162	+	+	+	+	+	+	+	+
H175	+	+	+	+	+	+	+	+
H177	+	+	+	+	+	+	+	+
H177E	+	+	+	+	+	+	+	+
H193	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 1222	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 6993	+	+	-	+	+	+	+	+

Tab. C.3: Ergebnisse des Antibiotika-Sensitivitätstest bei relevanten Vertretern des *B. cepacia* Komplexes: + bedeutet Wachstum auf LB-Agarplatte mit entsprechender Antibiotikumskonzentration, - bedeutet fehlendes Wachstum. H bezeichnet klinische Isolate aus CF-Patienten der MHH, Hannover. Bei den LMG Stämmen handelt es sich um Umweltisolate.

Unter den zehn AHL-positiven CF-Isolaten der MHH befand sich nur ein Stamm, nämlich Stamm H111, der Sensitivität gegenüber gleichzeitig mehreren Antibiotika (Chloramphenicol, Gentamycin, Kanamycin, Streptomycin) aufwies. Interessanterweise handelt es sich bei diesem Vertreter als einzigen um *B. cepacia* Gv.III, während die anderen aufgeführten MHH-

Stämme *B. stabilis* angehören. Für den Stamm LMG 6993, ein Bodenisolat und ebenfalls *B. cepacia* Gv.III zugehörig, konnte ausschließlich Chloramphenicol-Sensitivität nachgewiesen werden.

Folglich wurde *B. cepacia* Gv.III H111 als Kandidat für die Konstruktion einer *cepI* Mutanten gewählt. Ein weiterer bedeutender Aspekt in Hinblick auf den geplanten Einsatz der *cepI* Mutante in Studien betreffend intergenerische Kommunikation war, daß dieser Stamm bei dem Patienten in Co-Kolonisierung mit *P. aeruginosa* vorlag (Geisenberger *et al.*, 2000).

C.4.2 Sequenzanalyse des *cepIR* Locus von *B. cepacia* H111

Voraussetzung für die Konstruktion des *cepI* Integrationsvektors mit geeigneten genspezifischen Sequenzen war die Kenntnis der Nukleotidsequenz des gesamten *cepIR* Operons von *B. cepacia* H111 (Abb. F.1). Im Zuge der genotypischen Charakterisierung war der gesamte *cepIR* Locus von H111 mittels PCR mit den Primern *cepIR-V/cepIR-R* amplifiziert, bereits in pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert (s. C.2.2.1) und die Nukleotidsequenz des *cepI* und des *cepR* Gens bestimmt worden (s. C.2.2.3-C.2.2.5). Zusätzlich lag die Nukleotidsequenz eines in pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) klonierten Teilamplifikats von *cepR* aus H111 vor, das für die Sonde *cepR* mit den Primern *cepR-3V/cepR-3R* generiert worden war (C.2.1.2). Außerdem war noch die Nukleotidsequenz eines in pCR[®]2.1-TOPO klonierten Amplifikats analysiert worden, das aus PCR mit den Primern *cepIR-V/cepI-1V* hervorgegangen war und *cepI* mit zugehöriger *lux* Box aus H111 enthielt.

Um die Nukleotidsequenz des in pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) klonierten *cepIR* Operons von *B. cepacia* H111 zu vervollständigen, mußte folglich noch ein Großteil der intergenerischen Region sequenziert werden. Dafür dienten die Sequenzierprimer *cepIS-1V* und *cepRS-1R* (Tögl, 2000), sowie *cepRS-16660*, der bereits für die Bestimmung der vollständigen *cepR* Nukleotidsequenz von H111 und LMG 16660 eingesetzt worden war. Abb. C.20 zeigt alle für die vollständige Sequenzanalyse des *cepIR* Operons von *B. cepacia* H111 verwendeten Sequenzierprimer.

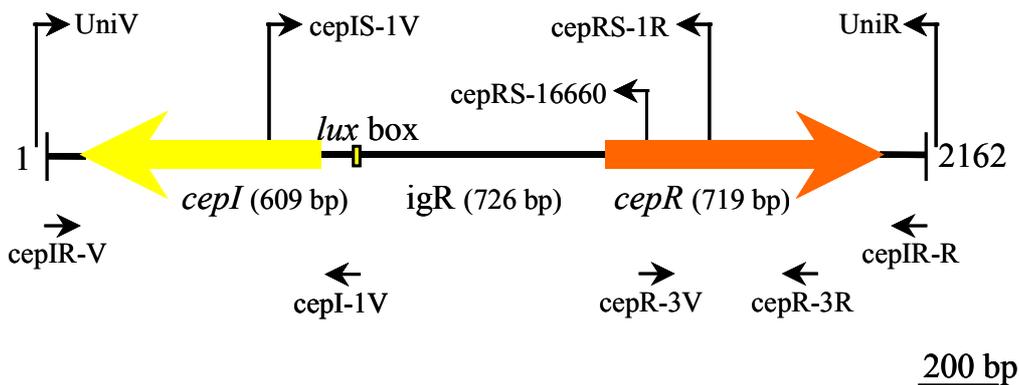


Abb. C.20: Schematische Darstellung des in pCR[®] 2.1-TOPO klonierten *cepIR* Amplikons aus *B. cepacia* H111 („pCR-*cepIR*_{H111}“) mit einer Gesamtlänge von 2162 bp. Unterhalb der abgebildeten genetischen Struktur sind die PCR-Primer angegeben, mit deren Hilfe Amplikons für Klonierungen und anschließende Sequenzierungen erzeugt wurden. Oberhalb davon sind die verwendeten Sequenzierprimer mit ihren Bindestellen aufgeführt.

C.4.3 Konstruktion des *cepI* Integrationsvektors

Aufgrund der bei H111 vorliegenden Antibiotika-Sensitivitäten gegenüber Gentamycin und Kanamycin war es möglich, mit dem Vektor pEX18Gm (Hoang *et al.*, 1998) zu arbeiten, der Resistenz gegenüber Gentamycin vermittelt. Zur Inaktivierung des *cepI* Gens wurde das Kanamycin-Resistenzgen *npt* eingesetzt. Für die Konstruktion des Integrationsvektors wurde die Kanamycin-Kassette mit zwei DNS-Sequenzen des *cep* Locus flankiert. Folglich wurden in den Vektor pEX18Gm in aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten, alle durchgeführt in *E. coli* XL1-Blue, drei Fragmente inseriert. Um eine möglichst günstige Strategie für die einzelnen gerichteten Klonierungen zu wählen, wurde zuvor das Vorhandensein von Restriktionsschnittstellen im *cepIR* Operon von H111 abgeklärt.

Der erste Konstruktionsschritt war die Klonierung eines PCR-Produkts, das die gesamte intergenerische Region zwischen *cepI* und *cepR* und zusätzlich die ersten ca. 100 Basen von *cepR* enthielt (Abb. C.21). Es umfaßte somit 852 Basen und war aus einer „high fidelity“ PCR mit den Primern *igR-R-SacI/igR-V-EcoRI* aus chromosomaler DNS von H111 hervorgegangen. Um eine gerichtete Insertion in den *SacI/EcoRI* geöffneten Vektor pEX18Gm zu gewährleisten, wiesen die Primer am 5'-Ende jeweils die entsprechende Restriktionsschnittstellen-Sequenz auf. Das entstandene Amplikon mußte folglich vor der Ligation ebenfalls einer Restriktion unterworfen werden. Der nach dem ersten Klonierungsschritt resultierende Vektor wurde „pEX-*igR*“ bezeichnet.

Im nachfolgenden Klonierungsschritt wurde ein weiteres PCR-Produkt in den *HindIII/BamHI* geöffneten Vektor pEX-*igR* inseriert. Dieses Amplikon mit einer Größe von 637 Basen war,

ebenfalls aus chromosomaler DNS von H111, mit den Primern *cepI*-R-*HindIII*/*cepI*-V-*BamHI* amplifiziert worden und enthielt das gesamte *cepI* Gen ohne der ersten sieben Basen am 5'-Ende (Abb. C.21). Da das Amplikon für eine gerichtete Klonierung wieder Restriktionsschnittstellen für *HindIII* bzw. *BamHI* an den Enden aufwies, wurde es vor Einsatz in die Ligation mit den entsprechenden Enzymen behandelt. Das resultierende Plasmid trug nun die beiden für die Rekombination in das Chromosom von H111 benötigten homologen Abschnitte und wurde „pEX-igR-*cepI*“ genannt. Durch die Klonierung über *HindIII/BamHI* waren in diesem Konstrukt die Restriktionsschnittstellen *XbaI*, *SalI*, *PstI*, *SphI* und *BspMI* verloren gegangen.

Die letzte Klonierung umfaßte die Insertion eines Kanamycin-Resistenzgens (Oka *et al.*, 1981) in den *BamHI* geöffneten Vektor pEX-igR-*cepI*. Für diesen Zweck war die verwendete Kanamycin-Kassette mit einer Größe von ca. 1,7 kb zuvor über *BamHI* aus dem Plasmid pCaroI (Maier, 1999) ausgeschnitten und zwischen die beiden zum Chromosom homologen Abschnitte kloniert worden. Der fertige Integrationsvektor wurde „pEX-ko-*cepI*_{H111}“ bezeichnet. Das gesamte Konstruktionsschema für pEX-ko-*cepI*_{H111} ist in Abb. C.23 zusammengefaßt.

Die klonierten homologen *cep* Abschnitte wurden so gewählt, daß eine erfolgreiche Mutagenese von *cepI* zu einer den Leserahmen zerstörenden Deletion der ersten sieben Basen am 5'-Ende des *cepI* Gens und einer gleichzeitigen Insertion der Kanamycin-Kassette an dieser Stelle führen sollte.

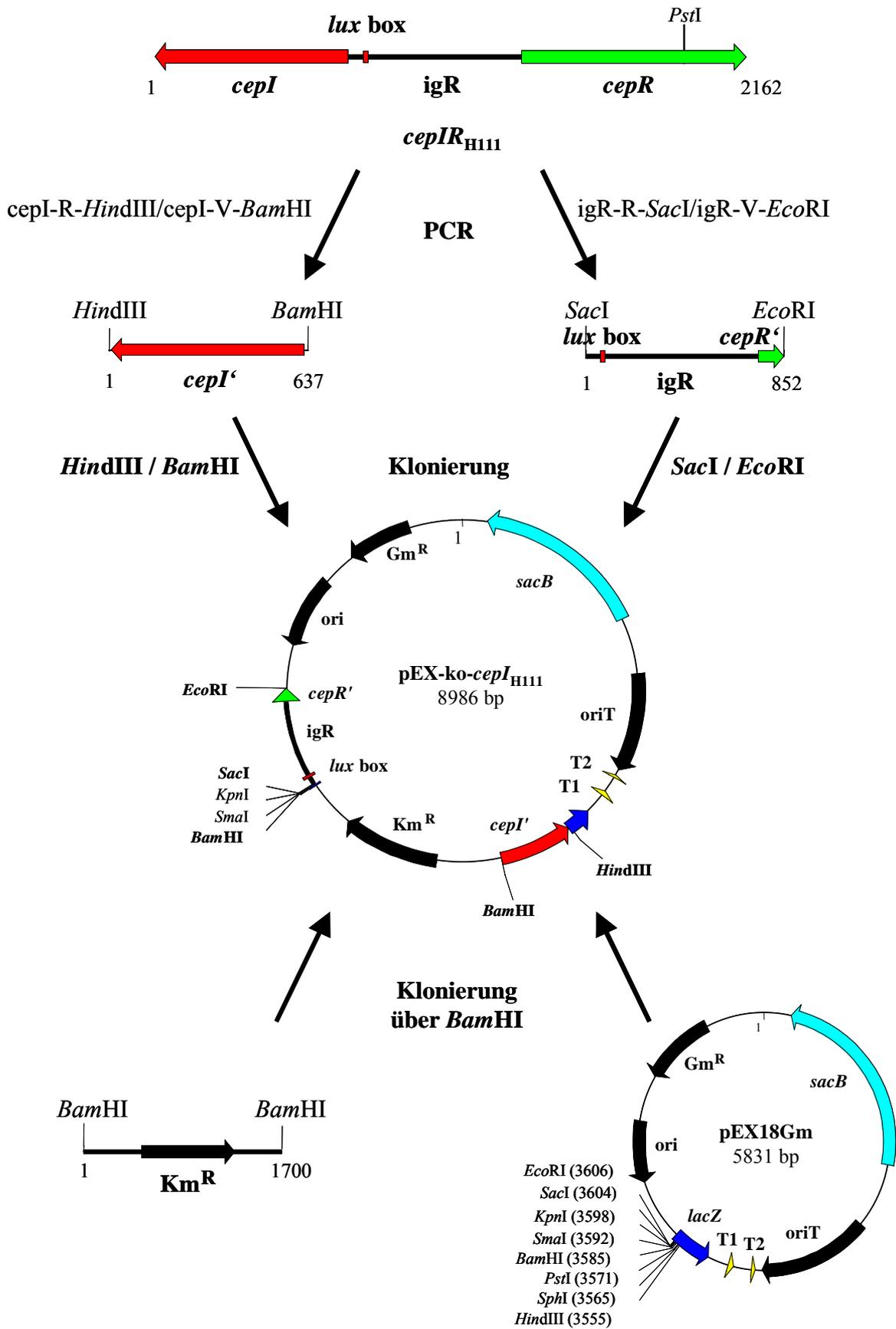


Abb. C:21: Konstruktionsschema des *cepI* Integrationsvektors „pEX-ko-*cepI*_{H111}“ für *B. cepacia* H111.

C.4.4 Mutagenese im *cepI* Gen von *B. cepacia* H111

Durch die Anwesenheit des oriT_{RP4} war es möglich, den Integrationsvektor in einem triparentalen Mating (B.5.7.2) in *B. cepacia* H111 zu transferieren. Eine Replikation des transferierten Vektors in H111 konnte nicht stattfinden, da die Vektoren der pEX-Reihe auf dem pMB1-Replikationsursprung basieren und somit nur in *Enterobacteriaceae* zu replizieren vermögen. Stattdessen kommt es zur Insertion des inaktivierten *cepI* Gens über zweifache homologe Rekombination („double cross-over“) in das Genom von H111.

Wie in Abb. C.22 dargestellt, führte das erste Rekombinationsereignis zur gerichteten Integration des gesamten Suizid-Vektors in den *cepIR* Locus von H111. Entsprechende Transkonjuganten, sogenannte merodiploide Mutanten, besitzen in diesem Stadium sowohl Resistenz gegenüber Gentamycin als auch gegenüber Kanamycin. Nach Aneinanderlagerung der Regionen des zweiten homologen Abschnitts kam es zu einem weiteren Rekombinationsereignis, das die Deletion von nicht-homologen Vektoranteilen aus dem Genom nach sich zog und u.a. das Gentamycin-Resistenzgen deletierte. Transkonjuganten dieses Stadiums, also echte double cross-over Mutanten, weisen folglich nur noch Kanamycin-Resistenz auf und sind sensitiv gegenüber Gentamycin.

Die Selektion der Transkonjuganten in dem triparentalen Konjugationsansatz erfolgte auf PIA Agarplatten, versetzt mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, und 24-36 h Inkubation bei 30 °C. Bei den herangewachsenen Klonen konnte es sich sowohl um merodiploide als auch um echte double cross-over Mutanten handeln (vgl. Abb. C.22). Um die gewünschten *cepI* Mutanten zu identifizieren, wurden die 19 erhaltenen Kolonien auf Sensitivität gegenüber Gentamycin getestet. Zwei der auf mit 25 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin versetzten PIA Agarplatten überimpften Klone, #10 und #19, erwiesen sich als sensitiv gegenüber diesem Antibiotikum. Außerdem ging aus einem Kreuzstrich-Assay gegen den Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) eindeutig hervor, daß ihnen die Fähigkeit zur AHL-Produktion fehlte (vgl. Abb. C.22). Diese in den beiden Klonen vorhandenen Phänotypen deuteten darauf hin, daß zweifache homologe Rekombination eine Inaktivierung des *cepI* Gens hervorgerufen hatte.

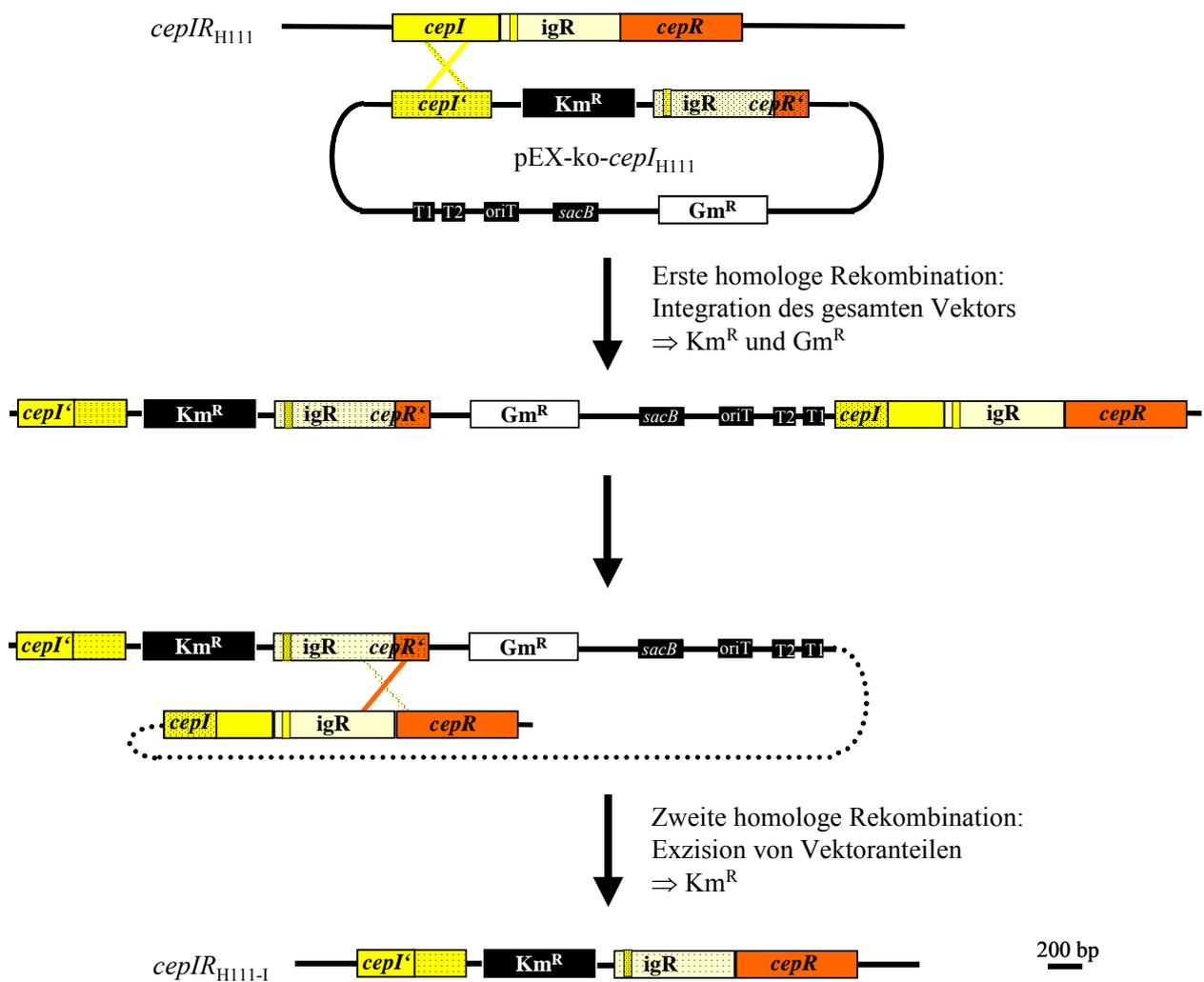


Abb. C.22: Schema des molekularen Mechanismus für die Mutagenese im *cepI* Gen von *B. cepacia* H111 mit Hilfe des *cepI* Integrationsvektors pEX-ko-*cepI*_{H111}.

C.4.5 Genotypischer Nachweis der *cepI* Mutation in *B. cepacia* H111

Es mußte genotypisch bestätigt werden, daß die Phänotypen der beiden Transkonjuganten #10 und #19 tatsächlich auf einer durch den Vektor pEX-ko-*cepI*_{H111} erzeugten *cepI* Mutation beruhten. Aus diesem Grund wurde eine Southern-Blot-Hybridisierung mit *Pst*I-verdauter chromosomaler DNS der Mutanten durchgeführt. Wie aus Abb. C.23 hervorgeht, kann eine Insertion der Kanamycin-Kassette im *cepI* Gen anhand veränderter Hybridisierungsfragmente mit der Sonde *cepR* (s. C.2.1.) nachgewiesen werden.

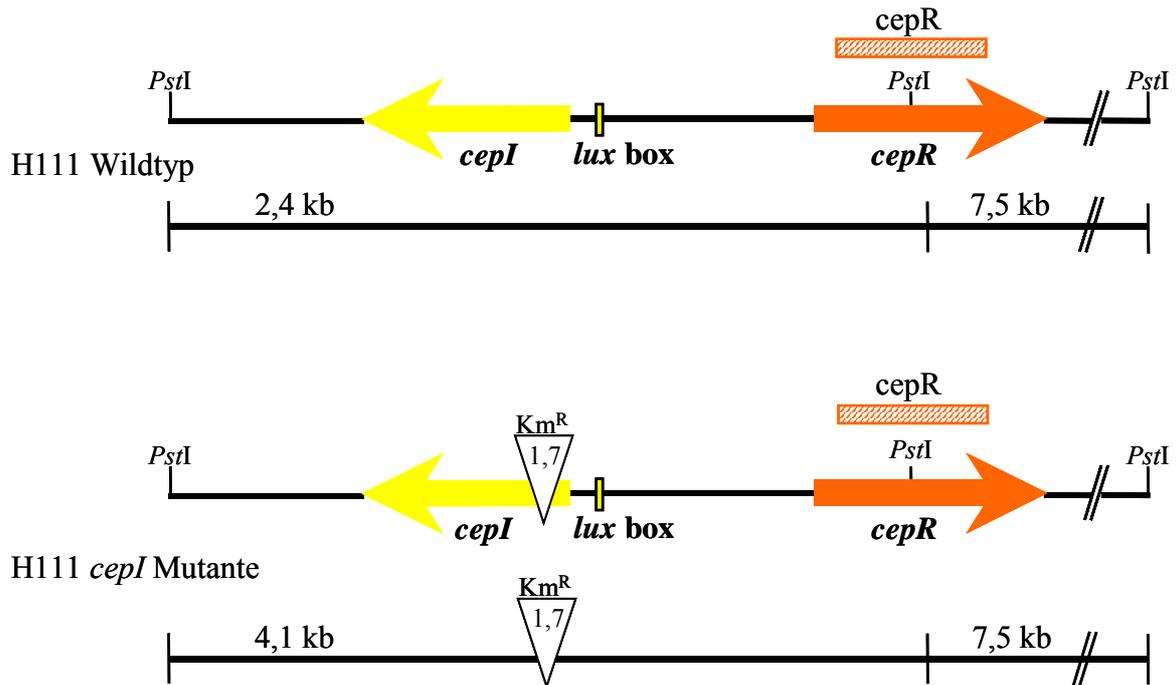


Abb. C.23: Vergleichendes Schema mit den mutmaßlichen Größen der Hybridisierungsfragmente bei *B. cepacia* H111 Wildtyp und *B. cepacia* H111-*cepI* Mutante nach *PstI*-Restriktion chromosomaler DNS und Hybridisierung mit der Sonde *cepR*.

Während bei *B. cepacia* H111 Wildtyp die Hybridisierung der *PstI*-geschnittenen chromosomalen DNS mit der Sonde *cepR* zu Signalen der Fragmentgröße 2,4 kb und 7,5 kb führt, sollten bei der H111 *cepI* Mutante Signale bei 4,1 kb und 7,5 kb entstehen. Die Insertion der 1,7 kb großen Kanamycin-Kassette am 5'-Ende des *cepI* Gens bewirkt eine Vergrößerung des zugehörigen von der Sonde *cepR* detektierten *PstI*-Fragments von 2,4 kb im H111 Wildtyp auf 4,1 kb in der Mutante. Das zweite *PstI*-Fragment, das mit der *cepR*-Sonde hybridisiert, bleibt in seiner ursprünglichen Größe von 7,5 kb erhalten.

Die entsprechende Southern-Blot-Hybridisierung mit den Transkonjuganten #10 und #19 zeigte in beiden Fällen die für eine *cepI* Mutante erwarteten Hybridisierungsfragmente (Abb. C.24), womit die Inaktivierung von *cepI* in *B. cepacia* „H111-I“ bewiesen wurde.

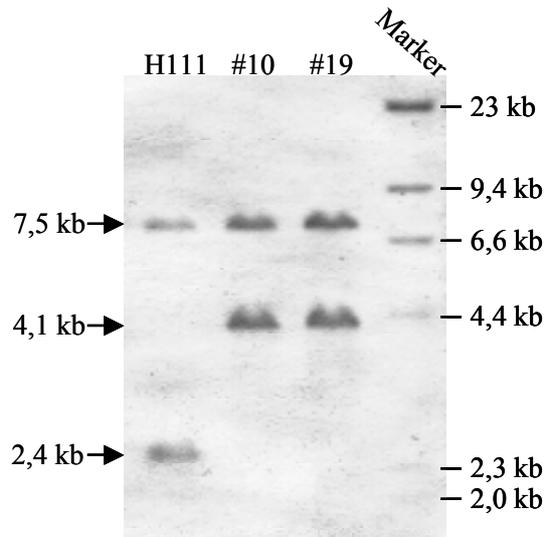


Abb. C.24: Genotypischer Nachweis der *cepI* Mutation in den Transkonjuganten #10 und #19 mittels Southern-Blot-Hybridisierung chromosomaler, *PstI*-verdauter DNS mit der Sonde *cepR*.

C.4.6 Funktionelle Komplementation der *cepI* Mutante *B. cepacia* H111-I

Nach der genotypischen Bestätigung der *cepI* Mutation in *B. cepacia* H111-I wurde versucht, den Gendefekt funktionell zu komplementieren. Für diese *trans*-Komplementation des inaktivierten *cepI* Gens wurde ein Plasmid benötigt, welches das intakte *cepI* Gen aus H111 trägt und in H111-I transferiert werden kann. Als Klonierungsvektor mit Gentamycin-Resistenz wurde pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) gewählt, da es sich dabei um ein mobilisierbares Plasmid mit breitem Wirtsbereich handelt, das auch in *B. cepacia* repliziert.

Mit Hilfe der Primer *cepIR*-V/*cepI*-1V wurde, ausgehend von pCR-*cepIR*_{H111} (s. C.2.2.1), das *cepI* Gen mit zugehöriger *lux* Box mittels PCR amplifiziert und zunächst in pCR[®]2.1-TOPO kloniert. Aus diesem konnte das vollständige Amplifikat dann über *EcoRI* in pBBR1MCS-5 umkloniert werden. Das so generierte Plasmid wurde als „pBBR-*cepI*_{H111}“ bezeichnet und lag in *E. coli* XL1-Blue vor. In völlig analoger Vorgehensweise wurde auch das *cepI* Gen mit zugehöriger *lux* Box von LMG 16660 amplifiziert und kloniert. Das resultierende Plasmid wurde „pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀“ genannt und sollte nach Transfer in *B. cepacia* H111-I die Funktionalität der exprimierten CepI AHL-Synthase von *B. multivorans* in *B. cepacia* beweisen. Abb. C.26 stellt das Konstruktionsschema für die beiden pBBR-*cepI* Plasmide dar. Da jeweils eine ungerichtete Klonierung in pBBR1MCS-5 vorgenommen worden war, mußte in den Klonen die Orientierung des *cepI*-Amplifikats zum *lac*-Promotor überprüft werden. Dies war im Falle von pBBR-*cepI*_{H111} durch Restriktion mit *SmaI* und im Falle von pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀ durch Restriktion mit *SacI* möglich.

Der Transfer des Vektors in *B. cepacia* H111-I erfolgte jeweils in einem triparentalen Mating (s. B.5.7.2). Die resultierenden Transkonjuganten wurden auf PIA-Festmedium, versetzt mit 25 µg/ml Gentamycin, selektioniert. Mittels Kreuzstrich-Assay gegen den Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) konnte nachgewiesen werden, daß der rekombinante Stamm *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) zu AHL-Produktion fähig ist. Durch Transfer des intakten AHL-Synthase Gens von H111 konnte der Gendefekt in H111-I also in *trans* komplementiert werden.. Abb. C.25 zeigt das Ergebnis des Assays und verdeutlicht, daß die komplementierte Mutante *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) im Vergleich zum Wildtyp *B. cepacia* H111 verstärkt AHLs produziert. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in der komplementierten Mutante das für die AHL-Synthase kodierende Gen in *trans* auf einem Plasmid mit hoher Kopienzahl vorliegt.

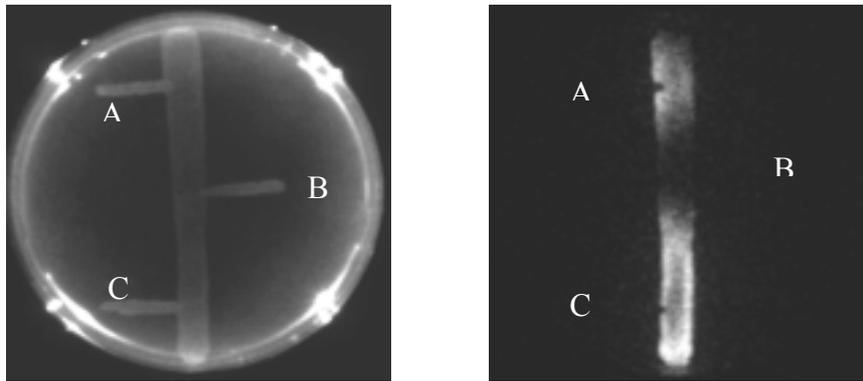


Abb. C.25: Phänotypischer Nachweis der *cepI* Mutation in H111-I mittels Kreuzstrich-Assay gegen den biolumineszenten Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) mit (A) *B. cepacia* H111, (B) *B. cepacia* H111-I und (C) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}). Die Aktivierung des Sensorstammes durch *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) beweist AHL-Produktion aufgrund einer *trans*-Komplementation des *cepI* Gendefekts in H111-I nach Transfer des Plasmids pBBR-*cepI*_{H111}. Die Dokumentation (links Tageslichtaufnahme, rechts Biolumineszenzaufnahme) erfolgte mit dem CCD-Kamerasystem C2400-40 und dem ARGUS20/HPD-CP-Softwarepaket (Hamamatsu Photonics, Herrsching).

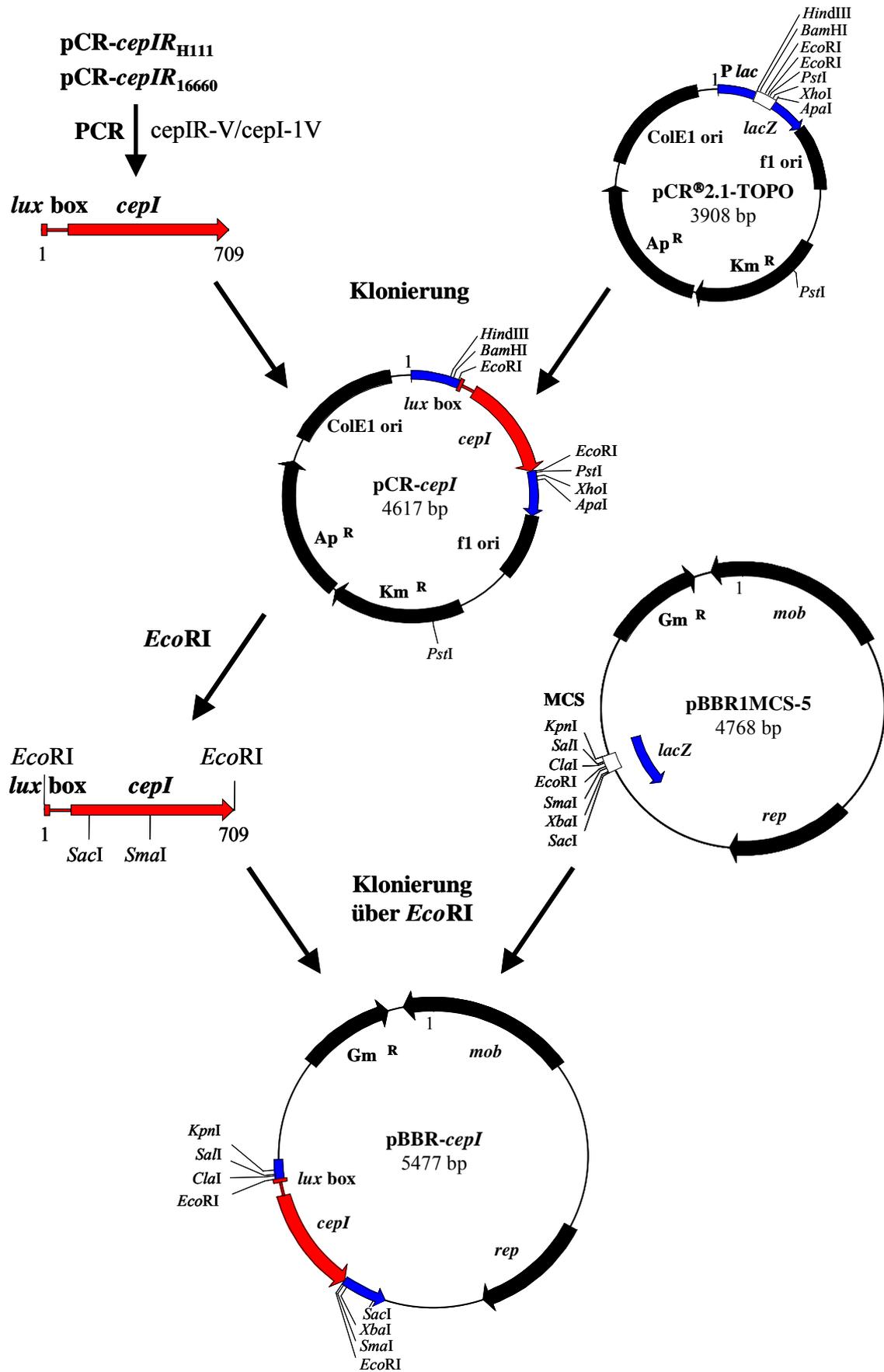


Abb. C.26: Konstruktionsschema des Vektors pBBR-*cepI* für die *trans*-Komplementation von H111-I. Die angegebene *SacI*-Schnittstelle bezieht sich auf *cepI*₁₆₆₆₀, die *SmaI*-Schnittstelle auf *cepI*_{H111}.

Als Kontrolle dafür, daß die funktionelle Komplementation des *cepI* Gendefekts nicht auf Plasmid-vermittelter Genexpression beruht, sondern tatsächlich von dem „Quorum-Sensing“-System des Wirts reguliert wird, wurde das Plasmid pBBR-*cepI*_{H111} auch in eine definierte *cepR* Mutante von H111 (Huber, 2000) transferiert. Die fehlende AHL-Produktion in diesem Stamm konnte durch pBBR-*cepI*_{H111} nicht komplementiert werden (ohne Abb.). Dies war der Beweis, daß das Plasmidkonstrukt *per se* nicht zur *cepI* Expression bzw. AHL-Synthese befähigt ist, und die Anwesenheit von intakten CepR Rezeptorproteinen die Voraussetzung für eine Induktion der Expression von *cepI* ist.

Der durch konjugativen Transfer erzeugte rekombinante Stamm *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀) war ebenfalls in der Lage, den Sensor *E. coli* MT102 (pSB403) zu aktivieren (ohne Abb.). Die durch das Plasmid pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀ hervorgerufene funktionelle Komplementation von H111-I beweist die prinzipielle Funktionalität der CepI AHL-Synthase von *B. multivorans* LMG 16660.

C.5 Charakterisierung der *cepI* Mutante *B. cepacia* H111-I

Wie im vorausgehenden Kapitel beschrieben, war es gelungen, eine definierte Mutation im *cepI* Gen von *B. cepacia* H111 zu erzeugen. Um sicherzustellen, daß es sich um eine vollständige Inaktivierung der AHL-Synthase handelt, sollte zunächst eine quantitative Bestimmung der AHL-Produktion erfolgen. Ein phänotypischer Vergleich zwischen der erzeugten AHL-defizienten Mutante H111-I und dem Wildtyp sollte dann Aufschluß über AHL-regulierte Prozesse geben. In Anlehnung an bereits bekannte AHL-abhängige Phänotypen (de Kievit und Iglewski, 2000; Davies *et al.*, 1998), wurden die beiden Stämme hinsichtlich der Synthese extrazellulärer Produkte sowie der Fähigkeit zu Biofilmbildung verglichen. Um abzusichern, daß veränderte Phänotypen in der Mutante tatsächlich auf die Abwesenheit von AHL-Molekülen zurückzuführen sind, wurden in den Untersuchungen die zwei komplementierten *cepI* Mutanten H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) und H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀) als Kontrollen mitgeführt.

C.5.1 AHL-Synthese in *B. cepacia* H111-I

Wie bereits aus dem Kreuzstrich-Assay (Abb. C.25) gegen *E. coli* MT102 (pSB403) hervorging, hat die *cepI* Mutante *B. cepacia* H111-I offensichtlich die Fähigkeit zur AHL-Produktion verloren. Eine DC-Analyse des AHL-Extrakts von H111-I, gewonnen aus dem zellfreien Kulturüberstand des Stamms, konnte dieses Ergebnis bestätigen (Daten nicht

gezeigt). Der Defekt war jedoch durch Bereitstellung des intakten *cepI* Gens aus *B. cepacia* H111 oder *B. multivorans* LMG 16660 in *trans* funktionell komplementierbar (s. C.4.).

Ein Mikrotiterplatten-Assay mit den Kulturüberständen von H111, H111-I und den zwei komplementierten Mutanten unter Verwendung von *E. coli* MT102 (pSB403) zeigt ebenfalls eindeutig, daß für die Mutante H111-I keine AHLs detektiert werden können, während die Überstände der komplementierten Mutanten AHLs enthalten (Abb. C.27). Außerdem wird erneut deutlich, daß die *trans*-Komplementation im Vergleich zum Wildtyp zu einer verstärkten AHL-Produktion führt.

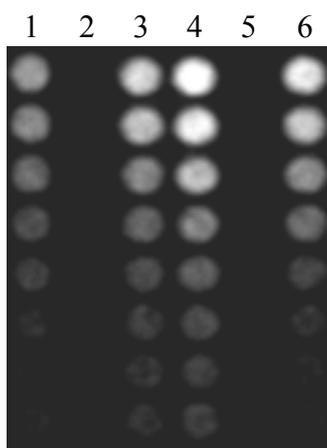


Abb. 27: Mikrotiterplatten-Assay unter Verwendung des biolumineszenten Sensors *E. coli* MT102 (pSB403) mit Kulturüberständen von (1) *B. cepacia* H111, (2) *B. cepacia* H111-I, (3) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) und (4) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀). Spur (5) enthält als Negativkontrolle nur den Sensorstamm und Spur (6) als Positivkontrolle den Sensorstamm mit 500 nM C8-HSL. In die Kavitäten wurden jeweils 100 µl Sensorstamm vorgelegt, dann in die erste Reihe der Spuren 1-4 jeweils 100 µl sterilfiltrierter Kulturüberstand zupipettiert. Es erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe in 8 Kavitäten mit jeweils einem Verdünnungsfaktor von 1:1. Die Dokumentation erfolgte mit dem CCD-Kamerasystem C2400-40 und dem ARGUS20/HPD-CP-Softwarepaket (Hamamatsu Photonics, Herrsching).

Um eine vergleichende Quantifizierung bezüglich der AHL-Produktion in den Stämmen H111, H111-I und den zwei komplementierten Mutanten zu ermöglichen, wurde ein Mikrotiterplatten-Assay unter Verwendung des auf GFP-basierenden AHL-Sensorstammes *B. cepacia* H111-I (pAS-C8) (Steidle, 2000) durchgeführt. Dieser Sensor weist eine hohe Spezifität und Sensitivität für C8-HSL auf (Steidle, persönliche Mitteilung). Die Kulturüberstände der zu testenden Stämme wurden für den Assay bei einer OD₆₀₀ = 1,0 gewonnen und sterilfiltriert. Aus einer exponentiell gewachsenen Kultur des Sensorstammes wurden jeweils 100 µl pro Kavität vorgelegt und in die erste Reihe 100 µl des jeweiligen Kulturüberstands zupipettiert. Nach ca. 6 h Inkubation bei 30 °C konnte die grüne Fluoreszenz der einzelnen Kavitäten mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts bestimmt werden. Abb. C.28

stellt die quantitative Auswertung der relativen Fluoreszenz, hervorgerufen durch die Anwesenheit von AHLs in den Kulturüberständen, dar.

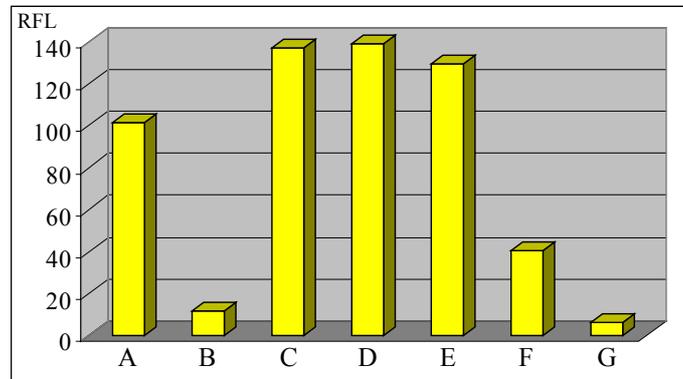


Abb. C.28: Quantitative Auswertung der emittierten relativen Fluoreszenz (RFL) des AHL-Sensorstammes *B. cepacia* H111-I (pAS-C8) in einem Mikrotiterplatten-Assay mit Kulturüberständen von (A) *B. cepacia* H111, (B) *B. cepacia* H111-I, (C) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) und (D) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀). Die Messung der grünen Fluoreszenz, abgegeben von den Sensorzellen bei 515 nm, erfolgte mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät Lambda fluoro 320 Plus (MWG Biotech, Ebersberg). Die Balken E und F stellen Positivkontrollen mit (E) 500 nM C8-HSL und (F) 500 nM C6-HSL dar, Balken G repräsentiert die Negativkontrolle (nur Sensorzellen). Die Daten spiegeln Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays wider.

Die Quantifizierung der AHL-Synthese mit dem GFP-Sensor bestätigt, was die Biolumineszenz-Assays (Abb. C.25 und C.27) bereits optisch angedeutet hatten. In der Mutante H111-I findet keine AHL-Synthese statt (die gemessene Fluoreszenz stellt Background dar), während die *trans*-Komplementation der Mutante mit *cepI*_{H111} bzw. *cepI*₁₆₆₆₀ die AHL-Produktion im Vergleich zum Wildtyp um jeweils ca. 35 % verstärkt.

C.5.1 Synthese von extrazellulären Produkten in *B. cepacia* H111-I

Wie bereits von Lewenza *et al.* (1999) beschrieben, ist es wahrscheinlich, daß die Expression bestimmter extrazellulärer Produkte in *B. cepacia* AHL-reguliert ist und somit unter Kontrolle des *cep*-Systems steht. Mit Hilfe der AHL-defizienten *cepI* Mutante H111-I sollte ein direkter Zusammenhang zwischen der Synthese von AHLs und extrazellulären Produkten nachgewiesen werden. Deshalb wurden H111 Wildtyp, H111-I und die zwei komplementierten Mutanten vergleichend auf die Produktion extrazellulärer Protease, Lipase, Chitinase, sowie Siderophore getestet. Dies erfolgte wie unter B.2.2 beschrieben auf den entsprechenden Indikatorplatten.

In Einklang mit den Ergebnissen von Lewenza *et al.* (1999) weist die *cepI* Mutante *B. cepacia* H111-I auf Magermilch-Medium eine deutlich verringerte proteolytische Aktivität gegenüber H111 auf (Abb. C.29 A), die durch externe Zugabe von 500 nM synthetischem C8-HSL (Abb.

C.29 B) bzw. H111 Wildtyp AHL-Extrakt zum Medium deutlich komplementiert werden kann (ohne Abb.). Eine quantitative Bestimmung der Exoprotease-Aktivität in Kulturüberständen der Stämme bewies, daß in der Mutante durch externe Zugabe entsprechender AHLs eine Komplementation auf den Wildtyp-Level erreicht werden kann (Riedel, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu tritt in den komplementierten Mutanten *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI* H111) und *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI* 16660) keine Komplementation der Protease-Aktivität auf (Abb. C.29 A), obwohl die AHL-Produktion in diesen Stämmen nachweislich wiederhergestellt ist (s. C.5.2).

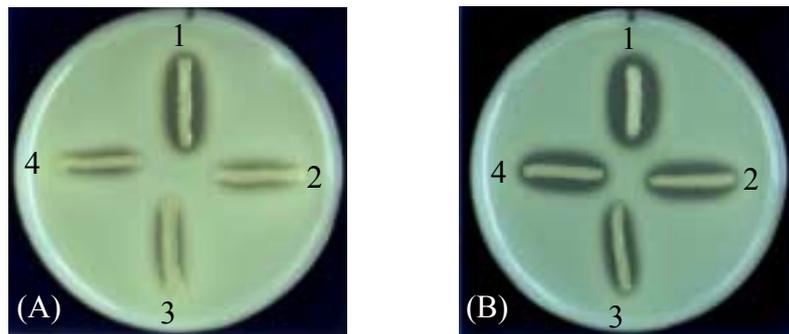


Abb. C.29: Vergleichende Darstellung der proteolytischen Aktivität für die Stämme (1) *B. cepacia* H111, (2) *B. cepacia* H111-I, (3) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) und (4) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀) auf Magermilch-Medium (A) ohne bzw. (B) nach externer Zugabe von 500 nM synthetischem C8-HSL. Die Platten wurden 48 h bei 30 °C inkubiert.

In Bezug auf die Produktion von Siderophoren konnte bei der Mutante auf CAS-Medium eine deutliche Reduktion im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Der Effekt war ebenfalls durch die externe Zugabe entsprechender AHLs komplementierbar (Huber *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis weicht von den Beobachtungen von Lewenza *et al.* (1999) ab, die eine Hochregulation der Siderophor-Synthese für die *B. cepacia* K56-2 *cepI* Mutante beschreiben. Hinsichtlich der Chitinase-Produktion zeigte sich bei H111-I eine leicht reduzierte Aktivität auf der Indikatorplatte (Abb. C.30 A), die sowohl durch *cepI* in den *trans*-komplementierten Mutanten, als auch durch Zugabe synthetischer AHLs auf Wildtyp-Aktivität gesteigert werden konnte. Betreffend die Lipase-Produktion konnte auf Tributyrin-Medium kein Unterschied für die getesteten Stämmen H111, H111-I und die komplementierten Mutanten detektiert werden (Abb. C.30 B).

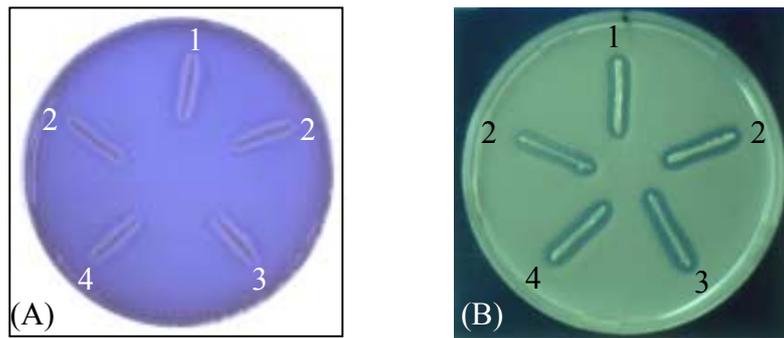


Abb. C.30: Vergleichende Darstellung der (A) chitinolytischen bzw. (B) lipolytischen Aktivität für die Stämme (1) *B. cepacia* H111, (2) *B. cepacia* H111-I, (3) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) und (4) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀) auf Chitin enthaltendem Medium bzw. Tributyrin-Medium. Die Platten wurden 24 h bei 30 °C inkubiert.

C.5.2 Biofilmbildung durch *B. cepacia* H111-I

Es wird angenommen, daß AHL-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation in *P. aeruginosa* Einfluß auf die Entwicklung und Struktur von Biofilmen hat (Davies *et al.*, 1998). In Anlehnung an diese Vermutung wurden H111, H111-I und die zwei komplementierten Mutanten auf ihr Vermögen, einen Biofilm auszubilden, untersucht. Für den Assay wurden die Stämme in Polystyrol-Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen) in ABC-Medium angeimpft und 48 h inkubiert. Nach Abpipettieren des Mediums konnte der vorhandene Biofilm durch Anfärben der in den Kavitäten adhäsierten Zellen mit Kristallviolett nachgewiesen werden. Da die auftretende Farbintensität der Stärke an gebildetem Biofilm entspricht, ging bereits optisch aus dem Assay hervor, daß der H111 Wildtyp sowie die komplementierten *cepI* Mutanten zur Formation von Biofilm fähig sind. Im Gegensatz dazu ist die Biofilmbildung bei der *cepI* Mutante eindeutig reduziert (Abb. C.31 A).

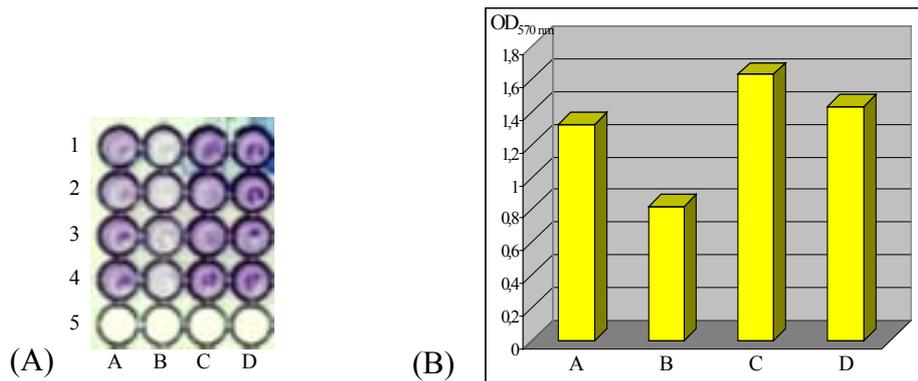


Abb. C.31: (A) Darstellung des Biofilm-Assays mit den Stämmen (Reihe A) *B. cepacia* H111, (Reihe B) *B. cepacia* H111-I, (Reihe C) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) und (Reihe D) *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀) in einer Polystyrol-Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen) nach Anfärben des an den Wänden der Kavitäten ausgebildeten Biofilms mit Kristallviolett (Reihen 1-4; Reihe 5 Nullprobe). (B) Darstellung der quantitativen Auswertung der Biofilmbildung nach Lösung des eingelagerten Farbstoffs und photometrischer Vermessung der Absorption bei einer OD_{570 nm}. Die Ergebnisse spiegeln den jeweiligen Mittelwert einer Vierfachbestimmung wider.

Eine quantitative Auswertung der Biofilmbildung war möglich, indem das in den Zellaggregaten angereicherte Kristallviolett mit einem 80:20 (v/v) Ethanol/Aceton Gemisch in Lösung gebracht und die Absorption bei einer OD_{570 nm} photometrisch vermessen wurde. Der Wert der optischen Dichte korreliert mit der Menge des gelösten Farbstoffs und folglich mit der Menge an Biofilm. Abb. C.31 (B) zeigt die Ergebnisse der quantitativen Auswertung. Es wird deutlich, daß die Fähigkeit zur Biofilmbildung in der *cepI* Mutante um ca. 40 % gegenüber dem Wildtyp vermindert ist. In den komplementierten Mutanten tritt, wie schon bei der AHL-Synthese beobachtet, eine funktionelle Komplementation über den Wildtyp-Level hinaus auf, wobei die Verstärkung mit ca. 123 % für *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) höher liegt als für *B. cepacia* H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀) mit ca. 108 %.

D. DISKUSSION

D.1 AHL-Produktion innerhalb des *B. cepacia* Komplexes

Erst kürzlich wurde ein „Quorum Sensing“-System, *cepIR*, in *B. cepacia* Gv.III K56-2 (LMG 18863) identifiziert, welches regulatorischen Einfluß auf die Synthese von Exoprodukten besitzt (Lewenza *et al.*, 1999). Zunächst wurde für diesen Stamm nur die Produktion von C8-HSL (OHL) beschrieben, aber in einer weiterführenden Arbeit gelang auch der Nachweis von C6-HSL (HHL) in den Kulturüberständen dieses und eines weiteren Genomovar III Stammes (Lewenza und Sokol, 2001). Auch innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die Synthese von C8-HSL und C6-HSL für die meisten Vertreter verschiedener *B. cepacia* Genomovare nachgewiesen (Geisenberger, 2000). Im Gegensatz dazu hatten erste Untersuchungen von McKenney *et al.* (1995) zu nicht näher charakterisierten *B. cepacia* Stämmen auf das Vorhandensein von C4-HSL (BHL), C6-HSL (HHL) und 3-Oxo-C6-HSL (OHHL) hingedeutet. Die abweichenden Ergebnisse sind höchstwahrscheinlich auf eine Fehlinterpretation der Aktivierung der in dieser Studie eingesetzten Biosensoren zurückzuführen.

Um ausführliche und umfassende Informationen über die Verbreitung der AHL-Produktion innerhalb des *B. cepacia* Komplexes zu erlangen, wurden 70 Vertreter des *B. cepacia* Komplexes unterschiedlicher Herkunft hinsichtlich ihrer AHL-Synthese unter möglichst standardisierten Bedingungen charakterisiert. Aufgrund der hohen Sensitivität und dem genau beschriebenen Spezifitätsspektrum (Geisenberger, 2000) wurden routinemäßig die biolumineszenten Sensorplasmide pSB403 und pSB1075 (Winson *et al.*, 1998) zur AHL-Detektion in Kreuzstrich-Assays bzw. DC-Analyse eingesetzt. In Anlehnung an die Untersuchungen von Tögl (2000) und Geisenberger (2000) konnte mit dem in dieser Arbeit durchgeführten „Screening“ eindeutig gezeigt werden, daß die meisten Vertreter des *B. cepacia* Komplexes charakteristischerweise wenigstens C8-HSL und C6-HSL in einem molaren Verhältnis von in der Regel 10:1 synthetisieren. Allerdings traten stammspezifische Variationen vor allem hinsichtlich der gebildeten Menge an C8-HSL auf, die zwischen 10 nM und 1 µM variierte.

Ca. 31 % der Stämme wiesen keine bzw. eine nicht nachweisbare AHL-Synthese auf (Detektionsgrenze für C8-HSL ca. 1 nM), darunter alle *B. multivorans* Stämme (entsprechend einem Prozentsatz von ca. 23 % der getesteten Stämme). Die Southern-Blot Analyse machte deutlich, daß sämtliche untersuchten Stämme, einschließlich aller offensichtlich AHL-negativen Vertreter, *cepI*- und *cepR*-homologe Gene besitzen und folglich die fehlende AHL-Produktion nicht auf das Fehlen der *cepIR* Gene zurückzuführen ist. Aus der anschließenden heterologen Expression verschiedener *cepI* Gene in *E. coli* sowie der funktionellen Komple-

mentation einer definierten *cepI* Mutante des Stammes *B. cepacia* Gv.III H111 ging eindeutig hervor, daß *cepI* für eine AHL-Synthase kodiert, die für die Synthese von C8-HSL und C6-HSL verantwortlich ist. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen von Lewenza und Sokol (2001) überein, die zeigten, daß CepI die Synthese von C8-HSL und C6-HSL in zwei Genomovar III Stämmen katalysiert.

D.1.1 AHL-Produktion bei *B. multivorans*

Die Beobachtung der fehlenden AHL-Synthese in allen *B. multivorans* Stämmen deckt sich mit Ergebnissen einer anderen Arbeit (Geisenberger, 2000), die belegen, daß unabhängig von Mediumzusammensetzung und Wachstumsphase für dieses Genomovar keine AHL-Produktion nachgewiesen werden kann.

Bei der vergleichenden Sequenzanalyse der *cepI* und *cepR* Gene ausgewählter Vertreter des *B. cepacia* Komplexes zeigte sich eine auffällige Besonderheit in der abgeleiteten CepI Aminosäuresequenz aller *B. multivorans* Vertreter. Es handelt sich um den Austausch einer Glutaminsäure gegen eine Asparaginsäure an Position 43 von CepI, wobei diese wahrscheinlich eine der zehn Positionen im aktiven Zentrum der AHL-Synthase darstellt, die in Vertretern der LuxI-Proteinfamilie als absolut konserviert gelten (Parsek *et al.*, 1997). Trotzdem scheint dieser für *B. multivorans* charakteristische Austausch nicht die Aktivität der AHL-Synthase zu beeinflussen, denn die heterologe Expression von CepI in *E. coli* führte zur Produktion von mit anderen Genomovaren vergleichbaren Menge an C8-HSL und C6-HSL. Dies läßt vermuten, daß *cepI* von *B. multivorans* zwar für ein funktionelles Protein kodiert, das Gen jedoch im Wildtypstamm nicht oder nur geringfügig exprimiert wird. Tatsächlich konnte in einem nachfolgenden Experiment die fehlende AHL-Produktion der definierten *cepI* Mutante H111-I mit *cepI* von *B. multivorans* komplementiert werden. Im Gegensatz dazu konnte die definierte AHL-defiziente *cepR* Mutante H111-R (Huber, 2000) nicht mit *cepI* von *B. multivorans* komplementiert werden, was beweist, daß das *cepI*-Plasmidkonstrukt *per se* nicht zur *cepI* Expression und AHL-Synthese befähigt ist, sondern regulatorische Interaktionen mit CepR eine Voraussetzung für die Expression von *cepI* sind. Da außerdem die *cepR* Sequenzen der beiden involvierten Stämme fast identisch sind und die stromaufwärts von *cepI* befindliche Promotor-Region stark konserviert ist, liegt die Schlußfolgerung nahe, daß in *B. multivorans* spezifische negativ-regulatorische Faktoren vorliegen, die die Expression von *cepI* verhindern. Die Sequenzanalyse des *cepI* homologen Gens aus *B. pseudomallei* E8 lieferte eine weitere Bestätigung für die dargelegte Hypothese. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Genprodukts stimmt zu 100 % mit der CepI Konsensus-

Sequenz von *B. multivorans* überein und weist somit auch den charakteristischen Aminosäure-Austausch auf. Im Gegensatz zu *B. multivorans* jedoch findet in *B. pseudomallei* E8 nachweislich *cepI* Expression statt, da der Stamm C6-HSL und C8-HSL produziert (Geisenberger, persönliche Mitteilung).

Für einige AHL-produzierende Organismen, darunter *Agrobacterium tumefaciens* und *Ralstonia solanacearum*, wurde bereits gezeigt, daß eine Aktivierung der AHL-Synthese zusätzliche externe Signale benötigt (Fuqua und Winans, 1994; Flavier *et al.*, 1997a und b). Bei diesen regulatorischen Faktoren handelt es sich um ein pflanzliches Opin bzw. ein Fettsäurederivat, welches jeweils die Stimulierung des übergeordneten LysR-Typ Transkriptionsregulators bewirkt und auf diesem Weg die AHL-vermittelte Genregulation beeinflusst. Derartige zusätzliche Regulationsmechanismen dienen dazu, „Quorum Sensing“-Kaskaden nur unter ganz bestimmten Umweltbedingungen auszulösen. Es ist folglich denkbar, daß die angewendeten Kultivierungsbedingungen für eine AHL-Synthese in *B. multivorans* nicht geeignet waren, da die *cepI* Expression nur bei Anwesenheit spezifischer Stimuli aus der Umwelt induziert wird.

Die dargelegte Hypothese der mutmaßlichen Repression der *cepI* Expression durch zusätzliche regulatorische Faktoren steht im Kontrast zu der Mutmaßung einer früheren Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe (Tögl, 2000), wonach die fehlende AHL-Produktion in *B. multivorans* auf einen funktionellen Defekt in CepI zurückzuführen ist. Diese Schlußfolgerung basiert auf der abgeleiteten CepI Aminosäuresequenz des Typstamms LMG 13010^T, die an Position 100 ein UGA (opal) Stopcodon und weitere Punktmutationen aufweist. Allerdings konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß LMG 13010^T scheinbar einen Ausnahmefall darstellt, da CepI_{13010T} stark von der CepI Konsensus-Sequenz der anderen analysierten *B. multivorans* Stämme abweicht, die alle an besagter Stelle ein UGG Codon für Tryptophan tragen. Es ist folglich naheliegend, daß CepI_{13010T} aufgrund einer „nonsense“-Mutation des Gens inaktiviert wurde und daß die auffällige Anhäufung von Mutationen als Folgeerscheinung der primären Mutation anzusehen ist. Tatsächlich konnte anhand des über PCR artifiziell verkürzten und anschließend exprimierten CepI_{H111} die Inaktivität einer entsprechend deletierten AHL-Synthase bewiesen werden, das mutmaßlich verkürzte CepI_{13010T} dagegen war wider Erwarten funktionstüchtig. Da der verwendete heterologe *E. coli* Wirt keinen opal-Suppressor-Stamm darstellt, handelt es sich bei dem beobachteten Phänomen offensichtlich um ein translationelles „read-through“, das von MacBeath und Kast (1998) als Artefakt in bestimmten Expressionsvektoren beschrieben wurde. Die Autoren konnten zeigen, daß es sich bei dem UGA Codon um ein ineffizientes

Stopsignal handelt, da an dieser Stelle häufig der Einbau von Tryptophan erfolgt, ohne den Leserahmen des exprimierten Proteins zu zerstören.

D.1.2 AHL-Produktion bei *B. vietnamiensis*

Ein Großteil der Vertreter von *B. vietnamiensis* fiel dadurch auf, daß in den Kreuzstrich-Assays bzw. der DC-Analyse zusätzlich zu C8-HSL und C6-HSL die Synthese wenigstens eines langkettigen AHL-Moleküls detektiert werden konnte. Eine chemische Analyse des AHL-Extrakts von Stamm *B. vietnamiensis* R-921 bestätigte die Synthese von C10-HSL als zusätzliches Hauptprodukt neben C8-HSL und C6-HSL, und offenbarte außerdem die Anwesenheit weiterer AHLs mit Acyl-Seitenkettenlängen von C10 bis C14 (3-Oxo-C10-HSL/ODHL, C12-HSL/dDHL und C14-HSL/tDHL; Hardman, persönliche Mitteilung). Die kombinierten Resultate der Southern-Blot Analyse und der heterologen Expression des *cepI* von *B. vietnamiensis* R-921 in *E. coli* deuten darauf hin, daß in diesem Organismus ein zweites AHL-Synthasegen mit geringer Homologie zu *cepI* vorliegt. Da für *CepI* von *B. vietnamiensis* R-921 nur die Synthese der kurzkettigen AHL-Moleküle C8-HSL und C6-HSL nachgewiesen werden konnte, muß ein zusätzliches Gen vorhanden sein, das die Synthese der langkettigen AHLs ermöglicht. Die Existenz zweier verschiedener AHL-Synthasen in einem Organismus, der sowohl kurz- als auch langkettige AHL-Moleküle produziert, wurde bereits für einige gram-negative Bakterien wie *P. aeruginosa*, *Erwinia chrysanthemi* oder *Vibrio anguillarum* gezeigt bzw. vermutet (Latifi *et al.*, 1996; Nasser *et al.*, 1998; Milton *et al.*, 1997). Außerdem wurde bereits eine zweite und dritte Familie von AHL-Synthasen beschrieben, die keine Homologie zur LuxI Proteinfamilie aufweisen, und zu denen *AinS* von *V. fischeri* und *LuxM* von *V. harveyi* bzw. *HdtS* von *P. fluorescens* gezählt werden (Gilson *et al.*, 1995; Laue *et al.*, 2000).

D.2 Korrelation zwischen AHL-Produktion und Exoprodukt-Synthese innerhalb des *B. cepacia* Komplexes

Es ist bekannt, daß in zahlreichen gram-negativen Bakterien die Produktion von Virulenzfaktoren über einen „Quorum Sensing“-Mechanismus reguliert wird (Salmond *et al.*, 1995; Fuqua *et al.*, 1996). Auch *B. cepacia* ist in der Lage, mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren wie Siderophore und verschiedene Exoenzyme in Abhängigkeit von der Zelldichte zu synthetisieren (Lonon *et al.*, 1988; McKeivitt *et al.*, 1989; Gessner und Mortensen, 1990; Yohalem und Lorbeer, 1994; Darling *et al.*, 1998). Kürzlich konnten Lewenza *et al.* (1999 und 2001)

zeigen, daß das *cep*-System von *B. cepacia* Gv.III K56-2 (LMG 18863) eine regulatorische Rolle bezüglich der Produktion von extrazellulären Pathogenitätsdeterminanten besitzt, indem es die Expression einer extrazellulären Protease stimuliert, die Expression von Ornibactin hingegen reprimiert. Ein Einfluß auf die Expression der Siderophore Pyochelin und Salicylsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

D.2.1 Phänotypische Charakterisierung von Vertretern des *B. cepacia* Komplexes

Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch die phänotypische Charakterisierung der 70 Vertreter des *B. cepacia* Komplexes im Hinblick auf die Synthese ausgewählter Exoprodukte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Produktion von AHLs und von mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren aufgezeigt werden. Das durchgeführte „Screening“ der Stämme hinsichtlich der Synthese von extrazellulärer Protease, Lipase, Chitinase und Siderophoren offenbarte jedoch keine direkte Korrelation zwischen der Produktion von AHLs und Exoprodukten. Ein Vergleich der untersuchten phänotypischen Merkmale machte deutlich, daß weder Lipase- noch Siderophor-Aktivität mit dem Vorhandensein von AHL-Synthese in Beziehung zu bringen sind. Im Gegensatz zu 22 AHL-negativ getesteten Stämmen wiesen beispielsweise nur zwei dieser Vertreter keine Lipase-Produktion auf. Das Fehlen von Protease-Produktion korrelierte ebenfalls nicht mit fehlender AHL-Synthese: sämtliche Vertreter des *B. cepacia* Gv.VI und des neuen Genomovars sowie *B. vietnamiensis* und *B. multivorans* wiesen zwar keine proteolytische Aktivität auf, aber nur *B. multivorans* fehlte gleichzeitig die Fähigkeit zur AHL-Synthese. Darüberhinaus blieb die Zugabe von 500 nM C8-HSL zu den entsprechenden Indikatorplatten ohne Effekt auf die Protease-Produktion in *B. multivorans*. Dies deutet darauf hin, daß das offensichtliche Fehlen von Protease-Expression nicht durch fehlende AHL-Synthese hervorgerufen wird. In Analogie dazu erwiesen sich *B. vietnamiensis*, *B. multivorans* sowie die Stämme des neuen Genomovars Chitinase-negativ, aber wiederum vermochte die Zugabe von 500 nM C8-HSL nicht, die chitinolytische Aktivität in den AHL-negativen *B. multivorans* Stämmen wiederherzustellen. Der Grund für die fehlende Expression von Protease bzw. Chitinase, ob ein regulatorischer Effekt vorliegt oder ob möglicherweise ein Fehlen der entsprechenden Gene dafür verantwortlich ist, bleibt unklar. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das durchgeführte „Screening“ nicht den erhofften Aufschluß über AHL-regulierte Phänotypen erbrachte.

Interessanterweise war eine recht einheitliche Linie bezüglich der untersuchten Phänotypen innerhalb der einzelnen Genomovare, insbesondere *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* und

B. cepacia Gv.VI, ersichtlich. Folglich zeichnen sich für diese Genomovare spezifische phänotypische Charakteristika ab, wodurch sie voneinander differenzierbar werden. Während beispielsweise in *B. multivorans* ein AHL-, Protease- und Chitinase-negativer Phänotyp vorliegt, fällt *B. vietnamiensis* durch Protease- und Chitinase-Negativität auf, *B. cepacia* Gv.VI dagegen nur durch fehlende Protease-Aktivität. Im Gegensatz dazu erscheinen die *B. cepacia* Gv.I und Gv.III und *B. stabilis* phänotypisch eher heterogen und nicht voneinander unterscheidbar. Diese Beobachtungen harmonisieren relativ gut mit dem aktuellen Kenntnisstand, wonach *B. vietnamiensis*, *B. multivorans*, *B. stabilis* und *B. cepacia* Gv.VI aufgrund der Verfügbarkeit unterscheidender Tests inzwischen den Status eigener Species innehaben (Gillis *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1997; Vandamme *et al.*, 2000; Coenye *et al.*, 2001). Für *B. cepacia* Gv.I und Gv.III dagegen stehen einfache Differenzierungstests noch aus. Eine Unterscheidung ist derzeit nur mit Hilfe eines komplexen Ansatzes, der phäno- und genotypische Tests umfaßt, durchführbar (Vandamme *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 2001). Die Tatsache, daß während der Entstehung der vorliegenden Arbeit die Reklassifizierung von fünf Stämmen des Genomovars I nach Genomovar III erfolgte, unterstreicht die Schwierigkeit der korrekten Klassifizierung.

D.2.2 Phänotypische Charakterisierung der *cepI* Mutante *B. cepacia* H111-I

Erst die Konstruktion einer definierten, AHL-defizienten *cepI* Mutante von *B. cepacia* Gv.III H111 ermöglichte die Identifizierung AHL-regulierter Phänotypen. In Einklang mit den Ergebnissen von Lewenza *et al.* (1999) konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Produktion extrazellulärer Protease AHL-abhängig ist. Die deutlich verringerte proteolytische Aktivität der Mutante H111-I gegenüber H111 ist durch externe Zugabe entsprechender AHLs bis auf Wildtyp-Level komplementierbar. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, daß in den komplementierten Mutanten H111-I (pBBR-*cepI*_{H111}) und H111-I (pBBR-*cepI*₁₆₆₆₀) keine funktionelle Komplementation der Protease-Aktivität auftritt, obwohl die AHL-Produktion in diesen Stämmen nachweislich wiederhergestellt ist. Eine mögliche Erklärung für diese Gegebenheit ist, daß die zusätzliche *lux* Box, die in *trans* auf dem Plasmid pBBR-*cepI* vorliegt, kompetitiv wirkt. Durch gemeinsame Bindung von CepR und C8-HSL an die plasmid-kodierte *lux* Box Sequenz gehen diese Komplexe für die Aktivierung der Protease-Expression verloren. Diese Hypothese beruht auf der Annahme, daß CepR als Komplex mit C8-HSL auf Transkriptionsebene die Expression potentieller Zielgene durch Bindung an *lux* Box Sequenzen im Promotorbereich reguliert (Lewenza und Sokol, 2001). Allerdings

wurde bisher weder der zugrundeliegende molekulare Regulationsmechanismus aufgeklärt, noch liegen die nötigen Sequenzinformationen mutmaßlicher Zielgene vor.

Bei der Synthese von Siderophoren handelt es sich vermutlich ebenfalls um einen AHL-induzierten Prozess, da die AHL-defiziente Mutante eine deutlich reduzierte Aktivität aufweist, dieser Effekt aber durch die externe Zugabe entsprechender AHLs komplementierbar ist (Huber *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis weicht von den Beobachtungen von Lewenza *et al.* (1999) ab, die eine Hochregulation der Siderophor-Produktion für die *B. cepacia* K56-2 *cepI* Mutante beschreiben. Vermutlich kann diese offensichtliche Diskrepanz auf stamm-spezifische Unterschiede zurückgeführt werden. Auch die Produktion von Chitinase scheint AHL-kontrolliert zu sein, da durch die Zugabe synthetischer AHLs die leicht reduzierte Aktivität der Mutante auf Wildtyp-Aktivität gesteigert werden kann. Bezüglich der Lipase-Produktion konnte, in Übereinstimmung mit den Resultaten von Lewenza *et al.* (1999), kein AHL-abhängiger Effekt in der *cepI* Mutante detektiert werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es sich bei der Expression von Protease, Chitinase und Siderophoren in *B. cepacia* H111 wahrscheinlich um AHL-regulierte Prozesse handelt, während die Lipase-Synthese nicht unter Kontrolle des *cep* Systems zu stehen scheint. Es ist unklar welcher Regulationsmechanismus zugrundeliegt, aber eine positive Kontrolle der Zielgene auf Transkriptionsebene ist wahrscheinlich.

D.3 Vergleichende Sequenzanalyse und phylogenetische Analyse von *cepIR* innerhalb des *B. cepacia* Komplexes

Die Southern-Blot Analyse mit der *cepI*- bzw. *cepR*-spezifischen Sonde deutete eine gewisse Konservierung der *cep* Gene innerhalb des *B. cepacia* Komplexes an, da in allen getesteten Angehörigen des *B. cepacia* Komplexes *cepIR* homologe Gene nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu konnten mit den gleichen Sonden keine Signale für Vertreter außerhalb des *B. cepacia* Komplexes, nämlich *B. gladioli*, *B. pyrrocinia* und *Pandoraea apista*, detektiert werden, obwohl es sich bei diesen ebenfalls erwiesenermaßen um Produzenten von kurz-kettigen AHL-Molekülen handelt (Daten nicht gezeigt). Vermutlich unterscheiden sich die „Quorum Sensing“ Systeme dieser Spezies deutlich von den *cep* Genen der Vertreter des *B. cepacia* Komplexes. Die Tatsache, daß in *B. pseudomallei* E8 *cepIR* homologe Gene vorliegen erscheint somit etwas ungewöhnlich, aber die ausgeprägte Homologie zu *CepIR* von *B. multivorans* konnte eindeutig gezeigt werden.

Die für die *cepI* und *cepR* Gene einiger Vertreter des *B. cepacia* Komplexes durchgeführte Sequenzanalyse bestätigte einen erstaunlich hohen Grad an Konservierung zwischen den verschiedenen Genomovaren. Für die mutmaßlichen CepI Proteine aller Genomovare des *B. cepacia* Komplexes ergab sich eine Identität von ca. 72 % zueinander, die abgeleiteten CepR Proteine zeigten mit 88 % Identität eine noch stärkere Konservierung. Mit nur zwei Ausnahmen weisen die abgeleiteten Proteinsequenzen alle hochkonservierten Aminosäurepositionen innerhalb der LuxI/LuxR-Proteinfamilie auf (Parsek *et al.*, 1997; Fuqua *et al.*, 1996). Eine Ausnahme stellt der für *B. multivorans* Stämme charakteristische Austausch einer Glutaminsäure gegen eine Asparaginsäure an Position 43 der CepI Aminosäuresequenz dar. Bei der anderen Abweichung handelt es sich um einen Austausch von Prolin gegen Serin an Position 77 in den CepR Sequenzen aller Genomovare, der auch schon vor kurzem für *B. cepacia* Gv.III K56-2 gezeigt wurde (Lewenza *et al.*, 1999). Somit scheint diese Mutation für den gesamten *B. cepacia* Komplex charakteristisch zu sein. Der Austausch der konservierten Glutaminsäure gegen Asparaginsäure an der Position 180 jedoch, der von Lewenza *et al.* für *B. cepacia* K56-2 gefunden wurde, konnte in keiner weiteren der bestimmten CepR Sequenzen entdeckt werden und ist folglich wohl spezifisch für diesen Stamm.

Die phylogenetische Analyse der *cepI* und *cepR* Gene vermochte lediglich schwache Hinweise auf die Verwandtschaftsverhältnisse der Genomovare untereinander zu geben. Es ist jedoch die Tendenz erkennbar, daß *B. cepacia* Gv.I und Gv.III am engsten verwandt sind und zusammen mit *B. stabilis* (Gv.IV) und *B. cepacia* Gv.VI eine Art Cluster bilden, von dem sich sowohl *B. vietnamiensis* (Gv.V) als auch *B. multivorans* (Gv.II) deutlich abtrennen. Diese stark vereinfachte phylogenetische Tendenz spiegelt sich auch in phylogenetischen Stammbäumen basierend auf 16S rDNS- bzw. *recA*-Sequenzvergleich wider (Coenye *et al.*, 2001; Mahenthiralingam *et al.*, 2000a). Die Resultate der durchgeführten Southern-Blot Analyse scheinen diese Konstellation ebenfalls zu bestätigen, da die Vertreter der Genomovare I, III und IV überwiegend Hybridisierungssignale mit der Größe 2,4 kb für die Sonde *cepI* bzw. 2,4 kb und 1,9 kb für die Sonde *cepR* aufweisen. Auch für das gesamte Genomovar VI wurde mit 2,4 kb (*cepI*) bzw. 2,4 kb und 2,8 kb (*cepR*) ein sehr ähnliches Hybridisierungsprofil detektiert. Im Gegensatz dazu differenzieren sich die Hybridisierungsprofile von *B. vietnamiensis* (Gv.V) und *B. multivorans* (Gv.II) davon deutlich.

D.4 Bedeutung der AHL-Synthese für die Pathogenität von *B. cepacia*

In dem opportunistisch pathogenen Organismus *P. aeruginosa*, der schwerwiegende Infektionen in immunsupprimierten Patienten verursacht und für chronische Infektionen in Mukoviszidose-Patienten verantwortlich ist, wird die Expression einer Vielzahl von Virulenzfaktoren von zwei vernetzten „Quorum Sensing“-Systemen kontrolliert (Van Delden und Iglewski, 1998; Williams *et al.*, 2000). Die Bedeutung von „Quorum Sensing“ für die Pathogenität von *P. aeruginosa* wurde bereits in zahlreichen Tiermodellen - darunter ein *Caenorhabditis elegans* Nematoden-Modell (Tan *et al.*, 1999), ein Pneumonie-Modell in neugeborenen Mäusen (Tang *et al.*, 1996) und ein Mausmodell für Verbrennungen (Rumbaugh *et al.*, 1999) - bestätigt. In allen diesen Tiermodellen erwiesen sich Mutanten mit einem „Quorum Sensing“-Defekt als wesentlich weniger virulent als die Wildtyp-Stämme. Aus diesem Grund war es von Interesse zu untersuchen, ob *B. cepacia* Stämme, die keine oder nur sehr wenig AHL-Moleküle produzieren, eine geringere Virulenz aufweisen.

Basierend auf dem phänotypischen „Screening“ zahlreicher Stämme des *B. cepacia* Komplexes konnte in vorliegender Arbeit allerdings keine Korrelation zwischen AHL-Produktion und Pathogenitätspotential gezeigt werden. Für zwei Isolate der höchst infektiösen ET12-Linie beispielsweise, nämlich die Genomovar III Isolate LMG 18826 (Sajjan *et al.*, 1995) und LMG 18827 (Mahenthiralingam *et al.*, 1996), konnte keine AHL-Produktion nachgewiesen werden. Ein weiterer Vertreter dieser infektiösen Linie, Genomovar III Isolat K56-2 (LMG 18863), zeigt mit ca. 20 nM eine sehr geringe Synthese von AHL-Molekülen (Lewenza *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu produziert der Genomovar III Stamm H111, der nur kurzzeitig einen Mukoviszidose-Patienten besiedelte, mit ca. 500 nM große Mengen an AHLs (Geisenberger *et al.*, 2000). Darüberhinaus konnten bei keinem der getesteten *B. multivorans* Stämme, unabhängig von dem angewendeten Assay, AHL-Moleküle nachgewiesen werden. Trotzdem finden sich innerhalb dieses Genomovars höchst aggressive Vertreter, wie z. B. LMG 16660, der als Index-Stamm einer nosokomialen Infektion unter siebzehn jugendlichen Mukoviszidose-Patienten gilt und zum Tod von fünf Betroffenen führte (Whiteford *et al.*, 1995), oder wie LMG 18825, der ebenfalls einen Epidemie-Referenzstamm darstellt (Millar-Jones *et al.*, 1998). Allerdings darf bei der Bewertung dieser Daten nicht außer Acht gelassen werden, daß offensichtliche AHL-Negativität eines Stammes unter *in vitro* Bedingungen eine AHL-Produktion *in vivo* während des Verlaufs einer Infektion nicht ausschließt. Von Williams *et al.* (2000) konnte durch AHL-Extraktion aus Sputum von Mukoviszidose-Patienten bereits grundsätzlich gezeigt werden, daß *Burkholderia* sp. *in vivo* AHL-Moleküle während einer Infektion produzieren. Somit erscheint es von großer Wichtig-

keit, einige der hier charakterisierten Stämme in geeigneten experimentellen Tierinfektionsmodellen auf *in vivo* AHL-Produktion zu testen. Dies könnte z. B. in Analogie zu Studien mit *P. aeruginosa* geschehen, in denen mit Hilfe von auf Gfp-basierenden AHL-Biosensoren kürzlich AHL-abhängige Genexpression auf Einzelzellebene in Lungengewebe infizierter Mäuse detektiert wurde (Wu *et al.*, 2000).

Andererseits kann darüberhinaus der Einsatz der erzeugten AHL-defizienten Mutante H111-I in vergleichenden Virulenzstudien in eukaryontischen Modellsystemen dazu dienen, mögliche Effekte eines „Quorum Sensing“-Defekts in *B. cepacia* zu untersuchen. Ein derartiger Ansatz erscheint vielversprechend, da die phänotypische Charakterisierung von H111-I ergab, daß einige der mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren offensichtlich unter Kontrolle des *cep* Systems stehen. Es stellt sich nun die Frage, ob im *in vivo*-Experiment tatsächlich ein verändertes bzw. abgeschwächtes Virulenzverhalten der *cepI* Mutante feststellbar ist.

Von Martin und Mohr (2000) konnte kürzlich für *B. cepacia* Gv.III J2315 Zellinvasion und -replikation nachgewiesen werden. In Anlehnung an diese Experimente wurde H111-I bereits mit Hilfe eines Invasionsassays in respiratorischen Epithelzellen (Zelllinie A549, ATCC) hinsichtlich Zellinvasion und intrazellulärem Überleben getestet. Es zeigte sich jedoch, daß es sich bei der Fähigkeit zur Zellinvasion offensichtlich um ein stammspezifisches Virulenzverhalten handelt, das bei H111 nicht vorzuliegen scheint. Sowohl bei dem Wildtyp H111 als auch bei der Mutante H111-I war nämlich nur eine äußerst schwache bzw. vernachlässigbare Invasivität zu beobachten (Steidle, persönliche Mitteilung).

Bei *C. elegans* handelt es sich um ein erst kürzlich entdecktes Nematoden-Modell, das bereits erfolgreich in Virulenzstudien mit *P. aeruginosa* eingesetzt wurde (Tan *et al.*, 1999). Die Pathogenität der getesteten Bakterien zeigt sich in Form eines schnellen oder langsamen Abtötens („fast killing“ oder „slow killing“) des Wurms. Es wurde untersucht, ob die Mutante H111-I eine verminderte Virulenz aufweist. Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Mutante gegenüber dem Wildtyp eine attenuierte Virulenz bezüglich „fast killing“ und „slow killing“ zeigt (Antl, persönliche Mitteilung). Die Frage, welche Faktoren für das abgeschwächte Virulenzverhalten der Mutante verantwortlich sind, ist Gegenstand weiterführender Arbeiten. Darüberhinaus werden derzeit unter der Leitung von Dr. I. Steinmetz an der MHH Hannover vergleichende Studien betreffend die Virulenz von H111 und H111-I in einem akuten Pneumonie-Modell der Maus durchgeführt.

Es wird allgemein angenommen, daß *P. aeruginosa* während einer chronischen Infektion in der Lunge von Mukoviszidose-Patienten als Biofilm vorliegt (Costerton *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000). Dies stellt ein besonderes Problem dar, denn die hoch strukturierten bakteriellen Biofilme gewähren den Zellen nämlich Schutz vor der Immunantwort des Wirts und vermitteln außerdem stark erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika (Schlierholz *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte von Davies *et al.* (1998) gezeigt werden, daß Entwicklung und Struktur von Biofilmen in *P. aeruginosa* ebenfalls „Quorum Sensing“ kontrolliert sind. In Einklang mit dieser Beobachtung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, daß *B. cepacia* H111 zur Formation von Biofilm fähig ist und es sich dabei um einen AHL-abhängigen Prozeß handelt. Ein Wachstumsversuch mit den eingesetzten Stämmen schloß die Möglichkeit aus, daß die reduzierte Biofilmbildung der Mutante lediglich auf vermindertem Wachstum beruht (Huber, persönliche Mitteilung). Weiterführende Experimente in künstlichen Durchflußkammern bestätigten die wichtige Rolle von *cepI* für die Biofilmbildung. Anhand einer detaillierten Auswertung zahlreicher Biofilm-Parameter mit dem Computerprogramm COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, daß das *cep*-System konkret die Reifung des Biofilms und offensichtlich nicht die anfängliche Anheftung der Zellen beeinflusst (Huber *et al.*, 2001). Außerdem wurde beobachtet, daß die in H111 ausgeprägte Schwärmermotilität in H111-I fehlt und somit höchstwahrscheinlich einen „Quorum Sensing“-regulierten Prozeß darstellt. Allerdings wurde auch deutlich, daß die Fähigkeit zum Schwärmen *per se* nicht für die Biofilmformation essentiell ist (Huber *et al.*, 2001).

In Zusammenhang mit Mukoviszidose ist auffällig, daß eine Infektion mit *B. cepacia* oftmals in bereits mit *P. aeruginosa* infizierten Patienten auftritt und diese Co-Kolonisierung zu unterschiedlich schweren Krankheitsverläufen führen kann (Koch und Hoiby, 1993; Govan und Deretic, 1996; Tümmler und Kiewitz, 1999). Vermutlich können bestimmte Exoprodukte von *P. aeruginosa* die Epithelzelloberfläche der Lunge derartig verändern, daß eine Anheftung von *B. cepacia* erleichtert wird (Saiman *et al.*, 1990). Andere Beobachtungen, wonach zellfreie Kulturüberstände von *P. aeruginosa* die Virulenzfaktor-Produktion in *B. cepacia* verstärken, weisen ebenfalls auf synergistische Wechselwirkungen zwischen den beiden Spezies hin (McKenney *et al.*, 1995). In Anbetracht der Tatsache, daß beide Bakterienspezies „Quorum Sensing“ Systeme mit z.T. identischen Signalmolekülen nutzen, stellen diese Gegebenheiten ein starkes Indiz für die Möglichkeit einer intergenerischen Kommunikation mittels AHL-Molekülen dar. Folglich hat in letzter Zeit die Fragestellung, ob AHL-

vermittelte Kommunikation die Koexistenz von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* in den Atemwegen von Mukoviszidose-Patienten beeinflusst, an Gewicht gewonnen. Aktuelle Studien zu diesem Phänomen in verschiedenen Modellsystemen sollen klären, ob intergenerische Kommunikation zwischen *P. aeruginosa* und *B. cepacia* stattfindet, und ob diese Interaktionen die Virulenzfaktor-Produktion oder Biofilmbildung verändern.

Der Einsatz der *cepI* Mutante H111-I als Hintergrundstamm für AHL-Sensoren konnte zeigen, daß AHL-vermittelte Kommunikation zwischen den beiden Spezies sowohl in Kreuzstrich-Assays als auch in artifiziellen Durchflußkammern und in Mäuselungen stattfindet (Riedel, persönliche Mitteilung). Allerdings stellte sich heraus, daß es sich dabei offensichtlich um einen unidirektionalen Kommunikationsweg handelt, der nur von *P. aeruginosa* aus in Richtung *B. cepacia* stattfindet.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Der *Burkholderia cepacia* Komplex stellt eine heterogene Gruppe von Bakterien dar, die derzeit sieben genomische Spezies - sogenannte Genomovare (Gv.) - umfaßt und die aufgrund ihres pathogenen Potentials große Relevanz für Mukoviszidose-Patienten besitzt. Kürzlich wurde beschrieben, daß *B. cepacia* ein „Quorum Sensing“ System, bestehend aus der C8-HSL-Synthase *CepI* und dem Regulatorprotein *CepR*, nutzt, um die Synthese mutmaßlicher Pathogenitätsfaktoren zu kontrollieren (Lewenza *et al.*, 1999).

Um Aufschluß über die Verbreitung der AHL-Produktion innerhalb des *B. cepacia* Komplexes zu erlangen, wurden 70 Vertreter des *B. cepacia* Komplexes unterschiedlicher Herkunft untersucht. Mit Hilfe von verschiedenen AHL-Biosensoren konnte gezeigt werden, daß der überwiegende Teil der Stämme C8-HSL und in geringeren Mengen C6-HSL synthetisiert. Außerdem produziert ein Großteil der Vertreter von *B. vietnamiensis* (Gv.V) zusätzlich AHL-Moleküle mit Acyl-Seitenkettenlängen zwischen C10 und C14. Im Gegensatz dazu synthetisieren auffälligerweise alle getesteten Vertreter von *B. multivorans* (Gv.II) keine AHLs.

Die nachfolgende genotypische Charakterisierung der *cepIR* Loci von verschiedenen Vertretern des *B. cepacia* Komplexes diente dazu, genetische Genomovar-spezifische Charakteristika aufzuzeigen. Die Southern-Blot Analyse machte deutlich, daß sämtliche untersuchten Stämme, einschließlich aller offensichtlich AHL-negativen Vertreter, *cepI*- und *cepR*-homologe Gene besitzen. Überdies offenbarte die vergleichende Sequenzanalyse der *cep* Gene von ausgewählten Vertretern des *B. cepacia* Komplexes einen erstaunlich hohen Grad an Konserviertheit zwischen den verschiedenen Genomovaren. Ferner konnte durch die heterologe Expression der *cepI* Gene verschiedener Genomovare in *Escherichia coli* bewiesen werden, daß alle Gene für funktionelle Proteine kodieren, die für die Synthese von C6-HSL und C8-HSL verantwortlich sind. Diese Ergebnisse legen die Schlußfolgerung nahe, daß in *B. multivorans* (Gv.II) negativ-regulatorische Faktoren die *cepI* Expression reprimieren und in *B. vietnamiensis* (Gv.V) ein zweites AHL-Synthasegen mit geringer Homologie zu *cepI* vorliegt.

Darüberhinaus wurden sämtliche Stämme einer phänotypischen Charakterisierung betreffend Protease-, Lipase-, Chitinase-, und Siderophor-Synthese unterzogen. Diese Arbeiten offen-

barten jedoch keine Korrelation zwischen AHL-Produktion und der Synthese dieser Exoprodukte.

Die Konstruktion einer definierten, AHL-defizienten *cepI* Mutante im Stamm *B. cepacia* Gv.III H111 ermöglichte die Identifizierung AHL-regulierter Phänotypen. Es stellte sich heraus, daß es sich bei der Expression von Protease, Chitinase und Siderophoren sowie bei der Biofilmbildung um AHL-regulierte Prozesse handelt, während die Lipase-Synthese nicht unter Kontrolle des *cep* Systems steht.

F. ANHANG

Tab. F.1: NCBI-GenBank-Zugangsnummern (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) für die Nukleotidsequenzen der analysierten *cepI*- und *cepR*- Gene verschiedener Genomovare des *Burkholderia cepacia* Komplexes.

Stammbezeichnung	Zugangsnummer	
	<i>cepI</i>	<i>cepR</i>
<i>B. cepacia</i> Gv.I LMG 1222 ¹	AF330012	AF330018
<i>B. multivorans</i> LMG 16660	AF330013	AF330019
<i>B. multivorans</i> R-139	AF330024	
<i>B. multivorans</i> LMG 18822	AF330025	
<i>B. multivorans</i> LMG 17588	AF330026	
<i>B. multivorans</i> H191	AF330027	
<i>B. cepacia</i> Gv.III H111	AF330014	AF330020
<i>B. cepacia</i> Gv.III LMG 18863 (Lewenza <i>et al.</i> , 1999)	AF019654	AF019654
<i>B. stabilis</i> LMG 14291	AF330015	AF330021
<i>B. vietnamiensis</i> R-921	AF330016	AF330022
<i>B. cepacia</i> Gv.VI LMG 18943	AF330017	AF330023

Abb. F.1: Doppelsträngige Nukleotidsequenz des *cepIR* Locus von *B. cepacia* Gv.III H111 mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code für *cepI* und *cepR*. Die Start- und Stopcodons der Gene sind hervorgehoben, wobei Sterne (*) Stopcodons bezeichnen. Die mutmaßlichen Promotor-Elemente sowie die Ribosomenbindestelle (RBS) für *cepI* sind hervorgehoben und unterstrichen. Die Pfeile kennzeichnen die „inverted repeats“ der *lux* Box-ähnlichen Sequenz.

```

1      GGAAACGCGCGTTCCGGCTCAGGCGGCGATAGCTTGCCGGGCGGCCTGCCCCGGCTCGAT
=====
      CCTTTGCGCGCAAGGCCGAGTCCGCGCTATCGAACGGCCCGCCGGACGGGGCCGAGCTA
              *  A  A  I  A  Q  R  A  A  Q  G  P  E  I

61     TCCTAGTGCGGCAAACGTTTTCGGATCGATGTCGATCCAGCACGCGACCACCAGACGCCC
=====
      AGGATCACGCCGTTTGCAAACGCCTAGCTACAGCTAGGTCGTGCGCTGGTGGTCTGCGGG
      G  L  A  A  F  T  Q  P  D  I  D  I  W  C  A  V  V  L  R  G

121    ATCCACCTGCTTCGGCGGGCCTGCGCGGTGCGCGTGTATGCCGATCCGGCGGAACAGGCG
=====
      TAGGTGGACGAAGCCGCCCGGACGCGCCACGCGCACATACGGCTAGGCCGCTTGTCCGC
      D  V  Q  K  P  P  G  A  R  H  A  H  I  G  I  R  R  F  L  R

181    CTCCATGCTCGCGAACGTCACGCCGATCAACTGCCGCGCCCCGAGCTGCGCCGCGCATTC
=====
      GAGGTACGAGCGCTTGCAGTGC GGCTAGTTGACGGCGCGGGGCTCGACGCGGCGCGTAAG
      E  M  S  A  F  T  V  G  I  L  Q  R  A  G  L  Q  A  A  C  E

```

241 GACGACGGCCGCGAGCATCGGGCGCACGGCCCATTTCGGCGTTGCCCGGGCCGCCTTCGTC
 =====
 CTGCTGCCGGCGCTCGTAGCCCGCGTGCCTGGGTAAGCCGCAACGGGCCCCGGCGGAAGCAG
 V V A A L M P R V A W E A N G P G G E D

301 GTCGGTCGCCGGAATCGCGACAATTCCAGACGGCGGCCGATTGCGGCAGAGGCATGTC
 =====
 CAGCCAGCGGGCGCTTAGCGCTGTTAAGGGTCTGCCGCGGCTAACGCCGTCTCCGTACAG
 D T A A F R S L E W V A A S Q P L P M D

361 TTCGGCGATCAGGTCGGCGAACAGCGACTTCAGCAGATACGGGCGCGTTCGTCGGCAGCAG
 =====
 AAGCCGCTAGTCCAGCCGCTTGTGCGTGAAGTCGTCTATGCCCGCGCAGCAGCCGTTCGTC
 E A I L D A F L S K L L Y P R T T P L L

421 GCGCGCACATCCGCACATGTCGCCGTCGGCGTTTCGCGCGAACACGTAGACGGTATTCGTC
 =====
 CGCGCGTGTAGGCGGTACAGCGCGCAGCCGCAAAGCGCGCTTGTGCATCTGCCATAGCAG
 R A C G C M D G D A N R A F V Y V T D D

481 GCGATCGAACTGGTACGCTCGAACTTACGTTTCGCCGACGGGAGCGCCCAACCGAGCTG
 =====
 CGCTAGCTTGACCAGTGCAGCTTTGAATGCAAGCGGCTGCCCTCGCGGGTTGGCTCGAC
 R D F Q D R E F S V N A S P L A W G L Q

541 CTCGACGAACACGCGGGCGCCGATAGCGCCCCGAGATCCGCCGCGAGTTCGTGTGGCAACCG
 =====
 GAGCTGCTTGTGCGCCGCGGCTATCGCGGGCTCTAGGCGGGCGCTCAAGCACACCGTTGGC
 E V F V R R R Y R G L D A A L E H P L R

601 CCCTTCCTCGTGAACGAAGGTCTGCATGGATGTCCTCGGATCTGTGCTTTTGTATGCGTG
 =====
 GGAAGGAGCACTTGTCTCCAGAC**GTA**CCTAC**AGGAG**CCTAGACACGAAAACATACGCAC
 G E E H V F T Q M **RBS**

661 CATTACAGCGCGCGGCACGAGGAGCCTGTAACGGTAACTCTTACAGGGTGACGGCGTAA
 =====
GTAATGTCGCGCGCCGTGCTCCTCG**GACATT**GACCATTGAGAATGTCCACTGCCGCATT
 -10 -35 -----><-----

721 AGACGCATTCGGGACGTGGTAACGGTTTCTTGATCAACGGGATTGAAAACCGCGCCGCTT
 =====
 TCTGCGTAAGCCCTGCACCATTGCCAAAGAACTAGTTGCCCTAACTTTTGGCGGGCGGAA

781 TTGCTTATAAAGAGCGCCAGTCTTGCAAAATCGTCAGAGGAATGCGCAGCCAGTTGTCAC
 =====
 AACGAATATTTCTCGCGGTGAGAACGTTTTAGCAGTCTCCTTACGCGTCGGTCAACAGTG

841 TGGAGCGTCGGACCGGCATGATAGGCGTCGTTGTGCCCGAGCAGGGCTGACGCGACAGCG
 =====
 ACCTCGCAGCCTGGCCGTAATACTCCCGCAGCAACACGGGCTCGTCCCAGTGCCTGTTCGC

901 GCGGGCCAGTCGATGCACGCGAGCCGTGCGGCGAGCGGGCGGCTGTGCGGAACATGCCG
 =====
 CGCCCGGTACGTGCGCTCGGCACGCCGCTCGCGCCCGACACGCCTTGTACGGC

961 ATGTCGGCGCCGGTGGCGTCGATGGCCATCACGTTGCTGCGGACGTCGCCGCCCGCGATC
 =====
 TACAGCCGCGGCCACCGCAGCTACCGGTAGTGCAACGACGCTGCAGCGGGCGGGCGCTAG

1021 ACGAACGTGCCCGTCGCGCGGTGAGATAACCAGTCCCAGCCGATCGTCACGTAAGCGACG
 =====
 TGCTTGACGGGCAGCGCGCCAGCTCTATGGTCAGGGTCGGCTAGCAGTGCATTCGCTGC

1081 CCGGCACTGGCCGGGCGATGCCATTCCGGTATAGCCGGCGAGGCGAGCGTCGATTGCGCTG
 =====
 GGCCGTGACCGGCCCGCTACGGTAAGCCATATCGGCCGCTCCGCTCGCAGCTAACGCGAC

1141 TCGCGCAATTCTCGCGCAGCGAGGTGTGAGGCCGCTTGCGACATGGTTCGAGCGCAAGC
 =====
 AGCGCGTTAAGGAGCGCGTCGCTCCACAGCTCCGGCGAACGCTGTACCAGCTCGCGTTCG

1201 ACGGCCAGTGCCTTTCTGACAGGCGTACGTAGCCGTCCGGGGACGGGCCGGGGACCGGG
 =====
 TGCCGGTCACGCGAAAGACTGTCCGCATGCATCGGCAGGCCCTGCCCGGCCCTTGCCCC

1261 TGCAGCAAAGGTGAAGTCATGCGCGGAATGTATCAGCCTCGAACGGGTGCTGGAACCTGA
 =====
 ACGTCGTTTCCACTTCAGTACGCGCCTTACATAGTCGGAGCTTGCCACGACCTTGACT

1321 CAAGTATGACAGCGTGACGTTGTCGGAGAATGA**AT**GGAACTGCGCTGGCAGGATGCCTAT
 =====
 GTTCATACTGTGCGACTGCAACAGCCTCTTACTTACCTTGACGCGACCGTCTACGGATA

1381 Q Q F S A A E D E Q Q L F Q R I A A Y S
 CAACAATTCAGCGCCGCGGAAGATGAGCAGCAGCTCTTCCAGCGGATCGCCGCTATTC
 =====
 GTTGTTAAGTCGCGGCGCCTTCTACTCGTCGTCGAGAAGGTGCCTAGCGGCGGATAAGG

1441 K R L G F E Y C C Y G I R V P L P V S K
 AAGCGGCTCGGATTCGAATACTGCTGTTACGGTATTCGCGTCCCCTGCCCGTTTCGAAG
 =====
 TTCGCCGAGCCTAAGCTTATGACGACAATGCCATAAGCGCAGGGCGACGGGCAAAGCTTC

1501 P A V A I F N T Y P D G W M A H Y Q A R
 CCCGCGGTCGCGATCTTCAATACCTATCCGGACGGCTGGATGGCGCACTACCAGGCGCGA
 =====
 GGGCGCCAGCGCTAGAAGTTATGGATAGGCCTGCCGACCTACCAGCGTATGGTCCGCGCT

1561 N Y I E I D S T V R D G A L S T N M I V
 AACTACATCGAGATCGACTCGACGGTTCGCGACGGCGCGCTCAGCACCAACATGATCGTC
 =====
 TTGATGTAGCTCTAGCTGAGCTGCCAAGCGCTGCCGCGGAGTCGTGGTTGTACTAGCAG

1621 W P D V D R I D P C P L W Q D A R D F G
 TGGCCGGACGTCGACCGGATCGATCCGTGCCCGCTGTGGCAGGACGCGCGGATTCGGA
 =====
 ACCGGCCTGCAGCTGGCCTAGCTAGGCACGGGCGACACCGTCCTGCGCGCTAAAGCCT

ANHANG

1681 L S V G V A Q S S W A A R G A F G L L S
TTGTCGGTGGGCGTTCGCGCAGTTCGAGCTGGGCGGCCCGCGGCGCGTTTCGGGCTGCTAAGC
=====
AACAGCCACCCGCGAGCGCTCAGCTCGACCCGCCGGGCGCCGCGCAAGCCCGACGATTTCG

1741 I A R H A D R L T P A E I N M L T L Q T
ATCGCCCGCCATGCCGACCGGCTGACGCCGGCCGAGATCAACATGCTGACGCTGCAGACC
=====
TAGCGGGCGGTACGGCTGGCCGACTGCGGCCGGCTCTAGTTGTACGACTGCGACGCTCTGG

1801 N W L A N L S H S L M S R F M V P K L S
AACTGGCTCGCAAACCTGTTCGATTCGCTGATGAGCCGCTTCATGGTGCCGAAGCTGTTCG
=====
TTGACCGAGCGTTTGGACAGCGTAAGCGACTACTCGGCGAAGTACCACGGCTTCGACAGC

1861 P A A G V T L T A R E R E V L C W T A E
CCGGCGGCGGGCGTACGCTGACCGCGCGGAGCGGAGGTGCTGTGCTGGACGGCCGAG
=====
GGCCGCCGCCCGCAGTGCAGTGGCGCGGCTCGCGCTCCACGACACGACCTGCCGGCTC

1921 G K T A C E I G Q I L S I S E R T V N F
GGCAAGACCGCGTTCGAAATCGGCCAGATCCTCAGCATCTCGGAGCGGACGGTCAACTTC
=====
CCGTTCTGGCGCACGCTTTAGCCGGTCTAGGAGTCGTAGAGCCTCGCCTGCCAGTTGAAG

1981 H V N N I L E K L G A T N K V Q A V V K
CACGTGAACAACATCCTCGAGAAGCTCGGCGCGACCAACAAGGTCCAGGCGGTTCGTCGTC
=====
GTGCACTTGTGTAGGAGCTCTTCGAGCCGCGCTGGTTGTTCCAGGTCCGCCAGCAGTTC

2041 A I S A G L I E A P *
GCGATCTCGGCCGGGCTCATCGAAGCACCC**TGAC**AGGGCGTGAGGGCGGCGAGCGCGACAT
=====
CGCTAGAGCCGGCCCGAGTAGCTTCGTGGGACTGTCCCCTCCCGCCGTCGCGCTGTA

2101 GCGGCTGCCGCCAGGCCGCTTACTCCATCATCGGCTCCGCTTCCTTCGCGGTCCAGCTCA
=====
CGCCGACGGCGGTCCGGCGAATGAGGTAGTAGCCGAGGCGAAGGAAGCGCCAGGTTCGAGT

2161 CG
==
GC

G. LITERATURVERZEICHNIS

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and D.J. Lippman. 1997. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* **25**:3389-3402

Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M. and S. Molin. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2240-2246

Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G. P., Stewart, G.S. and P. Williams. 1992. *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.* **288**:997-1004

Bassler, L.B., Wright, M., Showalter, R.E. and R.M. Silverman. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* **9**:773-786

Bradley, D.E., Taylor, D.E. and D.R. Cohen. 1980. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **143**:1466-1470

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

Burns, J.L., Jonas, M., Chi, E.Y., Clark, D.K., Berger, A. and A. Griffith. 1996. Invasion of respiratory epithelial cells by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Infect. Immun.* **64**:4054-4059

Cao, J.G. and E.A. Meighen. 1989. Purification and structural identification of an auto-inducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.* **264**:21670-21676

Chhabra, S.R., Stead, P., Bainton, N.J., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. and B.W. Bycroft. 1993. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* ATCC39048 by analogues of *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Antibiot.* **46**:441-454

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

Coenye, T., Falsen, E., Vancanneyt, M., Hoste, B., Govan, J.R.W., Kersters, K. and P. Vandamme. 1999a. Classification of some *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:405-413

Coenye, T., Schouls, L.M., Govan, J.R.W., Kersters, K. and P. Vandamme. 1999b. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1657-1666

Coenye, T., Falsen, E., Hoste, B., Ohlen, M., Goris, J., Govan, J.R.W., Gillis, M. and P. Vandamme. 2000. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenus* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:887-899

Coenye, T., LiPuma, J.J., Henry, D., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert D.B. and P. Vandamme. 2001. *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.B. and P. Vandamme. 2001. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex comprising biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **in press**

Connell, T.D., Metzger, D.J., Lynch, J. and J.P. Folster. 1998. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the *eps*-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **180**:5591-5600

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

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

Darling, P., Chan, M., Cox, A.D and P.A. Sokol. 1998. Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. *Infect. Immun.* **66**:847-877

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **280**:295-298

de Kievit, T.R. and B.H. Iglewski. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**:4839-4849

Dower W. J., Miller, J. F. and C. W.Ragsdale. 1998. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127-6145

Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S. and M. Givskov. 1996. Involvement of *N*-acyl-L-homoserinelactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* **20**:127-136

Eberl, L. 1999. *N*-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **22**:493-506

Figurski, D.H. and D.R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1648-1652

- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A. and T.P. Denny.** 1997a. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **26**:252-259
- Flavier, A.B., Ganova-Raeva, L.M., Schell, M.A. and T.P. Denny.** 1997b. Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum* : control of N-acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.* **179**:7089-7097
- Fuqua, W.C. and S.C. Winans.** 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* **176**:2796-2806
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and E.P. Greenberg.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and E.P. Greenberg.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:727-751
- Geisenberger, O., Givskov, M., Riedel, K., Hoiby, N., Tümmler, B. and L. Eberl.** 2000. Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:273-278
- Geisenberger, O.** 2000. Nachweis, Verbreitung und Bedeutung von N-Acyl-L-homoserin-lactonen bei Gram-negativen Bakterien. Doktorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München.
- Gessner, A.R. and J.E. Mortensen.** 1990. Pathogenic factors of *Pseudomonas cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* **33**:115-120
- Gillis, M., Van, T.V., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T. and M.P. Fernandez.** 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. Bacteriol.* **45**:274-289
- Gilson, L., Kuo, A. and P.V. Dunlop.** 1995. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* **177**:6946-6951
- Glass, S. and J.R.W. Govan.** 1986. *Pseudomonas cepacia* – fatal pulmonary infections in a patient with cystic fibrosis. *J. Infect.* **13**:157-158
- Glessner, A., Smith, R.S., Iglewski, B.H. and J.B. Robinson.** 1999. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J. Bacteriol.* **181**:1623-1629
- Govan, J.R.W. and V. Deretic.** 1996. Microbiol pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**:539-574

- Govan, J.R.W., Hughes, J.E. and P. Vandamme.** 1996. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. J. Med. Microbiol. **45**:395-407
- Govan, J.R.W. and P. Vandamme.** 1998. Agricultural and medical microbiology: a time for bridging gaps. Microbiology **144**:2373-2375
- Govan, J.R.W., Balendreau, J. and P. Vandamme.** 2000. *Burkholderia cepacia*—friend and foe. ASM News **66**:124-125
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**:557-580
- Hardmann, A.M., Stewart, G.S. and P. Williams.** 1998. Quorum sensing and cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. **74**:199-210
- Henry, D., Campbell, M.E., LiPuma, J.J. and D.P. Speert.** 1997. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. J. Clin. Microbiol. **35**:614-619
- Henry, D., Mahenthalingam, E., Vandamme, P., Coenye, T. and D.P. Speert.** 2001. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. J. Clin. Microbiol. **39**:1073-1078
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K. and S. Molin.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology **146**:2395-2407
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. and H.P. Schweizer:** 1998. A broad-host range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. Gene **212**:77-86
- Hobson, R., Gould, I. and J.R.W. Govan.** 1995. *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* as a cause of brain abscesses secondary to chronic suppurative otitis media. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **14**:908-911
- Holmes, A., Govan, J.R.W. and R. Goldstein.** 1998. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? Emerg. Infect. Dis. **4**:221-227
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S. and L. Eberl.** 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. Microbiology, **accepted**

- Hutchison, M.L., Poxton, J.I.R. and J.R.W. Govan.** 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., Bonell, E.C., Poxton, J.I.R. and J.R.W. Govan.** 2000. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**:73-77
- Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P. and H. Levison.** 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J. Pediatr.* **104**:206-210
- Johnson, W.M., Tyler, S.D. and K.R. Rozee.** 1994. Linkage analysis of geographic and clinical clusters in *Pseudomonas cepacia* infections by multilocus enzyme electrophoresis and ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* **32**:924-930
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Cox, A.J., Golby, P., Reeves, P.J., Stephens, S. et al.** 1993. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Embo J.* **12**:2477-2482
- Kaplan, H.B. and E.P. Greenberg.** 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**:1210-1214
- Kessler, B., de Lorenzo, V. and K.N. Timmis.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of Gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**:293-301
- Koch, C. and N. Hoiby.** 1993. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* **341**:1065-1069
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. and K.M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-176
- Kristensen, C.S., Eberl, L., Sanches-Romero, J.M., Givskov, M., Molin, S. and V. de Lorenzo.** 1995. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J. Bacteriol.* **177**:52-58
- Larsen, G.Y., Stull, T.L. and J.L. Burns.** 1993. Marked phenotypic variability in *Pseudomonas cepacia* isolated from a patient with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**:788-792
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. and A. Lazdunski.** 1996. A hierarchical quorum sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* **21**:1137-1146

- Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S.A.B., Hardman, A., Downie, J.A., O'Gara, F. and P. Williams.** 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium etli* bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. Microbiology. **146**:2469-2480
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P. and P.A. Sokol.** 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J. Bacteriol. **181**:748-756
- Lewenza, S. and P.A. Sokol.** 2001. Regulation of ornibactin biosynthesis and *N*-acyl-L-homoserine lactone production by CepR in *Burkholderia cepacia*. J. Bacteriol. **183**:2212-2218
- Lindum, P.W., Anthoni, U., Christopherson, C., Eberl, L., Molin, S. and M. Givskov.** 1998. *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. J. Bacteriol. **180**:6384-6388
- LiPuma, J.J.** 1998. *Burkholderia cepacia*. Management issues and new insights. Clin. Chest Med. **19**:473-486
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P. and J.A. Downie.** 2000. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. Mol. Microbiol. **37**:81-97
- Lonon, M.K., Woods, D.E. and D.C. Strauss.** 1988. Production of lipase by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. J. Clin. Microbiol. **26**:979-984
- Ludwig, W. and O. Strunk.** 1997. ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation/arb.ps>
- MacBeath, G. and P. Kast.** 1998. UGA read-through artifacts-when popular gene expression systems need a pATCH. Biotechniques. **24**:789-794
- Madden T. L., Tatusov, R. L. and J. Zhang.** 1996. Applications of network BLAST server. Methods Enzymol. **266**:131-41
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Henry, D.A. and D.P. Speert.** 1996. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. **34**:2914-2920
- Mahenthiralingam, E., Simpson D.A. and D.P. Speert.** 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. and P. Vandamme.** 2000a. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. J. Clin Microbiol. **38**:3165-3173

- Mahenthiralingam, E., Coenye, T., Chung, J.W., Speert, D.P., Govan, J.R.W., Taylor, P. and P. Vandamme.** 2000b. Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin Microbiol.* **38**:910-913
- Maier, C.** 1999. Konstruktion von Vektoren mit einem breiten Wirtsbereich zur Analyse von bakteriellen Promotoren. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München.
- Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208-218
- Martin, M., Showalter, R. and M. Silverman.** 1989. Identification of a locus controlling expression of luminescence genes in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **171**:2406-2414
- Martin, D.W. and C.D. Mohr.** 2000. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infect. Immun.* **68**:24-29
- McKenney, D., Brown, K.E. and D.G. Allison.** 1995. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. *J. Bacteriol.* **177**:6989-6992
- McKevitt, A.I., Bajaksouzian, S., Klinger, J.D. and D.E. Woods.** 1989. Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas cepacia*. *Infect. Immun.* **57**:771-778
- Meighen, E.A.** 1994. Genetics of bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Genet.* **28**:117-139
- Millar-Jones, L., Ryley, H.C., Paull, A. and M.C. Goodchild.** 1998. Transmission and prevalence of *Burkholderia cepacia* in Welsh cystic fibrosis patients. *Respir. Med.* **92**:178-183
- Milton, D.L., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S and P. Williams.** 1997. Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* **179**:3004-3012
- Murray, V.** 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**:164-175
- Nasser, W., Bouillant, M.L., Salmond, G. and S. Reverchon.** 1998. Characterisation of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* **29**:1391-1405
- Nealson, K.H., Platt, T. and J.W. Hastings.** 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* **104**:313-322
- Nealson, K.H.** 1977. Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch. Microbiol.* **112**:73-79

- Oka, A., Sugisaki, H and M. Takanami.** 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J. Mol. Biol.* **147**:217-226
- O`Toole, G.A. and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**:295-304
- Palfreyman, R.W., Watson, M.L., Eden, C. and A.W. Smith.** 1997. Induction of biologically active interleukin-8 from lung epithelial cells by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* products. *Infect. Immun.* **65**:617-622
- Palleroni, N.J. and B. Holmes.** 1981. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**:479-481
- Parsek M. R., Schaefer, A. L. and Greenberg E. P.** 1997. Analysis of random and site-directed mutations in *rhlI*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Mol. Microbiol.* **26**:301-310
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and B.H. Iglewski.** 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science.* **260**:1127-1130
- Pesci, E.C. and B.H. Iglewski.** 1997. The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends Microbiol.* **5**:132-134
- Pierson, L.S.III and E.A. Pierson.** 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**:101-108
- Pierson, L.S.III, Keppenne, V.D. and D.W. Wood.** 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-48 is regulated by PhzR in response to cell-density. *J. Bacteriol.* **176**:3966-3974
- Piper, K.R., Von Bodman, S.B. and S.K. Farrand.** 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature.* **362**:448-450
- Pratt, L.A. and R. Kolter.** 1998. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:598-603
- Reverts, H., Vandamme, P., Van Zeebroeck, A., De Boeck, K., Struelens, M.J., Verhaegen, J., Ursi, J.P., Verschraegen, G., Franckx, H., Malfroot, A., Dab, I. and S. Lauwers.** 1996. *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and cystic fibrosis: the epidemiology in Belgium. *Acta. Clin. Belg.* **51**:222-230
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Givskov, M., Molin, S. and L. Eberl.** 2001. AHL-mediated intergeneric communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology*, submitted

- Rosemeyer, V., Michiels, J., Verreth, C. and J. Vanderleyden.** 1998. *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. J. Bacteriol. **180**:815-821
- Rothballe, M.** 2000. Konstruktion von Knock-out-Mutationen in den Genen *gltB* und *nasT* von *Pseudomonas putida*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H. and A. N. Hamood.** 1999. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. Infect. Immun. **67**:5854-5862
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.H., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and H.A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **293**:487-491
- Saiman, L., Cacalano, G. and A. Prince.** 1990. *Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. **58**:2578-2584
- Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**:406-425
- Sajjan, U.S., Sun, L., Goldstein, R. and J.F. Forstner.** 1995. Cable (Cbl) type II pili of cystic fibrosis associated *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: nucleotide sequence of the *cblA* major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. J. Bacteriol. **177**:1030-1038
- Salmond, G.P., Bycroft, B.W., Stewart, G.S and P. Williams.** 1995. The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. Mol. Microbiol. **16**:615-624
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. and A. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**:5463-5467
- Schlierholz, J.M., Beuth, J., König, D., Nürnberger, A. and G. Pulverer.** 1999. Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. Zentralbl. Bakteriologie. **289**:165-177
- Schweizer, H.P. and T.T. Hoang.** 1995. An improved system for gene replacement and *xylE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene. **158**:15-22
- Schwyn, B. and J.B. Neilands.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. **160**:47-56
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E.Jr., Rinehart, K.L. and S.K. Farrand.** 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thinlayer chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**:6036-6041

- Shelly, D.B., Spilker, T., Gracely, E.J., Coenye, T., Vandamme, P. and J.J. LiPuma.** 2000. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3112-3115
- Simpson, I.N., Finlay, J., Winstanley, D.J., Dewhurst, N., Nelson, J.W., Butler, S.L. and J.R.W. Govan.** 1994. Multi-resistant isolates possessing characteristics of both *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and *Burkholderia gladioli* from patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**:353-361
- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J. and E.P. Greenberg.** 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* **407**:762-764
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517
- Speert, D.P., Bond, M., Woodman R.C. and J.C. Curnutte.** 1994. Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: role of non –oxidative killing by neutrophils in host defence. *J. Infect. Dis.* **170**:1524-1531
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. and M. Doudoroff.** 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**:159-271
- Stotzky, G., Devanas, M.A. and L.R. Zeph.** 1990. Methods for studying bacterial gene transfer in soil by conjugation and transduction. *In: Neidleman, S.L. and A.I. Laskin (Eds.), Advances in Applied Microbiology.* Academic Press, San Diego, CA. pp. 57-169
- Stüber, D., Matile, H. and G. Garotta.** 1990. System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *In: Lefkovits, I. and B. Pernis (Eds.), Immunological Methods.* Vol IV:121-152
- Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K. and R.B. Wallace.** 1981. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences. *In: Brown, D.D. and C.F. Fox (Eds.), Developmental Biology Using Purified Genes.* pp. 683-693. Academic Press, New York
- Sun, L., Jiang, L.-Z., Steinbach, S., Homes, A., Campanelli, C., Forstner, J., Sajjan, U., Tan, Y., Riley, M. and R. Goldstein.** 1995. The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl⁺ Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* causing epidemics in North America and Britain. *Nat. Med.* **1**:661-666
- Swift, S., Bainton, N.J. and M.K. Winson.** 1994. Gram-negative bacterial communication by *N*-acyl homoserine lactones: a universal language? *Trends Microbiol.* **2**:193-198
- Tan, M. W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G. and F. M. Ausubel.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**:2408-2413

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

Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G.S., Bycroft, B.W. and Pritchard, D.I. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.* **66**:36-42

Tögl, A. 2000. Klonierung der AHL-Synthase CepI und des Transkriptionsregulators CepR von *Burkholderia multivorans*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München.

Tümmler, B. and C. Kiewitz. 1999. Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol. Med. Today* **5**:351-358

Tyler, S.D., Rozee, K.R. and W.M. Johnson. 1996. Identification of IS1356, a new insertion sequence, and its association with IS402 in epidemic strains of *Burkholderia cepacia* infecting cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1610-1616

Ursing, J.B., Rossello-Mora, R.A., Garcia-Valdes, E. and J. Lalcut. 1995. Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar groups. *Int. Syst. Bacteriol.* **45**:604

Veal, D.A., Stokes, H.W. and G. Daggard. 1992. Genetic exchange in natural microbial communities. *In: Marshall, K.C. (Ed.), Advances in Microbial Ecology.* Plenum Press, New York, NY. pp. 383-430

Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K. and J.R.W. Govan. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1188-1200

Vandamme, P., Goris, J., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Kersters, K., De Vos, P. and E. Falsen. 1999. Assignment of Centers for Disease Control group IVc-2 to the genus *Ralstonia* as *Ralstonia paucula* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:663-669

Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, B., de Vos, P., Henry, D. and D.P. Speert. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J. Clin. Microbiol.* **38**:1042-1047

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

Van Pelt, C., Verduin, C.M., Goessens, W.H.F., Vos, M.C., Tümmler, B., Segonds, C., Reubsaet, F., Verbrugh, H. and A. van Belkum. 1999. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2158-2164

Whiteford, M. L., Wilkinson, J. D., McColl, J. H., Conlon, F. M., Michie, J. R., Evans, T. J. and Paton J. Y. 1995. Outcome of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax* **50**:94-98

Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V. J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D. I. and B. W. Bycroft. 2000. Quorum sensing and the population dependent control of virulence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences* **355**:549-550

Wilson, T. and J.W. Hastings. 1998. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**:197-230

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

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

Xu, K.D., McFeter, G.A. and P.S. Stewart. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology.* **146**:547-549

Yohalem, D.S. and J.W. Lorbeer. 1994. Intraspecific metabolic diversity among strains of *Burkholderia cepacia* isolated from decayed onions, soils, and the clinical environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**:111-131

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

Zhou, C., Yang, Y. and A.Y. Jong. 1990. Minipreps in ten minutes. *Biotechniques* **8**:172-173

H. PUBLIKATIONSLISTE

Liebl, W., Brem, D. and A. Gotschlich. 1998. Analysis of the gene for beta-fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**:55-64

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

Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S. and L. Eberl. 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. Microbiology, **accepted**

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer im Zeitraum von Mai 1998 bis Mai 2001 angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt an dieser Stelle:

Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer für die Bereitstellung des Themas, sein Interesse und seine besondere Unterstützung.

Herrn PD Dr. Leo Eberl für seine kompetente Betreuung und die vorzüglichen Arbeitsgruppenessen am Wörthsee.

Frau Anna Leeb für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Frau Beate Schumacher für ihre freundlichen Aufmunterungen sowie ihre bewundernswerte Ruhe und Gelassenheit.

Meinen „Mit-Hühnern“ Birgit Huber, Anette Steidle und Kathrin Riedel, sowie „Ex-Huhn“ Renate Schulze für ein sehr angenehmes, freundschaftliches Arbeitsklima und die zahlreichen privaten Aktivitäten.

Den „Jungs“ Aldo Ammendola und Otto Geisenberger für die wertvollen kleinen und großen Hilfen und das freundschaftliche Verhältnis.

Allen Diplomanden des „Eberl-Labors“ für die erfrischende Abwechslung im Laboralltag.

Den „Isotoplern“ für ihren ganz speziellen Beitrag dazu, den Spaß am Doktoranden-Dasein nicht zu verlieren.

Den „Wagners“ für zahllose Ratschläge und die „aktive Hilfestellung“ bezüglich *LI-COR*, *ARB* und Co.

Allen Institutsangehörigen für die vielen gelungenen Festivitäten und Unternehmungen.

Den Herren Prof. Dr. Dr. B. Tümmler und Dr. I. Steinmetz mit ihren Arbeitsgruppen für eine gute und lehrreiche Kooperation.

Frau Dr. A. Hardman und Herrn Dr. P. Vandamme für eine erfolgreiche Zusammenarbeit.

Meinen Freunden und Bekannten, die für meinen zeitintensiven „Kampf mit den bösen Bakterien“ viel Verständnis aufgebracht haben.

Und sicherlich nicht zuletzt meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht auf wunderbare Art und Weise unterstützt und motiviert hat.