

***Pseudomonas chlororaphis* (pJP4) als effizienter
Rhizosphäre-Kolonisierer:
Untersuchung fitness-relevanter Faktoren und
Etablierung einer *in situ*-Detektionsmethode**

**DISSERTATION
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**vorgelegt von
Heike Schmidt-Eisenlohr
aus München**

im Juli 2002

1. Gutachter: Privatdozent Dr. C. Baron

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.02

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Konkurrenzfähigkeit von Rhizosphäre-Kolonisierern | 1 |
| 1.2 | „Quorum-Sensing“ und das GacS/GacA Zwei-Komponenten-System | 3 |
| 1.3 | Katabolische Plasmide und ihre Bedeutung für den biologischen Schadstoffabbau | 6 |
| 1.4 | Relevanz nicht kultivierbarer Bodenmikroorganismen | 8 |
| 1.5 | „Biomonitoring“ plasmid-tragender Zellen durch Detektion der Komponenten von Typ IV-Sekretionssystemen | 9 |
| 1.6 | Aufgabenstellung | 10 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 11 |
| 2.1 | Verwendete Materialien | 11 |
| 2.1.1 | Bakterien | 11 |
| 2.1.2 | Pflanzen | 12 |
| 2.1.3 | Plasmide | 13 |
| 2.1.4 | Oligonukleotide | 14 |
| 2.1.5 | Sonden | 15 |
| 2.2 | Nährmedien und Supplemente und Antibiotika | 15 |
| 2.2.1 | Nährmedien | 15 |
| 2.2.2 | Supplemente und Antibiotika | 16 |
| 2.3 | Anzucht von Organismen | 16 |
| 2.3.1 | Kultur von Bakterien | 16 |
| 2.3.2 | Keimung von <i>A. thaliana</i> in mit <i>Pseudomonas spp.</i> inokulierten Mikrokosmen | 17 |
| 2.4 | Physiologische Methoden | 17 |
| 2.4.1 | Quantitative Analyse der Homoserinlaktone-Produktion | 17 |
| 2.4.2 | Semi-quantitative Analyse der antagonistischen Aktivität | 18 |
| 2.4.3 | Analyse der Protease-Aktivität | 18 |
| 2.5 | Molekularbiologische Methoden | 19 |
| 2.5.1 | Isolierung von Nukleinsäuren | 19 |
| 2.5.1.1 | Isolierung von Plasmid-DNA | 19 |
| 2.5.1.2 | Isolierung von chromosomaler DNA | 19 |
| 2.5.1.3 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 19 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.5.2 | Transformation von <i>E. coli</i> | 19 |
| 2.5.3 | Enzymatische Methoden zur Manipulation von DNA | 20 |
| 2.5.3.1 | Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion | 20 |
| 2.5.3.2 | Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA | 20 |
| 2.5.4 | Sequenzierung von DNA | 20 |
| 2.5.5 | Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung | 21 |
| 2.6 | Photometrische Methoden | 21 |
| 2.6.1 | Bestimmung der optischen Dichte | 21 |
| 2.6.2 | Analyse von Absorptionsspektren | 21 |
| 2.6.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 22 |
| 2.7 | Elektrophoretische Trennmethode | 22 |
| 2.7.1 | Elektrophorese von DNA in Agarosegelen | 22 |
| 2.7.2 | Elektrophorese von Proteinen und Lipopolysaccharid (LPS) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 22 |
| 2.8 | Präparative Methoden | 23 |
| 2.8.1 | Isolierung von „inclusion bodies“ für die Generierung polyklonaler Antiseren | 23 |
| 2.8.2 | Extraktion von Lipopolysaccharid | 24 |
| 2.8.3 | Isolierung von exponierten Molekülen auf der Zelloberfläche | 24 |
| 2.8.4 | Präparation von Membranen mit anschließender Separation von innerer und äußerer Membran | 25 |
| 2.8.5 | Präparation von Mikroorganismen aus der Rhizosphäre von <i>A. thaliana</i> | 25 |
| 2.9 | Immunologische Methoden | 27 |
| 2.9.1 | Immunblot-Analysen | 27 |
| 2.9.2 | Affinitätsreinigung von Antiseren | 27 |
| 2.9.3 | Immunfluoreszenz-Analysen | 27 |
| 2.10 | Chromatographische Methoden | 28 |
| 2.10.1 | Dünnschicht-Chromatographie | 28 |
| 2.10.2 | Gelfiltrations-Chromatographie | 28 |
| 2.11 | Fluoreszenzmikroskopie | 29 |
| 2.12 | Datenverarbeitung | 29 |
| 2.13 | Statistische Methoden | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3 | ERGEBNISSE | 31 |
| 3.1 | Charakterisierung von <i>P. chlororaphis</i> SPR044 und verschiedenen <i>TnMod</i>-Insertionsderivaten | 31 |
| 3.1.1 | <i>TnMod</i> -Mutagenese und Bestimmung der Insertionsstelle | 32 |
| 3.1.2 | Analyse der Homoserinlaktone-Produktion | 34 |
| 3.1.2.1 | Qualitative Zuordnung | 35 |
| 3.1.2.2 | Quantifizierung des gebildeten Butanoyl-Homoserinlaktone (BHSL) | 37 |
| 3.1.3 | Semi-quantitative Analyse der Produktion von antimikrobiellen Sekundärmetaboliten, Proteasen und Phenazinen | 38 |
| 3.1.4 | Untersuchung der Zusammensetzung des Lipopolysaccharids | 40 |
| 3.1.5 | Analyse der Kolonisierung der Rhizosphäre von <i>A. thaliana</i> | 41 |
| 3.1.6 | Koinokulation der <i>TnMod</i> -Insertionsderivate mit SPR044 in die Rhizosphäre von <i>A. thaliana</i> | 43 |
| 3.1.7 | Analyse des bakteriellen Wachstums in Flüssigkultur | 44 |
| 3.1.8 | Komplementation der Insertion im <i>gacS</i> -Gen | 46 |
| 3.1.9 | Analyse der Produktion von RpoS | 47 |
| 3.2 | Einfluss von pJP4 auf die Konkurrenzfähigkeit von <i>P. chlororaphis</i> | 49 |
| 3.2.1 | Einfluss von pJP4 auf die Kolonisierung der Rhizosphäre von <i>A. thaliana</i> | 49 |
| 3.2.2 | Koinokulations-Experimente | 51 |
| 3.2.2.1 | Koinokulation mit <i>P. aureofaciens</i> 30-84 | 52 |
| 3.2.2.2 | Koinokulation mit einer Mischung verschiedener Bakterien | 53 |
| 3.2.2.3 | Koinokulation mit <i>P. fluorescens</i> WCS417r | 54 |
| 3.2.3 | Einfluss der Acyl-HSL- und PCN-Produktion auf den Plasmidtransfer | 55 |
| 3.3 | Detektion plasmid-tragender Zellen in der Rhizosphäre | 58 |
| 3.3.1 | Identifikation oberflächen-exponierter Proteine von <i>A. tumefaciens</i> | 58 |
| 3.3.1.1 | Isolierung des T-Pilus von virulenzgen-induzierten <i>A. tumefaciens</i> -Zellen | 59 |
| 3.3.1.2 | Kofraktionierung von VirB5 und VirB2 im Saccharosegradienten | 60 |
| 3.3.2 | Untersuchung der pKM101-determinierten Pili | 62 |
| 3.3.2.1 | Zelluläre Lokalisierung von TraC in pKM101-tragenden Zellen | 62 |
| 3.3.2.2 | Analyse der pKM101-determinierten Zelloberflächenproteine mittels „Western-Blot“-Analyse | 64 |
| 3.3.2.3 | Analyse der pKM101-determinierten Zelloberflächenproteine mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie | 66 |
| 3.3.2.4 | Analyse des Molekulargewichts mittels Gelfiltrations-Chromatographie | 67 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3.3 | Analyse des Typ IV-Sekretionssystems des IncP-Plasmids pJP4 | 68 |
| 3.3.3.1 | Klonierung von <i>trbC</i> , <i>trbF</i> und <i>trbH</i> | 69 |
| 3.3.3.2 | Reinigung von TrbC, TrbF und TrbH für die Generierung polyklonaler Antiseren | 70 |
| 3.3.3.3 | Lokalisierung von TrbC, TrbF und TrbH in der Zelle | 71 |
| 3.3.3.4 | Analyse der pJP4-determinierten Zelloberflächenstrukturen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie | 72 |
| 3.3.4 | Immunfluoreszenz-Färbung zum „Biomonitoring“ plasmid-tragender Zellen in der Rhizosphäre | 73 |
| 3.3.4.1 | Immunfluoreszenz-Analyse zur Detektion plasmid-tragender Zellen | 74 |
| 3.3.4.2 | Untersuchungen zur Spezifität der eingesetzten Antiseren | 75 |
| 3.3.4.3 | Isolierung der Zellen aus der Rhizosphäre zur mikroskopischen Untersuchung | 78 |
| 3.4 | „Biomonitoring“ von Plasmidtransfer in der Rhizosphäre von <i>A. thaliana</i> | 80 |
| 3.4.1 | Herstellung einer <i>P. chlororaphis</i> -spezifischen Sonde | 80 |
| 3.4.2 | Untersuchung der Spezifität der SPR044-spezifischen Sonde | 81 |
| 3.4.3 | Detektion von Plasmidtransfer in der Rhizosphäre | 81 |
| 3.4.4 | Quantitativer Vergleich der kultivierungs-abhängigen und -unabhängigen Methode | 83 |
| 4 | DISKUSSION | 85 |
| 4.1 | Kolonisierungs- und Konkurrenzfähigkeit von <i>P. chlororaphis</i> | 85 |
| 4.1.1 | Charakterisierung von <i>P. chlororaphis</i> SPR044 und seinen TnMod-Insertionsderivaten | 85 |
| 4.1.2 | Einfluss von Acyl-HSL- und PCN-Produktion auf die Kolonisierungseffizienz von <i>P. chlororaphis</i> SPR044 | 87 |
| 4.1.3 | Einfluss von Acyl-HSL- und PCN-Produktion auf die Frequenz des Plasmidtransfers | 90 |
| 4.1.4 | Auswirkung von pJP4 auf die ökologische Fitness von SPR044 | 90 |
| 4.2 | Kultivierungs-unabhängige Detektion plasmid-tragender Zellen in der Rhizosphäre | 92 |
| 4.2.1 | Identifikation von VirB5 als Komponente des <i>Agrobacterium</i> T-Pilus | 93 |
| 4.2.2 | „Biomonitoring“ plasmid-tragender Zellen durch Detektion von Typ IV-Sekretionssystemen | 94 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.2.3 | Kultivierungs-unabhängige Detektion des Plasmidtransfers in der Rhizosphäre | 96 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 98 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 100 |

Verwendete Abkürzungen

| | |
|--------------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| Acyl-HSL | Acyliertes Homoserinlaktone |
| AS | Acetosyringon |
| BHSL | Butanoyl-Homoserinlaktone |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinder-Serumalbumin (<i>engl.</i> : „bovine serum albumin“) |
| Carb ^r | Resistenz gegenüber Carbenicillin |
| 3-CBA ⁺ | Enzyme zum Abbau von 3-Chlorbenzoat vorhanden |
| CFU | Kolonie-bildende Einheiten (<i>engl.</i> : „colony forming units“) |
| Cm ^r | Resistenz gegenüber Chloramphenicol |
| Cyc ^r | Resistenz gegenüber Cycloheximid |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiaminetetraessigsäure |
| Erm ^r | Resistenz gegenüber Erythromycin |
| FISH | Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung |
| Gac | G lobaler A ctivator der A ntibiotika- und C yanidbildung |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GVO | Genetisch veränderter Organismus |
| HgCl ₂ ^r | Resistenz gegenüber Quecksilberchlorid |
| H ₆ - | Hexahistidyl-Fusionsprotein |
| HHSL | Hexanoyl-Homoserinlaktone |
| IPTG | Isopropyl-β-Thiogalactosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| Kan ^r | Resistenz gegenüber Kanamycin |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MES | Morpholinethansulfonsäure |
| NTP | Nukleosid-5'-triphosphat |
| OD _x | Optische Dichte bei x nm |

| | |
|------------------|---|
| OHSL | Octanoyl-Homoserinlaktone |
| <i>P.</i> | <i>Pseudomonas</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PCA | Phenazin-1-Carboxylat |
| PCN | Phenazin-1-Carboxamid |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| Phz | Phenazinproduktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| psi | pounds/inch ² |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| <i>R.</i> | <i>Ralstonia</i> |
| Rif ^r | Resistenz gegenüber Rifampicin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Spc ^r | Resistenz gegenüber Spectinomycin |
| Str ^r | Resistenz gegenüber Streptomycin |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Tris-gepufferte Saline |
| TCA | Trichloressigsäure |
| Tet ^r | Resistenz gegenüber Tetracyclin |
| Tfd ⁺ | Enzyme zum Abbau von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure vorhanden |
| Tm ^r | Resistenz gegenüber Trimetoprim |
| <i>trc</i> | Tryptophan-Lactose-Promotor-Fusion |
| Tris | N,N,N-Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| Trx | Thioredoxin |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| Vol | Volumenanteil |
| X-Gal | 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-Galaktopyranosid |
| 2,4-D | 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure |

Bisherige Publikationen aus der Arbeit

Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N. und Baron, C. (1999). TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and high molecular weight structures in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 5563-5571

Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P. und Baron, C. (1999). Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T-pilus of *A. tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **181**: 7485-7492

Alvarez-Martinez, M.-T., Machold, J., Weise, C., Schmidt-Eisenlohr, H., Baron, C. und Rouot, B. (2001). The *Brucella suis* homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence operon *chvE* is essential for sugar utilization but not for survival in macrophages. *J. Bacteriol.* **183**: 5343-5351

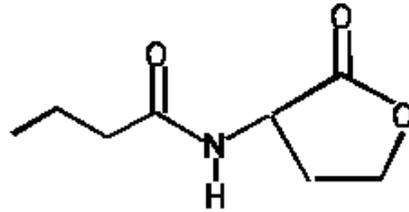
Schmidt-Eisenlohr, H., Preithner, S., Rittig, M. und Baron, C. (2001). Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis*. *Environ. Microbiol.* **3**: 720-730

Eingereichte Manuskripte

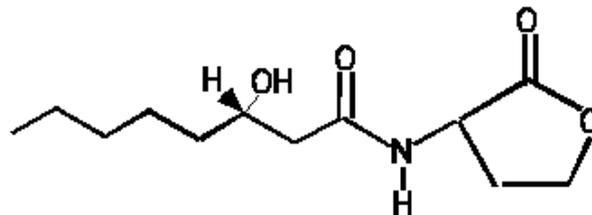
Schmidt-Eisenlohr, H., Gast, A. und Baron, C. (2002). Inactivation of *gacS* does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* strain SPR044 in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere.

Schmidt-Eisenlohr, H. und Baron, C. (2002). The competitiveness of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* is reduced in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere.

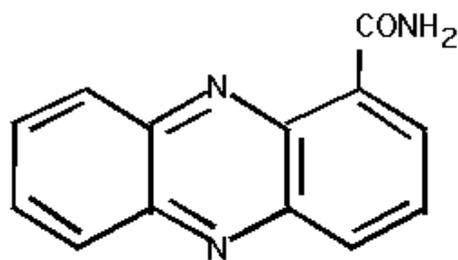
Relevante Strukturformeln



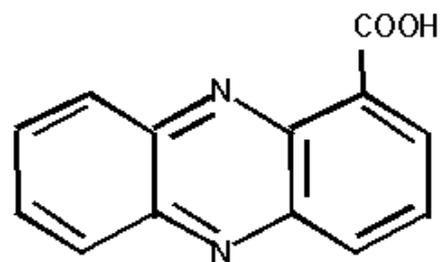
Butanoyl-Homoserinlaktone (BHSL)



N-(3-Hydroxy-Octanoyl)-L-Homoserinlaktone (3-OH-OHSL)



Phenazin-1-Carboxamid (PCN)



Phenazin-1-Carboxylsäure (PCA)

1 EINLEITUNG

Aufgrund intensiver industrieller und landwirtschaftlicher Nutzung und verstärktem Einsatz chemischer Pestizide, Dünger und Pflanzenschutzmittel sind viele Böden stark mit schwer abbaubaren Xenobiotika kontaminiert. Die diversen mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Boden sind in der Lage, die verschiedensten organischen Komponenten zu metabolisieren (Ghosal *et al.* 1985; Ramos *et al.*, 1994). Dennoch überdauern bisweilen synthetische organische Komponenten sehr lange in der Umwelt, obwohl sie biologisch abbaubar sind. Gründe hierfür können sein, dass die benötigten katabolischen Fähigkeiten im Habitat nicht vorhanden sind, oder dass die sie tragende Population zu klein oder physiologisch nicht aktiv genug ist.

Ein Ziel angewandter Forschung ist daher der biologische Schadstoffabbau. Die Regenerierung dieser Ökosysteme soll durch Freisetzung von Mikroorganismen erfolgen, welche entweder natürlicherweise oder nach genetischer Veränderung zum Abbau der Xenobiotika in der Lage sind. Zum einen stellt sich hierbei die Frage nach der Konkurrenzfähigkeit der ausgebrachten Mikroorganismen gegenüber der indigenen Population und den daraus resultierenden Auswirkungen auf die Stabilität des Ökosystems. Zum anderen ist mit einem Austausch genetischer Information zwischen eingebrachten und natürlich vorkommenden Mikroorganismen zu rechnen (Dejonghe *et al.* 2000; DiGiovanni *et al.* 1996). Hierdurch können die modifizierten Gene im Ökosystem überdauern, auch wenn der ausgebrachte Organismus selbst dort nicht überlebt.

1.1 Konkurrenzfähigkeit von Rhizosphäre-Kolonisierern

In natürlichen Habitaten herrscht unter den Mikroorganismen Konkurrenz um Nährstoffe, die das Überleben in verschiedenen ökologischen Nischen sichern. Die Rhizosphäre umfasst die pflanzliche Wurzel und den unmittelbar an die Wurzel anschließenden Bodenbereich. Dieser wird von der Pflanze durch die Abgabe von Exsudaten beeinflusst und stellt somit ein relativ nährstoffreiches Habitat dar. Die Wurzel-Exsudate enthalten neben Zuckern, organischen Säuren und Aminosäuren auch Wachstumsfaktoren und stellen eine reichhaltige Nahrungsquelle für Mikroorganismen dar (Curl und Truelove, 1986).

Die Kolonisierung der Pflanzenwurzel ist der erste Schritt für eine Ansiedlung ausgebrachter Bakterien im Boden. Eine Grundvoraussetzung hierfür ist, dass sich der eingebrachte Organismus gegenüber der indigenen Population im Boden durchsetzen kann. Er muss also nicht nur gut an die Rhizosphäre angepasst sein, sondern auch über selektive Vorteile gegenüber den indigenen Mikroorganismen verfügen, welche als Konkurrenten bei der Besiedlung in Frage kommen.

Verschiedene Studien wurden durchgeführt, um relevante Eigenschaften für die Kolonisierung der Rhizosphäre aufzuzeigen. Dazu wurden zum einen Bakterien gezielt in Eigenschaften verändert, die in Zusammenhang mit der Kolonisierung stehen könnten. Die Untersuchung des Einflusses dieser Mutationen auf die Kolonisierungseffizienz zeigte am Beispiel von *Pseudomonas* spp., dass die Synthese von Flagellen (de Weger *et al.*, 1987), von Aminosäuren (Simons *et al.*, 1997) sowie von O-Antigen und Lipopolysaccharid (de Weger *et al.*, 1989) essentiell ist. Zum anderen wurde ungerichtete Mutagenese durchgeführt, um Derivate mit verringerter Kolonisierungseffizienz zu isolieren. Eine genaue Untersuchung dieser Isolate zeigte, dass sich eine leicht verlängerte Generationszeit negativ auf die Besiedlungsfähigkeit auswirkt (Simons *et al.*, 1996).

Ein anderer Typ Experimente hatte zum Ziel, den Abbau von Schadstoffen im Boden durch das Ausbringen geeigneter Mikroorganismen zu fördern. Die hierfür benötigten Gene liegen oft auf extrachromosomalen zirkulären DNA-Fragmenten, den katabolischen Plasmiden. Hierbei fiel auf, dass bei Verwendung von plasmid-tragenden Bakterien bisweilen eine reduzierte Überlebensfähigkeit und geringe metabolische Aktivität des Inokulums festgestellt wurde (Lilley und Bailey, 1997; van Veen *et al.*, 1997). Diese plasmid-tragenden Bakterien erwiesen sich also gegenüber der indigenen Population als nicht konkurrenzfähig. Die mangelnde Konkurrenzfähigkeit könnte allerdings auch darauf beruhen, dass die Laborstämme unzureichend an das entsprechende Ökosystem angepasst waren (Newby *et al.*, 2000).

Eine Alternative zum Einsatz von Laborstämmen wäre die Nutzung von aus der Rhizosphäre isolierten Organismen. Diese sollten ohne lange Kultivierung im Labor in das ursprüngliche Ökosystem reintegriert werden, damit die Kolonisierungsfähigkeit erhalten bleibt. Diese Strategie wurde bislang nicht verfolgt. Ebenso wurden Untersuchungen darüber, wie sich das Einbringen eines Plasmids auf die Konkurrenzfähigkeit auswirkt bisher nur in begrenztem Umfang durchgeführt (van der Bij *et al.* 1996; Ka *et al.*, 1994.; Lilley *et al.*, 1997).

1.2 „Quorum-Sensing“ und das GacS/GacA Zwei-Komponenten-System

Viele der Eigenschaften, die für eine erfolgreiche Besiedlung der Rhizosphäre und Hemmung des Wachstums konkurrierender Mikroorganismen nötig sind, werden in Abhängigkeit von der Populationsdichte reguliert. Dieses Phänomen wird als „Quorum-Sensing“ bezeichnet (Swift *et al.*, 1996; Gray, 1997). Die Zelldichte wird mittels der Konzentration diffusibler Signalmoleküle sensiert, die von den Zellen produziert werden. Die meisten der charakterisierten Signalmoleküle sind N-acylierte Derivate von L-Homoserinlaktone (Acyl-HSLs). Sie haben einen identischen Homoserinlaktone-Rest, unterscheiden sich jedoch durch die Länge der Acyl-Seitenkette und die Substitution am C3-Atom. Bisher bekannte Signalmoleküle tragen an diesem C3-Atom entweder keine Substitution, eine Hydroxy- oder Oxogruppe, welche für die Spezifität des Signals verantwortlich ist (Zhu *et al.*, 1998). Erstmals wurde das Prinzip der Autoinduktion bei der Regulation der Biolumineszenz des marinen Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* beschrieben (Nealson *et al.*, 1970). Die Acyl-HSL-Synthase LuxI bildet aus dem Metaboliten S-Adenosylmethionin mit Hilfe eines acylierten Trägerproteins ein Acyl-HSL. Dieses diffundiert frei aus der Zelle und häuft sich in Abhängigkeit von der Zelldichte im umgebenden Milieu an. Ab einem bestimmten Schwellenwert, der einer bestimmten Populationsdichte entspricht, interagieren die Signalmoleküle produktiv mit dem Transkriptionsfaktor LuxR, der daraufhin die Expression verschiedener Gene einleitet. In der Folge wurden bei einer großen Zahl Gram-negativer Bakterien, insbesondere auch bei mit Pflanzen assoziierten Pseudomonaden, Gene gefunden, die Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit zu LuxR oder LuxI kodieren. Die Regulation der zugehörigen „Quorum-Sensing“-Systeme erfolgt nach demselben Prinzip wie bei *V. fischeri*, wobei jeweils spezifische Gene entsprechend der Populationsdichte exprimiert werden. Die LasI- und LasR-Proteine von *P. aeruginosa* (Passador *et al.*, 1993) kontrollieren die Synthese von Virulenzfaktoren, während die PhzI- und PhzR-Proteine von *P. aureofaciens* die Phenazinbiosynthese regulieren (Wood und Pierson, 1996). Wie in Abb. 1 dargestellt, haben Proteine vom LuxR-Typ (R) generell eine Zwei-Domänenstruktur, wobei der in der Membran verankerte N-Terminus die Sensordomäne darstellt. Der ins Zytoplasma ragende C-Terminus ist für die Aktivierung der Transkription zuständig und weist ein DNA-bindendes „Helix-turn-Helix“-Motiv auf (Hanzelka und Greenberg, 1995). Die Bindung des Acyl-HSLs führt sehr wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung, die die Blockade der DNA-Binderegion im C-Terminus aufhebt (Choi und Greenberg, 1991). Somit kommt es zur Dimerisierung und Bindung von LuxR an eine 20 bp lange palindromische DNA-Sequenz. Dies führt zur

Induktion der „Quorum-Sensing“ kontrollierten Gene, sowie zu einer Verstärkung der Expression von *luxI*, der Produktion von Acyl-HSLs und in der Folge der „Quorum-Sensing“-Kaskade.

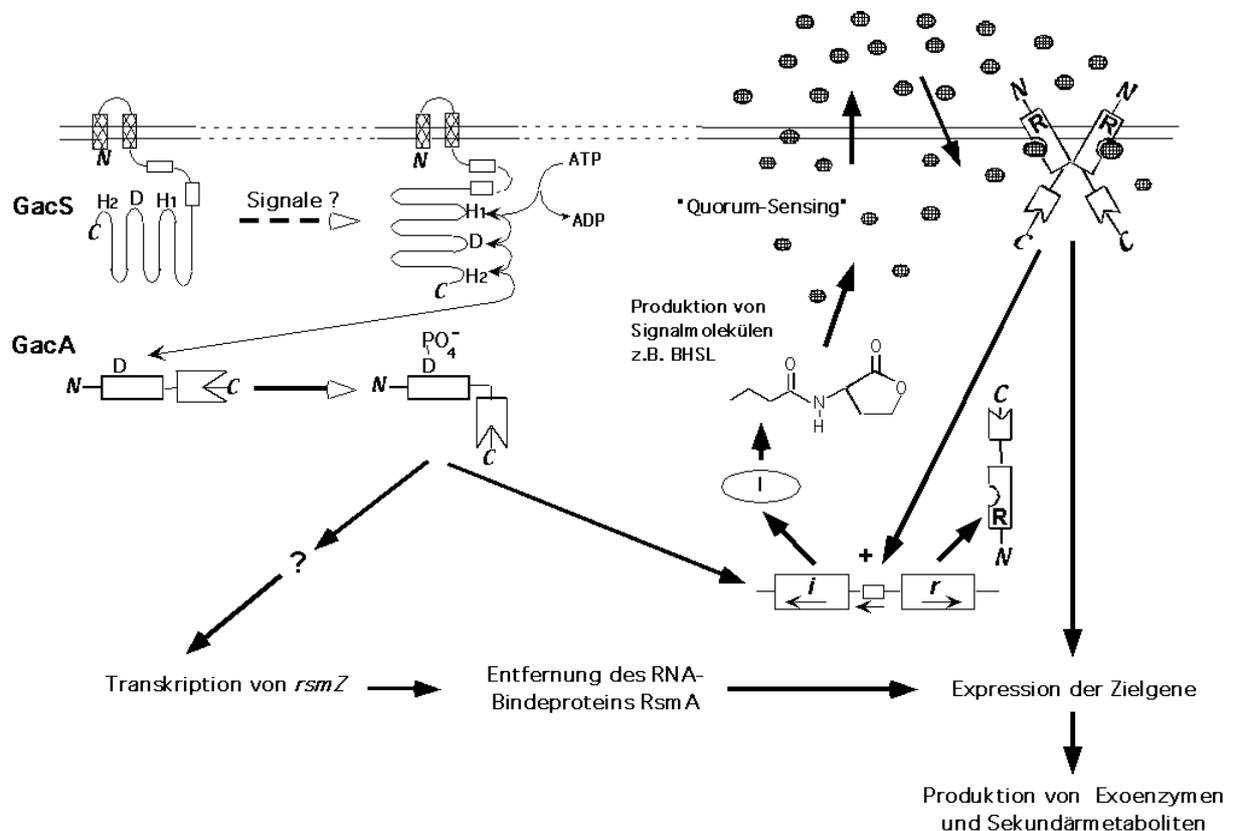


Abbildung 1: Schematische Darstellung des regulatorischen Netzwerks der Produktion von Exoprodukten in Acyl-HSL-produzierenden Pseudomonaden (nach Fuqua *et al.* 1994, Swift. *et al.* 1996 und Heeb *et al.* 2002). GacS reagiert auf ein bislang unbekanntes Signal mit Autophosphorylierung und Übertragung der Phosphatgruppe auf GacA. GacA stimuliert zum einen die Transkription eines für ein vom LuxI-Typ-Protein (I) kodierenden Gens was zur Produktion von Acyl-HSLs und der Transkription der abhängigen Gene führt. Zum anderen bewirkt GacA eine Acyl-HSL-unabhängige Aktivierung der Zielgene auf post-transkriptionaler Ebene.

Die Regulation der bakteriellen Genexpression in Abhängigkeit von externen Umweltbedingungen wird darüber hinaus oft durch Zwei-Komponenten Signal-Transduktionssysteme bewirkt (Chancey *et al.*, 1999). Diese erlauben dem Organismus die Sensierung unterschiedlicher Bedingungen und erleichtern die Besiedlung verschiedener ökologischer Nischen. Zwei-Komponenten-Systeme bestehen aus einer Sensorkinase und einem zytoplasmatischen Regulatorprotein. Als Antwort auf ein spezifisches Signal aus der Umwelt ist die Sensorkinase in der Lage, sich selbst zu phosphorylieren. Durch den Transfer des

Phosphats auf das zytoplasmatische Regulatorprotein wird dieses aktiviert und stimuliert die Transkription bestimmter Gene. Ein Zwei-Komponenten-System, das häufig in mit Pflanzen assoziierten Pseudomonaden vorkommt, ist das GacS/GacA-System. Die Sensorkinase GacS, wurde erstmals in *P. syringae* pv. *syringae* als essentieller Faktor für von diesem Organismus verursachte Schäden an Bohnenblättern beschrieben. Mutation des *gacS*-Gens führte zu einem Verlust der Virulenz und zur Reduktion der Überlebensfähigkeit in natürlichen Ökosystemen (Hrabak und Willis, 1992). Der zytoplasmatische Regulator GacA wurde erstmalig im Biokontroll-Organismus *P. fluorescens* CHA0 als **g**lobaler **A**ctivator der **A**ntibiotika- und Cyanidbildung beschrieben (Laville *et al.*, 1992). GacA ist für die fungizide Wirkung und die Kolonisierungseffizienz des Stamms notwendig. Mehr als 20 GacS- und GacA-Homologe wurden seither in einer großen Vielzahl anderer Gram-negativer Bakterien (*Enterobacteriaceae*, fluoreszierende Pseudomonaden und *Vibrio*) charakterisiert (Hrabak und Willis, 1992; Wong *et al.*, 1998; Altier *et al.*, 2000). Bei den die Rhizosphäre besiedelnden Pseudomonaden reguliert das GacS/GacA-System die Expression von Genen, die für die Synthese von Sekundärmetaboliten wie 2,4-Diacetylphloroglucinol, Pyoluteorin, Pyrrolnitrin, Hydrogencyanid und Phenazinen verantwortlich sind (Laville *et al.*, 1992). Darüber hinaus wird die Produktion von sekretierten Enzymen wie Protease, Phospholipase C und Chitinase reguliert (Corbell und Loper, 1995). Die Sensorkinase GacS trägt eine Phosphorylübertragungs-, eine Empfänger- und eine Histidin-Phosphotransfer-Domäne. Der die Sensierung vermittelnde N-terminale Bereich besteht aus zwei Transmembran-Regionen, welche durch eine periplasmatische Schleife getrennt werden (Heeb und Haas, 2001). An die zweite Transmembran-Region grenzen zwei amphipatische Sequenzen einer Bindedomäne an. Diese vermittelt Dimerisierung, wenn ein Umweltsignal die Aktivierung des Proteins hervorruft, woraus eine Konformationsänderung des C-terminalen Bereichs resultiert (Pernesting *et al.*, 2001). Dies führt zur Autophosphorylierung des konservierten Histidins in der Phosphoryl-Übertragungsdomäne. Die Phosphatgruppe wird sodann auf einen Aspartatrest in der Empfängerdomäne und schließlich auf einen Histidinrest am C-Terminus der Histidin-Phosphotransfer-Domäne von GacS übertragen. Diese überträgt den Phosphatrest auf ein konserviertes Aspartat des Regulators GacA. GacA enthält ein „Helix-turn-Helix“-Motiv, interagiert jedoch nicht direkt mit dem Promotor der von ihm kontrollierten Gene. Die Bindestelle von GacA ist bisher unbekannt (Blumer und Haas, 2000), aber GacA ist für die Transkription des *rsmZ*-Gens notwendig, welches für eine regulatorische RNA kodiert. Diese löst das RNA-Bindeprotein RsmA von den Shine-Dalgarno Sequenzen der mRNAs GacA-regulierter Gene ab, deren Expression in der Folge aktiviert wird (Heeb *et al.*, 2002).

Die Aktivität des GacS/GacA Zweikomponenten-Systems ist niedrig, wenn die Zellen ihre metabolische Energie für exponentielles Wachstum verwenden und die Zelldichte gering ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass das GacS/GacA-System und das „Quorum-Sensing“-System nicht unabhängig voneinander wirken, sondern dass beide Komponenten eines regulatorischen Netzwerks sind. Bei *P. aeruginosa*, *P. syringae* und *P. aureofaciens* reguliert das GacS/GacA-System die Synthese von Acyl-HSLs (Chancey *et al.*, 1999). GacA-abhängige Synthese von Sekundärmetaboliten wird also einerseits über die Stimulation der Produktion von Acyl-HSLs und andererseits auf posttranskriptionaler Ebene reguliert (Pessi und Haas, 2001).

Aufgrund der großen Verbreitung der Produktion von Acyl-HSLs unter Rhizosphäre-Kolonisierern ist stets mit einer signifikanten Menge dieser Signalmoleküle zu rechnen. Somit ist es von großer Bedeutung, deren Einfluss auf den eingebrachten Organismus sowie auf die Transferfrequenz des von ihm getragenen Plasmids zu kennen.

1.3 Katabolische Plasmide und ihre Bedeutung für den biologischen Schadstoffabbau

Die für die Enzyme des Xenobiotika-Abbaus kodierenden Gene liegen meist auf katabolischen Plasmiden, die sich in andere Organismen übertragen können. Das hinsichtlich seiner katabolischen Gene am besten untersuchte Plasmid ist pJP4 von *Ralstonia eutropha* JMP134. Es trägt das für den konjugativen Transfer verantwortliche *trb*-Operon und Quecksilber-Resistenzdeterminanten. Darüber hinaus kodieren dort Gene für Proteine, die die Degradation von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), 2-Methyl-4-Chlorphenoxyessigsäure und 3-Chlorbenzoat ermöglichen (Abb. 2, Don und Pemberton, 1985). Bei 2,4-D handelt es sich um einen chlorierten Aromaten, welcher aufgrund seiner Wirksamkeit als Auxin-Analog als Herbizid gegen dikotyledone Unkräuter verwendet wird. Das Plasmid pJP4 ist ca. 80 kb groß und hat einen weiten Wirtsbereich, so dass es in verschiedensten Gattungen Gram-negativer Bakterien replizieren kann (Don und Pemberton, 1981). Plasmide werden in sogenannte Inkompatibilitätsgruppen eingeteilt, weil sie bei gleichzeitiger Anwesenheit eines nahe verwandten Plasmids in ein und demselben Organismus nicht repliziert werden können. pJP4 gehört zur IncP β -Gruppe (Kittell und Helinski, 1993).

Bereits 1984 wurde mittels Transposon-Mutagenese und Restriktionsanalyse eine physikalische Karte erstellt (Don und Pemberton, 1985). Später wurde der Stoffwechselweg

des 2,4-D-Abbaus aufgeklärt. 2,4-D wird durch die von *tfdA* kodierte 2,4-D-Monooxygenase zu 2,4-Dichlorphenol abgebaut, welches dann durch die von *tfdB* kodierte Hydroxylase in das zentrale Intermediat Dichlorcatechol umgewandelt wird. Dies wird durch die Produkte der vom *tfdDCEF*-Operon kodierten Gene mittels Orthospaltung zu 2-Chlormaleylacetat umgewandelt und anschließend unter Mitwirkung der chromosomal kodierten Maleylacetat-Reduktase zu Succinat und Acetyl-CoA konvertiert (Don *et al.*, 1985; Perkins *et al.*, 1990).

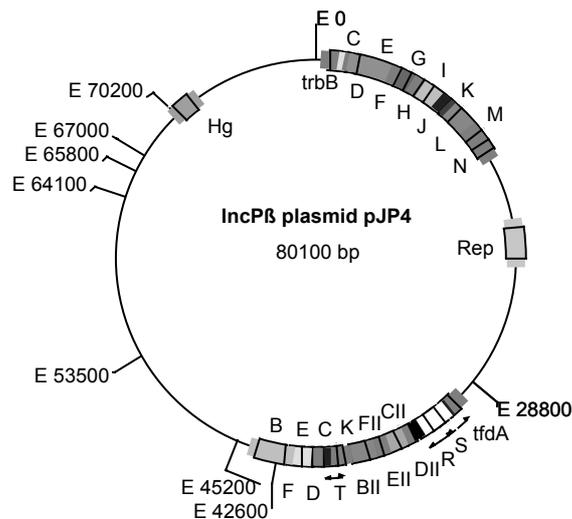


Abbildung 2: Physikalische Karte von pJP4. Die Anordnung der für die Arbeit relevanten Gene basiert auf der Restriktionskartierung von Don *et al.* 1985, die exemplarisch durch die Schnittstellen der Restriktionsendonuklease *EcoRI* (E) unter Angabe der Lokalisierung (bp) angedeutet ist. Gezeigt sind die Lage des für Plasmidtransfer verantwortlichen *trb*-Operons, des für den 2,4-D Abbau nötigen *tfd*-Operons sowie der Quecksilber-Resistenzdeterminanten (Hg) und des Replikationsursprungs (Rep).

Nach der Freisetzung von Mikroorganismen erfolgt unter Einwirkung von Selektion eine Propagierung derjenigen Eigenschaften, die unter den jeweilig herrschenden Bedingungen für den Mikroorganismus von Vorteil sind. Da das Tragen eines Plasmids auch eine zusätzliche metabolische Last für den Organismus bedeutet, kann seine Verbreitung innerhalb einer Population als eine Abwägung zwischen Kosten und Nutzen gesehen werden. Bei Vorhandensein des Herbizids 2,4-D im Boden steht für *R. eutropha* pJP4 und andere Organismen mit einer chromosomal kodierten Maleylacetatreduktase eine zusätzliche C-Quelle zur Verfügung. Diese ist schwer abbaubar, kann aber von den konkurrierenden Organismen nicht genutzt werden. Voraussetzung für den Erfolg einer Freisetzung ist folglich eine Steuerung des Ökosystems, so dass der eingebrachte Stoffwechselweg den Mikroorganismus selektiv begünstigt. Hierzu ist eine genaue Kenntnis der Interaktionen und

der Biologie des Plasmids sowie der ökologisch relevanten biotischen und abiotischen Faktoren erforderlich, die den Plasmidtransfer beeinflussen. Da pJP4 ökologisch bedeutsam und hinsichtlich seiner katabolischen Funktionen bereits gut untersucht ist, bietet es sich als Modellplasmid für derartige Untersuchungen an.

1.4 Relevanz nicht kultivierbarer Bodenmikroorganismen

Die bisher eingesetzten Methoden zum „Biomonitoring“ plasmid-tragender Stämme in natürlichen Ökosystemen basieren weitgehend auf Plattierung und Selektion der plasmid-tragenden Stämme durch Antibiotikazugabe. Bei der Analyse spezieller Faktoren in gnotobiotischen Systemen ermöglicht dieser Ansatz zweifellos den Gewinn tieferer Einblicke in wichtige Parameter (Simons *et al.*, 1996). Überträgt man die Vorgehensweise jedoch auf natürliche Ökosysteme, so erfasst man nur den Teil der Bodenmikroorganismen, welcher unter Standardbedingungen kultivierbar ist. Dieser macht jedoch nur ca. 0,1% der Population aus. Sämtliche anaeroben, mikroaerophilen oder nicht kultivierbaren Mikroorganismen werden jedoch nicht erfasst. Ebenso werden im Fall von pJP4 alle Exkonjuganden ausgeschlossen, denen chromosomal kodierte Proteine zum vollständigen Abbau des Fremdstoffs fehlen (Newby *et al.*, 2000).

Die Methode der exogenen Plasmidisolierung ermöglichte es, Plasmide aus nicht kultivierbaren Mikroorganismen zu gewinnen und Aussagen über deren Vorkommen und evolutiven Ursprung zu machen (Smit *et al.*, 1998; van Elsas *et al.*, 1998). Eine detaillierte Analyse von Faktoren, die für ihre Verbreitung relevant sind, ist jedoch aufgrund der unbekanntem Wirtsorganismen nicht möglich. Weitere Einblicke in den Plasmidtransfer in natürlichen Ökosystemen wurden durch Fusion des für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierenden Gens hinter einen im Plasmid vorhandenen Promotor erreicht. Plasmidtransfer wurde unabhängig von der Kultivierung der Zellen durch die GFP-Produktion im Epifluoreszenzmikroskop visualisiert. Diese Methode wurde erfolgreich zur Analyse von Plasmidtransfer in Biofilmen, auf festen Oberflächen und in Klärschlamm eingesetzt (Hausner und Wuertz, 1999, Christensen *et al.*, 1996; Geisenberger *et al.*, 1999). Trotz der auf diese Weise erzielten Resultate ist auch diese Methode nur in begrenztem Maße einsatzfähig. Tombolini *et al.* berichteten über eine verringerte Biokontroll-Aktivität von *gfp*-markierten *P. chlororaphis*-Zellen auf Hafersamen (Tombolini *et al.*, 1999). Die zusätzliche metabolische Last durch Produktion des GFP könnte mit der Analyse des Plasmidtransfers in

Abhängigkeit von biotischen oder abiotischen Faktoren interferieren. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung weiterer Strategien zur Detektion von Plasmidtransfer im Boden. Diese sollten idealerweise von der Kultivierung unabhängig sein.

1.5 „Biomonitoring“ plasmid-tragender Zellen durch Detektion der Komponenten von Typ IV-Sekretionssystemen

Plasmidtransfer innerhalb bakterieller Populationen ist ein natürlicher Prozess, der durch bakterielle Konjugation erfolgt. Die Übertragung von genetischem Material durch bakterielle Konjugation erfordert direkten Zell-Zellkontakt, welcher durch die Ausbildung einer konjugations-spezifischen Multiprotein-Pore ermöglicht wird. Diese besteht aus mehreren membran-assoziierten und periplasmatischen Komponenten in einem Komplex, der die innere und äußere Membran durchspannt und vermutlich eine Brücke für die DNA-Übertragung zur Nachbarzelle bildet (Winans *et al.*, 1996). Bakterielle Konjugationssysteme, die die Verbreitung von Plasmiden mit weitem Wirtsbereich ermöglichen, werden zu den Typ IV-Sekretionssystemen gezählt (Christie und Vogel, 2000). Diese wurden ursprünglich auf der Basis von Sequenz-Ähnlichkeiten zwischen den Komponenten dreier verschiedener makromolekularer Komplexe definiert. Der erste ist das T-DNA-Transfersystem von *Agrobacterium tumefaciens*, das für die Translokation onkogener T-DNA in Pflanzenzellen erforderlich ist. Die *A. tumefaciens* VirB-Proteine haben signifikante Sequenz-Ähnlichkeiten zu denen des konjugativen Transfersystems (Tra) des IncN-Plasmids pKM101 und des Pertussis-Toxin-Sekretionssystems (Ptl) von *Bordetella pertussis* (Winans *et al.*, 1996; Christie, 1997). In den letzten Jahren wurden weitere in die DNA- und Proteintranslokation involvierte Systeme identifiziert, wobei einige mögliche Homologe zu allen 11 VirB-Proteinen besitzen. Im Gegensatz dazu scheinen andere Transfersysteme wie das des zu pJP4 nahe verwandten IncP α -Plasmids RP4, Chimären aus VirB-Protein-Homologen und Tra-Proteinen unbekanntem Ursprungs zu sein (Haase und Lanka, 1997). Typ IV-Sekretionssysteme bestehen vermutlich generell aus zwei Teilen. Durch den Paarungskanal werden DNA-Transfer-Intermediate und Proteine transferiert. Der konjugative Pilus ist vermutlich für den Kontakt mit dem Rezipienten verantwortlich. Pili konnten wiederholt auf der Oberfläche plasmid-tragender Zellen visualisiert werden (Lai und Kado, 1998). Die hohe Konserviertheit der Transferregionen sowie die exponierte Lage ihrer Komponenten in der

Zellhülle legen nahe, dass Typ IV-Sekretionssysteme für die Detektion mit Antikörperpersonen zum „Biomonitoring“ von plasmid-tragenden Stämmen geeignet sein könnten.

1.6 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war erstens die Analyse des Einflusses von „Quorum-Sensing“- und Antibiotikaproduktion auf die Konkurrenzfähigkeit von Mikroorganismen. Dies sollte anhand der Kolonisierung der Rhizosphäre von *A. thaliana* mit und ohne pJP4 untersucht werden. Zusätzlich sollte ein möglicher Einfluss dieser Faktoren auf die Transferfrequenz von pJP4 Gegenstand der Analyse sein.

Zweitens sollten von pJP4 determinierte Oberflächenproteine identifiziert werden, um gegen diese spezifische Antiseren zu generieren. Diese sollten der Entwicklung von Sonden für das „Biomonitoring“ plasmid-tragender Stämme dienen, und eine neuartige kultivierungs-unabhängige Analyse des Plasmidtransfers in der Rhizosphäre ermöglichen.

Die der Arbeit zu Grunde liegende Strategie ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

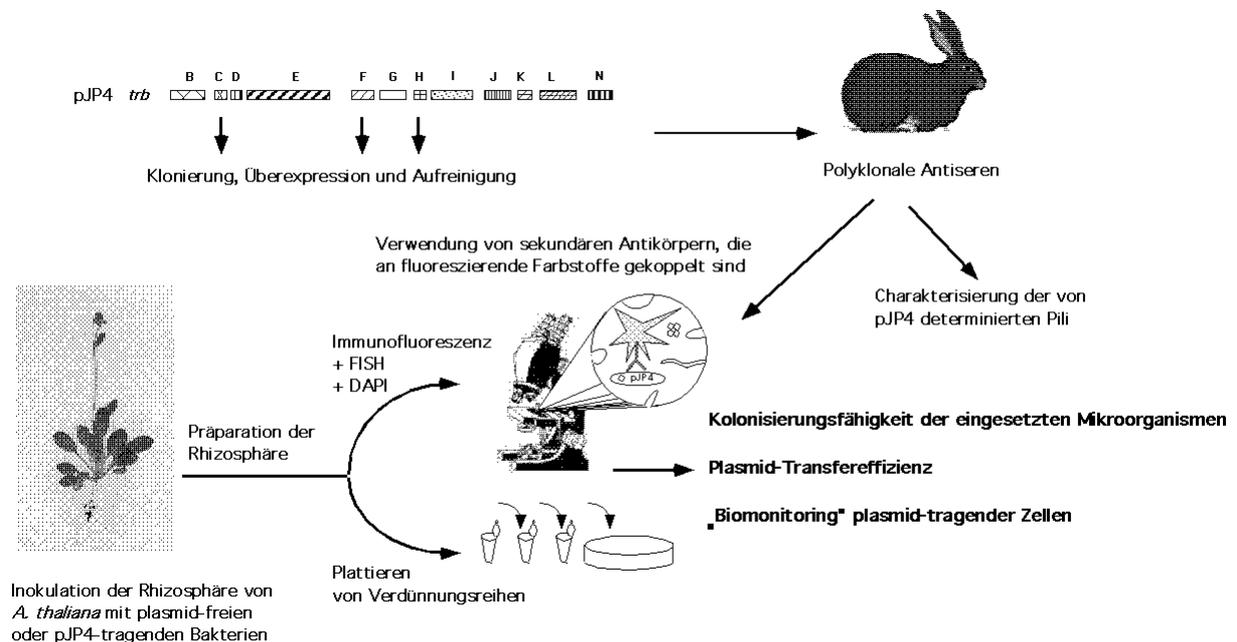


Abbildung 3: Strategie der zur Entwicklung von Sonden für das „Biomonitoring“ pJP4-tragender Zellen. Dargestellt sind die wesentlichen Schritte, welche zur Ausführung der gestellten Aufgabe durchgeführt wurden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Bakterien

Der Genotyp und die Herkunft der verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

| Stamm | Genotyp | Literatur |
|--|---|--|
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 | pTiC58 (Nopalin-Typ), virulenter Wildtyp | (van Larebeke <i>et al.</i> , 1974) |
| <i>A. tumefaciens</i> CB1006 | pTiC58 $\Delta virB6$, <i>virB6</i> -Deletionsmutante, avirulent | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 1999) |
| <i>A. tumefaciens</i> A136 | pCF218 (<i>traR</i>), pCF372 (<i>traI-lacZ</i>), Tet ^r , Spc ^r , Acyl-HSL-Detektionsstamm | (Fuqua <i>et al.</i> , 1996) |
| <i>A. tumefaciens</i> NT1REB | Rif ^r , Erm ^r , flagellenloses Derivat von C58 | (Lai und Kado, 1998) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Wildtyp | ATCC1498 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | Wildtyp | DSM50180 |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> CVO26 | <i>cviI::miniTn5</i> , Acyl-HSL ⁻ , Kan ^r | (McClellan <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>Escherichia coli</i> JM109 | F ⁺ (<i>traD36 proAB+ lacI^q lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 relA1 supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) | (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) |
| <i>E. coli</i> JE2571 | <i>leu thr fla pil</i> , Str ^r | (Bradley, 1980) |
| <i>E. coli</i> B | Wildtyp | ATCC11775 |
| <i>E. coli</i> B _{S-1} | hcr ⁻ , „rough“-Mutante | ATCC23226 |
| <i>E. coli</i> BL21 (λ DE3) | F ⁻ , <i>hsdS</i> , <i>gall</i> , λ DE3 | (Studier und Moffatt, 1986) |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | natürliches Isolat | (Schmidt-Eisenlohr und Baron 2002) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Wildtyp | DSM50071 |

| | | |
|-------------------------------------|--|--|
| <i>P. aureofaciens</i> 30-84 | Acyl-HSL ⁺ , Phz ⁺ , Biokontrollstamm | (Wood und Pierson, 1996) |
| <i>P. aureofaciens</i> 30-84I | <i>phzI::npt</i> , Acyl-HSL ⁻ , Phz ⁻ , Kan ^r , | (Wood und Pierson, 1996) |
| <i>P. chlororaphis</i> SPR044 | natürliches Isolat | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2001) |
| <i>P. chlororaphis</i> SPR144 | SPR044, <i>TnMod</i> -Insertion im Gen für eine mögliche RNA 3'-terminale Zyklase, Acyl-HSL ⁻ , PCN ⁻ , Kan ^r | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>P. chlororaphis</i> SPR244 | SPR044 <i>gacS::TnMod</i> -OKm, Acyl-HSL ⁻ , PCN ⁻ , Kan ^r | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>P. chlororaphis</i> SPR344 | SPR044, <i>TnMod</i> -Insertion im Gen für eine mögliche Glycosyltransferase, PCN ⁺⁺ , Kan ^r | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>P. chlororaphis</i> SPR544 | SPR044, <i>TnMod</i> -Insertion im Gen für einen möglichen Transkriptionsregulator; PCN ⁻ , Kan ^r | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>P. chlororaphis</i> SPR644 | SPR044, <i>htpX::TnMod</i> -OKm, PCN ⁻ , Kan ^r | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>P. chlororaphis</i> SPR744 | SPR044, <i>phzF::TnMod</i> -OKm, PCN ⁻ , Kan ^r | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>P. chlororaphis</i> SPR744 | SPR044, <i>phzF::TnMod</i> -OKm, PCN ⁻ , Kan ^r | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>P. fluorescens</i> WCS417r | Carb ^r , Cm ^r , Cyc ^r , Rif ^r , | (Pieterse <i>et al.</i> , 1998) |
| <i>P. putida</i> | Wildtyp | DSM291 |
| <i>P. stutzeri</i> | Wildtyp | DSM5190 |
| <i>P. syringae</i> | Wildtyp | DSM5176 |
| <i>Ralstonia eutropha</i> | Wildtyp | DSM5450 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | natürliches Isolat | (Schmidt-Eisenlohr und Baron 2002) |

2.1.2 Pflanzen

Es wurde mit *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia* (Lehle Seeds) gearbeitet.

2.1.3 Plasmide

Tab. 2 zeigt die für diese Arbeit relevanten Plasmide.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Genotyp | Literatur |
|--------------------------------|--|--|
| pJP4 | konjugierbares IncP β -Plasmid, 3-CBA ⁺ , Tfd ⁺ , HgCl ₂ ^r | (Don und Pemberton, 1981) |
| R751 | konjugierbares IncP β -Plasmid, Tm ^r | (Thorsted <i>et al.</i> , 1998) |
| RP4 | konjugierbares IncP α -Plasmid, Carb ^r , Kan ^r | (Pansegrau <i>et al.</i> , 1994) |
| R388 | konjugierbares IncW-Plasmid, Tm ^r | (Datta und Hedges, 1972) |
| pKM101 | konjugierbares IncN-Plasmid, Carb ^r | (Langer und Walker, 1981) |
| pKM101 <i>traM</i> | Carb ^r , Kan ^r , pKM101 <i>traM</i> 363::Tn <i>phoA</i> | (Winans und Walker, 1985) |
| pKM101 <i>traB</i> | Carb ^r , Kan ^r , pKM101 <i>traB</i> 1100::Tn5 | (Winans und Walker, 1985) |
| pKM101 <i>traC</i> | Carb ^r , Kan ^r , pKM101 <i>traC</i> 1134::Tn5 | (Winans und Walker, 1985) |
| pKM101 <i>eex</i> | Carb ^r , Kan ^r , pKM101 <i>eex</i> 1232::Tn5 | (Winans und Walker, 1985) |
| pKM101 <i>traD</i> | Carb ^r , Kan ^r , pKM101 <i>traD</i> 1141::Tn5 | (Winans und Walker, 1985) |
| pKM101 <i>traE</i> | Carb ^r , Kan ^r , pKM101 <i>traE</i> 1228::Tn5 | (Winans und Walker, 1985) |
| pT7-7 | Carb ^r , Expressionssystem unter Kontrolle des T7-Promotors | (Tabor und Richardson, 1985) |
| pT7-7 _{NcoI} | Carb ^r , pT7-7 mit einer <i>NcoI</i> - statt der <i>NdeI</i> -Schnittstelle | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2001) |
| pT7-H ₆ TrxFus | Carb ^r , Thioredoxin-Fusionsplasmid unter Kontrolle des T7-Promotors | (Kromayer <i>et al.</i> , 1996) |
| pT7-7 _{NcoI} TrbF | pT7-7 _{NcoI} , <i>trbF</i> PCR-Fragment hinter den T7-Promotor kloniert | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2001) |
| pT7-H ₆ TrxTrbCcore | pT7-H ₆ TrxFus, <i>trbC</i> core PCR-Fragment an <i>trxA</i> fusioniert | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2001) |
| pT7-H ₆ TrxTrbH | pT7-H ₆ TrxFus, <i>trbH</i> PCR-Fragment an <i>trxA</i> fusioniert | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2001) |
| pJK270 | pTiC58 <i>traC</i> ::Tn5, Kan ^r | (Kao <i>et al.</i> , 1982) |
| pTrc300 | pVS1-Replikon, <i>laqI</i> ^r , Str ^r , Spc ^r , <i>trc</i> -Promotor | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| pTrc300-GacS | pTrc300, <i>gacS</i> | (Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2002) |
| pTnMod-Okm | OriR, TnMod-Überträgerplasmid, Kan ^r | (Dennis und Zylstra, 1998) |

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 3 zusammengefasst, wobei die Schnittstellen für Restriktionsenzyme durch Fettdruck gekennzeichnet sind.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

| Name | Sequenz |
|--------------|---|
| TrbC 5' | 5'-GGGG ACATGTC CAGCAACCTTCCCGGCATTC-3' |
| TrbC 3' | 5'-CGGG AGTACT ACCCCGCGATGTGGCC-3' |
| TrxTrbC 5' | 5'-CACG CGGTACC CTCCGAGGGCACCGGC-3' |
| TrxTrbC 3' | 5'-CGAT GTCGAC GCCACGGCCGAAGAAC-3' |
| TrbF 5' | 5'-GGGG ACATGT CCATCGCCGACACCCTCAAG-3' |
| TrbF 3' | 5'-GCC AGTACT ATTGGATGCGGGACCA-3' |
| TrbH 5' | 5'-GGGG CCATGGG CAAGATCGTCTCTC-3' |
| TrbH 3' | 5'-GCC AGTACT ACTCCTTGCGCACCCAG-3' |
| TrxTrbH 5' | 5'-CGG CGGTACC CATGCGCAAGCTCGTCTCTCT-3' |
| TrxTrbH 3' | 5'-CCGG GTCGACT CACTCCTTGCGCACCCAG-3' |
| pT7-7 3' | 5'-GCCCC ATGGT TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAT-3' |
| pT7-7 5' | 5'-CGCCC ATGGG GCTAGAATTTTCGCGCCCG-3' |
| GacS-SacI 5' | 5'-GGC AGAGCTC GTTAGCAGGAGAGTTGCGTGCTTAAG-3' |
| GacS 3' | 5'-GCGG GTC TAGATCAGGCGTTGATGCGGGCCT-3' |
| GacS 459 | 5'-CAACGCACCGGCAGC-3' |
| GacS 840 | 5'-GGCCAGCCGGATCAAG-3' |
| GacS 1878 | 5'-GCAACTGGCTGTGAGGG-3' |
| GacS 2422 | 5'-GCCATTGCCGGACGG-3' |
| Ori 3'- Seq | 5'-CCCGAGCTCTTAATTAATTTAAATC-3' |
| Ori 5'- Seq | 5'-GCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCC-3' |

2.1.5 Sonden

Die für Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) verwendeten Sonden sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Für FISH verwendete Sonden

| Name | Sequenz der Sonde (5'-3') | Markierung | Ziel; rRNA-Position | Quelle |
|---------|---------------------------|--------------|---------------------|-----------------------------|
| Pchl454 | GTACTTACCTAATACGT | Cy3 | 16S, 454-477 | diese Arbeit |
| Bet42a | GCCTTCCCACTTCGTTT | Cy3 | 23S, 2043-2059 | (Manz <i>et al.</i> , 1992) |
| Bet42a | GCCTTCCCACTTCGTTT | Oregon Green | 23S, 2043-2059 | (Manz <i>et al.</i> , 1992) |

2.2 Nährmedien und Supplemente und Antibiotika

2.2.1 Nährmedien

| | |
|--------------------------------------|---|
| AB: (Winans <i>et al.</i> , 1988) | 1% Glucose; 0,39% MES; 1 mM NaK-Phosphat; 1x AB-Salze pH 5,5 (20x AB-Salze: 2% NH ₄ Cl; 0,6% MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,3% KCl; 0,02% CaCl ₂ ; 0,005% FeSO ₄ x 7 H ₂ O) |
| LB: (Miller, 1972) | 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl |
| M9: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) | 1 x M9-Salze (5x M9-Salze: 4,2% Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O; 1,5% KH ₂ PO ₄ ; 0,25% NaCl; 0,5% NH ₂ Cl) 2 mM MgSO ₄ ; 0,1 mM CaCl ₂ |
| YEB: (Baron <i>et al.</i> , 1997) | 0,5 % Rinderextrakt; 0,1 % Hefeextrakt; 0,5 % Pepton; 0,5 % Saccharose; 2 mM MgSO ₄ |
| Kings B: (King <i>et al.</i> , 1954) | 2% Pepton; 1% Glycerol; 1,5% MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,15% KH ₂ PO ₄ |

Die beschriebenen Medien wurden durch Zugabe von 1,5 bzw. 2 % Agar verfestigt.

2.2.2 Supplemente und Antibiotika

Je nach Bedarf wurden den Medien zur Anzucht in Flüssigkultur oder vor Erstarren des Agars folgende Supplemente zugesetzt.

Tabelle 5: Antibiotika und Supplemente

| Supplement bzw. Antibiotikum | Endkonzentration |
|------------------------------|-----------------------------------|
| Acetosyringon | 200 μ M |
| Carbenicillin | 100 μ g/ml |
| Chloramphenicol | 13 μ g/ml bzw. 20 μ g/ml |
| Cycloheximid | 50 μ g/ml |
| Kanamycin | 50 μ g/ml bzw. 100 μ g/ml |
| Rifampicin | 150 μ g/ml |
| Spectinomycin | 50 μ g/ml bzw. 200 μ g/ml |
| Streptomycin | 50 μ g/ml bzw. 200 μ g/ml |
| Tetracyclin | 5 μ g/ml |
| Trimethoprim | 20 μ g/ml |
| Arginin | 100 μ M |
| Glukose | 0,5% |
| myo-Inosit | 0,5% |
| Xylose | 0,5% |
| 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure | 20 bis 40 μ g/ml |
| X-Gal | 100 mg/ml |
| Quecksilberchlorid | 25 μ g/ml |

2.3 Anzucht von Organismen

2.3.1 Kultur von Bakterien

E. coli-Kulturen wurden in Reagenzgläsern mit 2 ml LB-Medium oder in Erlenmeyerkolben, die mit 10% des Nennvolumens LB-Medium befüllt waren, bei 37°C unter Schütteln (Certomat®, B. Braun; Biotech International bzw. Lab-Shaker, B. Braun Melsungen; Modell Küher) inkubiert.

Zur Anzucht von Kulturen von *Pseudomonas spp.*, *C. violaceum*, *B. cepacia*, *R. eutropha* und *B. subtilis* wurde in gleicher Weise verfahren, jedoch erfolgte die Inkubation bei 26°C.

A. tumefaciens-Zellen wurden über Nacht bei 26°C in 2 ml YEB kultiviert. Die Anzucht von Tageskulturen erfolgte in AB-Minimalmedium bei 20°C im temperierten Wasserbadschüttler (New Brunswick, Modell G76) für 3 bis 5 Stunden. Zur Virulenzgeninduktion wurde 1 ml Tageskultur auf AB-Agarplatten (15 cm Durchmesser), die mit 200 µM AS versetzt waren, plattiert und für 3 Tage bei 20°C inkubiert.

2.3.2 Keimung von *A. thaliana* in mit *Pseudomonas spp.* inokulierten Mikrokosmen

Bodenmikrokosmen enthielten 100 g autoklavierte Erde (entspricht 25 g Trockengewicht, Floraton 1 Florgard) in Vitrovent-Kontainern (9,5 x 9,5 cm, Duchefa), die mit 100 ml H₂O versetzt wurden. Die Wasserzugabe diente gleichzeitig der Inokulation mit Kulturen von *Pseudomonas spp.* in der exponentiellen Wachstumsphase zu einer OD₆₀₀ von je 0,01 (Endkonzentration bezogen auf den Gesamtwassergehalt). Ca. 50 *A. thaliana*-Samen wurden nach 20-minütiger Sterilisation der Oberfläche durch Immersion in Bleichmittel (DAN Klorix, 1:10 verdünnt) und mehreren Waschschritten in sterilem H₂O gleichmäßig auf der Erdoberfläche verteilt. Zur Vernalisierung wurden die Kontainer für mindestens 2 Tage bei 4°C inkubiert. Keimung und Pflanzenwachstum erfolgten bei 20°C in einem 16-stündigen Licht und 8-stündigem Dunkelzyklus.

2.4 Physiologische Methoden

2.4.1 Quantitative Analyse der Homoserinlaktat-Produktion

Die Acyl-HSL-Produktion von *P. chlororaphis* und seinen Insertionsderivaten wurde in Platten-Diffusionstests nach Ravn *et al.* quantifiziert (Ravn *et al.*, 2001). Dazu wurde das erkaltete LB-Medium vor dem Gießen mit 10 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *P. aureofaciens* 30-84I inokuliert. Dieser Stamm weist eine Defizienz in der Acyl-HSL-Synthese auf, wodurch seine Phenazinproduktion zum Erliegen kommt. Durch Zugabe

bestimmter Acyl-HSLs kann die Phenazin-Biosynthese jedoch induziert werden, so dass der defiziente Stamm die für den Wildtyp *P. aureofaciens* 30-84 charakteristische orange Färbung annimmt. In den Agar wurden Löcher mit einem Durchmesser von 0,5 cm gestanzt und mit 100 µl zellfreiem Überstand von Kulturen befüllt, die sich nach 17-stündigem Wachstum in mit Glukose supplementiertem M9-Minimalmedium in der stationären Phase befanden. Nach 24-stündiger Inkubation bei 26°C wurde der Durchmesser des orange gefärbten Bereichs um das ausgestanzte Loch gemessen, welcher durch Diffusion des im Überstand enthaltenen Acyl-HSLs entstand. Zur quantitativen Analyse des gebildeten Acyl-HSLs wurde N-Butanoyl-DL-HSL (Sigma) als Referenzsubstanz in einer Konzentration zwischen 1 und 10.000 pmol eingesetzt.

2.4.2 Semi-quantitative Analyse der antagonistischen Aktivität

Die Analyse der antagonistischen Aktivität erfolgte nach demselben Prinzip, jedoch wurde der erkaltete Agar vor dem Gießen mit einem Vertreter der Gram-negativen Bakterien (*C. violaceum*) bzw. der Gram-positiven Bakterien (*B. subtilis*) versetzt. Der Durchmesser des sich bildenden Hemmhofs wurde nach 24 stündiger Inkubation bei 26°C bestimmt.

2.4.3 Analyse der Protease-Aktivität

Zur Bestimmung der Proteaseaktivität wurde ebenfalls das Prinzip des Platten-Diffusionstests angewendet. Allerdings wurde Magermilchagar (1% Magermilchpulver, 0,3% Hefeextrakt, 0,5% K₂HPO₄) verwendet. Der Durchmesser der entstandenen Lysehöfe wurde nach 24-stündiger Inkubation bei 26°C gemessen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

DNA von Plasmiden mit einer Größe zwischen 20 und 80 kb wurde aus 2 bis 5 ml Übernachtskultur eines plasmid-tragenden Stamms nach dem Protokoll von Holmes and Quigley gewonnen (Holmes und Quigley, 1981). Klonierungsvektoren wurden durch die Verwendung eines Jet Quick Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach Angaben des Herstellers präpariert.

2.5.1.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Chromosomale DNA wurde mit dem Quantum Prep AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Biorad) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

2.5.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurden die gewünschten Fragmente ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des Jet Quick Extraction Spin Kits (Genomed) nach Angaben des Herstellers aus der Agarose herausgelöst.

2.5.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation bei 2000 V, 800 Ω und 25 μ F (Fiedler und Wirth, 1988).

2.5.3 Enzymatische Methoden zur Manipulation von DNA

2.5.3.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion wurde nach Standardverfahren vorgegangen. Im Labor gereinigte Taq-Polymerase (S. Preithner) im kommerziellen Taq-Puffer (MBI Fermentas) kam zum Einsatz. Der 100 µl umfassende Reaktionsansatz enthielt 2 mM von jedem Desoxynukleotid, je 10 pmol der verwendeten Oligonukleotide sowie MgCl₂ entsprechend vorheriger Optimierung in einer Konzentration zwischen 1 und 1,75 mM. Die PCR wurde in einem „Gradient Thermocycler“ (Biometra) durchgeführt, wobei das Temperaturprogramm 30 Zyklen umfaßte: 94°C zur Denaturierung (30 sek), zwischen 44°C und 47 °C zur Anlagerung der Primer (2 min) und 72°C für die Extension (2 min bzw. 4 min).

2.5.3.2 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

In vitro-Techniken mit DNA (Restriktion, Ligation, Auffüllen überstehender Enden, Dephosphorylierung) wurden wie von Sambrook *et al.* beschrieben durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Enzyme und zugehörige Puffer wurden von MBI Fermentas oder New England Biolabs bezogen.

2.5.4 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden in einem Kapillar-Sequenzierapparat (ABI Prism R310 von Applied Biosystems) mit fluoreszierenden Desoxyribonukleotiden im 20 µl-Ansatz durchgeführt. Die DNA wurde hierzu in 24 µl TSR (Template Suppression Reagent; Applied Biosystems) aufgenommen.

2.5.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von Paraformaldehyd zu einer Endkonzentration von 4% für 30 min. 5 μ l Zellsuspension wurden auf mit Polylysin (Sigma) beschichtete Deckgläser aufgebracht, getrocknet und durch Einbringen in Lösungen mit aufsteigender EtOH-Konzentration (50%; 80%; 100% je 1 min) dehydriert.

Danach wurden die Proben einer Prähybridisierung in 50 μ l Hybridisierungspuffer (0,9 M NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,2; 0,1 % SDS) für 30 min bei 48°C unterzogen. Die Hybridisierung erfolgte durch Zugabe von 5 μ l Sonde (ca. 300 ng) bei 46°C über Nacht, gefolgt von einem 20-minütigen Waschschrift in Hybridisierungspuffer bei 46°C. Nach Abspülen der Hybridisierungslösung mit H₂O wurden die Deckgläser mit VALAP (Vaseline, Lanolin und Paraffin im Verhältnis 1:1:1) auf Objektträgern befestigt und mikroskopisch ausgewertet.

2.6 Photometrische Methoden

2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Dichtezunahme in Bakterienkulturen wurde turbidometrisch durch Messung der OD₆₀₀ mit einem Standardphotometer (Zeiss, Modell PMQ II) bestimmt.

2.6.2 Analyse von Absorptionsspektren

Zur Analyse der Phenazinproduktion wurde der zellfreie Überstand von *P. chlororaphis*-Kulturen, welche in LB-Medium bei 26°C bis zur stationären Phase kultiviert worden waren, zweimal mit 1 Vol Chloroform extrahiert. Nach Evaporation des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 1 ml Chloroform aufgenommen und einer Spektralanalyse (200-500 nm) in einem Beckmann DU 640-Spektralphotometer unterzogen.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford unter Verwendung von Färbekonzentrat (Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad) und 1-16 µg BSA als Standard bestimmt (Bradford, 1976). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm an einem Beckmann DU 640-Spektralphotometer gemessen.

2.7 Elektrophoretische Trennmethode

2.7.1 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen mit einer Stärke von 0,8 bis 2% Agarose, denen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde, in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,8). Zur Beschwerung wurden die Proben vor dem Auftragen mit 1/10 Vol DNA-Auftragspuffer (50% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau) versetzt. Die Abschätzung der Fragmentlängen erfolgte durch Vergleich mit den Fragmenten eines geeigneten Längenstandards.

2.7.2 Elektrophorese von Proteinen und Lipopolysaccharid (LPS) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte je nach molekularer Masse der zu analysierenden Proteine durch zwei unterschiedliche Methoden der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Proteine mit einer molekularen Masse unter 10 kDa wurden durch Tricin-SDS-PAGE (12,5% Acrylamid; Schägger und von Jagow, 1987) aufgetrennt. Solche mit einer höheren molekularen Masse wurden durch Glycin-SDS-PAGE aufgetrennt (10-12,5% Acrylamid; Laemmli, 1970). Die Proteine wurden entweder in einer Coomassie-Lösung (0,2%) angefärbt oder einer Silberfärbung unterzogen (Bloom *et al.*, 1987). Die Auftrennung von LPS erfolgte ebenfalls durch Glycin-SDS-PAGE (15% Acrylamid). Die Färbung des LPS erfolgte mit einer dafür adaptierten Variante der Silberfärbung (Tsai und Fratsch, 1982). Dabei wurde das Gel über Nacht in einer Fixierlösung bestehend aus 25% Isopropanol und

7% Essigsäure fixiert. Oxidation des LPS erfolgte in Fixierlösung mit 0,87 g Na-Perjodat. Nach dreimaligem Waschen in H₂O erfolgte eine 10-minütige Inkubation in Färbelösung (70 ml H₂O + 3,5 ml 0,4 M NaOH + 1,25 ml 20% AgNO₃). Nach dreimaligem Waschen wurde das Gel in einer vorgewärmten Entwicklerlösung (2,5% Na₂CO₃ + 30 µl 37% Formaldehyd) entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM EDTA beendet.

2.8 Präparative Methoden

2.8.1 Isolierung von „inclusion bodies“ für die Generierung polyklonaler Antiseren

Zur Überexpression der von pT7-7_{NcoI}TrbF, pT7-H₆TrxTrbC_{core} und pT7-H₆TrxTrbH kodierten Gene wurden plasmid-tragende BL21-Zellen bei 37°C in mit Carbenicillin versetztem LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Die Genexpression wurde durch Zugabe von IPTG ad 0,5 mM induziert. Nach 3 h wurden die Zellen sedimentiert, in Puffer L (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,5 mM DDT und 0,5 mM PMSF) aufgenommen und bei 13.000 psi in einer „French-Press“-Zelle (Aminco) aufgebrochen. Nach Scherung der chromosomalen DNA mit Hilfe einer 26 Gauge-Kanüle wurden die Einschlusskörper sedimentiert und dreimal in Puffer H (= Puffer L mit einem NaCl-Gehalt von 1 M) gewaschen. Nach Aufkochen in Probenpuffer wurden die „inclusion bodies“ in präparativen SDS-Gelen (12 cm x 14 cm) aufgetrennt und mittels Elektroelution bei 90 V über Nacht in einer Biotrap (Schleicher&Schüll) konzentriert. Das Eluat wurde einer Acetonfällung unterzogen, und die Proteinmenge wurde bestimmt. Polyklonale Antiseren gegen TrbF, TrbC_{core} und TrbH wurden nach dem Standardprotokoll der BioGenes GmbH (Berlin) durch Injektion von 500 µg Protein bzw. Fusionsprotein in Kaninchen gewonnen.

2.8.2 Extraktion von Lipopolysaccharid

Die Extraktion von Lipopolysaccharid wurde angelehnt an eine etablierte Methode durchgeführt (Nesper *et al.*, 2000). Dazu wurden 4 ml Übernachtskultur sedimentiert, zweimal in 2 ml TNE (10 mM Tris pH 8; 10 mM NaCl; 10 mM EDTA) gewaschen und in TNEX (TNE + 1% Triton X-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl Lysozym (5 mg/ml in H₂O) wurde für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 30 µl Proteinase K (20 mg/ml in H₂O) versetzt und 2 h bei 65°C inkubiert, um die enthaltenen Proteine zu degradieren.

2.8.3 Isolierung von exponierten Molekülen auf der Zelloberfläche

Oberflächenstrukturen wurden von den Zellen durch Scherung präpariert (Roine *et al.*, 1997). Zellen wurden mit je 10 ml Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM pH 7 für *E. coli* und pH 5,5 für *A. tumefaciens*) von 8 LB- bzw. AB-Platten (Ø 15 cm) gespült und durch 15-minütige Zentrifugation bei 10.000 Upm sedimentiert. Die durch Resuspendieren in 1/10 Vol Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM pH 7) gewonnene Bakterien-Suspension wurde zehnmal durch eine Einmalkanüle (Ø 26 Gauge) gezogen, um Oberflächenstrukturen wie Flagellen und Pili abzuscheren. Zellen wurden durch 1-stündige Zentrifugation bei 10.000 Upm und 4°C entfernt. Der Überstand wurde einer 90-minütigen Ultrazentrifugation im Beckman Ti70.1-Rotor bei 40.000 Upm unterzogen. Hierbei sedimentierten Proteine in Strukturen hoher molekularer Massen. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Sedimente von *A. tumefaciens* in 100 µl Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM pH 5,5) suspendiert über einem Saccharose-Dichtegradienten (10-70%) aufgetrennt. Der Gradient wurde in einem Sorvall AH627-Ausschwingrotor bei 23.000 Upm bei 6°C für 8 h zentrifugiert. Proben aus *E. coli* pKM101 wurden durch Gelfiltrations-Chromatographie weiter charakterisiert (2.10.2).

2.8.4 Präparation von Membranen mit anschließender Separation von innerer und äußerer Membran

Zellen von *E. coli* FM433, die pKM101 oder ein Transposon-Insertionsderivat trugen, wurden in LB-Medium bis zur späten logarithmischen Phase kultiviert. Je 1 ml Kultur wurde auf LB-Agar-Platten (\varnothing 15 cm) plattiert und 18 bis 24 h bei 26°C inkubiert. Die Zellen wurden mit je 10 ml Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM pH 7) von der Platte gespült und nach dreimaligem Waschen in 5 ml Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM pH 7) suspendiert. Dieser enthielt als Reduktionsmittel DDT (0,2 mM) sowie die Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Antipain (1 mM) und Pepstatin (1 mM). Die Zellen wurden mittels einer „French Press“-Zelle aufgebrochen, das Lysat wurde zum Abbau der Zellhülle mit 0,2 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Entfernen der Zelltrümmer durch 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde der Überstand mit KCl ad 0,2 M versetzt und einer 60-minütigen Ultrazentrifugation im Beckman Ti70.1-Rotor bei 40.000 Upm unterzogen. Das erhaltene Sediment mit den Membranen wurde in 1 ml Puffer S (5 mM EDTA; 0,2 mM DDT; 20% Saccharose) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung vollständig suspendiert. Danach wurden innere und äußere Membran durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten (3,2 ml 53% Saccharose über 1,1 ml 70% Saccharose) im Sorvall AH627-Ausschwingrotor für 15 h Zentrifugation bei 23.000 Upm aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden einer Proteinbestimmung unterzogen. Die Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität (Osborn *et al.* 1972) diente der Lokalisierung der Zytoplasmamembran.

2.8.5 Präparation von Mikroorganismen aus der Rhizosphäre von *A. thaliana*

Bei jeder Probennahme wurden zehn Pflanzen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Nicht stark anhaftende Erdpartikel wurden von den Wurzeln abgeschüttelt. Die Wurzeln wurden gewogen und in Kolben mit 10 ml PBS sowie 0,5 g Glasperlen (0,25-0,35 mm \varnothing , B. Braun Biotech International GmbH) transferiert. Durch 20-minütige Inkubation unter heftigem Schütteln wurden die Bakterien gelöst. Nach Absetzen der Glasperlen und der verbleibenden Bodenpartikel wurden 100 μ l der Suspension entnommen und in adäquater Verdünnung auf LB-Medium verteilt. Nach 48-stündiger Inkubation bei 26°C wurde die Zahl der CFU pro g Rhizosphäre auf der Basis von selektivem Wachstum und phänotypischen Kriterien ermittelt.

Zur Selektion der *TnMod*-Insertionsderivate wurden das Medium mit Kanamycin supplementiert. Im Fall von *P. fluorescens* WCS417r wurde das Medium mit Carbenicillin, Chloramphenicol, Rifampicin und Cycloheximid versetzt (Pieterse *et al.* 1998). Kolonien von *P. aureofaciens* wurden durch ihre orange Färbung unterschieden. Kolonien von *P. chlororaphis* wurden aufgrund der Bildung grüner PCN-Kristalle identifiziert, während sich Kolonien von *R. eutropha* durch einen deutlich kleineren Koloniedurchmesser und fehlende Pigmente auszeichneten. Das Vorhandensein von pJP4 wurde durch Plattierung auf HgCl₂-haltigem Medium überprüft.

Für Plasmidtransfer-Analysen wurden SPR044 und seine Derivate als Donor benutzt, und *R. eutropha* wurde als Rezipient eingesetzt. Die Selektion basierte darauf, dass SPR044 pJP4 im Gegensatz zu *R. eutropha* pJP4 nicht auf M9-Minimalmedium mit 2,4-D als C-Quelle wuchs. SPR044 wuchs jedoch gut auf M9-Minimalmedium mit 0,5% Glucose oder myo-Inosit. Somit produziert er wahrscheinlich keine Maleylacetatreduktase, die neben den von pJP4 kodierten *tfd*-Genen für den vollständigen Abbau von 2,4-D nötig ist. Dies ermöglichte Selektion der Exkonjuganden (*R. eutropha* pJP4) durch Plattierung auf M9-Minimalmedium, das mit 30 µg/ml 2,4-D versetzt war. Die erhaltenen Exkonjuganden wurden stichprobenartig durch Ausstreichen auf Selektivagar (25 µg/ml HgCl₂) auf die Funktionalität der Quecksilber-Resistenzdeterminanten hin untersucht. Zusätzlich wurde das Vorhandensein des vollständigen Plasmids in Restriktionsanalysen untersucht. Die Expression der Transferregion wurde mittels „Western-Blot“-Analyse mit TrbF-spezifischem Antiserum belegt. Die auf diesem Weg untersuchten Exkonjuganden erfüllten all diese Kriterien.

Zur Ermittlung der Zellzahlen unabhängig von der Kultivierung wurden diese durch Zugabe von Paraformaldehyd zu einer Endkonzentration von 4% (30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur) fixiert. 2 ml der Suspension wurden zur Anreicherung der enthaltenen Bakterien durch schwarze Polycarbonatfilter (0,25 µm Ø, Millipore) filtriert. Zur weiteren Analyse mittels Immunfluoreszenz-Färbung (2.9.3) oder FISH (2.5.5) wurden die Membranfilter mit der Unterseite nach oben auf mit Polylysin beschichtete Deckgläser transferiert und die Bakterien durch Rehydrierung mit 50 µl PBS von den Filtern abgespült.

2.9 Immunologische Methoden

2.9.1 Immunblot-Analysen

Proteine wurden zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im vertikalen Puffertank (Trans Blot Cell; Biorad) in Blotpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20% Methanol) auf PVDF-Membranen (Immobilon P; Millipore) transferiert. Die zu untersuchenden Proteine wurden mit Hilfe von Antiseren und einem Chemolumineszenz-Detektionssystem (NEN) detektiert.

2.9.2 Affinitätsreinigung von Antiseren

Zur Erhöhung der spezifischen Erkennung von Antigenen durch polyklonale Antiseren wurden 400 µl Rohserum mehrere Stunden in 5 ml TBS-T-Puffer mit Affinitätsstreifen (an PVDF-Membran gebundenes Antigen) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die spezifischen Antikörper unter sauren Bedingungen eluiert (Harlow und Lane, 1988).

2.9.3 Immunfluoreszenz-Analysen

Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Zellen 30 min in 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden 30 µl der Probe auf mit 0,1% Polylysin vorbehandelte Deckgläser aufgetropft und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt, und zur Permeabilisierung der Zellhülle wurden 30 µl einer 8 mg/ml Lysozym-Lösung in GET-Puffer (Addinall *et al.*, 1996) aufgetragen. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lysozymbehandlung durch Absaugen der Flüssigkeit und dreimaliges Waschen in PBS beendet. Durch 30-minütige Inkubation in 1% BSA wurden freie Protein-Bindestellen blockiert, gefolgt von der Behandlung mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Die Behandlung mit an Oregon Green-Farbstoff (Molecular Probes) gekoppeltem sekundären Antikörper erfolgte nach dreimaligem Waschen in PBS im Dunkeln bei Raumtemperatur für 3 h. Die Deckgläser wurden dreimal in PBS gewaschen und mit einer Lösung behandelt, die das Ausbleichen des

Fluoreszenzfarbstoffs verhindert (AF1, Citifluor). Die Deckgläser wurden sodann auf Objektträgern mit VALAP (Vaseline, Lanolin und Paraffin im Verhältnis 1:1:1) befestigt.

2.10 Chromatographische Methoden

2.10.1 Dünnschicht-Chromatographie

10 ml Kulturen von SPR044 und den Tn*Mod*-Insertionsderivaten wurden bis zur stationären Phase bei 26°C in LB-Medium kultiviert. Nach Sedimentation der Zellen wurden die Kulturüberstände zweimal durch 30-minütiges Schütteln mit Ethylacetat extrahiert. Nach Phasentrennung wurde das Lösungsmittel abgeblasen und der Rückstand in 50 µl Ethylacetat aufgenommen. 5-10 µl des Extraktes wurden auf 20 x 20 cm großen DC-Platten (RP18 F₂₅₄; Merck) aufgetrennt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Methanol und Wasser (60: 40, Vol/ Vol) verwendet. Nach dem Trocknen der DC-Platten wurden diese in 24 x 24 cm großen Zellkulturschalen mit 300 ml LB-Agar überschichtet, welcher zuvor mit 10 ml eines exponentiell wachsenden Indikatorstamms und ggf. mit X-Gal versetzt worden war. Als Indikator-Organismen dienten der *phzI*-negative Stamm *P. aureofaciens* 30-84I oder der eine *traI-lacZ* Fusion tragende Stamm *A. tumefaciens* A136 pCF218 pCF372.

Zur qualitativen Zuordnung des gebildeten Acyl-HSLs wurden BHSL, HHSL bzw. OHSL (Sigma) als Referenzsubstanzen in einer Menge von 500 pmol aufgetragen.

2.10.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Für die Abschätzung der Größe hochmolekularer Strukturen (Pili, 2.8.3) wurde das nach der Ultrazentrifugation erhaltene Sediment in 200 µl Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM pH 7) suspendiert und über einer Superose 6-Säule (Pharmacia) aufgetrennt. Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 0,25 ml/min mit Na-K-Phosphat-Puffer (50 mM pH 7) eluiert und in 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Diese wurden mit 7,5 µl 100%iger TCA versetzt und die Proteine über Nacht auf Eis gefällt. Die Niederschläge wurden in 12 µl Probenauftragspuffer suspendiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Eichung der Säule dienten folgende Testproteine (Roche): Ferritin (450 kDa), BSA (68 kDa) und Cytochrom c (12 kDa) in der Konzentration von je 2 mg/300 µl Gesamtvolumen.

2.11 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem Zeiss-Axioplan-Mikroskop durchgeführt, wobei zur Analyse von mit DAPI, Oregon Green oder Cy3 markierten Zellen die Zeiss Filter Sets Nr. 1 (BP 365/12; LP 397) und Nr. 9 (BP 450-490; LP 515) sowie das HQ-Filterset für Cy3, TRITC, Alexa 546 (BP 545/30; LP 610/73) von AHF-Analysentechnik benutzt wurden. Mikroskopische Bilder wurden mit Hilfe der Spot-RT-Kamera (Visitron) unter Verwendung von Spot™ (Version 3.0) sowie IPLab (Version 3.5) digitalisiert.

2.12 Datenverarbeitung

Zur Herstellung von Abbildungen wurden Chemoluminogramme und gefärbte Polyacrylamidgele im Flachbettscanner (UMAX UC480) bei einer Auflösung von 600 dpi eingelesen. Relevante Bildausschnitte wurden unter Benutzung von Power Macintosh Computern mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Adobe Photoshop 5.0 bearbeitet.

Die Suche nach Proteinen mit Ähnlichkeiten zu den von Genen mit *TnMod*-Insertion kodierten Proteinen erfolgte via Internet auf dem Server des National Institute of Health (www.ncbi.nlm.nih.gov) unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990). Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm MegAlign (Version 0.97) erstellt. Vergleiche der 16S-rRNA-Sequenzen erfolgten mit Hilfe der ribosomalen rRNA-Datenbank (rdp.cme.msu.edu).

2.13 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS10 für Macintosh. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Mit dem Levene-Test wurde die Homogenität der Varianzen ermittelt. Bei den Ergebnissen der Wachstumskurven (3.1.2.7.) waren die Daten normalverteilt und die Varianzen waren homogen. Daher wurde eine einfaktorielle ANOVA für den Vergleich zwischen den für die verschiedenen Derivate erhaltenen Mittelwerten durchgeführt. Unterschiede zwischen den Derivaten wurden mit dem Post Hoc-Test nach Bonferroni ermittelt.

Die logarithmierten Werte der CFU/g Rhizosphäre in den Kolonisierungs-Experimenten (3.1.2.5, 3.1.2.6, 3.2) und die Anzahl der Exkonjuganden in Transferexperimenten waren nicht normalverteilt. Daher wurden Vergleiche mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dieser einfache nicht parametrische Test vergleicht die Mediane (Wert über und unter dem gleich viele Fälle liegen), verschiedener Proben für jedes Derivat und jeden Zeitpunkt. Paarweise Vergleiche zwischen Wildtyp und Insertionsmutanten oder zwischen dem Prozentsatz plasmid-freier und pJP4-tragender Zellen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Der U-Test dient dem Vergleich zwischen den Ordinalwerten (Rangplätzen) von zwei relativ kleinen Gruppen. Wird der U-Test signifikant, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Mediane beider Gruppen unterscheiden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung von *P. chlororaphis* SPR044 und verschiedenen TnMod-Insertionsderivaten

Gegenwärtig werden verschiedene Strategien zur Steuerung von Ökosystemen durch das Ausbringen bestimmter Mikroorganismen verfolgt, die entweder das Pflanzenwachstum fördern oder als Biokontroll-Organismen Nutzpflanzen vor Schädlingsbefall schützen. Oft liegen jedoch nur geringe Kenntnisse des Einflusses von biotischen und abiotischen Faktoren auf die Konkurrenzfähigkeit des Inokulums gegenüber der natürlichen Bodenpopulation vor. Verschiedene Eigenschaften sind bereits bekannt, die die Konkurrenzfähigkeit ausgebrachter Mikroorganismen erhöhen, wie z.B. die Produktion antimikrobieller Metabolite (Mazzola *et al.*, 1992). Einige dieser Mechanismen werden in Abhängigkeit von der bakteriellen Zelldichte reguliert, und dieses Phänomen wird als „Quorum-Sensing“ bezeichnet. Von Wood *et al.* konnte erstmals direkt gezeigt werden, dass durch Acyl-HSLs bewirktes „Quorum-Sensing“ *in situ* an der Pflanzenwurzel erfolgt (Wood *et al.*, 1997). Eine bisher ungeklärte Frage, die sich im Zusammenhang mit der Freisetzung von Mikroorganismen stellt, ist der Einfluss von Acyl-HSLs auf die Kolonisierungseffizienz.

Das Natur-Isolat *P. chlororaphis* SPR044 wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Susanne Preithner aus der Rhizosphäre im Boden des Instituts-Innenhofs gewachsener *A. thaliana*-Pflanzen isoliert (Preithner, 2000). Dieses Bakterium wurde ursprünglich in großer Zahl aus diesem Habitat isoliert und daher als effizienter Kolonisierer eingestuft. Es wurde aufgrund der Produktion von Acyl-HSLs sowie von Phenazin-1-Carboxamid (Chlororaphin, PCN) und anderen antimikrobiellen Metaboliten für folgende Untersuchungen in der Rhizosphäre von *A. thaliana* eingesetzt.

3.1.1 TnMod-Mutagenese und Bestimmung der Insertionsstelle

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Produktion von Acyl-HSLs und PCN und der Konkurrenzfähigkeit von *P. chlororaphis* SPR044 untersuchen zu können, wurde der Stamm im Rahmen der Diplomarbeit von Astrid Gast einer Mutagenese unterzogen. Diese erfolgte durch triparentale Paarung mit dem pTnModOKm-tragenden *E. coli* Stamm JM109 und dem Helferstamm HB101 pRK600, was zur ungerichteten Insertion des TnMod-Transposons ins Chromosom des Rezipienten führte (Gast, 2001; Dennis und Zylstra 1998).

Eine phänotypische Analyse der erhaltenen Klone führte zur Identifikation dreier Klassen. Die erste Klasse enthielt zwei Isolate, die eine Defizienz in der Produktion von Acyl-HSLs aufwiesen. Dies zeigte sich dadurch, dass sie im Gegensatz zum Wildtyp die „Quorum-Sensing“-abhängige Phenazinbiosynthese des Acyl-HSL-negativen Indikatorstammes *P. aureofaciens* 30-84I nicht durch Diffusion ihrer eigenen Signalmoleküle komplementierten. Die zweite Klasse enthielt vier Isolate, die keine PCN-Produktion aufwiesen. Im Gegensatz zum Wildtyp bildeten sie nach 48-stündiger Inkubation keine grünen Kristalle an der Kolonieoberfläche. Die dritte Klasse enthielt nur ein Isolat, welches sich durch eine deutlich verstärkte Bildung grüner PCN-Kristalle auszeichnete.

Diese Derivate sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden. Dazu war es zunächst nötig, die Insertionsstelle im Chromosom zu lokalisieren. Zu diesem Zweck wurden die flankierenden Bereiche unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme in *E. coli* JM109 rekloniert. Die einzelnen Klone wurden mit Hilfe von Primern sequenziert, die sich an den beiden Enden von TnModOKm anlagern. Die aus der Sequenz der an die Insertionsstelle angrenzenden genomischen DNA abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit Sequenzen in Datenbanken verglichen. Alle Klone trugen TnModOKm in Genen, welche für Proteine mit signifikanten Ähnlichkeiten zu denen von *P. aeruginosa* PAO1 oder von verschiedenen *P. chlororaphis*-Stämmen kodieren. In Tab. 6 sind die Übereinstimmungen und die angenommenen Funktionen dieser Proteine aufgeführt.

Tabelle 6: Aus Sequenz-Ähnlichkeiten abgeleitete Identität der Gene, die nach Zufallsmutagenese von *P. chlororaphis* SPR044 eine *TnMod*-Insertion trugen.

| Stamm | Organismus | Genbank-nummer | Angenommene Funktion des Proteins | Prozentuale Identität ^a | Prozentuale Ähnlichkeit ^b |
|--------|--------------------------------|----------------|---|------------------------------------|--------------------------------------|
| SPR144 | <i>P. aeruginosa</i> | AE004872 | RNA 3'-terminale Phosphatzyklase | 75% | 88% |
| SPR244 | <i>P. chlororaphis</i> O6 | AF192795 | Zwei-Komponenten Sensorkinase GacS ^c | 98% | 99% |
| SPR344 | <i>P. aeruginosa</i> | AE004913 | Glycosyltransferase ^d | 69% | 75% |
| SPR544 | <i>P. aeruginosa</i> | AE004556 | Transkriptionsregulator | 45% | 64% |
| SPR644 | <i>P. aeruginosa</i> | AE004709 | Hitzeschockprotein HtpX | 90% | 94% |
| SPR744 | <i>P. chlororaphis</i> PCL1391 | AF195615 | Phenazinbiosynthese PhzF | 99% | 99% |
| SPR844 | <i>P. chlororaphis</i> PCL1391 | AF195615 | Phenazinbiosynthese PhzE | 100% | 100% |

^a Basierend auf der Übereinstimmung zwischen abgeleiteten Aminosäuren und der exakten Aminosäuresequenz.

^b Basierend auf der Übereinstimmung zwischen abgeleiteten Aminosäuren und ähnlichen Aminosäuregruppen.

^c Zugangsnummer der von uns bei der Genbank eingereichten Sequenz: AF517688

^d Zugangsnummer der von uns bei der Genbank eingereichten Sequenz: AF517687

Die aus dem bei SPR144 durch die *TnMod*-Insertion betroffenen Gen abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt 88% Ähnlichkeit zu einer RNA 3'-terminalen Phosphatzyklase. Derartige Enzyme katalysieren die Umwandlung des 3'-Phosphats in einen zyklischen 2'-3'-Phosphodiester am Ende von RNAs und ihre biologische Funktion ist unklar. Möglicherweise ist es in die zelluläre Prozessierung der RNA involviert (Stover *et al.*, 2000). Der Einfluss auf die Acyl-HSL-Bildung kann hieraus nicht abgeleitet werden. SPR244 trägt die *TnMod*-Insertion in dem für die Sensorkinase GacS kodierenden Gen, das aus *P. chlororaphis* O6 bereits sequenziert wurde. Die Sensorkinase GacS ist Teil des dem „Quorum-Sensing“-System übergeordneten GacA/GacS Zwei-Komponenten-Systems. Das an die Insertion angrenzende Gen in SPR344 kodiert für eine putative Glycosyltransferase. Glycosyltransferasen werden in zwei Klassen unterteilt, wobei die der ersten Klasse angehörigen Enzyme nur einen Zucker auf ein Akzeptormolekül übertragen. Die zur zweiten Klasse gehörigen Glycosyltransferasen übertragen mehrere Zuckerreste auf ein Polysaccharid, das aus sich wiederholenden Untereinheiten aufgebaut ist. Die Analysen hydrophober Regionen derartiger Proteine führten zur Identifikation von zwei konservierten Bereichen, wobei die Domäne A in allen Glycosyltransferasen konserviert ist. Die Domäne B weist ein

charakteristisches QXXRW Motiv auf und ist nur in der zweiten Klasse vorhanden (Saxena *et al.*, 1995). Da dieses charakteristische Motiv in der Glycosyltransferase von SPR044 nicht vorliegt, überträgt sie wahrscheinlich nur einen Zuckerrest und gehört somit zur Klasse I. Die aus der flankierenden Gensequenz von SPR544 abgeleitete Proteinsequenz ähnelt einem Transkriptionsregulator. Dieser zeigt 58% Ähnlichkeit und 42% Übereinstimmung zu VanR von *Acinetobacter* spp. ADP1. Für VanR wurde Ähnlichkeit zu den Proteinen aus der Familie der GntR-Repressoren gezeigt, da es einen Repressor für ein Strukturgen kodiert (Moawski *et al.*, 2000). Die *TnMod*-Insertion von SPR644 lokalisiert im *htpX*-Gen, das vermutlich für ein Hitzeschock-Protein kodiert. Dieses zeigt 64% Ähnlichkeit und 49% Übereinstimmung mit HtpX von *E. coli*, das durch Temperaturerhöhung induziert wird. *E. coli*-Zellen mit einer Unterbrechung des Gens wachsen bei 47°C wie der Wildtyp, so dass die Funktion in der Hitzeschockantwort unklar ist (Kornitzer *et al.*, 1991). Die *TnMod*-Insertion der Stämme SPR544 und SPR644 liegt also nicht innerhalb des für die Phenazin-Biosynthese verantwortlichen *phz*-Operons. Im Gegensatz dazu sind die *TnMod*-Insertionen von SPR744 und SPR844 in *phzF* und *phzE* lokalisiert. Das *phzE*-Gen kodiert für eine Anthranilat-Synthase, ist also an der Modifikation von Chorismat vor der Bildung des Phenazin-Grundgerüsts beteiligt. Das von *phzF* kodierte Genprodukt katalysiert einen späteren Schritt der Biosynthese (Mavrodi *et al.*, 1998).

3.1.2 Analyse der Homoserinlaktone-Produktion

Die Produktion von PCN und anderen antibiotisch wirksamen und möglicherweise für die Konkurrenzfähigkeit relevanten Substanzen wird häufig in Kulturen mit einer hohen Populationsdichte beobachtet. Die Regulation unterliegt daher sehr wahrscheinlich dem Mechanismus des „Quorum-Sensings“. Daher war es für die weiteren Studien wichtig, Art und Menge der von SPR044 gebildeten Acyl-HSL-Derivate zu bestimmen sowie einen möglichen Einfluss der *TnMod*-Insertion auf deren Produktion zu untersuchen.

3.1.2.1 Qualitative Zuordnung

Die Detektion von dünn-schicht-chromatographisch aufgetrennten Acyl-HSLs ermöglicht einen Einblick in das von einem Organismus produzierte Acyl-HSL-Spektrum. Acyl-HSL-Biosensor-Organismen werden je nach Spezifität und Sensitivität des eigenen „Quorum-Sensing“-Systems nur durch eine begrenzte Anzahl von Acyl-HSL-Derivaten induziert. Die dünn-schicht-chromatographische Analyse gibt somit erste Hinweise auf die Struktur der von einem zu analysierenden Organismus produzierten Acyl-HSL-Derivate, die durch die vergleichende Untersuchung von synthetischen Acyl-HSLs zugeordnet werden können. Alle Derivate besitzen einen von der Länge der Acyl-Seitenkette und der Substitution an der C3-Position abhängigen R_f -Wert. Handelt es sich um 3-Oxo-Derivate, so ist ein „Schweif“ zu beobachten, während unsubstituierte oder 3-Hydroxy-Derivate zu punktförmigen Signalen führen.

Zunächst wurde die Induzierbarkeit von Acyl-HSL-Biosensorstämmen durch Ethylacetat-Extrakte zellfreier Überstände in der stationären Phase befindlicher SPR044-Kulturen untersucht. Dazu wurden die Extrakte sowie Referenzsubstanzen durch Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt und mit LB-Agar überschichtet, der mit dem Indikatorstamm *A. tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 (Zhu *et al.*, 1998) inokuliert war. Für diesen Stamm erkennbare Acyl-HSL-Derivate bewirken durch die Induktion der plasmid-kodierten *traI::lacZ*-Fusion eine Hydrolyse von X-Gal, was zu Blaufärbung des entsprechenden Bereichs führt. Im Fall von SPR044 und den Insertionsderivaten mit Ausnahme von SPR144 und SPR244 wurden zwei bioaktive Substanzen detektiert (Abb. 4A). Das stärkere Signal wurde durch Substanz A mit einem R_f -Werte von 0,5 hervorgerufen, die zwischen synthetischem HHSL und OHSL migrierte. Substanz B rief ein relativ schwaches Signal hervor und hatte einen etwas höheren R_f -Wert als synthetisches HHSL. Synthetisches BHSL induzierte das „Quorum-Sensing“-System von A136 pCF218 pCF372 in der eingesetzten Konzentration nicht, was mit der geringen Sensitivität des Stammes für BHSL übereinstimmt (Zhu *et al.*, 1998). Um andere Acyl-HSL-Derivate zu identifizieren, wurden weitere Dünnschicht-Chromatographie-Platten mit *P. aureofaciens* 30-84I (Wood und Pierson, 1996) überschichtet. Von 30-84I wird ein Acyl-HSL-Derivat erkannt, das von SPR044 und allen Insertionsderivaten außer SPR144 und SPR244 gebildet wird (Abb. 4B). Aufgrund des R_f -Wertes von 0,68 und durch Vergleich mit der synthetischen Substanz wurde es als BHSL identifiziert. HHSL und OHSL wurden in den Kulturüberständen von SPR044

nicht detektiert, obwohl die synthetischen Referenzsubstanzen bis zu einer Konzentration von 5 μM (HHSL) bzw. 500 μM (OHSL) die Phenazinbiosynthese induzierten. Die punktförmige Fraktionierung, die R_f -Werte der von A136 pCF218 pCF372 detektierten Komponenten und die Tatsache, dass sie das „Quorum-Sensing“-System von 30-84I nicht induzierten, deuten darauf hin, dass es sich bei diesen beiden Derivaten um C3-OH-substituierte Acyl-HSLs handelt. Vergleiche mit den publizierten R_f -Werten der von *P. fluorescens* 2-79 produzierten Acyl-HSLs ließen den Schluss zu, dass es sich bei Substanz A um N-(3-Hydroxy-Octanoyl)-L-HSL handelt. Substanz B wurde nicht eindeutig identifiziert, ähnelt jedoch vom R_f -Wert her einer nicht identifizierten, von 2-79 produzierten Substanz.

Somit wurde gezeigt, dass die beiden Acyl-HSL- und PCN-negativen Insertionsderivate SPR144 und SPR244 keines der drei Derivate produzieren. Das Acyl-HSL-Spektrum des PCN-Überproduziers SPR344 sowie das der PCN-negativen Derivate ist mit dem von SPR044 identisch.

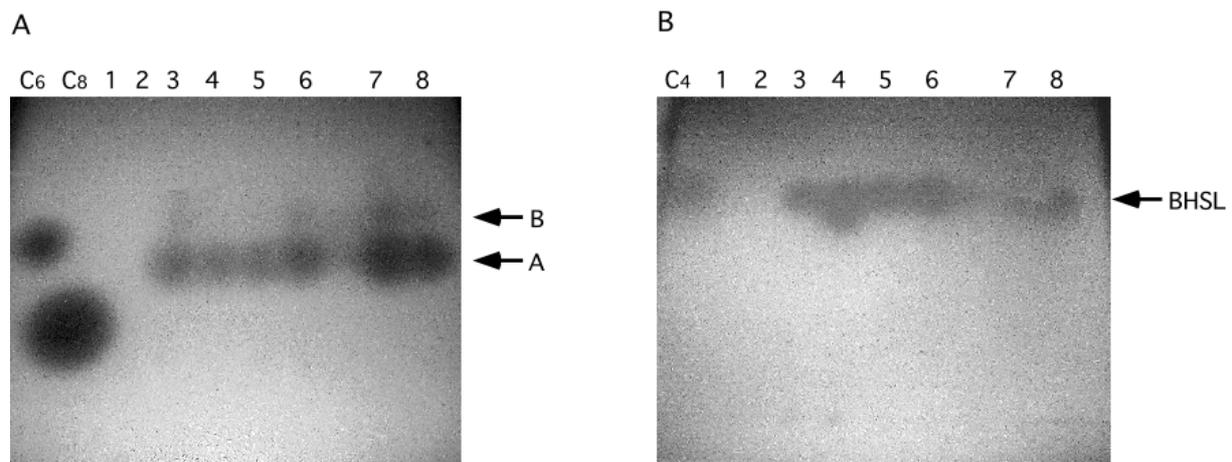


Abbildung 4: Analyse des Acyl-HSL Spektrums von SPR044. Von SPR044 synthetisierte Acyl-HSLs und Standard-Acyl-HSLs (C_4 =BHSL, C_6 =HHSL, C_8 =OHSL) wurden chromatographisch auf einer C_{18} -Dünnschichtplatte in einem Methanol/Wasser-Gemisch (40:60) aufgetrennt. Die Platten wurden mit den Acyl-HSL-Biosensor-Stämmen *A. tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 (A) bzw. mit *P. aureofaciens* 30-84I (B) überschichtet. Gezeigt ist die Fraktionierung der in den Ethylacetat-Extrakten enthaltenen Signalmoleküle von: (1) SPR144, (2) SPR244, (3) SPR344, (4) SPR544, (5) SPR644, (6) SPR744, (7) SPR844, (8) SPR044.

3.1.2.2 Quantifizierung des gebildeten Butanoyl-Homoserinlaktons (BHSL)

Die durch Acyl-HSLs vermittelte und von der Populationsdichte abhängige Genregulation ist unter Rhizosphäre-Kolonisierern weit verbreitet. Acyl-HSLs diffundieren durch die Zellmembranen und akkumulieren im umgebenden Milieu. Die produktive Interaktion des Acyl-HSLs mit dem aktivierten Transkriptionsfaktor ist von der intrazellulären Acyl-HSL-Konzentration abhängig. Diese steigt mit zunehmender Populationsdichte und ist somit auch von der vom jeweiligen Stamm produzierten Acyl-HSL-Menge abhängig. Vor der Durchführung vergleichender Studien in der Rhizosphäre war es daher wichtig, die Acyl-HSL-Produktion von SPR044 und den *TnMod*-Insertionsderivaten zu quantifizieren. Hierzu wurden die Zellen in M9-Minimalmedium mit Glukose als C-Quelle kultiviert. Nach 9-, 13- und 17-stündigem Wachstum wurden die Zellen abzentrifugiert. Je 100 µl des Überstandes wurden in Löcher (0,5 cm Ø) pipettiert, welche aus mit 30-84I versetztem Agar gestanzt wurden. Im Vortest war sicher gestellt worden, dass die Durchmesser der induzierten Zonen mit den eingesetzten Mengen an Überstand korrelieren. Zur Eichung wurde synthetisches BHSL in einer Konzentration von 50 bis 1.000 µM verwendet (Abb. 5) und die Durchmesser der nach 24-stündiger Inkubation entstandenen gefärbten Zonen wurden gemessen.

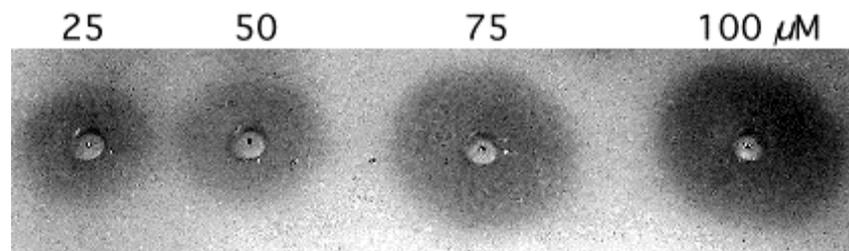


Abbildung 5: Platten-Diffusionstest mit *P. aureofaciens* 30-84I als Indikatororganismus. Steigende Mengen BHSL wurden in Löcher pipettiert, die in mit *P. aureofaciens* 30-84I inokuliertem Agar gestanzt worden waren. Bereiche durch BHSL induzierter Phenazinbildung sind durch orange Färbung um die Löcher herum sichtbar.

Dies ermöglichte die Erstellung einer Eichkurve, die die Abhängigkeit des Durchmessers der induzierten Zone von der eingesetzten Acyl-HSL-Menge darstellt. Damit konnte die in den zellfreien Überständen enthaltene Acyl-HSL-Menge bestimmt werden (Tab.7). Es ergaben sich für die relativen Mengen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Probennahme. Im Fall von SPR044 wurde nach 17-stündigem Wachstum eine BHSL-

Konzentration von 16 μM ermittelt, und dies entsprach der vom Stamm SPR644. In den Überständen der Acyl-HSL-negativen Mutanten ließ sich erwartungsgemäß kein BHSL nachweisen. Die von den drei anderen PCN-negativen Derivaten produzierte BHSL-Menge lag zwischen 37% und 63% der vom Wildtyp produzierten BHSL-Menge. Auch der PCN-Überproduzierer wies eine auf 26% reduzierte Produktion von Acyl-HSLs auf.

Tabelle 7: BHSL-Produktion von *P. chlororaphis* SPR044 und seinen TnMod-Insertionsderivaten nach 17-stündigem Wachstum.

| Stamm | BHSL-Menge ^a | BHSL-Produktion im Vergleich zu SPR044 |
|--------|-------------------------|--|
| SPR044 | 16,0 μM | 100% |
| SPR144 | - | 0% |
| SPR244 | - | 0% |
| SPR344 | 4,1 μM | 26% |
| SPR544 | 10,0 μM | 63% |
| SPR644 | 15,5 μM | 97% |
| SPR744 | 6,0 μM | 37% |
| SPR844 | 6,4 μM | 40% |

^aDie BHSL-Produktion wurde in Platten-Diffusionstests quantifiziert. Gezeigt sind repräsentative Werte aus 4 unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Semi-quantitative Analyse der Produktion von antimikrobiellen Sekundärmetaboliten, Proteasen und Phenazinen

Die Produktion antimikrobieller Metabolite, die das Wachstum konkurrierender Mikroorganismen hemmen, ist ein wichtiger Kolonisierungsfaktor. Diese wird häufig populationsdichte-abhängig reguliert, und aus diesem Grund wurden Menge und Vorhandensein derartiger Substanzen mit Platten-Diffusionstests untersucht (Ravn *et al.*, 2001). Um die Hemmung Gram-negativer Organismen zu untersuchen, wurde der für den Platten-Diffusionstest eingesetzte Agar mit einer exponentiell wachsenden Kultur von *C. violaceum* beimpft. Der Durchmesser der Hemmhöfe wurde nach 24-stündiger Inkubation bei 26°C gemessen. Da die für die Hemmung verantwortliche Substanz nicht bekannt war, konnte nur eine semi-quantitative Bestimmung der im Vergleich zum Wildtyp produzierten Menge

erfolgen. Die Antibiotika-Produktion von SPR644 war mit der des Wildtyps vergleichbar, wohingegen die der anderen Insertionsderivate im Vergleich zu SPR044 reduziert war (Tab. 8).

Um die Hemmwirkung auf Gram-positive Organismen zu analysieren, wurde der für den Platten-Diffusionstest eingesetzte Agar mit *B. subtilis* inokuliert. Die durch den zellfreien Überstand von SPR644 hervorgerufene Hemmung war ebenso mit der von SPR044 vergleichbar, während die der anderen Insertionsderivate deutlich schwächer war (Tab. 8).

Ein weiterer Faktor für die Kolonisierungseffizienz ist die Synthese von Enzymen für den Abbau schwer zugänglicher C- und N-Quellen oder polymerer Substanzen. Um stellvertretend die Produktion von Protease als einem derartigen Enzym zu überprüfen, wurden Platten-Diffusionstests mit Magermilchagar durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Durchmesser des gebildeten Lysehofes gemessen. Proteasen waren im Überstand aller Stämme außer SPR144 und SPR244 vorhanden (Tab. 8). Eine semi-quantitative Analyse der Proteasebildung war nicht möglich, da steigende Mengen zellfreien Überstandes nicht zu einer Zunahme des Lysehof-Durchmessers führten.

Wie aus dem Vergleich von Tab. 7 mit Tab. 8 hervorgeht, korrelierte die Antibiotika- und Proteaseproduktion mit der gebildeten Acyl-HSL-Menge. Die beiden Acyl-HSL-negativen Derivate bildeten weder Protease noch Antibiotika. Die Antibiotika- und Proteaseproduktion des PCN-Überproduzierers war ebenso wie die Acyl-HSL-Produktion im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt. Der Durchmesser der durch die Überstände des Derivats SPR644 hervorgerufenen Hemmhöfe entsprach denen des Wildtyps, während die drei anderen PCN-negativen Derivate einen im Vergleich zum Wildtyp verringerten Durchmesser aufwiesen.

Die Bildung von Phenazin-1-Carboxylsäure (PCA) und PCN wurde optisch anhand der Färbung der Kolonien bestimmt und durch Spektralanalyse von Chloroform-Extrakten zellfreier Kulturüberstände über einen Wellenlängenbereich zwischen 200 und 500 nm bestätigt (Mavrodi *et al.*, 2002). Die Untersuchung ergab, dass neben den beiden Acyl-HSL-negativen Stämmen auch SPR744 und SPR844, die Insertionen im *phzF*- bzw. *phzE*-Gen tragen, in der PCA-Produktion beeinträchtigt waren. Die PCA-Produktion von SPR744 und SPR844 (Gelbfärbung der Kolonien) konnte durch Komplementation mit zellfreien Extrakten von SPR044 in Platten-Diffusionstests wiederhergestellt werden. Zusätzlich konnte die Pigmentierung von SPR744 durch zellfreie Überstände von SPR844 komplementiert werden. Diese Komplementationen beruhen wahrscheinlich auf der Aufnahme diffusibler biosynthetischer Vorstufen durch die PCA-defizienten Derivate. Eine Umsetzung zu PCN erfolgte jedoch in keinem Fall.

Tabelle 8: Charakteristika von *P. chlororaphis* SPR044 und seinen TnMod-Derivaten.

| Stamm | Protease-Produktion ^a | PCA-Produktion ^b | PCN-Produktion ^c | Hemmung von Gram-neg. Bakterien ^d | Hemmung von Gram-pos. Bakterien ^e |
|--------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|--|
| SPR044 | + | ++ | + | ++ | ++ |
| SPR144 | - | - | - | - | - |
| SPR244 | - | - | - | - | - |
| SPR344 | + | + | +++ | + | + |
| SPR544 | + | ++ | - | + | + |
| SPR644 | + | ++ | - | ++ | ++ |
| SPR744 | + | - | - | + | + |
| SPR844 | + | - | - | + | + |

+: vorhanden; -: nicht vorhanden; Anzahl der “+” gibt die Produktion im Vergleich zum Wildtyp an. Gezeigt sind repräsentative Werte aus 4 unabhängigen Experimenten.

^a Die Aktivität wurde in Platten-Diffusionstests unter Verwendung zellfreier Überstände von in der stationären Phase befindlichen Kulturen und Magermilchagar analysiert.

^b Die PCA-Produktion wurde durch Spektralanalyse (200-500 nm) von Chloroform-Extrakten zellfreier Überstände gemessen.

^c Die PCN-Produktion wurde durch Abschätzung der Menge der pro Kolonie gebildeten PCN-Kristalle analysiert.

^d Die Aktivität wurde semi-quantitativ in Platten-Diffusionstests mit *C. violaceum* analysiert.

^e Die Aktivität wurde semi-quantitativ in Platten-Diffusionstests mit *B. subtilis* analysiert.

3.1.4 Untersuchung der Zusammensetzung des Lipopolysaccharids

Ein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung der Glycosyltransferase und der PCN-Überproduktion war nicht unmittelbar ersichtlich. Da Glycosyltransferasen eine Rolle in der Biosynthese von Lipopolysaccharids (LPS) spielen, wurde die Integrität dieses Moleküls aus verschiedenen Insertionsderivaten untersucht. Zum Vergleich wurde LPS von einem *E. coli* B-Wildtyp und einer *E. coli* B-Mutante (*E. coli* B, *hcr*⁻) präpariert, der die O-antigene Seitenkette fehlt. Analyse der Proben von SPR044, SPR244, SPR644 und vom *E. coli*-Wildtyp ergab Signale für Lipid A und das Kernoligosaccharid, sowie für die O-antigene Seitenkette (Abb. 6). In den Proben von SPR344 und der *E. coli* *hcr*⁻-Mutante dagegen fehlten die Signale, die durch die O-antigene Seitenkette hervorgerufen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Insertion im für die Glycosyltransferase kodierenden Gen die Synthese der O-antigenen Seitenkette in SPR344 verhindert. Die veränderte Oberflächenbeschaffenheit könnte zu erhöhter extrazellulärer Akkumulation von PCN-Kristallen führen.

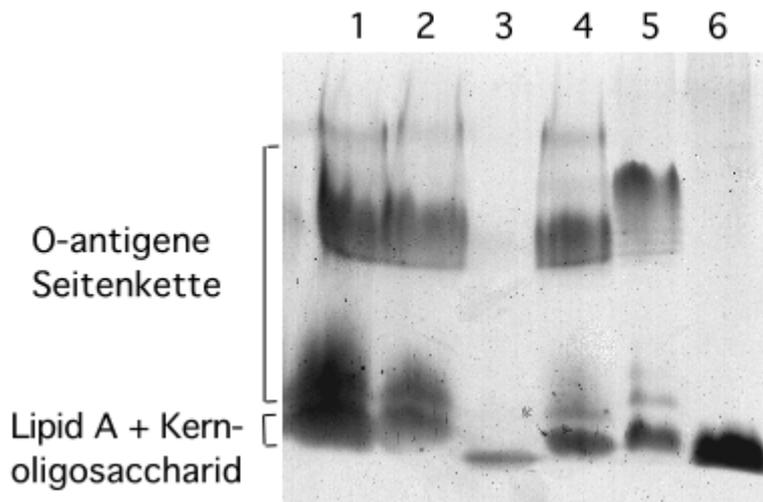


Abbildung 6: Analyse der Zusammensetzung des LPS. LPS wurde von SPR044 (1), SPR244 (2), SPR344 (3), SPR644 (4), *E. coli*B (5) und *E. coli*B hcr⁻ (6) isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.1.5 Analyse der Kolonisierung der Rhizosphäre von *A. thaliana*

Die Kolonisierung der Wurzel ist der erste Schritt nahezu aller Interaktionen zwischen Pflanzen und Bodenmikroorganismen. Die Wirkung von das Pflanzenwachstum begünstigenden als auch hemmenden Bodenbakterien, ist von ihrer Fähigkeit abhängig, sich in der Rhizosphäre erfolgreich anzusiedeln. Einige Kolonisierungsfaktoren wurden bereits beschrieben, wie die Synthese von Flagellen oder Aminosäuren (de Weger *et al.*, 1987; Simons *et al.*, 1997). Diverse Interaktionen zwischen Bakterien und Pflanzen unterliegen der Kontrolle durch „Quorum-Sensing“ (Dumenyo *et al.*, 1998). Da der Einfluss dieser Regulation auf die Kolonisierungseffizienz bisher noch nicht untersucht wurde, war es Ziel der folgenden Experimente, die Bedeutung der Acyl-HSL- und PCN-Produktion für die Kolonisierungseffizienz von *P. chlororaphis* SPR044 zu analysieren.

Zu diesem Zweck verwendeten wir auf Mikrokosmen basierende geschlossene Systeme mit steriler Erde und einem konstanten Feuchtigkeitsgehalt. Dies ermöglicht Pflanzenkeimung in Gegenwart von Bakterien unter reproduzierbaren Bedingungen und somit die Untersuchung subtiler Unterschiede der Rhizosphäre-Kolonisierungseffizienz verschiedener Organismen. In derartigen Systemen erhaltene Ergebnisse gleichen den in natürlicher Umgebung gewonnenen (Simons *et al.* 1996).

Für folgende Analysen wurden neben dem Wildtyp SPR044 das Acyl-HSL-defiziente Derivat SPR244, der PCN-Überproduzierer SPR344 und das Derivat SPR644 ausgewählt. SPR644 wurde als Vertreter der PCN-negativen Mutanten ausgewählt, da die Menge der gebildeten Acyl-HSLs und Antibiotika mit der von SPR044 übereinstimmt. Unterschiede in der Kolonisierungseffizienz wären somit ausschließlich auf die fehlende PCN-Produktion zurückzuführen. Die Wachstumsraten der Insertionsderivate in LB-Medium waren mit der des Wildtyps identisch. Dies war unabdingbar für weitere Untersuchungen, da aus früheren Arbeiten bekannt war, dass sich eine leicht verlängerte Generationszeit negativ auf die Kolonisierungseffizienz auswirkt (Simons *et al.*, 1996).

Die Kolonisierung der *A. thaliana*-Rhizosphäre durch den Wildtyp wurde mit der von SPR244, SPR344 und SPR644 über einen Zeitraum von 6 Wochen verglichen. Nach einer 14-tägigen Wachstumsperiode betrug die Populationsgröße von SPR044 $10^{7,3}$ CFU/g Rhizosphäre und wich nicht signifikant ($P > 0,05$) von der von SPR244, SPR344 oder SPR644 ab (Abb. 7). Nach 28- und 42-tägigem Wachstum war die Population von SPR044 ($10^{7,3}$ CFU/g Rhizosphäre) jedoch signifikant größer ($P < 0,05$) als die von SPR244 und SPR344. Die Populationsgröße von SPR644 dagegen wich nicht signifikant von der des Wildtyps ab. Der Unterschied zwischen der Population von SPR344 und SPR044 nahm mit jeder Probennahme zu und nach 42 Tagen war die von SPR344 um den Faktor 10 kleiner als die des Wildtyps. Die Population von SPR244 war im Gegensatz dazu nach 42 Tagen um den Faktor 4 kleiner als die von SPR044.

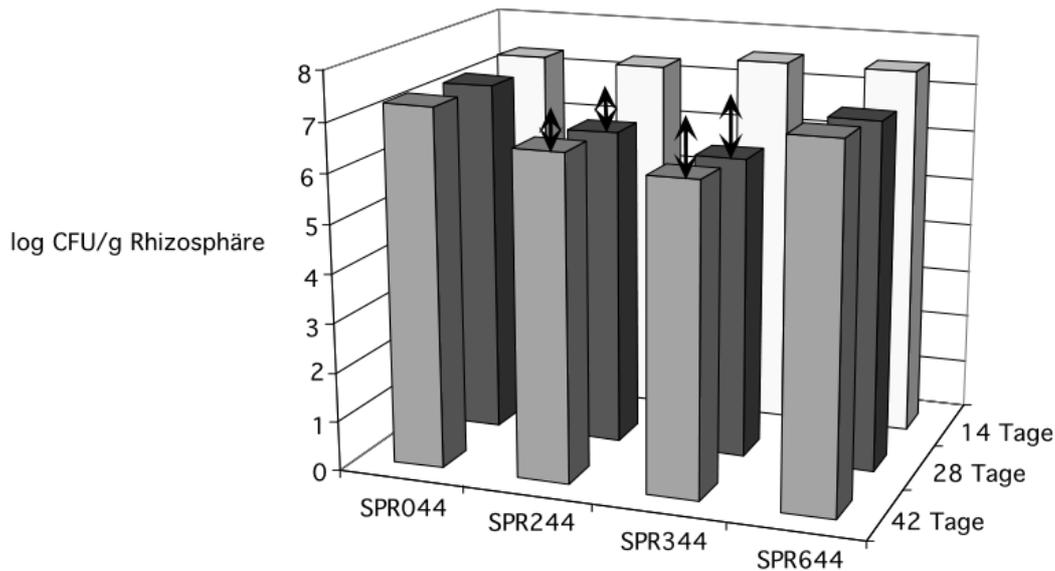


Abbildung 7: Untersuchung der Rhizosphäre-Kolonisierungseffizienz von SPR044 und seinen Insertionsderivaten. *P. chlororaphis* SPR044, sein „Quorum-Sensing“-negatives Insertionsderivat SPR244, der PCN-Überproduzierer SPR344 sowie das PCN-negative Derivat SPR644 wurden zu einer OD₆₀₀ von 0,01 zusammen mit 50 *A. thaliana*-Samen in sterile Mikrokosmen inokuliert. Die Populationsgrößen wurden nach 14, 28 und 42 Tagen bestimmt und die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten errechnet. Mit Doppelpfeil gekennzeichnete Mittelwerte sind signifikant kleiner ($P < 0,05$) als der für SPR044 ermittelte logarithmierte Wert der CFU/g Rhizosphäre.

3.1.6 Koinokulation der TnMod-Insertionsderivate mit SPR044 in die Rhizosphäre von *A. thaliana*

Um einen adäquaten Vergleich der Kolonisierungseffizienz zu erhalten wurde SPR044 mit je einem der Insertionsderivate koinokuliert. Analyse dieser Experimente ergab eine Abnahme der Populationsgröße von SPR044 von $10^{7,3}$ CFU/g Rhizosphäre nach 14 Tagen auf $10^{6,4}$ CFU/g Rhizosphäre nach 42 Tagen (Abb. 8). Dies beruht vermutlich auf einer Konkurrenz um C- und N-Quellen zwischen den verschiedenen Bakterien, was zu einer generellen Abnahme der Populationsgröße führte. Der Unterschied zwischen den Populationsgrößen von SPR044 und SPR344 war unter diesen Umständen jedoch größer als bei den Einzelinokulations-Experimenten. Die Population von SPR344 war nach 42 Tagen fast zwei Zehnerpotenzen kleiner als die des Wildtyps. Die Populationsgrößen von SPR244 und SPR644 waren dagegen auch nach 42 Tagen mit der des Wildtyps vergleichbar. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Einzelinokulations-Experimente, die signifikante Unterschiede zwischen der Population von SPR044 und SPR244 gezeigt hatten.

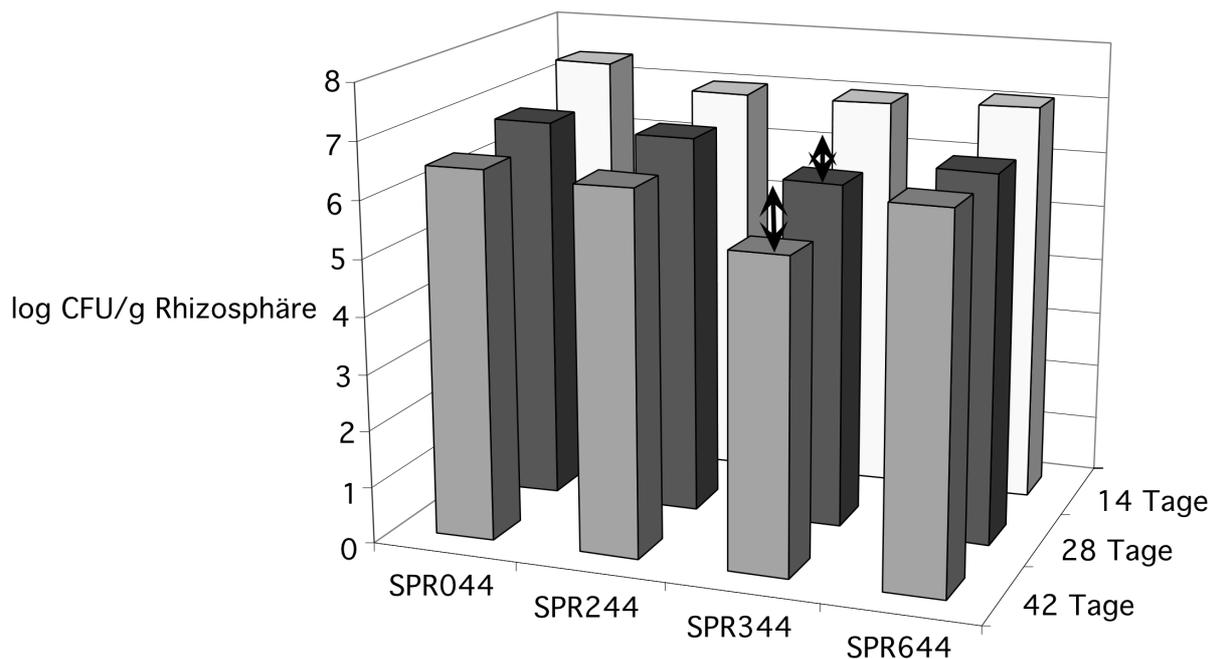


Abbildung 8: Rhizosphärekolonisierung verschiedener *TnMod*-Insertionsderivate nach Koinokulation mit SPR044. Das „Quorum-Sensing“-negative Derivat SPR244, der PCN-Überproduzierer SPR344 und das PCN-negative Derivat SPR644 wurde gemeinsam mit dem Wildtyp SPR044 zu einer OD_{600} von 0,01 zusammen mit 50 *A. thaliana*-Samen in sterile Mikrokosmen inokuliert. Die Populationsgrößen wurden nach 14, 28 und 42 Tagen bestimmt und die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten errechnet. Die Populationsgrößen von SPR044 waren in allen drei Experimenten identisch und sind nur einmal gezeigt. Mit Doppelpfeil gekennzeichnete Mittelwerte sind signifikant kleiner ($P < 0,05$) als der für den Wildtyp ermittelte logarithmierte Mittelwert der CFU/g Rhizosphäre.

3.1.7 Analyse des bakteriellen Wachstums in Flüssigkultur

Um weitere Erkenntnisse über die relative Fitness von SPR044 und seinen Insertionsderivaten zu erhalten, wurde das Wachstum in mit Glukose supplementiertem M9-Minimalmedium untersucht. Von diesen Untersuchungen erhofften wir uns auch weitere Informationen über die physiologische Grundlage der Diskrepanz zwischen dem Wachstum von SPR244 in Einzel- und Kokultur. Die mittlere Generationszeit (t_d) der Bakterien wurde während der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt und schloss mindestens 5 Datenpunkte in jeweils vier unabhängigen Experimenten ein (Abb. 9). Zusätzlich wurde die Dauer der Lag-Phase bis zum Einsetzen des exponentiellen Wachstums bestimmt.

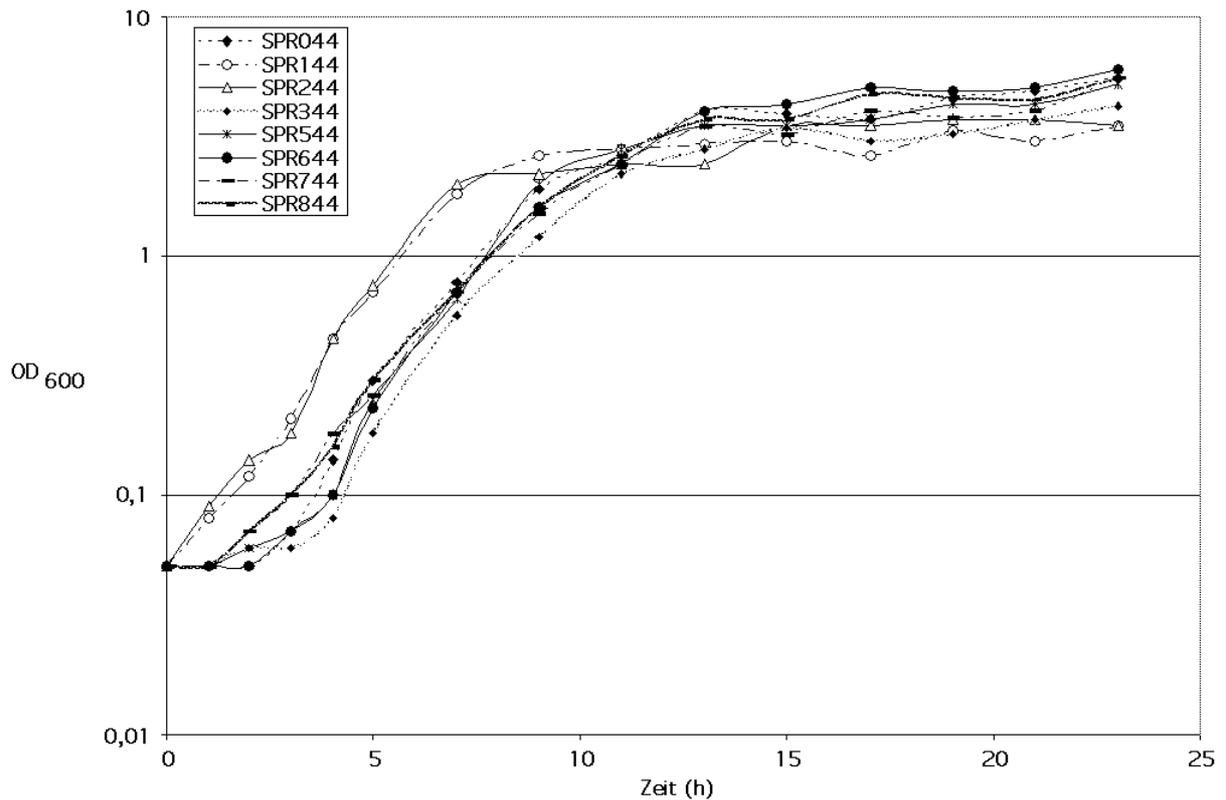


Abbildung 9: Vergleich des Wachstums von SPR044 und seinen Insertionsderivaten. Die Zellen wurden in mit 0,5% Glukose supplementiertem M9-Minimalmedium unter Schütteln bei 26°C kultiviert.

Sowohl für SPR044 als auch für die Insertionsmutanten mit veränderter PCN-Produktion wurden typisch sigmoide Wachstumskurven erhalten. Die Kurven von SPR144 und SPR244 wichen insofern von dem erwarteten sigmoiden Verlauf ab, als die Lag-Phase unter den gegebenen Bedingungen signifikant ($P < 0,01$) von 3 h auf 0,5 h reduziert war. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Übernachtskulturen in LB-Medium oder in M9-Minimalmedium kultiviert worden waren. Die optischen Dichten (OD_{600}) der eingesetzten Übernachtskulturen variierten zwischen 5,0 und 7,5, und es gab keinen Zusammenhang der Absolutwerte mit bestimmten Insertionsderivaten. Die Verdopplungszeit wich bei keiner der Insertionsmutanten signifikant von der des Wildtyps ab. Die Mittelwerte von Generationszeit, Wachstumsrate und Lag-Phase sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Vergleich von mittlerer Generationszeit, Wachstumsrate und Lag-Phase. SPR044 und seine Insertionsderivate wurden in mit 0,5% Glukose supplementiertem M9-Minimalmedium unter Standardbedingungen bei 26°C kultiviert.

| Stamm | Generationszeit (h) | Wachstumsrate (h ⁻¹) | Lag-Phase |
|--------|---------------------|----------------------------------|-----------|
| SPR044 | 1,25 | 0,554 | 3 h |
| SPR144 | 1,33 | 0,521 | 0 h |
| SPR244 | 1,33 | 0,521 | 0 h |
| SPR344 | 1,25 | 0,554 | 3 h |
| SPR544 | 1,16 | 0,594 | 3 h |
| SPR644 | 1,16 | 0,594 | 3 h |
| SPR744 | 1,16 | 0,594 | 3 h |
| SPR844 | 1,16 | 0,594 | 3 h |

3.1.8 Komplementation der Insertion im *gacS*-Gen

Da die Verkürzung der Lag-Phase in Zusammenhang mit der *TnMod*-Insertion im *gacS*-Gen stehen könnte, wurde die Komplementation von SPR244 durch Expression von *gacS in trans* durchgeführt. *GacS* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *GacS5'* und *GacS3'* aus chromosomaler DNA von SPR044 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde direkt in pUC19 kloniert. Nach Restriktion mit *SacI* und *HindIII* wurde das erhaltene Fragment in pTrc300 kloniert und sequenziert, da dieser Vektor mit breitem Wirtsbereich die Expression in *P. chlororaphis* ermöglicht. Beim Vergleich mit dem von Kim *et al.* (AF192795) sequenzierten *P. chlororaphis gacS*-Gen fiel eine relative hohe Anzahl an stummen Mutationen auf, was sich in einer Sequenzidentität von 97,5% (2685/2754 Nukleotide) auf DNA-Ebene im Vergleich zu 99,6% Identität auf Proteinebene (914/918 Aminosäuren) widerspiegelt. Durch Transformation von SPR244 mit pTrcGacS wurde die Produktion von Acyl-HSLs und PCN bei Wachstum auf Agarplatten wieder hergestellt. Die Komplementation erfolgte auch ohne Induktion des *trc*-Promotors durch IPTG, was vermutlich auf der Grundaktivität des Promotors beruht. Um eine genauere Analyse bei verlangsamttem Wachstum zu ermöglichen, wurde das Wachstum von SPR044, SPR244 sowie von SPR244 pTrc300 und SPR244 pTrcGacS in mit 0,5% myo-Inosit supplementiertem M9-Minimalmedium analysiert. Der Einsatz alternativer C-Quellen sollte darüber hinaus mögliche Effekte der Katabolitrepession vermeiden. SPR244 hatte mit und ohne Klonierungsvektor eine Lag-Phase von 3 h im Vergleich zu 6 h des Wildtyps. Durch Komplementation mit *gacS in trans* verlängerte sich

die Lag-Phase von SPR244 auf 8 h, was möglicherweise Folge einer im Vergleich zum Wildtyp erhöhten GacS-Produktion ist. Die Komplementation und die im Vergleich zum Wildtyp sogar noch verlängerte Lag-Phase von SPR244 pTrcGacS warfen die Frage auf, ob die reduzierte Lag-Phase von SPR244 aus einem verzögerten oder nur unvollständigen Eintreten in die stationäre Phase resultieren könnte.

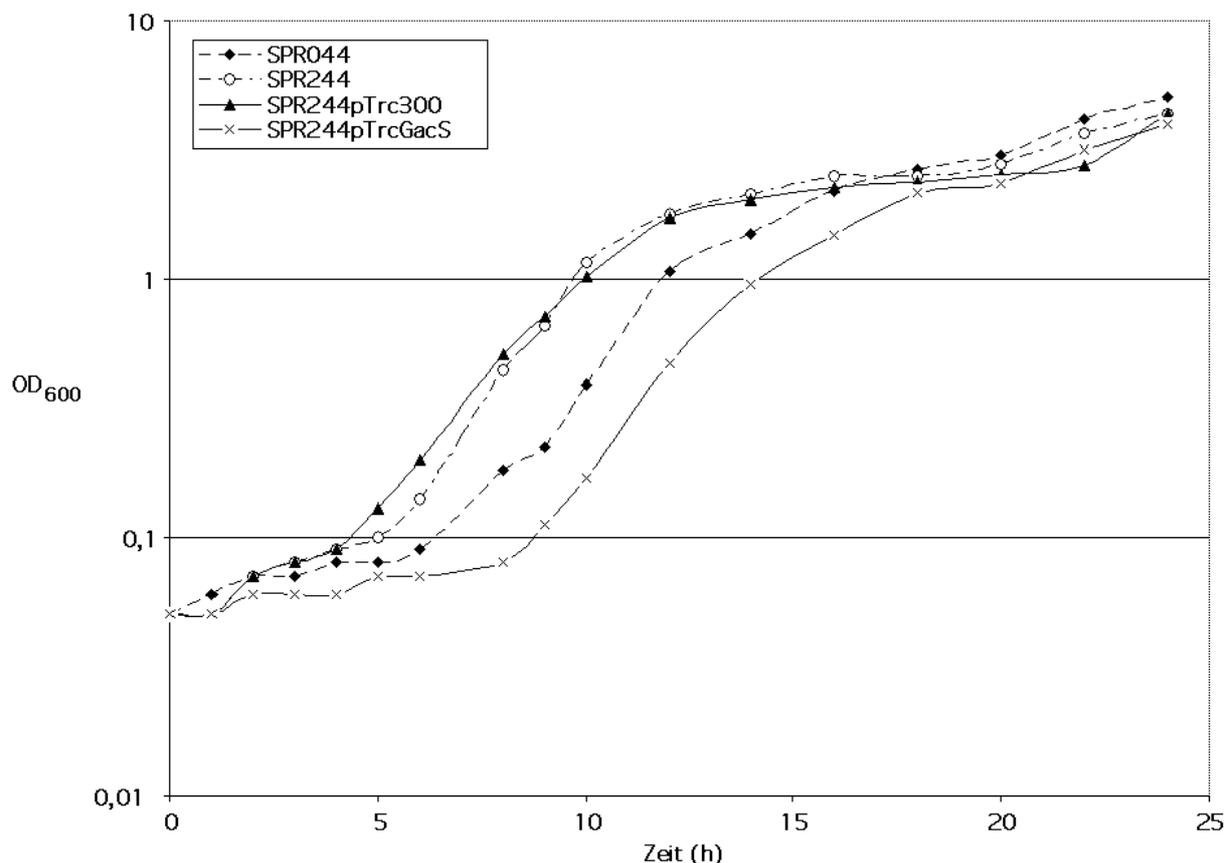


Abbildung 10: Komplementation der verkürzten Lag-Phase durch Expression von *gacS* *in trans*. Zellen von *P. chlororaphis* SPR044, SPR244 und SPR244 mit pTrc300 oder pTrcGacS wurden in mit 0,5% myo-Inosit supplementiertem M9-Minimalmedium unter Schütteln bei 26°C angezogen.

3.1.9 Analyse der Produktion von RpoS

Um die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen der verkürzten Lag-Phase und einem unvollständigen Eintreten in die stationäre Phase zu testen, wurde die Menge des für die stationäre Phase charakteristischen Sigmafaktors RpoS (σ^S) analysiert. Das σ^S -Protein ist in der exponentiellen Phase in *E. coli* äußerst instabil und wird mit einer Halbwertszeit von 14 min abgebaut. Mit dem Übergang in die stationäre Phase wird es jedoch stabilisiert (Lange und Hengge-Aronis, 1994). Um den zellulären Gehalt des σ^S -Proteins zu ermitteln, wurden

periodisch Proben von in Minimalmedium kultivierten Zellen genommen. Gleiche Mengen Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer „Western-Blot“-Analyse mit RpoS-spezifischem Antiserum unterzogen. Zwischen SPR044 und SPR244 war ein deutlicher Unterschied im zellulären σ^S -Protein-Gehalt erkennbar. Die Intensität des RpoS-spezifischen Signals nahm bei Proben aus SPR044 und bei SPR244 pTrcGacS nach 18 h deutlich zu. Im Gegensatz dazu bleibt die Signalintensität bei SPR244 und SPR244 pTrc300 relativ gleich und nahm nach 24 h leicht ab. Dies deutet darauf hin, dass SPR244 nicht vollständig in die stationäre Phase eintritt.

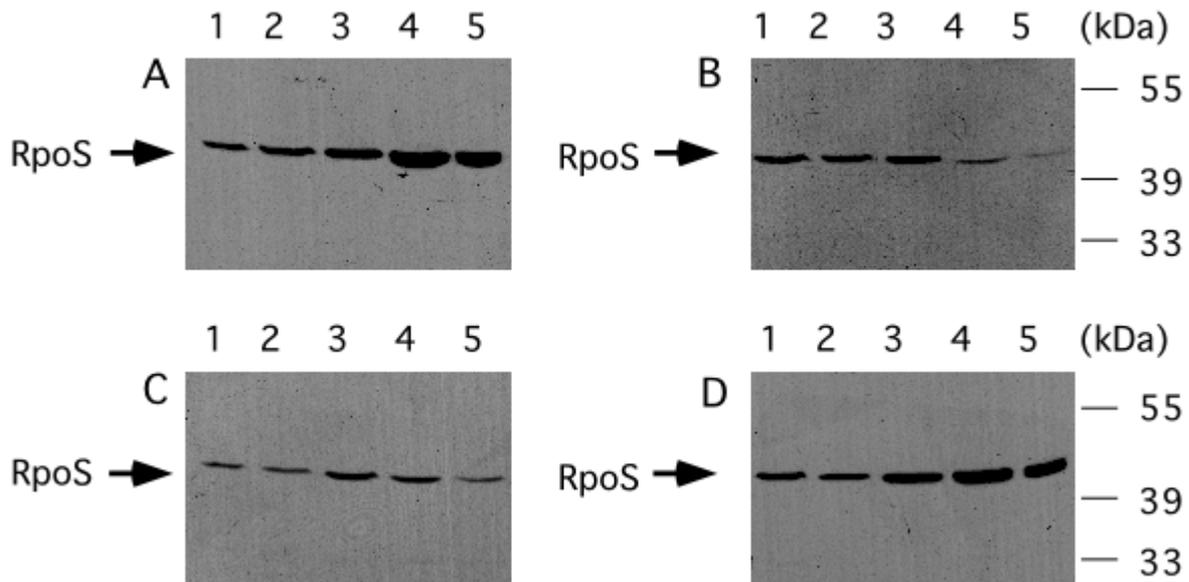


Abbildung 11: Analyse des zellulären Gehalts von σ^S -Proteins RpoS. Das Wachstum von SPR044 (A), SPR244 (B), SPR244pTrc300 (C) und SPR244pTrcGacS (D) wurde in Minimalmedium untersucht. Zellen wurden nach 6 h (1), 10 h (2), 14 h (3), 18 h (4) und 24 h (5) sedimentiert und in Probenauftragspuffer lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer „Western-Blot“-Analyse mit RpoS-spezifischem Antiserum unterzogen.

3.2 Einfluss von pJP4 auf die Konkurrenzfähigkeit von *P. chlororaphis*

Ein Ziel angewandter Forschung ist die Untersuchung der Freisetzung von Mikroorganismen zur Dekontamination von Böden. Hierzu werden meist Bakterien verwendet, die durch das Tragen katabolischer Plasmide zum Xenobiotika-Abbau in der Lage sind. Verschiedene Untersuchungen zur Analyse des Plasmidtransfers oder der katabolischen Leistung des Inokulums zeigten, dass eingebrachte Stämme längerfristig plasmid-freien Konkurrenten unterlegen sind. Hierbei wurden jedoch Laborstämme verwendet, welche schlecht an das jeweilige Ökosystem angepasst waren. Außerdem wurde teilweise mit einem hohen Selektionsdruck zur Propagierung des Plasmidtransfers gearbeitet, wodurch die natürliche Situation nur unzureichend widerspiegelt wurde (Neilson *et al.*, 1994; Newby *et al.*, 2000).

Ziel der hier durchgeführten Analysen war es zum einen, den Einfluss der Produktion von Acyl-HSLs und PCN auf die Transfereffizienz von pJP4 zu untersuchen. SPR044 diente als Donor, da dieser Stamm aus der Rhizosphäre von *A. thaliana* isoliert wurde und somit an diese angepasst sein sollte. Der vollständige Verzicht auf Selektionsdruck ermöglicht eine realistische Einschätzung der minimalen Transfereffizienz, welche zugleich für Langzeitprognosen zu Grunde gelegt werden kann. Zum anderen sollte der Einfluss, den die zusätzliche metabolische Last durch das Plasmid auf die Trägerzelle ausübt, in Abhängigkeit von biotischem und abiotischem Stress untersucht werden.

3.2.1 Einfluss von pJP4 auf die Kolonisierung der Rhizosphäre von *A. thaliana*

Ziel der folgenden Experimente war es, unter konkurrenzfreien Bedingungen den Einfluss von pJP4 auf die Kolonisierungseffizienz von SPR044 und Derivaten zu untersuchen. Hierzu wurden SPR044, SPR244 und SPR644 mittels Konjugation mit pJP4 transformiert, und der Erhalt des Plasmids wurde durch Reisolierung und Restriktionsanalyse bestätigt. Ein signifikanter Unterschied der Wachstumsraten zwischen den plasmid-freien und pJP4-tragenden Stämmen wurde in LB- und Minimalmedium nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die Kolonisierungseffizienz des mit pJP4 transformierten Wildtyps und seiner in der Produktion von Acyl-HSLs und/oder PCN veränderten Derivate wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen analysiert. Die Populationsgröße der plasmid-tragenden Zellen wurde durch die der plasmid-freien Zellen (vgl. 3.1.2.5) dividiert und die Abweichung vom Idealwert 1

errechnet. Die Populationsgrößen nach 14 Tagen lagen für die plasmid-freien Stämme bei $10^{7,3}$ CFU/g Rhizosphäre im Fall von SPR044 und SPR244 bzw. bei $10^{7,5}$ CFU/g Rhizosphäre im Fall von SPR344 und SPR644. Die Populationsgrößen der pJP4-tragenden Stämme wichen davon nicht signifikant ab ($P>0,05$) und lagen bei $10^{7,1}$ CFU/g Rhizosphäre (SPR044 und SPR244) bzw. bei $10^{7,0}$ CFU/g Rhizosphäre (SPR344) und $10^{7,4}$ CFU/g Rhizosphäre (SPR644). Das entspricht einer Reduktion von zwischen 1,3% und 6,6%. Nach 28 Tagen betrug die Verringerung der Populationsgröße der plasmid-tragenden Zellen zwischen 1,5% im Falle von SPR244 und 7,6% im Falle von SPR344. Die Verringerung der Populationsgrößen von SPR344 war zwar offensichtlich, jedoch nicht statistisch signifikant ($P>0,05$). Nach 42 Tagen lagen die mit pJP4 korrelierten Effizienzeinbußen von SPR044, SPR244 und SPR644 bei 4,1%, 1,5% und 2,7% und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Im Fall von SPR344 betrug die Populationsgröße der plasmid-tragenden Zellen hingegen $10^{5,7}$ CFU/g Rhizosphäre, während die der plasmid-freien Zellen $10^{6,3}$ CFU/g Rhizosphäre betrug. Die resultierende Effizienzeinbuße von 9,5% war somit signifikant größer ($P<0,05$) als die der drei anderen Derivate (Abb. 12). Ein signifikanter Verlust des Plasmids wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass pJP4 keinen negativen Einfluss auf die Kolonisierungseffizienz des Wildtyps sowie der Acyl-HSL- und PCN-negativen Derivate hat. Im Gegensatz dazu war ein negativer Einfluss auf den PCN-Überproduzierer deutlich erkennbar. Dies könnte zum einen mit der Toxizität dieses Sekundärmetaboliten zusammenhängen, der sich in der Umgebung der Zelle anhäuft. Zum anderen könnten Veränderungen der LPS-Zusammensetzung zu einem verminderten Schutz gegen schädliche Einflüsse wie Austrocknung oder Schwankung des osmotischen Drucks in der Rhizosphäre führen (de Weger *et al.*, 1989). Unter Einfluß von abiotischem Stress kommen also die Wachstumsnachteile pJP4-tragender Zellen zum Vorschein.

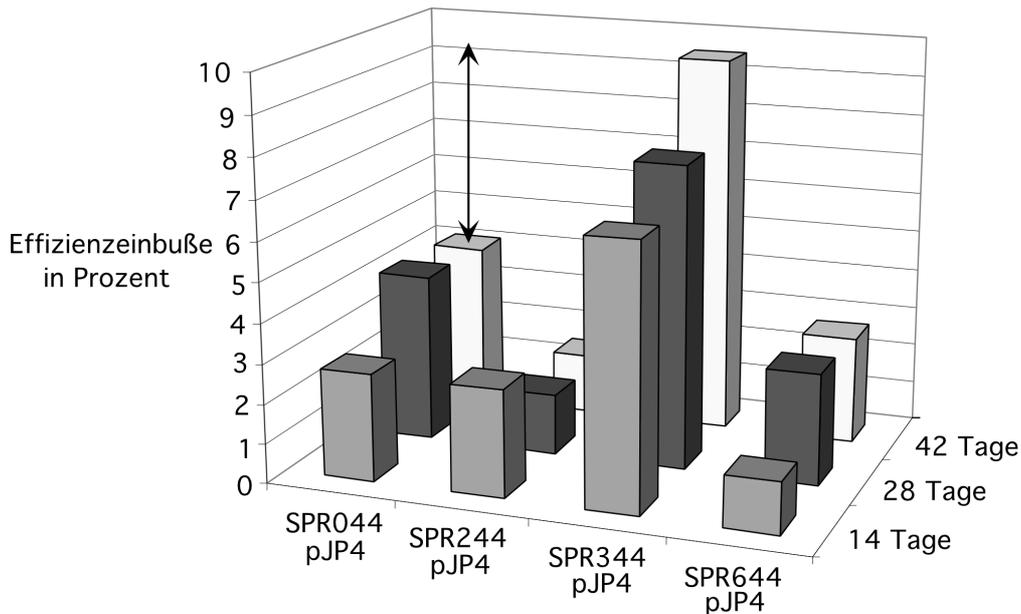


Abbildung 12: Einfluss von pJP4 auf die Kolonisierungseffizienz von SPR044. Die Populationsgröße wurde nach 14, 28 und 42 Tagen bestimmt, und die Mittelwerte wurden aus sechs unabhängigen Experimenten errechnet. Die Populationsgrößen der plasmid-tragenden Derivate wurden durch die Populationsgrößen der plasmid-freien Derivate dividiert. Die prozentuale Verringerung der Effizienz ergibt sich aus der Differenz der Abweichung vom idealen Verhältnis von 1:1. Der Doppelpfeil markiert eine statistisch signifikante Erniedrigung.

3.2.2 Koinokulations-Experimente

Weiterhin wurde der Einfluss von pJP4 auf die Konkurrenzfähigkeit von SPR044 in Gegenwart weiterer Mikroorganismen untersucht, also bei Vorhandensein von biotischem Stress. Dieser wurde durch Koinokulation mit anderen Bakterien eingebracht. Hierzu kamen Isolate aus der natürlichen Rhizosphäre von *A. thaliana* oder Laborstämme aus anderen Ökosystemen zum Einsatz, die jedoch ebenfalls als gute Kolonisierer beschrieben waren. Für diese Experimente wurden neben dem Wildtyp das „Quorum-Sensing“-negative Derivat SPR244 sowie das PCN-negative Derivat SPR644 eingesetzt. Beide besiedeln die Rhizosphäre von *A. thaliana* auch nach Transformation mit pJP4 erfolgreich. Stamm SPR344 wurde nicht weiter untersucht, da sich pJP4 *per se* negativ auf dessen Konkurrenzfähigkeit auswirkt. Sterile Mikrokosmen wurden im Verhältnis 1:1 mit je einem SPR044-Derivat und einem konkurrierenden Bakterienstamm zu einer OD₆₀₀ von 0,01 inokuliert und mit Samen von *A. thaliana* bestreut. Nach 14, 28 und 42 Tagen wurden je 10 Pflanzen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und einer Rhizosphärepräparation unterzogen. Die Suspensionen wurden auf Medien plattiert, die ggf. mit geeigneten Antibiotika supplementiert waren. Die

Populationsgrößen der plasmid-freien oder mit pJP4 transformierten SPR044-Derivate wurden zu den Populationsgrößen der koinokulierten Stämme ins Verhältnis gesetzt. Die für die plasmid-freien Derivate erhaltenen Werte wurden paarweise mit dem für die pJP4-tragenden Derivate erhaltenen Werten auf das Vorhandensein von signifikanten Unterschieden hin analysiert.

3.2.2.1 Koinokulation mit *P. aureofaciens* 30-84

Koinokulations-Experimente wurden zunächst mit *P. aureofaciens* 30-84 durchgeführt. Dieser Laborstamm ist sehr nahe mit *P. chlororaphis* verwandt. Er wurde als effizienter Rhizosphäre-Kolonisierer beschrieben (Mazzola *et al.* 1992), aber Kolonisierung der *A. thaliana*-Rhizosphäre wurde bisher nicht untersucht. Koinokulations-Experimente ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Verhältnis der Populationsgrößen der plasmid-freien bzw. pJP4-tragenden SPR044-Derivate zu den Populationsgrößen des koinokulierten Stammes. Nach 14 Tagen wurde ein Verhältnis des plasmid-freien Wildtyps zu *P. aureofaciens* von 0,96 und ein Verhältnis des pJP4-tragenden Wildtyps zum koinokulierten Stamm von 0,92 festgestellt. Beide Werte wichen also nicht signifikant voneinander ab und lagen nahe am ursprünglichen Verhältnis von 1:1. Das Verhältnis von SPR244 zu *P. aureofaciens* lag bei 0,95 für plasmid-freie bzw. bei 0,90 für pJP4-tragende Zellen. Im Fall von SPR644 ergab sich unabhängig von pJP4 ein Verhältnis von 0,92 zwischen den Populationen von SPR644 und *P. aureofaciens* (Abb. 13). In keinem Fall war also ein signifikanter Unterschied zwischen den Anteilen plasmid-freier und pJP4-tragender Zellen zu erkennen, und dies war auch nach Kultivierung für 28 und 42 Tage nicht der Fall.

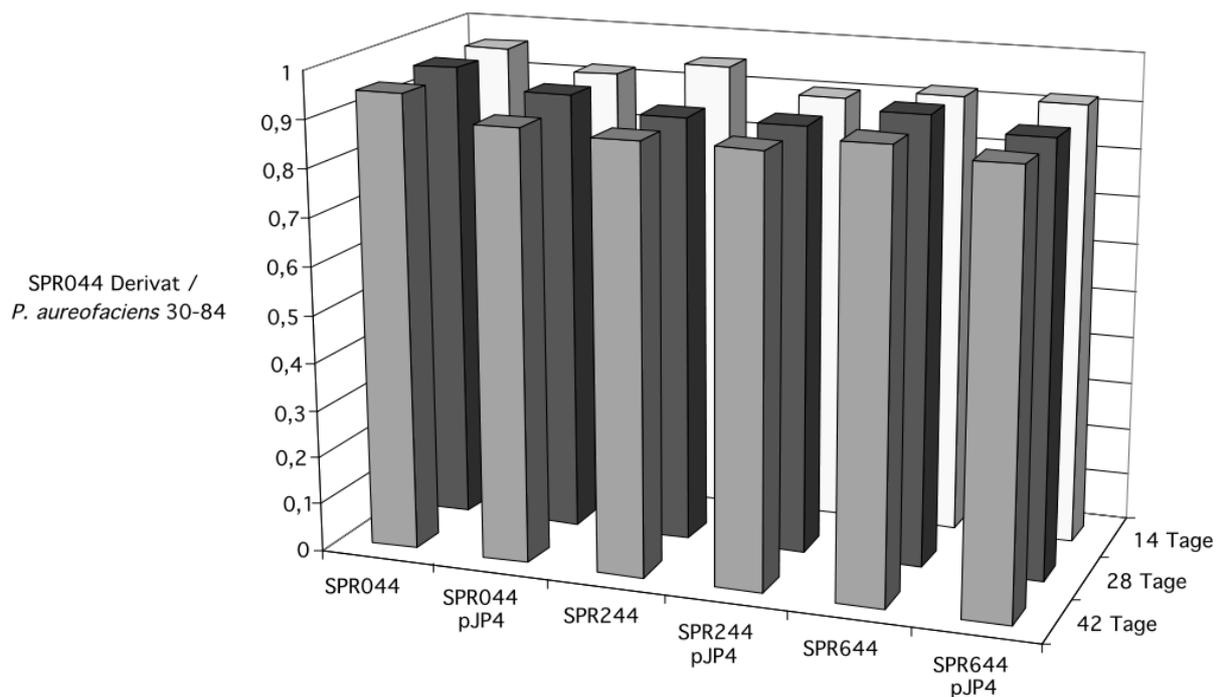


Abbildung 13: Einfluss von pJP4 auf die Konkurrenzfähigkeit von SPR044 bei Koinokulation mit *P. aureofaciens* 30-84. Der Durchschnitt von mindestens 4 unabhängigen Zählungen der CFU aus Koinokulations-Experimenten wurde errechnet. Gezeigt ist das Verhältnis der Populationsgrößen von SPR044 und Derivaten zu den Populationsgrößen des koinokulierten *P. aureofaciens* 30-84.

3.2.2.2 Koinokulation mit einer Mischung verschiedener Bakterien

Weiterhin wurde der Einfluss einer komplexeren Population untersucht. Dazu wurde mit einem Gemisch von Bakterien koinokuliert. Dieses enthielt die ebenfalls aus der natürlichen Rhizosphäre von *A. thaliana* isolierten Stämme *Pantoea agglomerans* und *Stenotrophomonas maltophilia* sowie die Laborstämme *R. eutropha* und *P. aureofaciens* 30-84. Die erhöhte Bakteriendichte bewirkte vermutlich eine Nährstoffverknappung, die sich in relativ niedrigen und über die 6 Wochen abnehmenden Werten für die Verhältnisse der SPR044-Derivate zum koinokuliertem Gemisch widerspiegelte. Nach 14 Tagen war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Verhältnis des plasmid-freien Wildtyps (0,94) und dem Verhältnis des pJP4-tragenden Wildtyps zum Gemisch (0,90) zu erkennen. Dies war auch für das Verhältnis plasmid-freier SPR244-Zellen (0,90) im Vergleich zu transformierten SPR244-Zellen (0,85) zu koinokuliertem Gemisch der Fall. Für SPR644 lagen die entsprechenden Werte bei 0,93 und 0,90. Auch nach 28 und 42 Tagen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Anteilen plasmid-freier und pJP4-tragender SPR044 bzw. dessen Derivaten zu erkennen.

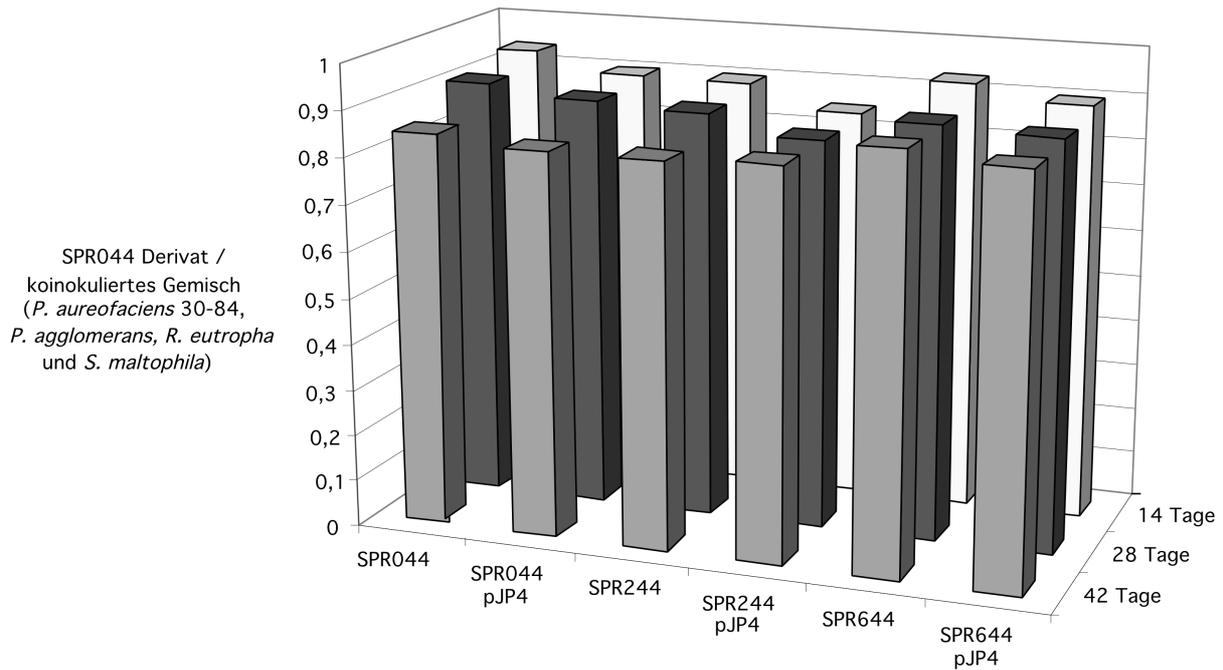


Abbildung 14: Einfluss von pJP4 auf die Konkurrenzfähigkeit von SPR044 bei Koinokulation mit einem bakteriellen Gemisch (*P. agglomerans*, *S. maltophila*, *R. eutropha* und *P. aureofaciens* 30-84). Der Durchschnitt von mindestens 4 unabhängigen Zählungen der CFU aus Koinokulations-Experimenten wurde errechnet. Gezeigt ist das Verhältnis der Populationsgrößen der SPR044-Derivate zu den Populationsgrößen des koinokulierten Gemisches.

3.2.2.3 Koinokulation mit *P. fluorescens* WCS417r

Zuletzt sollte der Einfluss von starker Konkurrenz untersucht werden, und zu diesem Zweck wurde *P. fluorescens* WCS417r koinokuliert. Dieser Stamm wurde als Kolonisierer beschrieben, der besonders gut an die Rhizosphäre von *A. thaliana* angepasst ist (Pieterse *et al.*, 1996; Pieterse *et al.*, 1998). Nach 14 Tagen lag das Verhältnis plasmid-freier Wildtyp zu WCS417r bei 1,0. Das Verhältnis SPR244 bzw. SPR644 zu *P. fluorescens* WCS417r lag bei 0,96 bzw. 0,97, was auf eine ähnliche initiale Kolonisierungseffizienz hinweist (Abb.15). Die Relationen pJP4-tragender SPR044, SPR244 bzw. SPR644 zu *P. fluorescens* WCS417r lagen bei 0,89, 0,91 bzw. 0,83. Somit war ein leichter Unterschied der Konkurrenzfähigkeiten pJP4-tragender Stämme zu erkennen, aber die Werte wichen nicht signifikant von denen der plasmid-freien Stämme ab. Nach 28 Tagen wurden ähnliche Verhältnisse ermittelt. Im Gegensatz dazu wurden nach 42 Tagen bei allen drei Stämmen signifikant kleinere Werte für das Verhältnis pJP4-tragender als für das Verhältnis plasmid-freier Derivate zu *P. fluorescens* erhalten. Das Verhältnis des plasmid-freien Wildtyps zu WCS417r lag mit 0,93 signifikant über dem des pJP4-tragenden Wildtyps zu WCS417r mit 0,7. Dies galt auch für plasmid-

freien SPR244 zu WCS417r (0,94) im Vergleich zu 0,71 des pJP4-tragenden SPR244 zum koinokulierten Stamm. Für SPR644 lagen die entsprechenden Anteile bei 0,86 und 0,76. Dies deutet darauf hin, dass pJP4 einen negativen Einfluss auf die Kolonisierungseffizienz hat, der sich erst nach längerer Kokultivierung manifestiert. Unter Einfluss von biotischem Stress in der Rhizosphäre kam somit die verringerte Fitness der pJP4-tragenden Stämme im Vergleich zu den plasmid-freien Stämmen zum Vorschein. Dieser Effekt scheint jedoch unabhängig von „Quorum-Sensing“ und PCN-Produktion zu sein.

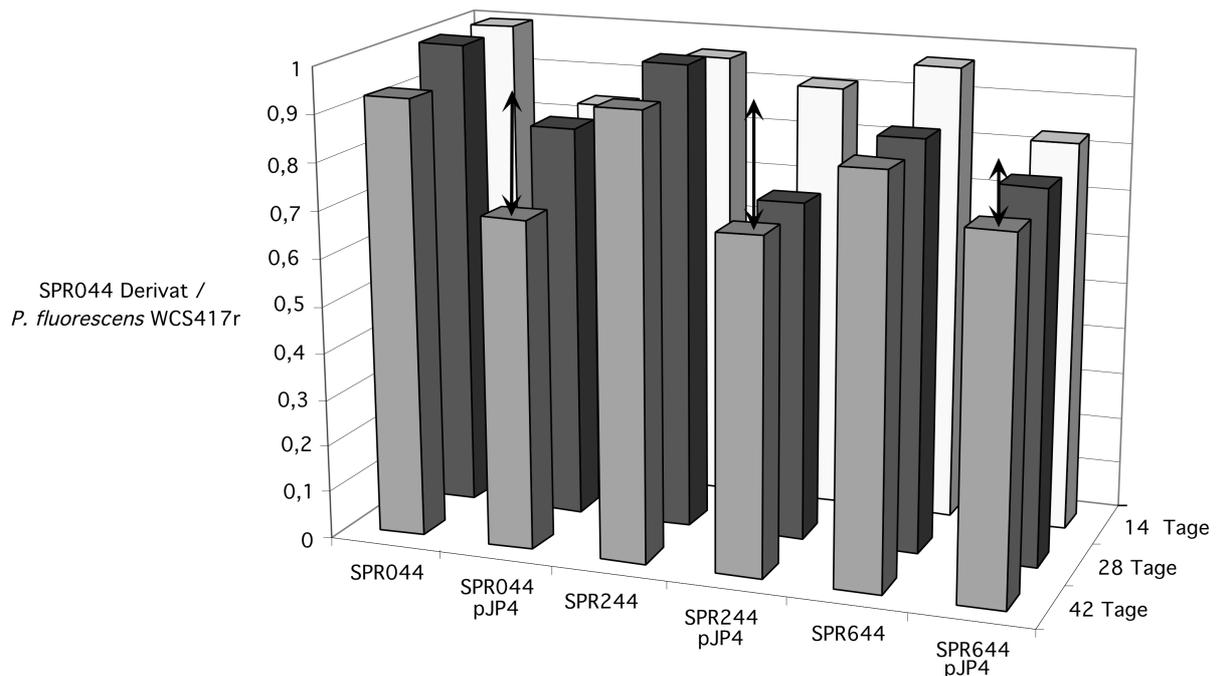


Abbildung 15: Einfluss von pJP4 auf die Konkurrenzfähigkeit von SPR044 bei Koinokulation mit *P. fluorescens* WCS417r. Der Durchschnitt von mindestens 4 unabhängigen Zählungen der CFU aus Koinokulations-Experimenten mit *P. fluorescens* WCS417r wurde errechnet. Gezeigt ist das Verhältnis der Populationsgrößen von SPR044 und Derivaten zu den Populationsgrößen des koinokulierten *P. fluorescens* WCS417r. Doppelpfeile zeigen signifikante Unterschiede zwischen den für den plasmid-freien und den pJP4-tragenden Stamm erhaltenen Werten.

3.2.3 Einfluss der Acyl-HSL- und PCN-Produktion auf den Plasmidtransfer

Neben der Kolonisierungseffizienz ist die Frequenz des Plasmidtransfers ein entscheidender Parameter für das Ausbringen plasmid-tragender Mikroorganismen für Bodensanierungsmaßnahmen. Die Transfereffizienz ist für den Erfolg der Sanierung entscheidend, da eine Weitergabe des Plasmids an indigene und daher optimal an das entsprechende Ökosystem angepasste Organismen eine erfolgreiche Regeneration begünstigt. Derartige Untersuchungen ermöglichen auch eine Einschätzung eventueller Langzeitauswirkungen eines derartigen

Projektes auf das Ökosystem. Daher ist die Kenntnis von Eigenschaften der eingebrachten Bakterien, welche den Transfer beeinflussen, von großem Interesse. In diesem Zusammenhang erschien die Untersuchung des Effekts der Produktion von Acyl-HSLs als vielversprechend. Der konjugative Transfer des Ti-Plasmids von *A. tumefaciens* wird neben der Stimulation durch pflanzliche Metabolite durch die TraI- und TraR-Proteine eines plasmid-kodierten „Quorum-Sensing“-System kontrolliert (Piper *et al.*, 1993). Über die Regulation des Transfers von IncP-Plasmiden liegen bisher nur wenig Informationen vor. Da das konjugative Transfer-system von IncP-Plasmiden mit dem des Ti-Plasmids nahe verwandt ist, war ein Einfluss von Acyl-HSLs auf den Plasmidtransfer denkbar (Alt-Mörbe *et al.*, 1996). Weiterhin sollte geklärt werden, ob eine Defizienz der PCN-Produktion die Transfereffizienz beeinflusst.

Sterile Mikrokosmen wurden mit je einem pJP4-tragenden Derivat von SPR044 und *R. eutropha* koinokuliert und mit Samen von *A. thaliana* bestreut. Die Transfereffizienz von pJP4 betrug nach 14-tägigem Wachstum bei allen untersuchten Derivaten 2% (Tab. 10). In Kontrollmikrokosmen mit plasmid-freien SPR044-Derivaten wurden keine Exkonjuganden gefunden. Auch die absoluten Zahlen der ermittelten Exkonjuganden wiesen keine signifikanten Unterschiede auf ($P > 0,05$) und lagen zwischen $8,7 \times 10^6$ für SPR044 und $4,2 \times 10^6$ für SPR644. Der Unterschied vom Faktor 2 korrelierte direkt mit der Zahl der detektierten Donoren und war daher nicht auf die fehlende PCN-Produktion durch SPR644 zurückzuführen. Auch nach 28 und 42 Tagen waren keine signifikanten Unterschiede der Transfereffizienz erkennbar. Die Transferrate betrug für die drei untersuchten SPR044-Derivate zwischen 2% und 4%. Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Untersuchungen, dass der Transfer des IncP-Plasmids pJP4 keiner Regulation durch „Quorum-Sensing“ unterliegt. Auch eine Defizienz der PCN-Produktion führte nicht zu veränderten Transferraten.

Tabelle 10: Transfer des pJP4-Plasmids in der Rhizosphäre von *A. thaliana* zwischen SPR044 und Derivaten als Donor und *R. etropha* als Rezipienten.

| Stamm | Zahl der Bakterien/ g Rhizosphäre ^a | | | | | | | | |
|--|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | SPR044 | | | SPR244 | | | SPR644 | | |
| | 14 Tage | 28 Tage | 42 Tage | 14 Tage | 28 Tage | 42 Tage | 14 Tage | 28 Tage | 42 Tage |
| Donoren (10 ⁸ CFU) | 3,8 | 2,2 | 1,4 | 2,8 | 2,6 | 2,6 | 1,8 | 1,3 | 1,5 |
| Rezipienten (10 ⁷ CFU) | 5,5 | 6,9 | 4,5 | 5,1 | 8,4 | 8,8 | 2,2 | 5,0 | 8,6 |
| Exkonjuganden (10 ⁶ CFU) | 8,7 | 9,1 | 5,8 | 6,7 | 8,4 | 9,5 | 4,2 | 3,6 | 3,6 |
| Transfer - Effizienz ^b | 2 % | 4 % | 4 % | 2 % | 3 % | 4 % | 2 % | 3 % | 3 % |

^a Durchschnittswert aus den Zählungen von 6 Replikaten.

^b Verhältnis von Exkonjuganden zu Donorzellen.

3.3 Detektion plasmid-tragender Zellen in der Rhizosphäre

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es, am Beispiel des hinsichtlich seiner biotechnologischen Anwendungen bereits gut untersuchten Modellplasmids pJP4 eine Strategie zum „Biomonitoring“ der Plasmidverbreitung zu entwickeln. Diese sollte eine von der Kultivierung unabhängige Detektion plasmid-tragender Bakterien ermöglichen. Prinzipiell sollte die Methode somit auch die Erfassung nicht kultivierbarer Bakterien erlauben. Resultate verschiedener Labors belegen, dass plasmid-tragende Stämme auf ihrer Oberfläche konjugative Pili tragen (Lai und Kado, 1998). Diese könnten gut zugängliche Antigene für spezifische Antikörper enthalten und damit das „Biomonitoring“ ermöglichen. Basierend auf dieser Hypothese wurden Piluskomponenten zunächst identifiziert, spezifische Antiseren wurden generiert und hinsichtlich ihrer Eignung für das „Biomonitoring“ untersucht.

Da die Transferregionen von Plasmiden verschiedener Inkompatibilitätsgruppen signifikante Sequenz-Ähnlichkeiten haben und vermutlich ähnliche Mechanismen zum konjugativen Transfer benutzen (Winans *et al.*, 1996), schien es sinnvoll, zuerst die Piluskomponenten bereits besser untersuchter Typ IV-Sekretionssysteme zu identifizieren (Christie, 1997). Die Erkenntnisse wurden dann auf das hinsichtlich seines Plasmidtransfers bisher noch nicht untersuchte IncP-Plasmid pJP4 übertragen.

3.3.1 Identifikation oberflächen-exponierter Proteine von *A. tumefaciens*

Das Typ IV-Sekretionssystem von *A. tumefaciens* ist hinsichtlich seiner Funktion und seiner Zusammensetzung am besten untersucht (Christie, 1997). Analog zum pilus-abhängigen konjugativen Transfer des F-Episoms, bindet der *Agrobacterium*-Pilus wahrscheinlich an die Pflanzenzelle und kann so den Transfer des T-Komplexes einleiten. Um den Mechanismus der DNA-Übertragung und der Pilus-Assemblierung genauer untersuchen zu können, war die Identifikation der Piluskomponenten von großem Interesse.

3.3.1.1 Isolierung des T-Pilus von virulenzgen-induzierten *A. tumefaciens*-Zellen

Basierend auf relativ geringen Sequenz-Ähnlichkeiten zu TraA, der Hauptkomponente des F-Pilus, war VirB2 als Hauptkomponente des T-Pilus postuliert worden (Jones *et al.*, 1996). Parallel zu unseren Arbeiten wurde gezeigt, dass VirB2 tatsächlich diese Funktion übernimmt (Lai und Kado, 1998). Zusätzliche Komponenten wurden nicht identifiziert, obwohl verschiedene Evidenzen auf das Vorhandensein von minoren Komponenten des Pilus hindeuteten (Anthony *et al.*, 1994). Um derartige Komponenten zu finden wurden im Rahmen dieser Arbeit C58-Zellen in Anwesenheit von Acetosyringon auf sauren Minimalmedium-Platten zur Induktion der Virulenzgene kultiviert. Um multimere Strukturen von der Zelloberfläche zu lösen, wurden die Zellen mehrfach durch eine Spritzen-Kanüle gezogen. Nach Abtrennung der Zellbestandteile wurde der Überstand einer Ultrazentrifugation unterzogen, um lösliche von hochmolekularen Bestandteilen wie Flagellen und Pili zu trennen. Die verschiedenen subzellulären Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und „Western-Blot“-Analyse mit spezifischen Antiseren (anti-VirB2, anti-VirB3, anti-VirB5, anti-VirB8, anti-VirB9, anti-VirB11 und anti-VirE2) untersucht. Während sämtliche der genannten Proteine im Zellysate nachgewiesen wurden (nicht gezeigt), enthielt der Überstand vor der Ultrazentrifugation (Ü1) nur signifikante Mengen an VirB1*, VirB2 und VirB5 (Abb. 16). Der Überstand nach der Ultrazentrifugation enthielt Proteine, die nicht in einer hochmolekularen Struktur vorliegen. Hier konnte ausschließlich VirB1* nachgewiesen werden, das offenbar ein lösliches, weder mit der Zelle noch mit Zelloberflächen-Strukturen assoziiertes Protein ist. Im Sediment der Ultrazentrifugation wurden nur geringe Mengen VirB1* detektiert. Neben der Haupt-Piluskomponente VirB2 wurden signifikante Mengen VirB5 im Sediment der Ultrazentrifugation nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass VirB5 neben VirB2 eine Komponente der T-Pili darstellt.

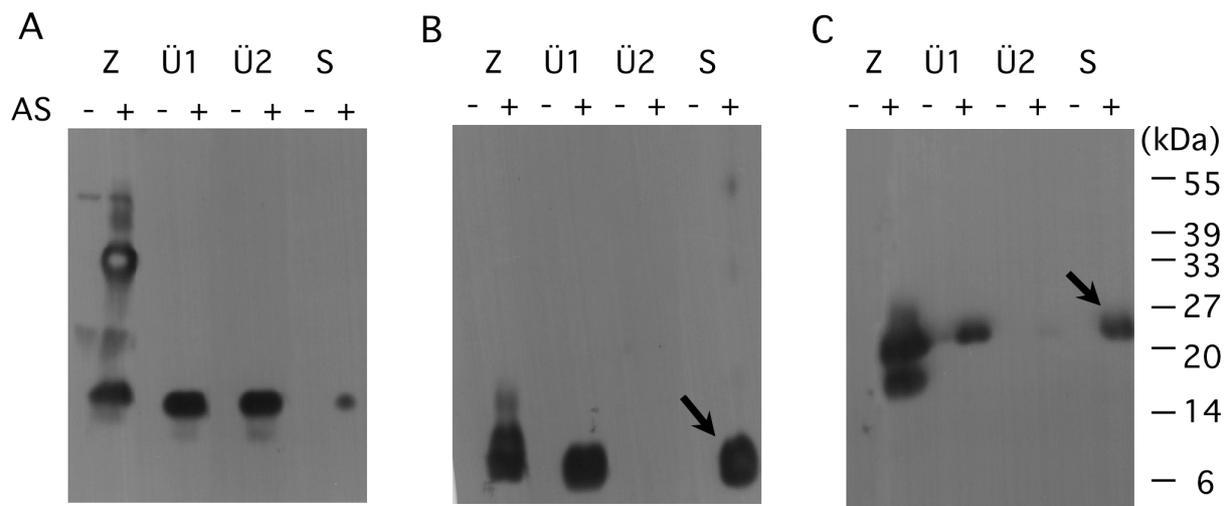


Abbildung 16: Isolierung von T-Pili von der Oberfläche des *Agrobacterium tumefaciens* Wildtyp-Stammes C58. Hochmolekulare Strukturen wurden durch Scherkräfte von der Zelloberfläche von *Agrobacterium*-Zellen abgelöst, die auf AB-Minimalmedium unter virulenzgen-induzierenden (+AS) oder nicht induzierenden (-AS) Bedingungen kultiviert worden waren. Die erhaltenen Proben Z (Zellen), Ü1 (Überstand nach dem Scheren), Ü2 (Überstand nach der Ultrazentrifugation) und S (Sediment nach der Ultrazentrifugation) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit Antiseren, die für VirB1 (A), VirB2 (B) oder VirB5 (C) spezifisch waren, analysiert. VirB-Proteine, die nach der Ultrazentrifugation im Sediment detektierbar waren, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.3.1.2 Kofraktionierung von VirB5 und VirB2 im Saccharosegradienten

Weitere Evidenzen für die Assoziation von VirB5 mit dem T-Pilus ergaben sich aus der Kofraktionierung von VirB2 und VirB5 während der Gelfiltrations-Chromatographie (C. Baron, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus sollten T-Pili ohne die Analyse störende Flagellen-Proteine aus dem flagellenlosen Derivat von C58 (NT1REB pJK270) aufgereinigt werden.

Zu diesem Zweck wurden die bei der Ultrazentrifugation erhaltenen Sedimente einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (10-70% w/v) unterzogen. Die Proteine der gesammelten Fraktionen wurden gefällt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. „Western-Blot“-Analyse zeigte Kofraktionierung von VirB2 und VirB5 in den Fraktionen 3 bis 11 (Abb. 17). Dies lieferte einen weiteren unabhängigen Hinweis darauf, dass VirB5 Teil des T-Pilus sein könnte.

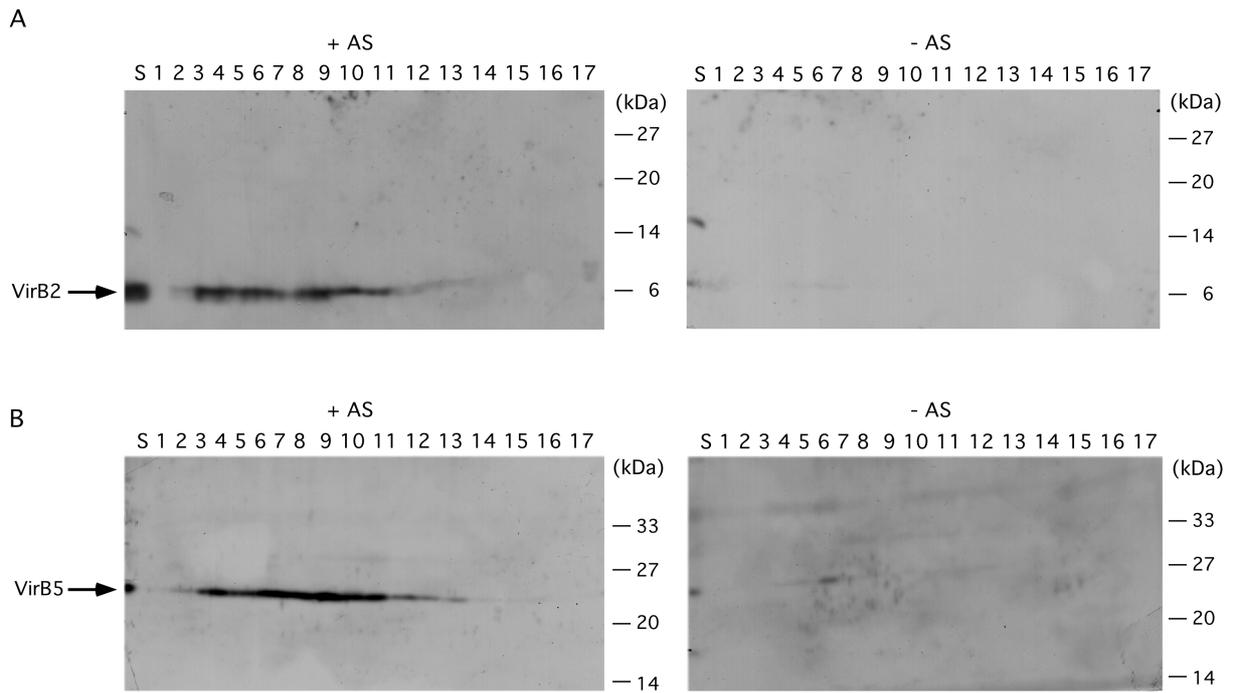


Abbildung 17: Kofraktionierung von VirB2 und VirB5 während der Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten. Hochmolekulare Strukturen wurden durch Scherkräfte von der Zelloberfläche des flagellenlosen C58-Derivats NT1REB pJK270 abgelöst, das auf AB-Minimalmedium unter virulenzgen-induzierenden (+AS) oder nicht induzierenden (-AS) Bedingungen kultiviert worden war. Mittels Ultrazentrifugation wurden hochmolekulare Strukturen angereichert und durch anschließende Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Proteine im nach der Ultrazentrifugation erhaltenen Sediment (S) und in den Fraktionen (1 bis 17 von oben nach unten abgenommen) des Gradienten wurden gefällt und mittels SDS-PAGE und „Western-Blot“-Analyse mit VirB2- (A) und VirB5-spezifischen (B) Antiseren analysiert.

Zusätzlich wurde der Erfolg der Reinigung durch SDS-PAGE von Proben aus den verschiedenen Schritten und anschließende Silberfärbung der Gele untersucht. Im Verlauf der Reinigung wurde eine deutliche Anreicherung der Haupt-Piluskomponente VirB2 bei gleichzeitigem Verschwinden kontaminierender Proteine erreicht (Abb. 18). VirB5 konnte mittels Silberfärbung jedoch nicht im Gel visualisiert werden, da es offensichtlich in deutlich geringerer Menge vorliegt als die Haupt-Piluskomponente VirB2. Bei Auftragen größerer Probenvolumina wurden im Bereich der molekularen Masse von VirB5 zwischen 20 und 27 kDa diverse schwache Signale detektiert, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

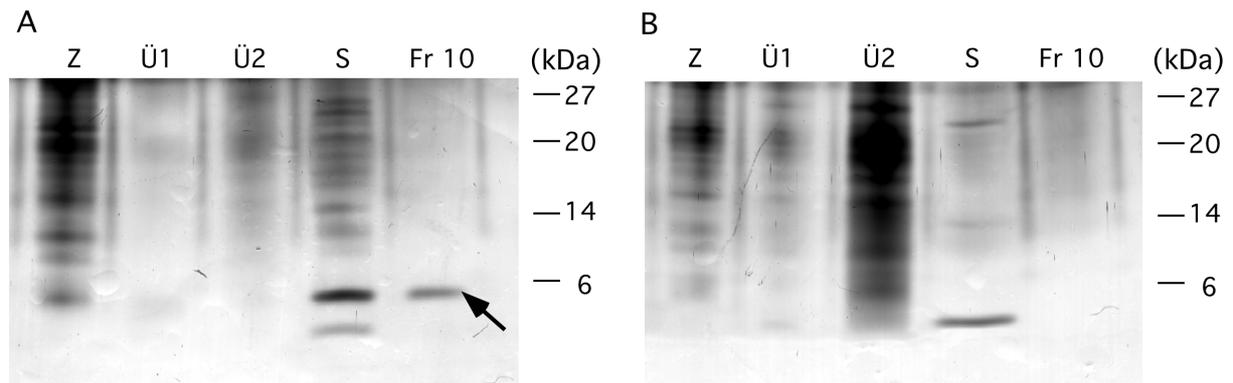


Abbildung 18: Reinigung der T-Pili von der Zelloberfläche des flagellenlosen C58-Derivats. NT1REB pJK270 Zellen wurden auf AB-Minimalmedium unter virulenzgen-induzierenden (A) oder nicht induzierenden (B) Bedingungen kultiviert. Hochmolekulare Strukturen wurden durch Scherkräfte von der Zelloberfläche abgelöst, mittels Ultrazentrifugation von löslichen Bestandteilen abgetrennt und durch eine anschließende Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Fraktionen der Zellen (Z), Überstand nach dem Scheren (Ü1), Überstand nach der Ultrazentrifugation (Ü2), Sediment der Ultrazentrifugation (S) und Fraktion 10 (Fr 10) des Saccharosegradienten. Das der angereicherten Haupt-Piluskomponente VirB2 entsprechende Signal ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.3.2 Untersuchung der pKM101-determinierten Pili

Die in der Transferregion (*tra*) des 35,4 kb großen konjugativen IncN-Plasmids pKM101 kodierten Proteine haben signifikante Ähnlichkeiten zu den 11 VirB-Proteinen, welche den Transmembrankanal des Typ IV-Sekretionssystems von *A. tumefaciens* ausbilden. Bereits im Rahmen der vorangehenden Diplomarbeit war gezeigt worden, dass TraC in Membranfraktionen von pKM101-tragenden Zellen lokalisiert (Schmidt-Eisenlohr, 1998).

3.3.2.1 Zelluläre Lokalisierung von TraC in pKM101-tragenden Zellen

Um die Lokalisierung genauer zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Trennung der inneren und äußeren Membran von pKM101-tragenden und plasmid-freien *E. coli* FM433 durchgeführt. Die Zellen wurden auf LB-Agar kultiviert, in einer „French Press“-Zelle aufgebrochen und periplasmatische und zytoplasmatische Proteine wurden durch Ultrazentrifugation von Membranproteinen abgetrennt. Um die innere und äußere Membran

voneinander zu trennen, wurde ein isopyknischer Saccharosegradient verwendet. Die Fraktionen des Gradienten wurden mittels SDS-PAGE und „Western-Blot“-Analyse untersucht. Coomassie-Färbung des SDS-Gels zeigte eine gute Trennung der beiden Membranen, da im Unterschied zu den Spuren 1-12 in den Spuren 13-16 die in der äußeren Membran lokalisierten Porine zu erkennen waren. Die Qualität der Auftrennung wurde zusätzlich durch Messung der NADH-Oxidase-Aktivität bestätigt (nicht gezeigt). NADH-Oxidase-Aktivität konnte in den Fraktionen 1 bis 5 nachgewiesen werden, die daraufhin der inneren Membran zugeordnet wurden. „Western-Blot“-Analyse mit TraC-spezifischem Antiserum zeigte, dass TraC vorzugsweise mit der inneren Membran assoziiert (Abb.19B).

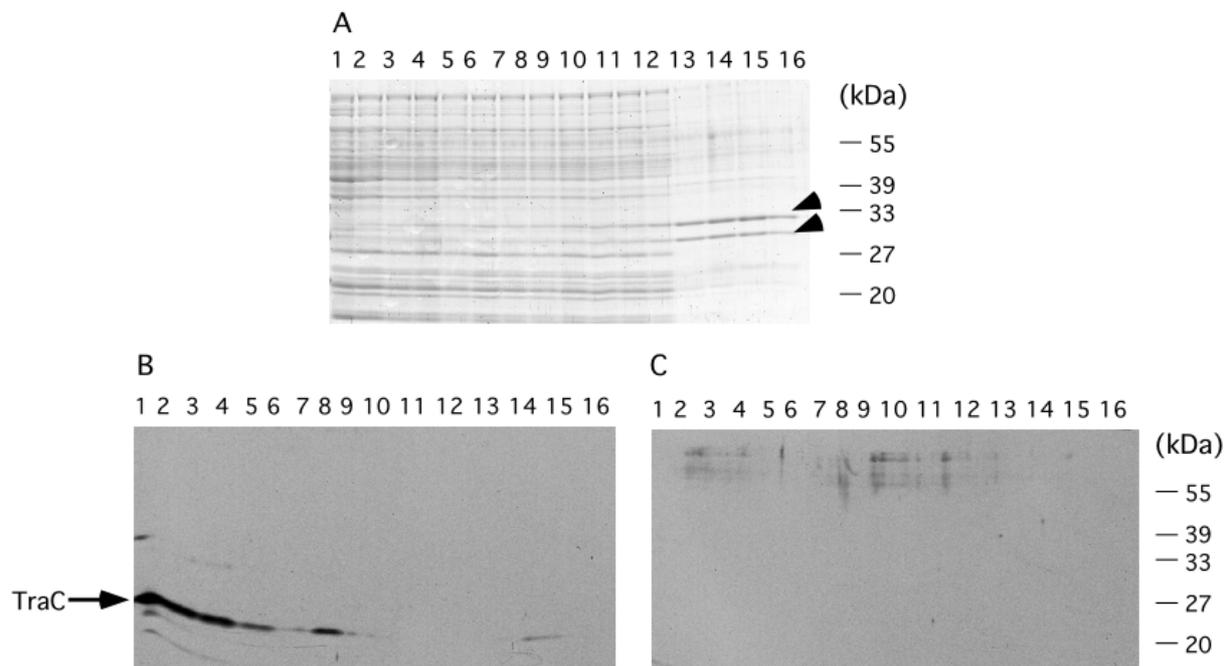


Abbildung 19: Membranfraktionierungen pKM101-tragender und plasmid-freier *E. coli* FM433-Zellen. Membranen von plasmid-freien und pKM101-tragenden FM433-Zellen wurden einer isopyknischen Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. Die Fraktionen 1-16 wurden von oben nach unten entlang des Gradienten gesammelt. SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung detektierte die für die äußere Membran charakteristischen Porine in den Fraktionen 13-16 (A). „Western-Blot“-Analyse der Fraktionen von pKM101-tragenden FM433-Zellen (B) und plasmid-freien FM433-Zellen (C) mit TraC-spezifischem Antiserum zeigte, dass TraC vorzugsweise mit in der inneren Membran assoziiert. Pfeilspitzen deuten auf die für Porine charakteristischen Signale, und der Pfeil zeigt das TraC-spezifische Signal.

3.3.2.2 Analyse der pKM101-determinierten Zelloberflächenproteine mittels „Western-Blot“-Analyse

Winans *et al.* hatten gezeigt, dass der Konjugationsdefekt von pKM101*traC*::Tn5 teilweise durch einen Helferstamm mit funktionsfähiger Transfermaschinerie komplementiert werden kann. Diese extrazelluläre Komplementation ließ eine extrazelluläre Funktion von TraC, möglicherweise als Piluskomponente, vermuten. Erste Hinweise dazu wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit durch die Isolierung pKM101-determinierter Zelloberflächenproteine erhalten (Schmidt-Eisenlohr, 1998).

Um weitere Belege für den Einbau von TraC in den konjugativen Pilus zu erhalten, wurden Oberflächenstrukturen aus Zellen mit pKM101-Derivaten untersucht, die Insertionen in verschiedenen Genen der *tra*-Region trugen (*traM*, *traB*, *traC*, *eex*, *traD* oder *traE*). Zelloberflächenstrukturen wurden durch Scherkräfte von den Zellen gelöst. Nach Abtrennung der Zellen wurden die Überstände einer Ultrazentrifugation zur Sedimentation hochmolekularer Strukturen unterzogen. Der TraC-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und „Western-Blot“-Analyse untersucht (Abb. 20). Mit Ausnahme der Negativkontrolle FM433 pKM101*traC*::Tn5 wurde TraC im Totalzelllysat aller Stämme sowie in den Überständen nach dem Scheren und nach der Ultrazentrifugation detektiert. TraC wurde jedoch nur im Sediment aus FM433 pKM101 und pKM101*eex*::Tn5 nach der Ultrazentrifugation nachgewiesen. Insertion im *eex*-Gen beeinträchtigt die Konjugation nicht, während Insertion in *traM*, *traB*, *traC*, *traD* oder *traE* zu konjugations-defizienten Plasmiden führt. Somit ergab sich eine Korrelation der Assoziation von TraC mit Oberflächenstrukturen hoher molekularer Masse in Bakterien mit konjugations-fähigen Plasmiden.

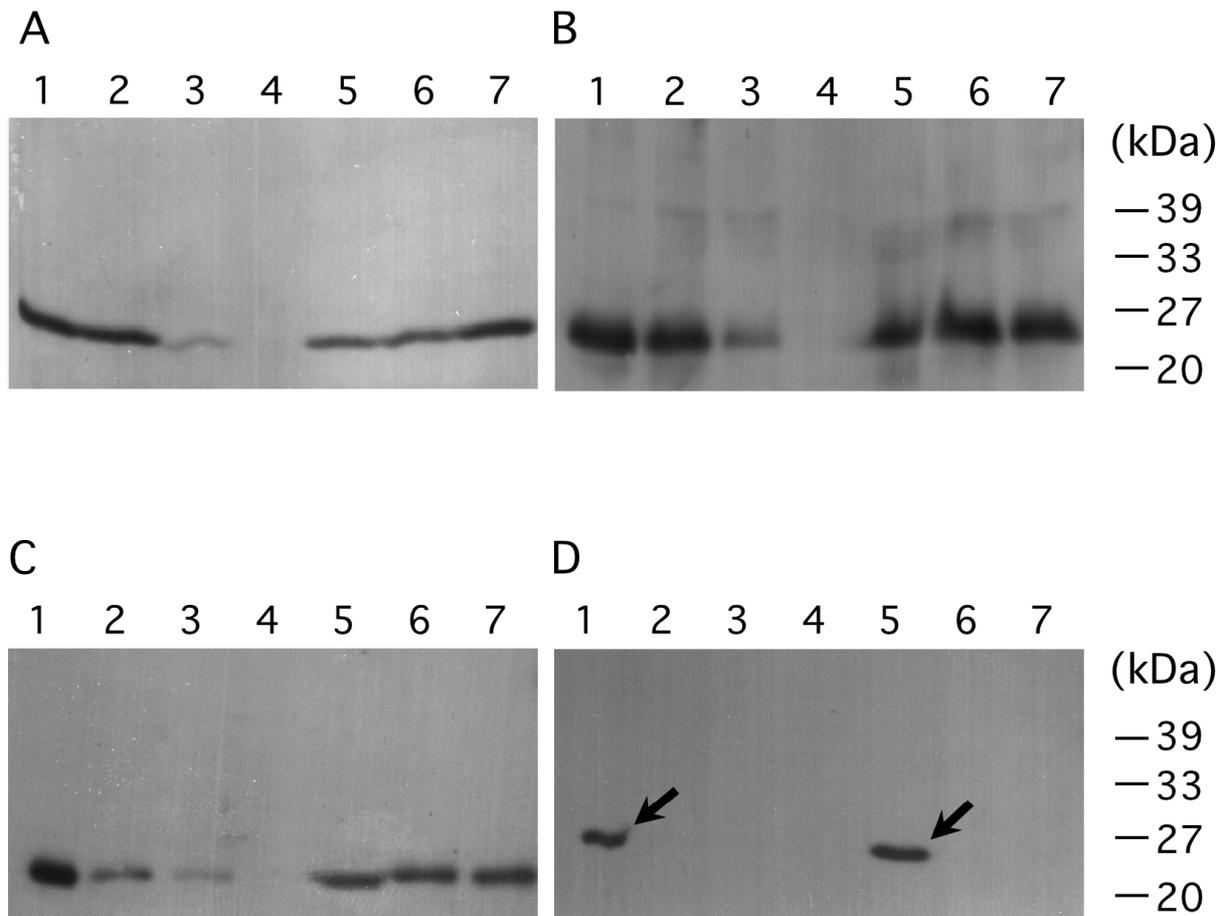


Abbildung 20: Zelluläre Lokalisierung von TraC in FM433 mit pKM101 und verschiedenen Transposon-Insertionsderivaten. Hochmolekulare Strukturen wurden durch Scherkräfte von der Oberfläche von FM433-Zellen, die pKM101 (1) oder ein Derivat, mit einer Tn5-Insertion in *traM* (2), *traB* (3), *traC* (4), *eex* (5), *traD* (6) oder *traE* (7) trugen, entfernt und mittels Ultrazentrifugation angereichert. Proben aus dem Zelllysate (A), dem Überstand nach dem Scheren (B), dem Überstand nach der Ultrazentrifugation (C) und dem Sediment der Ultrazentrifugation (D) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch auf das Vorhandensein von TraC untersucht.

Um sicherzustellen, dass bei der Isolierung der Pili die Integrität der Zelle nicht beschädigt wird, wurden Zellfraktionen aus FM433 pKM101 mit spezifischen Antiseren gegen das periplasmatische Protein MalE und das zytoplasmatische Protein SclA untersucht. Beide Proteine wurden nur in ganzen Zellen nachgewiesen, womit belegt wurde, dass bei obiger Prozedur keine signifikanten Mengen löslicher Proteine aus *E. coli* frei werden (Abb. 21). TraC assembliert also in einer hochmolekularen Struktur auf der Oberfläche von Zellen mit einem den vollständigen Transferapparat produzierenden pKM101-Derivat.

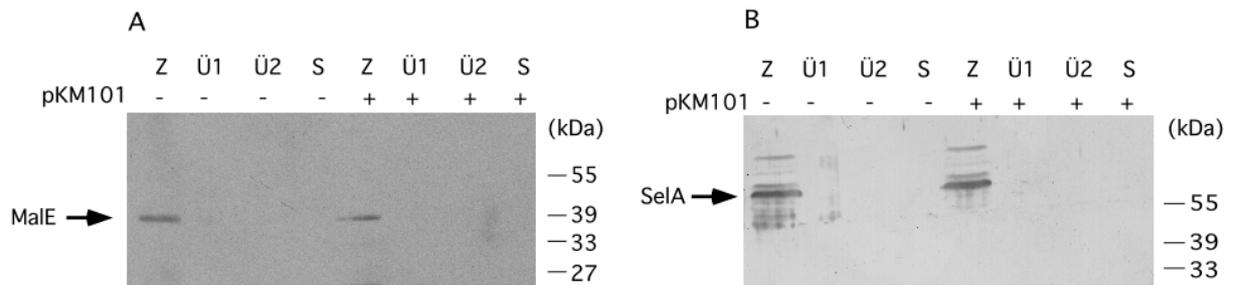


Abbildung 21: Kontrolle der Zellintegrität. Proben der während der Piluspräparation erhaltenen Fraktionen, nämlich des Zelllysats (Z), des Überstandes nach dem Scheren (Ü1), des Überstandes nach der Ultrazentrifugation (Ü2) und des Sediments der Ultrazentrifugation (S) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und zur Überprüfung des Gehalts an peri- oder zytoplasmatischen Proteinen immunologisch auf das Vorhandensein von MalE (A) bzw. SelA (B) hin untersucht.

3.3.2.3 Analyse der pKM101-determinierten Zelloberflächenproteine mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie

Um einen direkten Nachweis für das Vorhandensein von pKM101-determinierten Pili in den Sedimenten der Ultrazentrifugation zu erhalten, wurden die Proben eines plasmid-freien bzw. pKM101-tragenden, flagellenlosen *E. coli*-Stammes (JE2571) mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. In der Probe mit Zelloberflächenstrukturen von JE2571 pKM101 wurden filamentöse Strukturen nachgewiesen, deren Dimensionen mit denen des T-Pilus von *A. tumefaciens* übereinstimmten (Abb. 22; Lai und Kado, 1998). In der Kontrollprobe aus plasmid-freien JE2571-Zellen fehlten derartige Strukturen.

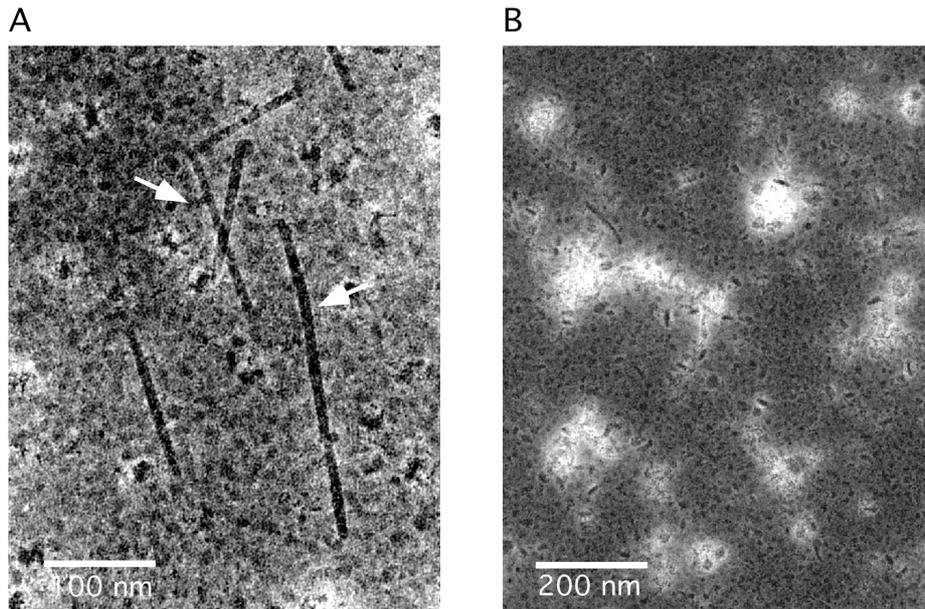


Abbildung 22. Transmissions-elektronenmikroskopische Analyse pKM101-determinierter Pili. Nach Scheren und Ultrazentrifugation erhaltene Proben von Zelloberflächenstrukturen wurden mit 1% Uranylacetat (w/v) negativ gefärbt. Gezeigt sind Aufnahmen von Präparationen zelloberflächen-assoziiierter Strukturen pKM101-tragender (A) und plasmid-freier (B) Zellen des flagellenlosen *E. coli* Stammes JE2571. Pfeile deuten auf pKM101-determinierte Pili.

3.3.2.4 Analyse des Molekulargewichts mittels Gelfiltrations-Chromatographie

Zur Analyse des Molekulargewichts der TraC enthaltenden Zelloberflächenstrukturen wurde das bei der Ultrazentrifugation erhaltene Sediment einer Gelfiltrations-Chromatographie über eine Superose 6-Säule unterzogen. Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE und „Western Blot“ zeigte, dass TraC in zwei Fraktionen eluierte (Abb. 23). Dies deutet darauf hin, dass TraC mit Komplexen verschiedener Größe assoziiert. Ein Vergleich mit den Elutionsvolumina verschiedener Referenzproteine ergab für den in Fraktion 6 eluierenden Komplex ein Molekulargewicht größer als 440 kDa (Ferritin), was mit der Lokalisierung im Pilus übereinstimmt. Der in Fraktion 11 vorliegende Komplex eluierte dagegen von der Säule wie gereinigtes TraC, welches auch bei Gelfiltration über eine Superdex 75-Säule als Dimer eluierte (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999). Zusammenfassend belegen obige Untersuchungen eindeutig die Assoziation von TraC mit einem hochmolekulare Pili enthaltenden Komplex aus pKM101-tragenden Zellen.

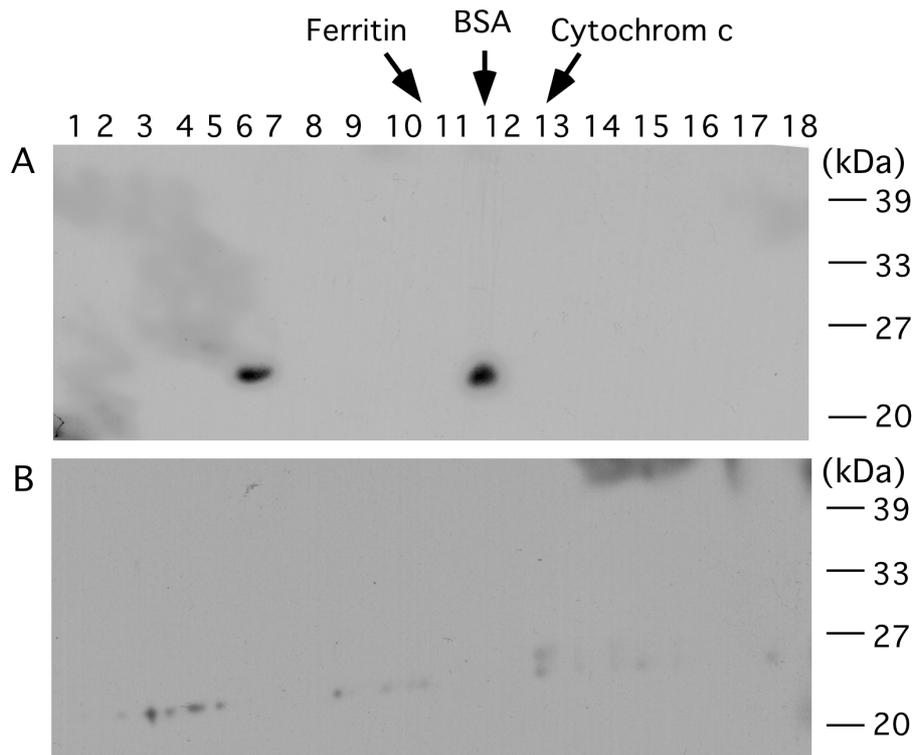


Abbildung 23: Abschätzung des Molekulargewichts der hochmolekularen Struktur aus pKM101-tragenden Zellen. Zelloberflächenstrukturen von pKM101-tragenden (A) und von plasmidfreien Zellen (B) wurden einer Gelfiltration über eine Superose 6-Säule unterzogen. Gezeigt ist die Analyse der erhaltenen Fraktionen nach Auftrennung mit SDS-PAGE gefolgt von immunologischer Detektion von TraC. Die molekularen Massen der Referenzproteine betragen 440 kDa für Ferritin, 68 kDa für BSA und 12 kDa für Cytochrom c.

3.3.3 Analyse des Typ IV-Sekretionssystems des IncP-Plasmids pJP4

Basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen von T-Pili sowie von pKM101-kodierten Pili sollte die Zusammensetzung der durch das IncP-Plasmid pJP4 kodierten Pili determiniert werden. Ziel dieser Untersuchung war die Entwicklung von Antikörpersonden für das „Biomonitoring“ plasmid-tragender Zellen in der Rhizosphäre. Dies sollte die Analyse des Transfers von pJP4 im Boden unabhängig von der Kultivierung der Zellen ermöglichen.

3.3.3.1 Klonierung von *trbC*, *trbF* und *trbH*

Für die zelluläre Lokalisierung sowie für die *in situ*-Analyse des Plasmidtransfers in der Rhizosphäre mittels Immunfluoreszenz waren Antiseren erforderlich, die spezifisch an Komponenten des pJP4-determinierten Typ IV-Sekretionssystems binden. Deshalb sollte die kodierende DNA kloniert werden, um Überproduktion und Reinigung der entsprechenden Komponenten zu ermöglichen. Basierend auf Sequenz-Ähnlichkeiten zu anderen Typ IV-Sekretionssystemen wurde TrbC als vermutliche Haupt- und TrbF als vermutliche Nebenkomponekte des Pilus identifiziert. Da auch andere Komponenten des Typ IV-Sekretionssystems für das „Biomonitoring“ geeignet sein könnten, wurde das Lipoprotein TrbH in unsere Untersuchungen einbezogen.

Die Gene sollten im T7-System überexprimiert werden. Um parallele Klonierung in Expressions- und andere im Labor genutzte Vektoren zu ermöglichen, wurde die in der MCS des T7-Plasmids pT7-7 vorhandene *NdeI*-Schnittstelle durch eine *NcoI*-Schnittstelle ersetzt. Zirkularisierte pT7-7 DNA diente als Matrize für eine inverse PCR. Die divergierend angeordneten Oligonukleotide (pT7-7 5' und pT7-7 3') wurden so gewählt, dass unter Einhaltung des Abstands vom Promotor und Beibehaltung des auch in der *NdeI*-Schnittstelle enthaltenen Start-Codons letztere durch eine *NcoI*-Schnittstelle substituiert wurde. Das lineare PCR-Fragment konnte nach Elution und Restriktion mit *NcoI* religiert und in JM109 transformiert werden.

Die Leserahmen von *trbC*, *trbF* und *trbH* wurden mit auf Basis der Sequenz des nahe verwandten IncPB-Plasmids R751 (Thorsted *et al.*, 1998) generierten Oligonukleotiden und gereinigter pJP4-DNA als Matrize amplifiziert, direkt in pT7-7_{NcoI} kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab verglichen mit den entsprechenden Genen aus R751 98,7% (459/465 Nukleotide) Identität für *trbC*, 99,4% (778/783 Nukleotide) Identität für *trbF* und 99,6% für *trbH* (487/489 Nukleotide). Da sich aufgrund der Hydrophobizität der Proteine die Überproduktion von TrbC sowie TrbH im pT7-7-System als unmöglich erwies, wurden die beiden Gene als *trxA*-Fusionen in pT7-H₆TrxFus kloniert, was Überexpression der klonierten Gene erlaubte. Statt des gesamten für TrbC kodierenden Leserahmens wurde der des vermutlich als Pilin dienenden "Core" kloniert, der gemäß Vorhersage durch Sequenzanalyse nach der Prozessierung des Propilins verbleibt (Eisenbrandt *et al.*, 2000).

3.3.3.2 Reinigung von TrbC, TrbF und TrbH für die Generierung polyklonaler Antiseren

Die Expression der klonierten Gene bei Temperaturen zwischen 20°C und 37°C führte zum überwiegenden Teil zur Synthese der Proteine in Form unlöslicher Einschlusskörper. Diese wurden angereichert und durch SDS-PAGE und anschließende Elution aus dem Gel aufgereinigt (Abb. 24). Somit wurden zwischen 0,6 und 1,1 mg Protein gewonnen und für die Immunisierung von Hasen eingesetzt.

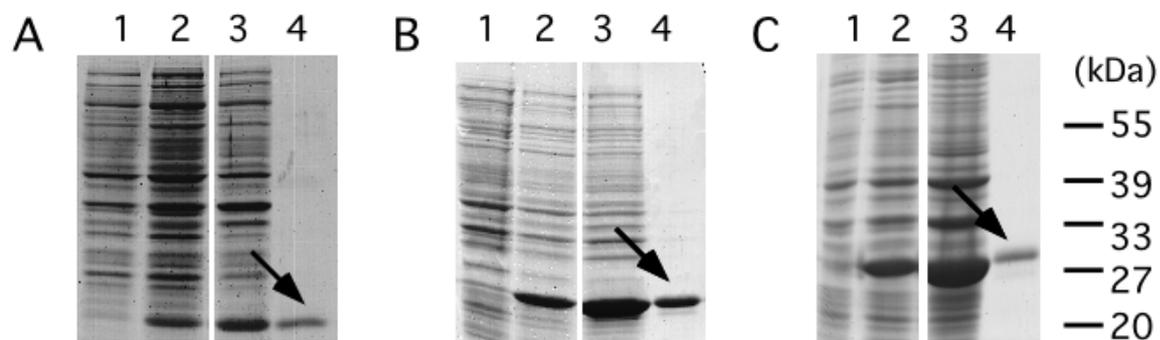


Abb. 24: Verlauf der Aufreinigung von „inclusion-bodies“. H₆Trx-TrbC_{core} (A), H₆Trx-TrbH (B) und TrbF (C) wurden für die Produktion von Antiseren überproduziert und als „inclusion-bodies“ aufgereinigt. Lysate von die Expressionsplasmide tragenden Zellen vor (1) und nach der Induktion mit 0,5 mM IPTG (2) sowie Proben der „inclusion-body“-Präparation (3) und des eluierten Proteins (4) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und das Gel wurde mit Coomassie angefärbt.

Die Spezifität der erhaltenen Antiseren wurde mittels „Western-Blot“-Analyse an Extrakten von *P. chlororaphis* mit und ohne pJP4 getestet. TrbF- und TrbH-spezifische Antiseren detektierten spezifisch Proteine der zu erwartenden molekularen Massen in Lysaten von pJP4-tragenden Zellen. In den Proben plasmid-freier *P. chlororaphis*-Zellen wurden keine Proteine detektiert (Abb. 25A). Das TrbC-spezifische Antiserum erkannte ebenfalls ein Protein der erwarteten molekularen Masse, welches in plasmid-freien Zellen nicht vorhanden war. Allerdings zeigten sich auch Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen von *P. chlororaphis*, die nicht mit dem Vorhandensein von pJP4 korrelierten (Abb. 25A).

3.3.3.3 Lokalisierung von TrbC, TrbF und TrbH in der Zelle

Um die zelluläre Lokalisierung der Trb-Proteine zu untersuchen, wurden pJP4-tragende und plasmid-freie *P. chlororaphis* SPR044- und *E. coli* JE2571-Zellen auf Festagar kultiviert. Die Zelloberflächenkomponenten wurden durch Scheren durch eine Kanüle von der Zelloberfläche abgetrennt, und weitere Anreicherung erfolgte durch Ultrazentrifugation wie im Fall der *A. tumefaciens* T-Pili.

Die Proteine der erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und „Western-Blot“ analysiert. TrbC und TrbF wurden in den Sedimenten der Ultrazentrifugation von Proben aus *P. chlororaphis* pJP4 und nicht in denen aus plasmid-freien Zellen nachgewiesen (Abb. 25B). TrbH kofraktionierte dagegen nicht mit Strukturen hoher molekularer Masse. TrbC und TrbF scheinen daher in eine hochmolekulare Struktur eingebaut zu werden, während es sich bei TrbH um ein mit der Zelle verbundenes Protein handelt. TrbF-spezifisches Antiserum detektierte im Sediment der Ultrazentrifugation zwei Proteine der molekularen Masse von 25 und 23 kDa, was auf Proteolyse oder eine andere Modifikation hindeutet. Zusätzliche Experimente mit Kultivierung unterschiedlicher pJP4-tragender Organismen zwischen 20°C und 37°C ergaben, dass die Proteolyse temperaturunabhängig sowohl in *E. coli* als auch in *P. chlororaphis* erfolgte (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Modifikation auch bei mehrstündiger Inkubation bei Raumtemperatur nicht in ganzen Zellen erfolgt und bei Inkubation der pilus-haltigen Zellüberstände nicht weiter fortschreitet. Dies führte zur Vermutung, dass es sich um eine zell-assoziierte Protease handelt, deren Erkennungssequenz jedoch erst im Verlauf der Pilusisolierung zugänglich wird.

Um die Kofraktionierung von TrbC und TrbF weiter zu untersuchen, wurden die bei der Ultrazentrifugation erhaltenen Sedimente einer Zentrifugation in einem 10-70%igen Saccharosegradienten (wt/vol) unterzogen. Die vom Gradienten gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und „Western-Blot“-Analyse untersucht. TrbF wurde in den Fraktionen 8 bis 15 detektiert. TrbC wurde dagegen nur in den Fraktionen 13 und 14 nachgewiesen, und in diesen war das Signal von TrbF am stärksten. Dies zeigt, dass TrbC und TrbF während der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation kofraktionierten und somit vermutlich in einer hochmolekularen Struktur assoziierten. TrbC konnte aufgrund des niedrigeren Titers des Antiserums nur in den Fraktionen mit der größten Menge dieser Zellanhänge nachgewiesen werden.

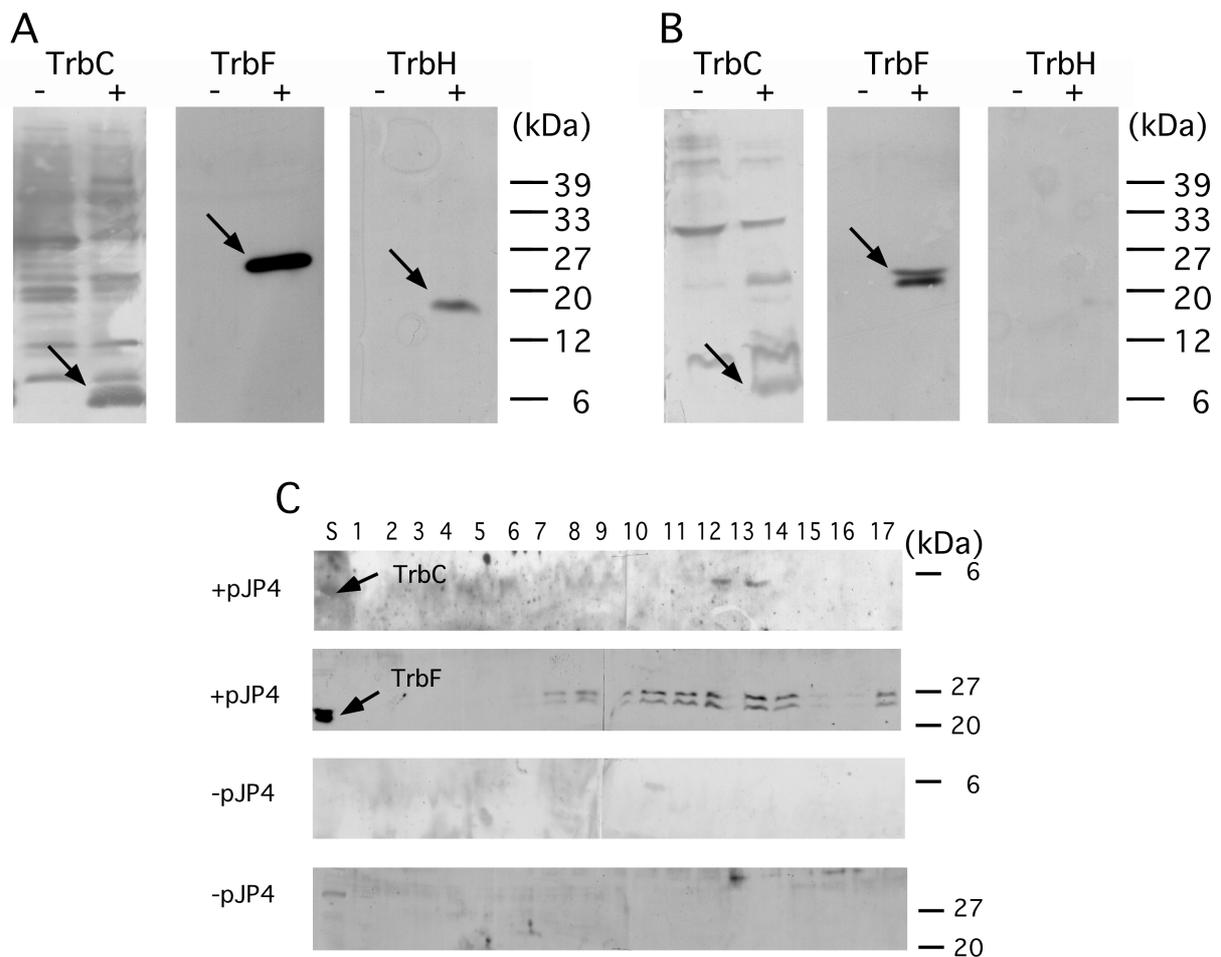


Abbildung 25: Zelluläre Lokalisierung der Trb-Proteine. SDS-PAGE-Analyse von Zellysaten (A) und Strukturen höherer molekularer Masse (B), die von der Oberfläche pJP4-tragender (+) oder plasmid-freier (-), auf LB-Medium kultivierter *P. chlororaphis*-Zellen isoliert wurden. Zellysate und Sedimente der Ultrazentrifugation wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antiseren, die spezifisch für TrbC, TrbF und TrbH waren, analysiert. Durch Ultrazentrifugation erhaltene Sedimente wurden alternativ einer Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten unterzogen (C). Das Sediment (S) und die von oben nach unten vom Gradienten genommenen Fraktionen 1 bis 17 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit TrbC- und TrbF-spezifischem Antiserum analysiert.

3.3.3.4 Analyse der pJP4-determinierten Zelloberflächenstrukturen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie

Um einen endgültigen Nachweis für das Vorhandensein von pJP4-determinierten Pili in den Sedimenten der Ultrazentrifugation zu erhalten, wurden die Proben von pJP4-tragenden Zellen von *P. chlororaphis* SPR044 und von *E. coli* JE2571 mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. In der Probe von pJP4-tragenden *P. chlororaphis*-Zellen

wurden Flagellen und dünnere Strukturen beobachtet, während in den Präparaten von pJP4-tragenden flagellenlosen JE2571-Zellen nur die dünneren Strukturen zu erkennen waren (Abb. 26). Die Dimensionen dieser Strukturen stimmten mit denen des T-Pilus von *A. tumefaciens* überein, so dass es sich vermutlich um pJP4-determinierte Pili handelt (Lai und Kado, 1998).

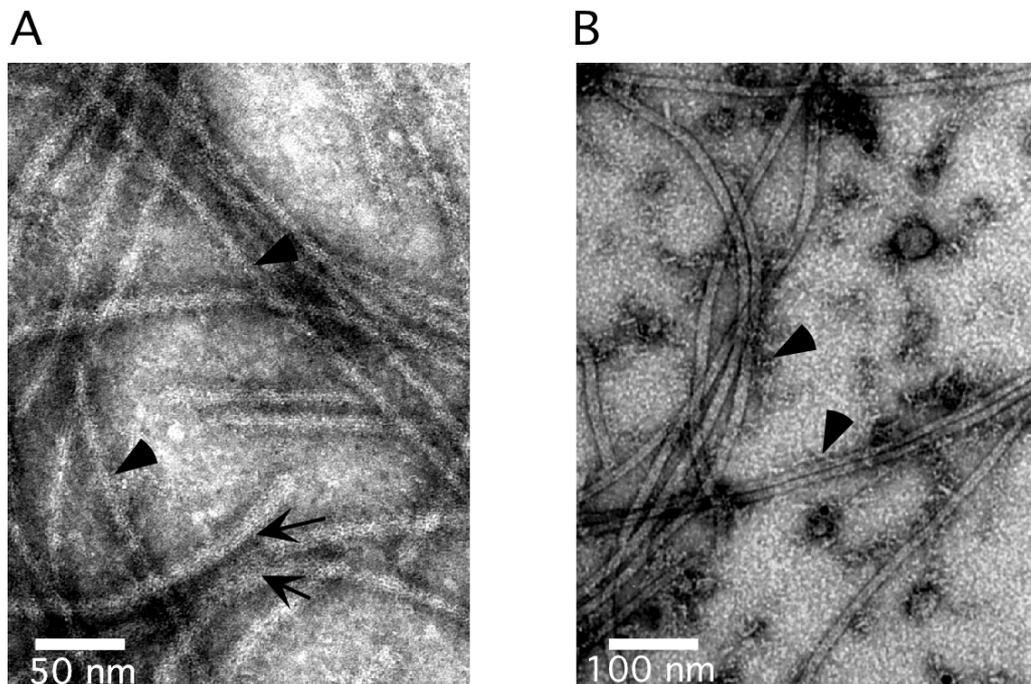


Abbildung 26: Transmissions-elektronenmikroskopische Analyse von pJP4-determinierten Pili. Die nach Scheren und Ultrazentrifugation erhaltenen Zelloberflächenstrukturen wurden mit Uranylacetat (1% w/v) negativ gefärbt. (A) Flagellen und pJP4-determinierte Pili von der Zelloberfläche von *P. chlororaphis*. (B) pJP4-determinierte Pili von der Zelloberfläche des flagellenlosen *E. coli*-Stamms JE2571. Pfeilspitzen kennzeichnen pJP4-determinierte Pili, während Pfeile auf Flagellen deuten.

3.3.4 Immunfluoreszenz-Färbung zum „Biomonitoring“ plasmid-tragender Zellen in der Rhizosphäre

Um die Präsenz von Plasmiden in kultivierbaren sowie nicht kultivierbaren Bakterien analysieren zu können, wurde ein *in situ*-Ansatz verfolgt. Die Visualisierung von Plasmiden wurde von Anderen durch plasmid-kodierte Produktion des grün fluoreszierenden Proteins erreicht. Die dadurch entstehende zusätzliche metabolische Last veränderte jedoch die Kompetitivität des eingebrachten Stammes (Tombolini *et al.* 1999), und das Leuchten des Bakteriums war an dessen metabolische Aktivität gekoppelt. Außerdem würden derartige Analysen in natürlichen Ökosystemen die Freisetzung von GVOs erfordern, weshalb

Analysen im Freiland nur mit großen Einschränkungen realisierbar wären. Daher erschien die Immunfluoreszenz-Färbung von plasmid-kodierten Zelloberflächenstrukturen eine vielversprechende Alternative zu sein. Diese sollten durch ihre exponierte Lage für eine Antigen-Antikörperreaktion leicht zugänglich sein.

3.3.4.1 Immunfluoreszenz-Analyse zur Detektion plasmid-tragender Zellen

Zunächst sollte die Hypothese untersucht werden, ob die Komponenten des pJP4-determinierten Typ IV-Sekretionssystems für *in situ*-„Biomonitoring“ von plasmid-tragenden Zellen geeignet sind. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenz-Analysen von pJP4-tragenden und plasmid-freien *P. chlororaphis*-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, auf mit Polylysin beschichtete Objektträger aufgetragen und mit verschiedenen Antiseren sowie sekundären Antikörpern behandelt, an die der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green gekoppelt war. GroEL-spezifisches Antiserum wurde als Kontrolle für die Detektion eines zytoplasmatischen Proteins verwendet und einheitlich über die gesamte Zelle verteilt detektiert (Abb. 27). TrbF- und TrbH-spezifische Antiseren führten dagegen zu einer Markierung entlang des Zelläußeren, während das Zytoplasma weitgehend frei von Signalen war (Abb. 27). Die Signale wurden nur in Präparaten von pJP4-tragenden Zellen visualisiert, nicht aber in Präparaten plasmid-freier Zellen. Die Markierung der Zelloberfläche spiegelt die Membran-Assoziierung des Typ IV-Sekretionsapparates wider, und TrbF und TrbH waren somit für das „Biomonitoring“ geeignet. Das TrbC-spezifische Antiserum detektierte schon in „Western Blot“-Analysen eine große Zahl nicht plasmid-kodierter Proteine in *P. chlororaphis* (Abb. 25). Ähnlich erlaubten die bei der *in situ*-Analyse erhaltenen Signale auch bei Verwendung von affinitäts-gereinigtem TrbC-Antiserum kaum eine Unterscheidung zwischen plasmid-freien und plasmid-tragenden Zellen. Dieses Serum ist offenbar nicht für das „Biomonitoring“ geeignet.

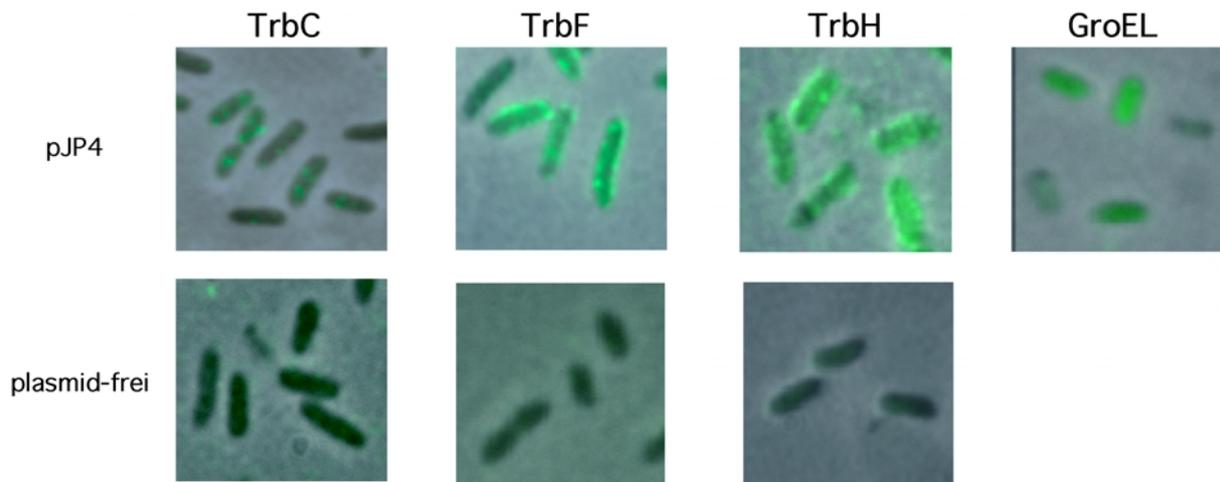


Abbildung 27: Lokalisierung der Trb-Proteine mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Plasmidfreie und pJP4-tragende *P. chlororaphis*-Zellen, die in Flüssigmedium kultiviert worden waren, wurden mit Paraformaldehyd fixiert und auf mit Polylysin beschichtete Deckgläser aufgebracht. Immunfluoreszenz-Mikroskopie erfolgte mit TrbC-, TrbF-, TrbH- und GroEL-spezifischen Antiseren.

3.3.4.2 Untersuchungen zur Spezifität der eingesetzten Antiseren

Weiterhin wurde die Anwendbarkeit der auf Immunfluoreszenz basierenden Methode für das „Biomonitoring“ in natürlichen Habitaten untersucht. Dort ist mit einer Vielzahl von Plasmiden verschiedenster Inkompatibilitätsgruppen zu rechnen. Daher ist es wichtig zu wissen, ob bzw. mit welchen Komponenten, kodiert von verwandten Plasmiden, die eingesetzten Antiseren Kreuzreaktionen haben. Einen ersten Hinweis gewährte ein Aminosäure-Sequenzvergleich (Abb. 28). TrbF hat 98,9% Aminosäure-Identität mit der vermutlich homologen Komponente von Plasmid R751 (IncP β) und 68,3% Aminosäure-Identität mit der des IncP α -Plasmids RP4. Im Gegensatz dazu betragen die Aminosäure-Identitäten mit den möglicherweise homologen Komponenten TraC aus pKM101 (IncN) bzw. TrwJ aus R388 (IncW) nur 10%. In R751 und RP4 wurde ein TrbH-ähnliches Protein gefunden, das eine Aminosäure-Identität von 98,2 % bzw. 59% aufweist, während alle weniger verwandten Plasmide keine ähnlichen Proteine kodieren.

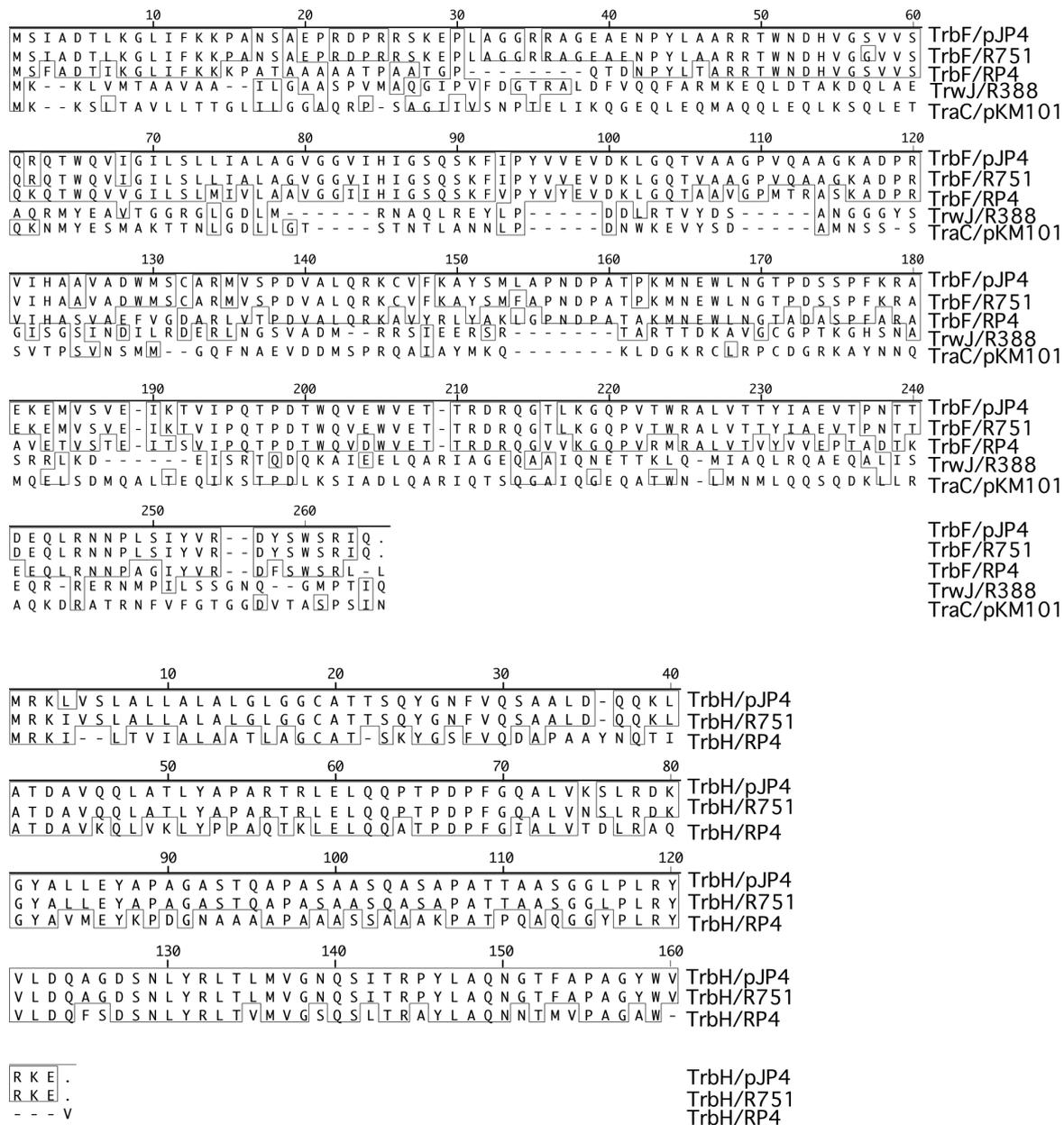


Abbildung 28: Sequenzvergleich der zu TrbF und TrbH des IncPβ-Plasmids pJP4 ähnlichen Proteine. Der Vergleich erfolgte mit Proteinen kodiert vom IncPβ-Plasmid R751, dem IncPα-Plasmid RP4, dem IncW-Plasmid R388 und dem IncN-Plasmid pKM101. Aminosäuren, die in der Mehrzahl der verglichenen Sequenzen identisch sind, wurden eingerahmt.

TrbF- und TrbH-spezifische Antiseren erkannten nur ein Protein der erwarteten molekularen Masse in pJP4-tragenden *P. chlororaphis* und *E. coli*-Zellen (Abb. 25 und 29A). Die weiteren vergleichenden Analysen wurden mit *E. coli* JE2571-Zellen mit pJP4 (IncP β), R751 (IncP β), RP4 (IncP α), pKM101 (IncN) bzw. R388 (IncW) durchgeführt. In diesem Stamm konnte die Selektion plasmid-tragender Zellen durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika gewährleistet werden. Aufgrund der hohen intrinsischen Antibiotikaresistenz von *P. chlororaphis* wären vergleichbare Untersuchungen in diesem Organismus nicht möglich gewesen.

„Western-Blot“-Analysen ergaben, dass TrbF-spezifisches Antiserum ein Protein der erwarteten molekularen Masse in Lysaten von Zellen mit pJP4, R751 und RP4 erkannte (Abb. 29A). Die Signale im Chemoluminogramm waren von vergleichbarer Intensität. In den Lysaten von Zellen mit pKM101 oder R388 wurden keine Proteine detektiert. Immunfluoreszenz-Analyse ergab ein vergleichbares Ergebnis (Abb. 29B). TrbF-spezifisches Antiserum eignet sich also zum „Biomonitoring“ von IncP-Plasmiden.

Im Gegensatz dazu wurde mit TrbH-spezifischem Antiserum ein Protein der erwarteten molekularen Masse nur in den Lysaten von pJP4- und R751-tragenden Zellen erkannt (Abb. 29A). In Lysaten von RP4-tragenden Zellen war hingegen nur ein äußerst schwaches Signal detektierbar, und in Lysaten von pKM101- und R388-tragenden Zellen wurde kein Protein erkannt (Abb. 29A). Immunfluoreszenz-Analyse resultierte in stark fluoreszierenden Signalen auf der Oberfläche von pJP4- oder R751-tragenden Zellen, während die Signalintensität auf der Oberfläche von RP4-tragenden Zellen stark reduziert war (Abb. 29B). pKM101- oder R388-tragende Zellen wiesen keine Markierung auf. TrbH-spezifisches Antiserum eignet sich also für eine weitere Unterscheidung zwischen den in dieser Arbeit untersuchten IncP-Plasmiden, da es spezifisch IncP β -Plasmide erkennt.

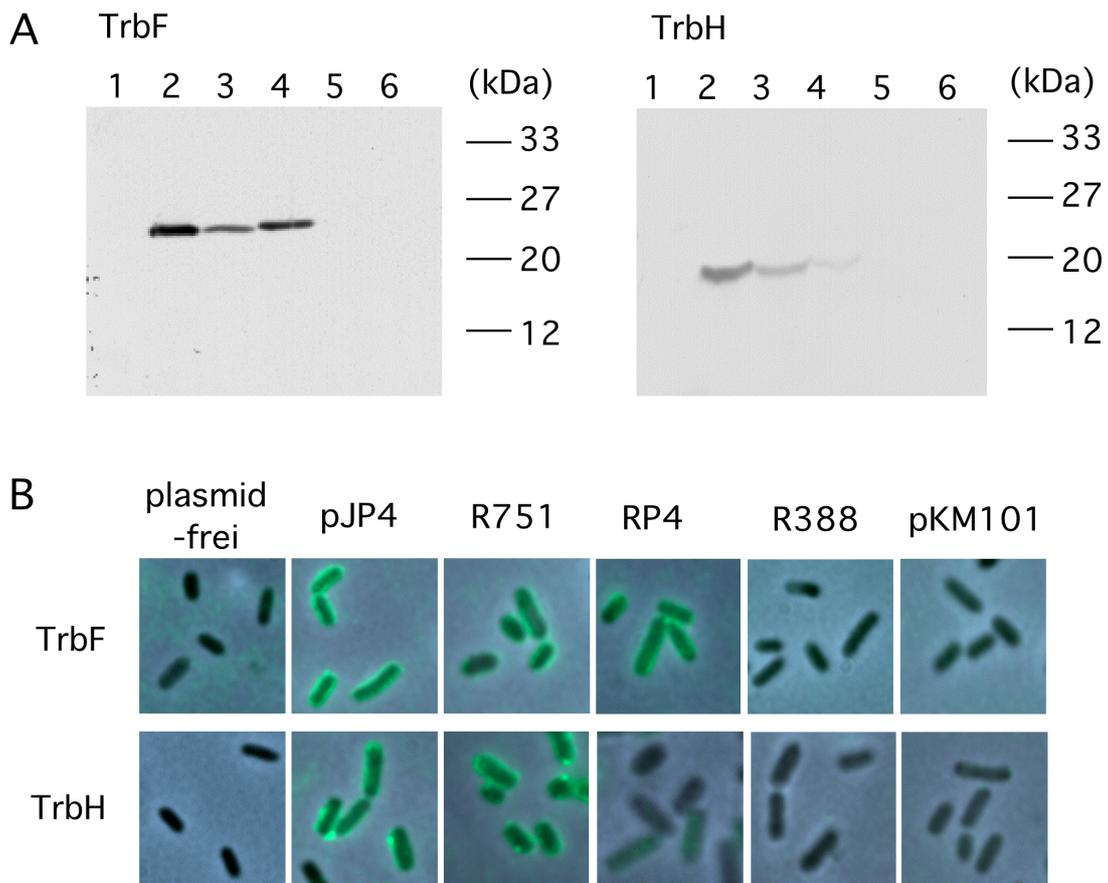


Abbildung 29: Spezifität der TrbF- und TrbH-spezifischen Antiseren. (A) „Western Blot“-Analysen von *E. coli* JE2571-Zellen ohne Plasmid (1) sowie mit pJP4 (2), R751 (3), RP4 (4), R388 (5) bzw. pKM101 (6). (B) Immunfluoreszenz-Analysen von *E. coli* JE2571 ohne Plasmid sowie mit pJP4, R751, RP4, R388 bzw. pKM101.

3.3.4.3 Isolierung der Zellen aus der Rhizosphäre zur mikroskopischen Untersuchung

Nachdem gezeigt worden war, dass Trb-Protein-spezifische Antiseren für die *in situ*-Detektion von im Labor kultivierten plasmid-tragenden Zellen geeignet waren, wurden sie als nächstes für das „Biomonitoring“ in der Rhizosphäre gewachsener Zellen angewandt. Dazu mussten die Bakterien aus der Rhizosphäre isoliert und einer Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen werden. Zu diesem Zweck wurden je 10 *A. thaliana*-Pflanzen einer Rhizosphärepräparation unterzogen. Für die mikroskopische Untersuchung war Konzentrierung der Zellen wichtig, aber ein gleichzeitiges Absinken von Erdpartikeln und Schwebstoffen sollte verhindert werden. Differentielle Zentrifugation hatte sich zu diesem Zweck in Vorversuchen als ungeeignet erwiesen. Aus diesem Grund wurde die Zellsuspension nach durch die Gravitation bedingtem Absetzen der Glasperlen und der meisten Schwebteile abgenommen

und auf schwarze Polycarbonatfilter filtriert. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass eine direkte Immunfluoreszenz-Färbung auf diesem Filter nicht möglich war. Daher wurden die Filter mit der die Bakterien tragenden Seite nach unten auf mit Polylysin beschichtete Deckgläser transferiert und vorsichtig rehydriert. Auf diesem Weg lösten sich die Bakterien vom Filter ab und blieben an der positiv geladenen Beschichtung des Deckglases haften. Ein Vergleich der Anzahl der auf dem Filter befindlichen mit DAPI gefärbten Zellen und der nach Transfer auf dem Deckglas verbliebenen Zellen ergab eine Transfereffizienz von ca. 80%. Diese Technik erwies sich also als sehr geeignet für die geplanten Analysen.

Aus der Rhizosphäre isolierte pJP4-tragende *P. chlororaphis*-Zellen wurden mit DAPI visualisiert (Abb. 30A) und nach Behandlung mit TrbF-spezifischem Antiserum und an Oregon Green gekoppelten sekundären Antikörpern mikroskopisch detektiert (Abb. 30B). Die Membran-Assoziation von TrbF ermöglichte zudem eine klare Unterscheidung der markierten Zellen von homogen fluoreszierenden Schwebstoffen.

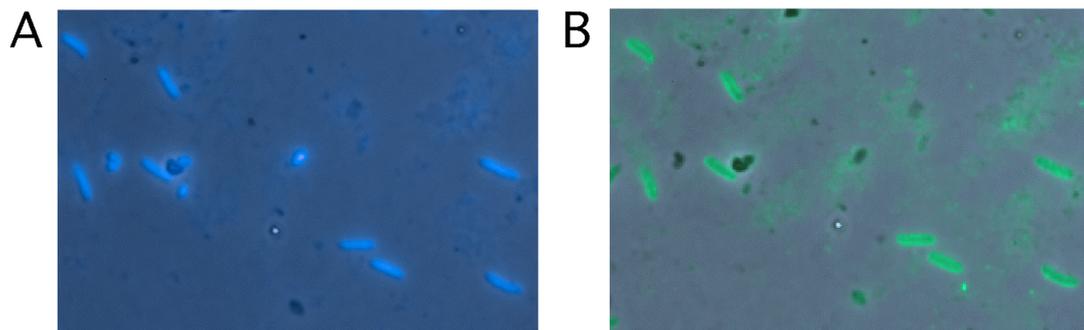


Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Mikroskopie von aus der Rhizosphäre von *A. thaliana* isolierten, pJP4-tragenden *P. chlororaphis*-Zellen. Zellen aus der Rhizosphäre wurden in 10 ml PBS mit Glaskugeln durch Schütteln von den Wurzeln abgelöst, auf schwarzen Polycarbonatfiltern konzentriert und auf mit Polylysin beschichtete Deckgläser transferiert. Die Detektion erfolgte nach (A) DAPI-Färbung (blau) und (B) Immunfluoreszenz-Färbung (grün) mit TrbF-spezifischem Antiserum.

3.4 „Biomonitoring“ von Plasmidtransfer in der Rhizosphäre von *A. thaliana*

Als nächstes wurde die neu etablierte Methode für die Detektion von Plasmidtransfer in der Rhizosphäre angewendet. Die dafür erforderliche gleichzeitige Detektion plasmid-tragender Zellen und ihre Identifikation sollte durch eine Kombination mit Oligonukleotid-Hybridisierungstechniken (FISH) erreicht werden.

3.4.1 Herstellung einer *P. chlororaphis*-spezifischen Sonde

Verschiedene rDNA-spezifische Sonden wurden bereits beschrieben (Manz *et al.* 1992), aber für die Anwendung in dieser Arbeit mußte zunächst eine für *P. chlororaphis* SPR044 spezifische Sonde hergestellt werden. Hierzu wurden verschiedene Optionen auf der Homepage des „Ribosomal database project“ genutzt (rdp.cme.msu.edu). Mit Hilfe der Option SEQUENCE_MATCH (Maidak *et al.*, 2001) wurden die 13 Spezies in der ribosomalen Datenbank gesucht, deren 16S rDNA-Sequenz zu der von SPR044 am ähnlichsten ist. Ein manueller Vergleich dieser Sequenzen ergab nach Aneinanderlagerung, dass sich innerhalb dieser 1,3 kb Region nur zwei Bereiche für eine Sondenherstellung eignen. Alle anderen Sequenzabschnitte zeigten vollständige Übereinstimmung (Daten nicht gezeigt). Mit der CHECK_PROBE Option der ribosomalen Datenbank wurden die potentiellen Sondensequenzen überprüft. Die 22 Basen anschließend an die Position 454 (bezogen auf die *E. coli* 16S rDNA-Sequenz), wurden als SPR044-spezifische Sonde (Pchl454) ausgewählt (Abb. 31). Die *in silico*-Analyse ergab 6 Übereinstimmungen (entweder *P. chlororaphis* Stämme oder nah verwandte Pseudomonaden) unter der Bedingung, dass ein, zwei oder drei Fehlpaarungen erfolgen dürften. Dies wies auf eine hohe Spezifität der Sonde hin.

Pchl454: 3'-CATGAATGGATTATGCACTCATA-5'

| 454 | 484 | |
|---|-----|---------------------------------|
| | | |
| G T A C T T A C C T A A T A C G T G A G T A T T T T G A C G | | <i>P. sp. Stamm 35L</i> |
| G C A G T T A C C T A A T A C G T G A T G T T T T G A C G | | <i>P. meliae</i> |
| G T A C T T A C C T A A T A C G T G A G T A T T T T G A C G | | <i>P. aurantiaca</i> |
| G C A G T T A C C T A A T A C G T A T C T G T T T T G A C G | | <i>P. mandelii</i> |
| G C A T T A A C C T A A T A C G T T A G T G T T T T G A C G | | <i>P. brassicacearum</i> |
| G C A T T A A C C T A A T A C G T T A G T G T T T T G A C G | | <i>P. brassicacearum</i> |
| G C A T T A A C C T A A T A C G T T G G T G T C T T T G A C G | | <i>P. thivervalensis</i> |
| G C A T T A A C C T A A T A C G T T A G T G T T T T G A C G | | <i>P. sp. Stamm DhA-91</i> |
| G C A T T T A C C T A A T A C G T A A G T G T T T T G A C G | | <i>P. borealis</i> |
| G T A C T T A C C T A A T A C G T G A G T A T T T T G A C G | | <i>P. chlororaphis</i> SPR044 |
| G T A G T A A C T T A A T A C G T T G C T A C T T T G A C G | | <i>P. sp.</i> |
| G C A G T A A A T T A A T A C T T G C T G T T T T G A C G | | <i>P. sp. Stamm 2-400</i> |
| G T A C T A C C T A A T A C G T G A G T A T T T T G A C G | | <i>P. aureofaciens</i> |
| G T A C T Y A C C T A A T A C G T G A G T A T T T T G A C G | | <i>P. aureofaciens</i> DSM 6698 |

Abbildung 31: Partielle Aneinanderlagerung der 16S rDNA-Sequenzen zu SPR044 verwandter Spezies. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die 16S rRNA-Sequenz von *E. coli*. Gezeigt ist die spezifische Sonde für SPR044, sowie ihre komplementäre Region in der Sequenz von SPR044 und der 13 am nächsten verwandten Arten.

3.4.2 Untersuchung der Spezifität der SPR044-spezifischen Sonde

Um die Verwendbarkeit der Sonde in natürlichen Ökosystemen zu überprüfen, wurde eine Auswahl von α -, β - und γ -Proteobakterien auf mögliche Erkennung hin untersucht. Nach *in situ*-Hybridisierung mit der Cy3-markierten Sonde Pchl454 wurden spezifisch *P. chlororaphis*, sowie die nahe verwandten Spezies *P. aureofaciens* und *P. syringae* erkannt. Die entfernter verwandten γ -Proteobakterien *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* und *E. coli*, die β -Proteobakterien *R. eutropha* und *Burkholderia cepacia* sowie *A. tumefaciens* als Vertreter der α -Proteobakterien wurden nicht erkannt (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Spezifität der Sonde für den gewünschten Einsatz ausreichend hoch war.

3.4.3 Detektion von Plasmidtransfer in der Rhizosphäre

Nachdem gezeigt worden war, dass die Pchl454-Sonde für die *in situ*-Detektion unter Laborbedingungen kultivierter Zellen geeignet war, wurde sie für die Detektion von Plasmidtransfer in der Rhizosphäre angewandt. *P. chlororaphis* pJP4 als Donor und *R. eutropha* als Rezipient wurden in sterile Mikrokosmen inokuliert, die anschließend mit *A. thaliana*-Samen

bestreut wurden. Nach vier Wochen wurden die Zellen aus der Rhizosphäre präpariert, mit der Pchl454-Sonde hybridisiert und anschließend einer Immunfluoreszenz- und DAPI-Färbung unterzogen. Sowohl Donor als auch Rezipient fluoreszierten bei Anregung mit Licht von 396 nm blau durch Einlagerung des DAPI-Farbstoffs in die chromosomale DNA. Bei Anregung mit Licht der geeigneten Wellenlängen wurden die Donorzellen dadurch unterschieden, dass sie im Gegensatz zu den Rezipienten sowohl blau (DAPI) und rot fluoreszierten (Hybridisierung von Pchl454) als auch grün (immunologische Detektion von TrbF). Exkonjuganden (*R. eutropha* pJP4) wurden als grün und blau fluoreszierende Zellen identifiziert, die nicht durch die Sonde markiert wurden (Abb. 32 B). Als Weiterentwicklung der Methode wurden die Rezipienten bzw. Exkonjuganden durch Hybridisierung mit der für β -Proteobakterien spezifischen Bet42a-Sonde (Manz *et al.* 1992) direkt visualisiert (nicht gezeigt). Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode ermöglicht also das „Biomonitoring“ von Gentransfer zwischen *P. chlororaphis* und *R. eutropha* in der Rhizosphäre von *A. thaliana*.

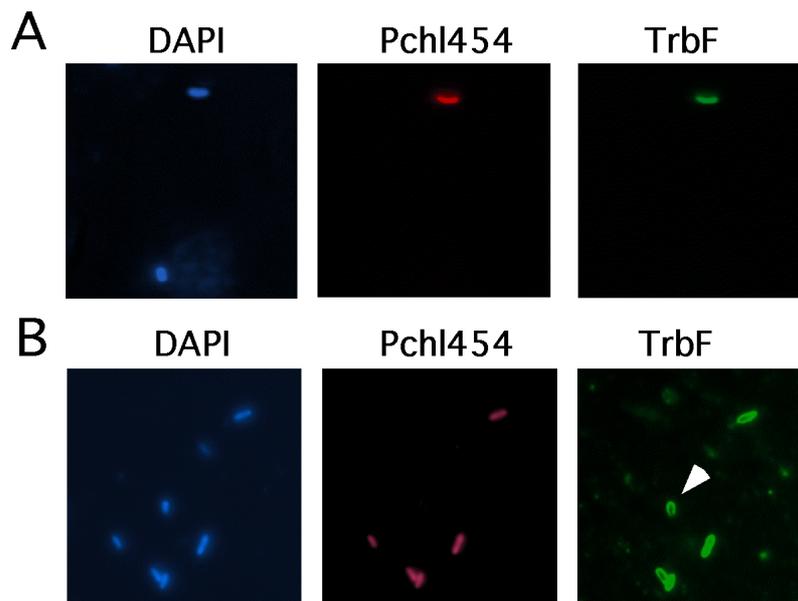


Abbildung 32: Detektion des Transfers von pJP4 zwischen *P. chlororaphis* und *R. eutropha*. Zellen aus der Rhizosphäre wurden in 10 ml PBS mit Glaskugeln durch Schütteln von den Wurzeln abgelöst, auf schwarzen Polycarbonatfiltern konzentriert und auf mit Polylysin beschichtete Deckgläser transferiert. Die Präparate wurden einer Hybridisierung mit der Sonde Pchl454 sowie einer DAPI- und Immunfluoreszenz-Färbung mit TrbF-spezifischem Antiserum unterzogen. Gezeigt sind Donor *P. chlororaphis* pJP4 und Rezipient *R. eutropha* (A) sowie Donor *P. chlororaphis* pJP4 und Exkonjugand *R. eutropha* pJP4 durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet (B).

3.4.4 Quantitativer Vergleich der kultivierungs-abhängigen und -unabhängigen Methode

Anschließend wurde ein quantitativer Vergleich zwischen der kultivierungs-abhängigen und –unabhängigen Methode vorgenommen. Dazu wurden sterile Mikrokosmen mit pJP4-tragenden SPR044 als Donor und mit *R. eutropha* als Rezipient inokuliert und mit Samen von *A. thaliana* bestreut. Nach 14, 28 und 42 Tagen wurde die Zahl der Donoren und Rezipienten durch Ausplattieren und phänotypische Charakterisierung der Kolonien ermittelt. Die Zahl der Exkonjuganden wurde durch Plattieren auf mit 2,4-D versetztem M9-Minimalmedium bestimmt, auf dem ausschließlich *R. eutropha* pJP4 wachsen können (2.8.5). Zusätzlich wurden 2 ml der Rhizosphäre-Suspension durch Filtrieren auf schwarze Polycarbonatfilter aufkonzentriert und auf mit Polylysin beschichtete Deckgläser transferiert. Die Präparate wurden entweder einer Hybridisierung mit der für den Donor spezifischen Pchl454-Sonde oder mit der für den Rezipienten spezifischen Bet42a-Sonde unterzogen. Anschließend wurden DAPI- und Immunfluoreszenz-Färbungen mit TrbF-spezifischem Antiserum durchgeführt und pro Präparat wurden mindestens 30 Felder unter dem Mikroskop ausgezählt. Unabhängig von der verwendeten Sonde ergaben sich für die Zahl der Donoren und Rezipienten keine deutlichen Abweichungen zwischen den beiden Methoden (Abb. 33). Die Zahl der Exkonjuganden war jedoch bei der *in situ*-Analyse ca. achtmal höher als bei der kultivierungs-abhängigen Methode (Abb. 33, vgl. 3.2.3). Dies war wiederum unabhängig davon, ob die Sonde zur direkten Visualisierung des Donors oder des Rezipienten verwendet wurde. Wenn jedoch Bakterien aus der Rhizosphäre isoliert wurden, die nur mit *R. eutropha* pJP4 allein inokuliert worden war, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der kultivierungs-abhängig und –unabhängig ermittelten Zellzahl. Obige Diskrepanz resultiert offenbar aus der Eigenschaft von Rezipienten, die pJP4 vor relative kurzer Zeit erhalten hatten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *in situ*-Detektion mit spezifischen Sonden für Donoren, Rezipienten und Exkonjuganden für die Detektion von pJP4-Transfer geeigneter ist als klassische Plattierungsmethoden.

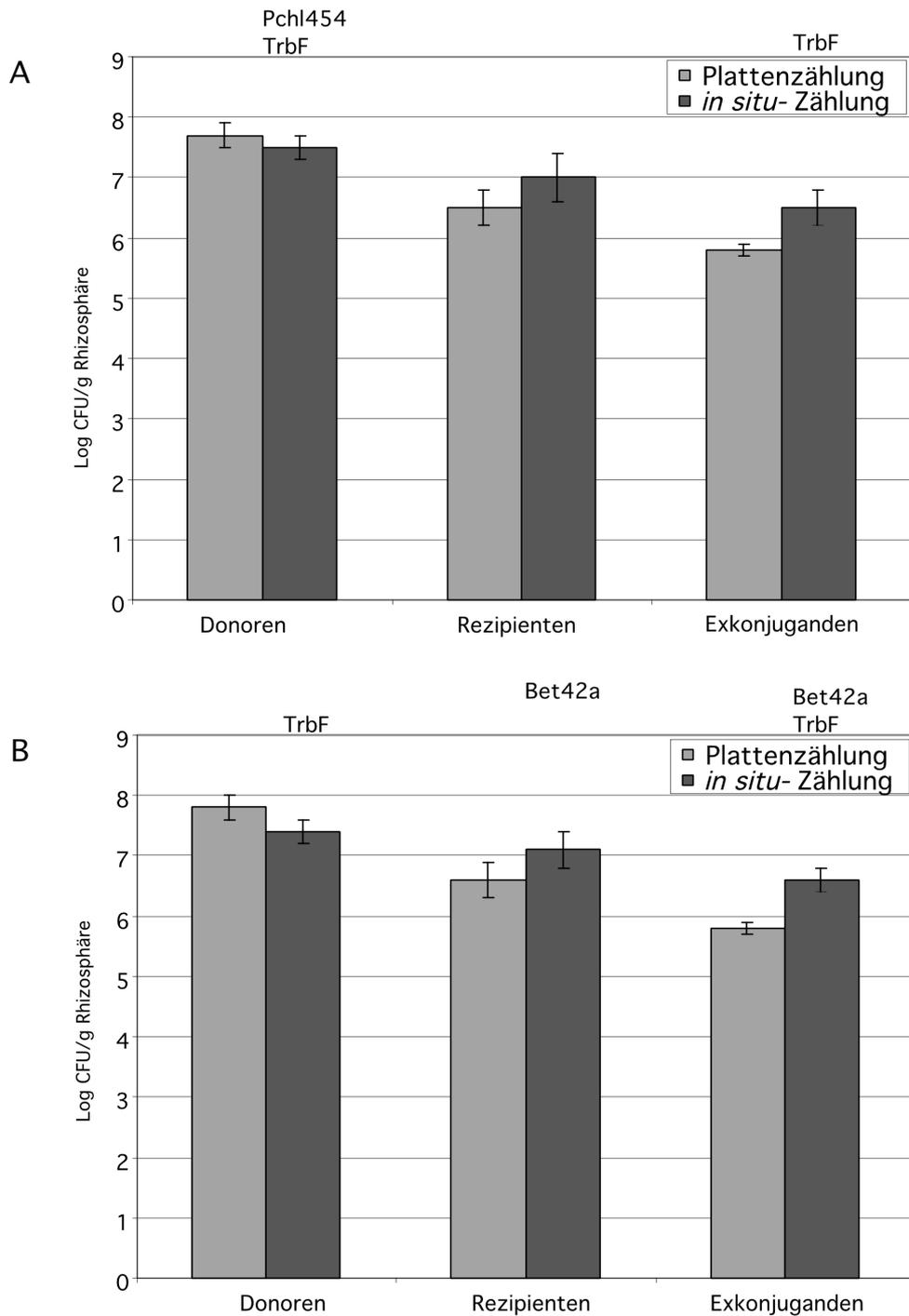


Abbildung 33: Vergleich der kultivierungs-abhängigen bzw. -unabhängigen Quantifizierung von Donoren, Rezipienten und Exkonjuganden. Donoren *P. chlororaphis* pJP4, Rezipienten *R. eutropha* und Exkonjuganden *R. eutropha* pJP4 wurden nach 6 Wochen aus der Rhizosphäre von *A. thaliana* isoliert. Die Quantifizierung erfolgte entweder durch Plattierung auf LB- und Selektivmedium oder *in situ* nach einer Kombination aus FISH, DAPI- und Immunfluoreszenz-Färbung mit TrbF-spezifischem Antiserum. Für FISH wurden Pchl454 (**A**) oder Bet42a (**B**) als Sonde verwendet. Gezeigt ist der Mittelwert aus 6 Zählungen mit der zugehörigen Standardabweichung.

4 DISKUSSION

4.1 Kolonisierungs- und Konkurrenzfähigkeit von *P. chlororaphis*

Ziel des ersten Teils der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von „Quorum-Sensing“- und PCN-Produktion auf die Rhizosphäre-Kolonisierungseffizienz von *P. chlororaphis* SPR044 sowie auf die Frequenz des pJP4-Transfers. Weiterhin wurden die Auswirkungen von pJP4 auf die Fitness von SPR044 untersucht.

4.1.1 Charakterisierung von *P. chlororaphis* SPR044 und seinen TnMod-Insertionsderivaten

Als Grundlage für weitere Arbeiten wurde die Acyl-HSL-Produktion von SPR044 und von Insertionsderivaten mit veränderter Acyl-HSL- und/oder PCN-Biosynthese untersucht. Die Analyse zellfreier Kulturüberstände zeigte, dass SPR044 drei Acyl-HSL-Derivate produziert. Nach dünn-schicht-chromatographischer Auftrennung und anschließendem Biotest wurden in allen Fällen punktförmige Signale beobachtet. Dies deutet auf unsubstituierte oder C3-OH-Acyl-HSLs hin, da 3-Oxo-Acyl-HSLs typischerweise nach unten elongierte (schweif-förmige) Signale ergeben (Cha *et al.*, 1998). Ein Derivat wies eine identische Fraktionierung wie synthetisches BHSL auf. Ein weiteres Derivat (Substanz A) wurde durch Vergleich des R_f -Wertes mit dem der synthetischen Acyl-HSLs sowie mit den R_f -Werten der von *P. fluorescens* 2-79 produzierten Acyl-HSLs als C3-OH-OHSL identifiziert (Cha *et al.*, 1998). Substanz B zeigte keine exakte Übereinstimmung mit einem bereits identifizierten Acyl-HSL. Es handelt sich jedoch wahrscheinlich ebenfalls um ein C3-OH-Acyl-HSL, da Substanz B das „Quorum-Sensing“-System von *P. aureofaciens* 30-84I nicht induzierte. Somit unterscheiden sich die von SPR044 gebildeten Signalmoleküle von den von *P. chlororaphis* PCL1391 produzierten Acyl-HSLs (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001). Zwar produzieren beide Stämme BHSL, aber das Hauptsignalmolekül von PCL1391 (HHSL) wird von SPR044 nicht synthetisiert. Das Fehlen der HHSL-Produktion in Stamm SPR044 weist darauf hin, dass die beiden nah verwandten *P. chlororaphis*-Stämme trotz ähnlicher Eigenschaften eine andere „Sprache“ für die Zell-Zell-Kommunikation verwenden. Das unterschiedliche Acyl-HSL-

Spektrum spiegelt möglicherweise eine Anpassung an verschiedene ökologische Nischen wider. Die für Phenazine charakteristische orange-gelbe Färbung der beiden „Quorum-Sensing“-negativen Derivate SPR144 und SPR244 konnte mit synthetischem BHSL nicht wieder hergestellt werden, wohl aber mit zellfreiem Überstand von in der stationären Phase befindlichen Wildtyp-Kulturen. Dies legt die Vermutung nahe, dass C3-Substitution von C3-OH-OHSL für die Konformationsänderung des die Acyl-HSLs erkennenden Transkriptionsfaktors entscheidend ist, wie im Fall des *A. tumefaciens*-Systems postuliert wurde (Zhu *et al.*, 1998). Allerdings betreffen die Insertionen in SPR144 und SPR244 Proteine, die in der regulatorischen Kaskade oberhalb der für die Acyl-HSL-Synthese zuständigen liegen. Somit könnten neben den Acyl-HSLs auch andere Signale für die Komplementation erforderlich sein.

Weiterhin wurde die regulatorische Funktion der Acyl-HSLs für die Synthese antimikrobieller Metabolite und extrazellulärer Enzyme untersucht. Die qualitative Analyse ergab in Übereinstimmung mit PCL1391 (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001) eine eindeutige Korrelation zwischen der Menge produzierter Acyl-HSLs und antimikrobieller Metabolite. Die einzige Ausnahme bildete der PCN-Überproduzierer SPR344, bei dem *TnMod* in das Gen für eine Glycosyltransferase inserierte. Dieser Stamm produzierte eine deutlich erhöhte Zahl grüner PCN-Kristalle pro Kolonie, aber die Mengen von Acyl-HSLs und Antibiotika waren niedriger als beim Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass durch die Insertion kein negativer Regulator der PCN-Biosynthese betroffen ist, da in diesem Fall eine Acyl-HSL-abhängige Hochregulation der Produktion von Sekundärmetaboliten zu erwarten wäre. Die PCN-Überproduktion könnte aus einer Blockade in einem gekoppelten Stoffwechselweg resultieren, die einen einseitigen Anstieg der PCN-Produktion zur Folge hat. Ähnliche Effekte wurden im Fall einer *phzM*-Mutante von *P. aeruginosa* beobachtet (Mavrodi *et al.*, 2002). Allerdings ist der Transfer von Glucosylresten nach derzeitigem Kenntnisstand nicht in die Biosynthese des Phenazin-Grundgerüsts involviert. Dies legt eine alternative Erklärung nahe, die auf einer Funktion der Glycosyltransferase in der LPS-Biosynthese beruht. Veränderungen des Lipopolysaccharids können zu verstärkter Diffusion von PCN aus der Zelle führen. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der LPS-Analyse bestätigt. Analytische SDS-Gele zeigten nach Silberfärbung in Spuren mit Proben des Wildtyps ein LPS-Muster, das dem des *E. coli*-Wildtyps ähnelte. Das LPS-Muster von SPR344 glich dagegen der *E. coli*-Mutante („rough“), der die O-antigene Seitenkette des LPS fehlt. Eine Funktion der Glycosyltransferase in der LPS-Biosynthese wird auch durch Resultate von Datenbankanalysen unterstützt. Das Produkt des durch die *TnMod*-Insertion betroffenen Gens

hat 55% Ähnlichkeit zu dem *lpsE*-Genprodukt aus *Sinorhizobium meliloti*. Diese Glycosyltransferase ist in die Biosynthese des LPS-Kernbereiches involviert.

4.1.2 Einfluss von Acyl-HSL- und PCN-Produktion auf die Kolonisierungseffizienz von *P. chlororaphis* SPR044

Für die Untersuchung des Einflusses der Acyl-HSL- und PCN-Biosynthese auf die Kolonisierungseffizienz von SPR044 wurden Derivate ausgewählt, bei denen die *TnMod*-Insertion keine pleiotropen Effekte hatte. Die Experimente in steriler *A. thaliana*-Rhizosphäre ergaben eine hohe Reproduzierbarkeit der Resultate bei realitätsnaher Imitation des natürlichen Ökosystems (Simons *et al.*, 1996). Die Resultate der Kolonisierungs-Experimente über einen Zeitraum von 42 Tagen zeigten, dass die PCN-Produktion keinen Einfluss auf die Kolonisierungseffizienz hat. Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen der Untersuchung von *P. aureofaciens* verminderte Überlebensfähigkeit der Stämme mit einer Defizienz der Phenazin-Biosynthese festgestellt (Mazzola *et al.*, 1992). Bei SPR644 war jedoch nur die PCN-Produktion, nicht aber die Produktion von PCA und anderen antimikrobiellen Metaboliten betroffen. Dies zeigt, dass die Umwandlung von PCA zu PCN nicht für eine effiziente Kolonisierung der *A. thaliana*-Rhizosphäre erforderlich ist.

Die erhöhte PCN-Produktion von SPR344 dagegen führte zu einer erniedrigten Überlebensfähigkeit in der Rhizosphäre. Dies liegt möglicherweise an der Anhäufung von PCN in der Umgebung der Zelle. Die Diffusion von Phenazinen durch die Zellmembran führt zur Aufnahme von Elektronen und damit zur Entkopplung der Atmungskette. Die daraus resultierende Überproduktion von O_2^- und H_2O_2 übersteigt vermutlich die Kapazitäten der Superoxid-Dismutase von *Pseudomonas* spp. (Hassan und Fridovich, 1980; Hassett *et al.*, 1995). Der oxidative Stress könnte dazu führen, dass SPR344 die Rhizosphäre nicht über einen längeren Zeitraum hinweg effizient kolonisieren kann. Zusätzlich könnte das veränderte LPS zu einer erhöhten Anfälligkeit für abiotische Stressfaktoren führen, wie z.B. Veränderungen des osmotischen Drucks oder Austrocknung (de Weger *et al.*, 1989). Gentechnische Veränderungen der Phenazinbiosynthese wurden zur Erweiterung des Phenazin-Spektrums und zur Erhöhung der Biokontrollaktivität angewandt (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch auf eine mögliche Problematik derartiger Eingriffe hin, da eine stark erhöhte PCN-Produktion die Überlebensfähigkeit der produzierenden Bakterien beeinträchtigen kann.

Die auffälligsten Resultate ergaben sich jedoch aus der Analyse von SPR244. Nach Einzelinokulationen war die Populationsgröße von SPR244 nach 28 und 42 Tagen signifikant kleiner als die des Wildtyps. Im Gegensatz dazu war die Population von SPR244 nach 28- bzw. 42-tägiger Kokultivierung mit SPR044 ebenso groß wie die des Wildtyps. Dieses Phänomen konnte durch vergleichende Untersuchung des Wachstums in Flüssigkulturen erklärt werden. Hierbei wiesen die beiden „Quorum-Sensing“-negativen Derivate SPR144 und SPR244 eine signifikant verkürzte Lag-Phase auf. Dies deutet darauf hin, dass diese Derivate nicht oder nur unvollständig in die stationäre Phase eintreten. Die Untersuchung der Menge des für die stationäre Phase charakteristischen σ -Proteins in der Zelle bestätigte diese Vermutung. Immunologische Detektion von RpoS ergab beim Wildtyp wie auch den mit *gacS* *in trans* komplementierten SPR244-Zellen eine deutliche Zunahme dieses Proteins nach 18-stündigem Wachstum in Minimalmedium. Im Gegensatz dazu nahm bei SPR244 und SPR244 pTrc300 die RpoS-Menge ab. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung führt die Zugabe von Acyl-HSLs zu exponentiell wachsenden Kulturen unabhängig von der Zelldichte zu einer Unterdrückung des Zellwachstums und zur Produktion des für die stationäre Phase charakteristischen Sigmafaktors RpoS (You *et al.*, 1998). Dies führt zu einer Erklärung für die Beobachtung, dass das „Quorum-Sensing“-negative Derivat nach Einzelinokulation eine verringerte Kolonisierungseffizienz aufwies, während es nach Koinokulation mit dem Wildtyp diesem in seiner Effizienz ebenbürtig war. Demnach kann die Population von SPR244 so lange unlimitiert wachsen wie leicht abbaubare C-Quellen in der Rhizosphäre zur Verfügung stehen. Da SPR244 keine extrazellulären polymer-abbauenden Enzyme produziert, ist der Stamm allein nicht in der Lage, komplexere Substrate zu verstoffwechseln. Zusammen mit dem Wildtyp dagegen kann SPR244 auch komplexe Substrate nutzen, die durch die Enzyme des Wildtyps zugänglich gemacht werden. Der Wildtyp hingegen wird in seinem Wachstum benachteiligt. Dies resultiert zum einen aus der Produktion der extrazellulären Enzyme, was eine metabolische Last darstellt. Zum anderen führt die mit zunehmender Kultivierung steigende Acyl-HSL-Konzentration zum RpoS-abhängigen Übergang in die stationäre Phase. Diese Interpretation passt zu den Resultaten verschiedener Studien des Vorkommens GacA/GacS-negativer Stämme. Nach Einsatz eines Inokulums bestehend aus 99% *P. fluorescens* CHAO Wildtyp-Zellen und 1% CHA89 GacA-negativen Zellen wurde festgestellt, dass sich der Prozentsatz der *gacA*-Mutanten in der stationären Phase auf 4% erhöhte (Bull *et al.*, 2001). Das legt nahe, dass die *gacA*-Mutanten nicht in die stationäre Phase eintreten, solange leicht abbaubare C-Quellen zu Verfügung stehen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch im Rahmen des Studiums einer häufig auftretenden Phasen-

variation und phänotypischen Selektion während der Kolonisierung von *Medicago sativa* gemacht, die auf einer Punktmutation im *gacA*-Gen beruht (Sánchez-Contreras *et al.*, 2002). Außerdem wurde bei der Produktion von Inokula für biotechnologische Anwendungen eine ungewöhnlich hohe Anzahl spontaner *gacA*- und *gacS*-Mutationen beobachtet (Duffy und Défago, 2000). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass bei derartigen Anzuchten ohne Nährstofflimitierung *gacA*- bzw. *gacS*-Mutanten einen selektiven Vorteil haben, da sie bei hohen Acyl-HSL-Konzentrationen nicht in die stationäre Phase eintreten. Einen weiteren Beleg für den selektiven Vorteil von *gac*-Mutanten lieferten Analysen zur Untersuchung der Verdrängung von *P. aureofaciens* 30-84 Wildtyp durch 30-84 *gac*-negative Mutanten in der Rhizosphäre von Weizen. Die Populationsgrößen der *gac*-Mutanten waren nach Koinkubation größer, und die des Wildtyps kleiner, als aufgrund der prozentualen Anteile im Inokulum und dem Wachstum nach Einzelinkubation zu erwarten gewesen wäre (Chancey *et al.*, 2002). Dies liefert einen weiteren Hinweis auf den selektiven Vorteil *gac*-negativer Mutanten nach Koinkubation mit dem Wildtyp.

Die verkürzte Lag-Phase von SPR244 hatte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keinen Vorteil bei der Rhizosphäre-Kolonisierung zur Folge. Dennoch wäre unter natürlichen Bedingungen ein positiver Einfluss auf die Kolonisierungseffizienz denkbar. In Erde ist die Konzentration löslicher Substanzen niedrig, und maximales Wachstum ist in der Rhizosphäre nur innerhalb der ersten Tage nach Keimung der Pflanzen und der damit einhergehenden Absonderung von Exsudaten möglich (Newman, 1978). Die verkürzte Lag-Phase GacS-negativer Stämme könnte zu einer effizienteren Ausnutzung der Exsudate führen. Das würde auch erklären, warum die Population einer *gacA*-Mutante von *P. fluorescens* CHAO in der Rhizosphäre von Weizen doppelt so groß war wie die des Wildtyps (Natsch *et al.*, 1994). Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Studien festgestellt, dass die Fitness der *gacA*-Mutante im Boden beeinträchtigt war. In der Rhizosphäre war dies wahrscheinlich aufgrund der vorhandenen Exsudate nicht der Fall (Natsch *et al.*, 1994). Zusammenfassend weisen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass die Präsenz des GacA/GacS Zwei-Komponenten-Systems unter gewissen Umständen zu selektiven Nachteilen führen kann. Dies beruht darauf, dass es neben der Kontrolle von Kolonisierungsfaktoren an der Regulation des Übergangs in die stationäre Phase und der damit einhergehenden Wachstums-Verlangsamung beteiligt ist.

4.1.3 Einfluss von Acyl-HSL- und PCN-Produktion auf die Frequenz des Plasmidtransfers

Studien zum Einfluss von „Quorum-Sensing“- und PCN-Produktion auf die Plasmidtransfer-effizienz ergaben, dass beide Faktoren keinen Einfluss auf diesen Prozess haben. Durch seine Abhängigkeit von der Acyl-HSL-Produktion unterscheidet sich der Transfer des Ti-Plasmids von *A. tumefaciens* somit deutlich von der Weitergabe des IncP-Plasmids pJP4. Die Produkte der von den Transferregionen der Typ IV-Sekretionssysteme kodierten Gene beider Plasmide haben große Sequenz-Ähnlichkeiten (Alt-Mörbe *et al.*, 1996). Das an der Regulation des Ti-Plasmidtransfers beteiligte „Quorum-Sensing“-System ist plasmid-kodiert (Fuqua und Winans, 1996), während das „Quorum-Sensing“-System von *P. chlororaphis* auf dem Chromosom lokalisiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Weitergabe von Plasmiden ohne eigenes „Quorum-Sensing“-System nicht in Abhängigkeit von Acyl-HSLs reguliert wird, sondern anderen regulatorischen Mechanismen unterliegt.

Die Resultate dieser Arbeit legen nahe, dass „Quorum-Sensing“-negative Stämme sich als Inokulum für biotechnologische Anwendungen eignen könnten, die auf der Weitergabe katabolischer Plasmide an die indigene Population beruhen. Darüber hinaus könnten die Resultate in manchen Fällen als Erklärung für die Unterlegenheit freigesetzter Bakterien gegenüber der natürlichen Population dienen. Die gängige Erklärung ist eine geringere Fitness von Laborstämmen im Vergleich zur indigenen Population. Alternativ könnte das reduzierte Wachstum ausgebrachter Bakterien aus der Verlangsamung durch Acyl-HSLs in natürlichen Ökosystemen resultieren. Auch dieses Problem könnte durch Verwendung „Quorum-Sensing“-negativer Derivate umgangen werden.

4.1.4 Auswirkung von pJP4 auf die ökologische Fitness von SPR044

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von pJP4 auf die Kolonisierungseffizienz und die ökologische Fitness von *P. chlororaphis*. Mögliche Zusammenhänge mit der Produktion von Acyl-HSLs und PCN wurden ebenfalls überprüft. Zu diesem Zweck wurde zuerst die Effizienz der Kolonisierung der *A. thaliana*-Rhizosphäre von SPR044 und verschiedener Derivate (Acyl-HSL-negativ, PCN-negativ, PCN-Überproduzierer) mit der Kolonisierungseffizienz der pJP4-tragenden Derivate verglichen. Eine signifikante Erniedrigung der Effizienz pJP4-tragender Bakterien wurde ausschließlich im

Fall des PCN-Überproduziers SPR344 beobachtet. Da die Kolonisierung von SPR244 und SPR644 nicht beeinträchtigt war, beruhte dies offenbar nicht auf der Präsenz von *TnMod per se*. Die reduzierte Effizienz der Kolonisierung durch SPR344 pJP4 ist wahrscheinlich eine Folge von zusätzlichem abiotischem Stress. Die metabolische Last durch das Tragen von pJP4 führt offenbar nur in diesem, aufgrund des defekten LPS vorbelasteten, Stamm zu einer merklichen Reduktion der Kolonisierungseffizienz. Das Tragen von pJP4 beeinträchtigte die Fitness von SPR044 somit unter diesen Bedingungen in nicht messbarer Weise. Im Gegensatz zu den Resultaten im Fall von SPR044 wurde im Fall pQBR103-tragender *P. fluorescens*-Zellen in der Phytosphäre von Zuckerrüben eine Reduktion der initialen Kolonisierung beobachtet. In späteren Phasen der Kolonisierung hatten die plasmid-tragenden Zellen jedoch keinen Nachteil im Vergleich zu den Plasmid-freien (Lilley und Bailey, 1997). Die hier gezeigten Untersuchungen wurden jedoch an der Rhizosphäre schnell wachsender *A. thaliana*-Pflanzen durchgeführt, so dass eine Phase der reduzierten Fitness schon vor der ersten Probennahme gelegen haben könnte. Darüber hinaus sind in verschiedenen Bakterien-Pflanzen-Interaktionen unterschiedliche Effekte der Präsenz unterschiedlicher Plasmide denkbar.

Um den Einfluss von biotischem Stress zu untersuchen, wurden Koinokulations-Experimente mit pJP4-tragenden und plasmid-freien Stämmen durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass pJP4 *per se* keine negativen Auswirkungen auf die Konkurrenzfähigkeit von SPR044 hat. Weder nach Koinokulation mit *P. aureofaciens* 30-84 noch nach Koinokulation mit einer bakteriellen Mischung bestehend aus *P. aureofaciens* 30-84, *R. eutropha*, *P. agglomerans* und *S. maltophila* war die Konkurrenzfähigkeit pJP4-tragender im Vergleich zu plasmid-freien Stämmen erniedrigt. Im Gegensatz dazu wurde eine starke Abnahme der Population pJP4-tragender *P. putida* beobachtet (Dejonghe *et al.*, 2001), aber diverse Unterschiede der experimentellen Ansätze könnten für die unterschiedlichen Beobachtungen verantwortlich sein. Erstens wurden in der stationären Phase befindliche Kulturen als Inokulum verwendet, die metabolisch möglicherweise weniger aktiv als die in unseren Experimenten waren. Zweitens wurde im Gegensatz zu unseren Experimenten in unsterilem Boden gearbeitet, wo der abiotische und biotische Stress generell größer ist. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurden auch in der vorliegenden Arbeit Effekte erhöhten biologischen Stresses festgestellt. Koinokulation mit *P. fluorescens* WCS417r führte zu einer signifikanten Verringerung der Konkurrenzfähigkeit pJP4-tragender SPR044-Derivate. WCS417r ist gut an die Rhizosphäre von *A. thaliana* angepasst (Pieterse *et al.*, 1998). Kokultivierung mit diesem Stamm führt möglicherweise zu einem biotischen Stress,

der dem natürlichen System vergleichbar ist. Da alle Organismen vergleichbare Wachstumsraten in LB-Medium aufwiesen und sich nicht gegenseitig hemmten, ist der zugrunde liegende Mechanismus dennoch nicht sofort einsichtig. *P. fluorescens* WCS417r ist ein Biokontroll-Stamm, der systemische Resistenz bei verschiedenen Pflanzen hervorruft, u.a. bei *A. thaliana* gegen den Pflanzenpathogen *P. syringae* pv. *tomato* (Pieterse *et al.*, 1998). Der Abwehr dienende Metabolite, die von der Pflanze abgesondert werden, könnten für die betroffenen Bakterien einen abiotischen Stressfaktor darstellen. Dieser könnte pJP4-tragende SPR044-Derivate in ähnlicher Weise beeinträchtigen wie die erhöhte PCN-Konzentration das Derivat SPR344. WCS417r könnte verglichen mit SPR044 eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Stress aufweisen. Somit würde auch in diesem Fall die pJP4-bedingte metabolische Last nur dann zum Tragen kommen, wenn die Bakterien weiteren Stressfaktoren ausgesetzt sind. Außerdem wäre eine Anpassung von WCS417r an die Metaboliten der Pflanze denkbar, was zu einer Art Mutualismus führen könnte. Ähnliche Beobachtungen wurden im Fall von der Pflanze gebildeter Vitamin-Cofaktoren gemacht, die die Rhizosphärenkolonisierung von *S. meliloti* stimulieren (Streit und Phillips, 1997).

Zusammengenommen zeigen diese Untersuchungen, dass die durch pJP4 verursachte metabolische Last nicht notwendigerweise die Rhizosphären-Kolonisierungseffizienz von SPR044 beeinträchtigt. Zusätzlicher biotischer oder abiotischer Stress kann jedoch zu einer verringerten Fitness der pJP4-tragenden im Vergleich zu den plasmid-freien Zellen führen. Dies lässt darauf schließen, dass pJP4 unter natürlichen Bedingungen meist zu einer reduzierten Fitness der Trägerzelle führt.

4.2 Kultivierungs-unabhängige Detektion plasmid-tragender Zellen in der Rhizosphäre

Der zweite Teil der Arbeit wurde mit der Zielsetzung begonnen, Komponenten von Typ IV-Sekretionssystemen auf der Zelloberfläche zu identifizieren. Diese könnten aufgrund ihrer zellulären Lokalisation für eine auf Immunfluoreszenz basierende mikroskopische Visualisierung plasmid-tragender Zellen geeignet sein. Der Schwerpunkt lag dabei auf den pilus-assoziierten Proteinen, die aufgrund ihrer exponierten Lage leicht für an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antiseren zugänglich sein sollten.

4.2.1 Identifikation von VirB5 als Komponente des *Agrobacterium* T-Pilus

Die Transferregionen von Plasmiden verschiedener Inkompatibilitätsgruppen sind durch signifikante Ähnlichkeiten der kodierten Proteine gekennzeichnet, weshalb sich vergleichende Studien anbieten. Für den T-Pilus wurde VirB2 als Hauptkomponente beschrieben (Lai und Kado, 1998). VirB2 wird ebenso wie das homologe Protein TrbC aus dem IncP α -Plasmid RP4 vor der Pilus-Assemblierung prozessiert (Haase und Lanka, 1997; Jones *et al.*, 1996). Verschiedene Indizien deuteten darauf hin, dass der prozessierte und sekretierte C-Terminus von VirB1 (VirB1*), sowie VirB5 ebenfalls Teil des T-Pilus sein könnten (Winans und Walker, 1985; Baron *et al.*, 1997). Diese Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Isolierung der extrazellulären hochmolekularen Strukturen von *A. tumefaciens* C58 und anschließende Ultrazentrifugation näher untersucht. VirB1* wurde nach der Ultrazentrifugation nur im Überstand, nicht aber im Sediment mit den hochmolekularen Strukturen detektiert, und ist somit keine Piluskomponente. VirB5 wurde dagegen ausschließlich im Sediment der Ultrazentrifugation nachgewiesen. Versuche zur immunoelektronenmikroskopischen Lokalisierung des Proteins im Pilus waren jedoch nicht erfolgreich. Dennoch weisen diverse Indizien darauf hin, dass es sich nicht um unspezifische Agglomeration handelt. Erstens wurde nach weiterer Aufreinigung der T-Pili mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation Kofraktionierung von VirB5 mit der Haupt-Piluskomponente VirB2 beobachtet. Dies stimmt gut mit der von C. Baron beobachteten Kofraktionierung der beiden Proteine während der Gelfiltrations-Chromatographie überein (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999). Zweitens wurde im Rahmen der Diplomarbeit das VirB5-ähnliche Protein TraC aus dem IncN-Plasmid pKM101 nach Isolierung hochmolekularer Strukturen pKM101-tragender *E. coli* im Sediment der Ultrazentrifugation detektiert (Schmidt-Eisenlohr, 1998, Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999). Die extrazelluläre Komplementation von *traC*-Defekten hatte den ersten Hinweis auf eine Assoziation mit den Pili ergeben (Winans und Walker, 1985). Drittens lag TraC nicht in einer hochmolekularen Struktur vor, wenn Zelloberflächenproteine von Stämmen mit transfer-defizienten pKM101-Derivaten (Transposoninsertion in *traM*, *traB*, *traC*, *traD* oder *traE*) präpariert wurden. Viertens belegten auch Gelfiltrations-Analysen der mittels Ultrazentrifugation isolierten Proteine, dass TraC mit einem hochmolekularen Komplex assoziiert vorliegt. Zusammengefasst belegen diese Erkenntnisse, dass VirB5 vermutlich eine Komponente des T-Pilus darstellt.

Analysen der zellulären Lokalisierung der VirB2- und VirB5-ähnlichen Proteine des für diese Arbeit als Modellplasmid dienenden IncP β -Plasmids pJP4 zeigten, dass neben der

Hauptkomponente TrbC auch das VirB5-ähnliche Protein TrbF in den Sedimenten der Ultrazentrifugation enthalten war. Weitere Aufreinigung mittels Saccharose-Gradienten-Zentrifugation zeigte ebenfalls Kofraktionierung der beiden Proteine, so dass der Aufbau der Pili vermutlich ähnlich dem der von anderen Typ IV-Sekretionssystemen determiniert ist. Aufgrund dieser Resultate wurden die oberflächen-assoziierten Proteine als Ziele für die Entwicklung von Antikörper-Sonden zum „Biomonitoring“ genutzt.

Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Pilus-Nebenkomponenten besteht darin, dass TraC in Assoziation mit der inneren Membran und löslich vorliegt, aber auch sekretiert wird. VirB5 und TrbF liegen dagegen ausschließlich membran-assoziiert vor. Geht man von einem gemeinsamen Mechanismus für die Assemblierung der von diesen Typ IV-Sekretionssystemen determinierten Pili aus, so scheint die Pilusbiogenese von der Membran aus zu erfolgen. Dies wird dadurch bestätigt, dass im Rahmen quantitativer Konjugationsanalysen gezeigt wurde, dass TraC allein keine extrazelluläre Komplementation der *traC*-Insertionsmutante bewirkt (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999). Die sekretierte Form steht also möglicherweise nicht in Zusammenhang mit der Pilusassemblierung.

4.2.2 „Biomonitoring“ plasmid-tragender Zellen durch Detektion von Typ IV-Sekretionssystemen

Die im Verlauf der Arbeit gewonnenen polyklonalen anti-TrbF und anti-TrbH-Seren erwiesen sich in „Western-Blot“-Analysen als äußerst spezifisch. In Proben pJP4-tragender Zellen wurde jeweils nur ein Protein der zu erwartenden molekularen Masse erkannt, während in Proben plasmid-freier Zellen kein Protein detektiert wurde. Zur weiteren Analyse der Spezifität wurden Zellen mit Plasmiden unterschiedlicher Inkompatibilitätsgruppen untersucht. Das TrbF-spezifische Antiserum detektierte ein Protein sowohl in Zellen, die die verwandten IncP β -Plasmide pJP4 und R751 (99% Aminosäure-Identität für TrbF) trugen als auch in Zellen mit dem IncP α -Plasmid RP4 (68% Aminosäure-Identität für TrbF). In Zellen mit Plasmiden, die entfernter verwandte Typ IV-Sekretionssystemen determinieren (IncN, IncW, ca. 10% Aminosäure-Identität für TrbF) wurde kein Protein erkannt. Die Verwendung des TrbH-spezifischen Antiserums ermöglichte zusätzlich die Unterscheidung zwischen Zellen mit den IncP β -Plasmiden pJP4 oder R751 und Zellen mit dem IncP α -Plasmid RP4. Während in Lysaten aus IncP β -Plasmid-tragenden Zellen starke TrbH-spezifische Signale erhalten wurden, lief TrbH aus RP4 (59% Aminosäure-Identität) nur ein äußerst schwaches

Signal in „Western-Blot“-Analysen hervor. In Immunfluoreszenz-Analysen waren vergleichbare Stärken der Signalintensitäten zu erkennen. Somit war bei der Analyse von Zellen aus der Rhizosphäre mit dem TrbH-spezifischen Antiserum eine eindeutige Unterscheidung dieser IncP α - und IncP β -Plasmide möglich. Die Signalintensität bei der Analyse von Proben aus der Rhizosphäre war niedriger als bei unter Laborbedingungen kultivierten Zellen, so dass TrbH in RP4-tragenden Zellen nicht detektiert wurde.

Im Gegensatz zu den gängigen kultivierungs-abhängigen Methoden ermöglicht die im Rahmen dieser Arbeit etablierte immunfluoreszenz-basierte Methode die Detektion von plasmid-tragenden Zellen nach Isolierung aus der Rhizosphäre. Sie könnte somit prinzipiell auch zur Detektion von lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Bakterien bzw. von Bakterien in syntrophen Lebensgemeinschaften geeignet sein. Dabei werden die Zellen vor der Isolierung in keiner Weise beeinflusst, so dass auch subtile Effekte detektierbar sind. Eine zusätzliche metabolische Last, wie sie z.B. die Expression von *gfp* zur Detektion des Plasmidtransfers bewirkt (Tombolini *et al.* 1999), würde derartige Effekte überdecken. Die Expression der für die Synthese des IncP-Pilus nötigen Gene ist unter den meisten Wachstumsbedingungen schwach konstitutiv und wird nach der Übertragung des Plasmids kurzzeitig stark stimuliert (Ghigo, 2001). Dementsprechend war die Detektion plasmid-tragender Stämme mit TrbF- oder TrbH-spezifischen Antiseren im Rahmen dieser Arbeit unabhängig von den Anzuchtbedingungen oder der Wachstumsphase stets möglich. Ob dies auch bei nicht kultivierbaren Mikroorganismen der Fall ist, wurde bislang nicht untersucht.

Die Lokalisierung der fluoreszierenden Signale entlang der Zellperipherie ermöglichte eine leichte und eindeutige Unterscheidung von homogen fluoreszierenden Schwebstoffen, die als Reste der Erde ebenfalls in den Proben vorhanden waren. Dadurch wäre eine digitalisierte Auswertung der Proben prinzipiell möglich. Die vergleichende Spezifitätsanalyse zeigte zugleich die Grenzen der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten auf polyklonalen Antiseren basierenden Methode auf. Zellen mit verwandten Plasmiden der selben Inkompatibilitätsgruppe können nicht unterschieden werden. Dies wäre möglicherweise durch die Verwendung monoklonaler Antikörper oder weniger konservierter plasmid-kodierter Antigene erreichbar.

Immunfluoreszenz-Analysen wurden bisher in der mikrobiellen Ökologie kaum angewendet (Faude und Höfele, 1997). Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode stellt daher eine Ergänzung des Methodenspektrums dar, und eignet sich beispielsweise für den Vergleich von naturbelassenen mit kontaminierten Böden, in denen mit einer großen Verbreitung von IncP-Plasmiden zu rechnen ist. Neben klassischen Methoden wie der

Vermehrung donor-spezifischer Phagen, basierte die Analyse der Plasmidverbreitung in natürlichen Habitaten bisher vor allem auf der Detektion „replicon“-spezifischer DNA-Sequenzen. „Dot-Blot“-Analysen mit entsprechenden Sonden oder PCR-Amplifikationen mit „replicon“-spezifischen Oligonukleotiden wurden zur Detektion von Plasmiden *in situ* oder in isolierter Gesamt-DNA der untersuchten Lebensgemeinschaften eingesetzt (Götz *et al.*, 1996). Allerdings können nur die „Replikons“ erkannt werden, die auf DNA-Ebene eine sehr hohe Sequenz-Ähnlichkeit zum Referenzplasmid aufweisen. Dieses Problem könnte mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten, auf plasmid-kodierten konservierten Epitopen basierenden Methode überwunden werden. Die Verwendung geeigneter monoklonaler Antikörper erlaubt möglicherweise eine weitere Erhöhung der Spezifität.

4.2.3 Kultivierungs-unabhängige Detektion des Plasmidtransfers in der Rhizosphäre

Parallel zur immunologischen Detektion des Plasmids konnte die Identität des plasmid-tragenden Stammes durch Hybridisierung mit 16S rRNA-spezifischen Sonden bestimmt werden. Dabei kam es nicht wie im Fall *gfp*-markierter Zellen zur Beeinträchtigung der FISH-Analyse durch sehr starke GFP-Fluoreszenz (Geisenberger *et al.*, 1999). Quantitative Vergleiche zwischen der kultivierungs-abhängigen und -unabhängigen Methode ergaben übereinstimmende Ergebnisse für die Zahl der Donoren und Rezipienten. Die Zahl der Exkonjuganden war bei der kultivierungs-unabhängigen Detektion allerdings achtmal höher. Die erhöhte Zahl von Exkonjuganden wurde bei Verwendung verschiedener Sonden erhalten, so dass ein methodisches Problem (unvollständige Hybridisierung) als Erklärung unzureichend ist. Im ersten Fall wurden die Donoren durch Hybridisierung mit der Sonde Pchl454 sichtbar gemacht. Unvollständige Hybridisierung hätte zu Überschätzung der Zahl der Exkonjuganden führen können. Diese wurden als DAPI-gefärbte Zellen detektiert, die immunologisch mit TrbF-spezifischem Serum, nicht jedoch durch die Sonde Pchl454 markiert wurden. Im zweiten Fall wurden die Rezipienten und Exkonjuganden mit der Sonde Bet42a visualisiert. Unvollständige Hybridisierung hätte in diesem Fall zu einer überhöhten Schätzung von Donoren geführt, was nicht der Fall war. Darüber hinaus ergab die Analyse von Proben aus allein mit *R. eutropha* pJP4 inokulierten Mikrokosmen keine Abweichung zwischen der kultivierungs-abhängigen und -unabhängigen Methode. Daher liegt die Annahme nahe, dass die Genprodukte der Transferregion bald nach der Plasmidaufnahme detektierbar werden.

Dies steht mit der „zygotischen Induktion“ der Expression der *trb*-Gene nach Plasmidtransfer in Einklang (Ghigo, 2001). Im Gegensatz dazu könnte die *tfd*-Region, die für das Wachstum auf mit 2,4-D versetztem Minimalmedium nötig ist, erst mit Verzögerung induziert werden. pJP4-tragende Stämme wachsen somit erst nach einer bislang unbekanntem Übergangszeit auf 2,4-D-haltigem Minimalmedium.

Als limitierender Faktor für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zum Nachweis von Gentransfer erwies sich die Signalintensität der 16SrRNA-spezifischen Sonden nach Analyse aus der Rhizosphäre isolierter Zellen. Erstens war stets eine DAPI-Färbung zum zweifelsfreien Nachweis der Zellen nötig, was den Zeitaufwand für die manuelle Zählung erhöht. Zweitens wäre eine automatisierte Quantifizierung nur bei einer Steigerung der Signalintensität nach Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden möglich. Dies ist für umfangreiche Analysen insofern wichtig, als viele Bakterien in der Natur nicht homogen verteilt, sondern in Form dicht gepackter Zellaggregate vorkommen (Watnick und Kolter, 2000). Daher muss eine möglichst große Zahl von Bakterien untersucht werden, um eine Verfälschung durch die Ungleichverteilung der bakteriellen Populationen zu vermeiden. Weiterführende Verbesserungen der Methode sollten daher eine bessere Aufreinigung aus der Rhizosphäre isolierter Zellen zum Ziel haben, so dass die Signalintensität vergleichbare Werte erreicht wie bei der Hybridisierung von unter Laborbedingungen kultivierten Zellen. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, wäre die Verwendung von Nycodenz (Unge *et al.*, 1999). Nycodenz ist ein jodiertes Gradientenmedium, das sich u.a. für die selektive Abtrennung von Bakterien von Bodenpartikeln und Schwebstoffen eignet (Rickwood, D. *et al.*, 1982). Für quantitative Analysen erwies sich Nycodenz jedoch insofern als problematisch, als stets ein massiver Verlust an Zellen zu verzeichnen war. Somit wäre die Entwicklung besserer Methoden zur Abtrennung der Bakterien von Erdproben ein primäres Ziel weiterführender Arbeiten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene physiologische Parameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die Kolonisierungs- und Plasmidtransfereffizienz von *P. chlororaphis* SPR044 in der Rhizosphäre von *A. thaliana* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden TnMod-Insertionsderivate mit Veränderungen „Quorum-Sensing“-regulierter Funktionen untersucht. Darüber hinaus sollten Auswirkungen von pJP4 auf die Fitness von SPR044 festgestellt werden. Weiterhin sollte eine Strategie zur *in situ*-Detektion plasmid-tragender Stämme in der Rhizosphäre entwickelt werden. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Das natürliche Isolat *P. chlororaphis* SPR044 produzierte BHSL, 3-OH-OHSL und ein weiteres, bisher nicht identifiziertes Acyl-HSL. Alle drei Acyl-HSLs wurden ebenfalls von den PCN-negativen SPR044-Derivaten sowie vom PCN-Überproduzierer produziert, nicht jedoch von den „Quorum-Sensing“-negativen Derivaten.

Entsprechend der regulatorischen Funktion der Acyl-HSLs zeigten quantitative Analysen eine Korrelation zwischen der Menge von produzierten Acyl-HSLs, antimikrobiellen Metaboliten und extrazellulären Proteasen. Die einzige Ausnahme bildete der PCN-Überproduzierer. Dessen PCN-Überproduktion basiert vermutlich auf einer Veränderung des LPS und nicht auf der Ausschaltung eines negativen Regulators.

In Einzelkultivierungs-Experimenten zeigte sich nach 14 Tagen kein Unterschied zwischen den Populationsgrößen des Wildtyps und der Derivate. Nach 28 und 42 Tagen war die Population des Wildtyps gleich groß wie die des PCN-negativen Derivats und signifikant größer als die des *gacS*-negativen Derivats und des PCN-Überproduzierers. In Kokultivierungs-Experimenten war die Population des *gacS*-negativen Derivats hingegen stets gleich groß wie die des Wildtyps. Eine Erklärung dieses Phänomens konnte durch Untersuchung der Wachstumskinetiken in Flüssigkultur erbracht werden. Die „Quorum-Sensing“-negativen Derivate wiesen eine stark verkürzte Lag-Phase und eine reduzierte Produktion des für die stationäre Phase spezifischen Sigmafaktors σ^S auf. Dies führte nach Koinokulation mit anderen Bakterien offenbar zu einer Aufhebung des selektiven Nachteils. Vermutlich nutzen die *gacS*-negativen Stämme komplexe C-Quellen, die durch die Enzyme

des Wildtyps zugänglich gemacht werden und profitieren darüber hinaus von der verkürzten Lag-Phase.

Die Frequenz des konjugativen pJP4-Transfers von SPR044 zu *R. eutropha* ist unabhängig von „Quorum-Sensing“- und PCN-Produktion.

Die Transformation mit pJP4 *per se* hatte keinen negativen Einfluss auf die Rhizosphäre-Kolonisierungseffizienz von SPR044. Lag jedoch zusätzlich abiotischer oder biotischer Stress vor, manifestierte sich die metabolische Last durch pJP4 in einer verringerten Populationsgröße. Dieser Effekt war unabhängig vom „Quorum-Sensing“-System und der PCN-Produktion von SPR044.

VirB5 von *A. tumefaciens* assembliert in einer höhermolekularen Struktur, die durch Scherkräfte von der Zelle gelöst und mittels Ultrazentrifugation sedimentiert werden kann. Bei verschiedenen Reinigungsschritten wurde eine Kofraktionierung mit der Haupt-Piluskomponente VirB2 beobachtet. VirB5 ist somit eine Nebenkomponekte des T-Pilus. Das homologe Protein TraC aus dem IncN-Plasmid übt vermutlich eine ähnliche Funktion in pKM101-determinierten Pili aus. Zellfraktionierung pJP4-tragender *P. chlororaphis*-Zellen und Detektion mit spezifischen Antiseren deuten darauf hin, dass TrbC und TrbF Haupt- und Nebenkomponekte pJP4-determinierter Pili sind. Bei TrbH handelt es sich um ein membran-assoziiertes Lipoprotein.

Die Detektion pJP4-tragender Bakterien aus der Rhizosphäre war mit den TrbF- und TrbH-spezifischen Antiseren *in situ* möglich. Das TrbF-spezifische Antiserum ermöglichte die Erkennung IncP-Plasmid-tragender Bakterien. Das TrbH-spezifische Antiserum ermöglichte eine zusätzliche Unterscheidung zwischen IncP α - und IncP β -Plasmid-tragenden Zellen. Eine Kombination der Immunfluoreszenz-Analyse mit FISH erwies sich als geeignet für die Detektion von pJP4-Transfer zwischen SPR044 und *R. eutropha* in der Rhizosphäre von *A. thaliana*.

6 LITERATURVERZEICHNIS

A

- Addinall, S., G., Bi, E. und Lutkenhaus, J. (1996). *J. Bacteriol.* **178**: 3877-3884.
- Alt-Mörbe, J., Stryker, J., L., Fuqua, C., Li, P.-L., Farrand, S., K. und Winans, S., C. (1996). *J. Bacteriol.* **178**: 4248-4257.
- Altier, C., Suyemoto, M. und Lawhon, S., D. (2000). *Infect. Immunol.* **68**: 6790-6797.
- Altschul, S., F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., W. und Lipman, D., J. (1990). *J. Mol. Microbiol.* **215**: 403-410.
- Anthony, K., G., Sherbourne, C., Sherburne, R. und Frost, L., S. (1994). *Mol. Microbiol.* **13** 939-953

B

- Baron, C., Llosa, M., Zhou, S. und Zambryski, P., C. (1997). *J. Bacteriol.* **179**: 1203-1210.
- van der Bij, A., J., de Weger, L., A., Tucker, W., T., und Lugtenberg, B., J., J. (1996). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1076-1080
- Bloom, H., Beier, H. und Gross, H., J. (1987). *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Blumer, C. und Haas, D. (2000). *Microbiology* **146**: 2417-2424.
- Bradford, M., M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bradley, D., E. (1980). *J. Bacteriol.* **141**: 828-837.
- Bull, C., T., Duffy, B., Voisard, C., Défago, G., Keel, C. und Haas, D. (2001). *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 327-336.

C

- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P., D. und Farrand, S., K. (1998). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1119-1129.
- Chancey, S., T., Wood, D., W. und Pierson, L., S. (1999). *Appl. Environ. Microbiol* **65**: 2294-2299.
- Chancey, S., T., Wood, D., W., Pierson, E., A. und Pierson, L. S. (2002). *Appl. Environ. Microbiol* **68**: 3308-3314.
- Chin-A-Woeng, T., F., C., Thomas-Oates, J., E., Lugtenberg, B., J., J. und Bloemberg, G., V. (2001). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1006-1015.

- Chin-A-Woeng, T., F., C., van den Broek, D., de Voer, G., van der Drift, K., M., G., M.,
 Tuinman, S., Thomas-Oates, J., E., Lugtenberg, B., J., J. und Bloemberg, G., V.
 (2001). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 969-979.
- Choi, S., H. und Greenberg, E., P. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11115-11119.
- Christensen, B., B., Sternberg, C. und Molin, S. (1996). *Gene* **173**: 59-65.
- Christie, P., J. und Vogel, J., P. (2000). *Trends Microbiol.* **8**: 354-360.
- Christie, P., J. (1997). *J. Bacteriol.* **179**: 3085-3094.
- Corbell, N. und Loper, J., E. (1995). *J. Bacteriol.* **177**: 6230-6236.
- Curl, E., A. und Truelove, B. (1986). *The Rhizosphere*, Berlin: Springer Verlag.

D

- Datta, N., und Hedges, R., W. (1972). *J. Gen. Microbiol.* **72**: 349-355.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E., M. und Verstraete, W. (2001). *Environ. Microbiol.* **3**: 649-657.
- Dennis, J., J. und Zylstra, G., J. (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2710-2715.
- DiGiovanni, G., D., Neilson, J., W., Pepper, I., L. und Sinclair, N., A. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2521-2526
- Don, R., H., Weightman, A., J., Knackmuss, H.-J. und Timmis, K., N. (1985). *J. Bacteriol.* **161**: 85-90.
- Don, R., H. und Pemberton, J. M. (1985). *J. Bacteriol.* **161**: 466-468.
- Don, R., H. und Pemberton, J. M. (1981). *J. Bacteriol.* **145**: 681-686.
- Duffy, B., K. und Défago, G. (2000). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3142-3150.
- Dumenyo, C., K., , Mukherjee, A., Chunn, W. und Chatterjee, A., R. (1998). *Eur. J. Plant Pathol.* **104**: 569-582.

E

- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E., M., Lurz, R., Kado, C., I. und Lanka, E. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**: 22548-22555.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lurz, R. und Lanka, E. (2000). *J. Bacteriol.* **182**: 6751-6761.
- van Elsas, J., D., McSpadden Gardener, B., B., Wolters, A., C. und Smit, E. (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 880-889.

F / G

- Faude, U., C. und Höfele, M., G. (1997). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4534-4542.
- Fiedler, S. und Wirth, R. (1988). *Anal. Biochem.* **170**: 38-44.
- Fuqua, C. und Winans, S. (1996). *J. Bacteriol.* **178**: 435-440.
- Fuqua, C. Winans, S., C., und Greenberg, E., P. (1996). *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 727-751.
- Gast, A. (2001). Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, LMU München
- Geisenberger, O., Ammendola, A., Christensen, B., Molin, S., Schleifer, K.-H. und Eberl, L. (1999). *FEMS Microbiol. Lett.* **174**: 9-17.
- Ghigo, J., M. (2001). *Nature* **412**: 442-445.
- Ghosal, D., You, I., S., Chatterjee, D., K. und Chakrabarty, A., M. (1985). *Science.* **228**:135-142.
- Götz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschäpe, H., van Elsas, J., D. und Smalla, K. (1996). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2621-2628.
- Gray, K., M. (1997). *Trends Microbiol.* **5**: 184-188.

H

- Haase, J. und Lanka, E. (1997). *J. Bacteriol.* **179**: 5728-5735.
- Hanzelka, B., L. und Greenberg, E., P. (1995). *J. Bacteriol* **177**: 815-817.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). *In: Antibodies; A Laboratorial Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Hassan, H., M. und Fridovich, I. (1980). *J. Bacteriol.* **141**: 156-163.
- Hassett, D. J., Schweizer, H., P. und Ohman, D., E. (1995). *J. Bacteriol.* **177**: 6330-6337.
- Hausner, M. und Wuertz, S. (1999). *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3710-3713.
- Heeb, S., Blumer, C. und Haas, D. (2002). *J. Bacteriol.* **184**: 1046-1056.
- Heeb, S. und Haas, D. (2001). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 1351-1363.
- Holmes, D., S. und Quigley, M. (1981). *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Hrabak, E., M. und Willis, D., K. (1992). *J. Bacteriol.* **174**: 3011-3020.

J / K

- Jones, A. L., Lai, E.-M., Shirasu, K. und Kado, C. I. (1996). *J. Bacteriol.* **178**: 5706-5711.
- Ka, J., O., Holben W., E., und Tiedje J., M. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1121-1128
- Kao, J., C., Perry, K., L. und Kado, C., I. (1982). *Mol. Gen. Genet.* **188**: 425-432.
- King, B., O., Ward, M., K. und Raney, D., E. (1954). *J. Lab. Clin Med* **44** **38**: 301-307.
- Kinkle, B., K., Sadowsky, M., J., Schmidt, E., L., und Koskinen, W., C. (1993). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1762-1766.

Kittell, B., L. und Helinski, D., R. (1993). *In*: Clewell, D., B., (ed.) Bacterial conjugation, Plenum Press , New York:, pp. 223-227.

Kornitzer, D., Teff, D., Altuvia, S. und Oppenheim, A., B. (1991). *J. Bacteriol.* **173**: 2944-2953.

Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P. und Böck, A. (1996). *J. Mol. Biol.* **262**: 413-420.

L

Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**: 680-685.

Lai, E.-M. und Kado, C., I. (1998). *J. Bacteriol.* **180**: 2711-2717.

Lange, R. und Hengge-Aronis, R. (1994). *Genes & Dev.* **8**: 1600-1612.

Langer, P., J. und Walker, G., C. (1981). *Mol. Gen. Genet.* **182**: 268-272.

van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A. und Schell, J. (1974). *Nature* **252**: 169-170.

Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G. und Haas, D. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1562-1566.

Lilley, A., K. und Bailey, M. (1997). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1577-1583.

M

Maidak, B., L., Cole, J., R., Lilburn, T., G., Parker, C., T. J., Saxman, P., R. und Farris, R., J. (2001). *Nucleic Acids Res.* **29**: 173-174.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. und Schleifer, K.-H. (1992). *System. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.

Mavrodi, D., V., Ksenzenk, V., N., Bonsall, R., F., Cook, R., J., Boronin, A., M., Thomashow, L., S. (1998). *J. Bacteriol.* **180**: 2541-2548

Mavrodi, D., V., Bonsall, R., F., Delaney, S., M., Soule, M., J., Philipps, G. und Thomashow, L. (2002). *J. Bacteriol.* **183**: 6454-6465.

Mazzola, M., Cook, R., J., Thomashow, L., S., Weller, D., M. und Pierson III , L. S. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2616-2624.

McClellan, K., H., Winson, M., K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S., R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J., H., Swift, S., Bycroft, B., W., Steward, G., S., A., B. und Williams, P. (1997). *Microbiology* **143**: 3703-3711.

Miller, J., H. (1972). *In* Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor, New York.

Moawski, B., Segura, A. und Ornston, N. (2000). *FEMS Microbiol. Lett.* **187**: 65-68

N / O

- Natsch, A., Keel, C., Pfirter, H., A., Haas, D. und Défago, G. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2553-2560.
- Nealson, K., H., Patt, T. und Hastings, J., W. (1970). *J. Bacteriol* **104**: 313-322.
- Neilson, J., W., Josephson, K., L., Pepper, I., L., Arnold, R., B., DiGiovanni, G., D., D. und Sinclair, N., A. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4053-4058.
- Nesper, J., Kapfhammer, D., Klose, K., E., Merkert, H. und Reidl, J. (2000). *J. Bacteriol.* **182**: 5097-5104.
- Newby, D., T., Josephson, K. L. und Pepper, I., L. (2000). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 290-296.
- Newman, E., I. (1978). *Biol. Rev.* **53**: 511-554.
- Osborn, M., J., Gander, J., E. Parisi, E. und Carson, J. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**: 3962-3972

P / R

- Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P., T., Figurski, D., H., Guiney, D., G., Haas, D., Helinski, D., R., Schwab, H., Stanisich, V., A. und Thomas, C., M. (1994). *J. Mol. Biol.* **239**: 623-663.
- Passador, L., Cook, J., M., Gambello, M., J., Rust, L. und Iglewski, B., H. (1993). *Science* **260**: 1127-1130.
- Perkins, E., J., Gordon, M., P., Caceres, O. und Lurquin, P., F. (1990). *J. Bacteriol.* **172**: 2351-2359.
- Pernesting, A., K., Melefors, O. und Georgellis, D. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**: 225-231.
- Pessi, G. und Haas, D. (2001). *FEMS Microbiol. Lett.* **200**: 73-78.
- Pieterse, C., M., J., van Wees, S., C., M., Hoffland, E., van Pelt, J., A., und van Loon, L., C. (1996). *Plant Cell* **8**: 1225-1237
- Pieterse, C., M., J., van Wees, S., C., M., van Pelt, J., A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P., J. und van Loon, L., C. (1998). *Plant Cell* **10**: 1571-1580.
- Piper, K., R., Beck von Bodman, S. und Farrand, S., K. (1993). *Nature* **362**: 448-450.
- Preithner, S. (2000). Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, LMU München
- Ramos, J., Diaz, L., E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., Ramos, O., G., F., C. und Timmis, K., N. 1994. *Biotechnol.* **12**: 1349-1356.
- Ravn, L., Christensen, A., B., Molin, S., Givskov, M. und Gram, L. (2001). *J. Microbiol. Methods* **44**: 239-251.
- Rickwood, D., Ford, T. und Graham, J. (1982). *Anal. Biochem.* **123**: 23-31
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E., L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. und He, S., Y. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3459-3464.

S

- Sambrook, J., Fritsch, E., F. und Maniatis, T. (1989). *In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Contreras, M., Martín, M., Villaceros, M., O'Gara, F., Bonilla, I. und Rivilla, R. (2002). *Appl. Environ. Microbiol.* **184**: 1587-1596.
- Saxena, I., M., Brown, R., M., Fevre, M., Roberto, A., G. und Henrissat, B. (1995). *J. Bacteriol.* **177**: 1419-1424.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Schmidt-Eisenlohr, H. (1998) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, LMU München
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P. C. und Baron, C. (1999). *J. Bacteriol.* **181**: 7485-7492.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N. und Baron, C. (1999). *J. Bacteriol.* **181**: 5563-5571.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Rittig, M. und Baron, C. (2001). *Environ. Microbiol.* **3**: 720-730.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Gast, A. und Baron, C. (2002). *Manuskript eingereicht.*
- Schmidt-Eisenlohr, H., und Baron, C. (2002). *Manuskript eingereicht.*
- Simons, M., Permentier, H., J., de Weger, L., A., Wijffelman, C., A., und Lugtenberg, B., J., J. (1997). *Mol. Plant-Microbe Interact* **10**: 102-06.
- Simons, M., van der Bij, A., Brand, I., de Weger, L., A., Wijffelman, C., A. und Lugtenberg, B., J., J. (1996). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 600-607.
- Smit, E., Wolters, A. und van Elsas, J., D. (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1210-1219.
- Stover, C., K., Pham, X.-Q., T., Erwin, A., L., Mizoguchi, S., D., Warrenner, P., Hickey, M., J., Brinkman. F., S., L., Hufnagle, W., O., Kowali, D., J., Lagrou, M., Garber, R., L., Goltry, L., Tolentino, E., Wetsbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L., L., Coulter, S., N., Folger, K., R., Kas, A., Lerbig, K., Lim, R., M., Smith, K., A., Spencer, D., H., Hancock, R., E., W., Lory, S. und Olson, M., V. (2000). *Nature* **406**: 959-964.
- Streit, W., R. und Phillips, D., A. (1997). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 933-937.
- Studier, F., W. und Moffatt, B., A. (1986). *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Swift, S., Throup, J., P., Williams, P., Salmond, G., P., C. und Steward, G., S., A., B. (1996). *Trends Biochem. Sci.* **21**: 214-219.

T / U

- Tabor, S. und Richardson, C., C. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1074-1078.
- Thorsted, P., B., Macartney, D. P., Akhtar, P., Haines, A. S., Ali, N., Davidson, P., Stafford, T., Pocklington, M., J., Pansegrau, W., Wilkins, B., M., Lanka, E. und Thomas, C., M. (1998). *J. Mol. Biol.* **282**: 969-990.
- Tombolini, R., Gaag, D., J., V., D., Gerhardson, B. und Jansson, J., K. (1999). *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3674-3680.
- Tsai, C., M. und Fratsch, C., E. (1982). *Anal. Biochem.* **119**: 115-119
- Unge, A., Tombolini, R., Molbak, L. und Jansson, J., K. (1999). *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 813-821

V / W

- van Veen, J., A., van Overbeek, L., S. und van Elsas, J., D. (1997). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 121-135.
- Watnick, P., Kolter, R. (2000) *J. Bacteriol.* **182**: 2675-2679
- de Weger, L., A., Bakker, P., A., H., M., Schippers, B., van Loosdrecht, M., C., M. und Lugtenberg, B., J., J. (1989). *In: Signal Molecules in Plant Microbe Interactions*, J. B., J. Lugtenberg, (ed.), Berlin: Springer Verlag: pp. 197-202.
- de Weger, l., A., van der Vlugt, C., I., M., Wijfjes, A., H., M., Bakker, P., A., H., M., Schippers, B. und Lugtenberg, B., J., J. (1987). *J. Bacteriol.* **169**: 2769-2773.
- Winans, S., C., Burns, D. L. und Christie, P. J. (1996). *Trends Microbiol.* **4**: 64-68.
- Winans, S., C., Kerstetter, R., A. und Nester, E., W. (1998). *J. Bacteriol.* **170**: 4047-4054
- Winans, S., C. und Walker, G. C. (1985). *J. Bacteriol.* **161**: 402-410.
- Wong, S., M., Carrol, P., A., Rahme, L., G., Ausubel, F., M. und Calderwood, S., B. (1998). *Infect. Immunol.* **66**: 554-5861.
- Wood, D., W., Gong, F., Daykin, M., M., Williams, P. und Pierson, L., S. (1997). *J. Bacteriol.* **179**: 7663-7670.
- Wood, D., W. und Pierson, L., S. (1996). *Gene* **168**: 49-53.

Y / Z

- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). *Gene* **33**: 103-119.
- You, Z., Fukushima, J., Tanaka, K., Kawamoto, S. und Okuda, K. (1998). *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 99-106.
- Zhu, J., Bearber, J., W., Moré, M., I., Fuqua, C., Eberhard, A. und Winans, S., C. (1998). *J. Bacteriol.* **180**: 5398-5405.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zuerst Privatdozent Dr. Christian Baron für die intensive wissenschaftliche Förderung. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders geschätzt habe ich auch sein Engagement in nationalen und internationalen Kooperationen. Diese ermöglichten es mir, im Rahmen interessanter Forschungsaufenthalte und Fortbildungsreisen, wichtige Kontakte zu Spezialisten insbesondere auf dem Gebiet der mikrobiellen Ökologie zu knüpfen.

Prof. Dr. A. Böck danke ich für sein Engagement für umfassende und zukunftsstaugliche Lehrveranstaltungen sowie für die Bereitstellung der SelA- und GroEL-spezifischen Antiseren.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG-Baron danke ich für viele spannende Diskussionen und die stets kollegiale Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank gebührt dabei den DiplomandInnen der „Ur“-AG Baron, Diana, Michi und Sigi, nicht nur für die produktive Zeit und die unvergleichliche Laboratmosphäre, sondern auch für die weit darüber hinaus andauernde Freundschaft. Ein großes Dankeschön auch „meinen“ beiden Diplomandinnen, Susi für Isolierung und Bestimmung der 200 Rhizosphäre-Kolonisierer und Astrid für Ihre Engelsgeduld bei der Mutagenese von unserem „Chloro“. Weiterhin danke ich Urs sehr herzlich nicht nur für seine unersetzliche Hilfe bei der Auswahl von CCD-Kamera und zugehöriger Software, für diverse hilfreiche Tipps zu Bildverarbeitung und graphischer Darstellung, sondern auch für seine Gastfreundschaft und abwechslungsreiche Führungen durch interessante Winkel seiner neuen Wahlheimat Berlin.

Dorothee Tippe danke ich für die Bereitstellung des Skriptes „Statistik für Psychologen“, durch das ich mir den nötigen Hintergrund für die Arbeiten mit SPSS aneignen konnte.

Den Mitgliedern des MECBAD-Konsortiums („mobile genetic elements contribution to bacterial adaptability and diversity“) bin ich zu großem Dank für regen Gedankenaustausch und inspirierende Diskussionen verpflichtet.

Prof. Dr. Bruno Rouot und seiner Arbeitsgruppe am INSERM / Montpellier danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und Dr. Mike Rittig sowie Mr. Selzner für Hilfe und tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen.

Prof. Dr. K. Tanaka und Prof. Dr. M. Ehrmann bin ich für die Sendung von RpoS- bzw. MalE-spezifischen Antiseren dankbar.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name: Heike Schmidt-Eisenlohr

Geburtstag: 12.01.74

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

Eltern: Uwe Schmidt-Eisenlohr; Dipl. Ing.
Maria Schmidt-Eisenlohr; Hausfrau

Ausbildung:

1980-1984: Grundschule in München

1984-1993: Käthe-Kollwitz-Gymnasium in München; Abitur

1993-1998: Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München; Diplom

1996-1997: Integriertes Auslandsstudium an der Universidad de Concepción/ Chile (DAAD-Stipendium)

1999-2002: Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der LMU München unter Leitung von Privatdozent Dr. C. Baron

Mai 2000: Forschungsaufenthalt am INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) in Montpellier/ Frankreich im Labor von Dr. Bruno Rouot