

Regulation der Autoinduktoren von *Vibrio harveyi*

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
vorgelegt von

Matthias Reiger
aus Augsburg

München, Juni 2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2011 bis Juni 2014 an der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Kirsten Jung durchgeführt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Kirsten Jung
2. Prof. Dr. Anton Hartmann

Datum der Abgabe: 30. Juni 2014

Datum der mündlichen Prüfung: 03. Dezember 2014

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen. Die folgende Dissertation liegt weder ganz, noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vor.

München, 30.06.2014

„Freude an der Arbeit lässt das Werk trefflich geraten.“

Aristoteles

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	IV
Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind	VI
Summary.....	VII
Zusammenfassung.....	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Bakterielle Autoinduktion.....	1
1.2 Quorum Sensing allgemein	5
1.3 Das Quorum Sensing System von <i>V. harveyi</i>	7
1.4 Regulation der Autoinduktoren.....	9
1.4.1 Enzymatischer Abbau von AHLs.....	10
1.4.2 AI-2-Transport.....	11
1.5 Zielsetzung.....	13
2. Ergebnisse	14
2.1 Die Rolle der Autoinduktoren bei der Induktion QS abhängiger Zielgene	14
2.2 AI-2 Transport von <i>V. harveyi</i> im Vergleich zu <i>E. coli</i>	20
2.2.1 Export von AI-2	20
2.2.2 Import von AI-2	27
2.3 Die Rolle von Laktonasen in <i>V. harveyi</i>	30
2.4 Die Detoxifikation von Methylglyoxal	39
3. Diskussion.....	48
3.1 Die Regulation von HAI-1, CAI-1 und AI-2 in <i>V. harveyi</i>	48
3.2 Der Einfluss von Quorum Quenching auf die Regulation der Autoinduktor- konzentration und -zusammensetzung	51

3.3	Transport von AI-2	52
3.4	Die Rolle von Laktonasen in <i>V. harveyi</i>	54
3.5	Die Rolle von GloB und GloC in der Detoxifikation von Methylglyoxal.....	56
4.	Material und Methoden	58
4.1	Material.....	58
4.1.1	Geräte.....	58
4.1.2	Chemikalien.....	58
4.1.3	Enzyme.....	59
4.1.4	Kits	59
4.1.5	Antibiotika und Zusätze.....	59
4.1.6	Puffer	60
4.1.7	Medien.....	61
4.1.8	Oligonukleotide.....	62
4.1.9	Plasmide und Stämme.....	67
4.2	Methoden.....	71
4.2.1	Kultivierungsverfahren	71
4.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>V. harveyi</i>	71
4.2.1.2	Dauerkulturen.....	71
4.2.2	Molekularbiologische und genetische Methoden.....	71
4.2.2.1	Plasmidisolierung	71
4.2.2.2	Isolierung genomischer DNA.....	71
4.2.2.3	Modifikation und Amplifikation von DNA	72
4.2.2.4	Elektrophoretische Auftrennung und Extraktion von DNA-Fragmenten.	72
4.2.2.5	Plasmidkonstruktion	72
4.2.2.6	DNA-Sequenzanalyse	72
4.2.2.7	Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme	73
4.2.2.8	Präparation von Phagenkonzentrat	73
4.2.2.9	Präparation von RNA	74
4.2.3	Biochemische und analytische Methoden	75

4.2.3.1	qRT-PCR.....	75
4.2.3.2	Produktion und Reinigung von Proteinen.....	75
4.2.3.3	Gelfiltration	77
4.2.3.4	Protein Detektion	77
4.2.3.5	Affinitätsbestimmung mit Tryptophanfluoreszenzmessung	78
4.2.3.6	Visualisierung von Phagen mit TEM	79
4.2.3.7	Nachweis von HAI-1	79
4.2.3.8	Nachweis von Methylglyoxal.....	80
4.2.3.9	Nachweis von Glutathion.....	80
4.2.3.10	Nachweis von AI-2.....	81
4.2.4	Bioinformatik	81
5.	Quellen	83
6.	Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

AHL	<u>A</u> cy <u>l</u> h <u>o</u> moser <u>i</u> n <u>l</u> ak <u>t</u> on
AI(s)	Autoinduktor(en)
AI-2	Autoinduktor-2
Amp ^R	Ampicillin Resistenz
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
CAI-1	<i>Vibrio cholerae</i> Autoinduktor-1
Cam ^R	Chloramphenicol Resistenz
CM	Zytoplasmamembran
CP	Zytoplasma
C _T	Cycle threshold (Schwellenwert)
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DHAP	<u>D</u> ihydroxy <u>a</u> ce <u>t</u> on <u>p</u> hos <u>p</u> hat
D-Lak	<u>D</u> - <u>L</u> aktat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPD	Dihydroxypentandion
FMNH ₂	Reduziertes Riboflavin-phosphat
FRET	<u>F</u> luorezenz- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergie- <u>T</u> ransfer
GSH	Glutathion
HAI-1	<i>Vibrio harveyi</i> Autoinduktor-1
nHis-Tag	Affinitäts-Tag aus n Histidinen
HTA	<u>H</u> em <u>i</u> th <u>i</u> o <u>a</u> ce <u>t</u> al
Kan ^R	Kanamycin Resistenz
MG	<u>M</u> ethyl <u>g</u> lyoxal
MIC	<u>M</u> inimale <u>i</u> nhibitorische <u>K</u> onzentration
mRNA	Messenger RNA
MU	<u>M</u> iller <u>U</u> nits
P	Phosphorylgruppe
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> ele <u>e</u> lektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion

PP	<u>P</u> eriplasma
QQ	<u>Q</u> orum <u>Q</u> uenching
QS	<u>Q</u> orum <u>S</u> ensing
RLU	Lumineszenz/OD ₆₀₀ (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SAH	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl <u>h</u> omocystein
SAM	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl <u>m</u> ethionin
SLG	<u>S</u> - <u>L</u> aktoyl <u>g</u> lutathion
sRNA	Kleine regulatorische (small regulatory) RNA
TEM	<u>T</u> ransmissionse <u>l</u> ektronen <u>m</u> ikroskopie
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind

Anetzberger, C., Reiger, M., Fekete, A., Schell, U., Stambrau, N., Plener, L., Kopka, J., Schmitt-Kopplin, P., Hilbi, H., and Jung, K. (2012). Autoinducers act as biological timers in *Vibrio harveyi*. *PLoS ONE* 7(10): e48310.

Drees, B., Reiger, M., Jung, K., and Bischofs, I.B. (2014). A modular view of the diversity of cell-density-encoding schemes in bacterial quorum sensing systems. *Biophysical Journal* in Druck (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.031>)

Rossmann, F.S., Wobser, D., Racek, T., Puchalka, J., Rabener, E.M., Reiger, M., Diederich, A.-K., Hendrickx, A.P.A., Jung, K., Klein, C., and Huebner, J. (2014). Quorum sensing and phages – a novel mechanism for dispersal of virulence genes. *Science Translational Medicine*. in Revision

Reiger, M.*, Lassak, J.*, and Jung, K. (2014). Deciphering the role of type II glyoxalase isoenzyme YcbL (GlxII-2) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.*

* Die gekennzeichneten Autoren haben zu gleichen Teil zur Entstehung der Arbeit beigetragen.

Summary

In *Vibrio harveyi* three autoinducers (AIs) Z-3-aminoundec-2-en-4-one CAI-1, N-(3-hydroxybutyryl)-D-homoserine lactone HAI-1 and the furanosylboratdiester AI-2 induce the quorum sensing (QS) regulatory cascade. Thus, among other phenotypes, bioluminescence, biofilm formation and exoprotease activity are affected. In order to understand the sensing mechanism of the QS cascade, the expression of various QS target genes in the wild type was examined. Compared to an AI-negative mutant it was obvious that not the cell density but the concentration of the different AIs and their interplay control the QS signaling cascade. Both changed depending on the media composition and thus allow the modulation of e.g. bioluminescence (Chapter 2.1.). The extracellular AI concentration in the medium depends crucially on the production and transport. Whereas HAI-1 diffuses freely out of the cell due to its chemical properties, CAI-1 and AI-2 have to be actively transported across the membrane.

In *Escherichia coli*, the deletion of the putative transporter YdgG affects the extracellular AI-2 concentration. In this work an additional potential exporter YhhQ was identified bioinformatically. AI-2 binding studies on both proteins, showed a micromolar affinity for YhhQ but did not exhibit affinity for YdgG. In contrast to this, the extracellular concentration of the AI-2- $\Delta ydgG/\Delta yhhQ$ double mutant compared to the single deletion mutants is 4 μM lower. Parallel *in vivo* studies on the YhhQ ortholog in *V. harveyi*, however, suggest redundant transport mechanisms. In this context, cell lysis could also be involved. This is why the role of phage mediated lysis should be investigated (Chapter 2.2.1.).

Regardless of production and export, the external AI concentration can also be controlled actively by import and subsequent degradation. In this context, the AG Bischofs predicted an AI-2 importer, which existence has been validated experimentally in the course of this PhD thesis (Chapter 2.2.2.).

Another way of action of the so-called quorum quenching is the degradation of acylhomoserinlactones as HAI-1 by acylases and lactonases. Bioinformatics analysis of the AG Streit identified five potential lactonases VIBHAR_02708, VIBHAR_03213, VIBHAR_06370, VIBHAR_06736 and VIBHAR_06900. However, intensive studies on the wild type and the "lactonase" mutants showed that there is no active degradation of HAI-1 in *V. harveyi*. VIBHAR_06370 is a β -lactamase that conveys a natural ampicillin resistance (Chapter 2.3.). In contrast, VIBHAR_02708 and VIBHAR_03213 encode the type II glyoxalases GloB and GloC and thus contribute to the detoxification of methylglyoxal not only in *V. harveyi* but also in *E. coli* (Chapter 2.4.).

Zusammenfassung

In *Vibrio harveyi* induzieren die drei Autoinduktoren (AIs) Z-3-Aminoundec-2-en-4-on CAI-1, N-(3-Hydroxybutyryl)-D-Homoserinlaktone HAI-1 und der Furanosylboratdiester AI-2 die Quorum Sensing (QS) Regulationskaskade. So werden unter anderem Biolumineszenz, Biofilmbildung und Exoproteaseaktivität beeinflusst. Um die Sensorik der QS Kaskade zu verstehen, wurde die Expression verschiedener QS-Zielgene im Wildtyp untersucht. Im Vergleich mit einer AI-negativen Mutante zeigte sich, dass nicht die Zelldichte sondern die Konzentration der verschiedenen AIs und deren Verhältnisse zueinander die QS-Signalkaskade steuern. Beides verändert sich in Abhängigkeit von der Medienzusammensetzung und erlaubt so die Modulation z.B. der Biolumineszenz (Kapitel 2.1.). Die extrazelluläre AI-Konzentration im Medium hängt entscheidend von der Produktion sowie dem Transport ab. Während HAI-1 aufgrund seiner chemischen Eigenschaften frei aus der Zelle diffundiert, müssen CAI-1 und AI-2 aktiv über die Membran transportiert werden.

In *Escherichia coli* beeinflusst die Deletion des möglichen Transporters YdgG die extrazelluläre AI-2 Konzentration. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bioinformatisch mit YhhQ ein zusätzlicher potentieller Exporter identifiziert werden. Bindestudien an beiden Proteinen, zeigten eine mikromolare Affinität für YhhQ jedoch nicht für YdgG. Im Gegensatz dazu ist die extrazelluläre AI-2-Konzentration der $\Delta ydgG/\Delta yhhQ$ Doppelmutante im Vergleich zu den Einzeldelationen um 4 μM reduziert. *In vivo* Parallelstudien am YhhQ Ortholog in *V. harveyi* allerdings, lassen redundante Transportmechanismen vermuten. In diesem Zusammenhang könnte z.B. auch eine durch Phagen vermittelte Zelllyse eine Rolle spielen (Kapitel 2.2.1.).

Unabhängig von Produktion und Export kann die externe AI-Konzentration auch durch aktive Reduktion in Form von Import und intrazellulärem Abbau kontrolliert werden. In diesem Zusammenhang sagte die AG Bischofs einen AI-2-Importer vorher und dessen Vorhandensein wurde im Verlauf dieser Promotion experimentell validiert (Kapitel 2.2.2.).

Eine weitere Möglichkeit des sogenannten Quorum Quenching ist der Abbau von Acylhomoserinlaktonen wie HAI-1 durch Acylasen und Laktinasen. Bioinformatische Analysen aus der AG Streit identifizierten die fünf potentiellen Laktinasen VIBHAR_02708, VIBHAR_03213, VIBHAR_06370, VIBHAR_06736 und VIBHAR_06900. Jedoch, liegt nach intensiven Untersuchungen am Wildtyp und den „Laktinase“-Mutanten der Schluss nahe, dass es in *V. harveyi* keinen aktiven HAI-1 Abbau gibt. Vielmehr handelt es sich bei VIBHAR_06370 um eine β -Laktamase, die eine natürliche Ampicillinresistenz vermittelt (Kapitel 2.3.). Im Gegensatz dazu, kodieren VIBHAR_02708 und VIBHAR_03213 die Typ II Glyoxalasen GloB und GloC und tragen damit zur Detoxifikation von Methylglyoxal nicht nur in *V. harveyi* sondern auch in *E. coli* bei (Kapitel 2.4.).

1. Einleitung

1.1 Bakterielle Autoinduktion

Der erste Autoinduktor wurde 1981 von Eberhard *et al.* als Acylhomoserinlaktone (AHL) beschrieben und wurde bei *Vibrio fischeri*, einem Symbionten des Zwergtintenfisches *Euprymna scolopes*, bereits 1970 als unbekannter Induktor der Biolumineszenz und im Jahr 2007 als Regulator 18 weiterer Gene entdeckt (6, 45, 49, 131). Inzwischen sind über 70 dieser LuxI-LuxR-Systeme beschrieben (47). Oft werden mehrere AHLs von einem Organismus produziert, wobei meist ein Molekül dominiert (150, 210). Die Gruppe der AHLs spielt in vielen Gram-negativen Proteobakterien als Signalmolekül für die Intraspezieskommunikation eine große Rolle (24, 64). Die Moleküle setzen sich aus einem Homoserinlaktone-Ring und einer Acylkette in der Länge von C4 bis C18 mit verschiedenen Modifikationen, vorrangig an C3, zusammen (105) und werden unter anderem von Enzymen der LuxI Familie synthetisiert (Tabelle 1) (46, 64).

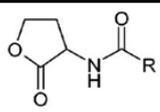
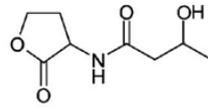
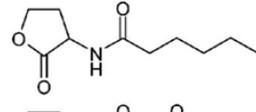
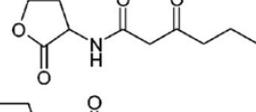
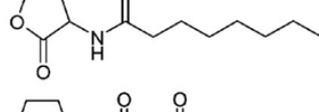
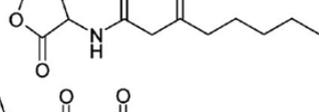
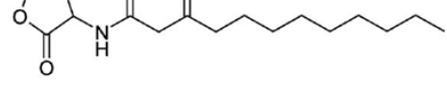
Bezeichnung	Struktur	Organismus
N-Acyl-homoserinlaktone (AHL)		
N-3-Hydroxybutyryl-homoserinlaktone (3-hydroxy-C4-HSL)		<i>Vibrio harveyi</i> (LuxM)
N-Hexanoyl-homoserinlaktone (C6-HSL)		<i>Chromobacterium violaceum</i> (CvII)
N-3-Oxo-hexanoyl-homoserinlaktone (3-oxo-C6-HSL)		<i>Vibrio fischeri</i> (LuxI)
N-Octanoyl-homoserinlaktone (C8-HSL)		<i>Burkholderia cepacia</i> (CepI)
N-3-Oxo-octanoyl-homoserinlaktone (3-oxo-C8-HSL)		<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (TraI)
N-3-Oxo-dodecanoyl-homoserinlaktone (3-oxo-C12-HSL)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LasI)

Tabelle 1: Beispiele für einige Acylhomoserinlaktone (AHLs).

Unterschiedliche AHLs werden von verschiedenen LuxI Homologen in unterschiedlichen Bakterien produziert [Modifiziert nach Kumari *et al.* 2006 (105)].

Bereits einige Jahre zuvor, 1965, wurde von A. Tomasz ein „Hormon ähnliches“ externes Zellprodukt als notwendiger Faktor für die genetische Kompetenz von *Streptococcus pneumoniae* (früher *Pneumococcus*) beschrieben, der später als modifiziertes Oligopeptid identifiziert wurde. Gram-positive Bakterien nutzen für ihre Intraspezieskommunikation modifizierte Oligopeptide als Autoinduktoren, die genetisch codiert und deshalb speziesspezifisch sind (116, 148).

Eine geringere Verbreitung und Bedeutung haben Quinolone, die zum Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa* als Als verwendet werden (77) oder das flüchtige 3-Hydroxypalmitylsäure Methylester aus *Ralstonia solanacearum* (59), α,β ungesättigte Fettsäuren (207) oder p-Kumaryl-Homoserinlaktone aus *Rhodopseudomonas palustris* (167). Zu dieser Gruppe der weniger verbreiteten speziesspezifischen Als zählen auch das α -Hydroxytri- und pentadecan-4-on aus *Vibrio cholerae* (vcCAI-1) bzw. *Legionella* (LAI-1) (82, 176) sowie das 3-Aminoundec-2-en-4-on aus *Vibrio harveyi* (CAI-1) (4) und ähnliche Moleküle, die von *Vibrio* sp. detektiert werden können (134).

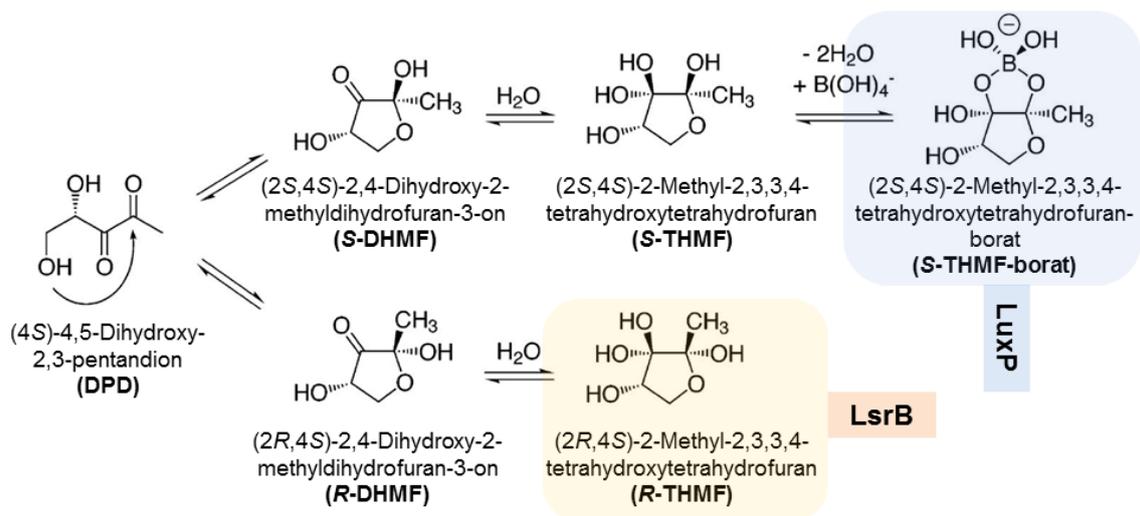


Abbildung 1: Gleichgewichtsreaktion von AI-2.

Die Vorstufe DPD wird von verschiedenen Bakterienarten synthetisiert und steht in direktem Gleichgewicht mit R-DHMF, R-THMF, S-DHMF, S-THMF. S-THMF wird in Gegenwart von Borsäure zu S-THMF-borat umgebaut, das an LuxP von *Vibrio harveyi* bindet, während R-THMF von LsrB z.B. aus *Salmonella enterica*, gebunden und erkannt wird. Abbildung aus Miller *et al.* 2004 modifiziert (125).

Zusätzlich zu diesen Intraspeziesignalen ist eine weit verbreitete universelle Signalgruppe bekannt, die die Kommunikation zwischen verschiedenen Spezies ermöglicht (182, 183). Diese entsteht aus einem gemeinsamen Zwischenprodukt, 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD), in einer Gleichgewichtsreaktion und wird Autoinduktor-2 (AI-2) genannt (168). Dabei steht die Kettenform (DPD) im Gleichgewicht mit S- und R-

THMF (Methyltetrahydroxytetrahydrofuran) (125). Diese beiden Furanone werden als AI-2 von verschiedenen Rezeptoren wahrgenommen, denn während LsrB aus *Salmonella enterica* R-THMF bindet, bindet LuxP aus *V. harveyi* nur S-THMF-borat (Abbildung 1) (28, 125, 195).

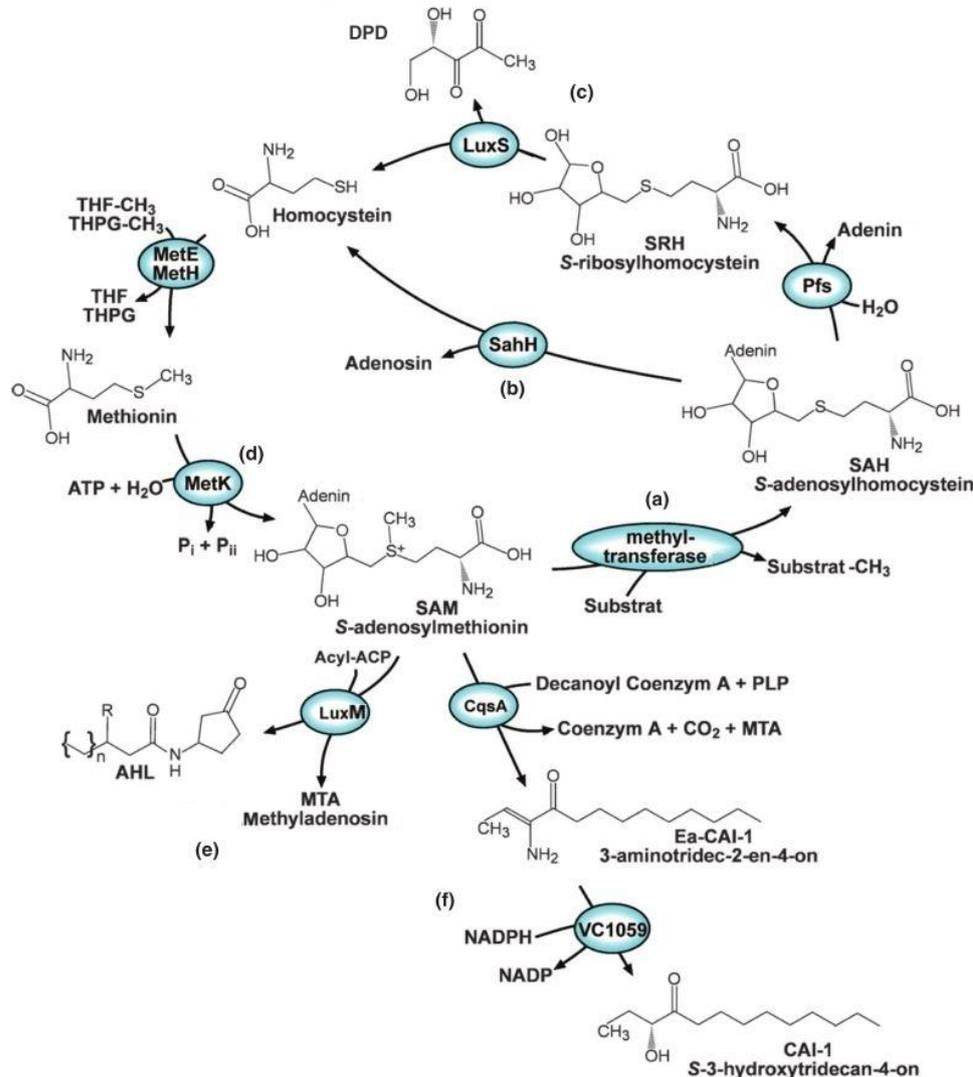


Abbildung 2: SAM-Kreislauf aus dem die Autoinduktoren produziert werden.

(a) Der Transfer einer Methylgruppe von SAM auf ein Akzeptormolekül erzeugt das toxische Zwischenprodukt, SAH. (b) Organismen, die das Enzym SahH enthalten, konvertieren SAH direkt zu Homocystein. (c) Diejenigen Bakterien, die LuxS nutzen, katalysieren eine Reaktion in zwei Schritten: Pfs erzeugt zunächst SRH und Adenin aus SAH, dann wandelt LuxS SRH in Homocystein und DPD, die lineare Form von AI-2, um. (d) SAM wird mit Hilfe von Methionin in mehreren Schritten aus Homocystein regeneriert. THF-CH₃ und THPG stehen für N-Methyltetrahydrofolat und 5-Methyltetrahydropteroylglutamat. (e) LuxI Typ-Proteine verwenden ebenfalls SAM und Acyl-Carrier-Proteine (Acyl-ACP) als Substrate für die Produktion von AHL Autoinduktoren. (f) *Vibrio cholerae* Autoinducer CAI-1 wird auch aus SAM und Decanoyl-Coenzym A über eine mehrstufige Reaktion synthetisiert. Dafür werden CqsA, eine Pyridoxalphosphatase-Aminotransferase und VC1059, ein nicht weiter charakterisiertes Enzym, verwendet. *Vibrio harveyi* besitzt ein Homolog zu CqsA, das Oktanoyl-CoA zu Z-3-Aminoundec-2-en-4-on umwandelt. Abbildung aus Pereira *et al.* 2013 (146).

Die Synthese der Autoinduktoren ist über S-Adenosylmethionin (SAM) direkt an den Metabolismus gekoppelt. Dabei ist SAM der Hauptmethylgruppendonor, der allerdings in Folge der Übertragung einer Methylgruppe in den zytotoxischen Stoff S-Adenosylhomocystein (SAH) umgebaut wird (168). Die Entgiftung von SAH zu Homocystein kann über zwei verschiedene Wege erfolgen, die charakteristisch für bestimmte Bakterienstämme sind. So bevorzugen Archaeen, Eukaryoten, Alphaproteobakterien, Actinobakterien und Cyanobakterien den SAH-Hydrolaseweg zur direkten Entgiftung, während die meisten Vertreter der Gamma-, Beta-, und Epsilonproteobakterien sowie Firmicutes den Pfs-LuxS-Weg nutzen. Hierbei entsteht dann AI-2 (Abbildung 2) (146, 182), das neben der Signalfunktion als Autoinduktor auch den metabolischen Status der Zelle abbildet (212).

Ausgehend von Homocystein kann über Methionin SAM regeneriert werden, aus dem neben AI-2 auch AHLs und eine weniger verbreitete Autoinduktorgruppe, CAI-1, synthetisiert werden. Die Nutzung dieser Stoffwechselprodukte als Autoinduktoren ist möglicherweise, zumindest in einigen Arten, ein sekundärer Effekt (156, 211).

1.2 Quorum Sensing allgemein

Der Begriff des „Quorum Sensing“ (QS) beschreibt die Zelldichte gekoppelte Genexpression in bakteriellen Gemeinschaften abhängig von der Konzentration von AIs, um die Antwort der Population zu synchronisieren (66). Der Prozess des QS ist sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien weit verbreitet und ermöglicht den Zugang zu Ressourcen, die Einzelzellen nicht nutzen könnten (wie zum Beispiel die Aufnahme von Eisen mit Hilfe von Siderophoren in *V. harvey*). Es wird die Abwehrkraft im Kollektiv erhöht und QS steuert auch die Differenzierung in verschiedene Zellformen (158, 172). Das generelle Prinzip dabei ist, dass ein oder mehrere Signalmoleküle, die sogenannten Autoinduktoren (AI), von den Zellen produziert und in die Umgebung abgegeben werden, wodurch die Autoinduktorkonzentration ansteigt. Die Schwellenkonzentration wird von Rezeptoren wahrgenommen und steuert die konzentrationsabhängige Expression der entsprechenden Gene (Abbildung 3) (97).

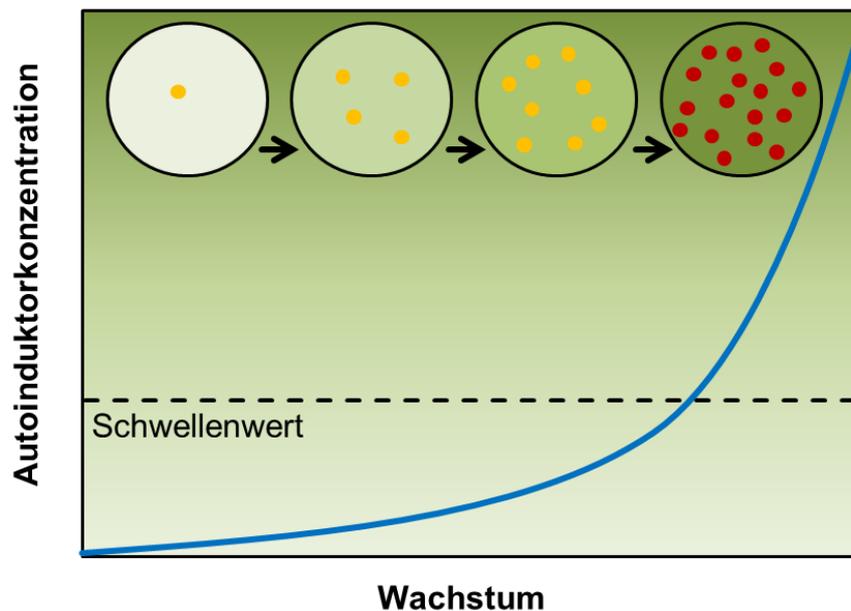


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines einfachen Quorum Sensing Systems.

Bakterien (orange) produzieren und exkretieren kleine Signalmoleküle, die in der Umgebung akkumulieren. Die Konzentration dieser sogenannten Autoinduktoren nimmt mit steigender Zelldichte zu (markiert durch den grünen Gradienten und die blaue Kurve). Wird ein Schwellenwert überschritten, führt die Wahrnehmung des Signals durch Rezeptoren zu Veränderungen der Genexpression von Quorum Sensing regulierten Genen. Die Zellen reagieren auf die abgegebenen Autoinduktoren (rot). Im Fall von Intraspezieskommunikation sind die Zellen, die Autoinduktoren abgeben identisch mit jenen, die reagieren. Die Abbildung wurde nach Keller und Surette (2006) modifiziert (97).

Für bakterielle Populationen ermöglicht dies die Regulation von unterschiedlichen Expressionsmustern bei niedriger (LCD = *low cell density*) bzw. hoher Zelldichte (HCD = *high cell density*) (133).

Die Architektur der QS Systeme ist unterschiedlich komplex und reicht von dem am besten bekannten LuxI/LuxR Mechanismus, bei dem das Signal von LuxI (oder einer homologen Synthase) produziert und vom zytoplasmatischen Sensor und Regulator LuxR (oder einem Homolog dazu) wahrgenommen und umgesetzt wird – wie zum Beispiel das LuxI/LuxR System von *V. fischeri* - (133, 147, 159), über einfache Zweikomponenten- und Phosphorelaissysteme, bei welchen das Signal in einer reversiblen Phosphorylierungsreaktion von einer Sensorhistidinkinase auf einen Antwortregulator weitergeleitet wird – wie zum Beispiel bei der Sporulation von *Bacillus subtilis* - (178), bis zu einer Kombination aus diesen beiden Systemen mit einer größeren Zahl an verschiedenen produzierten und wahrgenommenen Autoinduktoren – beispielsweise das QS-System von verschiedenen Vibrionen (204).

1.3 Das Quorum Sensing System von *V. harveyi*

Ein Modellorganismus zur Charakterisierung von QS Systemen ist *V. harveyi*. Im Jahr 2010 ist der lumineszente Stamm ATCC BAA-1116 (BB120), der unter anderem in dieser Arbeit als Wildtyp verwendet wurde, mit Hilfe einer vergleichender Genomanalyse der Art *V. campbellii* zugeordnet worden statt wie bisher *V. harveyi* (112). Um die in der Arbeitsgruppe gängige Bezeichnung beizubehalten wird in dieser Arbeit die Bezeichnung *V. harveyi* verwendet.

Die QS-Signalkaskade von *V. harveyi* ist sehr komplex (Abbildung 4). Dabei werden die Signale von drei verschiedenen AIs über eine Phosphorelais-Kaskade weitergeleitet,

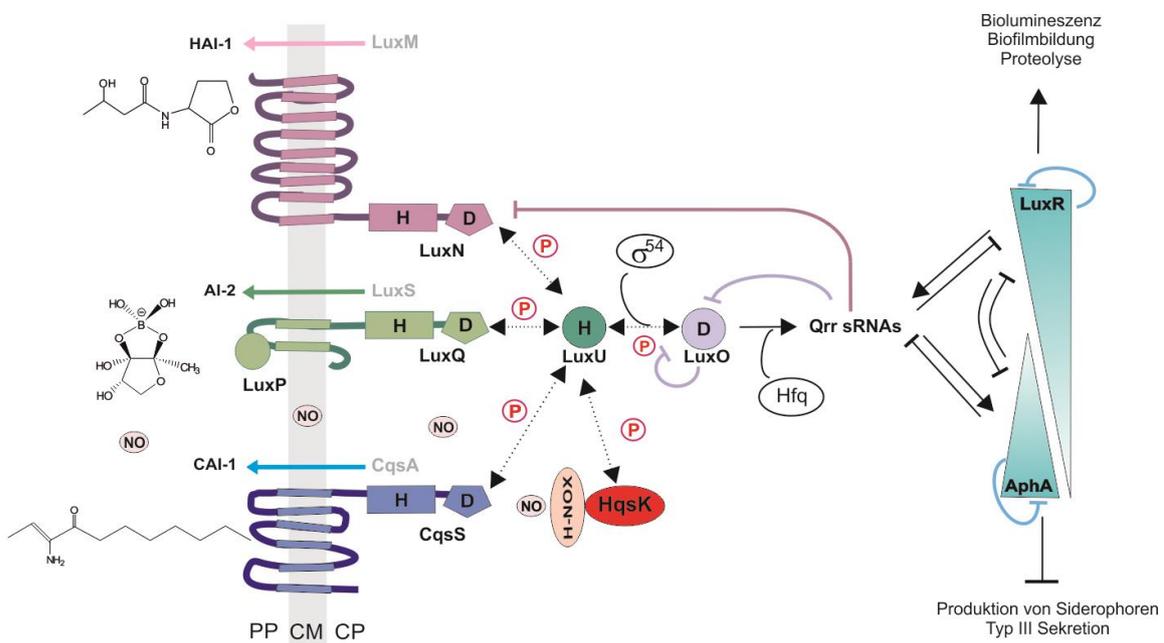


Abbildung 4: Quorum Sensing Kaskade von *V. harveyi*.

Die Autoinduktoren (AIs) HAI-1, AI-2 und CAI-1 werden von den Synthesen LuxM, LuxS und CqsA produziert. Bei niedrigen Zelldichten ist die AI-Konzentration so gering, dass sie kaum von den Kinasen LuxN, LuxP-LuxQ und CqsS wahrgenommen werden. Dadurch ist die Autophosphorylierungsaktivität der Kinasen hoch und die Phosphorylgruppe wird über das Histidin-Phosphotransfer-Protein LuxU auf den von σ^{54} -abhängigen Antwortregulator LuxO übertragen. Phosphoryliertes LuxO aktiviert die regulatorischen Qrr sRNAs, die zusammen mit dem Chaperon Hfq das Transkript von *luxR* destabilisieren, während *aphA* aktiviert wird. Dadurch werden die Proteinmengen der Masterregulatoren kontrolliert und QS abhängige Gene reguliert. Steigt die AI-Konzentration an, läuft der Phosphatfluss entgegengesetzt, sodass die Konzentration von LuxR ansteigt und AphA abnimmt. Ein weiteres System, das aus der löslichen Histidinkinase HqsK und dem NO-Sensor H-NOX besteht, integriert das Signal durch die Phosphorylierung von LuxU. Während bei hohen Zelldichten und den damit verbundenen hohen AI-Konzentrationen z.B. Biofilmbildung, Biolumineszenz und Exoproteaseaktivität induziert und die Produktion von Siderophoren und TypIII-Sekretion reprimiert werden, ist die Expression bei niedrigen Zelldichten genau umgekehrt. PP, Periplasma; CM, Zytoplasmamembran; CP, Zytoplasma. Die Abbildung wurde nach Anetzberger *et al.* 2012 modifiziert (4).

wodurch die Expression der Masterregulatoren LuxR und AphA kontrolliert und somit auch die Expression bestimmter Gene reguliert wird (201).

Die Autoinduktoren AI-2, HAI-1 und CAI-1 werden von der jeweils korrespondierenden Synthase (LuxS, LuxM und CqsA) synthetisiert. Die aktive Form von AI-2, die von LuxP gebunden und dann von der Sensorkinase LuxQ wahrgenommen wird, enthält Borat (28, 79, 132) und ist ein Interspezies-Signal. Das Acylhomoserinlaktone (AHL) 3OHC4-HSL, das HAI-1 genannt wird, ist ein Intraspezies-Signal und interagiert mit einer spezifischen Bindestelle in LuxN (24, 62), während das Z-3-Aminoundec-2-en-4-on CAI-1 (Ea-C8-CAI-1) ein genus-spezifisches Signal ist und von der korrespondierenden Sensorkinase CqsS wahrgenommen wird (79, 135). Alle drei Sensorkinasen sind in die Zytoplasmamembran integriert und leiten die Information der Autoinduktorkonzentration mit Hilfe des Phosphorelais zunächst an das lösliche Histidin-Phosphotransfer-Protein LuxU und dann weiter zum zytosolischen Antwortregulator LuxO (61). An der Position von LuxU wird ein weiteres Signal in das System eingespeist, wobei die NO-Konzentration von H-NOX in der Zelle gemessen und die Information über die lösliche Sensorhistidinkinase HqsK integriert wird (78).

Bei niedriger Zelldichte und somit auch bei niedriger Autoinduktorkonzentration liegt durch die Autophosphorylierungsaktivität der Sensorkinasen und des Phosphotransfers LuxO phosphoryliert vor. In diesem Fall werden kleine regulatorische RNAs (sRNAs; Qrr1-5) transkribiert, von welchen vier (Qrr1-4) zusammen mit Hfq, einem RNA Chaperon, das Transkript des Masterregulators *luxR* destabilisieren, sodass die Konzentration von LuxR auf einem niedrigen Niveau bleibt (171, 196). Gleichzeitig stabilisieren diese sRNAs die Expression von einem zweiten Masterregulator AphA, dessen Konzentration dadurch in der Zelle hoch ist (161). Steigt mit höheren Zelldichten auch die Autoinduktorkonzentration an, ändert sich die Aktivität der Sensorkinasen von Kinase zu Phosphatase, sodass insgesamt eine Dephosphorylierung von LuxO stattfindet. Aus diesem Grund gibt es keine oder weniger Qrr sRNAs und das Verhältnis der Masterregulatoren zueinander kehrt sich um. Demzufolge ist bei HCD die Konzentration von LuxR hoch und die von AphA niedrig (170). Zusammen regulieren AphA und LuxR etwa 700 Gene abhängig von den äußeren Bedingungen, unter anderem den TypIII-Sekretionsapparat, Biolumineszenz, Biofilm und Proteasen (3, 11, 201).

1.4 Regulation der Autoinduktoren

Viele Gene werden durch QS reguliert, wodurch Phänotypen, wie zum Beispiel Biofilmbildung, beeinflusst werden, die die Überlebenschancen der Population erhöhen. Um zufällige Schwankungen auszugleichen, muss das QS-System einerseits robust sein, andererseits aber auch über eine hoch sensitive Regulation verfügen.

Damit ein Signal entsteht, das über die Signalkaskade weitergeleitet werden kann, müssen die Als synthetisiert, sekretiert und detektiert werden. Aufgrund der engen Verknüpfung mit dem Stoffwechsel ist die Verfügbarkeit und Produktion der Als stark von den verfügbaren Nährstoffen abhängig (31). Die Tatsache, dass Autoinduktoren exkretiert wurden, zieht nicht automatisch die gleiche Wahrnehmung jeder Zelle nach sich. Die Zahl der Rezeptoren und die Diffusion beeinflussen speziell in Kolonien und der direkten Umgebung einer Zelle die Wahrnehmung (80, 219). Diffusion stellt eine Möglichkeit für Zellen dar, den Raum, den sie besiedeln, zu erfassen und zu reagieren. Das spielt gerade für die effiziente Produktion von Exoenzymen wie z.B. Siderophoren oder Proteasen eine Rolle (153, 194, 209). Doch die meisten Als gelangen nicht mit Hilfe von Diffusion in die Umgebung, wie kurzkettige AHLs, sondern müssen aktiv über die Membran transportiert werden, wie beispielsweise langkettige AHLs (mehr als 10 C-Atome) und AI-2. Über den Transport kann demnach die Signalauscheidung bzw. intrazelluläre Wahrnehmung reguliert werden (93, 95, 126, 143).

Über die Regulation der Synthesen ist wenig bekannt, lediglich für die AI-2 Synthese LuxS sind in verschiedenen Bakterien unterschiedliche Regulationsmechanismen beschrieben. In *Staphylococcus aureus* z.B. reguliert eine posttranslationale Modifikation in Form von Phosphorylierung die Aktivität von LuxS (35), während in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *luxS* konstitutiv exprimiert wird. Letztendlich wird in diesem Fall die AI-2 Konzentration von Pfs (dem zweiten Enzym, das an der AI-2 Synthese beteiligt ist) gesteuert, dessen Promotor reguliert ist (12). Im Gegensatz dazu steigt in *E. coli* die Expression von *luxS* in Korrelation zum Wachstum an und kann mit Glukose induziert werden (73, 110, 206, 214). Während in klassischen LuxI/LuxR AHL-Systemen LuxR die Transkription von *luxI* reguliert (65, 103), ist für *V. harveyi* weder eine Regulation der AHL-Synthese LuxM noch der Synthese von CAI-1, CqsA, bekannt.

Neben der Genregulation der Synthesen und der Transportkontrolle gibt es auch andere Strategien, um die AI-Konzentration zu steuern. Zwei generelle Strategien, die auch für die Pharmakologie bei der Entwicklung von neuen Antibiotika oder unterstützenden Substanzen, die die Biofilmbildung verhindern, von Bedeutung sind, ist zum einen die Blockade des Rezeptors durch Ligandenmimikri mit Analoga und andererseits die Neutralisierung von Autoinduktoren durch Degradation (2, 43, 67, 222,

223). Strategien, die über die Beeinflussung der Autoinduktorkonzentration die Zell-Zell-Kommunikation stören, werden mit dem Begriff des „Quorum Quenching“ (QQ) bezeichnet.

1.4.1 Enzymatischer Abbau von AHLs

Ein einfacher Weg, die Kommunikation mit Hilfe von AHLs zu stören, ist der Abbau des Signals. Aufgrund der chemischen Struktur der AHLs gibt es nur vier verschiedene Möglichkeiten, um die Moleküle abzubauen (Abbildung 5 A), wobei durch Acylasen (3) und Deaminasen (4) zwei Spaltprodukte entstehen, und durch Decarboxylasen (2) und Laktonasen (1) nur der Laktoring geöffnet wird (43).

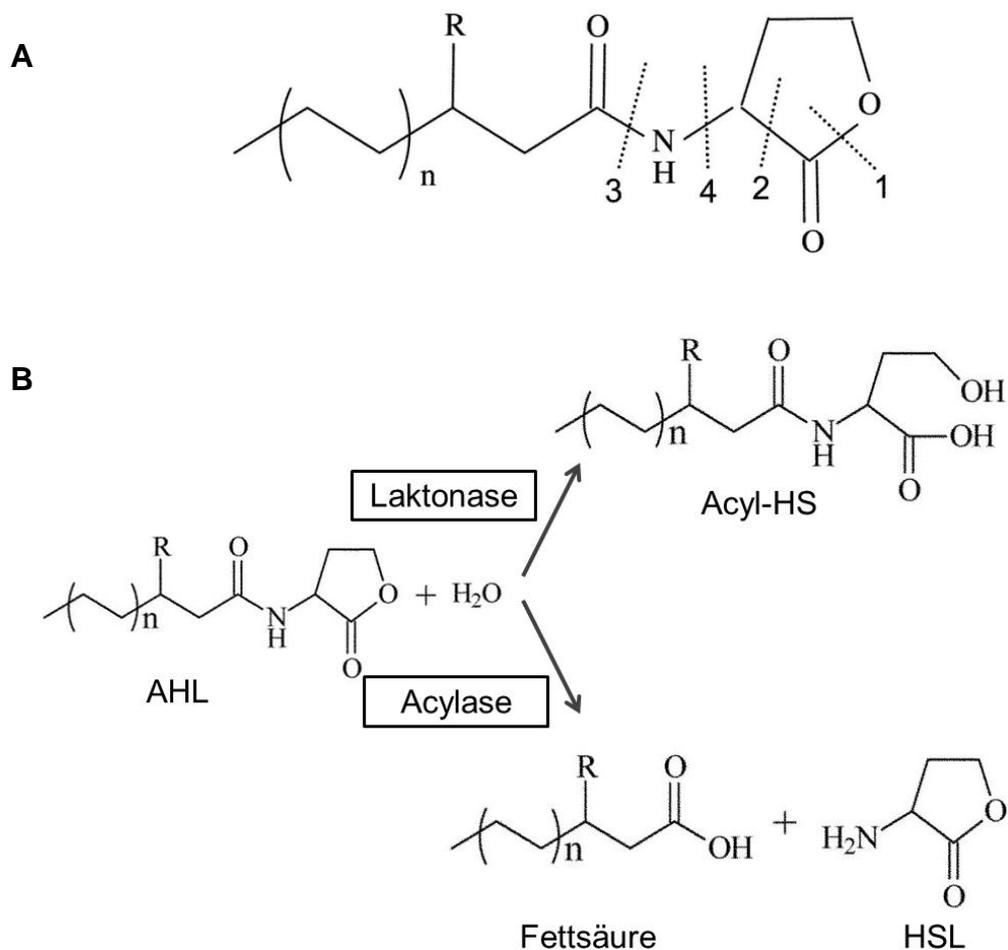


Abbildung 5: Die Struktur von Acylhomoserinlaktonen und Spaltungsmechanismen.

(A) zeigt die Grundstruktur von Acylhomoserinlaktonen (AHLs) und die möglichen enzymatischen Schnittstellen für Laktonasen (1), Decarboxylasen (2), Acylasen (3) und Deaminasen (4). (B) Es wurden bisher Acylasen und Laktonasen entdeckt. Laktonasen öffnen den Laktoring, sodass ein Acyl-Homoserin (Acyl-HS) entsteht, während Acylasen das AHL in eine Fettsäure und das Homoserinlaktone (HSL) spaltet. Modifiziert nach Dong und Zang 2005 (43).

Der Mechanismus der AHL-Degradation ist in verschiedenen Bakterienarten verbreitet, jedoch wurden bisher nur Acylasen oder Laktonasen beschrieben (Abbildung 5 B), die tatsächlich für den Abbau von AHLs verantwortlich sind (37). Die Hydrolyse des Homoserinlaktongrings zu einer Fettsäure und dem Homoserinlakton durch Laktonasen (Abbildung 5 B) ist weitgehend unabhängig von der Kettenlänge (208). Bekannte und gut charakterisierte Laktonasen sind AiiA aus *Bacillus* sp. (42, 102), AhlD aus *Arthrobacter* sp., welche neben den langkettigen auch C4-AHLs abbauen kann (142), QsdA aus *Rhodococcus* sp. (200) und AttM aus *Agrobacterium tumefaciens* (75). Es gibt auch einige gut beschriebene Acylasen, wie zum Beispiel AhlM aus *Streptomyces* sp. (141), PvdQ und QuiP aus *Pseudomonas aeruginosa* (84, 85), AiiD aus *Ralstonia eutropha* (113) und AiiC aus *Anabaena* sp., die eine große Bandbreite in Bezug auf den Abbau unterschiedlicher AHLs hat (157). Dabei entsteht durch Acylasen immer nur ein Produkt, nämlich das korrespondierende Acyl-Homoserin (Abbildung 5 B).

Die Möglichkeit, AHLs abzubauen, ist in der Natur weit verbreitet, denn nicht nur Bakterien, sondern auch Menschen, Pilze und Pflanzen können AHLs abbauen; besonders in Bereichen starker Interaktionen mit Bakterien wie Lungenepithelzellen oder Rhizosphäre hat dies Bedeutung (199). Das unterstreicht den Vorteil davon, die AI-Konzentration und damit die Expression bestimmter Funktionen zu steuern.

1.4.2 AI-2-Transport

Aufgrund der globalen Verbreitung von AI-2-Produktion durch LuxS in Bakterien und die enge Einbindung in den zentralen Metabolismus besteht die Möglichkeit, dass in einigen Spezies das Signalmolekül nur ein metabolisches Nebenprodukt ist (146). Um metabolische Effekte durch die Deletion von AI-2 auszuschließen, wurde in primären Arbeiten chemische Komplementation mit exogenem AI-2 verwendet, um die Rolle von AI-2 als Autoinduktor zu zeigen (203, 211). Auch wenn einige Organismen AI-2 nur produzieren, nicht jedoch als Signalmolekül nutzen, beeinflusst dies die Wahrnehmung der Umwelt von anderen Spezies und ermöglicht diesen eine Anpassung. Die AI-2 Moleküle werden im Zytoplasma synthetisiert und müssen aufgrund der hydrophilen Struktur und der damit verbundenen niedrigen Affinität zu Lipiden über die für diese undurchlässige Membran transportiert werden (93). Bisher wurde lediglich ein Transporter, YdgG, für AI-2 Export in *E. coli* beschrieben, der jedoch nur einen geringen Einfluss auf die extrazelluläre AI-2-Konzentration hat (81). Im Gegensatz dazu ist der Import von AI-2 in *E. coli* umfassend untersucht (146). Daran sind zwei Systeme beteiligt (Abbildung 6).

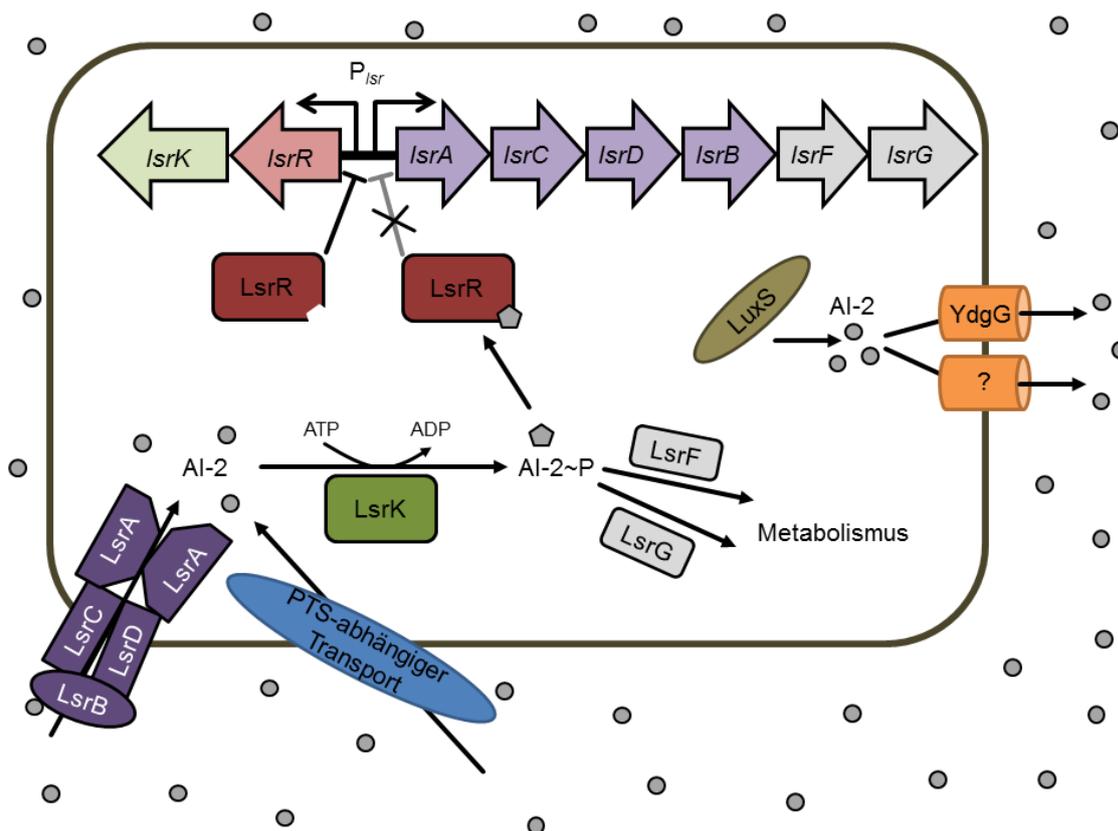


Abbildung 6: Schematische Abbildung des AI-2-Transports in *E. coli*.

AI-2 wird von LuxS synthetisiert und mit Hilfe von YdgG und anderen Transportern exportiert. In der frühen Wachstumsphase ist die extrazelluläre Konzentration von AI-2 zunächst gering. In dieser Phase wird die Expression des Lsr-Systems vom Repressor LsrR gehemmt. Im Wachstumsverlauf nimmt die AI-2 Konzentration zu, wodurch anfängliche Aufnahme mit Hilfe eines PTS-abhängigen Transporters erfolgt und das importierte AI-2 durch LsrK phosphoryliert wird (AI-2~P). AI-2~P bindet an LsrR, was zur Aufhebung der Repression *Isr*-Operons führt. Dadurch kann Lsr-abhängiger Transport einsetzen, bei dem AI-2 an das periplasmatische Bindepotein LsrB bindet und über die beiden Transmembranproteine, LsrC und LsrD, und das ATP-Bindeprotein LsrA, die zusammen den Transporter bilden, aufgenommen wird. Hierbei wird mehr AI-2~P erzeugt, wodurch die Expression des Transporters bei hohen Zelldichten weiter induziert wird. AI-2 Importsteigerungen und extrazelluläre Konzentration von AI-2 werden schnell als Folge dieser positiven Rückkopplungsschleife erschöpft. LsrG und LsrF bauen AI-2~P ab.

Den größten Anteil an dem Import trägt das aus zwei Operons bestehende Lsr-System, das neben *E. coli* auch in *S. enterica* serovar Typhimurium charakterisiert ist und vom cAMP-CRP Komplex sowie vom Repressor LsrR reguliert wird (184, 206, 214). Der Membrankanal wird aus den Transmembranproteinen LsrC und LsrD gebildet und wird von dem ATP-Bindeprotein LsrA energetisiert (184, 185, 214), während die Bindung durch das Bindepotein LsrB erfolgt (144). Nach der Aufnahme wird das internalisierte AI-2 durch die Kinase LsrK zu AI-2~P phosphoryliert, das an den Repressor LsrR bindet und somit die Repression aufhebt (215, 217). Dies führt einerseits zu einer erhöhten Produktion an

Transportern und dem verstärkten Abbau von AI-2~P durch die Prozessierung mit LsrF und LsrG (40, 121), und andererseits zu einer größeren Menge von Repressor und Kinase. Diese Autoregulation ermöglicht die schnelle Aufnahme und Umsetzung von externem AI-2 sowie eine optimale Anpassung an Konzentrations-änderungen. Damit eine Aktivierung des Systems initial stattfinden kann wird zu Beginn AI-2 über ein Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PTS) importiert, welches essentiell für die Aktivierung des *lsr* Operons ist (145, 184). Neben diesem Aufnahmesystem gibt es noch das Bindeprotein RbsB eines Ribose-ABC-Transporters, das u.a. in *Haemophilus influenzae* AI-2 bindet und an dessen Aufnahme beteiligt ist (7). Organismen, die das Lsr-System nicht haben – wie zum Beispiel *V. harveyi* – nutzen möglicherweise das Rbs-System für die AI-2 Aufnahme (156).

1.5 Zielsetzung

Die QS-abhängige Regulation verschiedener Phänotypen ist weit verbreitet und die QS-Kaskaden sind unterschiedlich komplex. Für die QS-Kaskade von *V. harveyi* ist die Wahrnehmung von drei unterschiedlichen Autoinduktoren charakteristisch. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen Einfluss und Regulation der Autoinduktoren von *V. harveyi* auf das QS-System untersucht werden.

- ❖ Dafür soll zunächst die Rolle der Autoinduktoren bei der Induktion QS abhängiger Zielgene untersucht werden.
- ❖ Im Anschluss daran sollen die Mechanismen des Transports von AI-2 bezüglich Import und Export analysiert werden.
- ❖ Und schließlich soll die Funktion der fünf potentiellen Laktonasen, die in Zusammenarbeit mit der AG Streit identifiziert wurden, aufgeklärt werden.

2. Ergebnisse

2.1 Die Rolle der Autoinduktoren bei der Induktion QS abhängiger Zielgene

In *V. harveyi* beeinflussen drei unterschiedliche Als die Regulation QS-abhängiger Zielgene. In diesem Abschnitt soll der Einfluss jedes einzelnen Als auf die QS-regulierte Biolumineszenz in Abhängigkeit von verfügbaren Nährstoffen analysiert werden. Dazu wurden die Synthasegene in verschiedenen Kombinationen im Wildtyp deletiert, sodass alle Mutanten zwar jeden der drei Autoinduktoren (HAI-1, CAI-1 und AI-2) wahrnehmen können, jedoch entsprechend ihrer Deletion keinen, einen oder zwei Als synthetisieren. OD₆₀₀ und Lumineszenz wurden von verschiedenen, in AB- bzw. LM-Medium wachsenden, *V. harveyi* Stämmen gemessen. In LM-Medium stehen für das Wachstum 1% (w/v) Trypton und 0,5% (w/v) Hefeextrakt zur Verfügung, während nur 0,2% (w/v) Casein und 1% (v/v) Glycerol in AB-Medium enthalten sind und dadurch wesentlich nährstoffarmer ist.

Der Einfluss der Autoinduktoren wurde mit der auf die Zellzahl normierten Lumineszenz (RLU) nach 6 h Wachstum dargestellt (Abbildung 7). Dabei wurde gezeigt, dass ohne Autoinduktorsynthesen die Lumineszenz nicht induziert wurde, während bereits ein AI allein für eine Induktion genügt. Die Intensität der Biolumineszenz, die die einzelnen Autoinduktoren induzieren konnte, reichte von 100 bis 25.000 RLU und war damit im Verhältnis zur RLU bei maximaler Induktion von etwa $4 \cdot 10^6$ relativ gering. Die Intensität war neben der Art des Als auch von dem verwendeten Medium abhängig. Während HAI-1 allein sowohl in AB- als auch in LM-Medium im Vergleich zur Kontrolle, die keine Als produzierte, die Lumineszenz nur um Faktor 3 in einem Bereich unter 1.000 RLU induzierte, waren CAI-1 und AI-2 in unterschiedlichem Maß dazu im Stande. In AB-Medium war dabei der Effekt von AI-2 mit 15.000 RLU etwa um Faktor 10 höher als der von CAI-1, das nur circa 1.700 RLU erreichte. Der gegenteilige Effekt wurde in LM-Medium beobachtet. Wenn jeweils zwei Als synthetisiert wurden war das in AB-Medium hervorgerufene Signal immer mindestens um Faktor 20 höher als die Induktion mit AI-2 allein. Dabei konnte HAI-1 die Induktion durch CAI-1 verstärken ($5 \cdot 10^5$ RLU), wobei die Kombination von AI-2 mit HAI-1 oder CAI-1 bereits die gleiche Signalstärke ergab wie der Wildtyp ($8 \cdot 10^6$ RLU), der alle drei Als synthetisiert. Dieses Ergebnis lies die Schlussfolgerung zu, dass AI-2 zumindest in AB-Medium hauptverantwortlich für die Induktion der Lumineszenz ist, während in LM-Medium eher CAI-1 diese Rolle übernimmt. In LM-Medium zeigte bereits CAI-1 allein mit 25.000 RLU die meiste Aktivierung, die dann in zusätzlicher Anwesenheit von HAI-1 ($0,8 \cdot 10^6$ RLU) oder AI-2 ($1,3 \cdot 10^6$ RLU) das Niveau

des Wildtyps ($2,5 \cdot 10^6$ RLU) erreichte, während die Kombination von HAI-1 und AI-2 lediglich die Biolumineszenz mit 50.000 RLU etwas über den Wert von CAI-1 allein (25.000 RLU) induzieren konnte.

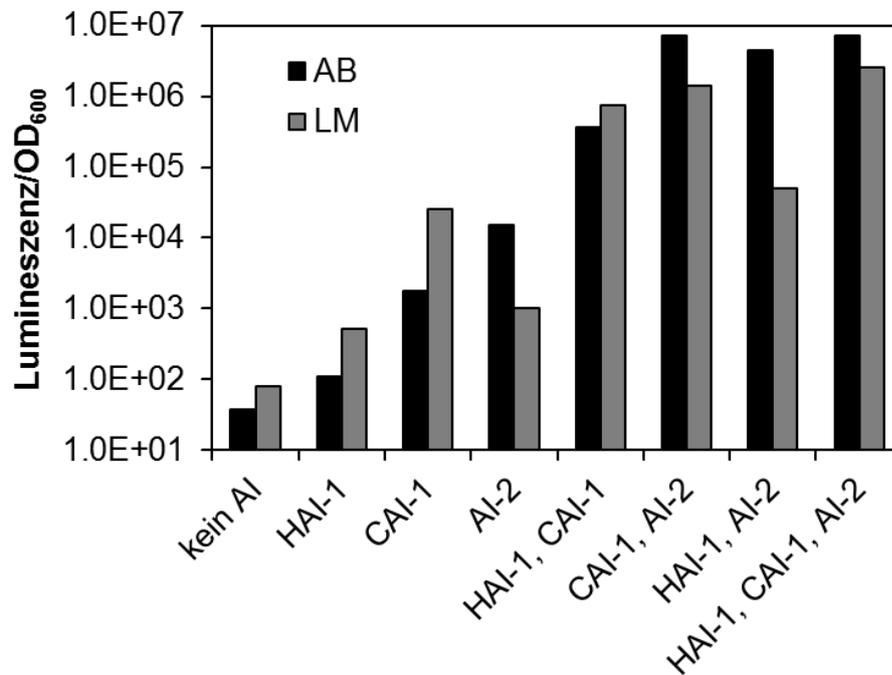


Abbildung 7: Der Einfluss der Autoinduktoren auf die Biolumineszenz von *V. harveyi*.

Übernachtskulturen verschiedener *V. harveyi* Stämme, die durch Deletion von unterschiedlichen Autoinduktorsynthesen keinen, nur einen oder eine Kombination von zwei AIs produzieren, wurden 1:1.000 in frischem AB (schwarz)- bzw. LM-Medium (grau) inokuliert. Die wachsenden Kulturen wurden bezüglich ihres Leuchtverhaltens mit dem Wildtyp, der alle drei AIs produziert, verglichen. Wachstum (OD_{600}) und Lumineszenz wurden mit dem Tecan Plattenlesegerät (Infinite F500pro) während der Kultivierung bei 30°C aufgenommen. Dargestellt ist die auf die Zellzahl normierte Lumineszenz nach 6 h Wachstum (RLU).

Diese Ergebnisse ermöglichen eine Gewichtung der Bedeutung der einzelnen AIs abhängig von dem Medium, in welchem die Kultivierung erfolgte. Während in AB-Medium AI-2, vor CAI-1 und zuletzt HAI-1 den größten Einfluss hatte, war in LM-Medium die Reihenfolge vertauscht, sodass CAI-1 vor AI-2 und schließlich HAI-1 für die Induktion der Biolumineszenz verantwortlich ist. Trotz des geringeren Einflusses von AI-2 in LM-Medium war die maximale Konzentration fünf mal höher als in AB-Medium.

Damit die Rolle der AIs weiter aufgeschlüsselt werden konnte, wurde der Zeitverlauf der Autoinduktoren im Überstand sowie die Biolumineszenz und Exoproteaseaktivität in einer in AB-Medium wachsenden Wildtypkultur von C. Anetzberger im Rahmen ihrer Dissertation bestimmt und veröffentlicht (4) (Abbildung 8). Es wurde hierbei deutlich, dass jeder AI einen charakteristischen Verlauf hat. Darauf basierend wurden vier Zeitpunkte bestimmt, die durch eine bestimmte Zusammensetzung und

2. Ergebnisse

Konzentration von Als charakterisiert sind. Die Pfeile in Abbildung 8 A markieren die verschiedenen Wachstumsphasen: „früh exponentiell“ (1), in welcher nur eine sehr geringe Konzentration von 1-2 μM AI-2 detektiert wurde, diese stieg im Anschluss in der „mittel exponentiellen“ Phase (2) an. Während in der „spät exponentiellen“ Phase (3) die Konzentration von AI-2 mit 13 μM maximal war, begann erst zu diesem Zeitpunkt die Konzentration von HAI-1 anzusteigen, bis „früh stationär“ (4) ein maximales Level von 11 μM erreicht war. Bis zu dieser Wachstumsphase sank gleichzeitig die Konzentration von AI-2 auf ein konstantes Level von etwa 10 μM ab. Im Übergang zwischen spät exponentieller (3) und früh stationärer (4) Wachstumsphase stieg auch die Konzentration von CAI-1 an, die nur indirekt mit Hilfe eines Bioassays mit einem *V. harveyi* Reporterstamm von L. Plener bestimmt wurde (Daten nicht dargestellt).

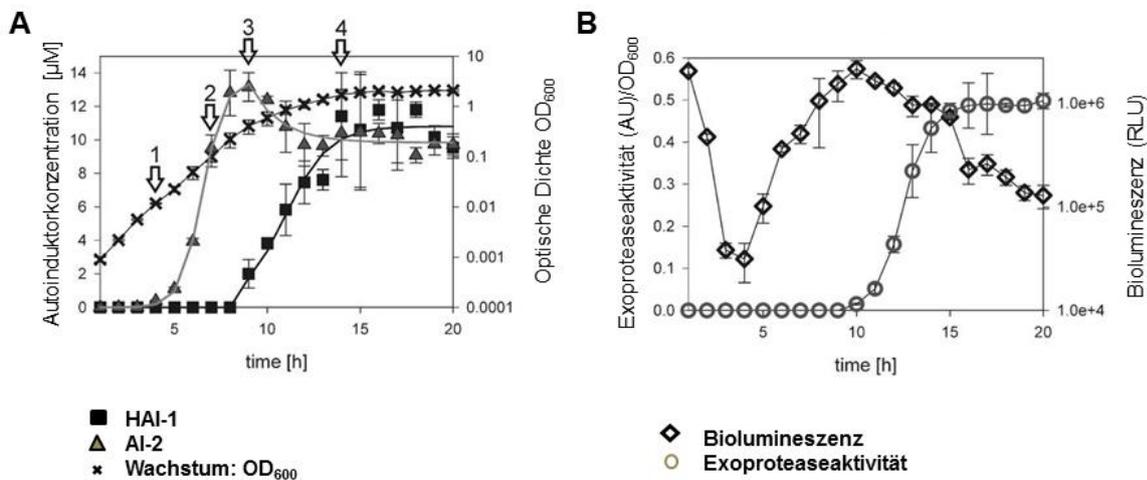


Abbildung 8: Zeitverlauf der Autoinduktorkonzentration (A) sowie der Biolumineszenz und Exoproteaseaktivität (B) in einer wachsenden Wildtyp Kultur.

Die Zellen einer Übernachtskultur von *V. harveyi* BB120 wurden 1:5.000 in frischem AB-Medium verdünnt und aerob bei 30°C kultiviert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Proben genommen, die AI-Konzentration und die Exoproteaseaktivität (graue Kreise) bestimmt sowie optische Dichte (OD_{600} , schwarze Kreuze) und Biolumineszenz (RLU, schwarze Rauten) gemessen. Die extrazelluläre Autoinduktorkonzentration wurde mit UPLC-MS (für HAI-1, schwarze Quadrate) bzw. mit Hilfe eines LuxP Bindeassays (für AI-2, graue Dreiecke) bestimmt. Die Pfeile 1-4 in Abbildung A markieren Zeitpunkte verschiedener Wachstumsphasen von „früh exponentiell“ (1) über „mittel exponentiell“ (2) und „spät exponentiell“ (3) bis „früh stationär“ (4). Die Standardabweichung wurde aus Triplikaten berechnet. Die Abbildung wurde aus Anetzberger *et al.* 2012 übernommen (4).

Parallel wurden Biolumineszenz und Exoproteaseaktivität bestimmt, Phänotypen, die beide positiv durch QS reguliert werden und deren Expression dennoch unterschiedlich ist (Abbildung 8 B). Während die Lumineszenz sofort mit dem Auftreten von AI-2 anstieg, um nach einem Maximum wieder abzusinken, konnte Exoproteaseaktivität erst festgestellt

werden, als AI-2 und HAI-1 konstante Level erreicht hatten und schließlich die Konzentration von CAI-1 zugenommen hatte (4). An diesen Ergebnissen konnte man erkennen, dass Zusammensetzung und Konzentration der AIs an der Induktion und Repression der QS-regulierten Phänotypen beteiligt sind.

In Zusammenhang mit diesen Ergebnissen sollte die Abhängigkeit bestimmter QS-regulierter Phänotypen von Zusammensetzung und Konzentration der AIs gezeigt werden, indem die Transkription verschiedener Gene analysiert wurde, die QS-reguliert sind. Dafür wurden die Transkriptlevel der Zielgene in der Gesamt-RNA zu den o.g. Zeitpunkten 1-4 aus wachsenden Kulturen von Wildtyp und einer Mutante, die keinen der drei AIs produziert, mittels qRT-PCR bestimmt und mit der ΔC_T -Methode relativ zu *recA* dargestellt. Nachdem sich die Transkriptlevel der Mutante für keine Bedingung signifikant änderten wurde jeweils nur ein Zeitpunkt dargestellt. Es wurde eine Änderung der Transkriptmenge abhängig von der AI-Konzentration erwartet, da die Transkriptmenge des Masterregulators *luxR* die Regulation der Zielgene steuert (Abbildung 9).

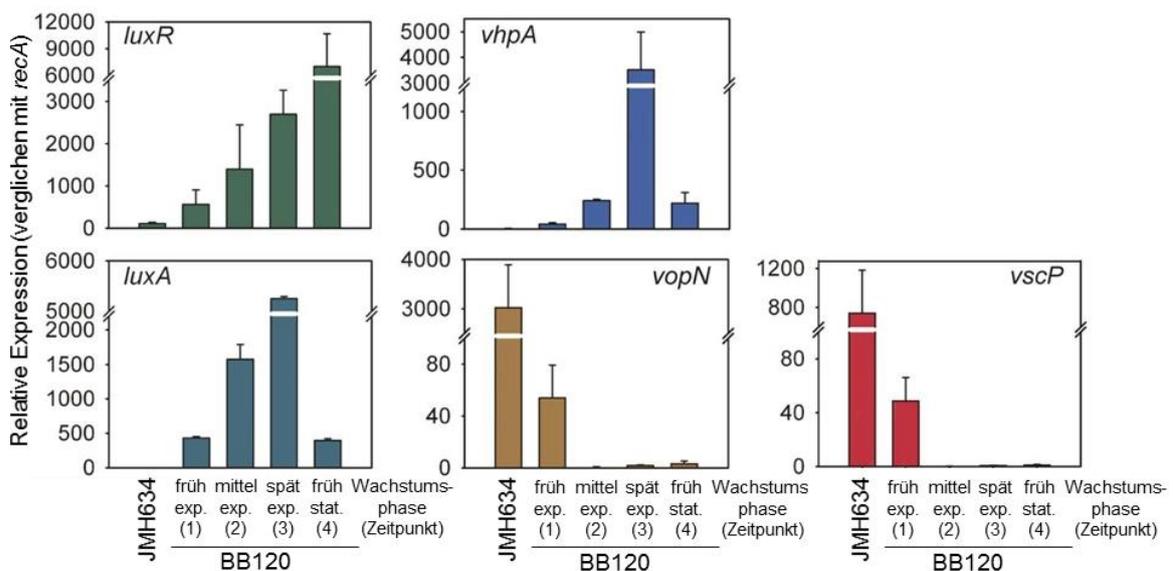


Abbildung 9: Analyse der Transkripte von AI-regulierten Genen.

Aus wachsenden Kulturen von Wildtyp (BB120) und der Mutante, die keine AIs produziert (JMH634), wurde zu den vier Zeitpunkten, die in Abbildung 8 A mit Pfeilen markiert sind, die Gesamt-RNA isoliert. Die Zeitpunkte wurden aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen und Zusammensetzungen der AIs ausgewählt. Die Transkriptlevel von *luxR*, *luxA*, *vhpA*, *vopN*, *vscP* und *recA* (als Kontrolle) wurden mittels qRT-PCR für jeden Zeitpunkt bestimmt. Änderungen im Transkriptlevel wurden relativ zu *recA* mit Hilfe der ΔC_T Methode (Livak und Schmittgen (114)) bestimmt. In der Mutante JMH634 änderten sich die Transkriptlevels über die Zeit nicht signifikant, weshalb stellvertretend nur ein Zeitpunkt (3) gezeigt ist. Die Standardabweichung wurde aus Triplikaten berechnet. Die Abbildung ist aus Anetzberger *et al.* 2012 entnommen und angepasst (4).

Im Vergleich zur Mutante stieg im Wildtyp die Transkriptmenge von *luxR* im Wachstumsverlauf bis zum Zeitpunkt 4 um das 54-fache an. Die Berechnung der Transkriptmenge pro Zelle (nach Teng *et al.* 2010 (189)) zeigte einen Anstieg von 0,9 Transkripten von *luxR* zu Beginn, über 2,2 und 4,2 bis 11,0 in der stationären Wachstumsphase (4). In der Mutante, die die Situation ohne Als widerspiegelt, wurde ein basales Transkriptlevel detektiert, sodass in jeder fünften Zelle ein Transkript von *luxR* vorhanden sein muss. Für die Regulation der Zielgene ist die Proteinmenge ausschlaggebend; diese lässt sich jedoch aufgrund zahlreicher Feedbackmechanismen nur schwer auf Zellniveau berechnen. Dennoch korreliert die Transkriptmenge mit der Zahl der LuxR Moleküle (189), die letztendlich zusammen mit AphA die Antwort auf das Signal kontrolliert.

Als Beispiele für diese Antwort wurden die Transkriptionsprofile von *luxA* (eine Untereinheit der Luciferase), *vhpA* (eine Exoprotease), *vopN* (ein Protein der äußeren Membran) und *vscP* (ein Protein aus einem Typ III Sekretionsapparat) erstellt. In Übereinstimmung mit den phänotypischen Beobachtungen zur Luziferaseaktivität stieg das Transkriptlevel von der frühen exponentiellen (1) bis zur späten exponentiellen Phase (3), in der AI-2 maximal ist, an (Abbildung 9). In der stationären Phase (4) war hingegen nur noch ein niedriges Level nachweisbar, während die Lumineszenz aufgrund der hohen Stabilität der Luciferase nur langsam zurückging (Abbildung 8 B) (154). Im Gegensatz dazu war das Transkriptlevel von *vhpA* nur in Gegenwart von HAI-1 und AI-2 zum Zeitpunkt 3 stark erhöht (750-fach im Vergleich zur Mutante) und lag sonst auf einem vergleichsweise niedrigem Niveau (Abbildung 9). Die negativ regulierten Gene *vopN* und *vscP* zeigten ohne Als ein hohes Transkriptlevel, das mit ansteigender AI-2 Konzentration unverzüglich abnahm und für das bereits ab der mittleren exponentiellen Phase (2) keine weitere Änderung detektiert werden konnte (Abbildung 9). HAI-1 und CAI-1 haben demnach auf diese Gene keinen Einfluss.

Zusammenfassend steuern verschiedene Zusammensetzungen der Als im Wachstumsverlauf verschiedene AI-abhängige Prozesse.

Es wurde von einer in AB-Medium wachsenden Wildtyp-Kultur die gesamte RNA isoliert und mit qRT-PCR für jeden Zeitpunkt die Transkriptlevel von *luxS*, *luxM*, *cqsA* und *recA* (als Kontrolle) bestimmt (Abbildung 10) um zu überprüfen, ob die AI-Konzentrationen mit den Transkriptmengen der Synthesen korreliert sind. Die Zeitpunkte der Wachstumsphasen mit den charakteristischen AI-Zusammensetzungen wurden mit den Pfeilen 1-4 markiert und die Transkriptlevel der Synthesen wurden zu *recA* relativ dargestellt. Der Transkriptverlauf der CAI-1 Synthase *cqsA* verlief nahezu parallel zur spät ansteigenden CAI-1 Induktionskurve und wurde bis nach der späten exponentiellen Phase (3) verdoppelt. Ein ähnliches Muster konnte auch für die AI-2 Synthase *luxS* beobachtet

werden, denn in Übereinstimmung mit dem AI-Konzentrationsverlauf nahm das Transkriptlevel von *luxS* von der frühen exponentiellen Phase (1) bis zur späten exponentiellen Phase (3) stetig zu bis es etwa verdreifacht war. Im Anschluss daran nahm der Transkriptlevel wieder ab. Das Gegenteilige wurde für *luxM*, das Transkript der HAI-1-Synthase, beobachtet. Deren Transkriptlevel war zunächst bis zum Zeitpunkt 3 konstant und wurde dann, bis die stationäre Phase (4) erreicht war, halbiert. Dies bedeutet, dass bis zu dem Zeitpunkt, an dem HAI-1 sein maximales Level erreichte, die Transkriptmenge hoch war. Im Anschluss war das Transkriptlevel bei Aufrechterhaltung der Konzentration im Überstand erniedrigt. Vergleichbar zum Verlauf der AIs erreichten alle Transkripte in der stationären Phase (4) ein ähnliches Level, das dann konstant geblieben ist.

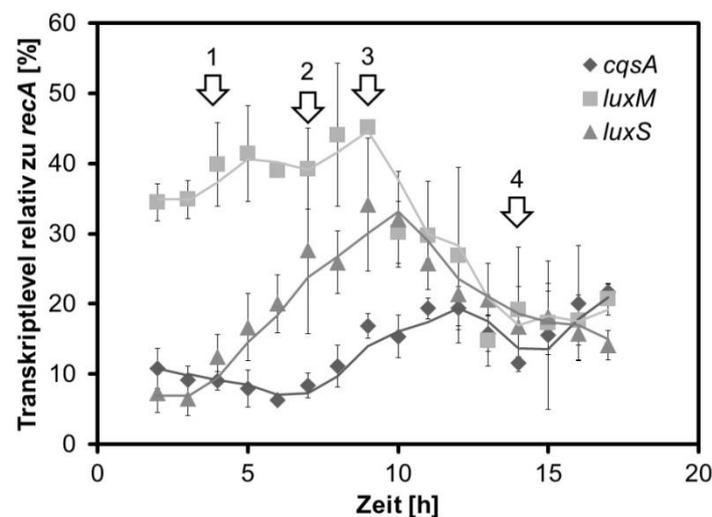


Abbildung 10: Zeitverlauf der Transkriptlevel der Autoinduktorsynthesen *luxS*, *luxM* und *cqsA*.

Die Zellen einer Übernachtskultur von *V. harveyi* BB120 wurden 1:5.000 in frischem AB-Medium verdünnt und aerob bei 30°C kultiviert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde die gesamte RNA isoliert. Die Transkriptlevel von *luxS*, *luxM*, *cqsA* und *recA* (als Kontrolle) wurden mittels qRT-PCR für jeden Zeitpunkt bestimmt. Änderungen im Transkriptlevel wurden relativ zu *recA* mit der ΔC_T Methode (Livak und Schmittgen (114)) dargestellt. Die Pfeile 1-4 markieren Zeitpunkte verschiedener Wachstumsphasen von „früh exponentiell“ (1) über „mittel exponentiell“ (2) und „spät exponentiell“ (3) bis „früh stationär“ (4) äquivalent zu Abbildung 8 A. Die Standardabweichungen wurden aus biologischen Triplikaten bestimmt.

Unter der Annahme, dass posttranskriptionale Regulation keine oder nur eine geringe Rolle spielt und dass die Synthesen konstant Autoinduktoren produzieren, müssten demnach die AI-Mengen, die produziert werden, auch wieder abgebaut werden. Die Ergebnisse zu Abbildung 8 sowie die Abbildung an sich wurden von C. Anetzberger erstellt, Abbildung 9 wurde in Zusammenarbeit mit C. Anetzberger erstellt und in PlosOne im Jahr 2012 unter dem Titel „Autoinducers act as biological timers in *Vibrio harveyi*“ veröffentlicht (4).

2.2 AI-2 Transport von *V. harveyi* im Vergleich zu *E. coli*

2.2.1 Export von AI-2

Damit die AIs von *V. harveyi* oder auch von anderen Organismen wahrgenommen werden können, müssen sie sekretiert werden. Aufgrund der chemischen Eigenschaften kann nur das kurzkettige AHL HAI-1 frei durch die Membran diffundieren, während für AI-2 und CAI-1 Transport notwendig ist (93). Der Mechanismus für CAI-1 ist noch unklar, während für AI-2 in *E. coli* ein Protein bekannt ist, das zumindest die externe AI-2-Konzentration beeinflusst – der potentielle Transporter YdgG (81). Da der Effekt einer Deletion nur gering ist (81) wurde im Rahmen dieser Arbeit nach weiteren möglicherweise am Transport beteiligten Proteinen gesucht. Es wurden mit Hilfe der Datenbank STRING 9.1 Gene gesucht, die bei niedrigen „confidence“ Einstellungen häufig zusammen mit den Synthesen von AI-2, *luxS* und *pfs* in verschiedenen bakteriellen Genomen codiert sind (Abbildung 11).

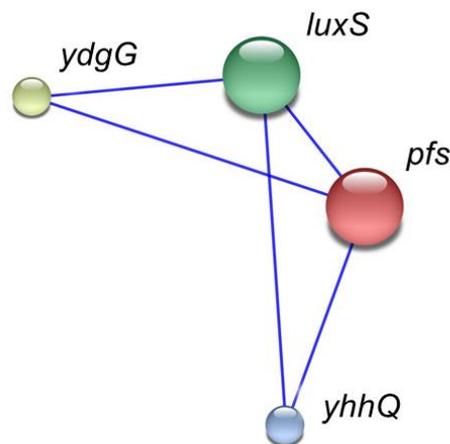


Abbildung 11: Analyse von Genen, die häufig parallel zu den Synthesen von AI-2, *luxS* und *pfs*, in verschiedenen bakteriellen Genomen codiert sind.

Die Analyse erfolgte mit String 9.1 bei niedrigen „confidence“ Einstellungen (*low confidence* [0,150]) und die blauen Linien markieren parallele genomische Codierung der entsprechend verbundenen Gene („cooccurrence“).

Als Ergebnis wurde neben *ydgG* noch das „konservierte Protein der inneren Membran“ *yhhQ* gefunden, das nach der Analyse mit Phyre2 (98) strukturell ähnlich zu einem Biotintransporter BioY des ECF-Typs aus *Lactococcus lactis* ist (13, 53).

Da in *E. coli* bereits der Einfluss eines Transporters auf die AI-2 Konzentration im Überstand gezeigt wurde, sollte in dieser Arbeit der zweite potentielle Transporter analysiert werden. Die Suche nach Homologen in *V. harveyi* mit BLAST Suche ergab nur ein Homolog zu YhhQ – VIBHAR_00342, mit 70% Identität bei einer Übereinstimmung in

der Länge von 94% -, wobei die Deletion ($\Delta yhhQ$) allein auf die AI-2-Konzentration im Überstand von *V. harveyi* im Vergleich zum Wildtyp (BB120) keinen Einfluss hatte (Abbildung 12).

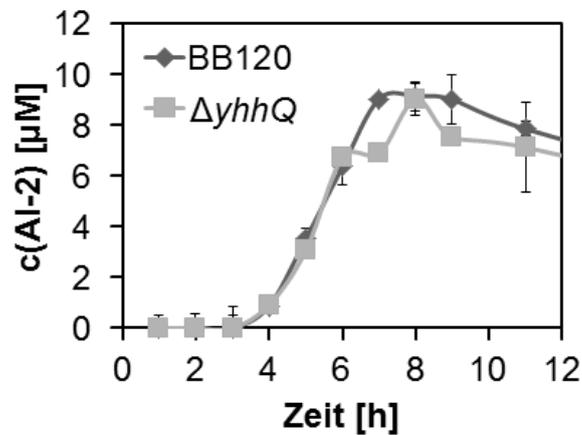


Abbildung 12: AI-2-Konzentrationsverlauf im Überstand von *V. harveyi*.

Die Zellen der Übernachtskulturen von *V. harveyi* BB120 (WT) und der $\Delta yhhQ$ Deletionsmutante wurden 1:1.000 in frischem LM-Medium verdünnt und aerob bei 30°C kultiviert. Es wurde zu den dargestellten Zeitpunkten die optische Dichte (OD_{600}) gemessen und mittels FRET die AI-2-Konzentration im Überstand bestimmt. Die Bestimmung von AI-2 in den einzelnen Proben wurde im technischen Duplikat durchgeführt und zeigte nahezu keine Abweichung. Der Wachstumsverlauf der Stämme war identisch. Die Standardabweichung wurde aus biologischen Triplikaten bestimmt.

Im Gegensatz dazu zeigte ein Vergleich der maximalen AI-2 Konzentrationen im Überstand von wachsenden *E. coli* Kulturen deutliche Unterschiede. Die AI-2 Konzentrationen der wachsenden *E. coli* Kulturen wurden mit FRET-Assay bestimmt. Zwischen einer OD_{600} von 2,5 bis 3,8 war die Konzentration maximal. Der Mittelwert aus den Maxima biologisch unabhängiger Triplikate ergab die maximale Konzentration von AI-2 (Abbildung 13).

Während die Konzentrationen in den Einzeldelentionsmutanten $\Delta ydgG$ und $\Delta yhhQ$ ($10,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$ und $10,0 \pm 1,2 \mu\text{M}$) nur wenig geringer waren als für den Wildtyp ($11,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$) war die Konzentration der Doppeldelentionsmutante nahezu halbiert ($6,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$). Das bedeutet, dass die beiden Proteine zusammen die extrazelluläre Konzentration von AI-2 beeinflussen.

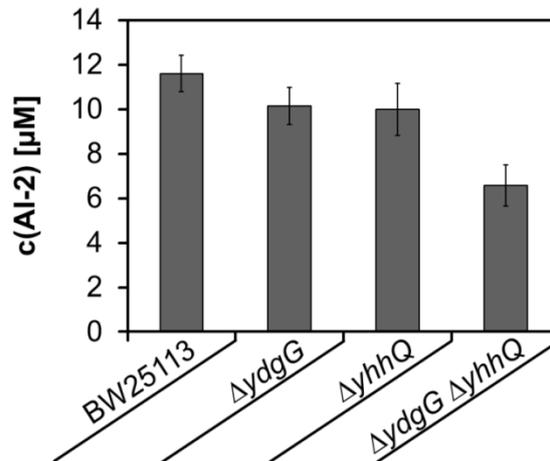


Abbildung 13: Vergleich der maximalen AI-2-Konzentration im Überstand von *E. coli* Wildtyp (BW25113) und Mutanten.

Die Zellen der Übernachtskulturen von *E. coli* BW25113 und Mutanten wurden 1:1.000 in frischem LB-Medium verdünnt und aerob bei 37°C kultiviert. Es wurde stündlich die optische Dichte (OD_{600}) gemessen und mittels FRET die AI-2 Konzentration im Überstand bestimmt. Die Bestimmung von AI-2 in den einzelnen Proben wurde im technischen Duplikat durchgeführt und zeigte nahezu keine Abweichung. Abgebildet ist die maximale AI-2-Konzentration im Wachstumsverlauf. Die Standardabweichung wurde aus biologischen Triplikaten bestimmt.

Um zu zeigen, dass AI-2 tatsächlich an die beiden Proteine bindet und möglicherweise transportiert wird, wurden *in vitro* Bindestudien mit Hilfe von Tryptophan-Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dabei wurden die Fluoreszenzspektren von YdgG, YhhQ und CaiT (als Kontrolle) unter sukzessiver Zugabe von Puffer bzw. Substrat aufgenommen. Damit eine durch Volumenänderung herbeigeführte Änderung der Spektren nicht quantifiziert wird, wurde neben den Substraten AI-2, Ribose und Carnitin eine Pufferkontrolle mit den gleichen Volumenänderungen mitgeführt, die dann die Korrektur des Verdünnungseffekts ermöglichte. Von den Werten für die einzelnen Konzentrationen wurde jeweils der Wert ohne Zugabe abgezogen (ΔF) und anschließend durch den Anfangswert geteilt ($\Delta F/F$). Wird $\Delta F/F$ gegen die Konzentration aufgetragen erhält man eine Substrat-Bindekurve. Mit der Darstellung nach Scatchard wurde daraus der K_D -Wert für die Affinität des Substrates bestimmt. Es wurde noch ein weiterer Transporter CaiT untersucht, um unspezifische Effekte auszuschließen. Dieser Transporter bindet und transportiert nachweislich Carnitin (90). Deshalb wurde neben der Pufferkontrolle und AI-2 auch Carnitin als Substrat getestet. Zur weiteren Analyse der Selektivität wurde als weiteres Substrat Ribose verwendet, das strukturell den Ringformen von AI-2 sehr ähnlich ist. Dabei zeigte sich, dass Carnitin unter den drei getesteten Transportern nur an CaiT bindet, da sich die Tryptophanfluoreszenz für YdgG und YhhQ durch die Zugabe von Carnitin nicht änderte (nicht dargestellt). Ebenfalls keinen Einfluss

hatte Ribose. In diesem Fall war für keines der drei Proteine eine Änderung nachweisbar (nicht dargestellt), sodass die Substratkontrollen wie erwartet negativ ausfielen.

Die Zugabe von hohen AI-2 Konzentrationen zwischen 75 μM und 3,6 mM ergab jedoch für YdgG, YhhQ und CaiT jeweils eine ähnliche Substrat-Bindekinetik, obwohl für CaiT keine Affinität erwartet wurde. Die mit Hilfe der Steigung des Scatchard-Plottes ermittelten K_D -Werte betragen für YdgG 1,3 mM, für YhhQ 1,0 mM und für CaiT 2,3 mM, liegen außerhalb des physiologisch relevanten Bereichs zwischen 1 und 100 μM und weisen auf eine unspezifische Bindung hin. Im Gegensatz dazu änderte sich bei Zugabe von niedrigen AI-2 Konzentrationen zwischen 1 und 36 μM das Spektrum zwar weder für YdgG noch für die Kontrolle, aber für YhhQ (Abbildung 14 A). Aus der Substrat-bindekinetik für YhhQ (Abbildung 14 B) wurde mit $4 \pm 2 \mu\text{M}$ ein K_D -Wert im physiologischen Bereich ermittelt. Eine Bestätigung dieser Werte muss noch durch Wiederholung der Messungen erfolgen.

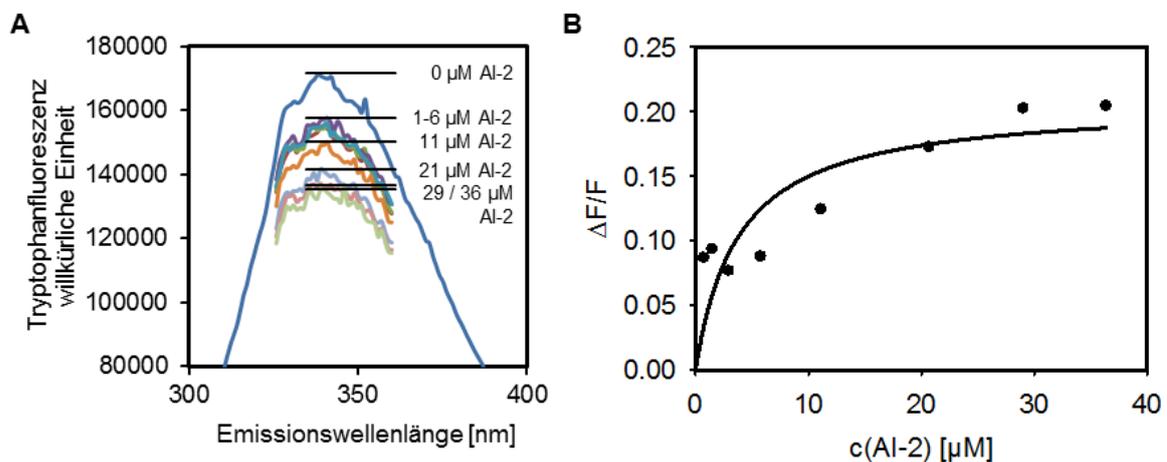


Abbildung 14: Affinität von AI-2 zu YhhQ gemessen mit Tryptophan-Fluoreszenz.

Die Messungen wurden mit 70 μg Protein in 1 ml Puffer bei 25°C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 287 nm. **(A)** Die Fluoreszenzspektren wurden zwischen 310 und 390 nm nach Zugabe von unterschiedlichen AI-2 Konzentrationen aufgenommen und wurden um den Effekt der Volumenänderung korrigiert. **(B)** Die Änderungen der Fluoreszenz werden als $\Delta F/F$ dargestellt, wobei ΔF den Unterschied an der maximalen Fluoreszenzintensität (340 nm) abbildet. Die Auftragung gegen die Substratkonzentration ergibt die Bindekurve.

Zusammen mit den Ergebnissen aus den *in vivo* Experimenten mit den Deletionsmutanten verfestigen sich die Hinweise, dass YdgG und YhhQ zusammen in *E. coli* AI-2 transportieren.

Neben der transporterabhängigen Freisetzung von AI-2 wurde Zellyse als Mechanismus in Betracht gezogen. Eine natürliche Möglichkeit zur Zellyse ist die Induktion und Freisetzung von Bakteriophagen. Die Bachelorarbeit von L. Pöttinger, die im Rahmen dieser Doktorarbeit zusammen mit N. Lorenz betreut wurde, sollte dazu

beitragen, die Rolle von potentiellen Phagen in *V. harveyi* zu identifizieren. Mit einer Datenbankanalyse (PHAST, Wishart-Lab) wurden drei unterschiedliche potentielle Phagen identifiziert. Durch oxidativen Stress, verursacht durch die halbstündige Inkubation mit 1 µg/ml Mitomycin C, kann die Phagenfreisetzung stimuliert werden (Abbildung 15).

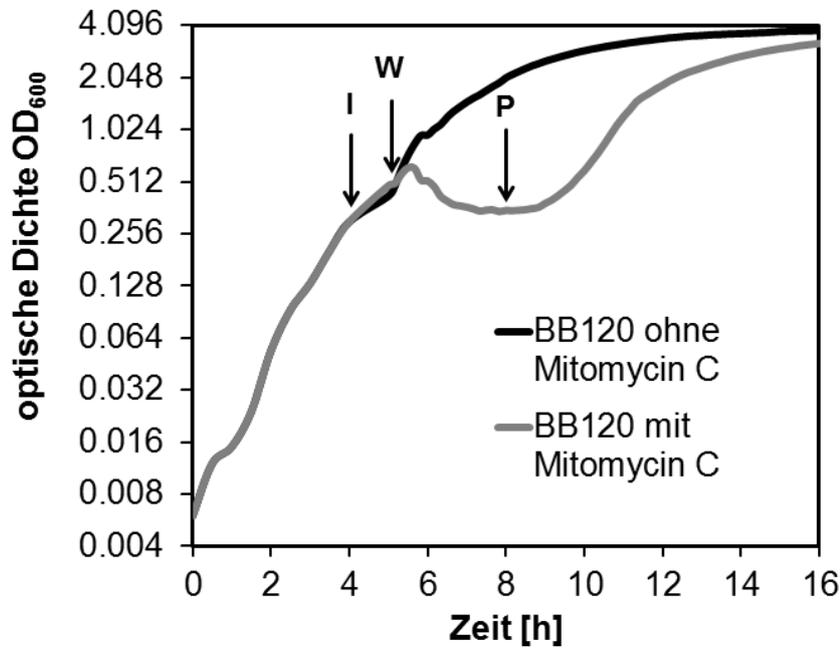


Abbildung 15: Induktion von Phagen in *V. harveyi* BB120.

Eine Übernachtskultur *V. harveyi* BB120 wurde in frischem LM-Medium auf $OD_{600} = 0,006$ verdünnt und bei 30°C inkubiert. Mit Erreichen von $OD_{600} = 0,3$ wurde die Kultur aufgeteilt und eine der beiden für 30 min mit 1 µg/ml Mitomycin C induziert (Pfeil I). 3 h nach dem Waschen (Pfeil W) wurden die Überstände geerntet (Pfeil P). Die nicht induzierte Hälfte diente als Kontrolle.

Der deutliche Knick in der Wachstumskurve nach Induktion mit Mitomycin C (Abbildung 15 Pfeil I) wurde als Hinweis auf das Vorhandensein von freien Phagen bewertet (50). Die Konzentration der Phagen ist mit Erreichen der niedrigsten optischen Dichte nach Induktion am Höchsten (Abbildung 15 Pfeil P). Zu diesem Zeitpunkt wurden die Phagen aus dem Kulturüberstand 250-fach konzentriert.

Die anschließende Visualisierung mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde von M. Toro durchgeführt. Auf den Aufnahmen konnten drei unterschiedlich große Phagen identifiziert werden (Abbildung 16). Der Kopf des größten Phagen (blau markiert) war etwa 70 nm groß, die beiden kleineren waren nur ungefähr 45 nm (rot markiert) und 25 nm (gelb markiert) groß. Die Schwänze konnten nur sehr schwer sichtbar gemacht werden, sind aber für die beiden kleineren Phagen gelb und rot in Abbildung 16 A zu erahnen und in Abbildung 16 B für den großen Phagen (blau) verhältnismäßig gut erkennbar. Für eine

Zuordnung der Phagen zu den genomischen Sequenzen muss eine möglichst reine Phagen-DNA sequenziert werden, die aus dem Phagenkonzentrat isoliert werden kann. Um die Rolle der Phagen zu identifizieren, sind noch weitere Experimente notwendig, die einerseits den Einfluss von Lyse auf die AI-Konzentration zeigen und andererseits die Induktion der Phagen unter natürlichen Bedingungen bestätigen.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Hübner wurde im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel des Darmbakteriums *Enterococcus faecalis* gezeigt, dass die Freisetzung von Phagen und QS miteinander verknüpft sind und dies sogar medizinisch relevant ist. Bakterien nutzen QS, um einerseits Biofilmbildung zu induzieren und um andererseits Virulenzgene zu übertragen und zu aktivieren. Dabei spielt AI-2 gerade bei der initialen Besiedlung und Anheftung an Epithelzellen, aber auch bei deren Verbreitung eine Rolle. Es wurde gezeigt, dass diese Schritte mit der Freisetzung von Phagen einhergehen, die Pathogenität auf an sich nützliche probiotische Stämme übertragen (205). AI-2, das auch von *E. faecalis* selbst synthetisiert wird (die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Rahmen der Dissertation) und Ciprofloxacin induzieren die Phagenfreisetzung. Dadurch wurde offensichtlich, dass die Bedingungen im Gastrointestinaltrakt von Patienten, die eine Therapie mit Antibiotikum erhalten, die Verbreitung von Virulenzgenen auch auf zunächst unschädliche oder sogar nützliche Stämme begünstigt. Die Ergebnisse sind in

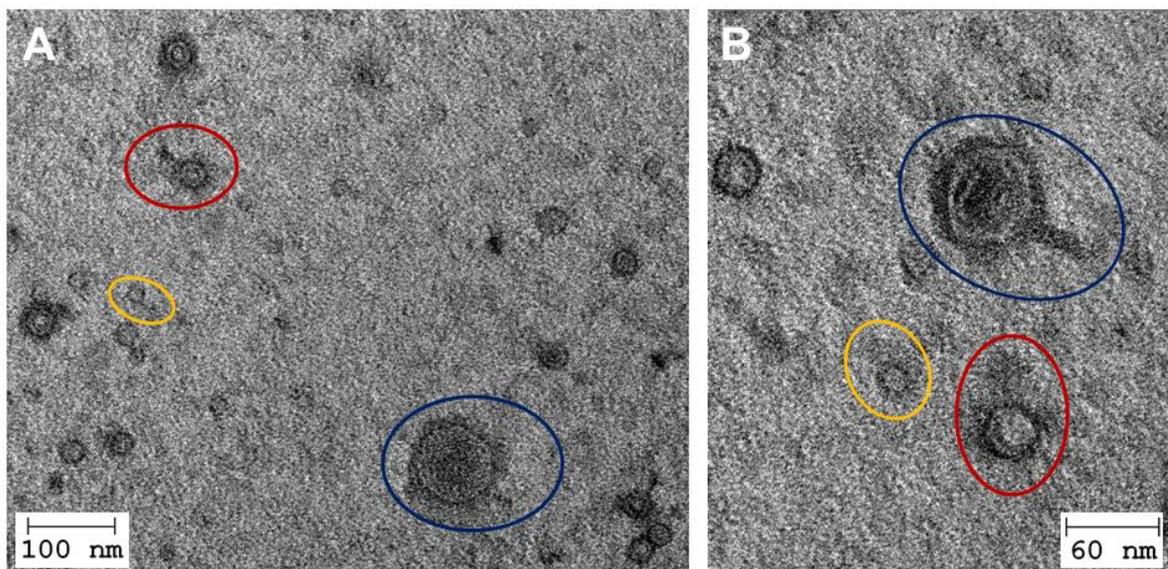


Abbildung 16: TEM-Bilder des Phagenkonzentrats von *V. harveyi* BB120.

Aus einer bei $OD_{600} = 0,3$ für 30 min mit $1 \mu\text{g/ml}$ Mitomycin C induzierten *V. harveyi* BB120 Kultur wurde ein 250-faches Phagenkonzentrat erstellt und in einer 1 zu 5 Verdünnung auf einen TEM-Objektträger appliziert. Die negative Färbung erfolgte für 30 s mit 1% Uranylacetat. Die Präparate wurden an einem FEI CM200 Transmissions-elektronenmikroskop in verschiedenen Vergrößerungen – 38.000 fach (**A**) und 66.000 fach (**B**) - sichtbar gemacht. Die Größe einzelner Partikel konnte mit Hilfe der Längenstandards bestimmt werden. Die Aufnahmen wurden von M. Toro durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

einem Manuskript, Rossmann *et al.*, 2014 „Quorum sensing and phages – a novel mechanism for dispersal of virulence genes“, das im Journal Science Translational Medicine im Revisionsprozess ist, zusammengefasst.

Auch wenn möglicherweise Phagen die AI-2 Konzentration beeinflussen, ist sicher die Nutzung eines Transporters zur Sekretion von AI-2 der prominentere Weg. Da AI-2 im Überstand von *V. harveyi* nachweisbar ist, jedoch nicht durch einfache Diffusion die Membran passieren kann (93), muss es in jedem Fall einen Exportmechanismus geben, der im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgedeckt werden konnte.

2.2.2 Import von AI-2

In *V. harveyi* sind im Vergleich zu *E. coli* weder Export noch Import von AI-2 bekannt (Abbildung 17).

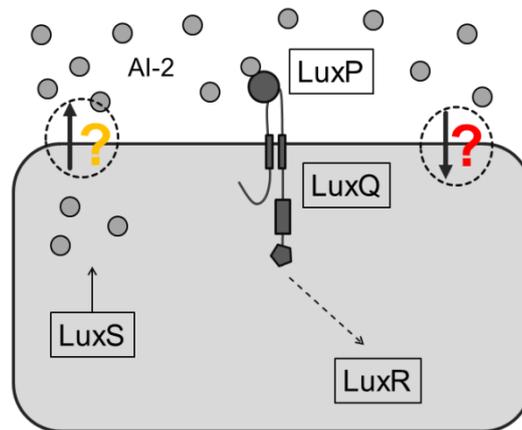


Abbildung 17: Schematische Darstellung von AI-2-Transport und -Wahrnehmung in *V. harveyi*.

AI-2 (graue Kreise) wird in der Zelle von LuxS synthetisiert und im Anschluss über einen bislang unbekanntem Mechanismus ausgeschleust. Das externe AI-2 bindet an LuxP und wird dadurch von LuxQ wahrgenommen, was zur Signalweiterleitung über eine Kaskade zum Masterregulator LuxR führt. Ob und wie AI-2 zum Abbau in die Zellen importiert wird ist unklar.

Den Import betreffend, gibt es in der Literatur Hinweise, dass Organismen, die kein Lsr-System zum Import von AI-2 besitzen, das Rbs-System nutzen (146). *V. harveyi* gehört zu den Organismen ohne Lsr-System, allerdings hatte weder die Deletion des Bindeproteins RbsB noch die der Permease RbsC einen Effekt auf die AI-2 Konzentration im Überstand von Übernachtskulturen (Abbildung 18). Eine erhöhte AI-2-Konzentration, die in diesem Zusammenhang erwartet wurde, konnte nicht nachgewiesen werden.

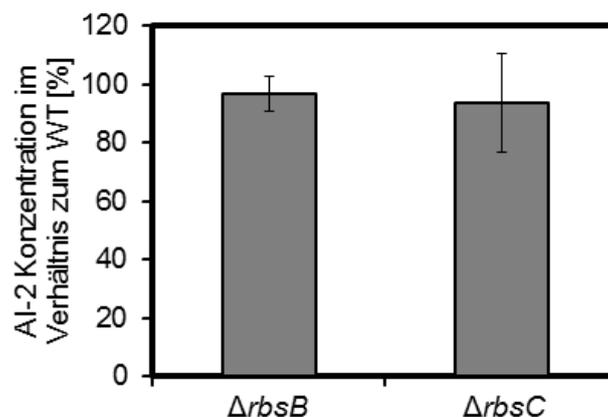


Abbildung 18: Vergleich der AI-2-Konzentrationen von *rbsB* und *rbsC* Deletionsmutanten mit *V. harveyi* WT.

In Übernachtskulturen von *V. harveyi* WT und den Deletionsmutanten $\Delta rbsB$ und $\Delta rbsC$ wurde mittels FRET die AI-2 Konzentration im Überstand bestimmt. Abgebildet ist die prozentuale Abweichung zum Wildtyp.

Es war bislang nicht bekannt, ob AI-2 von *V. harveyi* importiert wird, deshalb wurde basierend auf der Fusion von Teilen des *lsr*-Operons von *E. coli* mit *lacZ* ein Reportersystem konstruiert, mit dem diese Frage geklärt werden konnte (Abbildung 19). *V. harveyi* BB120 besitzt selbst kein intaktes *lacZ*, weshalb die Verwendung von LacZ als Reporter möglich war. Wildtyp (BB120) und eine AI-2⁻ Mutante (MR003) wurden mit den entsprechenden Reporterplasmiden transformiert und die Expression des Reporters analysiert. P_{l_{sr}}::*lacZ* zeigte ohne den Repressor LsrR eine starke Reporteraktivität, da *lacZ* konstitutiv transkribiert wurde. Die Kolonien färbten sich unabhängig von AI-2 blau (Abbildung 19 A). Die Ergänzung des Systems um den Repressor LsrR ermöglichte die Repression des Promotors (*l_{sr}R*P_{l_{sr}}::*lacZ*), die durch die Bindung von phosphoryliertem

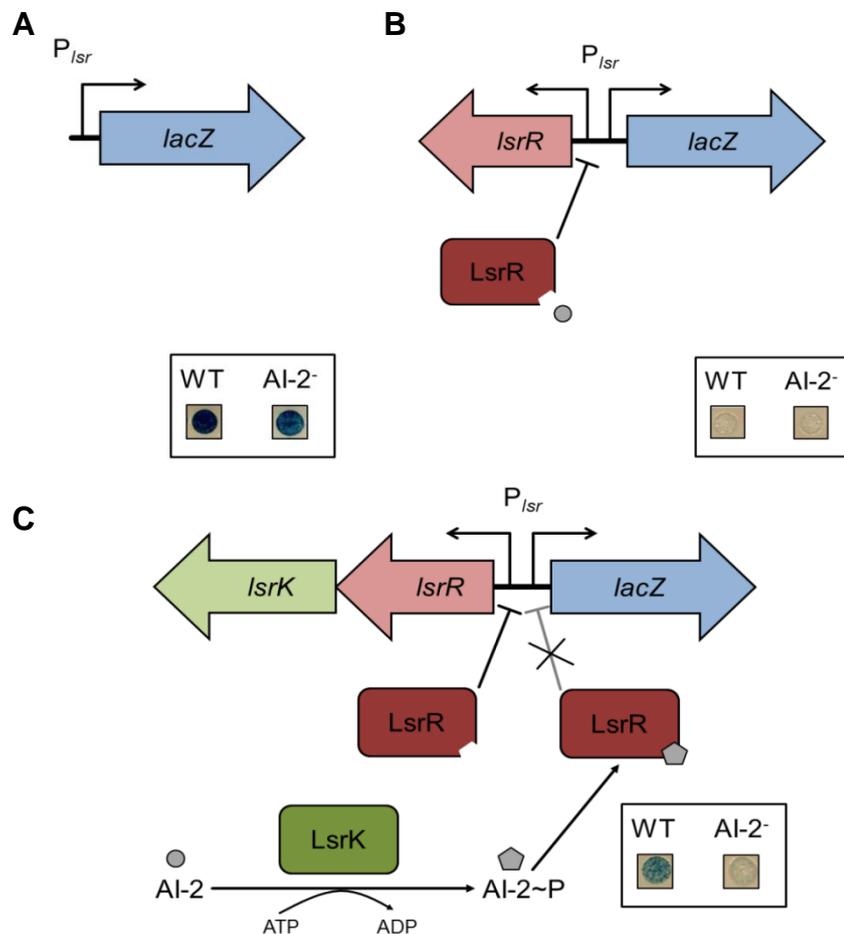


Abbildung 19: Ein *lacZ*-basiertes Reportersystem zur Analyse des AI-2 Imports in *V. harveyi*.

Das *lacZ*-basierte Reportersystem besteht aus drei Reporterplasmiden im Hintergrund von pBBR1-MCS2. Wildtyp BB120 (WT) und MR003 (AI-2⁻) wurden mit dem jeweiligen Reporterplasmid transformiert und auf LB-Agarplatten mit X-Gal aufgetropft. Die Messung der Aktivität des *l_{sr}* Promotors $P_{l_{sr}}$ erfolgt durch transkriptionale Kopplung mit *lacZ*. Die LacZ Aktivität erfolgt qualitativ auf LB-Agarplatten durch Spaltung von X-Gal und daraus resultierender Blaufärbung der Kolonien. **(A)** $P_{l_{sr}}$::*lacZ*: $P_{l_{sr}}$ ist konstitutiv aktiv. **(B)** *l_{sr}R*P_{l_{sr}}::*lacZ*: Die Integration des zugehörigen Regulators *l_{sr}R* reprimiert die Transkription von *lacZ* in Abwesenheit des allosterischen Induktors AI-2~Phosphat. **(C)** *l_{sr}KRP*_{l_{sr}}::*lacZ*: Die zusätzliche Integration der AI-2 Kinase *l_{sr}K* hebt die Repression durch LsrR bei Vorhandensein von AI-2 wieder auf.

AI-2 (AI-2~P) aufgehoben werden kann. Die Kolonien blieben unabhängig von der Verfügbarkeit von AI-2 weiß, da AI-2 in *V. harveyi* nicht phosphoryliert wird (Abbildung 19 B). Die zusätzliche Integration der Kinase LsrK in dieses System (*lsrKRP_{lsr}::lacZ*) zeigte schließlich einen Unterschied, abhängig von AI-2 (Abbildung 19 C). Im Wildtyp vorhandenes AI-2 wurde von LsrK phosphoryliert und somit konnte die Repression des Promotors durch LsrR unter Bindung von AI-2~P aufgehoben werden. Diese Kolonien färbten sich blau. Da in der AI-2⁻ Mutante kein AI-2 vorhanden ist, das in der phosphorylierten Form die Repression aufheben könnte, blieben diese Kolonien weiß. Dadurch wurde gezeigt, dass in *V. harveyi* AI-2 nicht phosphoryliert wird und dass mit diesem System intrazelluläres AI-2 qualitativ nachgewiesen werden kann.

Zur Darstellung, dass AI-2 tatsächlich importiert wird und nicht nur endogenes AI-2 nachgewiesen wurde, wurden Wildtyp und die AI-2⁻ Mutante mit dem Reporterplasmid (pBBR1-MCS2-*lsrKRP_{lsr}::lacZ*) ohne und mit Zugabe von 20 µM externem AI-2 kultiviert. Die Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivitäten ergab für die AI-2⁻ Mutante ohne Zugabe von AI-2 keine Aktivität (5 MU). Nach Zugabe stieg die Aktivität auf 28 MU an, was in der Größenordnung des Wildtyplevels (40 MU) lag (Abbildung 20).

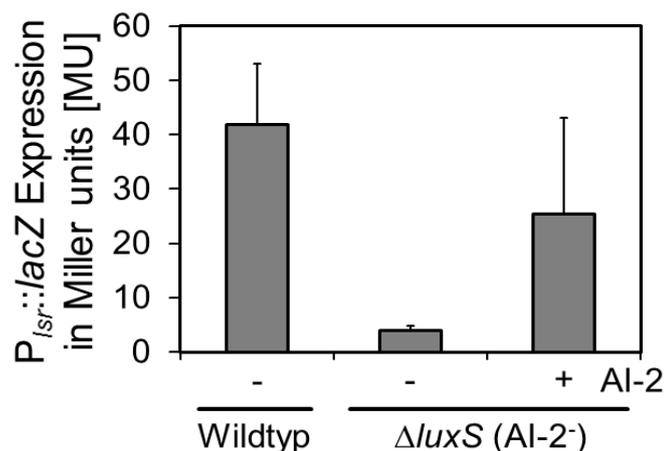


Abbildung 20: Nachweis von AI-2 Import in *V. harveyi*.

Expressionslevel des *lsr*-Operons mit und ohne AI-2. *V. harveyi* BB120 (WT) und MR003 (AI-2⁻), jeweils transformiert mit dem Reporterplasmid pBBR1-MCS2-*lsrKRP_{lsr}::lacZ*, wurden 6 h in AB-Medium mit Kanamycin kultiviert, wobei die AI-2⁻ Mutante mit und ohne Zugabe von externen 20 µM AI-2 kultiviert wurde. Die β-Galaktosidaseaktivität wurde bestimmt und in Miller Units (MU) dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus biologischen Triplikaten berechnet.

So konnte bewiesen werden, dass die Vorhersage der AG Bischofs zutrifft und AI-2 tatsächlich in *V. harveyi* importiert wird. Dadurch kann möglicherweise mit Hilfe eines Importmechanismus die Konzentration im Überstand reguliert werden. Diese Ergebnisse wurden in Drees *et al.* 2014 „A modular view of the diversity of cell-density-encoding schemes in bacterial quorum-sensing systems“ veröffentlicht (44).

2.3 Die Rolle von Laktonasen in *V. harveyi*

Um den Einfluss potentieller Laktonasen, die in Kollaboration mit der AG Streit (Hamburg) im Rahmen der Diplomarbeit von Ursula Schell (169) identifiziert wurden, auf den Konzentrationsverlauf von HAI-1 zu zeigen, wurde in unterschiedlichen Proben aus verschiedenen Bedingungen und Stämmen die Konzentration von HAI-1 mit UPLC-MS in Kooperation mit der AG Schmitt-Kopplin (Helmholtz Zentrum, München-Neuherberg) bestimmt. Hierfür wurde für jede Probe das Chromatogramm für das Na⁺-Addukt von HAI-1 anhand der spezifischen „Masse zu Ladung“ Zahl 210,075 m/z extrahiert und die Fläche des Peaks bestimmt (Abbildung 21 A-C). Das Na⁺-Addukt ist prominent, da sowohl in verwendeten Puffern und den Medien 300 mM Na⁺ enthalten ist. Mit Hilfe einer Standardreihe, die für jedes Experiment separat mit aufgenommen wurde, konnte die Konzentration bestimmt werden (Abbildung 21 D).

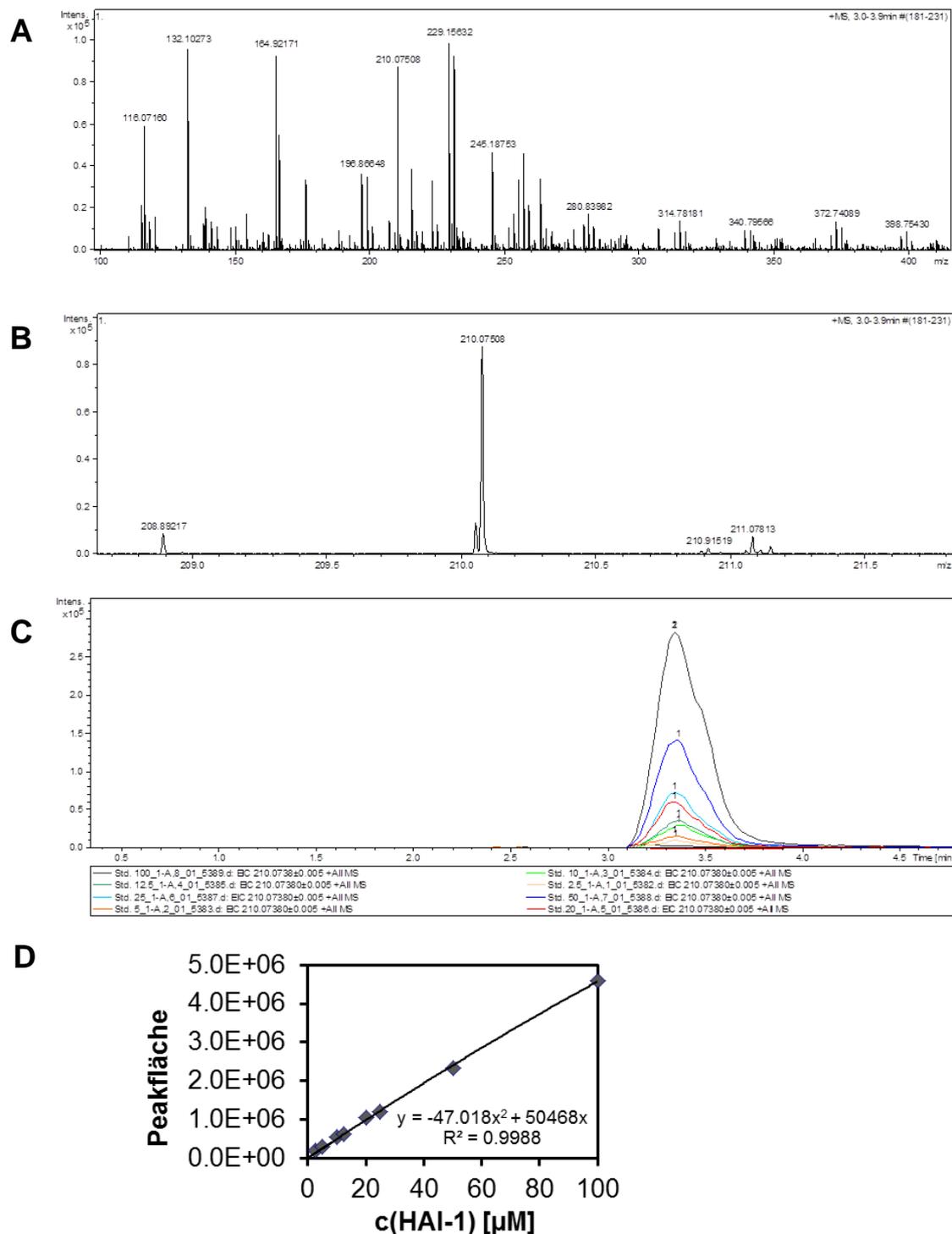


Abbildung 21: Die Bestimmung der Konzentration von HAI-1 mit UPLC-MS am Beispiel einer Eichreihe.

Jeder Peak eines Chromatogramms stellt eine Substanz dar, die anhand ihrer m/z Zahl (Masse zu Ladung) im MS detektiert wurde. In **(A)** sind die Substanzen, die zwischen 3,0 und 3,9 min von der UPLC-Säule eluiert wurden, in einem Bereich von 100 bis 400 m/z summiert und dargestellt. Um die m/z Zahl von HAI-1 (Na^+ -Addukt = 210,075 m/z) aufzulösen wurde in **(B)** nur der Ausschnitt von 209 bis 211 m/z aus **(A)** dargestellt. Der gesamte Elutionszeitverlauf von HAI-1 anhand m/z von 210,075 der verschiedenen HAI-1 Konzentrationen wurde in **(C)** dargestellt und die Fläche unter den Peaks zur Erstellung der Eichreihe verwendet **(D)**. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der AG Schmitt-Kopplin durchgeführt.

Für die Analyse des Einflusses der potentiellen Laktonasen VIBHAR_02708, VIBHAR_03213, VIBHAR_06736 und VIBHAR_06900 in *V. harveyi* wurden diese Laktonasen sukzessiv *in-frame* deletiert, sodass eine „Laktonasen“- Mutante (MR020, Vierfach-Mutante) entstand. Um Unterschiede beim Abbau von HAI-1 *in vivo* zu sehen, wurde zu wachsenden Kulturen von Wildtyp (BB120), einer HAI-1⁻ Mutante (MR018) sowie der Laktonasen⁻ Mutante (MR020) 10 μ M HAI-1 zugegeben. Die Konzentrationen im Überstand direkt nach Zugabe und nach 2 h Inkubation wurden mit UPLC-MS bestimmt (Abbildung 22).

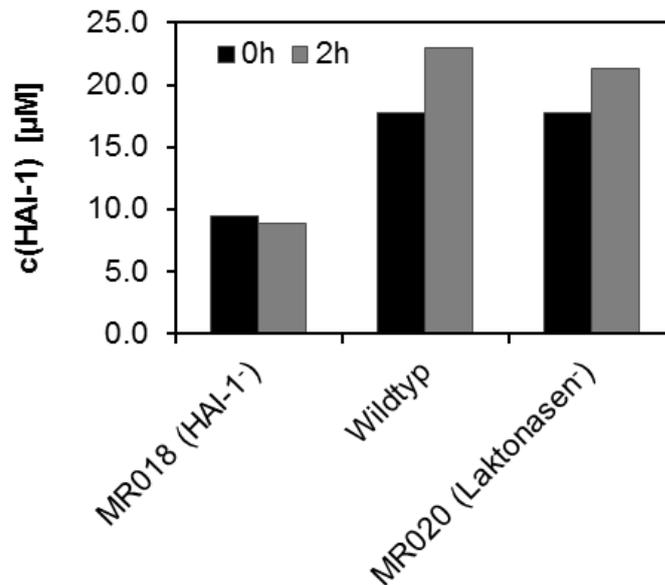


Abbildung 22: Der *in vivo* Abbau von HAI-1 in *V. harveyi*.

Zu *V. harveyi* Kulturen von Wildtyp, MR018 (HAI-1⁻) und MR020 (Laktonasen⁻), die in AB-Medium kultiviert wurden, wurde in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase jeweils 10 μ M HAI-1 zugegeben. Die Probennahme für die Analyse der HAI-1 Konzentration mit UPLC-MS erfolgte direkt nach Zugabe (0 h, schwarze Balken) und nach 2 h Kultivierung (graue Balken).

Für die HAI-1⁻ Mutante wurde nach zwei Stunden die gleiche Konzentration (10 μ M) bestimmt wie direkt nach Zugabe, während für die beiden anderen Stämme, Wildtyp und Laktonasen⁻, aufgrund der eigenen HAI-1 Synthese zu Beginn fast 18 μ M nachgewiesen wurde. Dieser Wert war nach 2 h noch weiter auf 23 bzw 21 μ M angestiegen. Bei diesem Versuch wurde festgestellt, dass Stämme, die selbst noch HAI-1 synthetisieren können, für die Untersuchung des Einflusses von Laktonasen auf die HAI-1 Konzentration ungeeignet sind.

In Folge dessen wurden in einem nächsten Schritt die potentiellen Laktonasen jeweils in *E. coli* heterolog exprimiert. *E. coli* produziert HAI-1 nicht selbst, deshalb wurde es in einer Konzentration von 20 μ M zu wachsenden Kulturen der transformierten Stämme

zugegeben. Die Konzentration im Überstand wurde nach 3 h Inkubation bestimmt, wobei zur Kontrolle ein Stamm mit Leervektor und Medium ohne Zellen verwendet wurde.

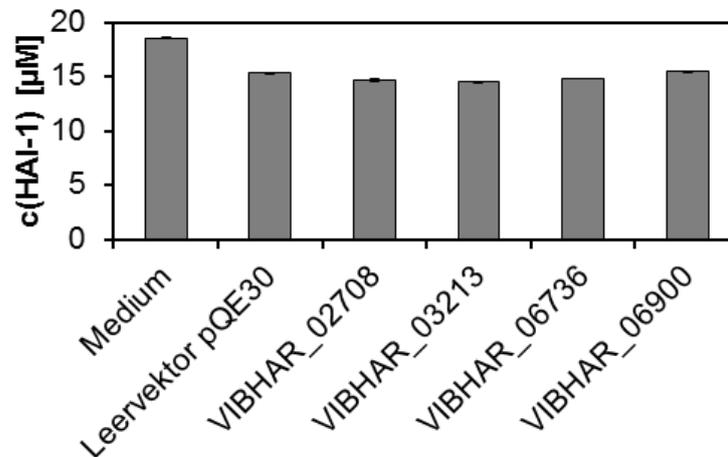


Abbildung 23: Abbau von HAI-1 *in vivo* nach heterologer Expression der potentiellen Laktonasen in *E. coli*.

E. coli DH5α *λpir* wurden mit den Laktonasenexpressionsvektoren und dem entsprechenden Leervektor pQE30 transformiert und in LB-Medium kultiviert. Zu wachsenden Kulturen sowie zur Mediumkontrolle wurde 20 µM HAI-1 zugegeben und nach 3 h Inkubation eine Probe zur Analyse der HAI-1 Konzentration im Überstand mittels UPLC-MS entnommen. Die Standardabweichung wurde aus biologischen Triplikaten bestimmt.

Es war deutlich zu erkennen, dass unabhängig von der exprimierten potentiellen Laktonase (bzw. auch mit Leerplasmid) die Konzentration identisch 15 µM war (Abbildung 23). Lediglich in der Kontrolle ohne Zellen konnte mit 19 µM die Konzentration HAI-1, die zuvor zugegeben wurde, nachgewiesen werden. Diese Beobachtung gibt einen ersten Hinweis darauf, dass möglicherweise die Diffusion in die Zellen für den Rückgang verantwortlich ist.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im folgenden Versuch für *V. harveyi* der Abbau von verschiedenen HAI-1 Konzentrationen *in vivo* bei steigenden Zelldichten analysiert. Die beiden Mutanten, die dabei verglichen wurden (MR018 und MR120), können kein HAI-1 produzieren (HAI-1⁻; MR018) und unterscheiden sich darin, dass in MR120 zusätzlich alle potentiellen Laktonasen deletiert sind (HAI-1⁻; Laktonasen⁻). Um den Abbau von HAI-1 darzustellen, wurde die Konzentration, die nach 3 h Inkubation im Überstand gemessen wurde, zur Anfangskonzentration ins Verhältnis gesetzt. Daraus ergab sich die prozentuale Darstellung von nach 3 h Inkubation noch vorhandenem HAI-1 (Abbildung 24). Es wurde immer der gleiche Prozentsatz an HAI-1 abgebaut, unabhängig davon, ob 5, 20 oder 80 µM HAI-1 inkubiert wurden. Voraussetzung hierfür war die Sichtbarkeit einer Reduktion. Unabhängig von der Zelldichte, bei der HAI-1 zugegeben

2. Ergebnisse

wurde, konnte kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen gezeigt werden. Wurde HAI-1 zu frühen Zeitpunkten A oder B zugegeben, bei welchen die Zelldichte bei OD_{600} von 0,05 und 0,1 lagen, war keine signifikante Konzentrationsänderung sichtbar. Dagegen konnte zu späteren Zeitpunkten C und D (OD_{600} von 0,5 und 1,0) eine Konzentrationsverringerng im Medium beobachtet werden (Abbildung 24).

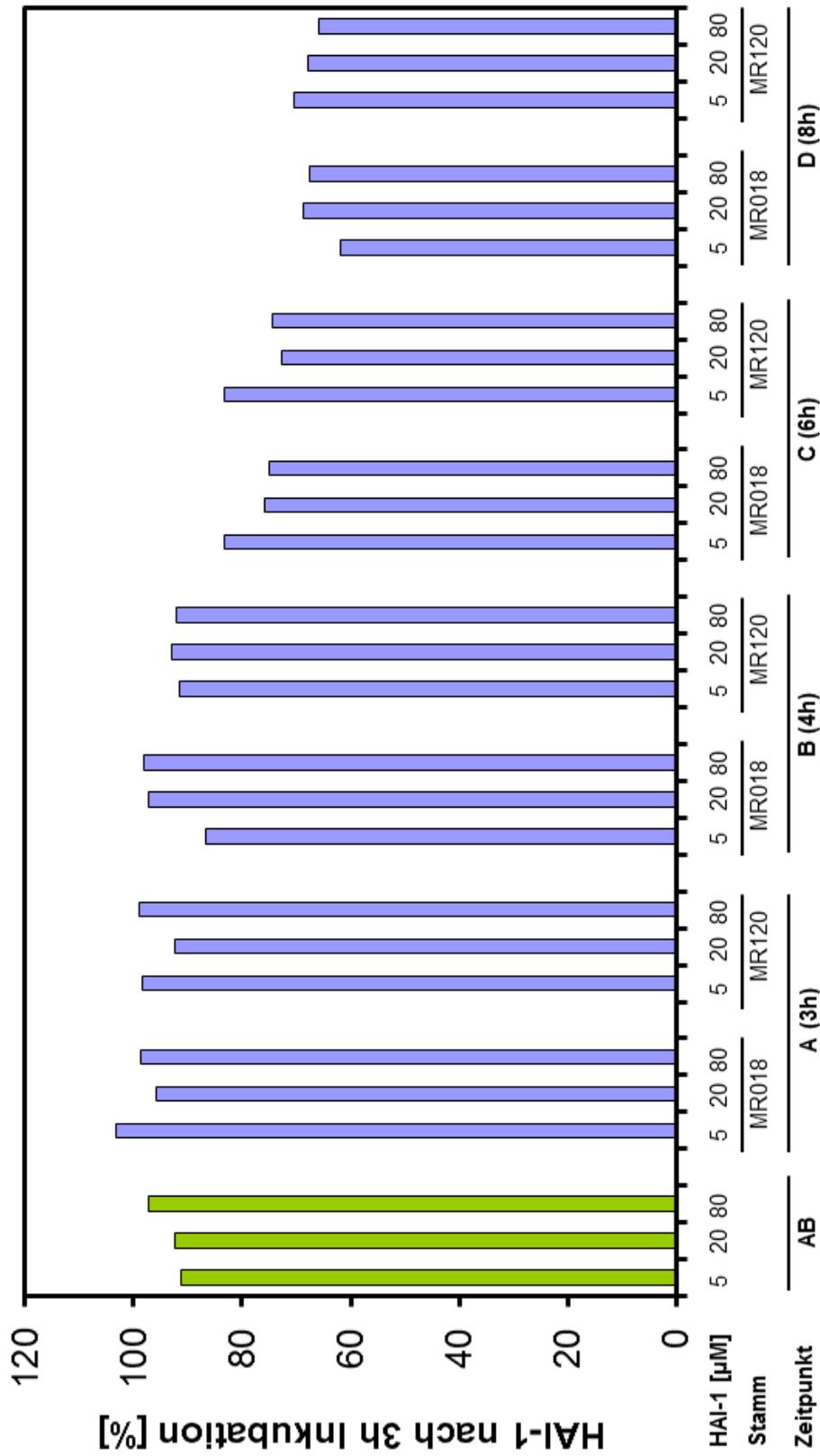


Abbildung 24: Abbau verschiedener HAI-1 Konzentrationen *in vivo* in *V. harveyi* HAI-1⁻ Mutanten bei steigenden Zelldichten.

Übernachtskulturen von *V. harveyi* MR018 (HAI-1⁻) und MR120 (HAI-1⁻; Laktosen⁻) wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,004 in AB-Medium verdünnt und bei 30°C kultiviert. Zu jedem der beiden Stämme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten 5, 20 oder 80 µM HAI-1 zugegeben. Die Zeitpunkte waren A, nach 3 h (OD₆₀₀ = 0,05); B, nach 4 h (OD₆₀₀ = 0,1); C, nach 6 h (OD₆₀₀ = 0,5) und D, nach 8 h (OD₆₀₀ = 1,0). Die Probenahme der Überstände für die Bestimmung der HAI-1 Konzentration mit UPLC-MS erfolgte direkt nach Zugabe (0 h) und nach dreistündiger Inkubation. Dargestellt ist das nach der Inkubation verbliebene HAI-1 in [%]. Als Kontrolle wurde HAI-1 in AB-Medium ohne Zellen entsprechend inkubiert (grüne Balken).

Der pH-Wert bei Zugabe von HAI-1 zu den Zeitpunkten A und B war 6,5. Zu den späteren Zeitpunkten war der pH-Wert auf 7,0 leicht erhöht. Es konnte eine Konzentrationsänderung in Korrelation mit der Zelldichte beobachtet werden. Das lässt vermuten, dass dieser Effekt durch das Abzentrifugieren von HAI-1 zur Gewinnung des Überstandes entstanden ist. HAI-1 gelangt durch Diffusion in die Zelle und wurde mit diesen Zellen aus dem Überstand entfernt.

Um diesen Effekt zu vermeiden, wurde die Abbauaktivität von präpariertem Zytosol einer *V. harveyi* Mutante, die weder AI-2 noch HAI-1 produziert (MR0017), analysiert. Dafür wurde Zytosol von Zellen in der frühen (1), mittleren (2) und späten (3) exponentiellen Wachstumsphase präpariert und nach Zugabe von 10 μM HAI-1 inkubiert. Als Kontrollen wurde der Autoinduktor ohne Zytosol und mit durch Hitze inaktiviertem Zytosol inkubiert, außerdem wurde eine Probe nicht inkubiert, sondern direkt zum Messen abgestoppt.

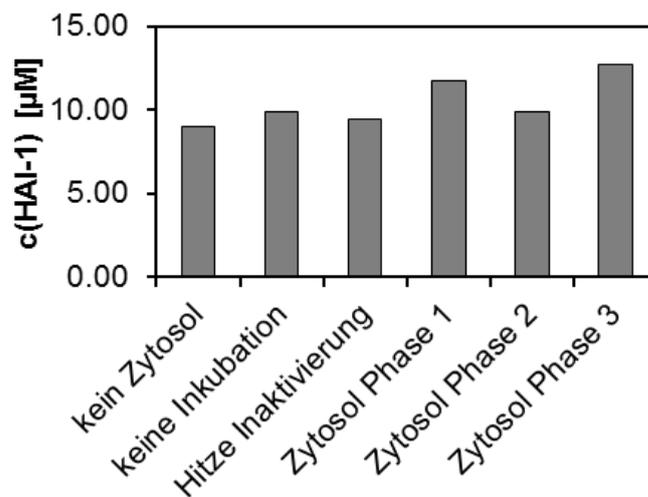


Abbildung 25: HAI-1 Abbauaktivität des Zytosols aus *V. harveyi*.

Von einer wachsenden Kultur *V. harveyi* MR017 (HAI-1⁻, AI-2⁻) wurde aus verschiedenen Wachstumsphasen von „früh exponentiell“ (1) über „mittel exponentiell“ (2) bis „spät exponentiell“ (3) Zytosol präpariert. Diese wurden nach Zugabe von 10 μM HAI-1 für 20 min bei 30°C inkubiert und anschließend Proben für die Konzentrationsbestimmung mit UPLC-MS genommen. Zur Kontrolle wurde HAI-1 ohne Zytosol inkubiert, es erfolgte keine Inkubation, oder das Zytosol wurde vorher durch Hitze inaktiviert.

Dabei zeigten die Konzentrationsbestimmungen mit UPLC-MS deutlich, dass HAI-1 zu keinem der Zeitpunkte abgebaut wurde (Abbildung 25). Eine Bestimmung der HAI-1 Konzentration der identischen Proben mit einem Bioreporterassay, wie es scheinbar erfolgreich zu Beginn des Projektes von Ursula Schell (169) durchgeführt wurde, ergab absolut willkürliche Werte, die nicht ausgewertet werden konnten.

Zusammenfassend konnte weder *in vivo* noch *in vitro* Degradation von HAI-1 in *V. harveyi* gezeigt werden, woraus geschlossen wurde, dass *V. harveyi* weder eine Acylase noch eine Laktonase zum Abbau von HAI-1 hat.

Auf der Suche nach möglichen Funktionen der potentiellen Laktonasen wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt (Abbildung 26).

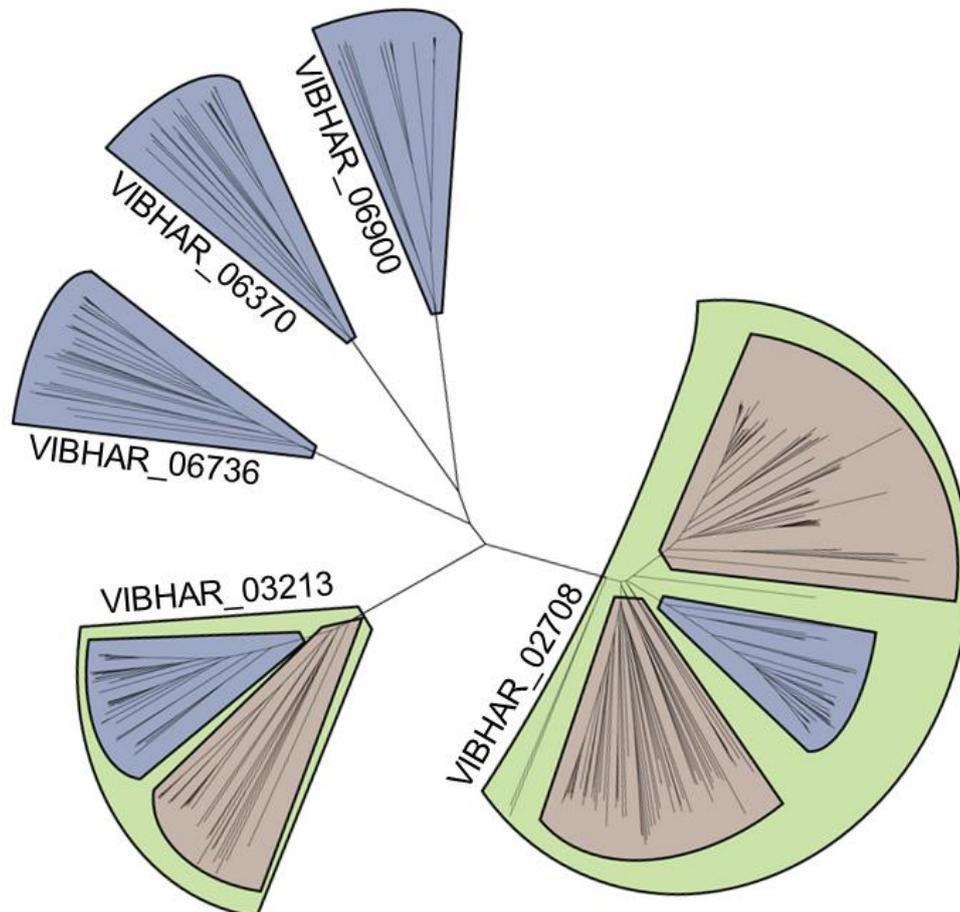


Abbildung 26: Phylogenetische Analyse der potentiellen Laktonasen von *V. harveyi*.

Proteinsequenzen von Homologen zu den potentiellen *V. harveyi* Laktonasen in den γ -Proteobakterien mit einer Identität größer als 50% bei einer Übereinstimmung der Proteinlänge von mindestens 90% wurden mit ClustalW aligned und als nicht gewurzelter Baum mit iTOL dargestellt. Phylogenetische Gruppen sind eingerahmt, wobei *Vibrionaceae* blau und sonstige γ -Proteobakterien rot hinterlegt sind. Bilden mehrere Cluster eine Gruppe, wurden diese in grün markiert.

Es wurde offensichtlich, dass drei der fünf Gene innerhalb der γ -Proteobakterien nur in Vibrionen vorkommen (blau), nämlich VIBHAR_06736, VIBHAR_06370 und VIBHAR_06900. Im Gegensatz dazu waren die beiden anderen potentiellen Laktonasen VIBHAR_02708 und VIBHAR_03213 neben der Gruppe der Vibrionen auch in anderen γ -Proteobakterien (rot) zu finden.

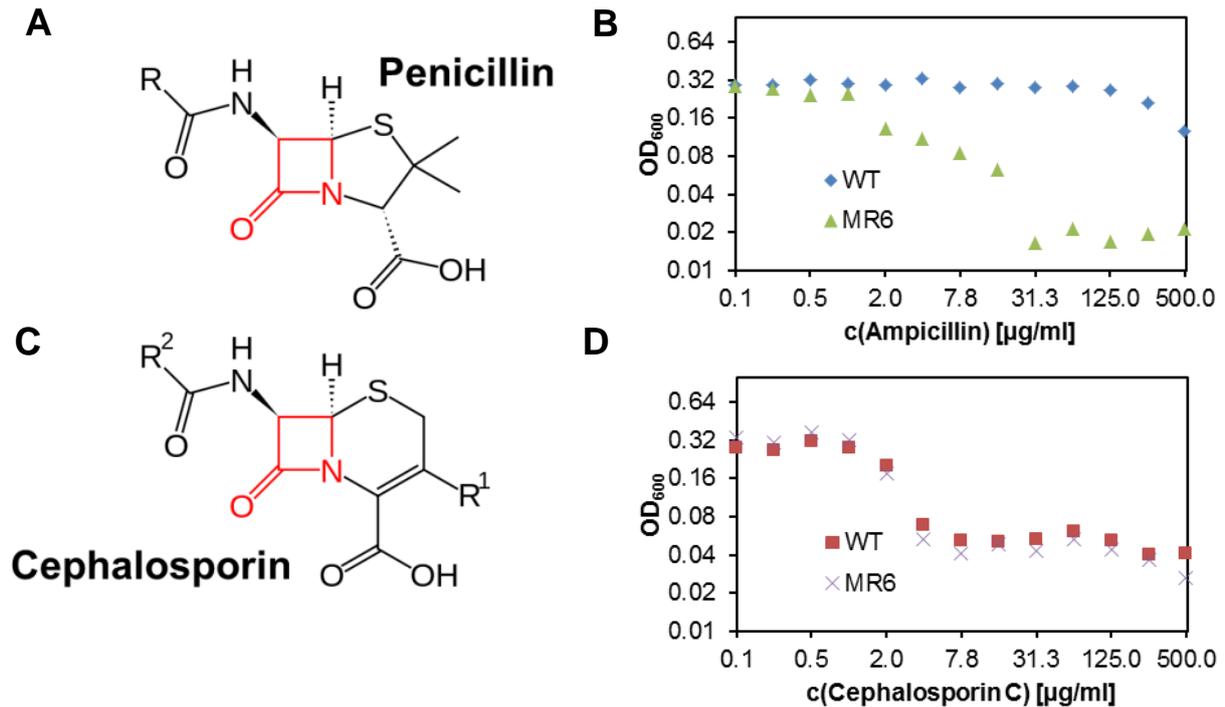


Abbildung 27: Die β -Laktamaseaktivität von VIBHAR_06370.

Die Familie der β -Laktamantibiotika besteht aus zwei Gruppen, den Penicillinen (**A**) (zu welcher auch Ampicillin gehört) und den Cephalosporinen (**C**). Übernachtkulturen von *V. harveyi* BB120 (WT) und MR6 (Δ VIBHAR_06370) wurden in LB-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Ampicillin und Cephalosporin C (zweier Verdünnungsschritte von 500 $\mu\text{g/ml}$ ausgehend = \log_2) kultiviert. Das Wachstum wurde mit der optischen Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) bestimmt und für die verschiedenen Konzentrationen der beiden Antibiotika nach 3,5 h dargestellt (**B**, **D**).

BLAST-Analysen ergaben für VIBHAR_06900 und VIBHAR_06736 nur die Zugehörigkeit zur β -Laktamasen Familie, während VIBHAR_06370 Ähnlichkeit zu bekannten Penicillinasen aufweist. Um die β -Laktamaseaktivität von VIBHAR_06370 nachzuweisen, wurden die minimalen inhibitorischen Konzentrationen (MICs) von den beiden Unterklassen der β -Laktamantibiotika, Penicilline (Abbildung 27 A) und Cephalosporine (Abbildung 27 C), für den Wildtyp (BB120) (Abbildung 27 B) und die Deletionsmutante Δ VIBHAR_06370 (MR006) bestimmt (Abbildung 27 D). Dabei wurde deutlich, dass die Deletionsmutante mit einer MIC von 30 $\mu\text{g/ml}$ sensitiv gegen Ampicillin ist, während der Wildtyp resistent ist (MIC >500 $\mu\text{g/ml}$) (Abbildung 27 B). Für Cephalosporin C sind WT und Mutante sensitiv (MIC 4 $\mu\text{g/ml}$) (Abbildung 27 D). Durch diese Analyse wurde VIBHAR_06370 als das Gen identifiziert, das *V. harveyi* BB120 die natürliche Resistenz gegen Ampicillin vermittelt.

2.4 Die Detoxifikation von Methylglyoxal

Für die beiden anderen Gene, die innerhalb der γ -Proteobakterien nicht nur in Vibrionen sondern weiter verbreitet sind, konnte mit Hilfe der BLAST-Analysen ein Zusammenhang zur Detoxifikation von Methylglyoxal (MG) hergestellt werden, das unter anderem als ein toxisches Nebenprodukt bei der Glykolyse entsteht. Dabei zeigt VIBHAR_03213 eine große Ähnlichkeit zur Glyoxalase II GloB aus *E. coli*. VIBHAR_02708 ist ähnlich zu YcbL aus *S. enterica* und *E. coli*, welches als Enzym mit Glyoxalase II Aktivität beschrieben ist (177). Es wurde jedoch mit der Detoxifikation von Methylglyoxal bisher nicht in Verbindung gebracht.

Methylglyoxal (MG) ist ein giftiges Ketoaldehyd, das ubiquitär in der Natur vorkommt (25, 34). Es entsteht als Nebenprodukt der Glykolyse durch die enzymatische Abspaltung von anorganischem Phosphat von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) durch die Methylglyoxalsynthase Mgs (69, 193). Außerdem entsteht MG bei der Oxidation von Aminoaceton durch eine Monoaminoxidase, welches ein Zwischenprodukt des Threonin-Abbaus ist (101, 122).

MG ist ein hoch reaktives, toxisches Elektrophil, das DNA- und Proteinschäden verursacht und zum Zelltod führen kann (36, 94, 160). Aus diesem Grund haben Bakterien und besonders *E. coli* verschiedene Strategien entwickelt, um mit der Belastung durch MG umzugehen, wie zum Beispiel das gut untersuchte KefGB und KefFC K⁺ Exportsystem, das abhängig von Glutathion (GSH) Teil der Stressantwort gegen das Elektrophil ist (56-58, 104, 118, 181, 216). Desweiteren nutzt *E. coli* eine Reihe von Enzymen, um MG durch den Abbau in unschädliche Produkte zu entgiften. Während Aldehydreduktasen für diesen Prozess nur eine untergeordnete Rolle spielen, wird MG hauptsächlich durch Glyoxalasen in D-Laktat umgebaut (56, 89, 192) (Abbildung 28).

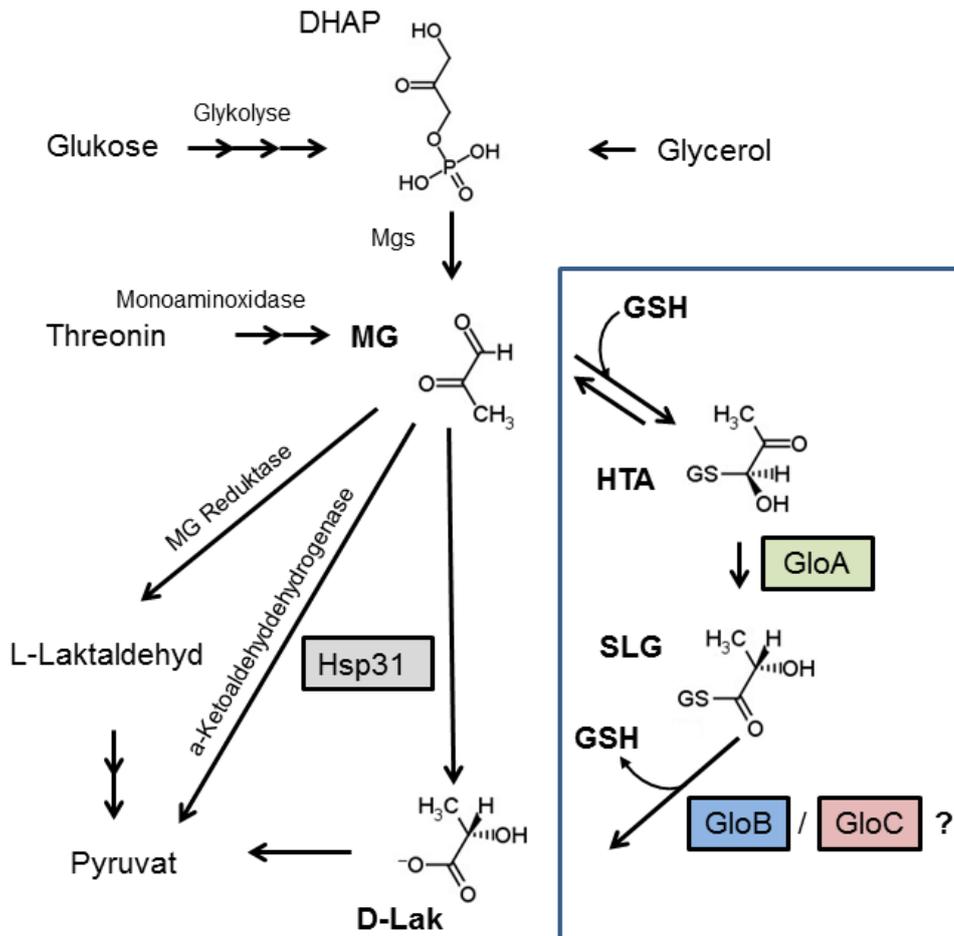


Abbildung 28: Methylglyoxalsynthese und Abbau in *E. coli*.

Methylglyoxal (MG) wird entweder von der Methylglyoxalsynthase (Mgs) aus Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) synthetisiert oder entsteht aus dem Threonin Stoffwechsel. Verschiedene Enzyme sind an der Entgiftung von MG beteiligt. Während einerseits durch Reduktasen über das Zwischenprodukt L-Laktaldehyd und andererseits direkt durch eine α -Ketoaldehyddehydrogenase Pyruvat entsteht, bilden Glyoxalasen D-Laktat (D-Lak) aus MG. In einer Glyoxalase III-Reaktion katalysiert das Hitzeschockprotein 31 (Hsp31) die direkte Umwandlung von MG zu D-Lak. Alternativ wird Methylglyoxal-Glutathion-Hemithioacetal (HTA), das in einer spontanen Reaktion aus MG und Glutathion (GSH) entsteht, zunächst von der Glyoxalase I GloA zu S-Laktoylglutathion (SLG) isomerisiert. In einem zweiten Schritt spalten die TypII-Glyoxalasen GloB und GloC SLG zu D-Lak und GSH.

Dabei kann MG direkt in einem Schritt in einer Glyoxalase III – Reaktion zu D-Laktat detoxifiziert werden, die von einem von RpoS regulierten Hitzeschockprotein Hsp31 katalysiert wird (180). Größeren Einfluss hat jedoch das von GSH abhängige Glyoxalase I/Glyoxalase II–System. In diesem Fall wird zunächst das Zwischenprodukt Methylglyoxal-Glutathion-Hemithioacetal (HTA), das in einer spontanen Reaktion aus MG und GSH entsteht, mit Hilfe der Glyoxalase I GloA zu S-Laktoylglutathion (SLG) isomerisiert. Dieses wird in der Glyoxalase II–Reaktion gespalten, wobei D-Laktat entsteht

und GSH regeneriert wird. Bis vor kurzem war als einziges Enzym mit dieser Aktivität und Funktion in *E. coli* nur GloB bekannt (137, 181). Im Jahr 2010 zeigten Stamp *et al.* *in vitro*, dass ein entferntes Homolog, YcbL, das jetzt GloC genannt wird, aus *S. enterica* serovar Typhimurium ebenfalls starke Glyoxalase II-Aktivität besitzt (177). Beide Typ II-Glyoxalasen binden Zn^{2+} als Cofaktor, allerdings wurde im Gegensatz zu GloB in GloC nur ein einzelnes Zn^{2+} -Ion in der Kristallstruktur gefunden, während normalerweise zwei Zn^{2+} -Ionen in Glyoxalase II-Enzymen beobachtet werden (22, 23, 177). Außerdem fehlt GloC die typische C-terminale Domäne, die einige Merkmale/Voraussetzungen für die Wahrnehmung von GSH beinhaltet (177). Ob GloC bei der Detoxifikation von MG eine Rolle spielt und welchen Einfluss es hat, ist bisher nicht bekannt und sollte in einem Nebenprojekt im Rahmen der Dissertation untersucht werden. Sowohl VIBHAR_02708 (GloC) als auch VIBHAR_03213 (GloB) sind Typ II Glyoxalasen sehr ähnlich. Der Einfluss von exogenem MG Stress auf *V. harveyi* *in vivo* ist nicht untersucht. Die Deletion von VIBHAR_02708 (*gloC*) zeigte keine erhöhte Sensitivität gegen MG (Abbildung 29). Ein Vergleich der Mutante Δ VIBHAR_03213 (Δ *gloC*) mit Wildtyp-Zellen ließ eine Verschiebung der letalen Konzentration von 0,5 auf 0,3 mM MG feststellen. Durch die Doppeldeletion von VIBHAR_02708 und VIBHAR_03213 konnte die letale Konzentration auf 0,1 mM MG (Abbildung 29) gesenkt werden.

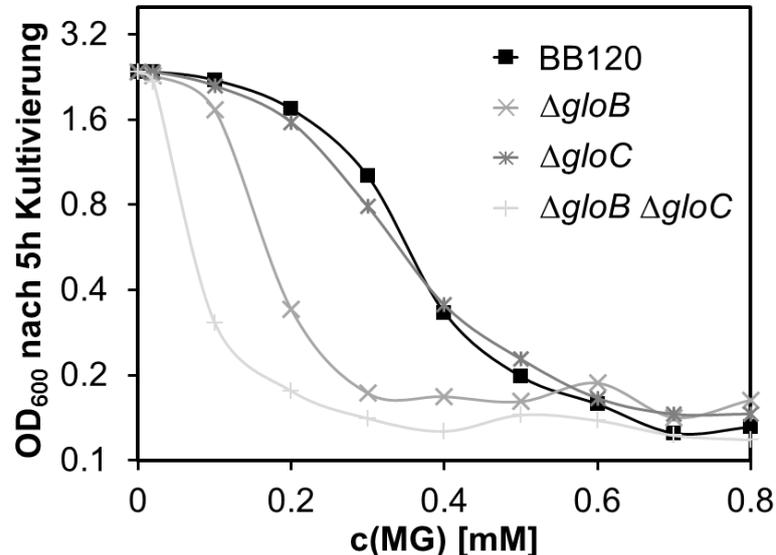


Abbildung 29: Die *in vivo* Reaktion von *V. harveyi* *glo* Mutanten auf exogenen MG Stress.

Exponentiell wachsende *V. harveyi* Kulturen von Wildtyp (BB120) und entsprechenden *gloB* und *gloC* Deletionsmutanten ($OD_{600} = 0,15$) wurden in LB-Medium steigenden MG Konzentrationen ($\leq 0,5$ mM) ausgesetzt. Die Sensitivität gegen MG wurde durch Aufzeichnen des Wachstums bestimmt. Dargestellt ist die OD_{600} nach 5 h Kultivierung.

2. Ergebnisse

Der verstärkte Effekt auf die Doppeldeletionsmutante weist darauf hin, dass beide Enzyme, GloB und GloC, eine Funktion bei der Bewältigung von exogenem MG Stress haben.

Im Gegensatz zu *V. harveyi* ist die Methylglyoxal Detoxifikation in *E. coli* bereits sehr gut beschrieben, daher wurde der funktionelle Zusammenhang von GloB und GloC (vorher YcbL) in *E. coli* analysiert. Die Ergebnisse aus diesem Teil sind in dem Manuskript Reiger, M. *et al.* (2014) „Deciphering the roles of GloB and YcbL (GloC) on methylglyoxal detoxification in *Escherichia coli*“ zur Veröffentlichung in FEMS Microbiology Letters zusammengefasst.

Zunächst sollte mit einer phänotypischen Analyse gezeigt werden, dass GloB und GloC an der Detoxifikation von MG *in vivo* beteiligt sind. Dazu wurden mit *in-frame* Deletion Einzel- und Doppelmutanten für die Gene *gloA* und *gloB* erstellt. *E. coli* Stämme, die kein *gloB* exprimieren, können extern zugegebenes MG schlechter abbauen (139) Daher sollte festgestellt werden, ob die Deletion von *gloC* einen vergleichbaren Phänotyp herbeiführt.

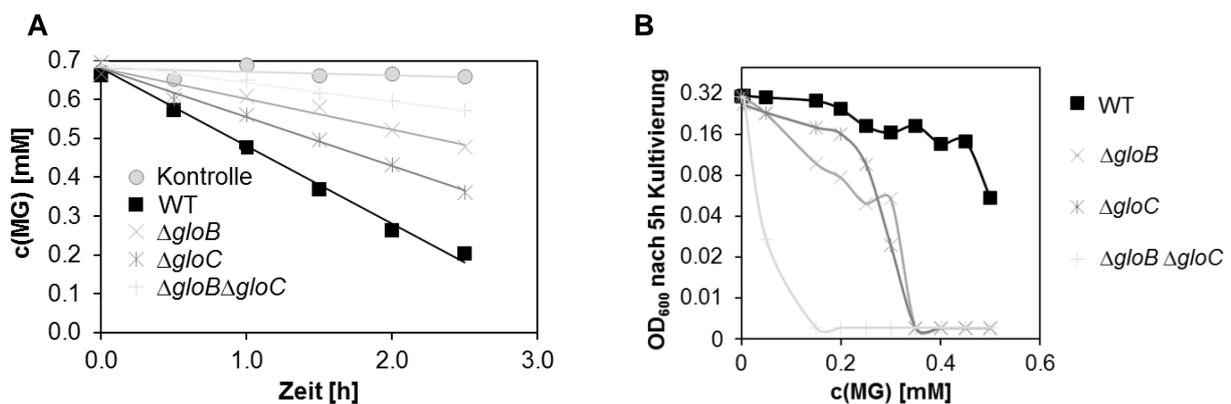


Abbildung 30: Die *in vivo* Reaktion von *E. coli* *glo* Mutanten auf exogenen MG Stress.

(A) MG Degradation: Zu *E. coli* Wildtyp und *glo* Mutanten einer exponentiell wachsenden Kultur ($OD_{600} = 0,4$) wurde 0,7 mM MG zugegeben. Zu den markierten Zeitpunkten wurden Überstände entnommen und die MG-Konzentration colorimetrisch bestimmt. **(B)** MG Toleranz: Übernachtskulturen von *E. coli* Wildtyp und *glo* Mutanten wurden in frischem $K_{0,2}$ -Medium auf eine OD_{600} von 0,005 verdünnt und steigenden MG-Konzentrationen ($\leq 0,5$ mM) ausgesetzt. Die Sensitivität der Zellen gegen MG wurde an Hand des Wachstums bestimmt. Dargestellt ist die optische Dichte nach 5 h Kultivierung.

Wildtyp-Zellen können MG konstant mit 0,20 mM/h abbauen (Abbildung 30 A), während bei Deletion von *gloB* der Abbau auf 0,08 mM/h reduziert ist. Vergleichbar dazu war auch für die $\Delta gloC$ Mutante die MG Abbaurate verringert (0,15 mM/h). Dadurch wurde deutlich, dass GloC als aktive Glyoxalase II *in vivo* eine Rolle spielt. Im Vergleich ist der Phänotyp von $\Delta gloC$ weniger stark ausgeprägt als $\Delta gloB$, dennoch spielt GloC möglicherweise eine Schlüsselrolle, um optimalen Umsatz von MG nach dessen enzymatischen Umwandlung

mit der Glyoxalase I GloA zu ermöglichen (Abbildung 28). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die $\Delta gloB \Delta gloC$ Doppeldeletion mit kumulativem Phänotyp nahezu kein MG aktiv degradiert (0,04 mM/h). Bemerkenswerterweise führte zwar die Doppeldeletion $\Delta gloB \Delta gloC$, aber keine der Einzeldelationen zu einem so drastischen Phänotyp, wie es für Zellen, die das die vorherige Reaktion katalysierende Enzym GloA deletiert haben, beschrieben ist (118). Deshalb kann spekuliert werden, dass GloC das Typ I / Typ II Glyoxalasesystem vervollständigt.

Nachdem *in vivo* die Glyoxalase II Aktivität demonstriert wurde, sollte untersucht werden, wie die Deletion von *gloC* die Kapazität MG abzubauen sowie die Überlebenschancen von *E. coli* beeinflusst, da die Deletion von *gloA* und *gloB* zu einer höheren Sensitivität gegen von Außen zugegebenes MG führt (118, 139). Für *E. coli* Wildtyp Zellen führen MG Konzentrationen größer als 0,4 mM zunächst zu langsamerem Wachstum und werden schließlich lethal, wenn 0,6 mM MG erreicht wird (139). Um den Einfluss der beiden *E. coli* Typ II Glyoxalasen herauszufinden, wurden der Wildtyp und die entsprechenden Mutanten steigendem exogenen MG Stress ausgesetzt (Abbildung 30 B). Das Wachstum wurde 5 h nach Zugabe von MG dargestellt. Die Zellen der Wildtypkultur sind bis zu einer Konzentration von 0,45 mM MG resistent und auch das Wachstum ist nicht signifikant beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu waren die Einzeldelationen von *gloB* oder *gloC* deutlich sensitiver gegen MG und erreichten bereits mit 0,35 mM MG eine letale Konzentration. Dennoch konnte $\Delta gloC$ bis 0,35 mM MG die steigenden Konzentrationen detoxifizieren und war nicht im Wachstum inhibiert, während die Wachstumsrate von $\Delta gloB$ bereits ab 0,05 mM MG kontinuierlich abfiel. Diese unterschiedlichen Phänotypen können nur durch verschiedene enzymatische Eigenschaften von GloB und GloC trotz funktioneller Redundanz als Typ II Glyoxalasen erklärt werden.

Daher maskiert möglicherweise einerseits die Haupt-Glyoxalase II GloB die physiologische Relevanz von GloC in $\Delta gloC$ bei niedrigen MG Konzentrationen, während andererseits eine unterstützende Glyoxalase II GloC nur teilweise GloB in dessen Abwesenheit ersetzen kann. In Übereinstimmung damit konnte die Doppeldeletionsmutante $\Delta gloB \Delta gloC$ bereits bei Konzentrationen größer als 0,1 mM MG kaum wachsen. Insgesamt zeigt die phänotypische Analyse der MG Degradation und des Zellwachstums die Bedeutung von GloC für die Detoxifizierung von MG deutlich, gibt aber auch Hinweise auf eine unterschiedliche Enzymaktivität verglichen mit GloB.

Frühere Studien zeigten, dass sowohl GloB als auch GloC von *S. enterica in vitro* Glyoxalase II Aktivität haben (21, 177). Diese Ergebnisse wurden mit den orthologen Proteinen von *E. coli* neu untersucht und Datensätze vergleichbar mit denjenigen aus der *in vivo* Analyse erstellt. Glyoxalase II Enzyme wandeln abhängig von Metallionen SLG in

2. Ergebnisse

D-Laktat und GSH um (Abbildung 28). Allgemein anerkannt ist, dass Glyoxalase Enzyme in ihrem aktiven Zentrum Zn^{2+} koordinieren. Außerdem können Eisen- oder Manganionen Zink funktional ersetzen. Um die Aktivitäten von GloB und GloC abhängig von verschiedenen Metallionen zu testen, wurden gereinigte Proteine verwendet.

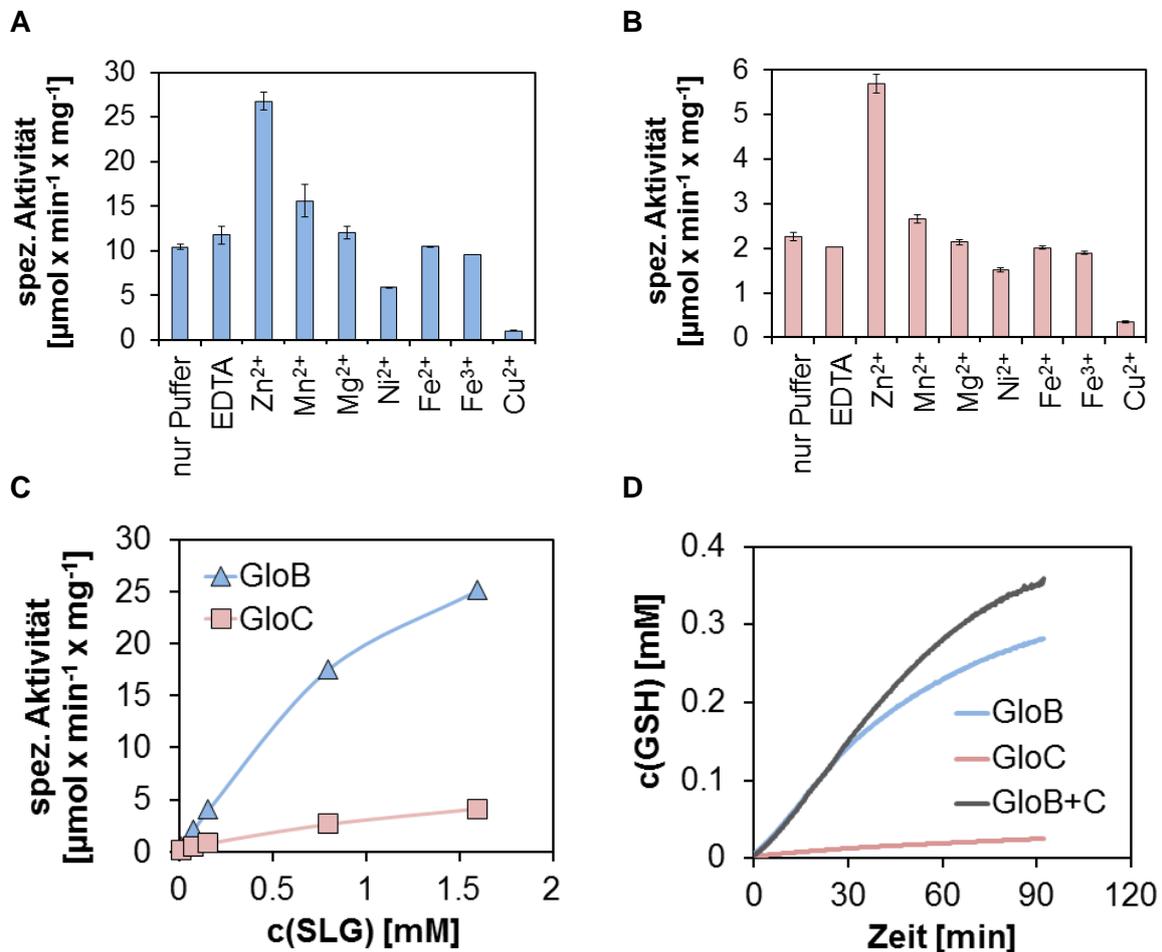


Abbildung 31: Die enzymatischen Aktivitäten *in vitro* der *E. coli* Typ II Glyoxalasen GloB und GloC.

(A, B) Abhängigkeit von GloB (blau) und GloC (rot) von zweiwertigen Metallionen: Die spezifische Aktivität des jeweiligen Enzyms wurde in Glo-Reaktionspuffer in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ zweiwertigen Metallionen oder $10 \mu\text{M}$ EDTA. (C) Spezifische Aktivität von gereinigtem GloB und GloC: Die enzymatische Umsetzung steigender SLG-Konzentrationen ($\leq 1,7 \text{ mM}$) wurde bei 30°C durch die colorimetrische Bestimmung des akkumulierenden GSH im linearen Bereich gemessen. Die spezifische Aktivität ist in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ angegeben. (D) SLG Umsetzung der *E. coli* Typ II Glyoxalasen: 10 nM GloB und 10 nM GloC wurden bei 30°C mit $0,4 \text{ mM}$ SLG inkubiert. Die SLG Konzentration wurde über 90 min verfolgt.

Die Expression erfolgte in Vollmedium, was dazu führte, dass beide Enzyme bereits ohne Zugabe von zusätzlichen Metallionen aktiv waren, da Zink aus dem Medium bereits am aktiven Zentrum gebunden hatte (Abbildung 31 A und B) (137, 177). In Übereinstimmung mit früheren Studien konnten die Enzymaktivitäten von GloB und GloC durch Zugabe von EDTA, das zweiwertige Metallionen bindet, nicht gemindert werden (Abbildung 31 A und

B), dies ist vermutlich eine Folge der festen Bindung von Zink (137). Ebenso beeinflusste weder zusätzliches zweiwertiges Nickel oder Mangan, noch zweiwertiges Eisen den SLG Umsatz. Cu^{2+} wirkte im Gegensatz dazu als starker Inhibitor gegen GloB und GloC (88). Die Zugabe von Zn^{2+} zu jedem der beiden Enzyme führte zu einer Erhöhung der Aktivität von $10 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ auf $27 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ für GloB und $2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ auf $6 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ bei GloC, möglicherweise in Folge der Besetzung von zunächst unbesetzten aktiven Zentren.

Parallel wurde die spezifische Aktivität von GloB und GloC in Abhängigkeit von der SLG Konzentration untersucht. Für beide Enzyme stieg die Umsatzrate linear mit den SLG Mengen an, allerdings unterschied sich die maximale Glyoxalase II Aktivität beider Enzyme signifikant. Während GloB SLG maximal mit $V_{\text{max}} = 49,4 \pm 4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ konvertiert, erreicht GloC nur $8,2 \pm 0,9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Abbildung 31 C). Die Aktivität von *E. coli* GloC entspricht genau der zuvor für *S. enterica* beschriebenen (177). Im Gegensatz dazu wurde ein SLG Umsatz von GloB festgestellt, der zwei Mal niedriger war als zuvor von O'Young *et al.* dargestellt (137). Der fünf Mal niedrigere SLG Umsatz von GloC relativ zu GloB kann durch die signifikanten Strukturunterschiede von GloC zur Glyoxalase II GloB erklärt werden. GloB enthält zwei Bindestellen für Metallionen. Ein Metallion ist an drei Histidin-Reste gebunden und könnte das anziehende Nukleophil liefern, während das andere durch die Stabilisierung einer negativen Ladung von Schwefel in der Glutathion-Gruppe die Spaltung einer S-C-Bindung favorisiert (21). Im Gegensatz dazu hat GloC nur die zweite Bindestelle und hat deshalb veränderte Eigenschaften für die Spaltung von SLG. Desweiteren hängt die Bindung von SLG stark von einer C-terminalen Domäne ab, die normalerweise für Typ II Glyoxalasen charakteristisch ist (20, 123). Eine solche Domäne fehlt in GloC und könnte zu einer niedrigeren Substrataffinität führen. Dementsprechend erfüllt GloC nur eine unterstützende Rolle bei der Entgiftung von MG, die bereits von der vorangegangenen phänotypischen Analyse impliziert wurde. Auffallend ist, dass bei einer Kombination der beiden Typ II Glyoxalasen in Bezug auf den Umsatz von SLG, GloB nicht die vergleichsweise geringe Aktivität von GloC überdeckt, sondern einen kumulativen Phänotyp zeigt (Abbildung 31 D). Dies weist auf den Vorteil hin, den *E. coli* dadurch erlangt, dass die beiden Typ II Glyoxalasen unterschiedliche enzymatische Eigenschaften haben.

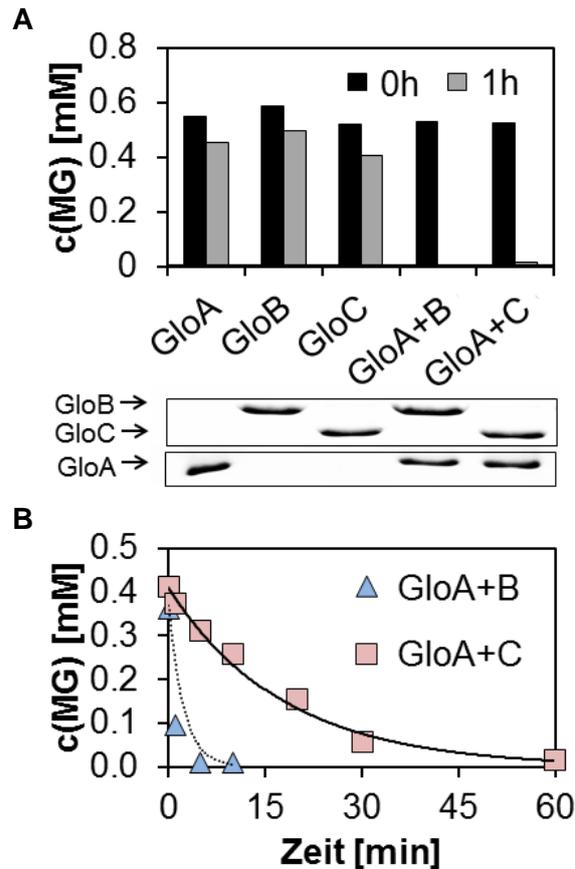


Abbildung 32: *In vitro* MG Detoxifikation durch das Typ I und Typ II Glyoxalase System.

(A) Degradation von MG durch GloA, GloB und GloC: 10 nM gereinigte(s) Protein(e) wurde(n) für 1 h bei 30°C mit 0,6 mM MG und 0,1 mM GSH inkubiert. Die MG Konzentration wurde zu Beginn und nach der Inkubation colorimetrisch bestimmt. Die korrespondierenden Proteine wurden im Western Blot detektiert. **(B)** Kinetik des MG Abbaus von Glyoxalase I und II: 10 nM gereinigtes GloA wurde entweder mit 10 nM GloB oder GloC kombiniert und bei 30°C mit 0,6 mM MG sowie 0,1 mM GSH inkubiert. Der MG Abbau wurde über 60 min verfolgt. Dafür wurde zu den bestimmten Zeitpunkten die MG Konzentration colorimetrisch bestimmt.

Schließlich wurde die MG Degradation mit Hilfe von Mischungen aus GloA und entweder GloB oder GloC *in vitro* nachgestellt. In Gegenwart von GSH kann keines der drei Enzyme MG allein abbauen, sondern nur die Kombination aus Glyoxalase I und Glyoxalase II ermöglicht den vollständigen Abbau innerhalb 1 h (Abbildung 32 A). Um die MG Degradationsraten von GloA/GloB und GloA/GloC aufzulösen, wurde eine Kinetik aufgenommen und die verbliebene MG Konzentration durch Messung des Farbumschlags bestimmt (Abbildung 32 B). Deckungsgleich mit der *in vivo* Analyse und dem Umsatz von SLG *in vitro* baute eine Kombination mit GloB MG viel effektiver ab als die mit GloC. In Gegenwart von GloB wurde 0,6 mM MG innerhalb von 5 min vollständig entfernt, während die Kombination von GloA und GloC für den vollständigen Abbau 60 min benötigte. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der sukzessiven Wiedereinführung von GloA, GloB und

GloC in *E. coli* $\Delta gloABC$ *in vivo* erreicht (Abbildung 33). Die Komplementation mit den einzelnen Enzymen war nicht ausreichend, damit die Zellen MG abbauen konnten. MG Abbau zu den abgebildeten Zeitpunkten war nur möglich, wenn sowohl die Typ I Glyoxalase GloA als auch eine der beiden Typ II Glyoxalasen komplementiert wurden. Die zwei verschiedenen Typ II Glyoxalasen GloB und GloC waren ohne GloA zur Detoxifikation nicht ausreichend. Im Western Blot wurde deutlich, dass GloC nur in geringen Mengen produziert wird, was bereits bei der Überproduktion der Enzyme aufgefallen war. Die Abbauaktivität in Gegenwart von GloA und GloC im Vergleich zu nur GloA bewies, dass GloC – wenn auch nur in geringen, nicht detektierbaren Mengen – produziert wurde.

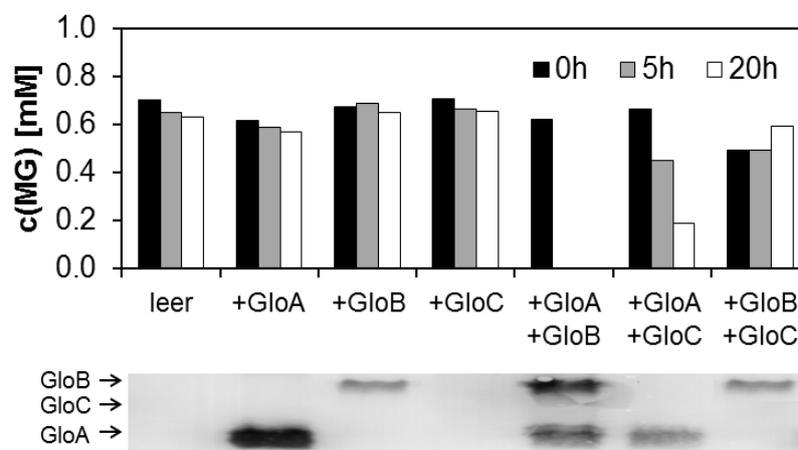


Abbildung 33: Komplementationsstudie der $\Delta gloABC$ Mutante.

Exponentiell wachsende *E. coli* $\Delta gloABC$ Kulturen mit einer plasmidkodierten Kopie von nur *gloA*, *gloB* und *gloC*, oder einer Kombination aus jeweils zwei Enzymen wurden mit 0.7 mM MG kultiviert. Nach 0 h, 5 h und 20 h wurde die MG Konzentration colorimetrisch bestimmt. Die Produktion von 6His-getaggten Glo-Proteinen wurde im Western Blot analysiert.

Mit diesen *in vivo* und *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass die potentiellen Laktonasen VIBHAR_02708 (GloC) und VIBAHR_03213 (GloB) an der Detoxifikation von MG beteiligt sind. Anhand der Homologen Enzyme in *E. coli* wurde deutlich, dass beide Enzyme die Funktion von Typ II Glyoxalasen haben, aber dennoch unterschiedliche enzymatische Eigenschaften aufweisen.

3. Diskussion

3.1 Die Regulation von HAI-1, CAI-1 und AI-2 in *V. harveyi*

V. harveyi synthetisiert drei verschiedene Autoinduktoren, das Acylhomoserinlaktone HAI-1, den Furanosylboratdiester AI-2 und das Undecanon CAI-1. Die Art und Weise des Zusammenspiels sowie der Einfluss und die Regulation jedes Einzelnen ist bislang ungeklärt. Um für diese offenen Fragen Lösungen zu finden wurde zunächst mit Hilfe von Synthase-Deletionsmutanten der Einfluss verschiedener AIs auf den Phänotyp der Biolumineszenz analysiert. Dabei stellte sich durch verschiedene Kombinationen heraus, dass jeder der drei Autoinduktoren einen unterschiedlich starken Einfluss auf diesen Phänotyp hat. Während in AB-Medium HAI-1 die Lumineszenz am wenigsten induziert hat CAI-1 bereits einen größeren Einfluss, wobei AI-2 schließlich die größte Bedeutung zukommt. Im Vergleich zur Situation in dem nährstoffreicheren LM-Medium zeigte sich, dass offensichtlich CAI-1 statt AI-2 den größeren Einfluss hat, obwohl die Konzentration von AI-2 im Verhältnis zu AB-Medium 5-fach erhöht war. Entgegen der Annahme, dass CAI-1 nur in *V. cholerae* größere Bedeutung hat (3), konnte gezeigt werden, dass die Gewichtung der AIs auch von den äußeren Bedingungen abhängt. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen war es möglich durch alleinige Zugabe von Phenylalanin zum Medium die Produktion von CAI-1 zu beeinflussen (128). Veränderungen in den AI-Konzentrationen stehen mit der Integration der AI-Synthese über den SAM-Kreislauf in den Stoffwechsel in Verbindung.

Unabhängig von der Art des Mediums war zu beobachten, dass die Kombination der beiden schwächsten AIs die Biolumineszenz nicht auf das Wildtypniveau induzieren konnte, in dem alle drei AIs vorhanden sind. Die Kombination von dem AI mit dem meisten Einfluss mit einem Schwächeren reichte jedoch aus, um das Level des Wildtyps zu induzieren. Dies wurde als erster Hinweis darauf gewertet, dass die Kombination der AIs die Expression QS-regulierter Gene beeinflusst.

Im Rahmen der Dissertation von C. Anetzberger wurden die AI-Konzentrationen in einer in AB-Medium wachsenden Kultur beobachtet. Dabei zeigte sich, dass in der exponentiellen Wachstumsphase beim Übergang von niedriger zu hoher Zelldichte ebenfalls AI-2 der überwiegende AI im Medium ist. Im Gegensatz dazu konnte HAI-1 erst ab der späten exponentiellen Phase nachgewiesen werden und erreichte dann ein konstantes Level zusammen mit AI-2 in der stationären Phase. Für CAI-1 konnten keine molaren Konzentrationen bestimmt werden, die Verfügbarkeit wurde nur indirekt mit Hilfe eines Reporterassays bestimmt (L. Plener). Dennoch wurde deutlich, dass in AB-Medium

die Konzentration von CAI-1 erst in der stationären Phase anstieg. Der versetzte Konzentrationsanstieg von HAI-1 zu AI-2 stimmt verhältnismäßig mit den Daten einer anderen Veröffentlichung überein, auch wenn sie in Bezug auf die absolute Konzentration und den nur leicht versetzten Konzentrationsanstieg nicht genau deckungsgleich sind (68). Unterschiede können dadurch erklärt werden, dass in der anderen Studie das nährstoffreichere LM-Medium verwendet wurde (68), während hier (4) die Konzentration in AB-Medium analysiert wurde. Dass unterschiedliche Medien die AI-Konzentrationen und deren Gewichtung beeinflussen, konnte bereits im Rahmen dieser Arbeit durch den Vergleich der verschiedenen Synthase-Deletionsmutanten dargestellt werden. Aufgrund der verschiedenen Konzentrationsprofile der AIs, die den Wachstumsverlauf von *V. harveyi* begleiten, konnte von C. Anetzberger eine Unterteilung in vier verschiedene Wachstumsphasen vorgenommen werden (4): in der frühen exponentiellen Wachstumsphase ist AI-2 niedrig und wird in der mittleren exponentiellen Phase hoch, während in der späten exponentiellen Wachstumsphase AI-2 und HAI-1 vorhanden sind und erst in der stationären Phase schließlich alle drei AIs verfügbar sind. Obwohl Biolumineszenz und Exoproteaseaktivität von der gleichen Signalkaskade positiv reguliert sind, werden diese Phänotypen im *V. harveyi* Wildtyp unterschiedlich induziert. Während die Biolumineszenz langsam ansteigt und in der exponentiellen Wachstumsphase das Maximum erreicht, ist Exoproteaseaktivität erst verzögert in der stationären Phase nachweisbar.

Da dies die Bedeutung von der Zusammensetzung und Konzentration der AIs unterstützt, wurde in dieser Arbeit die Induktion weiterer QS-abhängiger Gene auf Transkriptlevel mit qRT-PCR analysiert. Die AI-Zusammensetzung wird letztendlich in die Konzentration von LuxR „übersetzt“ und diese hängt von der *luxR* Transkriptmenge ab. Deshalb wurde ein enger Zusammenhang zwischen den verschiedenen Signalen und dem Transkript des Masterregulators erwartet und auch beobachtet. Mit jedem Schritt, in dem ein weiterer AI im Zuge des Zellwachstums hinzukam, nahm auch die *luxR* Menge zu und erreichte das Maximum, wenn alle drei AIs vorhanden waren.

LuxR reguliert 115 Gene direkt und ist insgesamt an der Kontrolle von mehr als 600 Genen beteiligt (202). Der Masterregulator aus der TetR-Familie bindet als Dimer an 1.165 Positionen, was nur durch eine hohe Verfügbarkeit von etwa 6.500 Dimeren im Wildtyp ermöglicht werden kann (152, 202), während eine geringe Verfügbarkeit, wie sie an anderer Stelle postuliert wurde, eine weitere Möglichkeit zur Regulation bzw. den schnellen Übergang zu niedrigen Zelldichten ermöglichen könnte (189). Die Bindemotive für reprimierte und aktivierte Promotoren sind unterschiedlich, denn während die Repression ein symmetrisches Palindrom benötigt, ist für die LuxR Aktivierung nur die halbe Seite des 23 bis 28 Basen langen Motivs notwendig, und auch die Zahl der LuxR-

Bindestellen ist in 59% der Binderegionen mehr als eine Bindestelle (202). Eine niedrige Konzentration von LuxR reicht offenbar aus, um *luxA* und damit die Biolumineszenz zu aktivieren und im Gegenzug *vopN* und *vscP* (Protein der äußeren Membran, bzw. Teil des TypIII-Sekretionssystems) zu unterdrücken. Erst zu späteren Zeitpunkten, wenn die *luxR* Transkriptmenge zugenommen hat, erreicht auch *vhpA*, das eine Protease kodiert, ein Maximum. Dies bedeutet, dass die Induktion der Protease eine höhere Konzentration von LuxR benötigt, die erst in Anwesenheit von AI-2 und HAI-1 erreicht wird, während die Lumineszenz bereits bei niedrigen Konzentrationen induziert wird. Durch die drei Bindestellen und die niedrige Affinität von LuxR zu selbigen im Promotor von *luxC* kann die konstante Zunahme der Biolumineszenz bis zu einem Maximum erklärt werden (202). Der Rückgang des Transkriptlevels von *luxA* könnte dadurch erläutert werden, dass eine der drei Bindestellen in P_{luxC} eine sehr niedrige Affinität hat und bei Bindung von LuxR die Transkription reprimiert. Diese Hypothese könnte mit Hilfe von LuxR-Überproduktion geprüft werden, da in diesem Fall die Biolumineszenz unterdrückt sein müsste. Ein weiterer Faktor, der an der Regulation QS-abhängiger Gene beteiligt ist, ist AphA, ein Transkriptionsregulator, der gegensätzliche Aktivität zu LuxR hat und 167 Gene allein und 77 Gene zusammen mit LuxR reguliert (201). Inwiefern andere Faktoren die Regulation in der stationären Phase beeinflussen, ist unbekannt.

Maßgeblich für die Entstehung eines Signals ist die Präsenz der AIs. Die Synthese der drei AIs HAI-1, CAI-1 und AI-2 beeinflusst deren Konzentration und Zusammensetzung. In dieser Arbeit wurden deshalb die Transkriptmengen dieser drei, zu den AIs korrespondierenden, Synthesen *luxM*, *cqsA* und *luxS* bestimmt und ein charakteristischer Verlauf festgestellt. Während zumindest für *luxS* (AI-2 Synthase) und *cqsA* (CAI-1 Synthase) nahezu der Verlauf der AI-Konzentration widerspiegelt wurde, war der Verlauf für *luxM* (HAI-1 Synthase) umgekehrt. Das Transkriptlevel war zunächst hoch und wurde dann, wenn die Konzentration im Medium ansteigt, erniedrigt. Durch die Verknüpfung der AI-Synthese mit dem Metabolismus können die teilweise relativ hohen Standardabweichungen erklärt werden (146). Wird die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation außer acht gelassen, würden die AIs abhängig vom metabolischen Zustand ständig produziert werden. In Folge davon müssen die AIs auch wieder abgebaut werden, um den charakteristischen Konzentrationsverlauf in einer wachsenden Kultur aufrecht zu erhalten und damit die Einteilung der Wachstumsphasen nach der bestimmten Zusammensetzung zu ermöglichen. Für AHLs und AI-2 sind Mechanismen beschrieben, die die Konzentration der AIs im Überstand erniedrigen und damit QS inhibieren können. Diese werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

3.2 Der Einfluss von Quorum Quenching auf die Regulation der Autoinduktor-konzentration und -zusammensetzung

Da die Konzentration und Zusammensetzung der AIs nicht nur die Zelldichte an sich, sondern verschiedene Wachstumsphasen abbilden, ist deren Kontrolle für die Regulation verschiedener QS-regulierter Phänotypen, wie zum Beispiel Exoproteaseaktivität, Biolumineszenz oder Biofilmbildung, essentiell (5). Alle Prozesse, die mit QS interferieren, wurden unter dem Begriff „Quorum Quenching“ (QQ) zusammengefasst (41). Dabei üben diese Strategien selektiven Druck auf Bakterien aus, indem die Expression bestimmter Funktionen, wie zum Beispiel Biofilmbildung, beeinflusst wird. In Zusammenhang mit der vermehrten Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und der im Vergleich dazu geringen Entwicklung neuer Antibiotika, bietet QQ einen neuen Ansatzpunkt für die bakterielle Infektionskontrolle in der medizinischen Anwendung. Einerseits reguliert QS die Virulenz vieler bakterieller Pathogene, andererseits wurden bereits viele Moleküle isoliert, die einen QQ Effekt haben. Dennoch gibt es noch viele Mikroorganismen, die ein Signal quenchen können, aber deren Quenchingmolekül noch nicht identifiziert ist (187). Die Strategie, mit Hilfe von QQ Molekülen die Ansiedlung von Bakterien durch Verhinderung von Biofilmbildung zu erschweren und damit dem Immunsystem ein größeres Zeitfenster zur Bekämpfung von Pathogenen zu verschaffen, scheint insofern erfolgversprechend, als dass in einem Mausmodell mit einigen Molekülen die Biofilmbildung von *Pseudomonas* und *V. cholerae* reprimiert werden kann (9). Einige der QS Inhibitoren wurden sogar aus Pflanzen isoliert, wie zum Beispiel L-Cavananin, das aus *Medicago sativa* (Luzerne) isoliert wurde und in großen Mengen auch von anderen Leguminosen produziert wird (100). Die Alge *Delisea pulchra* synthetisiert ein Bromofuranon, das eine Infektion von *P. monodon* (Garnele) durch *V. harveyi* erschwert (120, 164). Erst vor Kurzem entdeckte QQ Moleküle sind Yayurea A und B, die in einem breiten Wirkungsspektrum Beta- und Gammaproteobakterien in der Wahrnehmung von AHLs und Wachstum beeinflussen und in *V. harveyi* direkt mit der AHL Sensor kinase LuxN interagieren, indem der natürliche Phosphatfluss umgekehrt wird (33). Zimtaldehyd, das in der Lebensmittelindustrie weit verbreitet ist, inhibiert in niedrigen Konzentrationen das QS-System von *V. harveyi*, indem es möglicherweise die Affinität des Masterregulators LuxR für DNA erniedrigt (15-17, 136). In *Pseudomonas aeruginosa* kann unter Stressbedingungen sogar der QS-Masterregulator LasR umgangen und über einen Nebenweg eine Untergruppe von QS-regulierten Genen aktiviert werden (39). Die Signalkaskade von *V. harveyi* bietet zahlreiche Möglichkeiten die Wahrnehmung oder Weiterleitung eines Signals zu beeinflussen, zum Beispiel durch Feedbackschleifen (91, 188) oder direkt bei der Wahrnehmung durch die Sensor kinasen.

3.3 Transport von AI-2

Eng verknüpft mit der Wahrnehmung eines Signals ist der Transport. Während für CAI-1 bislang kein Exportmechanismus bekannt ist wurde gezeigt, dass kurzkettige AHLs wie HAI-1 die Membran durch Diffusion passieren können. Im Gegensatz dazu muss AI-2, das aufgrund seiner chemischen Eigenschaften eine niedrige Affinität für Lipide hat, über ein Transportsystem die Membran passieren (93). Bisher wurden drei verschiedene Klassen von AI-2-Rezeptoren charakterisiert. Die Familien der periplasmatischen Bindeproteine LsrB und LuxP binden AI-2-spezifisch, während außerdem Mitglieder der Ribose Bindeprotein Familie (RbsB) als Rezeptoren fungieren (7, 28, 125). Neben diesen bereits bekannten Systemen müssen weitere alternative Rezeptoren existieren, da AI-2-abhängige Antworten in verschiedenen Bakterien beschrieben sind, die keinen Rezeptor aus den drei beschriebenen Familien haben (146).

Für den Export des Signals ist bisher nur YdgG (TqsA) aus *E. coli* beschrieben, welches das einzige charakterisierte Protein aus der AI-2E Superfamilie ist (81, 155). Durch bioinformatische Analysen wurde YhhQ als potentieller AI-2 Transporter identifiziert. Die Deletion von beiden Proteinen in *E. coli* führte dazu, dass die maximale AI-2 Konzentration einer wachsenden Kultur halbiert wurde (Abbildung 13). YdgG zeigte in den Affinitätsmessung mit Hilfe der Tryptophanfluoreszenz mit einem K_D -Wert von etwa 2 mM lediglich eine niedrige, unspezifische Affinität für AI-2. Im Gegensatz dazu lag der K_D -Wert = 4 μ M von YhhQ im physiologischen Bereich. Der beobachtete quenchende Effekt wird durch Strukturänderung in Folge von AI-2 Bindung von benachbarten Aminosäuren hervorgerufen (29). Dieses Ergebnis muss durch Wiederholung bestätigt werden, um die zu hohen Werte bei Zugabe niedriger AI-2 Konzentrationen als Ausreißer zu identifizieren. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass YdgG an der Kontrolle des AI-2 Exports beteiligt ist (81). Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass beide Proteine am Transport von AI-2 beteiligt sind. Im Vergleich zu YdgG hat YhhQ jedoch nur sechs Transmembrandomänen und kann somit nicht in die AI-2E Superfamilie eingeordnet werden, da ein Kriterium für die Zuordnung die charakteristische Anordnung von acht Transmembrandomänen ist (155). Allerdings ist die vorhergesagte Struktur einem Biotintransporter BioY des ECF-Typs aus *Lactococcus lactis* ähnlich (13, 53). Diese Energie-Kopplungs-Faktor Proteine (ECF; *energy coupling factor*) sind strukturell divergente Transporter mit einer ATP-Bindekassette, die am Import von Mikronährstoffen in Prokaryoten beteiligt sind (13, 53). Die Energetisierung erfolgt dabei über ein ECF-Modul mit ähnlicher Funktion wie andere ABC-Transporter, durch dessen Bindung an die S-Komponente ein funktionaler Transporter entsteht. Für den aktiven Transport bindet das Substrat an eine sogenannte S-Komponente – z.B. BioY - , die die Pore für die Translokation bildet. Biotin bindet mit hoher Affinität (K_D von 0,3 nM) an BioY,

allerdings konnte ohne Energetisierungsmodul nach Rekonstitution in Proteoliposomen kein Transport gezeigt werden (13). Im Gegensatz dazu transportierte BioY_{RC} – ein Homolog in *Rhodobacter capsulatus* – nach heterologer Überexpression in *E. coli* ohne Energetisierungsmodul Biotin mit niedriger Affinität und hoher Kapazität (76). Da nur ein Drittel der weit verbreiteten *bioY* Gene an eine Energetisierungseinheit gekoppelt, aber dennoch als Transporter funktional sind (76), besteht die Möglichkeit, dass andere S-Komponenten ähnliche Eigenschaften haben. Für YhhQ könnte dies bedeuten, dass möglicherweise *in vivo* eine Energetisierung die Transportrichtung von AI-2 vorgeben könnte, sodass AI-2 vom Zytoplasma nur nach Außen transportiert wird und ein Rückfluss auf dem selben Weg verhindert wird. Weitere Studien zum Beweis eines aktiven Transportes sind für die weitere Charakterisierung erforderlich.

Es ist vorstellbar, dass Zelllyse – verursacht durch Phagen – Autoinduktoren, die nicht diffundieren, freisetzt und dadurch die Konzentration im Medium erhöht. Im Rahmen einer Bachelorarbeit (L. Pöttinger) wurden die Phagen von *V. harveyi* analysiert. Dabei zeigte sich, dass durch Induktion mit Mitomycin C, das oxidativen Stress in den Zellen verursacht (130), verschiedene Phagen induziert werden konnten. Viren sind global sehr weit verbreitet und in vielen Bakterien erfolgt die Vermehrung lysogener Bakteriophagen (96). Phagen können, wie am Beispiel von *Vibrio cholerae* gezeigt wurde, die Verbreitung von Bakterien verhindern und so den Verlauf von Epidemien beeinflussen (220). Dabei spielen Phagen bei der Weitergabe von genetischem Material in Form von Virulenzgenen und Resistenzen eine wichtige Rolle, aber auch andere Genomfragmente können transferiert werden, wie zum Beispiel in *Clostridium difficile* Teile eines QS-Systems (54, 74).

Für die Aufnahme von AI-2 sind bisher zwei Systeme bekannt und gut charakterisiert, das Lsr- und Rbs-System. Dabei bindet in beiden Systemen AI-2 an periplasmatische Bindeproteine und wird anschließend über einen Transporter in die Zelle importiert. In *E. coli* erfolgt der Transport mit Hilfe des Lsr-Systems und ist sehr gut charakterisiert (146), während in anderen Organismen wie zum Beispiel *Actinobacillus pleuropneumoniae* nicht einmal der AI-2 Rezeptor bekannt ist, obwohl unter anderem die Biofilmbildung durch AI-2 reguliert wird (111). Im Gegensatz dazu ist in *V. harveyi* der Rezeptor LuxP bekannt, dieser bindet AI-2 zur Signalweiterleitung und ist aber nicht am Import beteiligt. Aufgrund des markanten Konzentrationsprofils von AI-2 in *V. harveyi*, wurde mathematisch die Notwendigkeit des AI-2 Imports berechnet und im Rahmen dieser Arbeit generell bestätigt (44). Die entsprechenden Experimente zeigten außerdem, dass internalisiertes AI-2 für die weitere Prozessierung im Gegensatz zu *E. coli* in *V. harveyi* nicht phosphoryliert wird. *V. harveyi* hat zwar kein Lsr-System, besitzt aber das Rbs-System, das ersatzweise AI-2 transportieren könnte. Die Deletion des Bindeproteins RbsB, das AI-2 prinzipiell binden kann, und der Permease RbsC hatte jedoch keinen Effekt

auf die externe AI-2 Konzentration. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass in *V. harveyi* ein anderer Transporter für den Import von AI-2 verantwortlich sein muss.

In bakteriellen Gemeinschaften spielt für die Wahrnehmung des gemeinsamen Signals die An- oder Abwesenheit von Bakterien, die das Lsr-System haben eine große Rolle, da die extrazelluläre AI-2 Konzentration gesteuert wird. Dies könnte das Verhalten anderer benachbarter Bakterien, die AI-2 als Signal verwenden, beeinflussen, wodurch Lsr Einfluss auf AI-2 abhängiges QS hätte (213). Ein Beispiel, das im Rahmen dieser Dissertation in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hübner bearbeitet wurde, ist die durch AI-2 induzierte Weitergabe von Virulenzfaktoren mit Hilfe von Phagen. Im Magendarmtrakt beeinflusst mit Sicherheit ein ausgewogenes Mikrobiom unter anderem die AI-2 Konzentration und damit die QS gesteuerte Induktion von Virulenzfaktoren.

Die Konzentration und Wahrnehmung von AI-2 spielt demnach eine große Rolle und kann durch die Aufnahme von AI-2 beeinflusst werden.

3.4 Die Rolle von Laktonasen in *V. harveyi*

Verschiedene Bakterien passen die AHL-Konzentration im Wachstumsverlauf an, indem sie die Synthese steuern oder das Signal wieder abbauen, wie zum Beispiel *Pseudomonas putida* (55). In *V. harveyi* steigt die Konzentration von HAI-1 erst in der spät exponentiellen Wachstumsphase an und erreicht in der stationären Phase ein konstantes Niveau. Das Transkriptlevel der HAI-1 Synthese von *V. harveyi* stimmte nicht mit dem Konzentrationsverlauf des Als überein. Zunächst wurde in Kooperation mit der AG Streit (Universität Hamburg) nach Homologen zu bekannten Enzymen, die AHLs abbauen, gesucht (37, 169). Entgegen der Hypothese, dass zumindest eine der identifizierten potentiellen Laktonasen HAI-1 abbaut und somit den Verlauf der Konzentration beeinflusst, konnte diese Aktivität nicht detektiert werden.

Neben abbauenden Enzymen sind auch modifizierende Enzyme bekannt. Durch Modifikation kann die Wahrnehmung beeinflusst werden. Dazu benutzt *Rhodococcus erythropolis* eine AHL-Oxidoreduktase und *Bacillus megaterium* eine P450-Monooxygenase, die langkettige AHLs oxidiert (32, 198). Neben der enzymatischen Degradation können auch Umweltbedingungen wie pH und Temperatur maßgeblich zum Abbau von HAI-1 beitragen. Für kurzkettige AHLs wie HAI-1 wurde gezeigt, dass bei einem Temperaturanstieg von 22°C auf 37°C die Moleküle drei Mal schneller degradieren (218) und dass ein anderes kurzkettiges AHL bei pH 7,8 eine Halbwertszeit von sieben Stunden hat, während eine Erhöhung des pHs auf 8,5 in einer Halbwertszeit von nur noch 30 Minuten resultiert (19). Der pH-Wert einer in AB-Medium wachsenden Wildtypkultur überschreitet 7,0 nicht, weshalb die Halbwertszeit zumindest nicht geringer als 7 h sein

sollte. Die beobachtete Situation, dass allein die ansteigende Zelldichte eine Reduktion der exogen zugegebenen HAI-1 Konzentration bewirkte (Abbildung 24), kann weder auf eine enzymatische Aktivität noch auf Instabilität, hervorgerufen durch die Inkubationsbedingungen, zurückgeführt werden. Wahrscheinlicher ist, dass durch das Abzentrifugieren der Zellen auch anteilig HAI-1 dem Überstand entnommen wurde. Dieser Effekt wurde bei der Inkubation von HAI-1 mit Zytosol aus verschiedenen Wachstumsphasen nicht beobachtet und die HAI-1 Konzentration verringerte sich nicht (Abbildung 25). Deshalb sollten andere Regulationsmöglichkeiten wie zum Beispiel Translationsregulation, Enzymaktivität und posttranslationale Modifikation in Betracht gezogen werden, um den charakteristischen Konzentrationsverlauf von HAI-1, mit nicht detektierbaren Konzentrationen bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase und einem konstanten Niveau in der stationären Phase, aufrecht zu erhalten.

Die Proteine, die an der Einstellung der HAI-1 Konzentration im Wachstumsverlauf beteiligt sein sollten, zeigten nicht die erwartete Abbauaktivität. Es konnten drei der fünf Enzyme dennoch einer Funktion zugeordnet werden: VIBHAR_06370 hat β -Laktamaseaktivität und ist für die natürliche Resistenz von *V. harveyi* gegen Ampicillin verantwortlich, während VIBHAR_03213 und VIBHAR_02708 Glyoxalase II Aktivität haben und am Abbau des toxischen Methylglyoxal beteiligt sind.

3.5 Die Rolle von GloB und GloC in der Detoxifikation von Methylglyoxal

In einem Nebenprojekt wurden GloB und GloC in Bezug auf ihren Einfluss auf die Detoxifikation von MG untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass GloC direkt an der Detoxifikation von MG beteiligt ist, und dass sich die enzymatischen Eigenschaften der beiden Typ II Glyoxalasen unterscheiden.

Die phylogenetische Verteilung der MG entgiftenden Enzyme mit ausgewählten Eukaryoten und Bakterien, für die in der Literatur Daten zu der Detoxifikation von MG vorhanden sind, zeigte, dass ein kompletter MG Abbauweg verbreitet ist, der sowohl aus einer Glyoxalase I GloA als auch einem Glyoxalase II Enzym besteht (Abbildung 34).

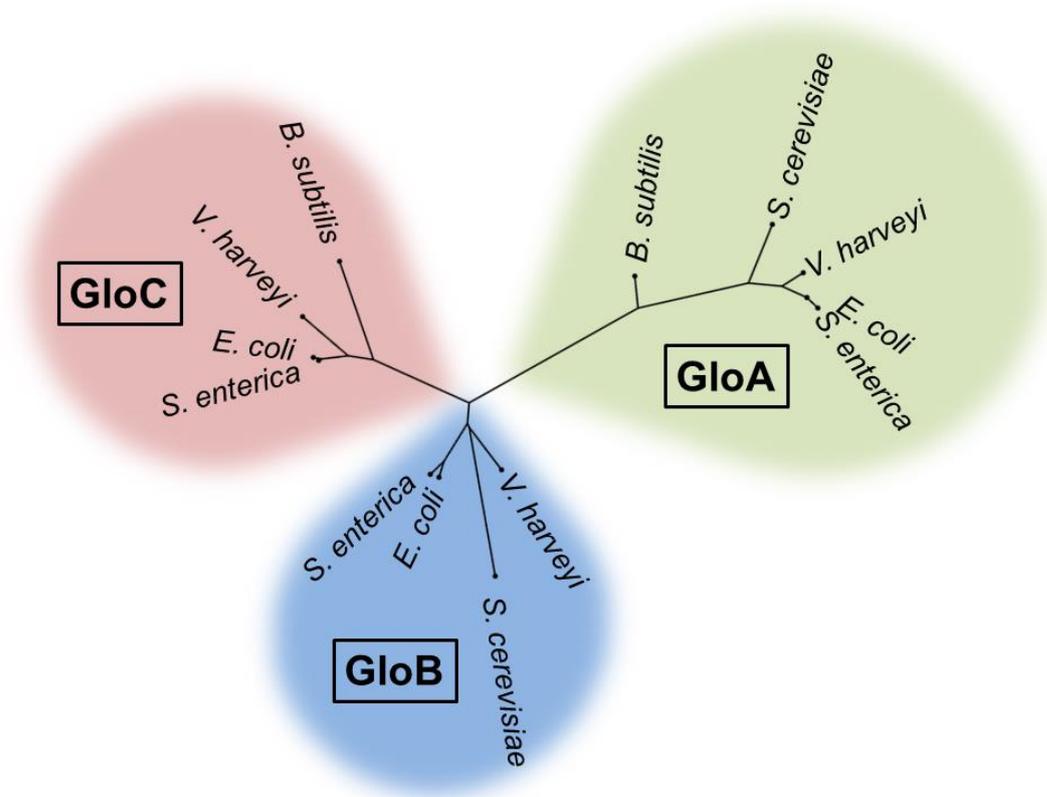


Abbildung 34: Phylogenetische Verteilung von Typ I und II Glyoxalasen.

Ein ClustalX Alignment von Glyoxalase I und II Proteinsequenzen von *E. coli*, *S. enterica*, *V. campbellii*, *B. subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* wurde verwendet, um einen nicht gewurzelten Stammbaum zu erstellen. Verschiedene Äste von GloA, GloB und GloC sind in grün, blau und rot markiert.

Bestimmte Organismen besitzen beide Glyoxalase II Proteine, andere Organismen hingegen kodieren entweder GloB oder GloC. *Saccharomyces cerevisiae* beispielsweise nutzt ein GloB Homolog, es fehlt aber ein Ortholog zu GloC. Umgekehrt kodiert *B. subtilis* ausschließlich ein mutmaßliches GloC Homolog (YqgX). Allerdings zeigte eine sehr aktuelle Studie mit einem *in vivo* Nachweis, dass es sich bei dem Protein YurT um eine ungewöhnliche Typ II Glyoxalase handelt, da die kanonischen Zn²⁺ Bindestellen nicht

vorhanden sind (27, 86). Dies scheint plausibel, da Mitgliedern der niedrig-GC Gram-positiven Firmicutes GSH fehlt. Stattdessen hängt die Entgiftung von MG von dem Reduktionsmittel Bacillithiol ab, was die Frage aufwirft, ob YqgX eine neuartige Substratspezifität für S-Laktoyl-bacillithiol entwickelt hat, das das Produkt der *B. subtilis* YwbC vermittelten Glyoxalase I Reaktion ist.

Im Gegensatz zu *B. subtilis* und *S. cerevisiae* verwenden γ -Proteobakterien wie *E. coli*, *S. enterica* oder *V. harveyi* experimentell sichergestellt zwei Arten von Glyoxalase II Enzymen. Man könnte spekulieren, dass diese Bakterien als Folge von Bakterien-Wirt-Wechselwirkung unterschiedlichen extrazellulären MG Konzentrationen ausgesetzt sind. In dieser Hinsicht ist es bemerkenswert, dass *S. enterica*, wenn es von Makrophagen aufgenommen wurde, erhöhte Expression von *gloA* und *kefB* zeigt (52). Unter Berücksichtigung der unabhängigen Transkriptionsregulation von *gloA*, *gloB* (140) und *gloC* könnten sich die Proteinverhältnisse von Glyoxalase I zu Glyoxalase II stochastisch zu Gunsten von GloA verschieben, was wiederum zu erhöhten SLG-Konzentrationen in einzelnen Zellen führen würde (139). Die Identifizierung von GloC als direkt an der MG Entgiftung beteiligtes Enzym fügt nun eine weitere Möglichkeit zur Regulation der vorgeschlagenen Heterogenität des zytoplasmatischen SLG-Pools hinzu, wodurch eine zusätzliche Feinabstimmung ermöglicht wird.

Diese Heterogenität könnte auch für *E. coli* vorteilhaft sein, da die MG Konzentrationen im menschlichen Darm in Folge des Konsums von MG-haltigen Nahrungsmitteln und Getränken schwanken (71, 119). Letztlich ist vorstellbar, dass eine bezüglich des SLG-Pools heterogene *V. harveyi* Population einen ähnlichen Vorteil in der Besiedelung der verschiedenen marinen Lebensräume hätte (138), wenn die Verhältnisse von Glyoxalase I zu Glyoxalase II durch Veränderung der Proteinlevel von GloA, GloB und GloC angepasst werden würden. Mit Hilfe von Promotor-Reporterfusionen könnte eine heterogene Induktion von GloA, GloB und GloC auf Einzelzellniveau gezeigt werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 aufgelistet. Zusätzlich verwendete, oder von den beschriebenen abweichende Geräte sind im Text gesondert aufgeführt.

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Typ	Firma
Falkon-Kühlzentrifuge	Zentrifuge 5804R, Rotor A-4-44	Eppendorf (Hamburg)
Flüssigkeitschromatographie	ÄKTA purifier	GE Healthcare (Braunschweig)
Geldokumentationsanlage	GelDoc™ EZ Imager	Bio-Rad (München)
Kühltischzentrifuge	Zentrifuge 5415R, Rotor F45-24-11	Eppendorf (Hamburg)
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite M200pro / F500pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)
NanoDrop	Spektrometer ND-1000, UV-vis	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf (Hamburg)
qRT-PCR-Maschine	iQ5	Bio-Rad (München)
Spektrofluorometer	Fluoromax-3	Horiba Scientific (Edison, New Jersey, USA)
Thermocycler	Mastercycler Nexus	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge	Sorvall Evolution RC, verschiedene Rotoren	Kendro Laborbedarf (Langenselbold)
Zellaufschlussgerät	French press, 30 ml Zelle	Thermo electron corporation (Waltham, USA)

4.1.2 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bayer (Leverkusen), Bio-Rad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), E. Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad „*pro analysis*“ bezogen. Weitere Bezugspartner werden entsprechend gesondert aufgeführt.

4.1.3 Enzyme

Für die Vervielfältigung von DNA mit der Polymerasekettenreaktion wurden sowohl die Phusion Polymerase von Finnzymes (Espoo, Finnland) und die Q5 Polymerase von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) als auch die OneTaq DNA-Polymerase von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden, ebenso wie die alkalische Phosphatase und die T4-Ligase, von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) bezogen. Zur Gewinnung von möglichst DNA-freier RNA fand DNaseI von Fermentas (St. Leon-Rot) Verwendung.

4.1.4 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten „Kits“ sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Kits

Bezeichnung und Firma	Verwendungszweck
First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	Umschreiben von RNA zu cDNA
HiYield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit (Süd-Laborbedarf, Gauting)	Reinigung von DNA aus Agarosegelen
HiYield Plasmid Mini Kit (Süd-Laborbedarf, Gauting)	Isolierung von Plasmid-DNA
Ultra Clean-Microbial DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories Inc., Californien, USA)	Isolierung von bakterieller genomischer DNA

4.1.5 Antibiotika und Zusätze

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Antibiotika und Medienzusätze verwendet. Abweichungen von diesen Standardbedingungen sind im Text gesondert beschrieben.

Tabelle 4: Antibiotika und Zusätze

Zusatz	Stammkonz.	Endkonz.	Lösungsmittel
Antibiotika			
Ampicillin-Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml	A. dest.
Chloramphenicol	34 mg/ml	10 µg/ml	Ethanol 96% (w/v)
Gentamycinsulfat	50 mg/ml	50 µg/ml	A. dest.
Kanamycinsulfat	100 mg/ml	100 µg/ml	A. dest.
Induktoren und sonstige Zusätze			
IPTG	0,5 M	0,5 mM	A. dest.
L-Arabinose	20% (w/v)	0,2% (w/v)	A. dest.

4. Material und Methoden

Zusatz	Stammkonz.	Endkonz.	Lösungsmittel
2,6-Diaminopimelinsäure (DAP)	60 mM	300 µM	A. dest.
Saccharose	80% (w/v)	10% (w/v)	A. dest.
HAI-1 (Nottingham University, UK)	100 mM	10 µM	Acetonitril 10% (w/v)
DPD ≙ AI-2 (Rita Ventura, Portugal)	11,8 mM	20 µM	A. dest. pH1
Methylglyoxal (MG)	5,55 M	Versch.	A. dest.
Glutathion (GSH)	1 M	Versch.	A. dest.
S-Laktoylglutathion	600 mM	Versch.	A. dest.
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	80 mg/ml	80 µg/ml	Dimethylformamid

4.1.6 Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer sind in Tabelle 5 aufgelistet. Abweichungen von selbigen, und darüber hinaus verwendete Puffer sind im Text gesondert beschrieben.

Tabelle 5: Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Quelle
Arbeit mit Nukleinsäuren		
<u>T</u> ris- <u>A</u> cet- <u>E</u> DTA-Puffer (TAE)	Tris Essigsäure EDTA pH-Wert	40 mM 20 mM 1 mM 8,3 (163)
6x DNA-Ladepuffer	Tris Bromphenolblau Xylencylanol Glycerol EDTA	10 mM 0,03% (w/v) 0,03% (w/v) 60% (v/v) 60 mM (163)
Transformationspuffer	Kaliumchlorid Manganchlorid Calciumchlorid Pipes pH-Wert	250 mM 55 mM 15 mM 10 mM 6,7 (87)
<u>A</u> cet- <u>E</u> DTA-Puffer (AE)	Natriumacetat pH 5,2 EDTA pH 8,0	20 mM 1 mM (163)
Arbeit mit Proteinen		
5x Protein-Ladepuffer	SDS Bromphenolblau Glycerol DTT Tris pH-Wert	10% (w/v) 0,05% (w/v) 50% (w/v) 0,5 M 0,313 M 6,8 (107)
10x <u>T</u> ris- <u>G</u> lycin- <u>S</u> DS-Puffer (TG)	Tris Glycin SDS	0,1 M 0,8 M 0,25% (w/v) (107)
Trenngelpuffer	Tris SDS pH-Wert	1,5 M 0,4% (w/v) 8,8 (107)
Sammelgelpuffer	Tris SDS pH-Wert	0,5 M 0,4% (w/v) 6,8 (107)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Quelle
Protein-Aufschlusspuffer Standard	KPi pH 8,0 Natriumchlorid PMSF β -Mercaptoethanol DNase	50 mM 300 mM 0,5 mM 2 mM Spatelspitze (163)
Wasch- / Elutionspuffer Standard	KPi pH 8,0 Natriumchlorid β -Mercaptoethanol Glycerol Imidazol pH 8,0	100 mM 300 mM 2 mM 10% (v/v) 10 mM / 200 mM (163)
FRET-Reaktionspuffer	NaPi pH 8,0 Natriumchlorid Borsäure	25 mM 35 mM 1 mM (151)
Glo-Reaktionspuffer	NaPi pH 7,5 Natriumchlorid	40 mM 240 mM
PufferA	Tris/HCl pH 7,5 Natriumchlorid	10 mM 150 mM (163)
Färbe-Substratlösung	Natriumcarbonat-Puffer pH 9,5 Nitro-Blue-Tetrazolium 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (BCIP)	50 mM 0,01% (w/v) 0,045% (w/v) (163)

4.1.7 Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Quelle
Lysogeny Broth (LB) (Luria/Miller)	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid pH-Wert	1% (w/v) 0,5% (w/v) 1% (w/v) 7,0 (14)
Lysogeny marine Broth (LM)	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid	1% (w/v) 0,5% (w/v) 2% (w/v) (3)
AB	Natriumchlorid Magnesiumsulfat Casein Nach Sterilisation: Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 L-Arginin Glycerol	1,75% (w/v) 1,23% (w/v) 0,2% (w/v) 10 mM 1 mM 1% (v/v) (70)
K _{0,2}	Natriumhydrogenphosphat Natriumdihydrogenphosphat Magnesiumsulfat Mono-Natrium-Citrat Ammoniumsulfat Kaliumchlorid Nach Autoklavieren Zugabe: Eisensulfat C-Quelle (Glukose/Glycerol)	46 mM 23 mM 0,4 mM 1 mM 8 mM 0,2 mM 6 μ M 0,2% (w/v) (51)
Autoinduktionsmedium (ZYM-5052)	Trypton Hefeextrakt Glycerol Glukose Magnesiumsulfat Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat	2% (w/v) 1% (w/v) 0,5% (w/v) 0,05% (w/v) 2 mM 25 mM 25 mM (179)

4. Material und Methoden

	Ammoniumchlorid Natriumsulfat Spurenelemente Arabinose	50 mM 5 mM 0,2% (w/v)	
--	---	-----------------------------	--

4.1.8 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' - 3')
A) Sequenzierprimer	
M13_uni -21	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13_reverse -29	AAC AGC TAT GAC CAT G
Tn7-chk-rev	GCC ACT CAT CGC AGT ACT GTT G
Tn7-chk-Fw	CAC CGA TCT TCT ACA CCG TTC C
T7 promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7 terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
lacZ 220 bp anti	AGC TTT CCG GCA CCG CTT CTG
B) Konstruktion Reporterplasmid	
IsrKeco_EcoRI_s	CAG AAT TCC TAT AAC CCA GGC GCT TTC CAT AAC
IsrReco_EcoRI_S	ATG AAT TCT TAA CTA CGT AAA ATC GCC GCT GCT G
Plsreco_EcoRI_s	ATG AAT TCA ATT CAT TCT TCA CTT TGA ACA TAT T
Plsr-50eco_EcoRI_s	TTG AAT TCT TCT TGC TCA TTT ATA TCT GTG ATG G
Plsreco_NcoI_as	GTC CAT GGA TTT CCC CCG TTC AGT TTT GCA GGT
Plsreco_PspOMI_as	GTG GGC CCA TTT CCC CCG TTC AGT TTT GCA GGT
IsrKeco_seq_as	TAA AGC CGA AGC AAT TGC CGC T
C) Klonierung von Genen zur (Über-)Expression	
GloAeco_KpnI_s	GCG GTA CCG CCA TTT TGA GGA TAA AAA GAT GCG TC
GloAeco_6His_XbaI_as	GCT CTA GAT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG TTG CCC AGA CCG CGA CC
GloBeco_KpnI_s	GCG GTA CCT TCA CAC TGA GAG GTA ATC TAT GAA TC
GloBeco_6His_XbaI_as	GCT CTA GAT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG AAC CTA TCT TTC TTT GAC CTT AAC C
YcbLeco_KpnI_s	GCG GTA CCC TTA ACG AAA CAG GGG CAG TAT GAA
YcbLeco_6His_XbaI_as	GCT CTA GAT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGC CAG ACG GGC ATT TCG TCT TG
06370_XbaI_6HisC_as	CCC TCT AGA CTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG AGC TCC AAT AGT ATT GTA CTC ATC CAG TAT TAA CTG
06370_HindIII_RBS_neu_s	GCA AGC TTG AAG GAG ATA TAC ATA TGA AAA AGC TAT TTC TAC TAC TTG GAC TG
ydgG_KpnI_s2	GGG GTA CCG GCA AAG CCG ATC ATC ACG CT
ydgG_6His_Sall_as	ACG CGT CGA CTT AGT GGT GAT GGT GAT GAT GCC CGC TAC CCT CTT TAT TGA GAT CGC TTA ACA GAA CG
yhhQ_KpnI_s2	GGG GTA CCG AAC GTT TTC TCG CAA ACT CAA CGC
yhhQ_6His_Sall_as	ACG CGT CGA CTT AGT GGT GAT GGT GAT GAT GCC CGC TAC C ACT CGC CTG CAA AGC GTT GAT TTC

Name	Sequenz (5' - 3')
00342_NheI_s	GGG <u>CTA GCA</u> TGA GTA ACT TTA CCC CTG CGC AG
00342_EcoRI_as	CAG <u>AAT TCT</u> TAA GAC TGA ACG CTT GTG GTC ACC
06370_HindIII_6HisC_as	CCC <u>AAG CTT</u> CTA <u>GTG ATG</u> GTG ATG GTG ATG AGC TCC AAT AGT ATT GTA CTC ATC CAG TAT TAA CTG
06370_BamHI_RBS_s	GCG GAT <u>CCA AGG</u> AGA TAT ACA TAT GAA AAA GCT ATT TCT ACT ACT TGG ACT G
D) Stammkonstruktion und Testprimer	
upstream_02708_BamHI_sense	AGC TAC <u>GGA TCC</u> AAG AAC TAA AGC GTC TTG
upstream_02708_EcoRI_KpnI_antise nse	GTT TTG <u>GAA TTC</u> <u>GGT ACC</u> TAC TGG AAC AAC TTG GTA
downstream_02708_EcoRI_NdeI_sen se	ACG AGC <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> CAT TCG TTG CTG ACG
downstream_02708_NheI_antisense	TCC CAC <u>GCT AGC</u> CAA CAC CTC TTT AAA GGC
VIBHAR_02708_chk_s	GCT ACG TCG ATG AAG AAC TAA AG
VIBHAR_02708_chk_as	GTG GAA ACA AGC CAT GTT ATC AG
upstream_03213_BamHI_s	CAA ATT <u>GGA TCC</u> GCG CCA AGG TAA TAA ACT TGC TAA GC
upstream_03213_9overlap_as	<u>GCG GTA GAG</u> CAT TAA ATG CGG GTA TGC TTT TGA TCT C
downstream_03213_9overlap_s	<u>CAT TTA ATG</u> CTC TAC GCG AGT GGA AGA ACG AAT
downstream_03213_NheI_as	TGT ATG <u>GCT AGC</u> CGA CGC CAT ACA TCT TCT TGT TCC
VIBHAR_03213_chk_s	CAA TCT TTG ATG CGG TTG GCA GTG
VIBHAR_03213_chk_as	GTA AGC CAC TTT CTT GTT GTC TGG GA
upstream_06736_BamHI_s	TTA ACA <u>GGA TCC</u> CTG AAA GGG ATT TGG TGT GCA TGG T
upstream_06736_9overlap_as	<u>ATC GTT CTT</u> TTT GTC TGG GTA CTC GGC AAG ATA C
downstream_06736_9overlap_s	<u>CCA GAC AAA</u> A AGA ACG ATA AAC AGG AGA AGG GCA G
downstream_06736_NheI_as	AAT GAT <u>GCT AGC</u> GAA CGC CGA AGC AAT TTG CTT ACC
VIBHAR_06736_chk_s	CGA TTT GCG GGA AGC GCA CTA
VIBHAR_06736_chk_as	CTC TCT TTA TCA CTC ATC GCT AGG AT
upstream_06370_BamHI_s	GTC TGG <u>GGA TCC</u> TCT CTA ATA AGA TCA GTA TCA CAC AGG TTG
upstream_06370_9overlap_as	<u>CAC TTG AGC</u> CAG TCC AAG TAG TAG AAA TAG CTT TTT CAT
downstream_06370_9overlap_s	<u>CTT GGA CTG</u> GC TCA AGT GAG CCA GTT AAT ACT G
downstream_06370_NheI_as	GTA AGC <u>GCT AGC</u> GTT GCG GAA GAT GCC TTA ACG TTG
VIBHAR_06370_chk_s	CGA TCG CAC AAT TGG TTA GTG AGG
VIBHAR_06370_chk_as	GCC GGG CGG AAA ACT AGA TAA TG
upstream_06900_BamHI_s	AAA GCG <u>GGA TCC</u> ACT CAG CCA GTT AAG GGC GCT T
upstream_06900_9overlap_as	<u>CCC AAG ATG</u> GAG CCA AGT ACG TGT TTT TAA GTG TCG
downstream_06900_9overlap_s	<u>ACT TGG CTC</u> CAT CTT GGG TTG TTA AAG GGC AGC
downstream_06900_NheI_as	GTC GGT <u>GCT AGC</u> CTT CTT AAC CTT CCA TTC ACC TTC GC
VIBHAR_06900_chk_s	TTG GTC GGG GTG ATG TTC GTT ATC
VIBHAR_06900_chk_as	GTT AGA TAA GCT CAG CTC TGC TGC

4. Material und Methoden

Name	Sequenz (5' - 3')
upstream_luxS_SpeI_s	ACC AAA <u>ACT AGT</u> CAT TCT TGG CTT TAT TCC ATG GGG G
upstream_luxS_9overlap_as	<u>GAC TCT GGC</u> GT GTG GTC TAC GGT AAA GCT GT
downstream_luxS_9overlap_s	<u>AGA CCA CAC</u> GCC AGA GTC AAT GCT GAG AGA G
downstream_luxS_NheI_as	CAA CGC <u>GCT AGC</u> CAG CGT ATC GGC TTA ATT GTC GAT G
luxS_chk_s	AGT AGC TTT CGC CAC GAC GCT
luxS_chk_as	CAC CTC TGA ACG TGC AAA TGT TGA AG
upstream_cqsA_BamHI_s	TTC ACA <u>GGA TCC</u> CAG AGA TCC TTC TTC ATG AAC TTC GC
upstream_cqsA_9overlap_as	<u>GTT ATA CGC</u> GCA TAA GTT TGC GTG CGC CTG
downstream_cqsA_9overlap_s	<u>AAC TTA TGC</u> GCG TAT AAC CAC CCA GAA CTA GAA T
downstream_cqsA_NheI_as	AAC CGC <u>GCT AGC</u> CAA CAA ACA AGC GAA CCA TTA TGG TG
cqsA_chk_s	CTT CGT GCT GGC GGT CGT GT
cqsA_chk_as	GCT AAT TAT GTT GTT CCA TCG ATG CC
upstream_luxM_BamHI_s	GCG ATT <u>GGA TCC</u> GCC TAG TAG CCA TTT TCT TTG CTC AG
upstream_luxM_9overlap_as	<u>ACG AAA GTC</u> AGC CGA CAG CGA GCC TAA TGA
downstream_luxM_9overlap_s	<u>CTG TCG GCT</u> GA CTT TCG TGG TTA TAA ACG TGC TG
downstream_luxM_NheI_as	CGA TAA <u>GCT AGC</u> AAG AGG TAT GAG GGC CAA ACT CG
luxM_chk_s	GCA TCA TTT GTT CTA CCG CTT GGT G
luxM_chk_as	GCG ATC ATG TAG TTG GTC TTG GCT
upstream_luxO_BamHI_s	GTG GAT <u>CCG</u> CTG GAG AAG GAG ATC AGT CGT TT
upstream_luxO_9overlap_as	<u>ATT CCA AGC</u> AGA CTT TTG ACC TTC TGT TAT TTG TTG C
downstream_luxO_9overlap_s	<u>CAA AAG TCT</u> GCT TGG AAT AGC AAG GAC GAA AAA C
downstream_luxO_NheI_as	<u>GTG CTA GCG</u> CAT TGA GAA AGC GGC TTC GAT TC
VIBHAR_luxO_chk_s	GCG TCA GCG TAA TAC TAA GCA AGT G
VIBHAR_luxO_chk_as	CGC GCT AGG CGA TTA GAA TGC
upstream_rbSBe_SpeI_s	ACA CTC <u>ACT AGT</u> GTC GCT ACG TTT ACG CAC TTG GT
upstream_rbSBe_9overlap_as	<u>AGG AAT GTA</u> AG CAG CAG AGA TAA GAG TTG CG
downstream_rbSBe_9overlap_s	<u>TCT GCT GCT</u> TA CAT TCC TGT TCC GCT TAA AGT CG
downstream_rbSBe_BamHI_as	GCC TGT <u>GGA TCC</u> GTT TGG CTG CAT CTT TAC ACC AGT G
rbSBe_chk_s	TGG TTC GGT ACA GGT TAC GCT CTT
rbSBe_chk_as	GCT CAA TCG CTT CTG CGG TAA G
upstream_rbsC_SpeI_s	GAT GGC <u>ACT AGT</u> CTG GGG TTA TCC GTG AAG GAA AAC A
upstream_rbsC_9overlap_as	<u>CAG TAC CGC</u> GC CCG TTT CGT TTG GTT TGC TCA
downstream_rbsC_9overlap_s	<u>GAA ACG GGC</u> GCG GTA CTG GTA GAC AAC AAA AAC AAG
downstream_rbsC_BamHI_as	CAA CTA <u>GGA TCC</u> CAG AAG CGA TGT GGC TCA CTA CTT
rbsC_chk_s	GTG GCG TCA TCA ACT TAG ACA ACA AG
rbsC_chk_as	GTT GGA TAA CTT TCG CTT TCT CGC C
upstream_ydgGeco_BamHI_s	GTG GAT <u>CCA</u> CTG ACG CTC GCC CAT TTC ATT G

Name	Sequenz (5' - 3')
upstream_ydgGeco_9over_as	<u>GGC GAT GCT</u> GCC ATT GAG CGT GAT GAT CGG
downstream_ydgGeco_9over_s	<u>CTC AAT GGC</u> AGC ATC GCC GTT CTG TTA AGC GA
downstream_ydgGeco_NheI_as	<u>GTG CTA GCA</u> TCA TTA CTC CGG GGT ACG GCA T
ydgGeco_updown_chk_s	GCG CAT AAG CTA CGC CTA AGG
ydgGeco_updown_chk_as	GCG ATG ATC AGG AAG TGG GTG A
delta_ydgG_chk2_fw	CAA TTA TCC GCA GTG TTG CTT CTC GTC AT
delta_ydgG_chk2_rev	TAT GCC TGT GCT GGA AGT GTG GAA AG
upstream_yhhQeco_BamHI_s	<u>GTG GAT CCC</u> CTA TCA ACC GCC TTT ACG AAT CA
upstream_yhhQeco_9over_as	<u>GAT TTC GGA</u> ATA GCG TTG AGT TTG CGA GAA AAC G
downstream_yhhQeco_9over_s	<u>CAA CGC TAT</u> TCC GAA ATC AAC GCT TTG CAG GC
downstream_yhhQeco_NheI_as	<u>GTG CTA GCT</u> CTA ACT GCT GCA TTT TGT GAC CTT TC
yhhQeco_updown_chk_s	GCA AAC CGA TCG CAA CAT TGA GC
yhhQeco_updown_chk_as	GCA GTT GAT TAC CCA CGT TAC CCA
yhhQ_cat_s	GTT AAT CAA AAA GGT ACA ATA TGA ACG TTT TCT CGC AAA CTC AAC GCT ATA <u>TGG GAA TTA GCC ATG</u> <u>GTC C</u>
yhhQ_cat_as	ACA ACT CTG ATA ACG AAC CTT TAA CTC GCC TGC AAA GCG TTG ATT TCG GAG TGT AGG CTG GAG CTG <u>CTT C</u>
upstream_00342_BamHI_s	<u>GTG GAT CCG</u> CTT TGA CCT TGA TAG CTT TCC TGC
upstream_00342_9over_as	<u>GGT CAC CTT</u> GCG TTG CTG CGC AGG GGT AAA GTT
downstream_00342_9over_s	<u>CAG CAA CGC</u> AAG GTG ACC ACA AGC GTT CAG TCT T
downstream_00342_NheI_s	<u>GTG CTA GCG</u> ATT GAG TGT CTA GTG ACT TAC TTC TTG
00342_updown_chk_s	GCT GGA GAA GTA TGC CGA TCC ATT
00342_updown_chk_as	GCC GAC CAT GCT TGC CAT TCT TC
upstream_03311_BamHI_f	<u>GTG GAT CCT</u> CAA TCT CTT CAG CAA AGG TAG GTA CGG TGA AG
upstream_03311_9over_r	<u>ATG TTT GGA</u> GCG TCA TAA AAC CTT AAA GGG GCA GTG GA
downstream_03311_9over_f	<u>TTA TGA CGC</u> TCC AAA CAT AGG AAC CTC ATA ATT ATA TTG AGC GAT GGT AAG GAG
downstream_03311_NheI_r	<u>GTG CTA GCA</u> TAC ACG GCT AAG AGA AGG GGG CC
03311_updown_chk_r	GGG ATT GCT GAT ACT TAT TGA CTC GAT ACT CTA CTT TCA TAC AC
03311_updown_chk_f	CCC AGT GTT TTG TTT AAG CCT TGG ATC AGC
upstream_03312_BamHI_f	<u>GTG GAT CCA</u> ACT GAG GTT GAT GTC GCT CTC CCA C
upstream_03312_9over_r	<u>TTA AGC TTG</u> CGT TGT CAT GTT AAG AGT CCT TTA ATA TTT ATG CTT ATC TAG CAC G
downstream_03312_9over_f	<u>ATG ACA ACG</u> CAA GCT TAA AAC CAA CTC ATT CGA ACA TTT ACT AAA A
downstream_03312_3_Sall_r	<u>GTG TCG ACT</u> CCA CTT CAC TTT TGT ACC TGA GAA GTA AGG GTC
03312_updown_chk_f	GGG GTG TTG CCA CAA TGT CAT TCC ATT AAC
03312_2_updown_chk_r	GCA TCT TCA CGT GCG CCT TCA ACG
E) Stammkonstruktion mit pRED/ET	
GloAeco_s	GCG TAA AGC CGC CGC TAT ACT AAA
GloAeco_as	GAC AAA TAT TAC TTG TCG ATG CAG

4. Material und Methoden

Name	Sequenz (5' - 3')
GloBeco_s	TCA GGA GCC ACG ACA GTT TGA
GloBeco_as	CAT GTG TGT GTC AAT AGT TGC TTA
YcbLeco_s	GCA TAT TGA TAC CGG GCC AGC A
YcbLeco_as	GCA TAA ACA AAG CGC ACT TTG CCA
F) qRT-PCR Primer	
recA_166_s	GCT TTG GGT GCT GGT GGT CTA
recA_267_as	CGC AGC AGC AAT AAG CTC AAG
rpoD_147_s	CGA CAT GGG TAT CAA GGT AGT AGA AAC
rpoD_264_as	GCT AGA AAG TGC TGC TGC TGC
cqsA_219_s	GCA CTT GGT ATT AGG GAA GCG AC
cqsA_314_as	GCC TGT TGA ATT TGT AGA TTG TGG GAC
luxA_n259_s	GCA GAA GAC GTA AAC CTA CTG GAT C
luxA_n372_as	GCT GTT ATC CAT GTC TGT ACC AAA GAC
vscP_120_s	GCA AGC AGA AAG CGA ACA TGA GTC
vscP_236_as	GCC TCA GGA ATA GCA CTG CTG
vopN_122_s	GCG TAC ACA ATG CAA CTC AGT CGT
vopN_248_as	GCT TCA TTC ACG CGA ATA CTG CC
vhpA_261_s	GCA AAG CTT TAA GGG TGG TGC ATT A
vhpA_377_as	GCG ACT TTT AAT GCA TCT GCA CGG
luxR_118_s	GCG GAT ATT GCA GAG ATC GCT CA
luxR_266_as	GCG TGG ATG TCT AAG TCG ATG TTA TC
ycbLeco_137_s	GCC TGA CAC TGA TGC AGA TCC T
ycbLeco_259_as	GCC AGA ACT CAT CTT CTT TTT CCG
ycbLeco_RT_rev	GCT GGC ACT CTT CCA GAC CAA A
gloAeco2_74_s	GCA TGA AAC TGC TGC GTA CCA G
gloAeco2_187_as	CGC CCC AGT TGT AGG TCA GTT
gloAeco2_RT_rev	CGT TAC CCC CGT TTT GAC GGA T
gloBeco2_132_s	GCA ACC GGA GGC CAT ATT TCT C
gloBeco2_276_as	GCC ATC TTT GAC TAC CTG TGT TGT T
gloBeco2_RT_rev	CCG ACC ACA CCC ACC AGA AAA
recAeco2_274_s	GCG TTT ATC GAT GCT GAA CAC G
recAeco2_395_as	GCG TCA CAG ATT TCC AGT GCC T
recAeco2_RT_rev	GCC TTC GAT TTC CGC TTT CGG

4.1.9 Plasmide und Stämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 8, die Plasmide in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Genotyp/Konstruktion	Referenz
A) <i>E. coli</i> Stämme			
DH5α <i>λpir</i>	-----	$\Delta(\text{argF-lac})169 \phi 80d\text{lacZ}58(\text{M15})$ <i>glnV44(AS) relA1 gyrA96(NalR), recA1</i> <i>endA1 thiE1 hsdR17 λpir</i>	(117)
MBS-01	Cam ^R [Amp ^R]	MG1655 <i>luxS::cam</i> [pQE30_cpy]	(186)
WM3064	DAPaux	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZΔM15 RP4-</i> <i>1360 Δ(araBAD)567 ΔdapA1341::[erm pir</i> <i>(wt)]</i>	W. Metcalf, Univ. of Illinois, Urbana
BW25113	-----	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ}4787(::\text{rrnB-3}),$ λ^- , <i>rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	(8)
JW1643	Kan ^R	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ}4787(::\text{rrnB-3}),$ λ^- , <i>rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514,</i> <i>ΔgloA729::kan</i>	(8)
JW0202	Kan ^R	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ}4787(::\text{rrnB-3}),$ λ^- , <i>rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514,</i> <i>ΔgloB731::kan</i>	(8)
JW0910	Kan ^R	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ}4787(::\text{rrnB-3}),$ λ^- , <i>rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514,</i> <i>ΔycbL744::kan</i>	(8)
ΔgloA	-----	JW1643; $\Delta\text{gloA}729$ (Kan ^R mit flp- Rekombinase entfernt)	diese Arbeit
ΔgloB	-----	JW0202; $\Delta\text{gloB}731$ (Kan ^R mit flp- Rekombinase entfernt)	diese Arbeit
ΔgloC	-----	JW0910; $\Delta\text{ycbL}744$ (Kan ^R mit flp- Rekombinase entfernt)	diese Arbeit
ΔgloAB	-----	$\Delta\text{gloA}; \Delta\text{gloB}731$ (pRED®/ET® Gegenselektion und Kan ^R mit flp- Rekombinase entfernt)	diese Arbeit
ΔgloAC	-----	$\Delta\text{gloA}; \Delta\text{ycbL}744$ (pRED®/ET® Gegenselektion und Kan ^R mit flp- Rekombinase entfernt)	diese Arbeit
ΔgloBC	-----	$\Delta\text{gloB}; \Delta\text{ycbL}744$ (pRED®/ET® Gegenselektion und Kan ^R mit flp- Rekombinase entfernt)	diese Arbeit
ΔgloABC	-----	$\Delta\text{gloAB}; \Delta\text{ycbL}744$ (pRED®/ET® Gegenselektion und Kan ^R mit flp- Rekombinase entfernt)	diese Arbeit
JW1593	Kan ^R	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ}4787(::\text{rrnB-3}),$ λ^- , <i>rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514,</i> <i>ΔtqsA749::kan</i>	(8)
ΔydgG	-----	JW1643; $\Delta\text{tqsA}749$ (Kan ^R mit flp- Rekombinase entfernt)	diese Arbeit
ΔyhhQ	-----	BW25113 ΔyhhQ	diese Arbeit
$\Delta\text{ydgG}\Delta\text{yhhQ}$	-----	$\Delta\text{ydgG} \Delta\text{yhhQ}$	diese Arbeit

4. Material und Methoden

Stamm	Beschreibung	Genotyp/Konstruktion	Referenz
B) <i>Vibrio harveyi</i> Stämme			
BB120	Amp ^R	Wildtyp	(10)
$\Delta luxO$	Amp ^R	BB120 $\Delta luxO$	diese Arbeit
JMH634	Amp ^R , Cam ^R	$\Delta luxM \Delta luxS cqsA::cam$	(79)
MR001	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_02708$ (<i>gloC</i>)	diese Arbeit
MR002	Amp ^R	BB120 $\Delta luxS \Delta VIBHAR_02708$	diese Arbeit
MR003	Amp ^R	BB120 $\Delta luxS$	diese Arbeit
MR004	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_02708 \Delta VIBHAR_06736$	diese Arbeit
MR005	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_06736$	diese Arbeit
MR006	-----	BB120 $\Delta VIBHAR_06370$	diese Arbeit
MR007	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_03213$ (<i>gloB</i>)	diese Arbeit
MR008	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_02708 \Delta VIBHAR_03213$	diese Arbeit
MR009	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_02708 \Delta VIBHAR_03213 \Delta VIBHAR_06736$	diese Arbeit
MR011	Amp ^R	BB120 $\Delta rbsB$	diese Arbeit
MR012	Amp ^R	BB120 $\Delta rbsC$	diese Arbeit
MR013	Amp ^R	BB120 $\Delta cqsA$	diese Arbeit
MR014	Amp ^R	BB120 $\Delta cqsA \Delta luxS$	diese Arbeit
MR015	Amp ^R	BB120 $\Delta cqsA \Delta luxS \Delta luxM$	diese Arbeit
MR016	Amp ^R	BB120 $\Delta cqsA \Delta luxM$	diese Arbeit
MR017	Amp ^R	BB120 $\Delta luxS \Delta luxM$	diese Arbeit
MR018	Amp ^R	BB120 $\Delta luxM$	diese Arbeit
MR019	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_06900$	diese Arbeit
MR020	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_02708 \Delta VIBHAR_03213 \Delta VIBHAR_06736 \Delta VIBHAR_06900$	diese Arbeit
MR030	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_00342$ (<i>yhhQ</i>)	diese Arbeit
MR101	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_02708 \Delta luxM$	diese Arbeit
MR105	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_06736 \Delta luxM$	diese Arbeit
MR106	-----	BB120 $\Delta VIBHAR_06370 \Delta luxM$	diese Arbeit
MR107	Amp ^R	BB120 $\Delta VIBHAR_03213 \Delta luxM$	diese Arbeit

Stamm	Beschreibung	Genotyp/Konstruktion	Referenz
MR108	Amp ^R	BB120 ΔVIBHAR_03213 ΔVIBHAR_02708 Δ <i>luxM</i>	diese Arbeit
MR119	Amp ^R	BB120 ΔVIBHAR_06900 Δ <i>luxM</i>	diese Arbeit
MR120	Amp ^R	BB120 ΔVIBHAR_02708 ΔVIBHAR_03213 ΔVIBHAR_06736 ΔVIBHAR_06900 Δ <i>luxM</i>	diese Arbeit

Tabelle 9: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Genotyp / Beschreibung	Referenz
A) Leervektoren			
pNPTS138-R6KT	Kan ^R	<i>mobRP4⁺ ori-R6K sacB</i> ; Suizidplasmid für "in-frame" Deletionen	(108)
pBBR1-MCS-2- <i>lacZ</i>	Kan ^R	<i>lacZ</i> in pBBR1-MCS-2 kloniert mit PspOMI und KpnI	(63)
pBAD24	Amp ^R	<i>ori-P15a araC P_{BAD}</i>	(72)
pBAD33	Cam ^R	<i>ori-P15a araC P_{BAD}</i>	(72)
pRED®/ET®	Amp ^R	λ-RED Rekombinase in pBAD24	Gene Bridges
pCP20	Amp ^R , Cam ^R	FLP ⁺ , λ <i>cl857⁺</i> , λ <i>p_R Rep^{ts}</i>	(30)
pQE30	Amp ^R	Expressionsvektor	QIAGEN (Hilden)
B) Plasmide zur Erstellung von Deletionsmutanten			
pNPTS138-R6KT-ΔVIBHAR_02708	Kan ^R	VIBHAR_02708 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-ΔVIBHAR_03213	Kan ^R	VIBHAR_03213 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-ΔVIBHAR_06736	Kan ^R	VIBHAR_06736 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-ΔVIBHAR_06370	Kan ^R	VIBHAR_06370 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-ΔVIBHAR_06900	Kan ^R	VIBHAR_06900 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-Δ <i>luxS</i>	Kan ^R	<i>luxS</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-Δ <i>cqsA</i>	Kan ^R	<i>cqsA</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-Δ <i>luxM</i>	Kan ^R	<i>luxM</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-Δ <i>luxO</i>	Kan ^R	<i>luxO</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-Δ <i>rbsB</i>	Kan ^R	<i>rbsB</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-Δ <i>rbsC</i>	Kan ^R	<i>rbsC</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-Δ <i>ydgGeco</i>	Kan ^R	<i>ydgGeco</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit

4. Material und Methoden

Plasmid	Resistenz	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pNPTS138-R6KT- <i>ΔyhhQeco</i>	Kan ^R	<i>yhhQeco</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>ΔVIBHAR_00342</i>	Kan ^R	VIBHAR_00342 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>ΔVIBHAR_03311</i>	Kan ^R	VIBHAR_03311 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>ΔVIBHAR_03312</i>	Kan ^R	VIBHAR_03312 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
C) Reporterplasmide			
pBBR1-MCS-2- <i>IsrKRP</i> <i>Isr::lacZ</i>	Kan ^R	<i>IsrKRP</i> <i>Isr</i> in die EcoRI und NcoI Schnittstellen von pBBR1-MCS-2- <i>lacZ</i> kloniert	diese Arbeit
pBBR1-MCS-2- <i>IsrRP</i> <i>Isr::lacZ</i>	Kan ^R	<i>IsrRP</i> <i>Isr</i> in die EcoRI und NcoI Schnittstellen von pBBR1-MCS-2- <i>lacZ</i> kloniert	diese Arbeit
pBBR1-MCS-2- <i>IsrP</i> <i>Isr::lacZ</i>	Kan ^R	<i>IsrP</i> <i>Isr</i> in die EcoRI und NcoI Schnittstellen von pBBR1-MCS-2- <i>lacZ</i> kloniert	diese Arbeit
D) Expressionsplasmide zu Proteinproduktion			
pQE30-VIBHAR_02708	Amp ^R	VIBHAR_02708 in pQE30	(169)
pQE30-VIBHAR_03213	Amp ^R	VIBHAR_03213 in pQE30	(169)
pQE30-VIBHAR_06736	Amp ^R	VIBHAR_06736 in pQE30	U. Schell (nicht veröffentlicht)
pQE30-VIBHAR_06900	Amp ^R	VIBHAR_06900 in pQE30	U. Schell (nicht veröffentlicht)
pBAD33-VIBHAR_06370-6His	Cam ^R	VIBHAR_06370 mit RBS und C-terminalem 6His-Tag in pBAD33	diese Arbeit
pBAD24_GloA-6His	Amp ^R	<i>gloA</i> mit C-terminalem 6His-Tag in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24_GloB-6His	Amp ^R	<i>gloB</i> mit C-terminalem 6His-Tag in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24_GloC-6His	Amp ^R	<i>gloC</i> mit C-terminalem 6His-Tag in pBAD24	diese Arbeit
pBAD33_GloA-6His	Cam ^R	<i>gloA-6His</i> übertragen mit BamHI und XbaI aus dem korrespondierenden pBAD24 Plasmid	diese Arbeit
pBAD33_GloB-6His	Cam ^R	<i>gloB-6His</i> übertragen mit BamHI und XbaI aus dem korrespondierenden pBAD24 Plasmid	diese Arbeit
pBAD33_GloC-6His	Cam ^R	<i>gloC-6His</i> übertragen mit BamHI und XbaI aus dem korrespondierenden pBAD24 Plasmid	diese Arbeit
pBAD33_VIBHAR_06370-6His	Cam ^R	VIBHAR_06370 mit C-terminalem 6His-Tag in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24_YdgG-6His	Amp ^R	<i>ydgG</i> mit C-terminalem 6His-Tag in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24_YhhQ-6His	Amp ^R	<i>yhhQ</i> mit C-terminalem 6His-Tag in pBAD24	diese Arbeit
pBAD33_YdgG-6His	Cam ^R	<i>ydgG-6His</i> übertragen mit BamHI und XbaI aus dem korrespondierenden pBAD24 Plasmid	diese Arbeit

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierungsverfahren

4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli* und *V. harveyi*

Die Kultivierung der in Tabelle 8 aufgeführten *E. coli* Stämme erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, aerob bei 37°C in LB- oder K_{0,2}-Medium. *V. harveyi* Stämme wurden, wenn nicht anders beschrieben, aerob bei 30°C in LM-Vollmedium oder AB-Medium kultiviert. Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5% Agar (w/v) hergestellt. Zum blau/weiß Screening wurde 80 µg/ml X-Gal zu den Nährböden zugegeben. Zur Selektion auf bestimmte Resistenzmarker wurden entsprechende Antibiotika zugegeben (Tabelle 3). Wenn nötig wurde *meso*-Diaminopimelinsäure (DAP) in der Konzentration von 300 µM zugesetzt. In einigen Experimenten wurden Autoinduktor-1 (HAI-1) oder Autoinduktor-2 (AI-2) in der jeweils beschriebenen Konzentration zugegeben.

Um das Wachstum zu kontrollieren, wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) als Maß für die Zellzahl einer Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer bestimmt. Wachstumskurven wurden in 96-Well Costar-Platten im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 600 nm und einem Volumen von 200 µl aufgenommen.

Die Lumineszenz wurde in 96-Well Costar Platten im Tecan Infinite F500pro Lesegerät mit einer Integrationszeit von 0,1 s aufgenommen.

4.2.1.2 Dauerkulturen

Die Lagerung von Bakterienstämmen erfolgte mit Hilfe von Glycerolkulturen. Hierfür wurden Übernacht-Kulturen mit 10% (v/v) Glycerol versetzt und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Dauerkulturen wurden bei -80°C gelagert.

4.2.2 Molekularbiologische und genetische Methoden

4.2.2.1 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 3 ml aeroben Übernachtskulturen mittels „HiYield Plasmid DNA Mini“-Kit nach Angaben des Herstellers, isoliert, in 30-100 µl Elutionspuffer bzw. sterilem dest. Wasser eluiert. Abschließend wurde die Plasmidkonzentration mit dem NanoDrop-Spektrophotometer bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.2.2.2 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus 5 ml Übernachtskultur mit dem „Ultra Clean Microbial DNA Isolation“-Kit von MO BIO Laboratories Inc. nach Angaben des Herstellers isoliert.

Abschließend wurde die Konzentration mit dem NanoDrop-Spektrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.2.2.3 Modifikation und Amplifikation von DNA

Die Standard-DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen durchgeführt (162, 163). Die *in vitro* Vervielfältigung durch die Polymerasekettenreaktion (129) erfolgte mit verschiedenen Polymerasen nach Angaben des Herstellers und auch Veränderungen von DNA Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Verhinderung einer Religation mit alkalischer Phosphatase behandelt.

4.2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung und Extraktion von DNA-Fragmenten

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1-2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer verwendet, die mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Vor dem Lauf wurden zu den Proben 6x DNA-Ladepuffer gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurde der 2 Log-Leiter-Standard der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) verwendet. Der Gellauf wurde in einer „Mini Sub DNA Cell GT“-Agarosegel-Laufkammer bzw. „Wide Mini Sub DNA Cell GT“-Agarosegel-Laufkammer (Biorad, München) bei konstant 110 V für 25-30 min durchgeführt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit der „GelDoku“-Fotodokumentationsanlage. DNA-Fragmente wurden mittels des „HiYield Gel Extraction“-Kit nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen extrahiert.

4.2.2.5 Plasmidkonstruktion

Plasmide wurden aus den Ursprungsplasmiden und den entsprechenden Inserts konstruiert. Dafür wurde paarweise mit den Oligonukleotiden, die in Tabelle 7 aufgelistet sind, die Ziel-DNA amplifiziert, im Anschluss mit den jeweils bestimmten Restriktionsenzymen geschnitten und schließlich in den mit den gleichen bzw. kompatiblen Restriktionsenzymen geschnittenen Zielplasmid aus Tabelle 9 ligiert.

4.2.2.6 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxynucleotid-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (165). Die Analysen wurden von dem Sequencing Service der Genetikabteilung des Departments Biologie (LMU-München) in einem Kapillarsequenzierer ABI 3730 (Applied Biosystems, Hitachi; USA) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 Teil A aufgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „CLC Main Workbench“ (CLCbio-QIAGEN, Aarhus, Dänemark) ausgewertet.

4.2.2.7 Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme

Molekularbiologische Methoden wurden nach Standardprotokollen (163) oder nach den Angaben der entsprechenden Hersteller durchgeführt. Die verwendeten Enzyme, Puffer, Kits und Chemikalien sind unter 4.1 gesondert aufgeführt.

Transfer replikativer Plasmide

Replikative Plasmide wurden mittels Transformation in chemisch kompetente *E. coli* (38, 87) transferiert. *V. harveyi* wurde mit Hilfe von Konjugation transformiert, wobei das entsprechende Plasmid zunächst in den *E. coli* WM3064 Donorstamm transferiert wurde.

In-frame Deletionen

In-frame Deletionsmutanten in *E. coli* und *V. harveyi* wurden in Anlehnung an Lassak *et al.* 2010 (108) unter dem Verbleib eines kurzen non-sense Peptids konstruiert. Dabei wurden an den terminalen Gensequenzen des zu deletierenden Gens jeweils 12-27 bp beibehalten (190, 191) und dafür etwa 500 bp große Fragmente stromaufwärts (*upstream*) und stromabwärts (*downstream*) der gewünschten Genregion mit den in Tabelle 7 gelisteten Primern mittels PCR amplifiziert. Im Anschluss daran wurden die beiden Fragmente mittels ÜberlappungsPCR fusioniert (173) und nach dem entsprechenden Restriktionsverdau in den Suizidvektor pNPTS138-R6KT ligiert. Die entsprechend konstruierten Plasmide sind in Tabelle 9 aufgelistet und wurden mit Hilfe von Konjugation durch *E. coli* WM3064 als Donor nach *E. coli* BW25113 oder *V. harveyi* als Akzeptorstämme transferiert. Da der Donorstamm auxotroph für DAP ist, war selbiges auch in den LB-Agar-Platten für das Mating enthalten. In einem ersten Schritt wird das nicht replikative Plasmid durch einfache homologe Rekombination genomisch integriert. Nach der Selektion auf LB Platten mit Kanamycin aber ohne DAP wurden Einzelkolonien über Nacht ohne Selektionsdruck in LB Medium kultiviert und anschließend auf LB-Platten mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert, um auf den Verlust des Plasmides nach der zweiten homologen Rekombination zu selektieren. Saccharose-resistente und Kanamycin-sensitive Stämme wurden schließlich mit Hilfe von Einzelkolonie-PCR auf Deletion des gewünschten Genabschnittes untersucht.

4.2.2.8 Präparation von Phagenkonzentrat

Eine *V. harveyi* Tageskultur wurde aus einer ÜN-Kultur in 1 l frischem LM-Medium auf eine $OD_{600} = 0,05$ angeimpft und anschließend aerob bei 30°C inkubiert. Bei $OD_{600} = 0,3$ wurde die Tageskultur mit 1 µg/ml Mitomycin C versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurden die Zellen zwei Mal gewaschen, indem für 15 min bei 5.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet jeweils in frischem Medium resuspendiert wurde. Nach den Waschschrinen wurde die Kultur weiter bei 30°C inkubiert. 3 h nach dem Waschen wurden

die Zellen bei 10.000 x g und 22°C abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (0,2 µm Filtropur BT50, PES, Sarstedt). Im Überstand wurden 100 g/l Polyethylenglycol 6000 (Sigma, Deisenhofen) gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Phagen durch Zentrifugation für 3 h bei 25.000 x g und 4°C pelletiert und in 4 ml Phagenpuffer gelöst. Dieses 250 fache Phagenkonzentrat wurde erneut sterilfiltriert (0,22 µm Rotilabo®-Spritzenfilter, CME, steril, Carl Roth, Karlsruhe) und schließlich bei 4°C gelagert.

4.2.2.9 Präparation von RNA

Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli*- bzw. *V. harveyi* Zellen erfolgte mittels saurer Phenol Extraktion (1). Dazu wurden 13 ml Aliquots der Zellen 5 min bei 10.000 x g pelletiert und das Pellet in 500 µl kaltem AE-Puffer resuspendiert und in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden 500 µl [gleiches Volumen] auf 60°C erwärmtes Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25/24/1 und 25 µl 10% (v/v) SDS gegeben und fünf Minuten im Thermomixer bei 60°C und 1000 rpm im Intervall inkubiert. Anschließend wurden die Proben für zwei Stunden auf Eis gekühlt oder über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Im nächsten Schritt wurden die Proben mindestens 20 min bei maximaler Geschwindigkeit (16.100 x g) und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um wässrige und organische Phase voneinander zu trennen. Die wässrige Phase, ca. 500 µl wurde möglichst vollständig und ohne Teile der organischen Phase mit aufzunehmen in 2 ml PhaseTrapA Gefäße (Peqlab, Erlangen) überführt. Dazu wurden zunächst ein Volumen (500 µl) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 1/10 des Volumens (50 µl) 3 M Natriumacetat pH 5.2 gegeben und nachdem die Proben gut durchgeschüttelt waren, wurde erneut mindestens 10 min bei maximaler Geschwindigkeit (16.100 x g) und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um wiederum wässrige und organische Phase voneinander zu trennen. Durch die Wachsschicht, die sich zwischen die beiden Phasen gelegt hat, konnte die wässrige Phase vollständig (500 µl) aufgenommen und zum dreifachen Volumen (1,5 ml) reinen 100% Ethanol überführt werden, sodass die Nukleinsäuren über Nacht bei -20°C in 75% Ethanol gefällt wurden.

Die RNA wurde am nächsten Tag durch Zentrifugation für mindestens 20 min bei maximaler Geschwindigkeit (16.100 x g) und 4°C in der Tischzentrifuge pelletiert und im Anschluss zwei mal mit kaltem 80%igem reinen Ethanol – ohne zu resuspendieren – gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 100 µl RNase-freiem Wasser (mit DEPC behandelt) gelöst.

Der RNA Gehalt und die Reinheit wurden photometrisch bestimmt und zusätzlich visuell über ein 2%iges Agarose-Gel überprüft. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt [0,1% (v/v) DEPC].

Entfernen von chromosomaler DNA und Qualitätskontrolle

Die gereinigte RNA wurde mit RNase-freier DNase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des mitgelieferten Puffers behandelt. Anschließend wurde die RNA erneut visuell über ein 2%iges Agarose-Gel überprüft und zusätzlich zur Kontrolle eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, die bei vollständigem Verdau kein Produkt ergibt.

Die RNA wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3 Biochemische und analytische Methoden

4.2.3.1 qRT-PCR

Proben von unterschiedlichen Stämmen und Zeitpunkten des Wachstums wurden entnommen und RNA isoliert wie bereits beschrieben (1). Die gewonnene RNA wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem cDNA-Synthesekit mit zufällig ausgewählten Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss daran wurde eine quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR) mit dem iQ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, München) im iQ5 Detektionssystem von Bio-Rad mit spezifischen Primern abhängig von dem Transkript, das nachgewiesen werden sollte, durchgeführt. Dabei wurden die C_T Werte nach 40 Wiederholungen eines 2-Schritt-Zyklus mit der iQ Software von Biorad bestimmt, und schließlich relative Änderungen in den Transkriptmengen nach Normalisierung auf ein nicht reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen, wie z.B. *recA*, mit der vergleichenden ΔC_T Methode berechnet (114). Die Primereffizienz wurde unter Einsatz definierter Mengen chromosomaler DNA (10 pg bis 100 ng) bestimmt.

4.2.3.2 Produktion und Reinigung von Proteinen

Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurden die Zellen nach Kultivierung und Waschen in standard Proteinauflösungspuffer resuspendiert und anschließend durch drei Passagen in einer French-Press mit 1200 Bar aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 5.000 x g erfolgte die Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen sowie Zelltrümmern und im folgenden Ultrazentrifugationsschritt bei 4°C und 35.000 x g wurden schließlich die löslichen Proteine aus dem Zytosol (Überstand) und die Membranfraktion (Pellet) getrennt.

Lösliche Proteine (GloA, GloB, GloC, CLPY)

GloA-6His, GloB-6His, GloC-6His wurden in dem mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden transformierten *E. coli* BW25113 $\Delta gloABC$, CLPY in dem AI-2 Stamm *E. coli* MBS-01 produziert und mittels Ni²⁺-NTA (Triazetonitril)-Agarose über eine Säule (Sigma-Aldrich) aus der zytosolischen Fraktion gereinigt. Um die Effizienz der einzelnen Schritte überprüfen zu können, wurden nach den verschiedenen Schritten Proben für eine SDS-PAGE entnommen. Ni²⁺-NTA-Agarose wurde nach Angaben des Herstellers bezüglich der Bindekapazität von 6His-fusionierten Proteinen benutzt. Es wurde angenommen, dass das Zielprotein nach Überproduktion ca. 5% des zytosolischen Gesamtproteins ausmacht. In der Regel wurden 0,5 bis 1 ml abgesetzte Ni²⁺-NTA-Agarose in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit dem 10fachen Volumen an dest. Wasser gewaschen und anschließend für 30 min bei 4°C mit Waschpuffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8, 2 mM β -Mercaptoethanol, 10% (w/v) Glycerol, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) äquilibriert.

Zur Bindung der 6His-Proteine wurde die zytosolische Fraktion zu der äquilibrierten Agarose gegeben und 30-60 min bei 4°C geschwenkt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls bei 4°C. Anschließend wurde das Agarose-Protein-Gemisch auf die Säule gegeben. Nach Absetzen der Ni²⁺-NTA-Agarose wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen mit dem 100-fachen Säulenvolumen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend erfolgten fünf Elutionsschritte mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8, 2 mM β -Mercaptoethanol, 10% (w/v) Glycerol, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol).

CLPY wurde nach Vorgaben von Taga und Xavier gereinigt (151, 186). Dafür wurde in Anschluss an das Standard Reinigungsprotokoll das Protein CLPY entweder 2 Tage bei 4°C oder 5 h bei Raumtemperatur zur Reifung inkubiert und daraufhin mit Gelfiltration in FRET-Reaktionspuffer umgepuffert.

Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen wurde nach Lowry bestimmt (115) und mehrere Fraktionen gegebenenfalls vereinigt. Für weitere Analysen der Proteine erfolgte die Lagerung Kurzzeit bei 4°C oder Langzeit bei -80°C.

Membranproteine (YdgG, YhhQ)

YhhQ-6His und YdgG-6His wurden in dem mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden transformierten *E. coli* BW25113 $\Delta yhhQ \Delta ydgG$ produziert. Die Kultivierung erfolgte in Autoinduktionsmedium für 20 h bei 20°C. Aus der Membranfraktion wurden die Proteine in Waschpuffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8, 2 mM β -Mercaptoethanol, 10% (w/v), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) zunächst durch schrittweise Zugabe des Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) bis zu einer finalen Konzentration von 1,5% (w/v) solubilisiert und das Solubilisat für 20 min bei 70.000 x g im Rotor 45Ti der Firma Beckman Coulter zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich mit Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt (92). Die weitere Reinigung erfolgte entsprechend wie für lösliche Proteine, jedoch mit jeweils 0,04 % (w/v) DDM in Reinigungs- und Elutionspuffer. Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen wurde mit Bradford-Assay bestimmt und mehrere Fraktionen gegebenenfalls vereinigt. Für weitere Analysen der Proteine erfolgte die Lagerung Kurzzeit bei 4°C oder Langzeit bei -80°C.

4.2.3.3 Gelfiltration

Zum Entsalzen und Umpuffern, sowie um mögliche Verunreinigungen durch andere Proteine zu verringern, wurde eine Größenausschlusschromatographie auf einer "Superdex 200 10/300 GL – increase"-Gelfiltrationssäule in einer Äkta Purifier Anlage durchgeführt. Pro Lauf wurde die Säule mit einem Gesamtvolumen von 500 μ l beladen. Der Säulenlauf erfolgte abhängig von dem geladenen Protein mit Reaktionspuffer bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. Die Absorption des Eluats, aufgefangen in 0,5 ml-Fractionen, wurde bei 280 nm in einer integrierten optischen Einheit gemessen und das Profil digital aufgezeichnet. Zusätzlich wurden die gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert und gegebenenfalls vereinigt.

4.2.3.4 Protein Detektion

SDS-PAGE

Zur Analyse wurden die Proben mit 5x Protein-Ladepuffer versetzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel mit 0,5% (v/v) Trichlorethanol geladen (48, 106). Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,9% (w/v), im Trenngel 12,5% (w/v). Die Gele wurden mit Hilfe von Protogel2 Fertiglösung (30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid) (Biozym Diagnostik GmbH) hergestellt. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte nach Größe (107, 163). Die Detektion erfolgte nach Aktivierung durch UV-Strahlen mit Hilfe der Geldokumentationsanlage. Für die Größenordnung wurde der Standard Roti® Mark 10-150 (Carl Roth, Karlsruhe) verwendet.

Western-Blot Analysen

Zur Detektion 6His-markierter Proteine wurden Zellen, Lysate, gereinigte Proteine nach der Auftrennung mit SDS-PAGE in einer Nass-Blot Anlage (Bio-Rad, München) mit Blotpuffer für zwei Stunden bei 300 mA bzw. über Nacht bei 100 mA auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Nach dem Blocken der Membran mit 3% (w/v) BSA in PufferA für eine Stunde, erfolgte die Behandlung der Membranen mit „Penta-His Antibody“ (QIAGEN, Hilden) in der Konzentration 1:2.500 entsprechend den Anweisungen des Herstellers für mindestens eine halbe Stunde. Nach mehrmaligem Waschen mit PufferA wurde als zweiter Antikörper ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Maus-IgG Antikörper in einer Endkonzentration von 1:5.000 in PufferA mit 3% (w/v) BSA für eine Stunde inkubiert. Für den mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper wurde der Immunoblot durch Zugabe einer Färbe-Substratlösung entwickelt. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Waschen mit dest. Wasser wurde die Membran zur Dokumentation eingescannt.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration löslicher Proteine wurde wie von Lowry beschrieben durchgeführt (115), die Konzentration membranintegrierter Proteine wurden in Abwandlung des Protokolls durchgeführt (149). Die Methode nach Bradford (18) wurde für eine erste Abschätzung der Proteinmenge zusätzlich angewendet. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (AppliChem, Darmstadt) verwendet. Über die Steigung der Eichgerade im linearen Bereich wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt.

4.2.3.5 Affinitätsbestimmung mit Tryptophanfluoreszenzmessung

Fluoreszenz wurde mit einem Spektrofluorometer FluoroMax-3 bei 25°C gemessen. Die Anregungswellenlänge wurde auf 287 nm eingestellt und die Emission wurde zwischen 310 und 390 nm mit einer Spaltbreite von 2,5 nm für die Anregung und 2,5 nm für die Emission aufgezeichnet. Messungen wurden mit 70 µg/ml Protein in einem Gesamtvolumen von 1 ml in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol und 0,04% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid durchgeführt. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Entsalzungssäule (HiTrap desalting, 5 ml, Pharmacia biotech) in den Reaktionspuffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer, 2 mM β-Mercapthoethanol, 0,04% DDM) umgepuffert. Liganden (in 150 mM pH 7,5 Kaliumphosphat-Puffer verdünnt) wurden in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt, und die Mischung wurde für 5 min bei 25°C vor der Messung inkubiert. Alle einzelnen Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt. Um durch die Volumenänderung herbeigeführte und unspezifische Effekte

zu korrigieren, wurden die gleichen Experimente neben dem Substrat AI-2 mit Puffer, Ribose und Carnitin durchgeführt, wobei die zugegebenen Volumina jeweils gleich blieben. Veränderungen in der Fluoreszenz werden als $\Delta F/F$ angegeben, wobei ΔF die Änderung der Fluoreszenzintensität bei 340 nm nach Zugabe von Liganden bei der angegebenen Konzentration und F die anfängliche Fluoreszenzintensität gemessen ohne Liganden ist. Die Affinitätskonstante K_D wurde aus der Steigung des Plottes von $\Delta F/F$ (= gebundenen Liganden) gegen $(\Delta F/F) / (L)$ (= Quotient von gebundenen und freien Liganden) nach Scatchard berechnet (166).

4.2.3.6 Visualisierung von Phagen mit TEM

10 μ l von 1:20 bzw. 1:5 verdünntem Phagenkonzentrat wurden auf ein Kupfergitter, welches durch Ausglühen entladen wurde und mit Kohlenstoff beschichtet war, adsorbiert. Nach 10 min wurde die Lösung vom Gitter entfernt und für 30 s mit 1%igem Uranylacetat behandelt, was eine negative Färbung des Präparats zur Folge hat. Die Phagen Lösung wurde mit einem Tropfen vollentsalztem Wasser gespült und anschließend luftgetrocknet.

Die Hellfeld Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde an einem FEI CM200 Transmissionselektronenmikroskop, bei 160 kV durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer Eagle 4k CCD Kamera mit den Programmen EMMenu 4.0 (Tietz) und FEI aufgenommen. Die TEM wurde von Mauricio Toro durchgeführt und die Aufnahmen zur Verfügung gestellt.

4.2.3.7 Nachweis von HAI-1

Mit Hilfe von UPLC-MS wurde die Konzentration von HAI-1 in Überständen, Zytosol und *in vitro* Enzymreaktionen bestimmt. Zur Kalibrierung und Quantifizierung wurde eine HAI-1 Standard Lösung verwendet. Die quantitativen Messungen wurden mit einem Acquity UPLC™ System (Waters Corporation, Milford, MA, USA) gekoppelt mit einem „Time-of-flight“ Massenspektrometer, das mit einer Apollo II Elektrosprayionisationsquelle (ESI-qTOF MS; maXis™, Bruker Daltonik, Bremen) ausgestattet ist, durchgeführt. Die chromatographische Auftrennung erfolgte auf einer Acquity BEH C18 Säule der Dimension 1,0 x 150 mm gepackt mit 1,7 μ m Partikeln (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Die Temperatur des Probenmanagers war 10°C, und es wurden jeweils 5 μ l eines Samples über eine partielle Schleife injiziert. Die mobile Phase bestand aus Eluent A [10% (v/v) Acetonitril und 0,1% (v/v) Ameisensäure in Wasser] und Eluent B [100% (v/v) Acetonitril]. Der Stufengradient wurde wie in Tabelle 10 abgebildet bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,100 ml/min angelegt.

Tabelle 10: Verlauf des Stufengradienten zum Nachweis von HAI-1 mit UPLC-MS.

Zeit [min]	%A	%B
Start	100	0
3,0	95	5
5,0	30	70
5,5	30	70
5,6	100	0
6,6	100	0

Die Aufnahme eines UV/vis Chromatogramms erfolgte über einen PDA-Detektor bei einer Wellenlänge von 196,5 nm. Das Massenspektrum wurde im positiven Ionisierungsmodus in einem Bereich von 50 – 1000 m/z (Masse zu Ladung) aufgenommen. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Chromatogramme und Massenspektren wurden mit der Software Data Analysis 3.4 (Bruker Daltonik, Bremen) ausgewertet. Die Daten sind in Kooperation mit der AG Schmitt-Kopplin (Helmholtz Zentrum, Neuherberg) entstanden und gespeichert.

4.2.3.8 Nachweis von Methylglyoxal

Die Konzentration von Methylglyoxal (MG) wurde nach Hopper & Cooper (1971) (83) in verkleinertem Volumen colorimetrisch unter Verwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin als Reagenz bestimmt. Dazu wurden 60 µl dH₂O in einem Well vorgelegt und 22 µl Reagent (0,1% (w/v) Dinitrophenylhydrazin in 2 M Salzsäure) zugegeben. Nach Zugabe von 7 µl Probe bzw. Standard erfolgte die Inkubation bei 30°C für 15 min. Daraufhin wurden 111 µl 10% (w/v) NaOH (= 2,5 M) zugegeben und erneut bei 30°C für 15 min inkubiert. Die Menge an MG wurde in Bezug auf eine MG-Standardkurve durch Messung der Absorption bei 540 nm berechnet (57).

4.2.3.9 Nachweis von Glutathion

Der Nachweis von Glutathion (GSH) beruht auf der Absorptionsänderung des Substrates 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat (DTNB, Sigma, Taufkirchen) bei 412 nm, die durch die Reduktion mit GSH hervorgerufen wird (177). Diese Eigenschaft wurde verwendet, um die Enzymaktivität von Typ II Glyoxalasen, S-Laktoylglutathion (SLG) in GSH umzuwandeln, nachzuweisen. Dazu wurden die Enzyme in 96-Well-Platten in 250 µl Puffer (40 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5, 240 mM NaCl), der 200 µM DTNB und verschiedene SLG-Konzentrationen enthielt, in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan Infinite F200) bei 30°C unmittelbar nach der letzten Zugabe von SLG für mindestens 1,5 h inkubiert und im

Abstand von 15 s die Absorption bei 412 nm aufgenommen. Parallel wurde eine Standardkurve mit GSH-Konzentrationen von 0,01 mM bis 0,4 mM aufgezeichnet.

4.2.3.10 Nachweis von AI-2

Extrazelluläre AI-2-Konzentration

Die Konzentration von AI-2 in sterilfiltrierten Überständen (0,22 µm Rotilabo®-Spritzenfilter, CME, steril, Carl Roth, Karlsruhe) aus verschiedenen Kultivierungen wurde mit Hilfe eines FRET-basierten Assays bestimmt (151). Dabei wurde ein Reporterprotein, das aus CFP, LuxP, und YFP (CLPY) besteht, in einem AI-2⁻ *E. coli* MBS-01 produziert, mit Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt und schließlich in der finalen Konzentration von 0,025 mg/ml in FRET-Reaktionspuffer verwendet. Der Nachweis von AI-2 in Lösungen oder Überständen erfolgte über die Messung von Änderungen im Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), die durch die Bindung eines Liganden hervorgerufen werden. Dafür wurde die Fluoreszenzemission bei 540 nm und 485 nm nach Excitation bei 430 nm gemessen, woraus sich das FRET-Verhältnis (YFP/CFP) ergibt. Mit Hilfe einer AI-2 Standardkurve im Bereich von 1 µM bis 40 µM konnte die AI-2 Konzentration in den entsprechenden Überständen bestimmt werden. Um mögliche störende Hintergrundsignale zu vermeiden, wurden für verschiedene Medien jedesmal die Standardkurven im entsprechenden Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration in Überständen erfolgte jeweils in biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten.

Intrazelluläres AI-2 in *V. harveyi*

Der direkte Nachweis von intrazellulärem AI-2 erfolgte qualitativ. Dazu wurden *V. harveyi* Stämme mit dem in dieser Arbeit konstruierten Reporterplasmid pBBR1-MCS-2-*IsrKRP*_{Isr}::*lacZ* transformiert und Übernachtskulturen von diesen Stämmen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in frischem AB-Medium mit Kanamycin verdünnt. Nachdem die Kulturen bei 30°C für 6 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,9 gewachsen waren, wurden sie geerntet. Daraufhin wurde die β-Galaktosidaseaktivität von mindestens drei unabhängigen Wiederholungen bestimmt, wie es bei Miller (124) beschrieben ist.

4.2.4 Bioinformatik

Grundlegende Informationen wie Gensequenzen, intergene Sequenzen und Informationen zu Proteinen, wie z.B. die Anwesenheit und Positionen von Proteindomänen wurden aus einschlägigen Datenbanken wie NCBI, EcoCyc (99) und BioCyc (26), und Uniprot (197) übernommen. Strukturanalysen wurden mit Phyre2 (98) und TMHMM (127)

und Proteinalignments mit Clustal Omega (174, 175) durchgeführt. Zur Vorhersage von potentiellen Bakteriophagen in verschiedenen Genomen wurde die Datenbank PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) verwendet (221).

Die Daten wurden mit CLC Main Workbench (CLCbio-QIAGEN; Aarhus, Dänemark) verwaltet, bearbeitet und für Alignments, Sequenzauswertungen und Kartierungen, sowie für die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen verwendet. Zur Erstellung von Stammbäumen wurde außerdem iTOL verwendet (109).

Analysen bezüglich gemeinsamen Vorkommen der korrespondierenden Gene in einem oder mehreren Genomen wurde mit STRING 9.1 (60) durchgeführt.

5. Quellen

1. **Aiba, H., S. Adhya, and B. de Crombrughe.** 1981. Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **256**: 11905-11910.
2. **Amara, N., R. Mashiach, D. Amar, P. Krief, S. A. Spieser, M. J. Bottomley, A. Aharoni, and M. M. Meijler.** 2009. Covalent inhibition of bacterial quorum sensing. *J Am Chem Soc* **131**: 10610-10619.
3. **Anetzberger, C., T. Pirch, and K. Jung.** 2009. Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **73**: 267-277.
4. **Anetzberger, C., M. Reiger, A. Fekete, U. Schell, N. Stambrau, L. Plener, J. Kopka, P. Schmitt-Kopplin, H. Hilbi, and K. Jung.** 2012. Autoinducers act as biological timers in *Vibrio harveyi*. *PLoS One* **7**: e48310.
5. **Anetzberger, C., U. Schell, and K. Jung.** 2012. Single cell analysis of *Vibrio harveyi* uncovers functional heterogeneity in response to quorum sensing signals. *BMC Microbiol* **12**: 209.
6. **Antunes, L. C., A. L. Schaefer, R. B. Ferreira, N. Qin, A. M. Stevens, E. G. Ruby, and E. P. Greenberg.** 2007. Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI regulon. *J Bacteriol* **189**: 8387-8391.
7. **Armbruster, C. E., B. Pang, K. Murrah, R. A. Juneau, A. C. Perez, K. E. Weimer, and W. E. Swords.** 2011. RbsB (NTHI_0632) mediates quorum signal uptake in nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP. *Mol Microbiol* **82**: 836-850.
8. **Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**.
9. **Bassler, B., and U. S. Neill.** 2014. A conversation with Bonnie Bassler. *J Clin Invest* **124**: 1421-1422.
10. **Bassler, B. L., E. P. Greenberg, and A. M. Stevens.** 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **179**: 4043-4045.
11. **Bassler, B. L., M. Wright, and M. R. Silverman.** 1994. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a 2nd sensory pathway. *Mol Microbiol* **13**: 273-286.
12. **Beeston, A. L., and M. G. Surette.** 2002. *pfs*-dependent regulation of autoinducer 2 production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**: 3450-3456.
13. **Berntsson, R. P., J. ter Beek, M. Majsnerowska, R. H. Duurkens, P. Puri, B. Poolman, and D. J. Slotboom.** 2012. Structural divergence of paralogous S components from ECF-type ABC transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13990-13995.
14. **Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300.
15. **Brackman, G., S. Celen, K. Baruah, P. Bossier, S. Van Calenbergh, H. J. Nelis, and T. Coenye.** 2009. AI-2 quorum-sensing inhibitors affect the starvation response and reduce virulence in several *Vibrio* species, most likely by interfering with LuxPQ. *Microbiology* **155**: 4114-4122.
16. **Brackman, G., S. Celen, U. Hillaert, S. Van Calenbergh, P. Cos, L. Maes, H. J. Nelis, and T. Coenye.** 2011. Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based quorum sensing and their effect on virulence of *Vibrio* spp. *PLoS One* **6**: e16084.
17. **Brackman, G., T. Defoirdt, C. Miyamoto, P. Bossier, S. Van Calenbergh, H. Nelis, and T. Coenye.** 2008. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives

- reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiol* **8**: 149.
18. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
 19. **Byers, J. T., C. Lucas, G. P. Salmond, and M. Welch.** 2002. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol* **184**: 1163-1171.
 20. **Cameron, A. D., M. Ridderstrom, B. Olin, and B. Mannervik.** 1999. Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure* **7**: 1067-1078.
 21. **Campos-Bermudez, V., N. R. Leite, R. Krog, A. J. Costa-Filho, F. C. Soncini, G. Oliva, and A. J. Vila.** 2007. Biochemical and structural characterization of *Salmonella typhimurium* glyoxalase II: new insights into metal ion selectivity. *Biochemistry* **46**: 11.
 22. **Campos-Bermudez, V. A., N. R. Leite, R. Krog, A. J. Costa-Filho, F. C. Soncini, G. Oliva, and A. J. Vila.** 2007. Biochemical and structural characterization of *Salmonella typhimurium* glyoxalase II: new insights into metal ion selectivity. *Biochemistry* **46**: 11069-11079.
 23. **Campos-Bermudez, V. A., J. Moran-Barrio, A. J. Costa-Filho, and A. J. Vila.** 2010. Metal-dependent inhibition of glyoxalase II: a possible mechanism to regulate the enzyme activity. *J Inorg Biochem* **104**: 726-731.
 24. **Cao, J. G., and E. A. Meighen.** 1989. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J Biol Chem* **264**: 21670-21676.
 25. **Carrington, S. J., and K. T. Douglas.** 1986. The glyoxalase enigma - the biological consequences of this ubiquitous enzyme. *IRCS J Med Sci* **11**: 762-768.
 26. **Caspi, R., T. Altman, J. M. Dale, K. Dreher, C. A. Fulcher, F. Gilham, P. Kaipa, A. S. Karthikeyan, A. Kothari, M. Krummenacker, M. Latendresse, L. A. Mueller, S. Paley, L. Popescu, A. Pujar, A. G. Shearer, P. Zhang, and P. D. Karp.** 2010. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* **38**: D473-479.
 27. **Chandrangsu, P., R. Dusi, C. J. Hamilton, and J. D. Helmann.** 2014. Methylglyoxal resistance in *Bacillus subtilis*: contributions of bacillithiol-dependent and independent pathways. *Mol Microbiol* **91**: 706-715.
 28. **Chen, X., S. Schauder, N. Potier, A. Van Dorsselaer, I. Pelczer, B. L. Bassler, and F. M. Hughson.** 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415**: 545-549.
 29. **Chen, Y., and M. D. Barkley.** 1998. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37**: 9976-9982.
 30. **Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.
 31. **Chopp, D. L., M. J. Kirisits, B. Moran, and M. R. Parsek.** 2002. A mathematical model of quorum sensing in a growing bacterial biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**: 339-346.
 32. **Chowdhary, P. K., N. Keshavan, H. Q. Nguyen, J. A. Peterson, J. E. Gonzalez, and D. C. Haines.** 2007. *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry* **46**: 14429-14437.
 33. **Chu, Y. Y., M. Nega, M. Wolfle, L. Plener, S. Grond, K. Jung, and F. Gotz.** 2013. A new class of quorum quenching molecules from *Staphylococcus* species affects communication and growth of gram-negative bacteria. *PLoS Pathog* **9**: e1003654.
 34. **Clugston, S. L., E. Daub, R. Kinach, D. Miedema, J. F. Barnard, and J. F. Honek.** 1997. Isolation and sequencing of a gene coding for glyoxalase I activity

- from *Salmonella typhimurium* and comparison with other glyoxalase I sequences. *Gene* **186**: 103-111.
35. **Cluzel, M. E., I. Zanella-Cleon, A. J. Cozzone, K. Futterer, B. Duclos, and V. Molle.** 2010. The *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 synthase LuxS is regulated by Ser/Thr phosphorylation. *J Bacteriol* **192**: 6295-6301.
 36. **Colanduoni, J. A., and J. J. Villafranca.** 1985. Labeling of a specific arginine residue at the active site of glutamine synthetase (*E.coli*). *Biochem Biophys Res Commun* **126**: 412-418.
 37. **Czajkowski, R., and S. Jafra.** 2009. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. In: *Acta Biochim Pol.* pp. 16.
 38. **Dagert, M., and S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28.
 39. **Dandekar, A. A., and E. P. Greenberg.** 2013. Plan B for quorum sensing. *Nat Chem Biol* **9**: 292-293.
 40. **Diaz, Z., K. B. Xavier, and S. T. Miller.** 2009. The crystal structure of the autoinducer-2 processing protein LsrF. *PLoS One* **4**: e6820.
 41. **Dong, Y. H., L. H. Wang, J. L. Xu, H. B. Zhang, X. F. Zhang, and L. H. Zhang.** 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* **411**: 813-817.
 42. **Dong, Y. H., J. L. Xu, X. Z. Li, and L. H. Zhang.** 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3526-3531.
 43. **Dong, Y. H., and L. H. Zhang.** 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* **43**: 101-109.
 44. **Drees, B., M. Reiger, K. Jung, and I. B. Bischofs.** 2014. A modular view of the diversity of cell-density-encoding schemes in bacterial quorum-sensing systems. *Biophys J* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.031>.
 45. **Eberhard, A., A. L. Burlingame, C. Eberhard, G. L. Kenyon, K. H. Nealson, and N. J. Oppenheimer.** 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**: 2444-2449.
 46. **Eberl, L.** 1999. N-acyl homoserinylactone-mediated gene regulation in Gram-negative bacteria. *Syst Appl Microbiol* **22**: 493-506.
 47. **Eberl, L., and K. Riedel.** 2011. Mining quorum sensing regulated proteins - Role of bacterial cell-to-cell communication in global gene regulation as assessed by proteomics. *Proteomics* **11**: 3070-3085.
 48. **Edwards, R. A., G. Jickling, and R. J. Turner.** 2002. The light-induced reactions of tryptophan with halocompounds. *Photochem Photobiol* **75**: 362-368.
 49. **Engebrecht, J., K. Nealson, and M. Silverman.** 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**: 773-781.
 50. **Engelhardt, T., M. Sahlberg, H. Cypionka, and B. Engelen.** 2011. Induction of prophages from deep-subseafloor bacteria. *Environ Microbiol Rep* **3**: 459-465.
 51. **Epstein, W., and B. S. Kim.** 1971. Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **108**: 639-644.
 52. **Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. Hinton.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**: 103-118.
 53. **Erkens, G. B., R. P. Berntsson, F. Fulyani, M. Majsnerowska, A. Vujicic-Zagar, J. Ter Beek, B. Poolman, and D. J. Slotboom.** 2011. The structural basis of modularity in ECF-type ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 755-760.
 54. **Faruque, S. M., and J. J. Mekalanos.** 2012. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence* **3**: 556-565.
 55. **Fekete, A., C. Kuttler, M. Rothballer, B. A. Hense, D. Fischer, K. Buddrus-Schiemann, M. Lucio, J. Muller, P. Schmitt-Kopplin, and A. Hartmann.** 2010.

- Dynamic regulation of N-acyl-homoserine lactone production and degradation in *Pseudomonas putida* IsoF. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 22-34.
56. **Ferguson, G. P., and I. R. Booth.** 1998. Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K⁺. *J Bacteriol* **180**: 4314-4318.
57. **Ferguson, G. P., D. McLaggan, and I. R. Booth.** 1995. Potassium channel activation by glutathione-S- conjugates in *Escherichia coli*: protection against methylglyoxal is mediated by cytoplasmic acidification. *Mol Microbiol* **17**: 9.
58. **Ferguson, G. P., A. W. Munro, R. M. Douglas, D. McLaggan, and I. R. Booth.** 1993. Activation of potassium channels during metabolite detoxification in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **9**: 8.
59. **Flavier, A. B., S. J. Clough, M. A. Schell, and T. P. Denny.** 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **26**: 251-259.
60. **Franceschini, A., D. Szklarczyk, S. Frankild, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, J. Lin, P. Minguez, P. Bork, C. von Mering, and L. J. Jensen.** 2013. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* **41**: D808-815.
61. **Freeman, J. A., and B. L. Bassler.** 1999. A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **31**: 665-677.
62. **Freeman, J. A., B. N. Lilley, and B. L. Bassler.** 2000. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **35**: 139-149.
63. **Fried, L., J. Lassak, and K. Jung.** 2012. A comprehensive toolbox for the rapid construction of *lacZ* fusion reporters. *J Microbiol Methods* **91**: 537-543.
64. **Fuqua, C., M. R. Parsek, and E. P. Greenberg.** 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**: 439-468.
65. **Fuqua, C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**: 727-751.
66. **Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.
67. **Geske, G. D., J. C. O'Neill, D. M. Miller, M. E. Mattmann, and H. E. Blackwell.** 2007. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J Am Chem Soc* **129**: 13613-13625.
68. **Gooding, J. R., A. L. May, K. R. Hilliard, and S. R. Campagna.** 2010. Establishing a quantitative definition of quorum sensing provides insight into the information content of the autoinducer signals in *Vibrio harveyi* and *Escherichia coli*. *Biochemistry* **49**: 5621-5623.
69. **Green, M. L., and J. B. Lewis.** 1968. The oxidation of aminoacetone by a species of *Arthrobacter*. *Biochem J* **106**: 267-270.
70. **Greenberg, E. P., J. W. Hastings, and S. Uitzur.** 1979. Induction of Luciferase Synthesis in *Beneckea harveyi* by Other Marine Bacteria. *Arch Microbiol* **120**: 87-91.
71. **Griffith, R., and E. G. Hammond.** 1989. Generation of swiss cheese flavor components by the reaction of aminoacids with carbonyl-compounds. *J Dairy Sci* **72**: 604-613.
72. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.

73. **Hardie, K. R., C. Cooksley, A. D. Green, and K. Winzer.** 2003. Autoinducer 2 activity in *Escherichia coli* culture supernatants can be actively reduced despite maintenance of an active synthase, LuxS. *Microbiology* **149**: 715-728.
74. **Hargreaves, K. R., A. M. Kropinski, and M. R. Clokie.** 2014. What does the talking?: quorum sensing signalling genes discovered in a bacteriophage genome. *PLoS One* **9**: e85131.
75. **Haudecoeur, E., M. Tannieres, A. Cirou, A. Raffoux, Y. Dessaux, and D. Faure.** 2009. Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 529-537.
76. **Hebbeln, P., D. A. Rodionov, A. Alfandega, and T. Eitinger.** 2007. Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2909-2914.
77. **Heeb, S., M. P. Fletcher, S. R. Chhabra, S. P. Diggle, P. Williams, and M. Camara.** 2011. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 247-274.
78. **Henares, B. M., Y. Xu, and E. M. Boon.** 2013. A nitric oxide-responsive quorum sensing circuit in *Vibrio harveyi* regulates flagella production and biofilm formation. *Int J Mol Sci* **14**: 16473-16484.
79. **Henke, J. M., and B. L. Bassler.** 2004. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**: 6902-6914.
80. **Hense, B. A., C. Kuttler, J. Muller, M. Rothballer, A. Hartmann, and J. U. Kreft.** 2007. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* **5**: 230-239.
81. **Herzberg, M., I. K. Kaye, W. Peti, and T. K. Wood.** 2006. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *J Bacteriol* **188**: 587-598.
82. **Higgins, D. A., M. E. Pomianek, C. M. Kraml, R. K. Taylor, M. F. Semmelhack, and B. L. Bassler.** 2007. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature* **450**: 883-886.
83. **Hopper, D. J., and R. A. Cooper.** 1971. The purification and properties of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase. *Biochem J* **128**: 9.
84. **Huang, J. J., J. I. Han, L. H. Zhang, and J. R. Leadbetter.** 2003. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5941-5949.
85. **Huang, J. J., A. Petersen, M. Whiteley, and J. R. Leadbetter.** 2006. Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1190-1197.
86. **Huyen, N. T. T., W. Eiamphungporn, U. Mader, M. Liebeke, M. Lalk, M. Hecker, J. D. Helmann, and H. Antelmann.** 2009. Genome-wide responses to carbonyl electrophiles in *Bacillus subtilis*: control of the thiol-dependent formaldehyde dehydrogenase AdhA and cysteine proteinase YraA by the MerR-family regulator YraB (AdhR). *Mol Microbiol* **71**: 876-894.
87. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
88. **Inoue, Y., and A. Kimura.** 1992. Purification and characterization of glyoxalase-II from *Hansenula mrakii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **73**: 271-276.
89. **Inoue, Y., and A. Kimura.** 1995. Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv Microb Physiol* **37**: 177-227.
90. **Jung, H., M. Buchholz, J. Clausen, M. Nietschke, A. Revermann, R. Schmid, and K. Jung.** 2002. CaiT of *Escherichia coli*, a new transporter catalyzing L-carnitine/gamma -butyrobetaine exchange. *J Biol Chem* **277**: 39251-39258.
91. **Jung, K.** 2011. Microbiology: tuning communication fidelity. *Nat Chem Biol* **7**: 502-503.

92. **Jung, K., B. Tjaden, and K. Altendorf.** 1997. Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 10847-10852.
93. **Kamaraju, K., J. Smith, J. Wang, V. Roy, H. O. Sintim, W. E. Bentley, and S. Sukharev.** 2011. Effects on membrane lateral pressure suggest permeation mechanisms for bacterial quorum signaling molecules. *Biochemistry* **50**: 6983-6993.
94. **Kang, J. H.** 2003. Oxidative damage of DNA by the reaction of amino acid with methylglyoxal in the presence of Fe(III). *Int J Biol Macromol* **33**: 43-48.
95. **Kaplan, H. B., and E. P. Greenberg.** 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**: 1210-1214.
96. **Keen, E. C.** 2014. Tradeoffs in bacteriophage life histories. *Bacteriophage* **4**: e28365.
97. **Keller, L., and M. G. Surette.** 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4**: 249-258.
98. **Kelley, L. A., and M. J. Sternberg.** 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**: 363-371.
99. **Keseler, I. M., A. Mackie, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, S. Gama-Castro, C. Bonavides-Martinez, C. Fulcher, A. M. Huerta, A. Kothari, M. Krummenacker, M. Latendresse, L. Muniz-Rascado, Q. Ong, S. Paley, I. Schroder, A. G. Shearer, P. Subhraveti, M. Travers, D. Weerasinghe, V. Weiss, J. Collado-Vides, R. P. Gunsalus, I. Paulsen, and P. D. Karp.** 2013. EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res* **41**: D605-612.
100. **Keshavan, N. D., P. K. Chowdhary, D. C. Haines, and J. E. Gonzalez.** 2005. L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **187**: 8427-8436.
101. **Kim, I., E. Kim, S. Yoo, D. Shin, B. Min, J. Song, and C. Park.** 2004. Ribose utilization with an excess of mutarotase causes cell death due to accumulation of methylglyoxal. *J Bacteriol* **186**: 7229-7235.
102. **Kim, M. H., W. C. Choi, H. O. Kang, J. S. Lee, B. S. Kang, K. J. Kim, Z. S. Derewenda, T. K. Oh, C. H. Lee, and J. K. Lee.** 2005. The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17606-17611.
103. **Kirke, D. F., S. Swift, M. J. Lynch, and P. Williams.** 2004. The *Aeromonas hydrophila* LuxR homologue AhyR regulates the N-acyl homoserine lactone synthase, Ahyl positively and negatively in a growth phase-dependent manner. *FEMS Microbiol Lett* **241**: 109-117.
104. **Ko, J., I. Kim, S. Yoo, B. Min, K. Kim, and C. Park.** 2005. Conversion of methylglyoxal to acetol by *Escherichia coli* aldo-keto reductases. *J Bacteriol* **187**: 5782-5789.
105. **Kumari, A., P. Pasini, S. K. Deo, D. Flomenhoft, H. Shashidhar, and S. Daunert.** 2006. Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. *Anal Chem* **78**: 7603-7609.
106. **Ladner, C. L., J. Yang, R. J. Turner, and R. A. Edwards.** 2004. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem* **326**: 13-20.
107. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
108. **Lassak, J., A. L. Henche, L. Binnenkade, and K. M. Thormann.** 2010. ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3263-3274.
109. **Letunic, I., and P. Bork.** 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* **23**: 127-128.

110. **Li, J., L. Wang, Y. Hashimoto, C. Y. Tsao, T. K. Wood, J. J. Valdes, E. Zafiriou, and W. E. Bentley.** 2006. A stochastic model of *Escherichia coli* AI-2 quorum signal circuit reveals alternative synthesis pathways. *Mol Syst Biol* **2**: 67.
111. **Li, L., Z. Xu, Y. Zhou, T. Li, L. Sun, H. Chen, and R. Zhou.** 2011. Analysis on *Actinobacillus pleuropneumoniae* LuxS regulated genes reveals pleiotropic roles of LuxS/AI-2 on biofilm formation, adhesion ability and iron metabolism. *Microb Pathog* **50**: 293-302.
112. **Lin, B., Z. Wang, A. P. Malanoski, E. A. O'Grady, C. F. Wimpee, V. Vuddhakul, N. Alves Jr, F. L. Thompson, B. Gomez-Gil, and G. J. Vora.** 2010. Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*. *Environ Microbiol Rep* **2**: 81-89.
113. **Lin, Y. H., J. L. Xu, J. Hu, L. H. Wang, S. L. Ong, J. R. Leadbetter, and L. H. Zhang.** 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**: 849-860.
114. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta \Delta C(T)}$ method. *Methods* **25**: 402-408.
115. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
116. **Lyon, G. J., and R. P. Novick.** 2004. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* **25**: 1389-1403.
117. **Macinga, D. R., M. M. Parojcic, and P. N. Rather.** 1995. Identification and analysis of *aarP*, a transcriptional activator of the 2'-N-acetyltransferase in *Providencia stuartii*. *J Bacteriol* **177**: 3407-3413.
118. **MacLean, M. J., L. S. Ness, G. P. Ferguson, and I. R. Booth.** 1998. The role of glyoxalase I in the detoxification of methylglyoxal and in the activation of the KefB K⁺ efflux system in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**: 563-571.
119. **Majtan, J., J. Klaudiny, J. Bohova, L. Kohutova, M. Dzurova, M. Sediva, M. Bartosova, and V. Majtan.** 2012. Methylglyoxal-induced modifications of significant honeybee proteinous components in manuka honey: Possible therapeutic implications. *Fitoterapia* **83**: 671-677.
120. **Manfield, M., L. Harris, S. A. Rice, R. de Nys, and S. Kjelleberg.** 2000. Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl Environ Microbiol* **66**.
121. **Marques, J. C., P. Lamosa, C. Russell, R. Ventura, C. Maycock, M. F. Semmelhack, S. T. Miller, and K. B. Xavier.** 2011. Processing the interspecies quorum-sensing signal autoinducer-2 (AI-2): characterization of phospho-(S)-4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione isomerization by LsrG protein. *J Biol Chem* **286**: 18331-18343.
122. **Mathys, K. C., S. N. Ponnampalam, S. Padival, and R. H. Nagaraj.** 2002. Semicarbazide-sensitive amine oxidase in aortic smooth muscle cells mediates synthesis of a methylglyoxal-AGE: implications for vascular complications in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 863-869.
123. **McCoy, J. G., C. A. Bingman, E. Bitto, M. M. Holdorf, C. A. Makaroff, and G. N. Phillips, Jr.** 2006. Structure of an ETHE1-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 964-970.
124. **Miller, J. H.** 1992. *A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
125. **Miller, S. T., K. B. Xavier, S. R. Campagna, M. E. Taga, M. F. Semmelhack, B. L. Bassler, and F. M. Hughson.** 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol Cell* **15**: 677-687.

126. **Minagawa, S., H. Inami, T. Kato, S. Sawada, T. Yasuki, S. Miyairi, M. Horikawa, J. Okuda, and N. Gotoh.** 2012. RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol* **12**: 70.
127. **Moller, S., M. D. Croning, and R. Apweiler.** 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **17**: 646-653.
128. **Motz, M.** 2013. Exploration of CAI-1 autoinducer pathway and its link to metabolism. In: Microbiology. Munich: LMU, pp. 71.
129. **Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
130. **Nanda, A. M., A. Heyer, C. Kramer, A. Grunberger, D. Kohlheyer, and J. Frunzke.** 2014. Analysis of SOS-induced spontaneous prophage induction in *Corynebacterium glutamicum* at the single-cell level. *J Bacteriol* **196**: 180-188.
131. **Nealson, K. H., T. Platt, and J. W. Hastings.** 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**: 313-322.
132. **Neiditch, M. B., M. J. Federle, S. T. Miller, B. L. Bassler, and F. M. Hughson.** 2005. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol Cell* **18**: 507-518.
133. **Ng, W. L., and B. L. Bassler.** 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**: 197-222.
134. **Ng, W. L., L. J. Perez, Y. Wei, C. Kraml, M. F. Semmelhack, and B. L. Bassler.** 2011. Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems. *Mol Microbiol* **79**: 1407-1417.
135. **Ng, W. L., Y. Wei, L. J. Perez, J. Cong, T. Long, M. Koch, M. F. Semmelhack, N. S. Wingreen, and B. L. Bassler.** 2010. Probing bacterial transmembrane histidine kinase receptor-ligand interactions with natural and synthetic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 5575-5580.
136. **Niu, C., S. Afre, and E. S. Gilbert.** 2006. Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Lett Appl Microbiol* **43**: 489-494.
137. **O'Young, J., N. Sukdeo, and J. F. Honek.** 2007. *Escherichia coli* glyoxalase II is a binuclear zinc-dependent metalloenzyme. *Arch Biochem Biophys* **459**: 20-26.
138. **Owens, L., and N. Busico-Salcedo.** 2006. *Vibrio harveyi*: pretty problems in paradises. In: The biology of Vibrios. F. Thompson, B. Austin, and J. Swings (eds). Washington: ASM press, pp. Chapter 19.
139. **Ozyamak, E., S. S. Black, C. A. Walker, M. J. Maclean, W. Bartlett, S. Miller, and I. R. Booth.** 2010. The critical role of S-lactoylglutathione formation during methylglyoxal detoxification in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **78**: 1577-1590.
140. **Ozyamak, E., C. de Almeida, A. P. de Moura, S. Miller, and I. R. Booth.** 2013. Integrated stress response of *Escherichia coli* to methylglyoxal: transcriptional readthrough from the *nemRA* operon enhances protection through increased expression of glyoxalase I. *Mol Microbiol* **88**: 936-950.
141. **Park, S. Y., H. O. Kang, H. S. Jang, J. K. Lee, B. T. Koo, and D. Y. Yum.** 2005. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2632-2641.
142. **Park, S. Y., S. J. Lee, T. K. Oh, J. W. Oh, B. T. Koo, D. Y. Yum, and J. K. Lee.** 2003. AhID, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* **149**: 1541-1550.
143. **Pearson, J. P., C. Van Delden, and B. H. Iglewski.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**: 1203-1210.
144. **Pereira, C. S., A. K. de Regt, P. H. Brito, S. T. Miller, and K. B. Xavier.** 2009. Identification of functional LsrB-like autoinducer-2 receptors. *J Bacteriol* **191**: 6975-6987.

145. **Pereira, C. S., A. J. Santos, M. Bejerano-Sagie, P. B. Correia, J. C. Marques, and K. B. Xavier.** 2012. Phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates detection and processing of the quorum sensing signal autoinducer-2. *Mol Microbiol* **84**: 93-104.
146. **Pereira, C. S., J. A. Thompson, and K. B. Xavier.** 2013. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 156-181.
147. **Perez, P. D., J. T. Weiss, and S. J. Hagen.** 2011. Noise and crosstalk in two quorum-sensing inputs of *Vibrio fischeri*. *BMC Syst Biol* **5**: 153.
148. **Pestova, E. V., L. S. Havarstein, and D. A. Morrison.** 1996. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**: 853-862.
149. **Peterson, G. L.** 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356.
150. **Purohit, A. A., J. A. Johansen, H. Hansen, H. K. Leiros, A. Kashulin, C. Karlsen, A. Smalas, P. Haugen, and N. P. Willassen.** 2013. Presence of acyl homoserine lactones in 57 members of the *Vibrionaceae* family. *J Appl Microbiol*.
151. **Rajamani, S., J. Zhu, D. Pei, and R. Sayre.** 2007. A LuxP-FRET-based reporter for the detection and quantification of AI-2 bacterial quorum-sensing signal compounds. *Biochemistry* **46**: 3990-3997.
152. **Ramos, J. L., M. Martinez-Bueno, A. J. Molina-Henares, W. Teran, K. Watanabe, X. Zhang, M. T. Gallegos, R. Brennan, and R. Tobes.** 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 326-356.
153. **Redfield, R. J.** 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* **10**: 365-370.
154. **Reeve, C. A., and T. O. Baldwin.** 1982. Synthesis and inactivation of bacterial luciferase determined by immunochemical techniques. Comparison with total protein synthesis and turnover. *J Biol Chem* **257**: 1037-1043.
155. **Rettner, R. E., and M. H. Saier, Jr.** 2010. The autoinducer-2 exporter superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* **18**: 195-205.
156. **Rezzonico, F., and B. Duffy.** 2008. Lack of genomic evidence of AI-2 receptors suggests a non-quorum sensing role for *luxS* in most bacteria. *BMC Microbiol* **8**: 154.
157. **Romero, M., S. P. Diggle, S. Heeb, M. Camara, and A. Otero.** 2008. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett* **280**: 73-80.
158. **Rosenberg, E., K. H. Keller, and M. Dworkin.** 1977. Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J Bacteriol* **129**: 770-777.
159. **Ruby, E. G.** 1996. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol* **50**: 591-624.
160. **Russell, J. B.** 1993. Glucose toxicity in *Prevotella ruminicola*: methylglyoxal accumulation and its effect on membrane physiology. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2844-2850.
161. **Rutherford, S. T., J. C. van Kessel, Y. Shao, and B. L. Bassler.** 2011. AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios. *Genes Dev* **25**: 397-408.
162. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor laboratory press New York.
163. **Sambrook, J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
164. **Sandy, M., J. N. Carter-Franklin, J. D. Martin, and A. Butler.** 2011. Vanadium bromoperoxidase from *Delisea pulchra*: enzyme-catalyzed formation of bromofuranone and attendant disruption of quorum sensing. *Chem Commun* **47**: 12086-12088.

165. **Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe, and M. Smith.** 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage Φ X174 DNA. *Nature* **265**: 687-695.
166. **Scatchard, G.** 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* **51**: 660-672.
167. **Schaefer, A. L., E. P. Greenberg, C. M. Oliver, Y. Oda, J. J. Huang, G. Bittan-Banin, C. M. Peres, S. Schmidt, K. Juhaszova, J. R. Sufirin, and C. S. Harwood.** 2008. A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* **454**: 595-599.
168. **Schauder, S., K. Shokat, M. G. Surette, and B. L. Bassler.** 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers, biosynthesis of a novel qs signal molecule. *Mol Microbiol* **41**: 14.
169. **Schell, U.** 2010. Populationsheterogenität Quorum Sensing regulierter Gene in *Vibrio harveyi*. In: Microbiology. LMU.
170. **Shao, Y., and B. L. Bassler.** 2012. Quorum-sensing non-coding small RNAs use unique pairing regions to differentially control mRNA targets. *Mol Microbiol* **83**: 599-611.
171. **Shao, Y., L. Feng, S. T. Rutherford, K. Papenfort, and B. L. Bassler.** 2013. Functional determinants of the quorum-sensing non-coding RNAs and their roles in target regulation. *EMBO J* **32**: 2158-2171.
172. **Shapiro, J. A.** 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* **52**: 81-104.
173. **Shi, X., S. Wegener-Feldbrugge, S. Huntley, N. Hamann, R. Hedderich, and L. Sogaard-Andersen.** 2008. Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**: 613-624.
174. **Sievers, F., and D. G. Higgins.** 2014. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol* **1079**: 105-116.
175. **Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins.** 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**: 539.
176. **Spirig, T., A. Tiaden, P. Kiefer, C. Buchrieser, J. A. Vorholt, and H. Hilbi.** 2008. The Legionella autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J Biol Chem* **283**: 18113-18123.
177. **Stamp, A. L., P. Owen, K. El Omari, C. E. Nichols, M. Lockyer, H. K. Lamb, I. G. Charles, A. R. Hawkins, and D. K. Stammers.** 2010. Structural and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium YcbL: an unusual Type II glyoxalase. *Protein Sci* **19**: 1897-1905.
178. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
179. **Studier, F. W.** 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**: 207-234.
180. **Subedi, K. P., D. Choi, I. Kim, B. Min, and C. Park.** 2011. Hsp31 of *Escherichia coli* K-12 is glyoxalase III. *Mol Microbiol* **81**: 926-936.
181. **Sukdeo, N., and J. F. Honek.** 2008. Microbial glyoxalase enzymes: metalloenzymes controlling cellular levels of methylglyoxal. *Drug Metabol Drug Interact* **23**: 29-50.
182. **Sun, J., R. Daniel, I. Wagner-Dobler, and A. P. Zeng.** 2004. Is autoinducer-2 an universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* **4**: 36.
183. **Surette, M. G., M. B. Miller, and B. L. Bassler.** 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1639-1644.

184. **Taga, M. E., S. T. Miller, and B. L. Bassler.** 2003. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **50**: 1411-1427.
185. **Taga, M. E., J. L. Semmelhack, and B. L. Bassler.** 2001. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **42**: 777-793.
186. **Taga, M. E., and K. B. Xavier.** 2011. Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. *Curr Protoc Microbiol Chapter 1*: Unit1C 1.
187. **Tang, K., and X. H. Zhang.** 2014. Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy. *Mar Drugs* **12**: 3245-3282.
188. **Teng, S. W., J. N. Schaffer, K. C. Tu, P. Mehta, W. Lu, N. P. Ong, B. L. Bassler, and N. S. Wingreen.** 2011. Active regulation of receptor ratios controls integration of quorum-sensing signals in *Vibrio harveyi*. *Mol Syst Biol* **7**: 491.
189. **Teng, S. W., Y. Wang, K. C. Tu, T. Long, P. Mehta, N. S. Wingreen, B. L. Bassler, and N. P. Ong.** 2010. Measurement of the copy number of the master quorum-sensing regulator of a bacterial cell. *Biophys J* **98**: 2024-2031.
190. **Thormann, K. M., S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa, and A. M. Spormann.** 2006. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J Bacteriol* **188**: 2681-2691.
191. **Thormann, K. M., R. M. Saville, S. Shukla, and A. M. Spormann.** 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol* **187**: 1014-1021.
192. **Thornalley, P. J.** 2003a. Glyoxalase I -structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans* **31**: 1343-1348.
193. **Totemeyer, S., N. A. Booth, W. W. Nichols, B. Dunbar, and I. R. Booth.** 1998. From famine to feast: the role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**: 553-562.
194. **Trovato, A., F. Seno, M. Zanardo, S. Alberghini, A. Tondello, and A. Squartini.** 2014. Quorum vs. diffusion sensing: a quantitative analysis of the relevance of absorbing or reflecting boundaries. *FEMS Microbiol Lett* **352**: 198-203.
195. **Tsuchikama, K., C. A. Lowery, and K. D. Janda.** 2011. Probing autoinducer-2 based quorum sensing: the biological consequences of molecules unable to traverse equilibrium states. *J Org Chem* **76**: 6981-6989.
196. **Tu, K. C., and B. L. Bassler.** 2007. Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev* **21**: 221-233.
197. **UniProt, C.** 2014. Activities at the universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **42**: D191-198.
198. **Uroz, S., S. R. Chhabra, M. Camara, P. Williams, P. Oger, and Y. Dessaux.** 2005. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology* **151**: 3313-3322.
199. **Uroz, S., Y. Dessaux, and P. Oger.** 2009. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *ChemBiochem* **10**: 205-216.
200. **Uroz, S., P. M. Oger, E. Chapelle, M. T. Adeline, D. Faure, and Y. Dessaux.** 2008. A *Rhodococcus qsdA*-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1357-1366.
201. **van Kessel, J. C., S. T. Rutherford, Y. Shao, A. F. Utria, and B. L. Bassler.** 2013. Individual and combined roles of the master regulators AphA and LuxR in control of the *Vibrio harveyi* quorum-sensing regulon. *J Bacteriol* **195**: 436-443.
202. **van Kessel, J. C., L. E. Ulrich, I. B. Zhulin, and B. L. Bassler.** 2013. Analysis of Activator and Repressor Functions Reveals the Requirements for Transcriptional Control by LuxR, the Master Regulator of Quorum Sensing in *Vibrio harveyi*. *MBio* **4**.

203. **Vendeville, A., K. Winzer, K. Heurlier, C. M. Tang, and K. R. Hardie.** 2005. Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 383-396.
204. **Visick, K. L.** 2005. Layers of signaling in a bacterium-host association. *J Bacteriol* **187**: 3603-3606.
205. **Wagner, P. L., and M. K. Waldor.** 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* **70**: 3985-3993.
206. **Wang, L., Y. Hashimoto, C. Y. Tsao, J. J. Valdes, and W. E. Bentley.** 2005. Cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein influence both synthesis and uptake of extracellular autoinducer 2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 2066-2076.
207. **Wang, L. H., Y. He, Y. Gao, J. E. Wu, Y. H. Dong, C. He, S. X. Wang, L. X. Weng, J. L. Xu, L. Tay, R. X. Fang, and L. H. Zhang.** 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* **51**: 903-912.
208. **Wang, L. H., L. X. Weng, Y. H. Dong, and L. H. Zhang.** 2004. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem* **279**: 13645-13651.
209. **West, S. A., K. Winzer, A. Gardner, and S. P. Diggle.** 2012. Quorum sensing and the confusion about diffusion. *Trends Microbiol* **20**: 586-594.
210. **Winson, M. K., M. Camara, A. Latifi, M. Foglino, S. R. Chhabra, M. Daykin, M. Bally, V. Chapon, G. P. Salmond, B. W. Bycroft, and et al.** 1995. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9427-9431.
211. **Winzer, K., K. R. Hardie, and P. Williams.** 2003. LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv Appl Microbiol* **53**: 291-396.
212. **Xavier, K. B., and B. L. Bassler.** 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* **6**: 191-197.
213. **Xavier, K. B., and B. L. Bassler.** 2005. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature* **437**: 750-753.
214. **Xavier, K. B., and B. L. Bassler.** 2005. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 238-248.
215. **Xavier, K. B., S. T. Miller, W. Lu, J. H. Kim, J. Rabinowitz, I. Pelczer, M. F. Semmelhack, and B. L. Bassler.** 2007. Phosphorylation and processing of the quorum-sensing molecule autoinducer-2 in enteric bacteria. *ACS Chem Biol* **2**: 9.
216. **Xu, D., X. Liu, C. Guo, and J. Zhao.** 2006. Methylglyoxal detoxification by an aldo-keto reductase in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC 7002. *Microbiology* **152**: 2013-2021.
217. **Xue, T., L. Zhao, H. Sun, X. Zhou, and B. Sun.** 2009. LsrR-binding site recognition and regulatory characteristics in *Escherichia coli* AI-2 quorum sensing. *Cell Res* **19**: 1258-1268.
218. **Yates, E. A., B. Philipp, C. Buckley, S. Atkinson, S. R. Chhabra, R. E. Sockett, M. Goldner, Y. Dessaux, M. Camara, H. Smith, and P. Williams.** 2002. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **70**: 5635-5646.
219. **Youk, H., and W. A. Lim.** 2014. Secreting and sensing the same molecule allows cells to achieve versatile social behaviors. *Science* **343**: 1242782.
220. **Zahid, M. S., S. M. Udden, A. S. Faruque, S. B. Calderwood, J. J. Mekalanos, and S. M. Faruque.** 2008. Effect of phage on the infectivity of *Vibrio cholerae* and emergence of genetic variants. *Infect Immun* **76**: 5266-5273.
221. **Zhou, Y., Y. Liang, K. H. Lynch, J. J. Dennis, and D. S. Wishart.** 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* **39**: W347-352.

-
222. **Zhu, J., and G. F. Kaufmann.** 2013. Quo vadis quorum quenching? *Curr Opin Pharmacol* **13**: 688-698.
223. **Zhu, P., H. Peng, N. Ni, B. Wang, and M. Li.** 2012. Novel AI-2 quorum sensing inhibitors in *Vibrio harveyi* identified through structure-based virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett* **22**: 6413-6417.

6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kirsten Jung für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die Möglichkeit, am Quorum Sensing Projekt diese Dissertation zu erarbeiten, für die persönliche Unterstützung und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei der gesamten Prüfungskommission und besonders bei Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann bedanken, der sich bereit erklärt hat, als Zweitgutachter diese Arbeit zu beurteilen.

Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Jürgen Lassak, der mich mit unzähligen Diskussionen und seinem nahezu unendlichen Fundus an Ideen motiviert und unterstützt hat; vielen Dank Dir dafür!

Großer Dank geht besonders an meine Mitstreiter im *Vibrio*-Labor Laure Plener und Nicola Lorenz, sowie an „meinen“ HiWi Ralph Krafczyk. Herzlichen Dank für Eure uneingeschränkte Unterstützung, die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima, In diese Runde einschließen möchte ich meinen Büro-Arbeitsplatz-Nachbarn Poldi Fried: Danke für Alles!

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Kirsten Jung, Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung und Herrn PD Dr. Ralf Heermann. Die Gruppendynamik und das Arbeitsklima waren zu jeder Zeit sehr angenehm. Ich habe die Zeit mit Euch allen sehr genossen.

Schließlich darf ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich zu allen Zeiten unterstützt.

„Für seine Arbeit muss man Zustimmung suchen, aber niemals Beifall.“

Charles-Louis de Montesquieu