

**Phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen  
der Interaktionen in gemischten Biofilmen**

von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik  
der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Frauke Gina Purschke  
aus München

Hauptberichter: PD Dr. Steffen Rupp  
Mitberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Tag der mündlichen Prüfung: 07. August 2012

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2012



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	5
Abstract	6
1 Einleitung	7
1.1 Vorkommen von Biofilmen	7
1.2 Entwicklung von Biofilmen	10
1.3 Quorum sensing	12
1.4 Biofilmbildung in <i>Candida albicans</i>	17
1.5 Biofilmbildung in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
1.6 Interaktionen zwischen <i>Candida albicans</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.7 Biofilmbildung in <i>Escherichia coli</i>	23
1.8 Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Organismen und Wachstumsbedingungen	27
2.2 Verfahren zur Kultivierung von Biofilmen	29
2.3 Quantitative Messungen von Biofilmen	30
2.3.1 Aktivitätsbestimmung in Biofilmen mittels Fluoreszeindiacetat	30
2.3.2 Aktivitätsbestimmung in Biofilmen mittels XTT	31
2.3.3 Markierung mit Carboxynaphthofluorescein succinimidyl Ester	31
2.4 Konstruktion von mutierten Stämmen	32
2.4.1 Herstellung von Reporterstämmen in <i>Candida albicans</i>	33
2.4.2 Herstellung von Reporterstämmen in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.4.3 Herstellung von Deletionsmutanten und Reporterstämmen in <i>Escherichia coli</i>	35
2.5 Isolierung genomischer DNS	36
2.6 Southern Blot Analyse	36
2.7 Isolierung von RNS	38

---

2.8	Quantitative <i>real time</i> PCR	38
2.9	Präparation von Proteinen aus Zelllysaten	39
2.10	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.11	Western Blot Analyse	40
2.12	Isolierung sekretierter Proteine	40
2.13	Identifizierung sekretierter Proteine mittels Massenspektrometrie	41
2.14	Analyse von Pyoverdin	43
2.15	Mikroskopie	43
2.15.1	Fluoreszenzmikroskopie	43
2.15.2	Rasterelektronenmikroskopie	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Untersuchungen der Interaktionen von <i>Candida albicans</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
3.1.1	Optimierung der Wachstumsbedingungen für Biofilme	45
3.1.2	Etablierung eines <i>in vitro</i> Assays zur quantitativen Untersuchung von Biofilmen	48
3.1.3	Einfluss von Quorum sensing Molekülen auf Biofilme von <i>C. albicans</i> und <i>P. aeruginosa</i>	50
3.1.4	Vergleich der metabolischen Aktivität von <i>C. albicans</i> zwischen einzelnen und gemischten Biofilmen	52
3.1.5	Analyse der von gemischten Biofilmen sekretierten Proteine im Vergleich zu <i>C. albicans</i> und <i>P. aeruginosa</i> Biofilmen	55
3.1.6	Identifizierung und Beobachtungen zur Produktion von Pyoverdin	68
3.1.7	Entwicklung von Reporterstämmen zum Nachweis von Biofilmen und der Detektion von Quorum sensing Molekülen	71
3.1.7.1	Auswahl der Reportergene	71
3.1.7.2	Auswahl der Promotoren für Reporterstämmen in <i>C. albicans</i>	72
3.1.7.3	Integration des Reportergens in <i>C. albicans</i>	74
3.1.7.4	Validierung der Reporterstämmen	76
3.1.7.5	Einsetzen der <i>C. albicans</i> Reporterstämmen	79
3.1.7.6	Auswahl der Promotoren für Reporterstämmen in <i>P. aeruginosa</i>	82
3.1.7.7	Integration des Reportergens in <i>P. aeruginosa</i>	84
3.1.7.8	Validierung der Reporterstämmen	84
3.1.7.9	Einsetzen der <i>P. aeruginosa</i> Reporterstämmen	87

---

3.2	<i>Escherichia coli</i> als Reporter für AI-2	90
3.2.1	Anpassung der Wachstumsbedingungen und des <i>in vitro</i> Assays	90
3.2.2	Entwicklung von Reporterstämmen in <i>Escherichia coli</i>	92
3.2.3	Validierung und Einsetzen der <i>E. coli</i> Reporterstämmen	96
4	Diskussion	99
4.1	Verhalten von <i>C. albicans</i> und <i>P. aeruginosa</i> in gemischten Biofilmen im Vergleich zu reinen Biofilmen	99
4.2	Auswirkungen der Quorum sensing Moleküle auf Monospezies-Biofilme	100
4.3	Online Beobachtung von Biofilmen	101
4.3.1	Detektion von <i>C. albicans</i> und <i>P. aeruginosa</i> anhand der produzierten Quorum sensing Moleküle	101
4.3.2	Nachweis von AI-2 produzierenden Mikroorganismen unter Verwendung von <i>E. coli</i>	103
4.4	Weitere Interaktionen zwischen <i>C. albicans</i> und <i>P. aeruginosa</i>	104
5	Literaturverzeichnis	111
	Abkürzungsverzeichnis	126
	Abbildungsverzeichnis	128
	Tabellenverzeichnis	130
	Anhang	131
	Danksagung	147
	Lebenslauf	149
	Erklärung	151



## Zusammenfassung

Die Mehrheit der Mikroorganismen lebt in ihrer natürlichen Umgebung in Biofilmen, oberflächenassoziierten Lebensgemeinschaften, die normalerweise von einer extrazellulären Matrix umgeben sind. Die meisten Biofilme werden nicht von einzelnen sondern mehreren Spezies gebildet, die in den Biofilmen nicht nur miteinander kooperieren, sondern auch um vorhandene Nährstoffe konkurrieren. Die Gram-negative Bakterienspezies *Pseudomonas aeruginosa* und der polymorphe Pilz *Candida albicans* sind zwei opportunistisch Pathogene, die oft in Co-Existenz in einem humanen Wirt nachgewiesen werden. Verschiedene Modelle antagonistischen Verhaltens wurden für diese Organismen in gemischten Biofilmen berichtet. Um diese Interaktionen zwischen *P. aeruginosa* und *C. albicans* genauer zu erforschen, wurde der Einfluss der Quorum sensing Moleküle untersucht. Hierfür wurde ein *in vitro* Assay etabliert, der eine einfache und schnelle Detektion von Veränderungen in der Ausprägung von Biofilmen erlaubt. Während sowohl Überstände als auch nur das für die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* wichtige Quorum sensing Molekül *N*-3-oxododecanoyl-homoserinlacton die Biofilmbildung von *C. albicans* unterdrücken, wirkt Farnesol, der Pilz-Autoinducer, zwar inhibierend auf die Adhärenz, aber verstärkend auf bereits bestehende bakterielle Biofilme. Zur weiteren Charakterisierung dieser Interaktion wurde das Sekretom einzelner und gemischter Biofilme zu verschiedenen Zeitpunkten mit MALDI-TOF MS/MS analysiert. Insgesamt wurden 247 unterschiedliche Proteine identifiziert, von denen 170 *P. aeruginosa* und 77 *C. albicans* zugeordnet werden konnten. *P. aeruginosa* sekretierte in Anwesenheit von *C. albicans* Virulenzfaktoren wie das Exotoxin A sowie Proteine der Stoffwechselwege zur Eisenerfassung wie das Pyochelin-Biosynthese-Protein PchD und den Ferripyoverdin-Rezeptor FpvA. Außerdem wurde in gemischten Biofilmen jedoch nicht in rein bakteriellen Biofilmen das Siderophor Pyoverdin identifiziert, das Eisen mit großer Affinität bindet. Dieses deutet darauf hin, dass *P. aeruginosa* in Konkurrenz mit *C. albicans* die Wege zur Eisenaufnahme induziert. Von *C. albicans* dagegen wird der Metabolismus reprimiert, inklusive der detektierten eisenbindenden Proteine. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mikroorganismen nicht nur mit dem Wirt um essentielle Nährstoffe konkurrieren, sondern auch mit der vorhandenen Mikroflora.

Die transkriptionellen Veränderungen während der Ausbildung von Biofilmen wurden genutzt, um Reporterstämme in *C. albicans*, *P. aeruginosa* und dem nicht-pathogenen *E. coli* herzustellen, welche die Bildung von Biofilmen anzeigen. Mit Hilfe dieser Stämme können Quorum sensing Moleküle anderer Mikroorganismen detektiert werden. Gemeinsam mit dem *in vitro* Assay steht mit diesen Stämmen eine Toolbox zur Verfügung, um Biofilme und Einflüsse auf diese zu charakterisieren.

## Abstract

The majority of microorganisms persist in nature as surface-attached communities often surrounded by an extracellular matrix, called biofilms. Most natural biofilms are not formed by a single species but by multiple species. Microorganisms do not only cooperate as in some multi-species biofilms but also compete about available nutrients. The Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and the polymorphic fungus *Candida albicans* are two opportunistic pathogens that are often found coexisting in a human host. Several models of mixed biofilms have been reported for these organisms showing antagonistic behavior. To investigate the interaction of *P. aeruginosa* and *C. albicans* in more detail, the influence of the respective quorum sensing molecules was analyzed. Therefore an *in vitro* assay was established to detect easily and fast modifications of biofilm development. Supernatants as well as the main biofilm regulating quorum sensing molecule *N*-3-oxo-dodecanoylhomoserine lactone of *P. aeruginosa* itself repressed biofilm formation of *C. albicans*, while the fungal autoinducer farnesol inhibited adhesion but induced bacterial biofilms. Additionally the secretome of single and mixed biofilms of both organisms was analyzed at several time points using MALDI-TOF MS/MS. Over all 247 individual proteins were identified, 170 originated from *P. aeruginosa* and 77 from *C. albicans*. Most interestingly, *P. aeruginosa* in the presence of *C. albicans* secreted virulence factors such as exotoxin A and iron acquisition systems, like the pyochelin biosynthesis protein PchD and the ferripyoverdine receptor FpvA. In addition the high affinity iron-binding siderophore pyoverdine was identified in mixed biofilms but not in bacterial biofilms, indicating that *P. aeruginosa* increases its capability to sequester iron in competition with *C. albicans*. In contrast, *C. albicans* metabolism was significantly reduced, including a reduction in detectable iron acquisition proteins. The results obtained in this study show that microorganisms not only compete with the host for essential nutrients but also strongly with the present microflora in order to gain a competitive advantage.

Transcriptional changes during growth as biofilms were used to construct reporter strains in *C. albicans*, *P. aeruginosa*, and the non-pathogenic *E. coli*, which indicate formation of biofilms. These strains can be used to detect the presence of Quorum sensing molecules produced by other microorganisms. Together with the *in vitro* assay the reporter strains are available as toolbox to characterize biofilms and influences on these.

# 1 Einleitung

Lange wurden Mikroorganismen überwiegend während planktonischem Wachstum analysiert. Die mikrobiologische Forschung fokussierte sich dabei auf die Erforschung und Charakterisierung einzelner planktonisch wachsender Bakterien- und Pilzspezies. Heutzutage ist es jedoch allgemein anerkannt, dass Mikroorganismen in der Natur überwiegend als Biofilme vorkommen, was oft grundlegende Veränderungen im Verhalten und Metabolismus dieser Spezies zur Folge hat. Seit der ersten Beschreibung von Biofilmen 1936 (ZoBell & Anderson, 1936) steigt die Anzahl von Publikationen mit dem Schlagwort „Biofilm“ jedes Jahr an, woraus man auf die Bedeutung dieser Wachstumsform schließen kann (Abbildung 1.1). Biofilme werden definiert als von Matrix umgebene Populationen von Mikroorganismen, die auf anorganischen oder biologischen Oberflächen, sowie aneinander adhären (Costerton *et al.*, 1995).

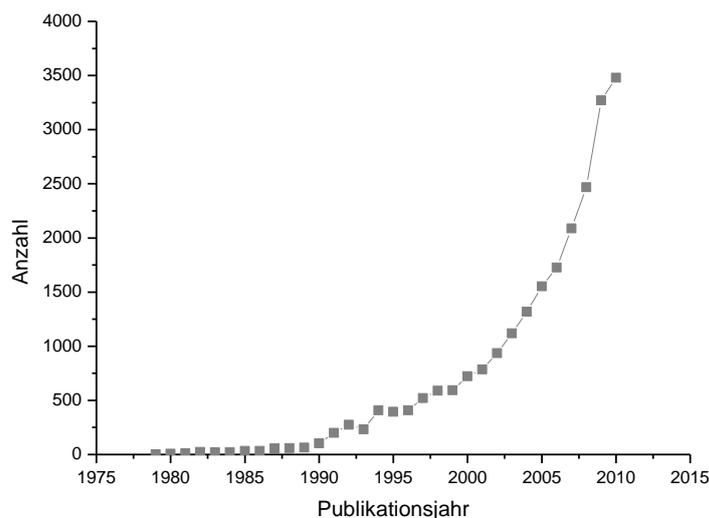


Abbildung 1.1. Anzahl der Publikationen mit dem Begriff "Biofilm" pro Jahr (<http://apps.isiknowledge.com>).

## 1.1 Vorkommen von Biofilmen

Biofilme sind in der Natur allgegenwärtig und beherrschen gewissermaßen jedes mit ausreichend Nährstoffen versehene Milieu. Auch unter extremen Bedingungen, wie z. B. in heißen Quellen und Gletschern sowie im Alkalischen und Sauren, können Biofilme bestehen. Als wesentlicher Bestandteil der globalen Kreisläufe von Sauerstoff, Kohlenstoff und Stickstoff aber auch von Schwefel und Phosphor sind sie von ökologischer Bedeutung. Auch an der Selbstreinigung von Gewässern sind Biofilme

beteiligt, da sie durch Biodegradation von Giften und das Verhindern von Verschmutzungen zur Aufrechterhaltung der Wasserqualität beitragen. Aus diesem Grund werden immobilisierte Mikroorganismen zur Abwasserreinigung in Klärwerken und bei der biologischen Abfallbehandlung eingesetzt, um organische Abfälle umzusetzen. Sogar bei Ölkatastrophen wird auf biologische Reinigung der Ozeane durch Bioremediation gesetzt. Außerdem tragen in Reaktoren immobilisierte Mikroorganismen zur Verbesserung von Produktivität und Stabilität von Fermentationsprozessen von Produkten wie Ethanol, Essigsäure oder Polysacchariden bei. Doch profitiert die Industrie nicht nur von Biofilmen sondern muss auch Kontaminationen von Wasser und Lebensmitteln, Arzneimitteln und Kosmetika durch Biofilme verhindern. Biofilme können in Trinkwassersystemen zu verminderten Fließgeschwindigkeiten und –umsatz führen, sowie Verstopfungen in Rohrsystemen verursachen, was durch Erhöhung von Energieverbrauch und Verringerung der Betriebseffizienz Kosten verursacht. Auch Biokorrosion und Biofouling in Wärmeaustauschern und Kühltürmen wird in Gegenwart von Biofilmen vermehrt beobachtet, was zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden führt (Kumar & Anand, 1998).

Auf und in höheren Lebewesen, wie Pflanzen oder Tieren sind Biofilme ebenfalls vertreten. Als Teil der normalen Haut-, Mund- und Darmflora tragen apathogene Biofilmpopulationen zur Reifung des Immunsystems bei und unterstützen beispielsweise die Verdauung. Außerdem dienen diese als eine Art Schutzschild zur Verhinderung der Besiedelung durch potentiell gefährliche Mikroorganismen. Der bekannteste Biofilm befindet sich auf der Zahnoberfläche. Vor allem *Streptococcus spp.* besiedelt unsere Zähne und ermöglicht die Ansiedelung anderer Mikroorganismen, was zu Zahnerkrankungen wie Parodontitis und Gingivitis führen kann.

Diese offensichtliche Problematik führte dazu, dass sich die Wissenschaft auf die Erforschung der Biofilmstruktur und –funktion fokussierte und Modellsysteme hierfür entwickelt wurden (Guggenheim *et al.*, 2001). Auch das Auftreten von Lungenentzündungen verursacht durch *Pseudomonas aeruginosa* in an Zystischer Fibrose erkrankten Patienten wird auf Biofilme zurückgeführt (Govan & Deretic, 1996). Eine weitere bekannte Erkrankung, die mit Biofilmen in Zusammenhang gebracht wird, ist die chronische Mittelohrentzündung *Otitis media*. Diese ist aufgrund von Schwierigkeiten, Biofilm residierende Bakterien mit gängigen Labormethoden zu kultivieren, schwer zu diagnostizieren (Dingman *et al.*, 1998). Diese Beispiele verdeutlichen, welche Bedeutung Biofilme bei humanen Erkrankungen einnehmen. An 65% aller durch Mikroorganismen hervorgerufenen humanen Infektionen sind Biofilme beteiligt (Donlan, 2002). Auch bei Kontaminationen medizinischer Geräte sind Biofilme nicht zu unterschätzen. Biofilme auf künstlichen Herzklappen sind verantwortlich für Endocarditis Erkrankungen, die zu 70% tödlich enden (Hyde *et al.*, 1998). Katheter, wie

z. B. intravenöse oder Blasenkatheter, dienen Biofilmen ebenfalls als besiedelbare Oberfläche. Einige Beispiele von Krankheiten und Infektionen mit den beteiligten Mikroorganismen sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1. Humane Infektionen, die mit Biofilmen assoziiert werden (Donlan & Costerton, 2002; Fux *et al.*, 2005).

<b>Infektion oder Krankheit</b>	<b>beteiligte Mikroorganismen</b>
Karies	<i>Streptococcus spp.</i> , säurebildende Kokken, <i>Candida spp.</i>
Periodontitis	Gram-negative anaerobe Bakterien
Otitis media	<i>Haemophilus influenza</i>
chronische Mandelentzündung	verschiedene Spezies
Zystische Fibrose Pneumonie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Endokarditis	<i>Streptococcus viridans</i> , Staphylokokken
nekrotisierende Fasziiitis	Gruppe A Streptokokken
Muskel-Skelett Infektionen	Gram-positive Kokken
Osteomyelitis	verschiedene Spezies
Gallenwegsinfektionen	Darmbakterien
infektiöse Lebersteine	Gram-negative stabförmige Bakterien
bakterielle Prostatitis	Gram-negative Bakterien
<b>Infektionen assoziiert mit medizinischen Materialien</b>	
Kontaktlinsen	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Gram-positive Kokken
Naht	Staphylokokken
Beatmungs-assoziierte Pneumonie	Gram-negative stabförmige Bakterien
prothetische Herzklappen	Staphylokokken, <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Candida albicans</i>
Arterienprothese	Staphylokokken, <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
endovaskuläre Katheterinfektionen	Staphylokokken
Zerebrospinalflüssigkeit Shunt	Staphylokokken, <i>C. albicans</i> , <i>Cryptococcus</i>
Peritonealdialyse Peritonitis	verschiedene Spezies
Blasenkatheter Infektionen	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus spp.</i> ( <i>E. coli</i> ), Staphylokokken, <i>Candida spp.</i>

---

Intrauterinpeppar	<i>Actinomyces israelii</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , Staphylokokken
orthopädische Prothesen	Staphylokokken, <i>C. albicans</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i>

---

Nun stellt sich die Frage, was in Biofilmen wachsende Mikroorganismen in die Lage versetzt, lebensbedrohende Infektionen zu verursachen. Die Prävalenz von Biofilmen in Infektionen und auf medizinischen Gerätschaften ist unter anderem die Folge einer bis zu 1000-fach erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln von in Biofilmen lebenden Mikroorganismen verglichen mit planktonisch wachsenden. Diese Resistenz ist multifaktoriell begründet und auf biofilmspezifische Phänotypen zurückzuführen. Zum Teil werden Antibiotika durch extrazelluläre Polymere und Enzyme inaktiviert. Außerdem ist in Biofilmen die Diffusion durch die räumlich dichte Anordnung herabgesetzt und die Wachstumsrate aufgrund von geringen Nährstoffangeboten reduziert (Gilbert *et al.*, 1997). Da einige häufig verschriebene Antibiotika nicht bakteriozid sondern bakteriostatisch sind, haben diese wenig Effekt auf in Biofilmen lebende Bakterien. Die verringerte Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Mitteln wird weiterhin durch einen vermehrten Austausch von Resistenzgenen innerhalb von Biofilmen und erhöhter Mutabilität verstärkt (Driffield *et al.*, 2008; Molin & Tolker-Nielsen, 2003). Die gesteigerte Konjugationsrate deutet auf Evolutionsvorgänge durch horizontalen Gentransfer hin. Außerdem sind in Biofilmen residierende Mikroorganismen vor Einflüssen aus der Umgebung geschützt, vor allem vor Angriffen des humanen Immunsystems (Fux *et al.*, 2005). Die Produktion von Exotoxinen durch Bakterien in Biofilmen könnte für gesteigerte Entzündungsparameter verantwortlich sein. Darüber hinaus ermöglicht die Freisetzung von Zellen oder Mikrokolonien aus Biofilmen die Besiedelung weiterer Habitate und führt teilweise zu Blutbahninfektionen (Donlan & Costerton, 2002).

Mit einem erweiterten Verständnis der Vorkommen in Biofilmen und der Mechanismen, die für die Entstehung von Biofilmen essentiell sind, können Biofilme auf der einen Seite vermehrt genutzt werden, auf der anderen Seite durch Biofilme verursachte Infektionen verhindert werden.

## 1.2 Entwicklung von Biofilmen

Die Ausbildung eines Biofilms folgt einem Entwicklungsprozess mit verändertem Genexpressionsprofil, während dem die Mikroorganismen multizelluläre Strukturen mit individuellen Architekturen ausbilden, manchmal bis hin zu zellulärer Differenzierung (Abbildung 1.2).

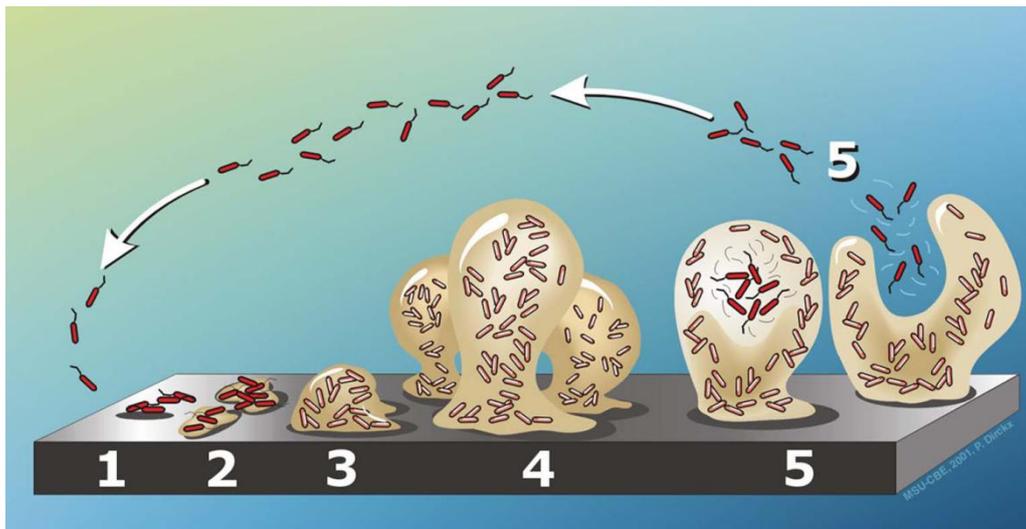


Abbildung 1.2. Stadien der Biofilmbildung (Annual Reviews, vol. 56, 2002).

Der reversiblen Anlagerung von Zellen an abiotische oder lebende Oberflächen (1) folgt die Ausbildung eines Monolayers (2) und die Bildung von Mikrokolonien (3). Der Biofilm reift mit Vermehrung der Biomasse (4) und dispergiert letztendlich zur Kolonisierung anderer Habitate (5).

Die Entwicklung eines Biofilms beginnt mit der Anlagerung von Zellen an anorganische oder organische Oberflächen (Abbildung 1.2\_1). Diese reversible Besiedelung ist abhängig von Material und Struktur der Oberfläche und den Umgebungsbedingungen. In Gram-negativen Bakterien sind Motilitätselemente wie Flagellen und Pili essentiell für die Kolonisierung, da gezeigt wurde, dass Mutanten in *P. aeruginosa* und *Vibrio cholerae* mit entsprechenden genetischen Defekten (*sad* – *surface attachment defective*) nicht adhärenzfähig sind (O'Toole & Kolter, 1998a; Watnick *et al.*, 2001). Flagellen werden als molekulare Ankerproteine Adhäsion-ähnliche Funktionen zugeschrieben, die mit spezifischen Oberflächenstrukturen interagieren, um abstoßende Kräfte zu überwinden und die Anheftung zu ermöglichen (Lawrence *et al.*, 1987). Die Anlagerung Gram-positiver Bakterien und Pilze wird durch spezifische Adhäsine an der Zelloberfläche vermittelt (Nobile & Mitchell, 2006). Diese fungieren weiterhin als Rezeptoren für transkriptionelle Regulationsvorgänge zur optimalen Anpassung an die Umgebung (Cleary & Retnoningrum, 1994). In *P. aeruginosa* wurde gezeigt, dass die Expression des für die Alginsynthese als Teil der extrazellulären Matrix unerlässlichen Proteins AlgC in adhätierenden Zellen im Vergleich zu planktonisch wachsenden hochreguliert wird (Davies & Geesey, 1995). Mit dem Kontaktieren der Oberfläche wird mittels des Sigmafaktors  $\sigma^{22}$  die Synthese der Flagellen parallel reprimiert (Garrett *et al.*, 1999). Daraus folgt durch Änderung der Bewegungsart vom Flagellen vermittelten Schwimmen zum gemeinschaftlichen *Twitching* mittels Typ IV Pili die Ausbildung eines Monolayers (Abbildung 1.2\_2) (Semmler *et al.*, 1999). Durch Anlagerung planktonischer und Vermehrung Biofilm-residierender Zellen sowie *Twitching* Motilität findet eine Reorganisation der Mikroben

zu stetig wachsenden Mikrokolonien statt (Abbildung 1.2\_3). Während der frühen Phasen der Mikrokolonieformation befinden sich die Zellen in enger räumlicher Nähe, was einen interzellulären Genaustausch begünstigt und die Aufnahme extrazellulärer DNS, freigesetzt von lebenden oder sogar toten Zellen, ermöglicht (Li *et al.*, 2001). Geschützt durch extrazelluläre polymere Substanzen reift der Biofilm unter Zunahme der Biomasse (Abbildung 1.2\_4). Die Architektur der Biofilme ist Spezies spezifisch und von Umgebungsbedingungen wie dem Nährstoffangebot abhängig. In den vertikalen Gradienten von Nahrungs- und Sauerstoffversorgung scheinen schichtweise metabolische Aktivitäten, vermehrte Mutationsraten und genetischer Austausch begründet zu sein, was gelegentlich zu Resistenzen führt (Høiby *et al.*, 2010). Es gibt Berichte, dass gemischte Biofilme, die in Fließzellen unter turbulenten Strömungen wachsen, nur zu 15 – 20% aus Bakterienzellen und bis zu 80% aus extrazellulärer Matrix bestehen (Stoodley *et al.*, 1998). Diese Matrix besteht aus durch zweiwertige Ionen vernetzten Polysacchariden, Proteinen und DNS und bietet dem Biofilm strukturelle Stabilität und Schutz. Durch Einlagerung großer Mengen an Wasser verhindert die Matrix außerdem das Austrocknen des Biofilms und trägt durch Erschwerung der Diffusion zur Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen bei (Donlan & Costerton, 2002). Aus reifen Biofilmen lösen sich kontinuierlich Zellen oder Mikrokolonien, um andere Orte zu besiedeln und das Habitat zu vergrößern (Abbildung 1.2\_5). Diese Dispersion kann aufgrund von Ablösung aktiv wachsender Zellen aus dem Biofilm z. B. bei Nährstofflimitierung oder Abscheren von Zellaggregaten hervorgerufen durch Strömungseffekte und Scherkräfte erfolgen (Stoodley *et al.*, 2001).

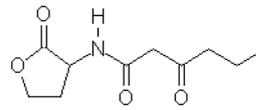
### 1.3 Quorum sensing

Die Ausbildung von Biofilmen ist ein dynamischer Prozess, der mittels chemischer Kommunikation zwischen den Organismen koordiniert wird und als Quorum sensing bezeichnet wird (lat. quorum „von denen“; mindeste Anzahl an Stimmen, die für das Treffen einer Entscheidung benötigt werden). Die Konzentration dieser Quorum sensing Moleküle ist von der Anzahl der Mikroorganismen in der Umgebung abhängig und lässt auf die Zelldichte schließen. Mit dem Erreichen eines Schwellenwertes werden bestimmte Gene aktiviert oder reprimiert, was zur Bildung strukturierter Biofilme führt (Hogan, 2006). Auch andere dichteabhängige Verhaltensweisen wie Biolumineszenz, die Expression von Virulenzfaktoren, Motilität, Sporulation oder *mating* werden über Quorum sensing Moleküle reguliert. Die Signalmoleküle sind im Allgemeinen spezies- oder stammspezifisch und strukturell vielfältig (Tabelle 1.2).

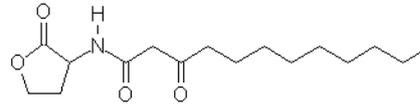
Tabelle 1.2. Chemische Strukturen von Autoinduktoren.

**Acyl-Homoserinlactone**

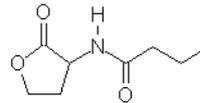
*Vibrio fischeri* / LuxI  
N-3-oxo-hexanoyl-L-homoserinlacton



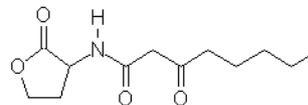
*Pseudomonas aeruginosa* / LasI  
N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserinlacton



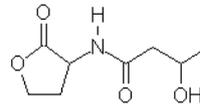
*Pseudomonas aeruginosa* / RhII  
N-butanoyl-L-homoserinlacton



*Agrobacterium tumefaciens* / TraI  
N-3-oxo-octanoyl-L-homoserinlacton



*Vibrio harveyi* / LuxLM  
3-hydroxy-butanoyl-L-homoserinlacton



**Oligopeptide**

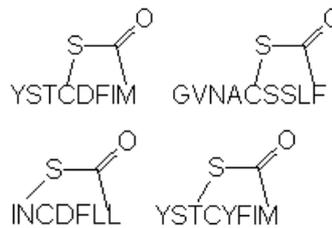
*Bacillus subtilis*  
ComX



*Streptococcus pneumoniae*  
CSP (competence stimulating peptide)

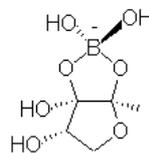


*Staphylococcus aureus*  
AIP I-IV (autoinducing peptides)



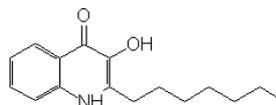
**Autoinducer-2**

*Vibrio harveyi* / LuxS  
Tetrahydroxytetrahydrofuranborat



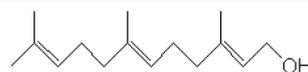
**Weitere bakterielle Signalmoleküle**

*Pseudomonas aeruginosa*  
PQS (Pseudomonas quinolone signal)



**Autoinduktoren von Pilzen**

*Candida albicans*  
Farnesol





Betrachtet man die chemische Struktur von HSL, die von verschiedenen Gram-negativen Bakterien verwendet werden, wie in Tabelle 1.2 dargestellt, ist es nicht verwunderlich, dass einige Mikroorganismen in der Lage sind, auch fremde HSL zu erkennen. Diese Eigenschaft wird in der Forschung zur Detektion von HSL mittels Biosensoren genutzt, beispielsweise kommen hier Stämme von *Chromobacterium violaceum*, *Agrobacterium tumefaciens* oder *Sinorhizobium meliloti* zum Einsatz (Kawaguchi *et al.*, 2008; Llamas *et al.*, 2004; McClean *et al.*, 1997).

Gram-positive Bakterien verwenden typischerweise modifizierte Peptide als Signalmoleküle. Diese AIPs (*autoinducing peptide*) bestehen normalerweise aus 5 – 17 Aminosäuren mit veränderten Seitengruppen, wie Isopren-Gruppen oder Thiolacton-Ringen (Tabelle 1.2), und werden schrittweise aus Vorläuferpeptiden modifiziert. Aktiv aus der Zelle exportiert, interagieren sie mit der externen Domäne Membran gebundener Sensorproteine, Zwei-Komponenten-Signaltransduktions-Proteinen. Das Signal wird durch Phosphorylierung an ein Responsregulator-Protein übertragen, was zu veränderter DNS-Bindungsaktivität und der Transkription spezifischer Zielgene führt (Hakenbeck & Stock, 1996) (Abbildung 1.4).

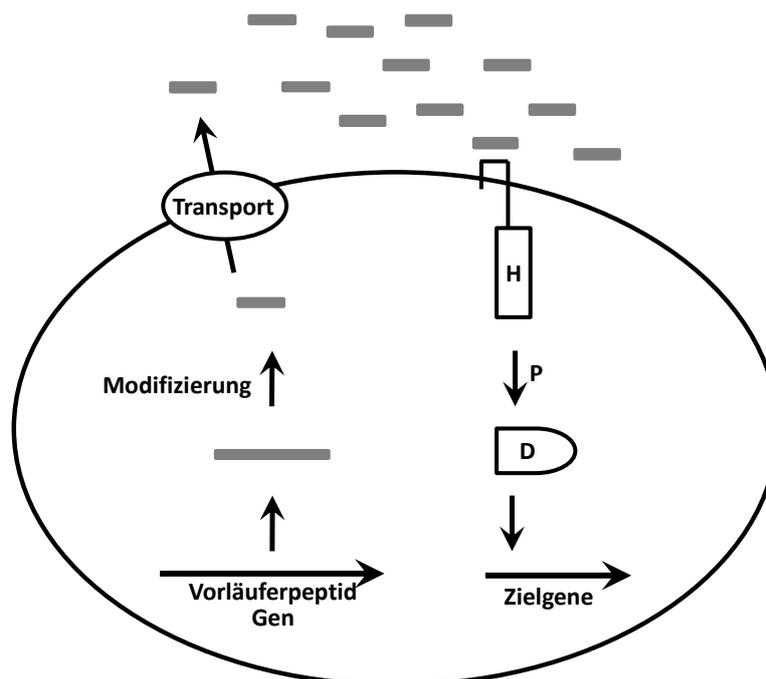


Abbildung 1.4. Quorum sensing in Gram-positiven Bakterien (nach Bassler, 2002).

Quorum sensing mittels HSL oder AIPs fördert die Kommunikation innerhalb einzelner Spezies, da diese Moleküle für eine Bakterienart spezifisch sind und LuxR-Typ-Proteine und Zwei-Komponenten-Rezeptoren ausschließlich ihre Autoinduktoren erkennen. Es gibt jedoch in einigen Bakterien mehr als ein Quorum sensing System und einige

Zelldichte abhängige Phänotypen werden auch von verschiedenen Signalmolekülen reguliert. *Vibrio harveyi*, ein marines Bakterium, verfügt über zwei Quorum sensing Systeme, einen HSL Autoinducer 1 (AI-1) und einen Autoinducer 2 (AI-2), ein Furanosylboratdiester (Tabelle 1.2). AI-1 wird durch LuxLM produziert, jedoch durch LuxN, ein Hybrid Sensor kinase / Responsregulator Protein, aktiv transportiert (Bassler *et al.*, 1993). AI-2 wird durch LuxS aus SAM zu 4,5-dihydroxy-2,3-pentadion (DPD) synthetisiert, das, abhängig von der Verfügbarkeit von Bor, spontan zu verschiedenen funktionellen Molekülen reagiert (Surette *et al.*, 1999) (Abbildung 1.5). Das Bindeprotein LuxN und das Hybrid Sensor kinase / Responsregulator LuxQ tragen gemeinsam zur Detektion von AI-2 bei. Signale von LuxN und LuxQ werden an ein Integratorprotein LuxU weitergeleitet, das wiederum einen Transkriptionsaktivator LuxO phosphoryliert, der die Expression des Luziferase-Operons reguliert (Schauder *et al.*, 2001). Für Untersuchungen von AI-2 Produzenten wurden Biosensoren in *Vibrio harveyi* hergestellt (Bassler *et al.*, 1997). Autoinduktoren identisch oder ähnlich zu AI-2 werden mittels LuxS von über 30 Spezies produziert, unter anderem von *Escherichia coli* (MG1655, O157:H7), *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* und *Bacillus subtilis*, was auf die Funktion von AI-2 als universelles Signal hindeutet (Surette *et al.*, 1999).

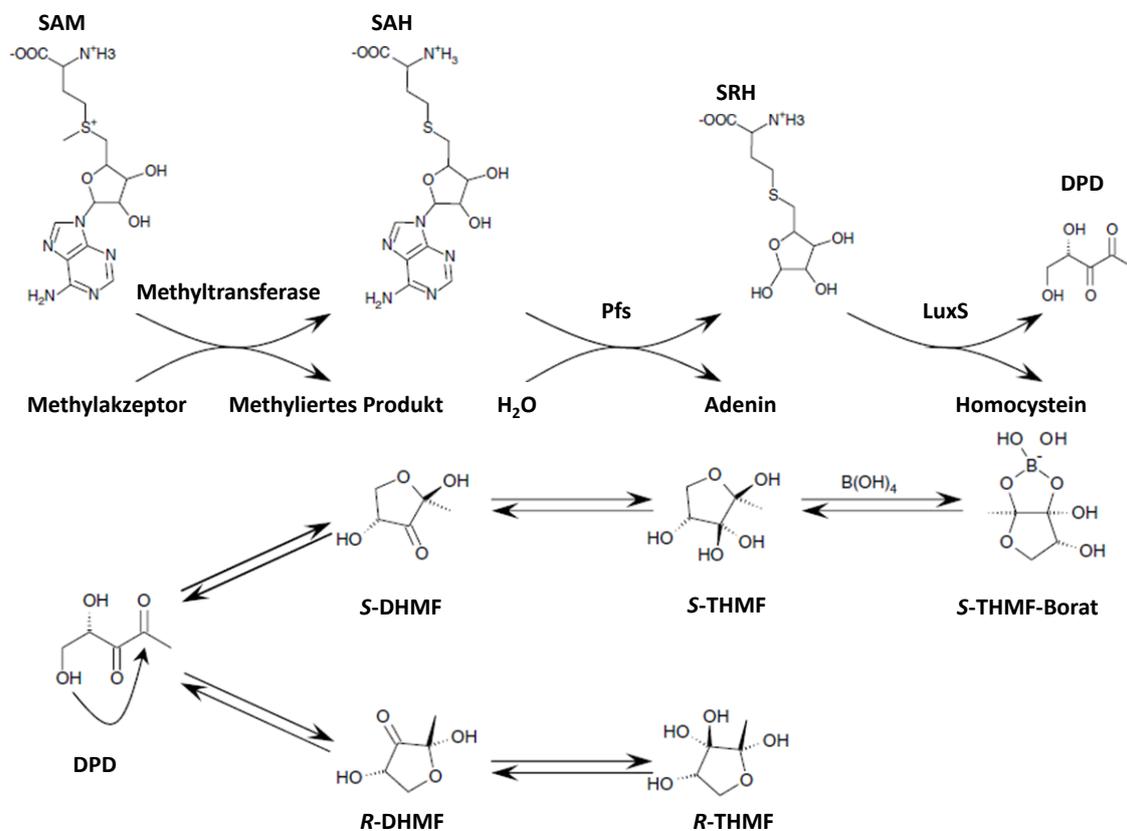


Abbildung 1.5. Biosynthese des Autoinducer 2 (Defoirdt *et al.*, 2007).

Zelldichte abhängige Regulationen kontrolliert durch Quorum sensing werden nicht nur von Bakterien verwendet, sondern sind auch in diversen Pilzarten verbreitet. Beispielsweise *mating*, Pathogenese und Biofilmbildung werden durch Quorum sensing beeinflusst. In Pilzen wird der morphologische Wechsel zwischen Hefen- und Hyphenwachstum abhängig von Umweltbedingungen, beispielsweise der Verfügbarkeit von Stickstoff, durch Quorum sensing reguliert. Der dichteabhängige Einbau von  $\alpha$ -1,3-Glucan in die Zellwand von *Histoplasma capsulatum* erfolgt reguliert durch ein unbekanntes Molekül (Kügler *et al.*, 2000). Wachsende Zellen von *Ceratomyces ulmi* sekretieren ein unbekanntes Quorum sensing Molekül, das den morphologischen Wandel von Hyphen- zu Hefenwachstum auslöst (Hornby *et al.*, 2004). In *Cryptococcus neoformans* wurde ein *qsp1*-kodierte Peptid gefunden (Tabelle 1.2), das die Wachstumsinhibition bei geringer Zelldichte überwindet, zumindest in einem *tup1*-Deletionsstamm (Lee *et al.*, 2007a). Als Antwort auf Stickstoffmangel werden von *Saccharomyces cerevisiae* abhängig von der Zelldichte die aromatischen Alkohole Phenylethanol und Tryptophol sekretiert, die durch Hochregulation des GPI-verankerten Oberflächenproteins Flo11 die Morphogenese stimulieren (Chen & Fink, 2006). Auch das  $\alpha$  /  $\alpha$  Faktor abhängige *mating* von *S. cerevisiae* wird manchmal als Quorum sensing klassifiziert, obwohl es unabhängig von der Zelldichte ist (Hogan, 2006). Quorum sensing in Pilzen wurde allerdings am besten in dem opportunistisch humanpathogenen Pilz *Candida albicans* charakterisiert.

#### 1.4 Biofilmbildung in *Candida albicans*

Der Pilz *Candida albicans* wird der Ordnung *Saccharomycetales* der Abteilung *Ascomycota* zugeordnet. Innerhalb der mikrobiellen Population, die den Menschen besiedelt, ist *C. albicans* der am häufigsten nachgewiesene Pilz und kann von ca. 70% der gesunden Bevölkerung isoliert werden (Douglas, 2003). Als kommensaler Pilz besiedelt er die Haut sowie orale, gastrointestinale und urogenitale Schleimhäute (Odds, 1994). Aber er kann auch rezidive Schleimhaut- und lebensbedrohliche disseminierte Infektionen wie Kandidose in immunsupprimierten Patienten auslösen (Perlroth *et al.*, 2007). Als polymorpher Organismus ist *C. albicans* in der Lage unter Ausprägung verschiedener Morphologien zu wachsen: abhängig von Umweltfaktoren kann er zwischen monozellulären Blastosporen (knospende Hefen), multizellulären Pseudohyphen und Hyphen sowie der Dauerform Chlamydospore wechseln. Filamentöse Formen entstehen durch unipolares Wachstum. Die elongierenden Tochterzellen verbleiben an der Mutterzelle haftend, wodurch sich Filamente aus länglichen Zellen mit Einschnürungen an den Septen bilden. Hyphen entstehen durch kontinuierliches apikales Wachstum einzelner Zellen ohne Konstriktionen, was zu mononuklearen parallelwändiger Zellen führt, die zu Myzelien verzweigen (Odds,

1994). Diese reversiblen morphologischen Änderungen werden durch verschiedene Faktoren wie Zelldichte, Temperaturen über 30°C, neutralem pH-Wert oder Serum ausgelöst und unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren Efg1 und Cph1 reguliert. Die filamentösen Wachstumsformen werden mit Pathogenität und Biofilmbildung assoziiert (Kim & Sudbery, 2011).

Biofilmbildung erfolgt über verschiedene Phasen, beginnend mit Anhaftung und Kolonisierung, gefolgt von Zellteilung, Proliferation und Reifung. Die initiale Adhärenzphase ist abhängig von dem zu besiedelnden Material und wird über die hydrophobe Zelloberfläche und spezifische Adhäsine vermittelt. Reife Biofilme sind komplexe dreidimensionale Strukturen mit räumlicher Heterogenität aus einem dichten Netzwerk an Hefen, Hyphen und Pseudohyphen, die von einer extrazellulären Matrix umgeben sind (Abbildung 1.6). Das filamentöse Wachstum stärkt die Biofilmstruktur und dient den knospendenden Hefen als Schutz und Adhäsionsoberfläche (Ramage *et al.*, 2002b). An der Zap1-regulierten Bildung der extrazellulären Matrix, die den Biofilm als schützende Hülle umgibt, sind Proteine, Chitin, DNS und  $\beta$ -1,3-Glucane beteiligt (Al-Fattani & Douglas, 2006; Nobile *et al.*, 2009). Insgesamt ermöglicht die strukturierte Architektur die Verteilung von Nährstoffen und die Ausscheidung von Abfallprodukten durch Wasserkanäle.

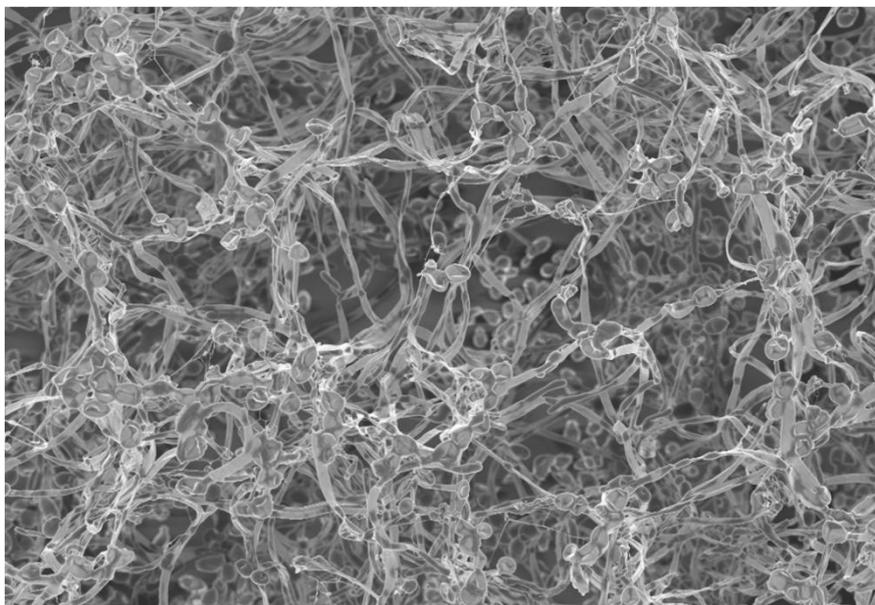


Abbildung 1.6. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines 48 h gewachsenen Biofilms von *C. albicans* SC5314 in YBNP-Medium. Die horizontale Kante entspricht 140  $\mu$ m.

*C. albicans* Biofilme haben beträchtliche Auswirkungen, da sie eine erhöhte Resistenz gegenüber Fungiziden entwickeln, Angriffe des menschliche Immunsystems überstehen können und somit zu Infektionen von Implantaten führen können (Costerton *et*

*al.*, 1999) (Tabelle 1.1). An der Resistenz der Biofilme gegen antifungale Mittel sind die unterschiedlichen physiologischen Stadien der Zellen beteiligt, die dicht gepackt von extrazellulärer Matrix umgeben sind, die wiederum Auswirkungen auf Diffusionsvorgänge hat. Es wurde jedoch mit Mutantenstämmen, Microarrays und Proteomanalysen gezeigt, dass die Entwicklung solcher strukturierter Biofilme von bestimmten Genen abhängig ist und die Genexpression sich von der planktonischen Wachstums unterscheidet (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Martinez-Gomariz *et al.*, 2009; Murillo *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2006; Yeater *et al.*, 2007). Der Hyphenregulator Efg1 ist auch an der Regulation der Morphogenese in und an der Bildung von einheitlichen Biofilmen involviert (Ramage *et al.*, 2002b). Der an der Regulation von Zelloberflächengenen beteiligte Transkriptionsregulator Bcr1 dagegen ist für die Biofilmbildung unerlässlich, hat jedoch keinen Einfluss auf Hyphenformation (Nobile & Mitchell, 2005).

Der dichteabhängige Wechsel von Hefen zu Hyphen, auch als Inokulum-Größeneffekt bekannt, als entscheidender Schritt der Biofilmbildung von *C. albicans* wird durch Quorum sensing reguliert. Es wurden von planktonisch oder in Biofilmen wachsenden Zellen sekretierte Komponenten gefunden, die das Wachstum oder die Hyphenbildung unterbinden, wie Farnesolsäure (Oh *et al.*, 2001), 2-Phenylethanol und Tryptophyl (Lingappa *et al.*, 1969), Isoamylalkohol, E-Nerolidol und 1-Dodecanol (Martins *et al.*, 2007). Farnesol wurde als das Signalmolekül identifiziert, das für diesen Effekt verantwortlich ist, indem es die Hyphenbildung bei hoher Zelldichte unterdrückt, sogar unter Hyphen induzierenden Bedingungen (Hornby *et al.*, 2001) (Tabelle 1.2). Die Elongation bereits bestehender Hyphen wird jedoch nicht beeinflusst (Mosel *et al.*, 2005). In Biofilmen unterdrückt Farnesol als Quorum sensing Molekül die Hyphenbildung neugebildeter Hefen und fördert dadurch die Ablösung dieser und die Ausbreitung auf neue Substrate. Es wurde gezeigt, dass Biofilmdichte und -morphologie abhängig von Konzentration und initialer Adhäsionszeit durch Farnesol verändert wird (Ramage *et al.*, 2002a). Farnesol wird kontinuierlich durch die Pyrophosphat-Phosphatase Dpp3 aus dem Intermediat Farnesylpyrophosphat der Sterolbiosynthese produziert und in die Umgebung abgegeben, wo es proportional zur Zelldichte akkumuliert (Nickerson *et al.*, 2006). Das Signal wird über die Zwei-Komponenten-Signaltransduktion Histidin-Kinase Chk1 übertragen (Kruppa *et al.*, 2004). Die Morphogenese wird durch Farnesol verhindert, indem MAP-Kinase- (Sato *et al.*, 2004) und cAMP-Proteinkinase A-Wege (Davis-Hanna *et al.*, 2008) unterdrückt und die Expression von Hyphensuppressorgenen wie *TUP1* und *HOG1* gefördert werden. Weiterhin wird Tyrosol während des Wachstums kontinuierlich produziert, um im extrazellulären Medium dicht bewachsener Kulturen zu akkumulieren (Chen *et al.*, 2004) (Tabelle 1.2). Es ist für die Lag-Phase des planktonischen Wachstums verantwortlich und beschleunigt die Hyphenbildung während früher und intermediärer Phasen der Biofilmentwicklung (Alem *et al.*, 2006). Zusammengefasst werden

Morphogenese und Biofilmbildung in *C. albicans* dichteabhängig durch Quorum sensing Moleküle reguliert. Farnesol unterdrückt bei hoher Zelldichte die Hyphenbildung während Tyrosol filamentöses Wachstum bei geringer Dichte fördert.

## 1.5 Biofilmbildung in *Pseudomonas aeruginosa*

Das Proteobakterium *Pseudomonas aeruginosa* gehört zur Ordnung der *Pseudomonadales* mit Gram-negativer Zellwand. Das opportunistische Humanpathogen wird als Teil der normalen Hautflora gefunden. Durch die Fähigkeit in Wasser und sogar in Desinfektionsmitteln zu überleben, sind *P. aeruginosa* Infektionen in Krankenhäusern vor allem von immunsupprimierten Patienten weit verbreitet, was es zu einem bedeutenden nosokomialen Keim macht. Die Kolonisation von Harnkathetern und Ventilatoren sowie chronische Lungenentzündungen in Patienten mit zystischer Fibrose werden mit Biofilmen assoziiert. Aus diesem Grund wurde die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* erforscht und dient heute als Modellorganismus dafür. Die Anlagerung an feste Oberflächen wird durch Flagellen und Typ IV Pili vermittelt (O'Toole & Kolter, 1998a); aber auch extrazelluläre DNS (eDNS) und Psl Polysaccharide sind an der Adhäsion beteiligt (Ma *et al.*, 2009; Whitchurch *et al.*, 2002). Durch Bewegungen mittels *Twitching* Motilität werden Mikrokolonien geformt und abhängig von Stamm und Umweltbedingungen flache uniforme oder stiel- und pilzförmige Biofilme ausgebaut (Abbildung 1.7). Während der gesamten Entwicklung kann Dispersion vom Biofilm beobachtet werden, was die Besiedelung neuer Habitate ermöglicht. Die extrazelluläre Matrix von *P. aeruginosa* Biofilmen bestehend aus Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren ist an Prozessen wie Anlagerungen und Zellinteraktionen sowie an Toleranz gegenüber antimikrobiellen Substanzen und DNS-Austausch beteiligt. Das Glukose reiche Polysaccharid Pel ist für die Ausbildung von Biofilmen unerlässlich, das Mannose reiche Psl Polysaccharid vermittelt Zell-Oberflächen- und Zell-Zell-Interaktionen. Das acetylierte Polysaccharid Alginate agiert als physikalische Barriere gegen Antibiotika (Friedman & Kolter, 2004; Govan & Deretic, 1996). Reguliert durch das *Pseudomonas* Quinolone Signal- (PQS-) Quorum sensing System wird eDNS nach Lyse kleiner Unterpopulationen vor allem von reifen Biofilmen abgegeben. Diese ist an den äußeren Teilen des Pilzfußes lokalisiert, um den Biofilm zu stabilisieren und die Einwanderung von Bakterien mittels Typ IV Pili zu fördern, die DNS hochaffin binden (Allesen-Holm *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* Biofilme sind heterogen und in Unterpopulationen mit verschiedenen Funktionen unterteilt. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die Synthese von Pyoverdine, Rhamnolipiden und Quorum sensing Molekülen spezifisch an den unteren Teilen der pilzförmigen Strukturen stattfindet (Yang *et al.*, 2009). Diese Unterpopulationen, vor allem

persistierende Zellen, werden von antimikrobiellen Substanzen unterschiedlich stark angegriffen, was die hohe Rückfallrate von Infektionen erklärt.

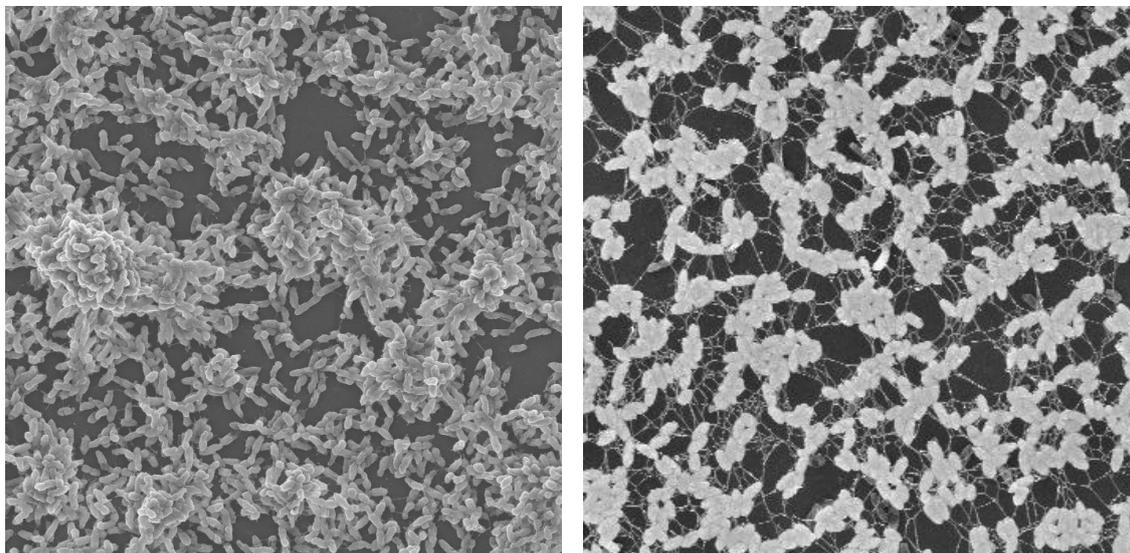


Abbildung 1.7. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen 72 h gewachsener Biofilme der *P. aeruginosa* Stämme PA14 und PAO1. Eine Seitenkante entspricht 25  $\mu\text{m}$ .

Biofilme von *P. aeruginosa* werden ebenfalls durch Quorum sensing reguliert. Das Bakterium besitzt zwei Acyl-Homoserinlacton-basierte Quorum sensing Systeme, Las und Rhl, die die Produktion von sekretierten und Zell assoziierten Virulenzfaktoren regulieren (de Kievit, 2009). Die Acyl-Homoserinlacton Synthetase LasI synthetisiert das Signal *N*-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserinlacton (3OC12HSL) (Tabelle 1.2), welches von dem Transkriptionsregulator LasR registriert wird. Dieses System ist für die Ausbildung strukturierter differenzierter Biofilme essentiell, da *lasI* Mutanten lediglich flache undifferenzierte Biofilme bilden, die in der Resistenz gegen Biozide funktionell beeinträchtigt sind (Davies *et al.*, 1998). Das Las System beeinflusst mittels transkriptioneller und post-transkriptioneller Kontrolle das Rhl System bestehend aus dem Transkriptionsregulator RhlR mit dem Autoinduktor *N*-butyryl-L-homoserinlacton (Tabelle 1.2), der durch die Rhl Synthetase RhlI produziert wird (de Kievit, 2009). Dieser Autoinduktor reguliert  $\sigma^5$ , den Sigma-Faktor der stationären Phase, die Produktion von Rhamnolipiden und vermittelt die externe Signalantwort auf den Wirt (Miller & Bassler, 2001). Ein drittes Signalmolekül, 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon, genannt PQS für *Pseudomonas* quinolone signal (Tabelle 1.2), ist ebenfalls mit den Las und Rhl Systemen verbunden (Pesci *et al.*, 1999). PQS Produktion wird von Genen des *pqsABCDH* Operons und dem Transkriptionsregulator PqsR reguliert, während der Responseregulator PqsE die Zellantwort vermittelt (Gallagher *et al.*, 2002). Dieses Signal ist an der Regulation der Virulenz, Pathogenität und Biofilmbildung beteiligt (Dubern & Diggle, 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass der Vorläufer von PQS,

2-Heptyl-4-quinolon selber als Signalmolekül agiert (Diggle *et al.*, 2007). Transkriptionsprofile von *P. aeruginosa* in Anwesenheit von PQS zeigten eine deutliche Induktion von Genen, die den eng verzahnten funktionellen Gruppen von Eisenaufnahme und oxidativer Stressantwort angehören (Bredenbruch *et al.*, 2006). Außerdem ist eine wichtige Funktion von PQS die eines Fe(III)-Chelators, der Eisen an der Zelloberfläche bindet, um es für die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme zugänglich zu machen (Diggle *et al.*, 2007). Entsprechend ist die Verfügbarkeit von Eisen mittels PQS direkt mit den Acyl-Homoserinlacton-basierten Biofilmregulationssystemen verknüpft und dient als Signal für die Biofilmentwicklung in *P. aeruginosa* (Banin *et al.*, 2005).

## 1.6 Interaktionen zwischen *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa*

In den meisten natürlichen Habitaten werden Mikroorganismen in gemischten Populationen gefunden, in denen sie in Interaktionen wie Symbiose, Parasitismus oder Räuber-Beute-ähnlichen Gemeinschaften leben. In diesen Populationen sind sie gezwungen, miteinander zu kommunizieren und zu kooperieren, aber auch um vorhandene Nährstoffe zu konkurrieren. Interaktionen zwischen verschiedenen Organismen finden mittels Metaboliten, wie Peptidoglykanen, Antibiotika oder Signalmolekülen statt (Shank & Kolter, 2009).

Innerhalb der den Menschen besiedelnden mikrobiellen Population werden *C. albicans* und *P. aeruginosa* oft gemeinsam identifiziert (Hermann *et al.*, 1999). Beispielsweise werden sie in gemischten Populationen auf Venenkathetern gefunden, aber auch aus Lungen an Mukoviszidose erkrankter Patienten sowie von Brandwunden co-isoliert (Bakare *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005; Pierce, 2005; Valenza *et al.*, 2008). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die beiden Organismen nicht wie für andere beschrieben synergistisch, sondern vielmehr antagonistisch miteinander interagieren (Hogan & Kolter, 2002; Shirtliff *et al.*, 2009). Die Anwesenheit von *P. aeruginosa* scheint das Wachstum von *C. albicans* zu blockieren (Kerr, 1994), was nach erfolgreicher Behandlung des Bakteriums zu einer Zunahme der Pilzpopulation führen kann (Burns *et al.*, 1999). Vorangegangene *Pseudomonas* Infektionen scheinen eine Prädisposition für schwere Kandidosen zu sein, begründet auf der proteolytischen Aktivität des Bakteriums (Neely *et al.*, 1986). Ähnlich erhöht eine *Candida* Kolonisation das Risiko von *P. aeruginosa* Infektionen, da Biofilme des Pilzes auf medizinischen Geräten wie Endotrachealschläuchen zum Teil *P. aeruginosa* enthalten. So reduziert die Behandlung von *Candida spp.* im Tracheobronchialsystem das Risiko einer beatmungsbedingten Pneumonie oder Besiedelung mit *P. aeruginosa* (Azoulay *et al.*, 2006; Nseir *et al.*, 2007). In gemischten Biofilmen scheinen *P. aeruginosa* und

*C. albicans* um vorhandene Bindungsstellen zu konkurrieren, da im Vergleich zu Monokulturen weniger Kolonie bildende Einheiten von beiden Mikroorganismen an der Oberfläche adhären (Bandara *et al.*, 2010). Vorgeformte fungale Biofilme begünstigen Adhäsion und Biofilmbildung von *P. aeruginosa*, während vorgeformte bakterielle Biofilme sowohl Adhäsion als auch die Ausbildung von Biofilmen von *C. albicans* signifikant reduzieren (El-Azizi *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass *P. aeruginosa* *C. albicans* Hyphen in Form von dichten Biofilmen besiedelt, was zur Abtötung der Filamente führt. Dieses wird durch verschiedenartige Virulenzfaktoren wie Pili und sekretierte Moleküle vermittelt. Die Hefeform dagegen wird weder besiedelt noch abgetötet (Hogan & Kolter, 2002). Aufgrund der Farnesol ähnlichen Eigenschaften von 3OC12HSL, das die Filamentation durch Induktion des Hefenwachstums unterdrückt, werden Morphologie und Virulenz des Pilzes durch *P. aeruginosa* beeinflusst (Hogan *et al.*, 2004). Überstände von planktonisch wachsenden *P. aeruginosa* Zellen führen zu Änderungen der Genexpression in frühen *C. albicans* Biofilmen, weitgehend unabhängig von 3OC12HSL (Holcombe *et al.*, 2010). Farnesol wirkt sich auf das Verhalten und die Virulenz von *P. aeruginosa* aus, indem es die Produktion von PQS und somit die toxischer Phenazine wie Pyocyanin verändert und das Schwimmverhalten unterdrückt (Cugini *et al.*, 2007; McAlester *et al.*, 2008). Dieses führt zu verlangsamtem Wachstum beider Mikroorganismen in Biofilmen (Bandara *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass die Phenazin-Derivate Pyocyanin und 1-Hydroxyphenazin die Hefe-zu-Hyphen-Transformation sowie das Wachstum von *C. albicans* inhibieren, welches an der Prävention von *P. aeruginosa* besiedelter Patienten vor pulmonaler Candidose beteiligt sein könnte (Kerr *et al.*, 1999). Weiterhin korrelieren in Co-Kulturen hohe Pyocyanin-Werte mit reduzierter Vitalität von *C. albicans* (Gibson *et al.*, 2009). Hierzu trägt auch 5-Methyl-Phenanzinium-1-Carboxylat bei, da es in der Pilzzelle toxisch wirkt (Morales *et al.*, 2010). Diese Untersuchungen legen nahe, dass sich *C. albicans* und *P. aeruginosa* erkennen und aufeinander reagieren - vermittelt durch Quorum sensing Moleküle und Virulenzfaktoren.

## 1.7 Biofilmbildung in *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, ein weiterer Gram-negativer Vertreter der Abteilung *Proteobacteria*, wird der Ordnung *Enterobacteriales* zugeordnet. Als typisches Darmbakterium kolonisiert *E. coli* meist innerhalb der ersten Lebensstunden den Gastrointestinaltrakt von Neugeborenen und lebt normalerweise mit beidseitigem Nutzen über Jahre mit bzw. in dem menschlichen Wirt. Als Indikator für fäkale Verunreinigungen dient es der Qualitätskontrolle für Wasser und in der Lebensmittelherstellung. Als fakultatives Pathogen kann *E. coli* jedoch außerhalb des Darmtraktes Infektionen hervorrufen. Durch den Erwerb von Virulenzfaktoren sind einige Stämme für den Menschen

gesundheitsgefährdend. In der Molekularbiologie werden apathogene *E. coli*-Stämme der Sicherheitsstufe 1 vielseitig zu Forschungszwecken verwendet, da die genetischen Grundlagen dieses Bakteriums bekannt sind und das Genom sequenziert ist. Auch für industrielle Anwendungen im Rahmen der Biotechnologie wird *E. coli* eingesetzt, unter anderem auch als Biofilm.

Biofilmbildung von *E. coli* folgt dem in Abbildung 1.2 schematisch dargestellten Verlauf. An der initialen reversiblen Adhärenz an Oberflächen sind die Flagellen des peritrich begeißelten Bakteriums beteiligt. Typ I Fimbrien und Curli tragen zum irreversiblen Anheften der Zellen an die Oberfläche bei (Prüss *et al.*, 2006). Mikrokolonie-Formation wird durch das Adhäsins Antigen 43 induziert und unter Beteiligung von Curli, extrazellulären Polysacchariden und Konjugationspili entwickelt sich ein reifer Biofilm mit ausgeprägter Architektur. Die Dispersion von einzelnen Zellen wird wiederum durch Flagellen vermittelt (van Houdt & Michiels, 2005). Die Expression von Genen, die die Ausbildung von Biofilmen beeinflussen, wie Flagellen und Mobilität, wird mittels des dichteabhängigen Autoinducers AI-2 reguliert. AI-2 wird durch die S-Ribosylhomocystein Lyase LuxS synthetisiert (Abbildung 1.5) und mittels des Transporters TqsA aus der Zelle exportiert (Herzberg *et al.*, 2006). Als Antagonist zu AI-2 wurde das Quorum sensing Signal Indol identifiziert, das die Entwicklung von Biofilmen unterdrückt (Lee *et al.*, 2007b). In *E. coli* sind die unter Gram-negativen Bakterien verbreiteten Homoserinlactone am Quorum sensing nicht direkt beteiligt. Aber es wurde ein LuxR-ähnliches Rezeptorprotein (SdiA) beschrieben, wodurch *E. coli* Biofilme vermutlich durch die Anwesenheit anderer HSL-produzierender Organismen beeinflusst werden können (Ahmer, 2004).

## 1.8 Zielsetzung

Biofilme werden als dominierender Lebensstil von Mikroorganismen immer mehr wahrgenommen. Vielfältige Nutzungsmöglichkeiten, aber auch Gefährdungen durch mit Biofilmen assoziierte Krankheiten und Infektionen sowie wirtschaftliche Schäden sind die Folge. Zwei der wichtigsten nosokomialen Keime, *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa*, persistieren in Biofilmen und interagieren miteinander. In dieser Arbeit sollten die Interaktionen zwischen *C. albicans* und *P. aeruginosa* auf verschiedenen Ebenen charakterisiert werden. Es sollte mit Hilfe der Etablierung von Screening-Verfahren die Beeinflussung der Monospezies-Biofilme über extrazelluläre Substanzen detektiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich die Anwesenheit des jeweils anderen Organismus im Sekretom beider Organismen manifestiert. Daraus wurden weitere Einblicke erhalten, wie die Mikroorganismen aufeinander reagieren und welche Konkurrenz- oder Kommunikations-Mechanismen hierzu beitragen. Mit Hilfe der hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollte ein vielseitiges Werkzeug aufgebaut werden, das die Detektion von Biofilmen sowie deren Beeinflussung ermöglicht. Dieses sollte außerdem zur Erweiterung des Spektrums *Escherichia coli* beinhalten, da dieser Mikroorganismus der Sicherheitsstufe 1 zugeordnet wird.



## 2 Material und Methoden

Die molekularbiologischen und biochemischen Methoden wurden nach Standardprotokollen durchgeführt, wenn nicht anders erwähnt (Ausubel *et al.*, 1988; Sambrook & Russel, 2001).

### 2.1 Organismen und Wachstumsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten mikrobiellen Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. *C. albicans* Stämme wurden über Nacht in YPD-Medium (10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Glucose pro Liter) bei 30°C unter Schütteln angezogen. *P. aeruginosa* und *E. coli* wurden in LB-Medium (10 g Bacto Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro Liter, pH 7,0) bei 37°C unter Schütteln kultiviert.

Tabelle 2.1. Verwendete Stämme

<b><i>Candida albicans</i></b>			
Stammsammlungsnummer	Name	Genotyp	Quelle
Can14 (SC5314)	Wildtyp	klinisches Isolat	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
Can777 (CAF-2)	Wildtyp	$\Delta$ ura3::imm434/URA3	(Calera & Calderone, 1999)
Can778 (CHK21)	chk1 $\Delta$	CAF-2 $\Delta$ ura3::imm434/ $\Delta$ ura3::imm434 $\Delta$ chk1::hisG/ $\Delta$ chk1::hisG-URA3-hisG	(Calera & Calderone, 1999)
Can779 (CHK23)	chk1 $\Delta$ -CHK1	CAF-2 $\Delta$ ura3::imm434/ $\Delta$ ura3::imm434 $\Delta$ chk1::hisG/ CHK1::URA3-hisG	(Calera & Calderone, 1999)
Can780 + Can782	Vorläufer von tef2 $\Delta$ -yEGFP	SC5314 tef2 $\Delta$ ::yEGFP-SAT1- FLIP/TEF2	diese Arbeit
Can781 + Can783	tef2 $\Delta$ -yEGFP	SC5314 tef2 $\Delta$ ::yEGFP-FRT/TEF2	diese Arbeit
Can784 + Can786	Vorläufer von adh7 $\Delta$ -yEGFP	SC5314 adh7 $\Delta$ ::yEGFP-SAT1- FLIP/ADH7	diese Arbeit
Can785 + Can787	adh7 $\Delta$ -yEGFP	SC5314 adh7 $\Delta$ ::yEGFP-FRT/ADH7	diese Arbeit
Can788 + Can790	Vorläufer von met3 $\Delta$ -yEGFP	SC5314 met3 $\Delta$ ::yEGFP-SAT1- FLIP/MET3	diese Arbeit
Can789 + Can791	met3 $\Delta$ -yEGFP	SC5314 met3 $\Delta$ ::yEGFP-FRT/MET3	diese Arbeit

Can792 + Can794	Vorläufer von <i>als1Δ-yEGFP</i>	SC5314 <i>als1Δ::yEGFP-SAT1-FLIP/ALS1</i>	diese Arbeit
Can793 + Can795	<i>als1Δ-yEGFP</i>	SC5314 <i>als1Δ::yEGFP-FRT/ALS1</i>	diese Arbeit

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Stammsammlungsnummer	Name	Genotyp	Quelle
S2_B004 (PA14)	Wildtyp	klinisches Isolat	(Hogan <i>et al.</i> , 2004)
S2_B005	<i>ΔlasI</i>	PA14 <i>ΔlasI</i>	(Hogan <i>et al.</i> , 2004)
S2_B006	<i>ΔlasI / plasI-2</i>	PA14 <i>ΔlasI / plasI-2</i>	(Hogan <i>et al.</i> , 2004)
S2_B007	<i>ΔlasI / pUCP18</i>	PA14 <i>ΔlasI / pUCP18</i>	(Hogan <i>et al.</i> , 2004)
S2_B008 (PAO1)	Wildtyp	klinisches Isolat	(Gambello & Iglewski, 1991)
S2_B009	<i>ΔlasR</i>	PAO1 Sm <sup>r</sup> <i>ΔlasR::tet</i>	(Gambello & Iglewski, 1991)
S2_B010	<i>ΔlasR / plasR</i>	PAO1 Sm <sup>r</sup> <i>ΔlasR::tet / pMG1.7</i>	(Gambello & Iglewski, 1991)
S2_B011 + S2_B013	Vorläufer von <i>pr(rahU)-FP602</i>	PAO1 Tn7- <i>pr(rahU)-FP602-FLIP</i>	diese Arbeit
S2_B012 + S2_B014	<i>pr(rahU)-FP602</i>	PAO1 Tn7- <i>FRT-pr(rahU)-FP602</i>	diese Arbeit
S2_B015 + S2_B017	Vorläufer von <i>pr(aprI)-FP602</i>	PAO1 Tn7- <i>pr(aprI)-FP602-FLIP</i>	diese Arbeit
S2_B016 + S2_B018	<i>pr(aprI)-FP602</i>	PAO1 Tn7- <i>FRT-pr(aprI)-FP602</i>	diese Arbeit
S2_B019 + S2_B021	Vorläufer von <i>pr(ampR)-FP602</i>	PAO1 Tn7- <i>pr(ampR)-FP602-FLIP</i>	diese Arbeit
S2_B020 + S2_B022	<i>pr(ampR)-FP602</i>	PAO1 Tn7- <i>FRT-pr(ampR)-FP602</i>	diese Arbeit

### ***Escherichia coli***

Stammsammlungsnummer	Name	Genotyp	Quelle
B4390 (MG1655)	Wildtyp	F- λ- <i>rph-1 Fnr</i> <sup>+</sup>	DSMZ
B4391	Vorläufer von <i>ΔluxS</i>	MG1655 <i>ΔluxS-FLIP</i>	diese Arbeit
B4392	<i>ΔluxS</i>	MG1655 <i>ΔluxS-FRT</i>	diese Arbeit

B4393	Vorläufer von <i>pr(cynT)-GFP</i>	MG1655 <i>pr(cynT)-GFP-FLIP</i>	diese Arbeit
B4394	<i>pr(cynT)-GFP</i>	MG1655 <i>pr(cynT)-GFP-FRT</i>	diese Arbeit
B4395	Vorläufer von <i>pr(cynT)-GFP</i> $\Delta luxS$	MG1655 $\Delta luxS-FLIP$ <i>pr(cynT)-GFP-FRT</i>	diese Arbeit
B4396	<i>pr(cynT)-GFP</i> $\Delta luxS$	MG1655 $\Delta luxS-FRT$ <i>pr(cynT)-GFP-FRT</i>	diese Arbeit
B4397	Vorläufer von <i>pr(rfe)-GFP</i>	MG1655 <i>pr(rfe)-GFP-FLIP</i>	diese Arbeit
B4398	<i>pr(rfe)-GFP</i>	MG1655 <i>pr(rfe)-GFP-FRT</i>	diese Arbeit
B4399	Vorläufer von <i>pr(rfe)-GFP</i> $\Delta luxS$	MG1655 $\Delta luxS-FLIP$ <i>pr(rfe)-GFP-FRT</i>	diese Arbeit
B4400	<i>pr(rfe)-GFP</i> $\Delta luxS$	MG1655 $\Delta luxS-FRT$ <i>pr(rfe)-GFP-FRT</i>	diese Arbeit

pr (Promotorregion)

FRT (flip recombinase target)

FP602 (TurboFP602)

GFP (TurboGFP)

## 2.2 Verfahren zur Kultivierung von Biofilmen

Für die Kultivierung von Biofilmen wurden Übernacht-Kulturen der jeweiligen Stämme durch Zentrifugation bei 4000 g für 10 min geerntet, mit YNBNP-Medium (1,7 g / l Yeast Nitrogen Base w/o Aminosäuren und Ammoniumsulfat, 25 mM Phosphatpuffer pH 7,0, 2,5 mM N-Acetylglucosamin) (Hogan & Kolter, 2002) oder Pepton Saline (1 g / l Pepton aus Fleisch, 4,3 g / l NaCl, pH 7,0) gewaschen und mit YNBNP-Medium oder Pepton Saline auf eine optische Dichte von 1,0 eingestellt (Jasco V-630 Spectrophotometer, Groß-Umstadt; ca.  $3 \cdot 10^7$  Zellen / ml für *C. albicans*; ca.  $1 \cdot 10^9$  Zellen / ml für *P. aeruginosa* und *E. coli*). YNBNP-Medium wurde für Biofilme von *C. albicans* und *P. aeruginosa* verwendet; Pepton Saline wurde für *E. coli* gewählt, da dieses Bakterium in YNBNP-Medium schlecht wuchs. Abhängig vom Experiment wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension in der jeweiligen Platte bei 37°C inkubiert. Nach 90-minütiger Adhärenz wurde der Überstand gegen frisches Medium ausgetauscht und für eine weitere Zeit bis zu 24, 48 oder 72 h inkubiert.

Für RNS- und Proteinisolierung wurden 30 ml der Suspension in Petrischalen mit Nocken (Bestellnummer 82.1473.001; Sarstedt, Nürnberg) verwendet.

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurde 1 ml der Zellen auf Thermanox Deckgläschen (Nunc, Thermo Scientific, Langenselbold) in 24 Well-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) gegeben.

200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspensionen wurden für mikroskopische Experimente in 96 Well-Sensoplatten (Greiner Bio-One GmbH) oder für die *in vitro*-Assays in 96 Well-Mikrotiterplatten (Bestellnummer 82.1581.001; Sarstedt) inkubiert.

Vor dem Einsatz in Biofilm-Experimente wurde das Material, wie Petrischalen oder Mikrotiterplatten auf Adhäsionseigenschaften getestet, da die Chargen Unterschiede aufweisen.

Um den Einfluss von Quorum sensing Molekülen auf Biofilme zu testen, wurden Stammlösungen von Farnesol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), 3OC12HSL (GLSynthesis, Worcester, MA) oder Dodecanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in DMSO hergestellt und mit Endkonzentrationen von 30 bis 300  $\mu\text{M}$  zugegeben. Um die Auswirkungen dieser Moleküle auf die Adhärenz der Zellen zu untersuchen, wurden diese während der 90-minütigen Adhärenzphase mitinkubiert und die Biofilme daraufhin in nicht-supplementiertem Medium angezogen. Um dagegen die Wirkung auf reife Biofilme zu testen, wurden die Moleküle zu 24 h gewachsenen Biofilmen gegeben und für weitere 24 h mit den Zellen inkubiert.

Konditioniertes Medium wurde durch Sterilfiltration von in entsprechenden Minimalmedien exponentiell wachsenden Kulturen gewonnen, auf 1/10 Volumen reduziert und für 60 min zu 24 h gewachsenen Biofilmen gegeben.

## 2.3 Quantitative Messungen von Biofilmen

Um die metabolisch aktiven Zellen in den Biofilmen zu bestimmen, wurden abhängig vom Organismus unterschiedliche *in vitro*-Assays eingesetzt.

### 2.3.1 Aktivitätsbestimmung in Biofilmen mittels Fluoreszeindiacetat

Fluoreszeindiacetat (FDA) wird von Esterasen der Mikroorganismen, unter anderen von *E. coli*, *P. aeruginosa* und *C. albicans*, zu dem fluoreszierenden Fluoreszein umgesetzt (Kleymann & Werling, 2004). Wie unter 2.2 beschrieben, wurden Biofilme in 96 Well-Mikrotiterplatten in YNBNP oder Pepton Saline mit Austausch des Mediums nach 90 min Inkubation bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Nach 48 h Wachstum wurden die Biofilme mit PBS gewaschen, um die nicht fest verankerten Zellen zu entfernen. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  einer FDA-Lösung (Arbeitslösung: 10  $\mu\text{g}$  FDA / ml PBS; Stammlösung: 10 mg / ml in DMSO; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) auf den Biofilm gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur oder für *E. coli* bei 30°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm vermessen (Synergy 2, Biotek, Bad Friedrichshall). Um Hintergrund-Fluoreszenz zu eliminieren, wurden einige Wells ohne Zellen wie oben beschrieben behandelt.

### 2.3.2 Aktivitätsbestimmung in Biofilmen mittels XTT

Metabolisch aktive *C. albicans* Zellen in Biofilmen wurden mit dem XTT-Reduktionsassay bestimmt. Biofilme wurden wie unter 2.2 beschrieben in YNBNP mit einem Waschschrift nach 90 min in 96 Well-Mikrotiterplatten bei 37°C ohne Schütteln angezogen unter Verwendung von 200 µl der standardisierten Zellsuspension pro Well. Wenn notwendig, wurde ein interner Standard hergestellt, um verschiedene Platten miteinander vergleichen zu können. Hierzu wurden Proteinextrakte exponentiell wachsender *C. albicans* Kulturen mittels Glasperlen in PBS mit Proteinase-Inhibitor (Roche) verwendet. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden die Biofilme mit PBS gewaschen und eine frisch hergestellte XTT- (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid Hydroxid; 1 mg / ml in PBS; Sigma-Aldrich) Menandion- (1 M in Aceton; Sigma-Aldrich) Lösung auf jedes Well gegeben (Chandra *et al.*, 2001b; Hiller *et al.*, 2007). Nach 60 min Inkubation im Dunkeln bei 37°C wurde der Farbumschlag zu Formazan bei 490 nm bestimmt (Infinite M200 Pro; Tecan, Schweiz). Um den Hintergrund zu eliminieren, wurden einige Wells ohne Mikroorganismen ebenso behandelt.

### 2.3.3 Markierung mit Carboxynaphthofluorescein succinimidyl Ester

*P. aeruginosa*-Kulturen wurden geerntet, mit sterilem PBS gewaschen und mit 1 mg / ml 5-Carboxynaphthofluorescein succinimidyl Ester (CNF, Invitrogen) in 0,1 M Natriumbicarbonat pH 8,3 bei 20°C für 30 min unter kontinuierlichem Schütteln markiert. Anschließend wurden die Zellen zur Entfernung von nicht-gebundenem CNF mit sterilem PBS gewaschen, in YNBNP resuspendiert und umgehend eingesetzt (Sheth *et al.*, 2011; Silverman *et al.*, 2010). 200 µl der standardisierten Zellsuspensionen von *C. albicans* und markierten *P. aeruginosa* wurden in Mikrotiterplatten gegeben und für 90 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und durch 50 µl frisches YNBNP ersetzt. Die adhären markierten Zellen wurden bei 595 / 680 nm vermessen (Infinite M200 Pro).

## 2.4 Konstruktion von mutierten Stämmen

Alle für die Mutationen verwendeten Oligonukleotide (invitrogen, Darmstadt) sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2. Oligonukleotide für die Konstruktion von Mutationen.

Name	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
FP4	CC CTC GAG TTA TTT GTA C	yEGFP-XhoI-rev
FP7	GG GGT ACC CCA ACT GGT ATT GCC	FLR1-als1-KpnI-for
FP8	ACC TTT AGA CAT CTG ATA TTA ACA	FLR1-als1-yEGFP-rev
FP9	TGT TAA TAT CAG ATG TCT AAA GGT	FLR1-als1-yEGFP-for
FP10	GAG CGC GGC CGC TGA CTA TAT TGT	FLR2-als1-NotI-for
FP11	GG GAG CTC CCT GTT TGC AAT TCC G	FLR2-als1-SacI-rev
FP12	GG GGT ACC CCA TTA ATG CGC CCC	FLR1-met3-KpnI-for
FP13	ACC TTT AGA CAT GTT TTC TGG GGA	FLR1-met3-yEGFP-rev
FP14	TCC CCA GAA AAC ATG TCT AAA GGT	FLR1-met3-yEGFP-for
FP15	GAG CGC GGC CGC ACT TGA AAA GAA	FLR2-met3-NotI-for
FP16	GG GAG CTC GAT GTG GAA AAT AAT C	FLR2-met3-SacI-rev
FP17	GG GGT ACC CTA ACA CAG TGT G	FLR1-tef2-KpnI-for
FP18	ACC TTT AGA CAT GAT TGA TTA TAT AAA	FLR1-tef2-yEGFP-rev
FP19	TTT ATA TAA TCA ATC ATG TCT AAA GGT	FLR1-tef2-yEGFP-for
FP20	GAG CGC GGC CGC ACT AAT TAA ATA CC	FLR2-tef2-NotI-for
FP21	GG GAG CTC CTG ATC AAT CTG ATA	FLR2-tef2-SacI-rev
FP25	GG GGT ACC ATA TAT CCG CCC TGT	FLR1-adh7-KpnI-for
FP26	TTC ACC TTT AGA CAT GAT TTA TTG TAT AAT	FLR1-adh7-yEGFP-rev
FP27	ATT ATA CAA TAA ATC ATG TCT AAA GGT GAA	FLR1-adh7-yEGFP-for
FP28	GAG CGC GGC CGC GTT AGT ATT TAT TTT	FLR2-adh7-KpnI-for
FP29	GG GAG CTC TCG GGT ATT GAT GAA	FLR2-adh7-SacI-rev
FP100	GTG TTC GGA TCC ATC TGT GTC AGC GGC TAC CGT GAT TCA TTC CCG CCA ACA ACC GCG CAT TCC TCA TCA TAA ATG AG	NCR1-pr(cynT)-BamHI-for
FP102	CTC GTC GCT CTC CGT TAA CCT CTG	pr(cynT)-GFP-rev
FP103	CAG AGG TTA ACG GAG AGC GAC GAG	pr(cynT)-GFP-for
FP106	GGT GAA GCT TAC AGC TGG CAG ACA GCC GCT GCG AAG GCA TTT TTG CAC ATG GCG TTG GAG GAA GTT CCT ATA	NCR2-pr(cynT)-HindIII-rev

Name	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
FP107	GTG TTC GGA TCC CGC CAC GTG TTT ACG TGG CGT TTT GCT TTT ATA TCT GTA ATC TTA ATG CCT TTT TGC ACA GGA CT	NCR1-pr(rfe)-BamHI-for
FP113	GGT GAA GCT TTT GCA TAA CAT GCC AGC AAA TTC CAG GAA TTT TCC TAA CAT CGC CAG CGC GAA GTT CCT ATA	NCR2-pr(rfe)-HindIII-rev
FP118	AC TTC GTC GAC TCA TTC TTC ACC G	GFP-cassette-Sall-rev
FP119	C GGT GAA GAA TGA GTC GAC GAA GT	GFP-cassette-Sall-for
FP129	AGA GCA TGC ATT CTC GAG GAG AGC GAC GAG	pr(rfe)-GFP-XhoI-for
FP130	CTC GTC GCT CTC CTC GAG AAT GCA TGC TCT	pr(rfe)-GFP-XhoI-rev
FP141	GGT GAA GCT T GGG AAG AAA GAG TTC AGA AAA TTT TTA AAA AAA TTA CCG GAG GTG GCT AAG AAG TTC CTA TTC TCT AG	FLR1-luxS-HindIII-for
FP142	GTG TTC GGA TCC AGT TCA TTT GAA CTG GCT TTT TTC AAT TAA TTG TGA AGA TAG TTT ACT GA GAA GTT CCT ATA CTT TCT	FLR2-luxS-BamHI-rev
FP200	GTG TTC GGA TCC ATG GTG GGT GAG GAT	FP602-BamHI-for
FP201	G GTG AAG CTT TCA GCT GTG CCC CAG TT	FP602-HindIII-rev
FP204	GTG TTC GAG CTC GAA AAA CGC CGG AGG	pr(rahU)-SacI-for
FP205	GTG TTC GGA TCC CTG GAT CTC CGT TAA	pr(rahU)-BamHI-rev
FP206	GTG TTC GAG CTC CTT CGG CCG GCC GGG	pr(aprI)-SacI-for
FP207	GTG TTC GGA TCC CGA GAG ATC TCC TTC	pr(aprI)-BamHI-rev
FP208	GTG TTC GAG CTC GCA GTG TGG AAG CGG	pr(ampR)-SacI-for
FP209	GTG TTC GGA TCC TCT CTG CTC CAA ATT	pr(ampR)-BamHI-rev

#### 2.4.1 Herstellung von Reporterstämmen in *Candida albicans*

Das für *C. albicans* Codon-optimierte grün fluoreszierende Protein yEGFP (*yeast-enhanced green fluorescent protein*) (Cormack *et al.*, 1997) wurde gemeinsam mit der Flipase FLP (Reuß *et al.*, 2004) in den *C. albicans* Stamm Can14 hinter die Promotoren der Gene *ALS1*, *MET3*, *ADH7* und *TEF2* integriert. Die 5' der kodierenden Sequenzen gelegenen flankierenden Regionen (FLR1) wurden mittels PCR amplifiziert, unter Verwendung der Primerpaare FP7 und FP8 (*als1*), FP12 und FP13 (*met3*), FP17 und FP18 (*tef2*) sowie FP25 und FP26 (*adh7*). Anschließend wurden diese mit einer *overlap* PCR an yEGFP gefügt, das zuvor vom Template pSFS2A-yEGFP-URA (Laborsammlung) mit den Primern FP4 und FP9 / FP14 / FP19 / FP27 generiert wurde. Die 3' flankierenden Regionen (FLR2) wurden analog unter Verwendung der Primerpaare

FP10 und FP11, FP15 und FP16, FP20 und FP21 sowie FP28 und FP29 amplifiziert (Tabelle 2.2). Für die Ligation der PCR Produkte in das Plasmid pSFS2A wurden Restriktionsschnittstellen in die Sequenzen der Primer integriert. Für die Herstellung der Plasmide pSFS2A-als1, pSFS2A-met3, pSFS2A-tef2 und pSFS2A-adh7 wurden die jeweiligen *KpnI* und *XhoI* verdauten FLR1-yEGFP-Fragmente und die FLR2-Fragmente nach Restriktionshydrolyse mit *NotI* und *SacI* in pSFS2A kloniert. Nach Verifizierung der korrekten Sequenzen durch Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz) wurden die mit *KpnI* und *SacI* verdauten Plasmide mit Elektroporation in Can14 transformiert (MicroPulser electroporator, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Hierfür wurde eine Kultur der späten exponentiellen Phase von Can14 in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) mit 100 mM LiAc pH 7,5 für 60 min bei 30°C und 150 upm inkubiert plus weitere 30 min nach Zugabe von DTT zu 25 mM Endkonzentration. Die elektrokompetenten Zellen wurden vorsichtig mit kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1 M Sorbitol resuspendiert bevor die linearisierten Plasmide transformiert wurden. Nach einer vierstündigen Regeneration in YPD wurde auf YPD Platten mit Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena) auf positive Transformanten selektiert. Die FLP-vermittelte Entfernung der Resistenzkassette wurde durch die Inkubation der positiven Transformanten in YPM (10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Maltose pro Liter) erreicht. Die korrekte Integration von yEGFP unter Kontrolle der nativen Promotoren an den ursprünglichen Stellen im Genom wurde mittels Southern Blot nachgewiesen.

#### 2.4.2 Herstellung von Reporterstämmen in *Pseudomonas aeruginosa*

Für die Konstruktion von Reporterstämmen in dem *P. aeruginosa* Stamm S2\_B008 wurde ein Tn7-basiertes Klonierungssystem verwendet (Choi *et al.*, 2005). Das rot fluoreszierende Protein *TurboFP602* (evrogen, Moskau, Russland) wurde unter Kontrolle spezifischer Promotorregionen an der Tn7-Bindungsstelle in die intergenische Region PA5548-*gImS* kloniert. Die Promotorregionen wurden mit PCR amplifiziert mit den Primerpaaren FP204 und FP205 (*rahU*), FP206 und FP207 (*aprl*) sowie FP208 und FP209 (*ampR*). FP200 und FP201 wurden für die Erstellung von *TurboFP602* eingesetzt (Tabelle 2.2). Für die Klonierung der Promotorregionen und des Reportergens in pUC18-mini-Tn7T-Gm wurden spezifische Restriktionsschnittstellen in die Primersequenzen integriert. Die *SacI* und *BamHI* verdauten Promotorregionen wurden in den Vektor ligiert, gefolgt von einem zweiten Klonierungsschritt zur Integration des *BamHI* und *HindIII* verdauten *TurboFP602*. Die Sequenzen der Plasmide pUC18-mini-Tn7T-Gm-*rahU*, pUC18-mini-Tn7T-Gm-*aprl* und pUC18-mini-Tn7T-Gm-*ampR* wurden durch Sequenzierung überprüft (GATC Biotech AG, Konstanz).

Für jeden Elektroporationsansatz wurden 6 ml einer Übernachtskultur von *P. aeruginosa* S2\_B008 geerntet, zweimal mit 1 ml einer 300 mM Saccharose-Lösung

gewaschen und in 100 µl Saccharose resuspendiert, um anschließend 50 ng des jeweiligen Vektors und des Helferplasmids pTNS2 hinzuzugeben. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 2 h in 1 ml LB bei 37°C inkubiert, bevor sie zur Selektion auf LB-Platten mit 30 µg / ml Gentamycin ausplattiert wurden. Nach Überprüfung der korrekten Integration mit PCR wurde der Selektionsmarker unter Verwendung des FLP-Expressionsplasmids pFLP2 (Hoang *et al.*, 1998) entfernt und die Zellen auf VBMM-Platten (0,2 mg MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 2 mg Zitronensäure, 10 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,5 mg NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O, 0,3% Trinatriumcitrat pro Liter) mit 10 µg / ml PABA und 500 µg / ml Carbenicillin ausplattiert. Auf VBMM / PABA Platten mit und ohne Gentamycin getestete Gentamycin-sensitive Klone wurden zur Entfernung von pFLP2 auf VBMM / PABA Platten mit 5% Saccharose ausgestrichen. Schließlich wurden die Saccharose-resistenten Klone auf Carbenicillin-Sensitivität getestet und mittels PCR überprüft. Die korrekte Integration von *TurboFP602* unter Kontrolle der nativen Promotoren an der spezifischen intergenischen Region wurde mit Southern Blot Analysen verifiziert.

### 2.4.3 Herstellung von Deletionsmutanten und Reporterstämmen in *Escherichia coli*

Für die Konstruktion von *luxS*-Mutanten und Reporterstämmen in *E. coli* B4390 wurde Red/ET Rekombination verwendet (Gene Bridges GmbH, Heidelberg) (Datsenko & Wanner, 2000). Zur Deletion von *luxS* wurden die *luxS* flankierenden Regionen (FLR) mit dem Primerpaar FP141 und FP142 amplifiziert und mit FRT-PGK-gb2-neo-FRT verbunden. Um genug Material zu erhalten, wurde das PCR Produkt mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Bam*HI in den Vektor pUCP18 kloniert. Für die Integration des Reportergens *TurboGFP* (evrogen, Moskau, Russland) wurden intergenische Regionen (NCR) nahe der nativen Promotorregionen gewählt und in die Primersequenzen eingebaut. Die *cyn* Promotorregion wurde mit den Primern FP100 und FP102 amplifiziert und mit *overlap* PCR sowie den Primern FP100 und FP118 mit *TurboGFP* verbunden, welches mit Hilfe von FP103 und FP118 vervielfältigt wurde. Dieses Fragment wurde vor die mit FP119 und FP106 amplifizierte FRT-PGK-gb2-neo-FRT-Kassette unter Verwendung einer zweistufigen Ligation und den Enzymen *Bam*HI, *Sal*I und *Hind*III kloniert. Entsprechend wurde pUCP18-*rfe* hergestellt, für das die Promotorregion mit den Primern FP107 und FP130, *TurboGFP* mit FP129 und FP118 und die Kassette mit FP119 und FP113 amplifiziert wurden (Tabelle 2.2). Die Plasmide pUCP18-*luxS*, pUCP18-*cyn* und pUCP18-*rfe* wurden durch Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz) überprüft. Die FRT-PGK-gb2-neo-FRT-Kassetten wurden inklusive der homologen Regionen und *TurboGFP* mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III aus den Plasmiden geschnitten und aufgereinigt. Zuerst wurde das Red/ET Expressionsplasmid pRedET in den *E. coli* Wildtyp B4390 mittels Elektroporation

transformiert. Hierfür wurden 30 µl einer Übernachtskultur mit 1,4 ml LB verdünnt und für 2 h bei 37°C und 160 upm inkubiert. Nach Ernte und Waschen der Zellen mit gekühltem ddH<sub>2</sub>O wurde das entsprechende Volumen an Plasmid zugegeben und elektroporiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 60 min in LB inkubiert bevor sie auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert wurden. Nach Induktion der Expression der Red/ET Rekombinationsproteine mit 0,3 – 0,4% L-Arabinose wurden die elektrokompententen Zellen mit den linearen Fragmenten transformiert und die Rekombination fand statt. Positive Klone wurden unter Verwendung von Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika selektiert. Die Selektionsmarker wurden durch Transformation der Klone mit dem FLP-Expressionsplasmid 706-FLP und folgender Expression der FLP-spezifischen Rekombinase entfernt. Die korrekte Integration von *TurboGFP* kontrolliert von den entsprechenden Promotoren sowie die Deletionen von *luxS* wurden mit Southern Blot Analysen überprüft.

## 2.5 Isolierung genomischer DNS

Für die Überprüfung von *C. albicans* Stämmen mittels PCR wurde die chromosomale DNS nach einer publizierten Methode isoliert (Hoffman & Winston, 1987). Hierfür wurde eine Übernachtskultur geerntet, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und durch starkes Schütteln in 1 Volumen Lyse-Puffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM Tris / HCl pH 8, 1 mM EDTA), 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) und 1 Volumen Glassperlen aufgeschlossen. Der Überstand wurde mit 100% Ethanol gemischt und die Nukleinsäuren bei -20°C gefällt. Die RNS wurde mit 75 µg / ml RNase in TE-Puffer (10 mM Tris / HCl pH 8, 1 mM EDTA) und erneuter Ethanol-Fällung entfernt. Das die DNS enthaltende Pellet wurde in H<sub>2</sub>O resuspendiert und die RNase bei 65°C inhibiert.

Wurde die DNS als PCR-Template oder für Southern Blot Analysen eingesetzt, wurde das innuSPEED Bacteria / Fungi DNA Kit (Analytik Jena AG, Jena) für die Isolierung der chromosomalen DNS von Pilzen und Bakterien verwendet.

## 2.6 Southern Blot Analyse

Nach Standard-Protokollen (Sambrook & Russel, 2001) wurde auf Agarose-Gelen aufgetrennte DNS auf Nylonmembranen übertragen, um komplementäre DNS mit radioaktiv markierten Sonden zu detektieren (Southern, 1975). 25 µg genomische DNS wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen fragmentiert und auf Agarose-Gelen aufgetrennt. Nach der Generierung von Doppelstrangbrüchen mit Depurinierungspuffer (0,25 M HCl) wurden mit Hilfe des Denaturierungspuffers (1,5 M NaCl, 0,5 M

NaOH) Einzelstränge produziert. Um die Bindung der DNS an die Membran zu unterstützen, wurde Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris / HCl pH 7,0) verwendet. Die DNS wurde in 20 \* SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) auf eine Nylonmembran transferiert und mit UV-Crosslinking kovalent gebunden.

Die Sonden wurden mittels PCR und den in Tabelle 2.3 gelisteten Primern amplifiziert und anschließend mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-CTP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) unter Verwendung des Prime-It II Random Primer Labeling Kits (Stratagene, Waldbronn) radioaktiv markiert. Während der Hybridisierung in Church Puffer (7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 250 mM Natriumphosphat pH 7,2) konnten die markierten Sonden an die komplementäre DNS auf den Membranen binden. Für die Detektion der Signale wurden die Membranen auf Phosphorschirme (Fujifilm, Düsseldorf) exponiert und diese mit einem FLA-5100 Scanner (Fujifilm) bei 635 nm gescannt.

Tabelle 2.3. Primer für die Herstellung der Sonden für Southern Blot Analysen.

Name	Sequenz (5' – 3')	Anwendung
FP31	CGG CCT ATT ACT CCT TGA	Sonde als1 for
FP32	GAT GCG ACA TAG TTG GTA	Sonde tef2 for
FP33	GGG AAT TAT ACT GAG TAA	Sonde met3 for
FP34	GAA GTA AAC CGG TGC TAG	Sonde adh7 for
FP48	GAC AAC TTG GGT TGA AGA	Sonde als1 rev
FP49	GAA AAA TTT GTT AGA AAA	Sonde met3 rev
FP50	AGC TTT CAA TTC TTT TGA	Sonde adh7 rev
FP51	TAT TGA AGT TTT TGC GGC	Sonde tef2 rev
FP123	CTG GAG TCC GGC ATT AAC GTC	Sonde cyn for
FP124	CGG CTG GAA TTG CCT GAT GCG	Sonde cyn rev
FP126	CTC CAT CAC TCG TCT GGC GCG	Sonde rfe for
FP127	GGC ATA AGA CAA ATT TAT GAG	Sonde rfe rev
FP133	AGT TTA TCC AGG GGT TTG CGG TGG	Sonde luxS for
FP134	TCA GTA AAC TAT CTT CAC AAT TAA TTG	Sonde luxS rev
FP211	TCA ATC GCG CAA CGG CAG	Sonde Tn7 rev
FP214	TGC TGC GCC AGC GCT ACG	Sonde Tn7 for

## 2.7 Isolierung von RNS

Planktonisch wachsende Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet, während in Petrischalen gewachsene Biofilme mit Hilfe von Zellschabern (Sarstedt, Nürnberg) von der Oberfläche gelöst wurden.

*C. albicans* Zellen wurden in flüssigen Stickstoff getropft, um Zellperlen zu erhalten, die bei -80°C gelagert wurden. Die Zellperlen wurden in einer mit Stickstoff gekühlten Retsch Mühle (Retsch, Haan) mechanisch aufgeschlossen und die RNS mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

*P. aeruginosa* und *E. coli* Zellen wurden umgehend mit RNA protect (Qiagen GmbH) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die RNS zu stabilisieren. Die Zellen wurden mit Lysozym (1 mg / ml) in TE-Puffer aufgeschlossen und die RNS nach dem RNeasy Mini Kit gereinigt.

Um die Reinheit der RNS zu erhöhen, wurde eine Lithiumchlorid-Fällung angeschlossen. Die RNS wurde in 2 M LiCl Endkonzentration bei -20°C inkubiert, mit eiskalten 70% Ethanol gewaschen und in RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Konzentration und Reinheit der isolierten RNS wurde mit RNA 600 Nano Kits in einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

## 2.8 Quantitative *real time* PCR

Unterschiedliche Expressionsraten auf Transkript-Level wurden mit quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) analysiert. 1 µg Gesamt-RNS (2.7) wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH) in cDNS transkribiert. 2 ng der cDNS wurde als Matrize für die *real time* PCR eingesetzt, die in einem LightCycler 480 (Roche, Mannheim) durchgeführt wurde. Das LightCycler 480 Master Kit (Roche) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet mit Gen-spezifischen Kombinationen aus Primern (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin) und Sonden (Universal ProbeLibrary, Roche), die in Tabelle 2.4 dargestellt sind. Die Daten wurden mit der LightCycler Software (Roche) ausgewertet.

Tabelle 2.4. Primer und Sonden für die qRT-PCR.

Gen	Genbank- Nummer	Primer 1 Primer 2	Sonden- Nummer
rdn18		5'-ccttaacgaggaacaattgga-3' 5'-tacgcttttgagctggaat-3'	66

act1	orf19.5007	5'-aaccaccggtattgttttg-3' 5'-gcgtaaattggaacaacgtg-3'	9
rip1	orf19.5893	5'-accaccaccaccttatccaa-3' 5'-ttgaccggatttgttca-3'	63
grp2	orf19.4309	5'-acataccgcatctccattcc-3' 5'-ggcttgtaaggcattgttg-3'	78
adh7	orf19.5517	5'-tgggtagtgatgccaaggta-3' 5'-caattgcaaggccaaatga-3'	119
rahU	PA0122	5'-aagtcagcagcatgaacgtg-3' 5'-gtgttgccgtcgtagcagt-3'	37
16S rRNA	PA0668.1	5'-taagcaccggctaacttcgt-3' 5'-gattaacgcttgacccttc-3'	66
cbpD	PA0852	5'-acggctataaccccgagaag-3' 5'-ctggtgatcgagcagaacg-3'	1
apri	PA1250	5'-tgattcttctcagcgttcc-3' 5'-cccaggtcgtagccactg-3'	1
	PA1657	5'-gggctgcagatcaactcg-3' 5'-cgcaactccatcagcttctt-3'	159
chiC	PA2300	5'-taccagcagggtcgttc-3' 5'-cggcgaccacgttgact-3'	11
ampR	PA4109	5'-tgctgtgtgactccttcgac-3' 5'-tagtgccaccctcgaaa-3'	40
cynS	b0340	5'-ggatctcgacgaagactcca-3' 5'-ggaatacggatcatcaatgcag-3'	86
rfe	b3784	5'-cgggtgctgttttcattg-3' 5'-gcacggattttacgctgat-3'	42
rffA	b3791	5'-ctgcaagctgcatacctgtg-3' 5'-gacgttgctggttgatacga-3'	38
rrsA	b3851	5'-ccctagctggtctgagagga-3' 5'-cgtaggagtctggaccgtg-3'	5
TurboFP602		5'-gcaaagccttcatcaaccac-3' 5'-cctcaggaaggactgctta-3'	37

## 2.9 Präparation von Proteinen aus Zelllysaten

Um Gesamtproteinextrakte zu erhalten, wurden *C. albicans* Zellen mit Glasperlen lysiert. Die geernteten Zellen wurden mit Glasperlen in Extraktionspuffer (PBS pH 7,4, 1% Nonidet NP-40, 0,1% SDS) mit Proteinaseinhibitor (complete protease inhibitor,

Roche) kräftig gemischt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Proteinkonzentration der Überstände nach Bradford (Bradford, 1976) mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bestimmt, kalibriert mit BSA.

Zur Aufkonzentrierung der Proteine wurden Proteinpräzipitationen durchgeführt (Wessel & Flügge, 1984). Hierfür wurden die Proteinlysate mit einem Volumen Methanol / Chloroform (4 : 1) gemischt. Die Proteine in der unteren Phase wurden mit Methanol präzipitiert und in der wässrigen Lösung resuspendiert.

## 2.10 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden mit SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Ausubel *et al.*, 1988; Laemmli, 1970) der Größe nach aufgetrennt unter Verwendung des Mini Protean Cell oder des Protean II xi Cell Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Üblicherweise wurden 50 µg Protein in Gelen mit 12% Acrylamid in 375 mM Tris / HCl pH 8,8, 0,1% SDS, APS und TEMED getrennt.

## 2.11 Western Blot Analyse

Für die spezifische Detektion von GFP wurden die der Größe nach getrennten Proteine in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore, Schwalbach) übertragen. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Membranen in 5% Magermilchpulver in PBST (0,05% Tween20 in PBS) inkubiert und anschließend mit PBST gewaschen. Der erste Antikörper gegen GFP ( $\alpha$ -GFP N-terminal, produced in rabbit; Sigma-Aldrich, Hamburg) wurde aufgebracht, gefolgt vom zweiten goat-anti-rabbit Peroxidase-konjugierten Antikörper (Amersham, Freiburg), 1:10000 verdünnt in PBST mit 1% BSA. Die Signale wurden mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) detektiert und mit einer CCD Kamera (LAS-1000plus, Fujifilm) dokumentiert.

## 2.12 Isolierung sekretierter Proteine

Für die Identifizierung von Proteinen wurden Überstände von in Petrischalen angezogenen Biofilmen gesammelt und mittels Sterilfiltration von den Zellen befreit (Filtropur BT, PES Membran, Porengröße 0,2 µm; Sarstedt, Nürnberg). Die Proteine in den Überständen wurden durch Ultrafiltration (Amicon® Ultra-15 Centrifugal filter units, MWCO: 10 kDa; Millipore, Schwalbach) bei Raumtemperatur angereichert und

bei -20°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC protein microplate assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bestimmt (Lowry *et al.*, 1951).

## 2.13 Identifizierung sekretierter Proteine mittels Massenspektrometrie

Je 1 µg der sekretierten Proteine (2.12) von drei biologischen Replikaten wurden gepoolt und mit 5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in 0,5 M Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) bei 60°C für 60 min reduziert, gefolgt von einer Alkylierung mit 3,5 mM Iodacetamid für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Proteine wurden durch die Zugabe von Trypsin (sequencing grade modified trypsin; Promega, Mannheim) im Verhältnis 1:50 (w/w) für 16 h bei 37°C verdaut. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Verdampfen wurde das Peptidgemisch in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) wiederaufgenommen und 2 µg für die *reversed phase* Nano Liquid Chromatography (Ultimate 3000 nanoflow LC system; Dionex, Germering) verwendet. Die Peptide wurden mit einer Flussrate von 20 µl / min entsalzt (Acclaim PepMap100, C18, 5 µm i.d. \* 5 mm; Dionex) und anschließend auf einer analytischen Säule (Acclaim PepMap100, C18, 5 µm, 100 Å, 75 µm i.d. \* 25 cm) für 180 min bei 40°C aufgetrennt mit einem linearen Gradienten von 5 – 50% Diluent (80% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure) und einer Flussrate von 300 nl / min. Das Ende der Säule stand in direkter Verbindung mit der Spottingspitze eines Proteiner fc Fraktionssammlers (Bruker Daltonic, Bremen). Die α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure- (HCCA) Matrixlösung wurde durch die Zugabe von 1/40 einer gesättigten HCCA-Lösung (90% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure) zu 1 mM NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> in 90% Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure hergestellt und zu der Spottingspitze gepumpt, in der sie mit der Elutionslösung gemischt wurde. Diese Mischung aus Eluent und Matrix wurde auf einem 384 well anchorChip target (Bruker Daltonic) alle 20 sec zwischen Minute 20 und 148 abgelegt. Um Übertragungen zu minimieren, wurde nach jedem Probenlauf ein Wasserlauf angeschlossen. Die Kalibrierungslösung (Peptide Calibration Standard II; Bruker Daltonic) mit Matrix wurde im Anschluss manuell auf den Kalibrierungspunkten abgelegt.

Die monoisotopische Masse der Peptide wurde mit einem Massenspektrometer (MS) bestimmt unter Verwendung des matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF; Ultraflex II TOF/TOF 200; Bruker Daltonic) mit einem massenspektrometrischen Massenscan von 700 bis 5000 Da. Die Massenspektren wurden im Reflektormodus aufgenommen und unter Verwendung von WARP-LC, FlexControl und FlexAnalysis 3.3 Software (Bruker Daltonic) verarbeitet. Die Massen für die MS/MS Messungen (Signal / Hintergrund > 20, maximal 30 MS/MS Messungen pro Fraktion)

wurden von der Massenliste ausgewählt, die zuvor mit Hilfe der WARP-LC Software generiert wurde. Die Fragmentspektren der Peptide für die MS/MS Analysen wurden mit Hilfe des LIFT Modus generiert.

Für die Identifizierung der Proteine wurden die tandem MS Spektren mit BioTools (Bruker Daltonic) an das Datenbanksuchprogramm MASCOT 2.2.07 (Matrix Science, UK) übergeben. Eine Proteindatenbank mit 11774 Einträgen, basierend auf dem Assembly 21 der translatierten offenen Leserahmen des *C. albicans* SC5314 Genoms der *Candida*-Genom-Datenbank (<http://www.candidagenome.org/>) und auf NC002516 des Stammes PAO1 der *Pseudomonas*-Genom-Datenbank (<http://www.pseudomonas.com/>) (Winsor *et al.*, 2009), wurde mit den folgenden Suchparametern verwendet: maximal eine verfehlte Schnittstelle, Genauigkeit 100 ppm für Peptide und 0,5 Da für MS/MS (MALDI-TOF/TOF, Enzyme: Semi-Trypsin, variable Modifikationen: Oxidation (M), feste Modifikationen: Carbamidomethyl (C)). Wahrscheinlichkeitsbasierte MASCOT-Treffer wurden für die Bewertung der Proteinidentifikationen verwendet. Nur Peptide mit p-Values < 0,05 für zufälliges Vorkommen wurden als signifikant berücksichtigt. Zur Abschätzung der potentiellen falsch-positiven Zuordnung wurde eine Zuordnung der Messungen zu einer synthetischen Datenbank gleicher Größe mit randomisierten Proteinsequenzen durchgeführt. Daraus ergab sich eine durchschnittliche falsch-positive Rate der Zuordnungen von 2,8%. In den Proben der *C. albicans* Biofilme wurden 17 Proteine fälschlicherweise *P. aeruginosa* zugeordnet und 10 Pilz-Proteine wurden irrtümlich in den bakteriellen Proben gefunden (Tabelle 0.1).

Da die Anzahl der Peptide, die einem bestimmten Protein zugeordnet werden können, mit der relativen Menge des Proteins in der Mischung korreliert (Liu *et al.*, 2004), wurde der Mittelwert der Anzahl an identifizierten Peptiden von zwei technischen Replikaten bestimmt und für eine semi-quantitative Bestimmung verwendet. Änderungen von mindestens zwei Peptiden, die einem individuellen Protein zugeordnet wurden, im Vergleich zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten innerhalb einer biologischen Bedingung oder zwischen zwei Bedingungen zu einem Zeitpunkt wurden als unterschiedlich sekretiert klassifiziert. Statistische Analysen wurden mit dem Multi Experiment Viewer MeV v4.8 durchgeführt (Saeed *et al.*, 2003) (Saeed *et al.*, 2006). Für den Vergleich der biologischen und technischen Replikate wurde ein zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben mit auf t-Verteilung basierten p-Werten verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels der Standard Bonferroni Korrektur berechnet und das Signifikanzniveau auf 0,01 festgelegt. Für die Bewertung der Änderungen der Peptidzahlen wurden zweifaktorielle ANOVA Tests mit auf Permutationen basierten p-Werten (1000 Permutationen pro Protein) verwendet, das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

## 2.14 Analyse von Pyoverdin

Die Überstände von Biofilmen wurden sterilfiltriert und in Mikrotiterplatten analysiert. Das Absorptionsspektrum zwischen 230 nm und 1000 nm wurde gemessen und das Maximum bei 400 nm bestimmt. Ausgehend von diesem Absorptionsmaximum wurden Wellenlängenscans für Fluoreszenzsignale durchgeführt und die maximale Extinktion bei 405 nm und Emission bei 455 nm ermittelt (Infinite M200 Pro; Tecan, Schweiz).

Um die Produktion von Pyoverdin während der Entwicklung von Biofilmen zu verfolgen, wurden Biofilme in Mikrotiterplatten angezogen und die Fluoreszenz bei  $\lambda = 405 / 455$  nm über 72 h alle 30 min bestimmt (Visca *et al.*, 1992).

## 2.15 Mikroskopie

### 2.15.1 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Fluoreszenz der Reporterstämme *in vivo* zu verfolgen, wurde Fluoreszenzmikroskopie verwendet (AxioObserver Z1, Zeiss, Göttingen). Für statische Biofilmanalysen wurden die Biofilme in Multi-Well Sensoplatten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. In Fließzellen (ibidi, Martinsried) konnten die Mikroorganismen 90 min adhären, bevor diese mit einer kontinuierlichen Flussrate von 10 ml / h durchströmt wurden. Die Expression von *yEGFP* und *TurboGFP* wurde mit einem Filterpaar der Wellenlängen 480 / 525 nm detektiert und die Filter 550 / 605 nm für *TurboFP602* verwendet. Die Zellen wurden mit DIC visualisiert.

Für die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde ein in Matlab erstelltes Programm eingesetzt. Mit Hilfe eines *image processing tools* wurden die Zellen anhand der Kontraste in den DIC-Aufnahmen erkannt und auf die Fluoreszenzbilder übertragen. In den erkannten Zellen wurden die Signalintensitäten ausgelesen und auf Pixel normiert. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen. Das Programm PixelZählen kann Abbildung 0.1 des Anhangs entnommen werden.

### 2.15.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die Biofilme wie oben beschrieben (2.2) mit einem Waschschrift nach 90 min auf Thermanox Deckgläschen (Nunc, Thermo Scientific, Langenselbold) in 24 Well Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) bei 37°C ohne Schütteln inkubiert unter Verwendung von 1000  $\mu$ l der

standardisierten Zellsuspension pro Well. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurde der Überstand für 30 min mit 2% Glutaraldehyd in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 80 mM NaCl bei pH 7,3 ersetzt, mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen, bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die Deckgläschen wurden nach Standardprotokollen gesputtert und mit einem LEO 1530 VP Elektronenmikroskop (Zeiss, Göttingen) analysiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen der Interaktionen von *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa*

*Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa* sind zwei der wichtigsten nosokomialen Pathogene, die in immunsupprimierten Patienten lebensbedrohliche Infektionen verursachen. Beide Mikroorganismen sind in der Lage persistente Biofilme auszubilden und miteinander unter anderem durch die jeweiligen Quorum sensing Moleküle zu interagieren. In dieser Arbeit wurden diese Interaktionen untersucht. Hierfür wurden verschiedene Testsysteme aufgebaut und die Sekretome einzelner und gemischter Biofilme analysiert und verglichen.

#### 3.1.1 Optimierung der Wachstumsbedingungen für Biofilme

Um Biofilme reproduzierbar zu kultivieren wurden unterschiedliche Parameter zur Kultivierung der Biofilme getestet und optimiert. Da unter anderem Untersuchungen mit gemischten Biofilmen von *C. albicans* und *P. aeruginosa* durchgeführt wurden, mussten Bedingungen gefunden werden, unter denen beide Organismen alleine und gemeinsam in der Lage sind, distinkte Biofilme zu bilden. Für die Optimierung der Wachstumsbedingungen wurden die Wildtypstämme Can14 und S2\_B004 oder S2\_B008 verwendet.

Da die Biofilmbildung und die Adhärenz, wie in 1.2 beschrieben, von den Eigenschaften der Oberflächen abhängig ist und auf kleinste Änderungen stark reagiert, wurden zunächst unterschiedliche Mikrotiterplatten und Petrischalen verschiedener Hersteller auf die Adhäsionseigenschaften getestet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Biofilme für alle Untersuchungen in 96 Well-Mikrotiterplatten (Sarstedt, Bestellnummer 82.1571.001) oder Petrischalen (Sarstedt, Bestellnummer 82.1473.001) angezogen. Da jedoch unterschiedliche Chargen geringe Abweichungen aufwiesen, wurden auch diese nochmals getestet bevor sie für das Anziehen von Biofilmen verwendet wurden.

Biofilme wurden bei 37°C unter statischen Bedingungen kultiviert. Die Temperatur wurde der natürlichen Umgebung, in der Biofilme von *C. albicans* und *P. aeruginosa* zu finden sind, angepasst. Die statischen Bedingungen wurden gewählt, da Biofilme, die beispielsweise auf Implantaten wachsen, geringen Scherkräften ausgesetzt sind. Um jedoch zu verhindern, dass planktonisch wachsende Zellen, die nicht Teil des Biofilms sind, die Ergebnisse beeinflussen, wurde nach einer initialen Adhärenzphase von

90 min das Medium inklusive der nicht-adhärenen Zellen abgenommen und durch frisches vortemperiertes Medium ersetzt.

Beide Organismen wurden mit einer standardisierten hohen Zelldichte in die Versuche eingesetzt ( $OD_{600} = 1,0$ ;  $3 \cdot 10^7$  *C. albicans* / ml;  $1 \cdot 10^9$  *P. aeruginosa* / ml). Bedingt durch die Abnahme der nicht adhärenen Zellen nach 90 min, wurden die Biofilme nur aus den anhaftenden Zellen, limitiert durch die Oberfläche, gebildet.

Für die gemeinsame Kultivierung von *C. albicans* und *P. aeruginosa* in Biofilmen wurden verschiedene Medien, die für Biofilmuntersuchungen von *C. albicans* und *P. aeruginosa* beschrieben sind, für beide Organismen getestet. In Abbildung 3.1 sind einige Tests exemplarisch abgebildet.

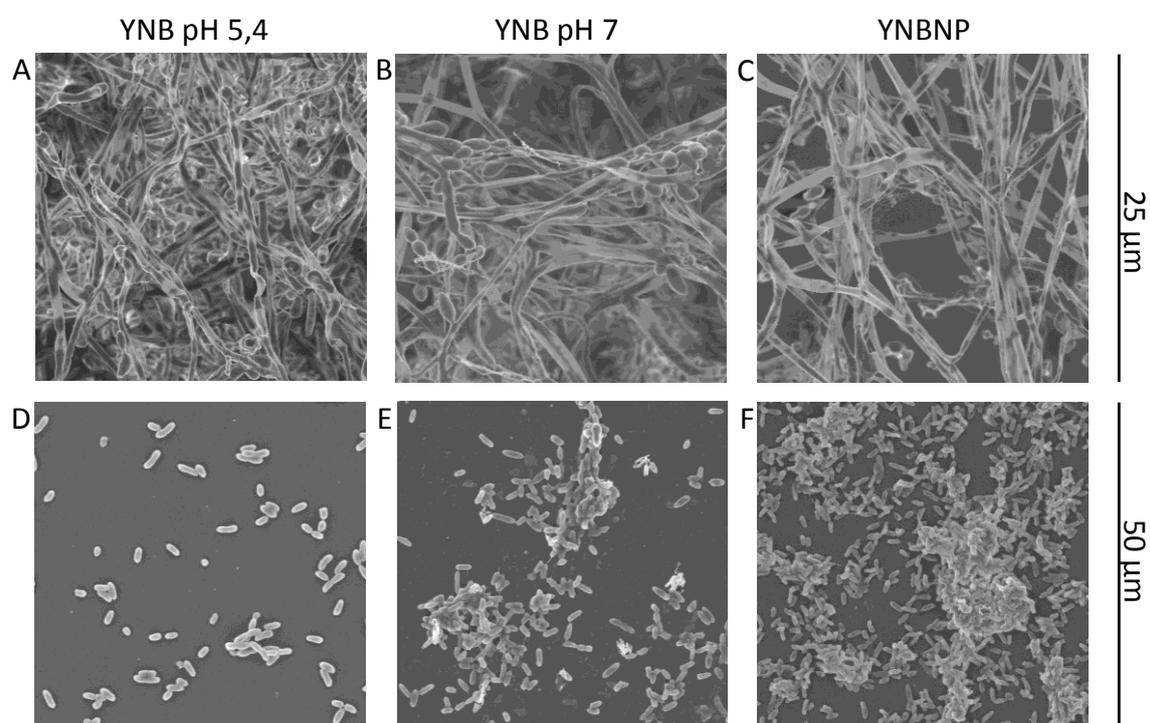


Abbildung 3.1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von 48 h gewachsenen Biofilmen von *C. albicans* Can14 (A, B, C) und *P. aeruginosa* S2\_B004 (D, E, F) in YNB-Medium pH 5,4 (A, D), YNB-Medium pH 7,0 (B, E) und YNBNP-Medium (C, F).

In dem für *C. albicans* beschriebenen Medium YNB pH 5,4 bildete *P. aeruginosa* keine Biofilme, nur einige adhären Mikrokolonien waren zu erkennen (Abbildung 3.1 D). Die Anpassung des pH-Wertes an neutrale Bedingungen führte zu mehr Bakterien in einer Biofilm-ähnlichen Struktur (Abbildung 3.1 E). Erst mit einer Änderung der Kohlenstoffquelle von Glukose zu *N*-Acetylglucosamin wurden strukturierte Biofilme gebildet (Abbildung 3.1 F). *C. albicans* bildete unter allen hier gezeigten Bedingungen aus Hyphen, Pseudohyphen und Hefen zusammengesetzte Biofilme (Abbildung 3.1 A, B, C).

Das Minimalmedium YBNBP wurde schon früher für Interaktionsstudien zwischen *C. albicans* und *P. aeruginosa* beschrieben (Hogan *et al.*, 2004). Wenn möglich und nicht anders erwähnt, wurden Untersuchungen mit *C. albicans* und *P. aeruginosa* in YBNBP-Medium durchgeführt.

Gemischte Biofilme wurden in YBNBP-Medium bei 37°C unter statischen Bedingungen angezogen. Auch hier wurde nach einer initialen Adhärenzphase von 90 min der Überstand gegen frisches Medium getauscht, um planktonische Zellen zu entfernen. Da die für Monospezies-Biofilme gewählten standardisierten Zellsuspensionen unterschiedlich viele Zellen enthielten ( $3 \cdot 10^7$  *C. albicans* / ml;  $1 \cdot 10^9$  *P. aeruginosa* / ml), wurde der Einfluss verschiedener Anfangszellzahl-Verhältnisse auf die Ausbildung gemischter Biofilme getestet. Es zeigte sich, dass das Verhältnis der eingesetzten Zellzahlen nach 24 h Inkubation keine Auswirkungen auf den gemischten Biofilm hat (Abbildung 3.2 A, B). Dieses ist auf das Einsetzen von hohen Zellzahlen zurückzuführen. Durch das Abnehmen nicht-adhätierender Zellen nach 90 minütiger Inkubation wird der Biofilm daraufhin nur durch die an der Oberfläche anhaftenden Zellen ausgebildet. Diese werden durch die Oberfläche begrenzt und nicht durch die Anzahl eingesetzter Zellen. *C. albicans* und *P. aeruginosa* bildeten bevorzugt geschichtete Biofilme aus. Zum Vergleich mit den Einzelbiofilmdaten wurden die standardisierten Zellsuspensionen für Versuche mit gemischten Biofilmen eingesetzt. Unter allen untersuchten Bedingungen bildeten *P. aeruginosa* und *C. albicans* bevorzugt geschichtete Biofilme. Die an der Oberfläche angehafteten Hefezellen wurden von einem Netzwerk aus Hyphen und Hefen bedeckt, welches wiederum von bakteriellen Schichten überdacht wurde. Am Übergang zwischen den Schichten ist zu erkennen, dass *P. aeruginosa* dicht auf den Hefe- und Hyphenzellen wächst. Für Hyphen wurde dieses schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Hogan & Kolter, 2002). Da in der Literatur beschrieben ist, dass *P. aeruginosa* die Filamentation von *C. albicans* verhindert (Hogan & Kolter, 2002), wurde anschließend untersucht, ob Hyphen auch ausgebildet werden, wenn *C. albicans* Zellen zu bereits 90 min adhätierenden *P. aeruginosa* Zellen gegeben werden (Abbildung 3.2 D). Außerdem wurden Biofilme betrachtet, in denen *P. aeruginosa* nach *C. albicans* eingesetzt wurde (Abbildung 3.2 C). Nach Inkubation für 48 h waren keine offensichtlichen Unterschiede zu beobachten. Die gemischten Biofilme entwickelten sich mehrschichtig, bestehend aus Hyphen, Hefen und Bakterienzellen. Zumindest unter diesen Wachstumsbedingungen beeinträchtigte *P. aeruginosa* die Filamentation von *C. albicans* nicht sichtbar.

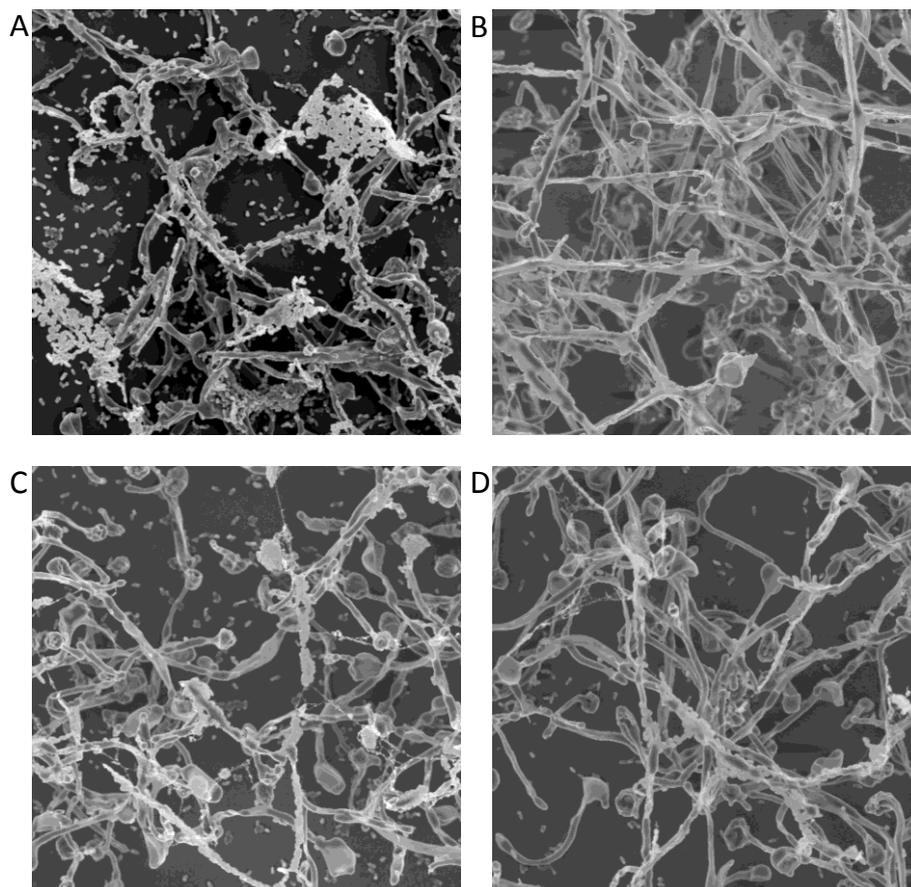


Abbildung 3.2. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen 24 h (A, B) und 48 h (C, D) gewachsener gemischter Biofilme von *C. albicans* Can14 und *P. aeruginosa* S2\_B004 in YNBNP-Medium. A. Biofilm, der aus den adhärennten Zellen von  $3 \cdot 10^7$  Can14 und  $1 \cdot 10^9$  S2\_B004 / ml gebildet wurde. B. Biofilm aus  $3 \cdot 10^7$  Can14 und  $1 \cdot 10^8$  S2\_B004 / ml vorinkubierten Zellen. C. S2\_B004 wurde zu adhärennten Can14 gegeben und für 48 h inkubiert. D. Nach Adhärenz von S2\_B004 wurde Can14 hinzugefügt und die Biofilme für 48 h inkubiert. Seitenkanten entsprechen 45  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2 Etablierung eines *in vitro* Assays zur quantitativen Untersuchung von Biofilmen

Zur Quantifizierung von *C. albicans* und *P. aeruginosa* Biofilmen wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Methoden für die Anwendungen verglichen und optimiert. Der Assay sollte zum Vergleich verschiedener Mutanten sowie zur Detektion des Einflusses von Substanzen auf Biofilme eingesetzt werden. Es wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Farbstoffe getestet, die von Zellen umgesetzt werden oder die Zellen anfärben, von denen nur einige vielversprechende Alternativen kurz erläutert werden.

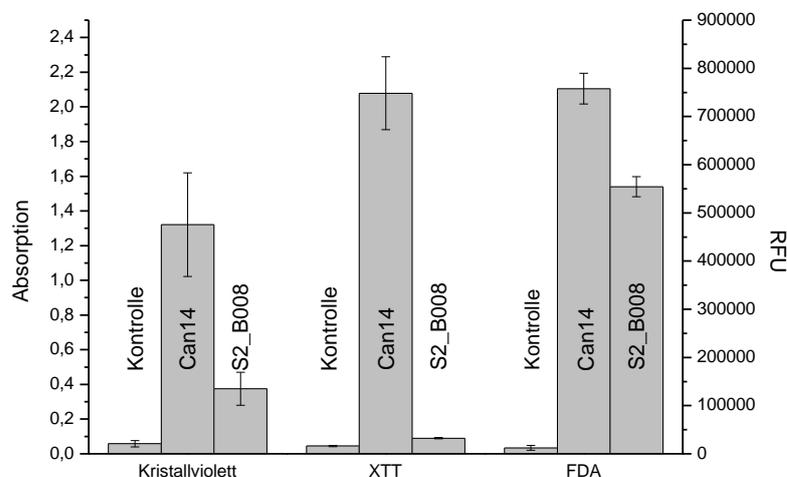


Abbildung 3.3. Vergleich verschiedener *in vitro* Assays zur Quantifizierung von Biofilmen. 48 h gewachsene Biofilme von *C. albicans* Can14 und *P. aeruginosa* S2\_B008 wurden mit Kristallviolett, XTT oder FDA inkubiert und die Färbung bei 595 nm (Kristallviolett), 490 nm (XTT) oder 485 / 535 nm (FDA) verglichen mit Kontrollen ohne Mikroorganismen bestimmt.

Die Färbung von Biofilmen mit Kristallviolett wurde für verschiedene Organismen beschrieben (Peeters *et al.*, 2008). 48 h gewachsene Biofilme von *C. albicans* und *P. aeruginosa* wurden nach Antrocknung mit einer 1%-igen wässrigen Kristallviolett-Lösung versetzt. Nach einem Waschschrift wurde das an die Zellen gebundene Reagenz mit Ethanol gelöst und bei 595 nm vermessen. *C. albicans* lieferte signifikante Signale verglichen mit Kontrollen ohne Mikroorganismen, während *P. aeruginosa* den Farbstoff nur schwach band. Außerdem waren die Standardabweichungen relativ hoch (Abbildung 3.3). Das basische Reagenz bindet an negativ geladene Oberflächenmoleküle lebender und toter Zellen und an Polysaccharide der extrazellulären Matrix. Somit kann mit dieser Methode nicht auf metabolisch aktive Zellen geschlossen werden.

Für Quantifizierungen von *C. albicans* Biofilmen wird verbreitet das Tetrazoliumsals XTT verwendet, das von den Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert wird (Knight & Dancis, 2006). Wiederum wurden 48 h gewachsene Biofilme von *C. albicans* und *P. aeruginosa* für den Test verwendet. Die Biofilme wurden mit einer XTT-Menandion-Lösung bei 37°C im Dunkeln inkubiert und der Reagenzumsatz bei 490 nm gemessen (2.3.2). *C. albicans* Biofilme lieferten hohe Signale im Vergleich zu den Kontrollen ohne Mikroorganismen (Abbildung 3.3). Da unter diesen Bedingungen *P. aeruginosa* XTT nicht umsetzte, wurde der Assay verwendet, um die Aktivität von *C. albicans* auch in gemischten Biofilmen zu bestimmen.

Fluoreszeindiacetat (FDA) wird von Esterasen lebender Zellen zu dem fluoreszierenden Fluoreszein umgesetzt und ist für die Analyse humaner Zellen bekannt (Kleymann & Werling, 2004). Biofilme von *C. albicans* und *P. aeruginosa* wurden mit FDA inkubiert und die Fluoreszenz bei 485 nm Extinktion und 535 nm Emission ausgelesen (2.3.1). Beide Mikroorganismen setzten FDA um und lieferten signifikante Signale (Abbildung 3.3). Da diese Methode für beide Organismen ausreichend hohe Signale mit geringen Standardabweichungen erzielte, die Handhabung einfach und kostengünstig ist, wurden Biofilme einzelner Organismen in dieser Arbeit mit FDA quantifiziert.

### **3.1.3 Einfluss von Quorum sensing Molekülen auf Biofilme von *C. albicans* und *P. aeruginosa***

Mit Hilfe des *in vitro* FDA-Assays wurde untersucht, ob die Quorum sensing Moleküle von *C. albicans* und *P. aeruginosa*, wie bereits beschrieben (Cugini *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2004; McAlester *et al.*, 2008), Einfluss auf Biofilme der anderen Spezies haben. Gleichzeitig wurde der Assay mit diesen Untersuchungen validiert.

Die initiale Adhärenzphase ist ein wesentlicher Schritt in der Kolonisation von Oberflächen durch Mikroorganismen, aber auch am anfälligsten für Störungen. Wurde während der Adhäsion von *C. albicans* das Medium mit Farnesol versetzt, bildete Can14 Biofilme, die im Vergleich zur Kontrolle YNBNP um ca. 75% weniger Zellen enthielten. Auch wenn Farnesol zu 24 h gewachsenen Biofilmen gegeben wurde und diese weiter 24 h inkubiert wurden, führte es zu einer Reduzierung des Biofilms (Abbildung 3.4). Dieser konzentrationsabhängige Effekt wurde schon in früheren Studien gezeigt und mit der hyphen-inhibierenden Wirkung von Farnesol begründet (Ramage *et al.*, 2002a). 3OC12HSL als postuliertes hauptregulatorisches Quorum sensing Molekül in *P. aeruginosa* Biofilmen, hatte während der initialen Adhäsion weniger Auswirkungen als Farnesol auf die Biofilmbildung von Can14. Wurde es jedoch zu späteren Zeitpunkten auf die Biofilme gegeben, führte es zu einer Reduktion der im Biofilm befindlichen Biomasse vergleichbar zu Farnesol (Abbildung 3.4). Unter hypheninduzierenden Bedingungen verhindert 3OC12HSL wie Farnesol die Filamentierung von *C. albicans*. Dies wurde auch für Dodecanol gezeigt, welches der unpolaren Seitenkette von Farnesol oder 3OC12HSL entspricht (Hogan *et al.*, 2004). Biofilmbildung von *C. albicans* wurde durch die Anwesenheit von Dodecanol ähnlich wie durch Farnesol inhibiert (Abbildung 3.4). Da die Substanzen vor allem während der Adhäsion unterschiedliche Auswirkungen zeigten, wurde getestet, ob diese über den gleichen Signalweg mittels Chk1 wirken. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung der Substanzen auf die Adhäsionsphase der *chk1* Deletionsmutante Can778, sowie dem Ausgangsstamm Can777 und die Revertante Can779 als Kontrollen überprüft. Wie früher gezeigt, enthielten Biofilme von Can778 ähnlich viele Zellen wie der Wildtyp und

Farnesol hatte geringe Auswirkungen (Kruppa *et al.*, 2004). 3OC12HSL jedoch beeinflusste die Ausbildung von Biofilmen der Mutante stärker als die Kontrollen und führte zu um 50% reduzierte Biofilme. Dodecanol wirkte sich ähnlich wie auf den Wildtyp aus (Abbildung 3.4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Quorum sensing Molekül 3OC12HSL anders als Farnesol oder Dodecanol über einen anderen Weg Einfluss auf *C. albicans* Biofilme nimmt.

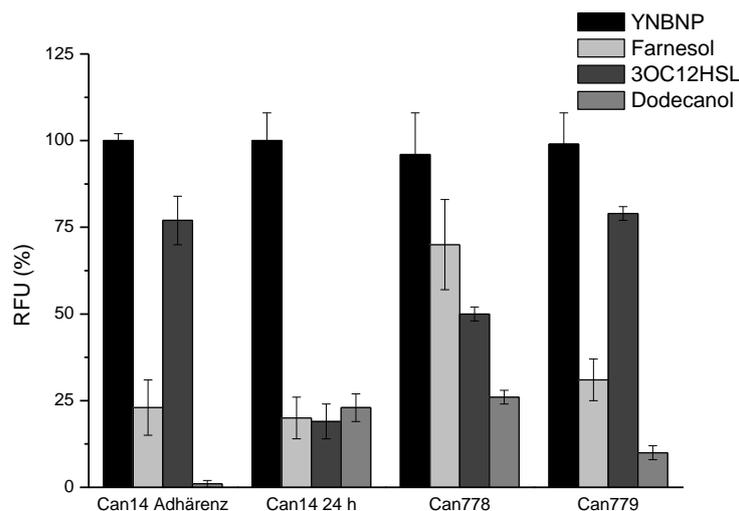


Abbildung 3.4. Einfluss von 300 µM Farnesol, 3OC12HSL und Dodecanol auf Biofilme von *C. albicans* Can14, Can778 (*chk1Δ*) und Can779 (*chk1Δ-CHK1*). Die Substanzen wurden während der Adhäsionsphase zugegeben oder zu 24 h gewachsenen Biofilmen und für weitere 24 h inkubiert. Biofilme wurde mit FDA quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten, die im Triplikate vermessen wurden.

Nachdem *P. aeruginosa* *C. albicans* beeinflusst, wurde überprüft, ob auch *P. aeruginosa* in der Lage ist, Signale von *C. albicans* zu detektieren. Zunächst wurde der Einfluss von Farnesol, 3OC12HSL und Dodecanol auf Biofilme des Wildtyps S2\_B008 getestet, wenn die Substanzen ausschließlich während der Adhäsionsphase zugegeben wurden. Wie für ein typisches Quorum sensing Molekül erwartet, waren Biofilme mit 3OC12HSL inkubiert bezüglich der Zellzahl vergleichbar zur Kontrolle. Farnesol, wie auch Dodecanol dagegen verminderten die Anzahl der Zellen im Biofilm, vermutlich indem die Adhäsion verhindert wurde (Abbildung 3.5). Um zu überprüfen, ob die Substanzen Biofilme nur während der Anlagerung der Zellen oder auch bereits bestehende beeinflussen, wurden diese auf 24 h gewachsene Biofilme gegeben und für weitere 24 h inkubiert. 3OC12HSL, Farnesol und Dodecanol führten zu um ca. 50% vermehrtem Umsatz von FDA (Abbildung 3.5). Die Substanzen fördern die Zellvermehrung oder zumindest die Anhaftung von neu gebildeten Zellen. Nachdem Farnesol und Dodecanol gegenteilige Effekte während Adhärenzphase und auf vor-

inkubierten Biofilme zeigten, wurde überprüft, ob diese wie für 3OC12HSL beschrieben über LasR wirken (Pearson *et al.*, 1994). Der Einfluss der Substanzen auf die Adhäsion der *lasR* Mutante S2\_B009 wurde getestet; die Revertante S2\_B010 wurde zur Kontrolle mitgeführt. S2\_B009 bildete einen um ca. 50% reduzierten Biofilm verglichen mit den Kontrollstämmen. Nachdem 3OC12HSL, Farnesol und auch Dodecanol sich auf Biofilme der *lasR* Mutante gering auswirkten (Abbildung 3.5), wirken sie über diesen Transkriptionsregulator.

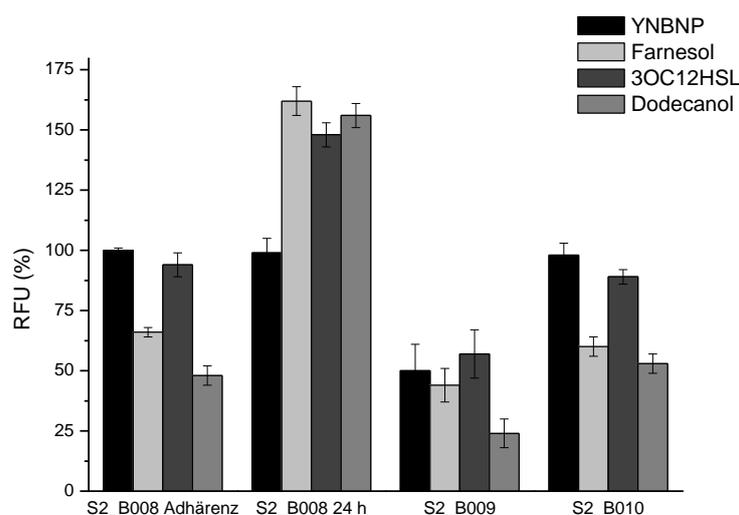


Abbildung 3.5. Einfluss von 300 µM Farnesol, 3OC12HSL und Dodecanol auf Biofilme von *P. aeruginosa* S2\_B008, S2\_B009 ( $\Delta lasR$ ) und S2\_B010 ( $\Delta lasR/plasR$ ). Die Substanzen wurden während der Adhäsionsphase zugegeben oder zu 24 h gewachsenen Biofilmen und weitere 24 h inkubiert. Biofilme wurden mit FDA quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von im Triplikot gemessenen drei biologischen Replikaten.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf eine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens der Mikroorganismen durch die Quorum sensing Moleküle zurückzuführen ist, wurde dieses überprüft. Es zeigte sich, dass *C. albicans* und *P. aeruginosa* in An- und Abwesenheit von Farnesol (300 µM), 3OC12HSL (300 µM) und Dodecanol (300 µM) mit vergleichbarer Teilungsrate wuchsen (Daten nicht gezeigt). Die Quorum sensing Moleküle wirken sich somit nicht auf das Wachstum der Mikroorganismen aus.

### 3.1.4 Vergleich der metabolischen Aktivität von *C. albicans* zwischen einzelnen und gemischten Biofilmen

Nachdem das Verhältnis von Hefen und Hyphen in gemischten Biofilmen verglichen mit reinen *C. albicans* Biofilmen verändert ist und auch die Ausbildung der Biofilme

insgesamt anders erscheint (Abbildung 3.1, Abbildung 3.2), wurde untersucht, ob der Metabolismus des Pilzes in gemischten Biofilmen beeinträchtigt ist. Zu diesem Zweck wurden Biofilme von Can14 und S2\_B008 einzeln und in Co-Kultur angezogen und mit Hilfe des XTT Assays (2.3.2) die Aktivität von *C. albicans* bestimmt.

Für vergleichende Analysen zwischen Einzel- und gemischten Biofilmen wurde zuvor überprüft, ob eine analoge Anzahl *C. albicans* und *P. aeruginosa* Zellen innerhalb der 90-minütigen Adhärenzphase an der Oberfläche anhaften. Da nach dieser Inkubationszeit das Medium inklusive nicht-adhärerender Zellen abgenommen und mit frischem ersetzt wurde, entwickelt sich der Biofilm ausschließlich aus diesen anhaftenden Zellen. Für die Quantifizierung adhärerender Zellen wurden CNF-markierte S2\_B008 Zellen (2.3.3) verwendet, sowie der XTT-Reduktionsassay (2.3.2) zur Bestimmung von Can14 Zellen. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten für *C. albicans* in gemischten Biofilmen ca. 80% der XTT Aktivität im Vergleich zu einzelnen Biofilmen, unter Berücksichtigung der 10% Hintergrundaktivität von *P. aeruginosa*. Für *P. aeruginosa* wurden jedoch keine wesentlichen Unterschiede an adhärenenten Zellen zwischen Mono- und Co-Kultur festgestellt (Abbildung 3.6). Diese Ergebnisse bestätigten vergleichbare Anfangsbedingungen bezüglich der Zellpopulationen, wodurch die Ergebnisse der folgenden Untersuchung miteinander verglichen werden können. Von anderen wurde unter Verwendung anderer Wachstumsbedingungen sowie unterschiedlicher Laborstämme eine signifikante Reduktion von Kolonie-bildenden Einheiten beider in gemischten Biofilmen adhärerender Organismen im Vergleich zu Einzel-Biofilmen berichtet (Bandara *et al.*, 2010).

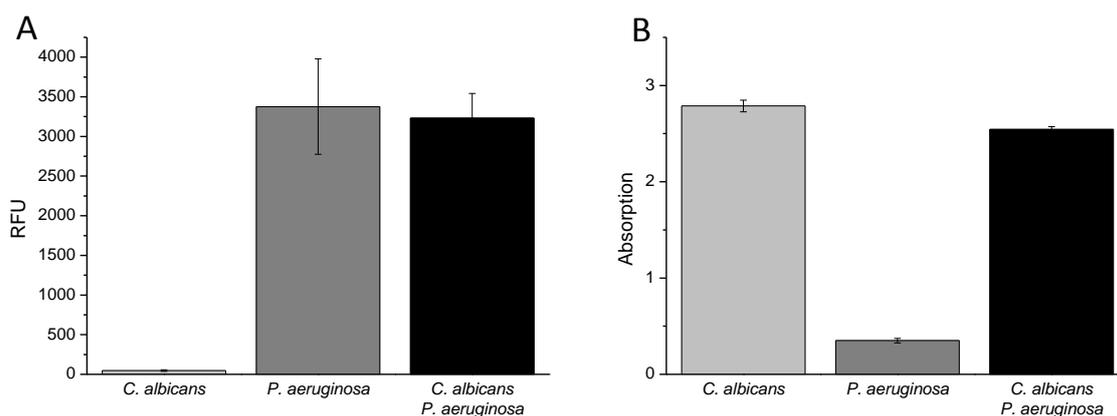


Abbildung 3.6. Bestimmung der adhärenenten Zellen nach Vorinkubation. Can14 (hellgrau) und S2\_B008 (dunkelgrau) wurden getrennt und zusammen (schwarz) für 90 min in Mikrotiterplatten inkubiert. Der Überstand wurde inklusive der nicht-adhärerenden Zellen abgenommen. A. Vorher CNF-markierte S2\_B008 Zellen wurden bei 595 / 680 nm bestimmt. B. Die metabolische Aktivität von Can14 wurde nach Verwendung des XTT-Assays bei 490 nm bestimmt.

Nachdem die Anzahl adhärenter Zellen, die die Basis der Biofilme bilden, zwischen Einzel- und gemischten Biofilmen vergleichbar ist, wurde untersucht, ob die metabolische Aktivität von *C. albicans* durch die Gegenwart von *P. aeruginosa* beeinträchtigt wird. Da frühere Studien zeigten, dass Interaktionen zwischen den beiden Organismen abhängig von der morphologischen Wachstumsform von *C. albicans* sind (Hogan & Kolter, 2002), wurden frühe Zeitpunkte der Biofilmbildung analysiert, während denen der Wandel von Hefen zu Hyphen stattfindet, und bis zu 72 h verfolgt. Für diese Analysen wurde der XTT-Reduktionsassay (2.3.2) verwendet und zum Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte auf einen internen Standard aus lysierten *C. albicans* Zellen normalisiert. Durch die Verwendung eines für *C. albicans* optimierten Protokolls wurde wenig durch *P. aeruginosa* verursachte Formazan-Produktion beobachtet, wodurch es möglich wurde, die metabolische Aktivität des Pilzes zu verfolgen.

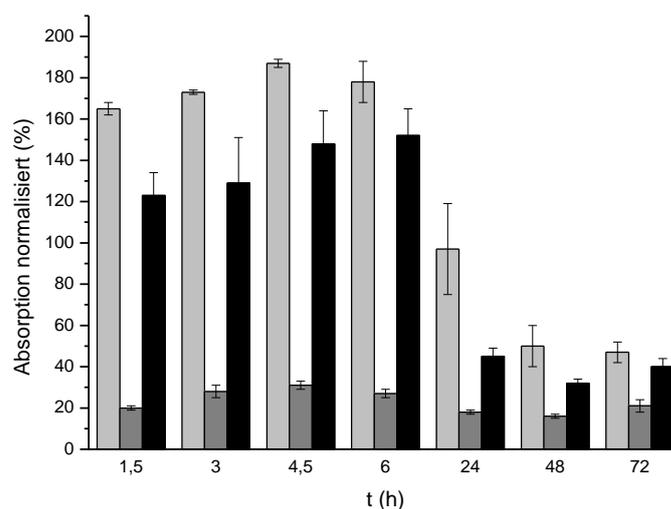


Abbildung 3.7. Metabolische Aktivität von Can14 (hellgrau) und S2\_B008 (dunkelgrau) Biofilmen im Vergleich zu gemischten (schwarz). Die Zellen wurden in 96 well-Platten für 1,5, 3, 4,5, 6, 24, 48 und 72 h inkubiert und die metabolische Aktivität mit Hilfe des XTT-Reduktionsassays bestimmt und auf einen internen Standard bestehend aus lysierten *C. albicans* Zellen normalisiert. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, die im Triplikate vermessen wurden.

*P. aeruginosa* Biofilme verblieben zu allen Zeitpunkten bei ca. 23 RFU, welches als Hintergrundaktivität des Assays in Gegenwart dieses Organismus gewertet wurde. In gemischten Biofilmen war die Aktivität von Can14 im Vergleich zu einzelnen Biofilmen grundsätzlich reduziert (Abbildung 3.7). Während den ersten sechs Stunden wurden in *C. albicans* und in gemischten Biofilmen hohe XTT Aktivitäten gemessen, die zwischen den 6 h und 24 h Zeitpunkten abnahmen. Bemerkenswerterweise war diese Reduktion der Aktivität in gemischten Biofilmen zu diesem Zeitpunkt stärker als im reinen. Nach

48 h und 72 h wurden die Unterschiede zwischen *C. albicans* alleine und in Co-Kultur mit *P. aeruginosa* geringer, da die Aktivität des Pilzes allgemein verringert war. Dieses ist auf den Verbrauch der zu Beginn zur Verfügung gestellten Nährstoffe zurückzuführen.

### **3.1.5 Analyse der von gemischten Biofilmen sekretierten Proteine im Vergleich zu *C. albicans* und *P. aeruginosa* Biofilmen**

Die mikroskopisch sichtbaren Unterschiede zwischen Mono- und Duospezies-Biofilmen (3.1.1) scheinen zumindest zum Teil auf einer Reduktion der metabolischen Aktivität von *C. albicans* zu beruhen (3.1.4), andererseits durch die Quorum sensing Moleküle hervorgerufen zu werden (3.1.3). Um diese Interaktionen genauer zu analysieren, wurde das Sekretom der Biofilme untersucht. Mikroorganismen nehmen andere Mikroben vor allem durch die Detektion extrazellulärer Komponenten wahr und reagieren auf deren Anwesenheit. Auch hier wurden frühe Zeitpunkte der Biofilmbildung analysiert, da die Mikroorganismen schnell aufeinander reagieren sollten. Um jedoch die Auswirkungen auf ältere Populationen zu erkennen, wurden 24 h und 48 h gewachsene Biofilme in die Analyse integriert. Jeweils drei unabhängige Biofilme von Can14 und S2\_B008 wurden gemeinsam und getrennt in Petrischalen über die gewählten Zeiträume angezogen, die Überstände abgenommen, steril filtriert und aufkonzentriert (2.12). Abbildung 3.8 zeigt die Gesamtmenge an Protein, die für die unterschiedlichen Proben mit Hilfe des DC Protein Assays (2.12) gemessen wurde, gemittelt über drei unabhängige Replikate. Die Proteinkonzentrationen nahmen in den Überständen von *C. albicans*, *P. aeruginosa* und den gemischten Biofilmen über den Zeitverlauf zu. In den Überständen der *P. aeruginosa* wurden nach 48 h Wachstum insgesamt 23 µg Gesamtprotein in 30 ml Medium nachgewiesen, während von *C. albicans* Biofilmen 58 µg Protein gewonnen wurden. Von gemischten Biofilmen wurde jedoch mehr Protein als die Summe der einzelnen Biofilme sekretiert; nach 48 h Wachstum wurde 148 µg Gesamtprotein gemessen. Diese Beobachtung könnte auf der Sekretion eines komplexeren Proteingemisches durch die gemischten Biofilme begründet sein oder durch eine quantitative Zunahme der Proteinsekretion. Außerdem könnte erhöhte Zellyse zu einem signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration im Überstand führen. Dies könnte entweder durch den Pilz oder das Bakterium verursacht werden. Um diese Fragen zu klären, wurden die Proteine in den Überständen mittels MALDI-TOF-MS/MS analysiert.

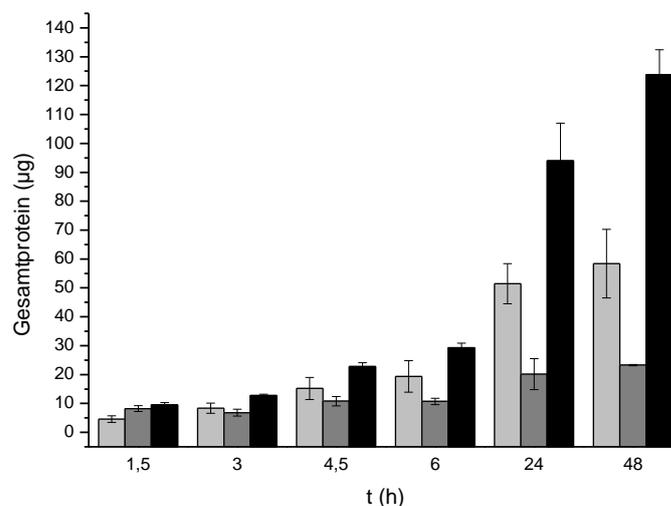


Abbildung 3.8. Gesamtmenge an Protein sekretiert von Monospezies-Biofilmen von Can14 (hellgrau) und S2\_B008 (dunkelgrau) im Vergleich zu gemischten Biofilmen (schwarz), die für 1,5, 3, 4,5, 6, 24 und 48 h inkubiert wurden. Überstände der Biofilme wurden steril filtriert, die Proteine aufkonzentriert und die Konzentrationen nach Lowry bestimmt.

Die Gesamtmenge an sekretierten Proteinen ist vor allem zu den frühen Zeitpunkten gering und reicht nicht aus, um Messungen in technischen Replikaten vorzunehmen. Da für Microarray-Experimente gezeigt wurde, dass experimentelle Designs mit technischen, biologischen und gepoolten Replikaten keine statistisch signifikanten Unterschiede aufwiesen (Kendziorzski *et al.*, 2005), wurde überprüft, ob dieses auch auf dieses Experiment angewendet werden kann. Auch für Proteom-Analysen wird empfohlen, bei Limitierung des Probenmaterials technische Replikate gepoolter biologischer Proben zu vermessen. Dieses wird zudem geraten, wenn biologische Varianzen zu erwarten sind, die nicht in die Diagnose mit einbezogen werden sollen (Karp *et al.*, 2005). Um die Entscheidung treffen zu können, ob die biologischen Replikate einzeln oder technische Replikate der gepoolten Proben vermessen werden, wurden biologische und technische Replikate miteinander verglichen. Äquivalente Proteinmengen der drei biologischen Replikate der 48 h gewachsenen Biofilme von *C. albicans* und von *C. albicans* mit *P. aeruginosa* wurden tryptisch verdaut, mittels *reversed-phase liquid chromatography* aufgetrennt und auf MALDI Träger gespottet, um die Proteine mit MS/MS zu identifizieren (2.13). Des Weiteren wurden identische Proteinmengen der drei biologischen Replikate jeweils gepoolt und im technischen Duplikat tryptisch verdaut, aufgetrennt und identifiziert. Die Übereinstimmung der biologischen und technischen Replikate wurde mit Hilfe von t-Tests überprüft (2.13). Es wurden in beiden Proben für über 95% der identifizierten Proteine keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p$ -Wert  $< 0,01$ ) in der mittleren Anzahl der Peptide der

biologischen Replikate und der technischen Replikate festgestellt (Tabelle 0.2). Dieses entspricht der generellen Reproduzierbarkeit von Proteomanalysen mittels Massenspektrometrie (Booy *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2004). Aufgrund der geringen Proteinnengen der frühen Biofilmproben wurden in den weiteren Analysen technische Duplikate der gepoolten biologischen Replikate verwendet. Außerdem sollten Änderungen innerhalb der Biofilmentwicklung detektiert und unabhängig von biologischen Varianzen individuelle und gemischte Biofilme verglichen werden.

Die Analysen des zeitlichen Verlaufs der Sekretom-Zusammensetzung zeigten deutliche Unterschiede zwischen reinen *C. albicans* und *P. aeruginosa* Biofilmen verglichen mit gemischten Biofilmen.

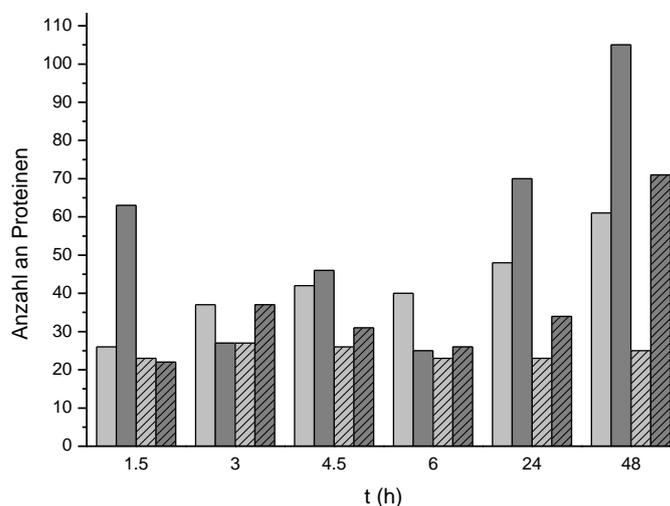


Abbildung 3.9. Anzahl der Proteine, die von *C. albicans* (hellgrau), *P. aeruginosa* (dunkelgrau) oder gemischten Biofilmen sekretiert wurden, getrennt nach *C. albicans* (hellgrau schraffiert) und *P. aeruginosa* (dunkelgrau schraffiert). Die Proteine wurden aufkonzentriert, tryptisch verdaut, chromatografisch aufgetrennt und mittels MS/MS identifiziert.

Tabelle 3.1. Anzahl der sekretierten Proteine im Vergleich zwischen einzelnen und gemischten Biofilmen und zu *C. albicans* und *P. aeruginosa* zugeordnet.

		1,5 h	3 h	4,5 h	6 h	24 h	48 h
<i>C. albicans</i> Proteine	Einzelpezies Biofilme	26	37	42	40	48	61
	gemischte Biofilme	23	27	26	23	23	25
<i>P. aeruginosa</i> Proteine	Einzelpezies Biofilme	63	27	46	25	70	105
	gemischte Biofilme	22	37	31	26	34	71



Accession	Name	Funktion	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h
PA0423 *	pasP	PasP protease	9,0	6,0	12,5	4,5	11,5	12,0
			4,5	9,0	5,0	4,5	12,0	19,0
PA0468 *		hypothetical protein					0,5	2,5
PA0572 *		hypothetical protein	3,0		1,0		5,0	3,5
			1,0	4,5	2,5	4,5	29,5	16,5
PA0620 *		probable bacteriophage protein					0,5	2,0
PA0622		probable bacteriophage protein					2,5	5,0
					1,0	1,0		0,5
PA0623		probable bacteriophage protein			1,5		6,5	6,0
				1,0	1,5	0,5	2,5	3,0
PA0807	ampDh3	AmpDh3 N-acetyl-anhydro-muramyl-L-alanine amidase	3,5	2,5	6,5	3,5	9,0	13,5
			1,0	3,0	2,0	1,5	3,5	2,0
PA0852 *	cbpD	chitin-binding protein CbpD precursor	10,0	1,0	1,5	0,5	4,5	6,5
			1,0	3,5	1,5	2,0	6,5	6,0
PA0888 *	aotJ	arginine/ornithine binding protein AotJ	3,0		0,5	1,0	1,0	4,0
				2,0		1,5	1,5	2,0
PA0962		probable DNA-binding stress protein					5,5	7,5
PA0973 *	oprL	peptidoglycan associated lipoprotein OprL precursor	0,5		1,5		2,0	4,5
					1,0	0,5	1,5	2,0
PA1074 *	braC	branched-chain amino acid transprot protein BraC					1,5	1,0
							2,0	3,0
PA1092	fliC	flagellin type B	5,5	2,5			0,5	1,5
			2,0	1,5	1,0			
PA1094	fliD	flagellar capping protein FliD	1,0		1,0	1,5	13,0	20,0
				0,5	1,0	1,0	5,0	5,0
PA1148 *	toxA	exotoxin A precursor						1,0
						3,0	17,0	21,5
PA1249	aprA	alkaline metalloproteinase precursor	6,5	11,0	47,5	48,0	64,0	67,0
			3,5	7,5	14,5	17,5	35,0	39,0
PA1342 *		probable binding protein component of ABC transporter	4,0		3,5	1,5	5,0	12,0
				2,5			2,5	3,0
PA1777 *	oprF	major porin and structural outer membrane porin OprF precursor	1,0	1,0	1,5	1,5	4,5	6,5
				1,5	0,5	1,0	0,5	1,0

Accession	Name	Funktion	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h
PA1871 *	lasA	LasA protease precursor			2,0	0,5	3,0	5,0
							2,0	1,0
PA1982 *	exaA	quinoprotein ethanol dehydrogenase					1,0	8,5
								14,5
PA2451		hypothetical protein					0,5	1,0
				8,5	4,5	5,5	24,5	20,0
PA2452 *		hypothetical protein					0,5	1,5
				8,5	9,0	15,0	33,0	25,5
PA2453 *		hypothetical protein	0,5	0,5			3,0	3,0
			1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	1,5
PA2462 *		hypothetical protein						1,0
								2,0
PA2623	icd	isocitrate dehydrogenase	5,0	2,0				
			0,5	1,0				
PA2787 *	cpg2	carboxypeptidase G2 precursor			0,5			0,5
								2,5
PA2862 *	lipA	lactonizing lipase precursor	1,0				3,0	12,0
PA2939 *		probable aminopeptidase	6,0	4,0	19,0	18,0	85,5	92,5
					6,5	11,5	28,5	33,5
PA3029	moaB2	molybdopterin biosynthetic protein B2						0,5
								2,5
PA3313		hypothetical protein					1,5	3,0
								5,0
PA3529		probable peroxidase					0,5	0,5
								2,5
PA3724 *	lasB	elastase LasB	2,0		6,0	5,0	6,0	11,5
			0,5	4,0		1,0	6,5	6,5
PA3922 *		conserved hypothetical protein					7,0	12,0
								2,0
PA4031	ppa	inorganic pyrophosphatase				0,5	4,5	3,0
								3,0
PA4175 *	piv	protease IV	4,5	9,0	22,0	12,5	17,0	25,0
			4,0	6,0	13,0	16,0	23,0	24,0

Accession	Name	Funktion	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h
PA4236	katA	catalase	10,0	2,0	13,0	6,0	4,5	1,0
			0,5	2,5				
PA4265	tufA	elongation factor Tu	4,0					2,0
PA4366	sodB	superoxide dismutase	3,0	1,5	3,5		1,0	3,5
				2,0	1,0			
PA4385	groEL	GroEL-protein chaperonine	0,5				2,5	3,0
						1,5		2,0
PA4497 *		probable binding protein component of ABC transporter					2,0	8,0
PA4554 *	pilY1	type 4 fimbrial biogenesis protein PilY1					6,0	17,0
							9,5	13,0
PA4625 *	cdrA	cyclic diguanylate-regulated TPS partner A, CdrA			3,5	3,0	21,0	26,0
				2,0	4,0	7,5	13,0	12,5
PA4648 *		hypothetical protein					2,0	2,0
							0,5	0,5
PA4858 *		conserved hypothetical protein	0,5		1,0		8,0	16,0
PA4913 *		probable binding protein component of ABC transporter					13,5	18,0
PA4922 *	azu	azurin precursor	5,0	3,5	7,5	4,0	3,0	9,0
			1,5	3,0	2,5	1,0	1,5	0,5
PA5033 *		hypothetical protein					0,5	0,5
							4,5	3,0
PA5153 *		amino acid ABC transporter periplasmic binding protein	1,0	1,0	1,0	0,5	2,5	4,0
				1,0			1,0	3,0
PA5171	arcA	arginine deiminase	2,0					
				2,0				
PA5172	arcB	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	3,5				4,0	9,5
			0,5	1,5			3,5	3,0
PA5303		conserved hypothetical protein	1,5	2,0	3,5	1,0	2,0	2,5
			1,0		0,5	0,5		0,5
PA5339		conserved hypothetical protein	1,0	0,5	1,5	1,0		1,0
				0,5	0,5	0,5		2,0
PA5378 *		hypothetical protein						3,0

Accession	Name	Funktion	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h
PA5505 *		probable TonB-dependent receptor						2,0 3,0

Für *C. albicans* besitzen 55 der identifizierten Proteine (55%) eine N-terminale Sekretions-Signaldomäne (Lee *et al.*, 2003). Davon sind 22 GPI verankerte Proteine (De Groot *et al.*, 2003). 6 weitere der identifizierten Proteine werden in Funktion oder Lokalisation mit Zellwand oder Membran assoziiert oder wurden schon zuvor im Sekretom gefunden, wie Tsa1A/Tsa1B (Urban *et al.*, 2005) oder Grp2 (Thomas *et al.*, 2006). Schon in früheren Studien wurden Membran-assoziierte und GPI verankerte Proteine in Kultur-Überständen gefunden (Hiller *et al.*, 2007; Sorgo *et al.*, 2010). Diese Proteine könnten während Zellwandumstrukturierungen oder vor der Bindung an Membran-Polysaccharide aus der Zelle gelöst worden sein.

Über die analysierten Zeiträume konnten bei allen drei Biofilmtypen mit Ausnahme des ersten Zeitpunkts des *P. aeruginosa* Biofilms mehr Proteine identifiziert werden (Abbildung 3.9). Dieser Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass zu frühen Zeitpunkten mehrere Proteine in geringer Menge vertreten sind, die unterhalb des Detektions- bzw. Identifikationslevels ist. Diese generelle Zunahme der Identifizierungen ist jedoch nicht auf der Verwendung unterschiedlicher Proteilmengen für die einzelnen Messungen begründet, was auch durch die UV-Spektren belegt wird, die während der Fraktionierung mit der Nano-HPLC aufgezeichnet wurden. Mit der Reifung der Biofilme entwickeln sich mehrere Zellschichten, die unterschiedliche Funktionen übernehmen, was mit veränderten Expressionsmustern verbunden ist. Die Anzahl der im 1,5 h gewachsenen *P. aeruginosa* Biofilm identifizierten Proteine ist auffallend hoch, verglichen mit den 3 h und 6 h Biofilmen. Eine deutliche Anzahl der *P. aeruginosa* Proteine, die zu diesem frühen Zeitpunkt identifiziert wurden, ist nur durch ein Peptid vertreten, während hoch-abundante Proteine die Ausnahme sind. Während der Entwicklung der Biofilme agglomerierten Proteine im Überstand oder konnten bestimmten Phasen der Biofilmbildung zugeordnet werden. In den *C. albicans* Biofilmen deutet das Muster der Proteinsekretion deutlich auf eine Unterscheidung zwischen frühen (1,5 h bis 6 h) und reifen Biofilmen hin (24 h und 48 h). Die Sekretion beispielsweise extrazellulär agierender Proteine wie Sun41 (orf19.3642, p-Wert 0,002) und Mitgliedern der Sap Familie (orf19.5542 und orf19.756) nahm in reifen Biofilmen signifikant zu (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3. *C. albicans* zugeordnete Proteine, die über die Zeit oder im Vergleich zwischen einzelnen und gemischten Biofilmen mit spezifischen Mustern sekretiert identifiziert wurden. Die Zahlen entsprechen dem Mittelwert der in zwei technischen Replikaten zugeordneten Peptide, die in *C. albicans* (obere Reihe) oder gemischten Biofilmen (untere Reihe) gefunden wurden. Vorhergesagt sekretierte Protein sind durch einen Stern gekennzeichnet, GPI verankerte mit einem Kreuz.

Accession	Name	Funktion	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h
orf19.1097 *+	Als2	ALS family protein		2,5 1,5	2,0	1,5 0,5		1,0
orf19.1442 *+	Plb4.5	putative phospholipase						5,5
orf19.1490 *	Msb2	mucin family, adhesin-like protein	1,5 1,5	3,0 3,5	4,0 4,0	3,0 2,5	4,5 5,5	5,5 6,0
orf19.1671 *+	Utr2	putative glycosidase	1,0 0,5	3,0 2,0	2,0 2,0	3,5 0,5	5,0 3,5	7,0 3,5
orf19.1690 *	Tos1	protein similar to alpha agglutinin anchor subunit	11,0 20,5	23,5 34,0	27,0 33,5	19,0 27,0	27,0 22,5	24,5 20,5
orf19.1779 *	Mp65	cell surface mannoprotein	6,0 15,5	15,5 26,0	18,5 21,0	15,0 16,0	19,5 19,5	22,5 13,5
orf19.1816 *+	Als3	adhesin	2,5 3,5	5,0 8,0	5,5 8,0	5,5 5,0	7,5 5,5	10,5 4,5
orf19.2060 *+	Sod5	copper- and zinc-containing superoxide dismutase	0,5 0,5	1,0 0,5	1,0 0,5	2,0 0,5	3,5	3,5
orf19.220 *	Pir1	structural protein of cell wall					1,5	2,5
orf19.2451 *+	Pga45	cell wall protein	0,5	0,5	1,5	1,5	3,0	2,5
orf19.2706 *	Crh11	GPI-anchored cell wall transglycosylase		0,5 0,5	2,0	1,5	2,5	4,5
orf19.2770.1 *	Sod1	copper- and zinc-containing superoxide dismutase					2,0	1,0
orf19.2990 *	Xog1	Exo-1,3-beta-glucanase	0,5 0,5	2,0 1,5	1,5	2,0	2,0 1,0	4,0 0,5
orf19.3010.1 *+	Ecm33	GPI-anchored cell wall protein	1,0	1,0	1,0 1,0	1,0	1,0	2,0
orf19.3087 *	Ubi3	fusion of ubiquitin with the S34 protein of the small ribosomal subunit						2,0

Accession	Name	Funktion	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h
orf19.3117 *	Csa2	extracellular-associated protein					3,0	4,5
							2,5	2,5
orf19.3374 *	Ece1	hyphal-specific cell wall protein	1,5	2,5	4,5	3,5	2,5	1,5
			1,0	1,0	1,0	0,5		
orf19.3499 *		secreted protein					3,5	3,5
orf19.3642 *	Sun41	putative cell wall glycosidase	2,5	6,0	9,0	5,0	13,0	12,0
			6,5	12,0	14,5	12,0	10,0	8,5
orf19.3829 *+	Phr1	glycosidase of cell surface		2,0	6,0	5,0	8,0	12,0
			0,5	1,5	0,5	1,0	2,5	2,0
orf19.3895 *+	Cht2	GPI linked chitinase	0,5	3,0	3,5	3,5	6,0	4,5
			1,0	1,5	1,0	1,0		
orf19.395	Eno1	Enolase			2,0	2,0	3,0	0,5
orf19.4035 *+	Pga4	GPI-anchored cell surface protein	1,0	3,5	4,0	2,5	4,0	6,5
				3,0	2,0	1,0	4,0	5,0
orf19.4393	Cit1	citrate synthase					5,5	
orf19.4565 *	Bgl2	1,3-beta-Glucosyltransferase	1,0	3,0	3,0	2,0	3,0	4,0
			1,5	1,0	1,5		1,0	1,0
orf19.4899/ orf19.999 *	Gca1/ Gca2	predicted extracellular glucoamylase		1,0	0,5	0,5	1,5	9,0
							2,5	1,5
orf19.4975 *+	Hyr1	hyphal-induced GPI-anchored cell wall protein			1,0	1,5	1,5	3,5
								2,0
orf19.5063 *	Coi1	secreted protein					3,5	5,0
orf19.5542 *	Sap6	secreted aspartyl proteinase		0,5	1,0		6,0	7,5
				1,0	4,5	2,0	3,0	4,5
orf19.5636 *+	Rbt5	GPI-anchored cell wall protein involved in hemoglobin utilization		0,5	0,5	0,5	2,0	2,5
							0,5	0,5
orf19.5741 *+	Als1	adhesin	6,0	9,5	6,5	6,5	5,5	9,0
			5,5	8,5	8,5	7,0	3,0	4,0
orf19.5806	Ald5	NAD-aldehyde dehydrogenase					4,5	2,0
orf19.6081 *+	Phr2	glycosidase		1,5	1,5	1,0	1,0	2,0

Accession	Name	Funktion	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h
orf19.6202 *	Rbt4	protein with similiarity to plant pathogenesis-related proteins	1,0	5,5	8,0	7,0	11,0	12,5
			2,0	4,0	1,5	2,0	4,0	0,5
orf19.6274 *	Pbr1	protein required for cohesion, adhesion, and biofilm formation	1,0	3,5	4,0	3,5	4,0	4,5
			1,0	2,5	3,0	2,0	2,5	2,0
orf19.6673 *	Hex1	beta-N-acetyl-hexosaminidase/chitobiase	5,5	10,0	8,0	6,5	5,0	5,0
			5,0	7,5	5,0	2,0	3,5	3,0
orf19.6844	Icl1	isocitrate lyase					3,5	
orf19.7114 **	Csa1	surface antigen on elongating hyphae and buds						2,0
orf19.7218 *	Rbe1	cell wall protein	1,0	3,5	2,5	1,5	3,0	3,5
				1,0	1,0	0,5		
orf19.756 *	Sap7	member of the secreted aspartyl proteinase family					2,0	4,0
orf19.7574		uncharacterized orf					2,0	1,0
orf19.7586 *	Cht3	major chitinase	2,5	4,5	5,0	3,5	3,5	5,0
			2,5	5,0	4,5	3,0	1,0	0,5
orf19.903	Gpm1	phosphoglycerate mutase					1,5	3,0

In gemischten Biofilmen ist die Zunahme der identifizierten Proteine des Sekretoms über die Zeit vor allem von Proteinen abhängig, die von *P. aeruginosa* sekretiert wurden, da die Anzahl der exkretierten Pilz-Proteine zu allen Zeitpunkten zwischen 23 und 27 stagnierte. Dieses deutet auf eine bakterielle Prävalenz hin.

Die Änderungen der Sekretome von *C. albicans* und *P. aeruginosa* in gemischten Biofilmen waren im Vergleich mit den Einzelspeziesbiofilmen mit reduzierten Diversitäten der den einzelnen Organismen zugeordneten Proteine verbunden (Abbildung 3.9, Tabelle 3.1). Die Anzahl der in reinen *C. albicans* Biofilmen identifizierten Proteine belief sich auf 73, während nur 39 verschiedene *C. albicans* Proteine in gemischten Biofilmen gefunden wurden. Von den insgesamt in allen Zeitpunkten und Bedingungen identifizierten 80 *C. albicans* Proteinen wurden 4 mit geringen Peptidzahlen ausschließlich in gemischten Biofilmen detektiert, während 38 allein in Monospezies-Biofilmen nachgewiesen wurden. Für *P. aeruginosa* war die Anzahl der in den bakteriellen Biofilmen gefundenen Proteine mit 154 ebenfalls um einiges höher als die 92 in gemischten Biofilmen identifizierten. 16 Proteine jedoch wurden nur in

gemischten Biofilmen gefunden und 10 weitere waren mit signifikant mehr Peptiden vertreten als in bakteriellen Biofilmen mit nur einer Spezies, während 78 Proteine ausschließlich in den rein bakteriellen Biofilmen detektiert wurden. Ein nicht erfolgreicher Nachweis einzelner Proteine muss jedoch nicht zwangsläufig die Abwesenheit dieser bedeuten, es könnte vielmehr auch unterhalb der Nachweis- und Identifizierungsgrenze liegen. Dennoch war die Menge an isoliertem Protein bei gemischten Biofilmen mit 124 µg höher als die Summe der von den einzelnen Biofilmen sekretierten (81 µg), was auf eine vermehrte Produktion einzelner Proteine als Reaktion auf die Anwesenheit des anderen Organismus oder auf vermehrte Zelllyse hindeutet. Die Anzahl potentiell cytosolischer Proteine ohne Sekretionsdomäne, die in zentrale Stoffwechselwege involviert sind, war jedoch für beide Spezies in gemischten Biofilmen nicht erhöht. Vermehrte Zelllyse findet deshalb während des analysierten Zeitraumes für beide Mikroorganismen nicht statt.

In gemischten Biofilmen wurden einige *P. aeruginosa* Proteine mit stark vermehrten Peptiden identifiziert (Tabelle 3.4). Der Effekt wurde vor allem bei fünf Proteinen beobachtet (p-Werte für zufälliges Auftreten 0,000 bis 0,001): Exotoxin A ToxA (PA1148), eine Quinoprotein Ethanol Dehydrogenase ExaA (PA1982), das Häm Akquisition Protein HasAp (PA3407) und zwei unbekannte Proteine PA2451 und PA2452, die mit Eisen Enterobactin Esterasen verwandt sind. Drei dieser fünf Proteine sind in Eisenverwertung involviert. Das Häm Akquisition Protein HasAp (PA3407) und die mit Eisen Enterobactin Esterasen verwandten Proteine PA2451 und PA2452 bilden bekannte Eisenverwertungs-Systeme. Außerdem wurde der Eisenpyoverdin Rezeptor FpvA (PA2398) zu den späten Zeitpunkten in gemischten Biofilmen detektiert, was auf einen Mangel an Eisen in Co-Kulturen mit *C. albicans* hinweist. Das Exotoxin ToxA (PA1148), ein bekannter Virulenzfaktor in *P. aeruginosa*, wurde nur in Gegenwart von *C. albicans* sekretiert. Die Expression dieses Gens wurde auch unter Eisenmangel-Bedingungen beobachtet (Lamont *et al.*, 2002). Das im Periplasma lokalisierte Quinoprotein Ethanol Dehydrogenase ExaA (PA1982) wird vermehrt zu den späteren Zeitpunkten exprimiert und deutet auf ein Auftreten von Alkohol, z. B. von Ethanol, im Medium hin (Görisch, 2003), welches von *C. albicans* produziert werden könnte.

Für *C. albicans* dagegen konnte keine Induktion einzelner Proteine im Überstand beobachtet werden. Im Gegenteil, es wurden weniger Peptide in Co-Kultur mit *P. aeruginosa* gefunden, die Proteinen der Hämoglobin-Rezeptor Familie zugeordnet werden können, namentlich Pga10 (orf19.5674), Rbt5 (orf19.5636), Csa1 (orf19.7114) und Csa2 (orf19.3117) als in Monokulturen. Dieses wurde auch für fast alle anderen detektierten *C. albicans* Proteine beobachtet und deutet im Einklang mit der reduzierten metabolischen Aktivität, die mit dem XTT-Assay gefunden wurde (Abbildung 3.7), auf eine signifikante Reduktion des Metabolismus hin.

Tabelle 3.4. Ausschließlich in gemischten Biofilmen identifizierte Proteine. Die Zahlen entsprechen dem Mittelwert der in den technischen Duplikaten zugeordneten Peptide. Ein Stern weist auf vorhergesagte Sekretionsdomänen hin, ein Kreuz auf GPI Anker.

Accession	name	function	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h
orf19.1589	orf19.1589	putative DNA-binding transcription factor			0,5			
orf19.3445 *	Hoc1	protein with similiarity to mannosyltransferase	0,5					
orf19.5674 **	Pga10	plasma membrane protein involved in heme-iron utilization					1,0	1,0
orf19.5716 *	Sap4	secreted aspartyl proteinase		1,0	1,0			
PA0002	dnaN	DNA polymerase III, beta chain						2,5
PA0283 *	sbp	sulfate-binding protein precursor						1,5
PA1733		conserved hypothetical protein		0,5	0,5			
PA2377 *		hypothetical protein					3,5	2,5
PA2398 *	fvpA	ferripyoverdine receptor						0,5
PA2758		probable transcriptional regulator			0,5			
PA3117	asd	aspartate semialdehyde dehydrogenase						1,0
PA3301		hypothetical protein						0,5
PA3407	hasAp	heme acquisition protein HasAp			10,0	14,5	28,0	28,0
PA3441		probable molybdopterin-binding protein						0,5
PA4228	pchD	pyochelin biosynthesis protein PchD	0,5					
PA4266	fusA1	elongation factor G						2,0
PA4694	ilvC	ketol-acid reductoisomerase						0,5
PA4761	dnaK	DnaK-protein, chaperone						2,5
PA5240	trxA	thioredoxin						1,0
PA5288	glnK	nitrogen regulatory protein P-II 2						1,0

### 3.1.6 Identifizierung und Beobachtungen zur Produktion von Pyoverdin

Während der Bildung von gemischten Biofilmen von *C. albicans* und *P. aeruginosa* wurde beobachtet, dass das Medium gelblich wurde, während bei einzelnen Biofilmen keine offensichtliche Farbänderung zu sehen war. Absorptionsmessungen des Überstandes offenbarten ein Absorptionsmaximum bei 400 nm (Abbildung 3.10). Mit der Durchführung von Extinktions- und Emissionsscans wurde festgestellt, dass der Überstand bei einer Anregung mit 405 nm bei 455 nm emittiert. Diese Absorptions- und Fluoreszenzsignale sind charakteristisch für die Anwesenheit von Pyoverdin, einem von *P. aeruginosa* sekretierten Siderophor (Visca *et al.*, 1992).

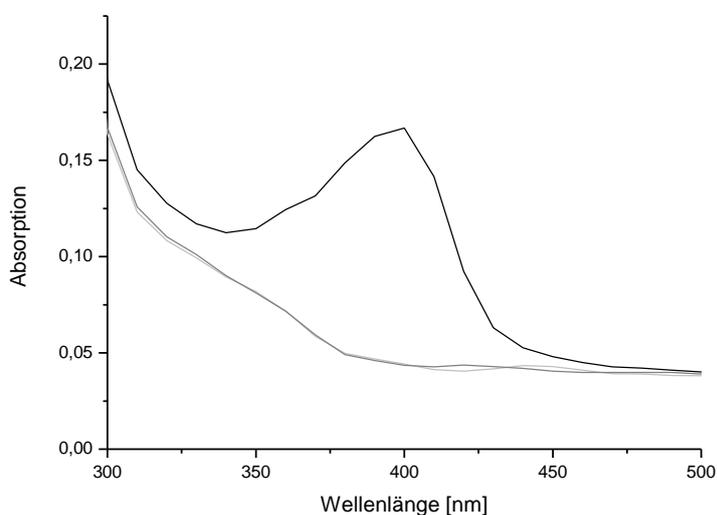


Abbildung 3.10. Absorptionsscan von Filter-sterilisierten Überständen 24 h gewachsener Biofilme von *C. albicans* (hellgrau), *P. aeruginosa* (dunkelgrau) und gemischten Biofilmen (schwarz). Der Peak bei 400 nm deutet auf die Anwesenheit von Pyoverdin hin.

Um dieses zu überprüfen, wurde die spezifische Masse dieses Moleküls mit MALDI Massenspektrometrie bestimmt. Es wurde ein Massenpeak bei 1333,62 Da [M+H] identifiziert, der für Pyoverdin charakteristisch ist und dessen Anwesenheit bestätigte (Wendenbaum *et al.*, 1983) (Abbildung 3.11).

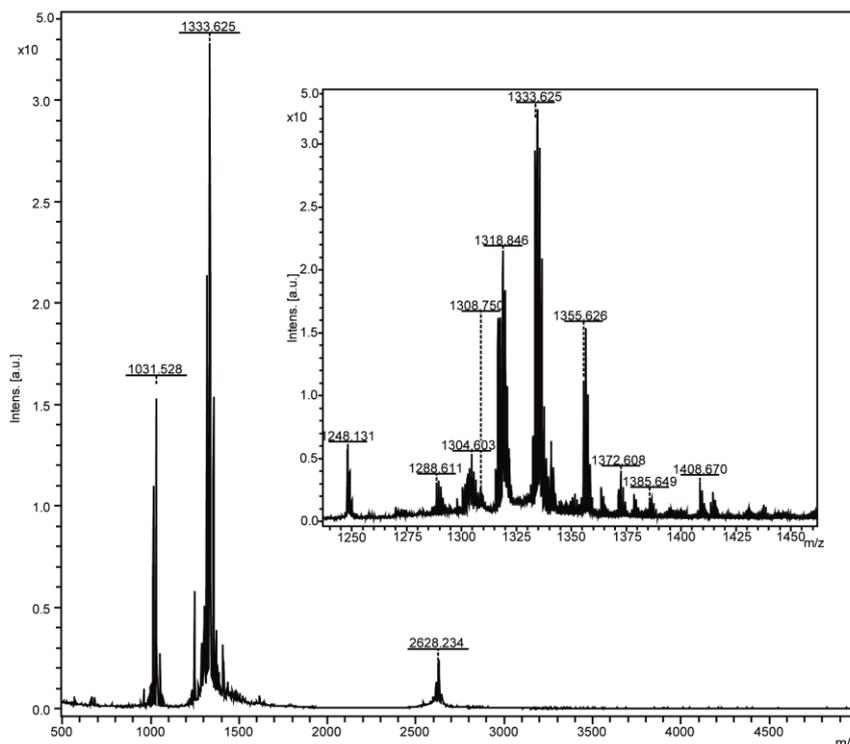


Abbildung 3.11. Massenspektrometrische Untersuchungen von Überständen der gemischten Biofilme zeigten die für Pyoverdin spezifische Masse von 1333.62 Da [M+H].

Mit Hilfe der spezifischen Fluoreszenz wurde die Produktion von Pyoverdin während der Bildung von gemischten Biofilmen verfolgt und mit den Einzelbiofilmen zur Kontrolle verglichen. Die Konzentration von Pyoverdin stieg in gemischten Biofilmen während der ersten 20 h schnell an, um während der folgenden 50 h langsam abzunehmen (Abbildung 3.12). In einzelnen Biofilmen von *P. aeruginosa* wurden ebenfalls geringe Fluoreszenzsignale gemessen, die vor allem auf die Eigenfluoreszenz dieses Bakteriums zurückzuführen sind, da in zellfreien Überständen kein Signal detektiert wurde.

Da Pyoverdin unter eisenlimitierenden Bedingungen produziert und sekretiert wird (Cox & Adams, 1985), wurde Eisen in Form von  $\text{FeCl}_3$  supplementiert und die Fluoreszenz gemessen. Wie in Abbildung 3.13 gezeigt, verhinderte eine Zugabe von Eisen zum Medium die Produktion von Pyoverdin auch in Gegenwart von *C. albicans*.

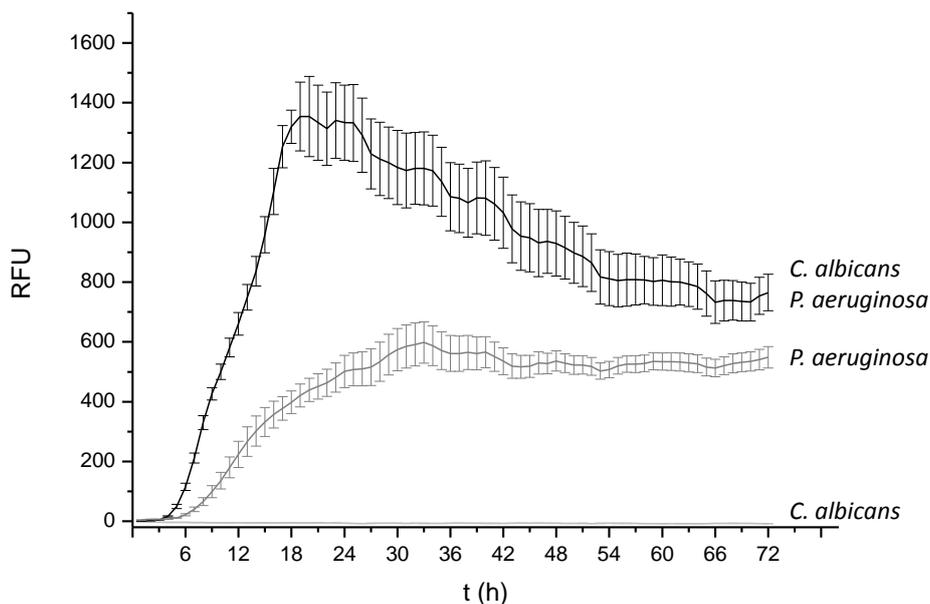


Abbildung 3.12. Pyoverdin-Produktion während der Entwicklung von *C. albicans* (hellgrau), *P. aeruginosa* (dunkelgrau) und gemischten Biofilmen (schwarz). Die Fluoreszenz bei 405 / 455 nm wurde während 72 h Inkubation bei 37°C alle 30 min gemessen. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten im Triplikate vermessen wurden aufgetragen.

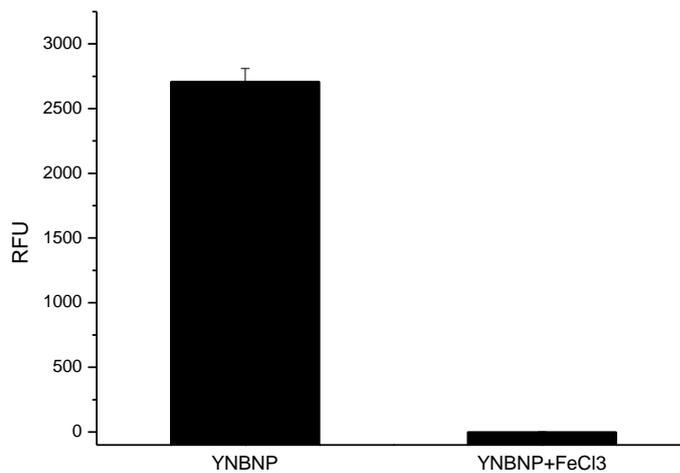


Abbildung 3.13. Pyoverdin-Signale von zellfreien Überständen 24 h gewachsener gemischter Biofilme aus *C. albicans* und *P. aeruginosa* in YNBNP verglichen mit YNBNP supplementiert mit 10 mM FeCl<sub>3</sub>, bei 405 / 455 nm gemessen.

### 3.1.7 Entwicklung von Reporterstämmen zum Nachweis von Biofilmen und der Detektion von Quorum sensing Molekülen

Um die Bildung von Biofilmen auch *in vivo* zu beobachten und online zu verfolgen, wurden die oben beschriebenen Änderungen der Transkriptionsprofile während der Ausbildung von Biofilmen (3.1.5) genutzt, um Reporterstämmen zu erzeugen. Weiterhin ermöglichen diese Stämme die Detektion von anderen Quorum sensing Molekül produzierenden Mikroorganismen, da oben gezeigt wurde, dass auch zwischen Organismen unterschiedlicher Phyla Kommunikation statt findet (3.1.3). Für die Erzeugung von Reporterstämmen wurde wiederum auf die Humanpathogenen *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa* zurückgegriffen. Diese gehören zu den bedeutensten nosokomialen Keimen, die vor allem durch die Etablierung von Biofilmen resistent gegenüber antimikrobiellen Substanzen sind. Ihre Interaktion wurde in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich dargestellt. Weiterhin wurden in *Escherichia coli* Reporterstämmen hergestellt, um das Spektrum an detektierbaren Quorum sensing Molekülen und damit auch den entsprechenden Mikroorganismen zu erweitern. *E. coli* synthetisiert Autoinducer 2 als Quorum sensing Molekül, der in Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien nachgewiesen wurde. Somit sind diese Stämme für den Nachweis vieler unterschiedlicher AI-2 produzierender Mikroben einsetzbar. Außerdem unterliegt *E. coli* im Gegensatz zu *C. albicans* und *P. aeruginosa* der Sicherheitsstufe 1 und kann unter einfacheren Bedingungen gehandhabt werden. Diese Reporterstämmen bilden zukünftig eine weitere Möglichkeit für die Untersuchung von Biofilmen und der inter- und intraspezifischen Kommunikation.

#### 3.1.7.1 Auswahl der Reporter gene

Reporter ermöglichen es, phänotypische Veränderungen von Mikroorganismen *in vivo* zu verfolgen. Mit dem Anfügen von Reporter genen an regulatorische Sequenzen können spezifisch phänotypische Erscheinungen durch Detektion der exprimierten Signale beobachtet werden. In der Literatur sind die Reporter gene für  $\beta$ -Galactosidase, Luziferase und fluoreszierende Proteine bekannt.

Die  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) *lacZ* ist in *E. coli* ursprünglich für die Hydrolyse von Laktose zu Galaktose und Glucose zuständig, kann jedoch als Substrat auch die Chromogene ONPG (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) oder S-Gal (3,4-Cyclohexenoesculetin- $\beta$ -D-galactopyranosid) verwenden, die zu farbigen, einfach detektierbaren Produkten umgesetzt werden (James *et al.*, 1996). Dieses System ist jedoch nicht für online- und *realtime*-Studien geeignet, da die Substrate kostenintensiv sind, vor allem jedoch aufgrund der Toxizität dieser Zellyse stattfindet.

Die Leucht käfer-Luziferase *luc* wird als Reporter gen in verschiedenen Eukaryoten verwendet. Das System ist sehr sensitiv, da das detektierbare Leuchten mit der Menge

an exprimiertem Protein korreliert (de Wet *et al.*, 1985). Jedoch muss auch hier ein kostenintensives Substrat, Luziferin, zugegeben werden, um die Aktivität zu verfolgen und auszulesen. Die bakterielle Luziferase, die zusammen mit ihrem Substrat codiert auf dem Operon *luxCDABE* vorliegt, ermöglicht kontinuierliche Verfolgungen von Genexpressionsmustern und wird vielseitig für bakterielle Biosensoren verwendet (Ghim *et al.*, 2010). Kürzlich wurde ein Vektor konstruiert, mit dem die bakterielle Luziferase auch in Hefen exprimiert werden kann (Ghim *et al.*, 2010). Da die Expression der Luziferase von der Verfügbarkeit von ATP abhängig ist und somit eng mit der Elektronentransportkette verzahnt ist, ist die Klonierung des gesamten Operons inklusive Reduktionsäquivalenter vorausgesetzt.

Fluoreszierende Proteine werden für Genexpressions- sowie für Lokalisationsstudien verwendet. Das grün fluoreszierende Protein GFP wurde aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert (Morin & Hastings, 1971). Die erfolgreichen Arbeiten mit diesem führten 2008 zum Nobelpreis der Chemie. Der Einsatz von fluoreszierenden Proteinen ist ohne Zugabe von Substraten möglich und nicht mit Zellyse verbunden. Mittlerweile sind unterschiedliche Farbmodifikationen für Eukaryoten sowie für Prokaryoten erhältlich. Dieses erlaubt die Markierung von mehreren Proteinen innerhalb einer Zelle oder die Markierung von mehr als einem Organismus. Die Expression und korrekte Faltung dieser Proteine kann jedoch zeitverzögert erfolgen.

In dieser Arbeit wurden in *C. albicans* und *P. aeruginosa* Reporterstämme entwickelt, um die Biofilmbildung dieser Organismen *in vivo* zu beobachten und zu untersuchen, wie diese aufeinander sowie auf die jeweiligen Quorum sensing Moleküle reagieren. Da diese Reporterstämme möglichst vielfältige Anwendungen finden sollen, wurden fluoreszierende Proteine als Reporter Gene verwendet. Für *C. albicans* wurde das für Hefen Codon-optimierte *yEGFP* (yeast enhanced green fluorescent protein) (Cormack *et al.*, 1997) gewählt, während für *P. aeruginosa* das rot fluoreszierende *TurboFP602* (evrogen, Russland) als Reporter Gen diente.

### 3.1.7.2 Auswahl der Promotoren für Reporterstämme in *C. albicans*

In den *C. albicans* Reporterstämmen wurde das Reporter Gen *yEGFP* unter Kontrolle von Regulationssequenzen gebracht, welche die Expression Biofilm-relevanter Gene kontrollieren. Um möglichst vielfältige Reporter zu erhalten, wurden Literaturdaten verglichen und unter Berücksichtigung der Sekretomanalyse (3.1.5) spezifische Gene ausgewählt. Untersuchungen der Transkriptionsprofile von Biofilmen, die unter unterschiedlichen Bedingungen angezogen wurden, zeigten, dass sowohl essentielle Stoffwechselwege, wie Proteinsynthese, Aminosäure- und Nukleotidmetabolismus, aber auch in spezifische morphogenetische und in die Zellorganisation involvierte Gene in Biofilmen anders reguliert werden als in planktonisch wachsenden Kulturen (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2005; Yeater *et al.*, 2007). Ähnliche Cluster an

Genen wurden reguliert durch exogen zugegebenes Farnesol gefunden (Cao *et al.*, 2005; Enjalbert & Whiteway, 2005).

Während der Biofilmbildung von *C. albicans* spielen an Adhäsionsvorgängen involvierte Proteine eine wichtige Rolle. Proteine der ALS (agglutin-like sequence) Familie sind auf der Zelloberfläche GPI verankerte Glykoproteine, die an der Zelladhäsion und der Haftung an Zelloberflächen beteiligt sind (Hoyer, 2001). Die Expression des Adhäsins *ALS1* (orf19.5741) ist abhängig von Umweltbedingungen (Hoyer *et al.*, 1998) und wird in Biofilmen hochreguliert, wie mittels RT-PCR und Northern Blot Analysen ermittelt (Chandra *et al.*, 2001a; O'Connor *et al.*, 2005). Dieses wurde mit Hilfe von Genomweiten Microarrays bestätigt (Murillo *et al.*, 2005; Yeater *et al.*, 2007). Als1 wurde auch in der oben beschriebenen Analyse der während der Biofilmbildung sekretierten Proteine zu allen Zeitpunkten gefunden (3.1.5, Tabelle 3.3).

Proteine des Schwefelmetabolismus werden in frühen Biofilmen hochreguliert. Die ATP-Schwefellyase *MET3* (orf19.5025) katalysiert den ersten Schritt der Assimilation von anorganischem Sulfat durch die Produktion von Adenosin-5'-phosphosulfat. Da die Expression von *MET3* in Anwesenheit von Methionin und Cystein fast vollständig unterdrückt wird, wurde der Promotor für Studien an essentiellen Genen verwendet (Care *et al.*, 1999). Auch unter Eisenmangel wird *MET3* nicht exprimiert (Lan *et al.*, 2004). In Biofilmen dagegen wird die Sulfat-Assimilation, unter anderem *MET3* induziert (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2005).

Für *C. parapsilosis* sowie *C. albicans* wurde berichtet, dass die Oxidoreduktasen *ADH7* und *GRP2* durch die Zugabe von Farnesol verstärkt exprimiert werden (Enjalbert & Whiteway, 2005; Rossignol *et al.*, 2007). Eine Hochregulation von *ADH7* (orf19.5517), ein Protein mit Homologien zu Alkoholdehydrogenasen, wurde in Transkriptionsanalysen mit genomweiten Microarrays in Biofilmen verglichen mit planktonischem Wachstum nachgewiesen (Murillo *et al.*, 2005). Die Regulationen von *ADH7* und *GRP2* wurden unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen mittels qRT-PCR überprüft (2.8).

Hierzu wurden 24 h gewachsene *C. albicans* Biofilme in YNB pH 5,4, YNB pH 7,0 und YNB<sub>NP</sub> (2.2) geerntet, die Zellen mit Hilfe einer Retsch Mühle aufgeschlossen und die RNS isoliert. Zur Kontrolle wurden Hyphen in Schüttelkultur in den oben genannten Medien bei 37°C angezogen und ebenso behandelt. Nach photometrischer und Gelbasierter Überprüfung von Reinheit und Konzentration (2.7) wurde die RNS in cDNA umgeschrieben und die Transkriptmengen von *ADH7* und *GRP2* ermittelt. Zur Normalisierung wurden unterschiedliche *housekeeping* Gene getestet, die als Referenzgene in Biofilmen und Hyphen vergleichbar exprimiert vorliegen sollten. Für die Bedingung YNB pH 5,4 erwiesen sich Aktin *ACT1* (orf19.5007) und die Reduktase

*RIP1* (orf19.5893) als geeignet (Nailis *et al.*, 2006), während für YNB pH 7,0 und YNBNP die 18S rRNS *RDN18* zur Normalisierung verwendet wurde. Da die Menge an *GRP2* in YNB in Biofilmen im Vergleich zu planktonischem Wachstum abnahm, während *ADH7* unter allen getesteten Bedingungen stark vermehrt transkribiert wurde (Tabelle 3.5), wurde die Promotorregion von *ADH7* für einen weiteren Reporterstamm ausgewählt.

Tabelle 3.5. Regulation der Transkripte an *ADH7* (orf19.5517) und *GRP2* (orf19.4309) in Biofilmen verglichen mit planktonisch gewachsenen Zellen, auf die normalisiert wurde.

	<b><i>ADH7</i> (orf19.5517)</b>	<b><i>GRP2</i> (orf19.4309)</b>
YNB pH 5,4	3,78 * 10 <sup>5</sup>	0,2019
YNP pH 7,0	1,67 * 10 <sup>11</sup>	0,7998
YNBNP	1,50 * 10 <sup>14</sup>	8,59

Zur Kontrolle wurde der Translationselongationsfaktor 1-alpha *TEF2* (orf19.382) verwendet, der unter Hefen- und Hyphenwachstum sowie in Biofilmen ohne sichtbare quantitative Unterschiede exprimiert wird (Sundstrom *et al.*, 1990).

### 3.1.7.3 Integration des Reportergens in *C. albicans*

Die vier Gene *ALS1* (orf19.5741), *MET3* (orf19.5025), *ADH7* (orf19.5517) und *TEF2* (orf19.382) wurden ausgewählt, um in *C. albicans* Reporterstämme herzustellen. Da der Pilz diploid ist, konnte jeweils ein Allel durch *yEGFP* ersetzt werden. Dadurch wurde erreicht, dass das Reportergen an Stelle des ursprünglichen Gens unter Kontrolle des jeweiligen Promotors im nativen Locus exprimiert wird. Die Integration wurde durch homologe Rekombination nach einer Methode durchgeführt, durch die der eingeführte Selektionsmarker mittels einer induzierbaren FRT-spezifischen Rekombinase wieder entfernt werden konnte (Morschhäuser *et al.*, 1999; Reuß *et al.*, 2004). Hierfür wurde für jeden gewünschten Austausch ein Plasmid konstruiert, in dem die 5' flankierende Region des ursprünglichen Gens, welche die Promotorregion enthielt, zusammen mit *yEGFP* vor der Selektionskassette platziert wurde und die 3' flankierende Region dahinter. Nach Integration dieser Fragmente durch homologe Rekombination wurde die Selektionskassette entfernt (2.4.1) und die korrekten Klone mittels Southern Blot ermittelt (2.6). In Abbildung 3.14 sind beispielhaft Southern Blot Analysen zur Verifizierung der Integration der Reportergene sowie der Entfernung der Resistenzmarker dargestellt.

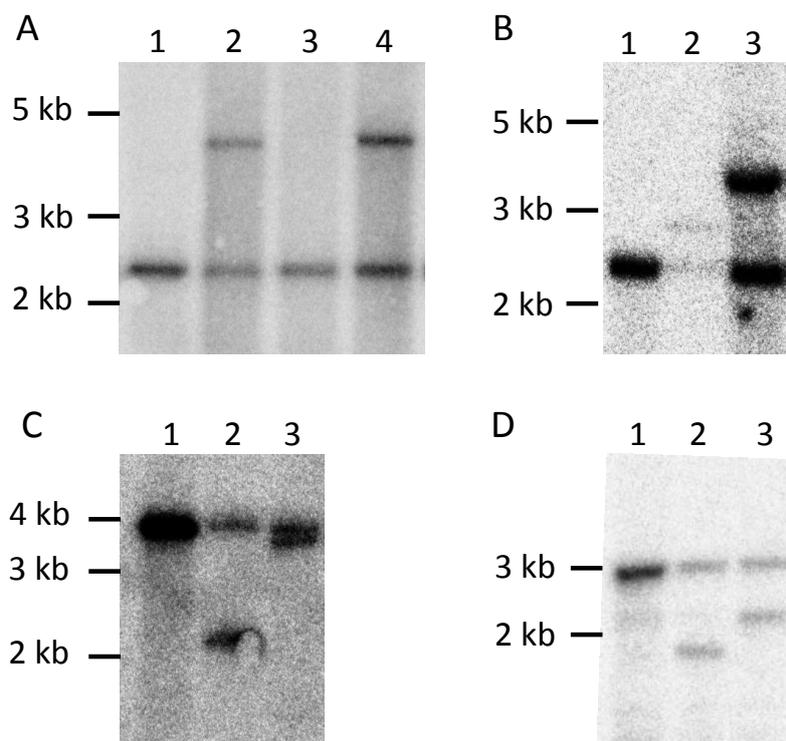


Abbildung 3.14. Southern Blot Analysen zur Verifizierung der Integration der Reportergene in *C. albicans*. A. Screening nach Integration der *yEGFP*-Kassette anstelle von *als1*. Spur 1+3: Can14 (*ALS1/ALS1*), Spur 2+4: Can792 + Can794 (*als1Δ::yEGFP-SAT1-FLIP/ALS1*). B. Validierung des Austauschs von *met3* durch *yEGFP*. Spur 1: Can14 (*MET3/MET3*), Spur 2: Can788/Can790 (*met3Δ::yEGFP-SAT1-FLIP/MET3*), Spur 3: Can789/Can791 (*met3Δ::yEGFP-FRT/MET3*). C. Überprüfung des Ersetzens von *adh7* durch *yEGFP*. Spur 1: Can14 (*ADH7/ADH7*), Spur2: Can784/Can786 (*adh7Δ::yEGFP-SAT1-FLIP/ADH7*), Spur 3: Can785/Can787 (*adh7Δ::yEGFP-FRT/ADH7*). D. Austausch von *tef2* durch *yEGFP*, Spur 1: Can14 (*TEF2/TEF2*), Spur 2: Can780/Can782 (*tef2Δ::yEGFP-SAT1-FLIP/TEF2*), Spur 3: Can781/Can783 (*tef2Δ::yEGFP-FRT/TEF2*).

Die genomische DNS der Transformanten wurde isoliert (2.5), mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Enzyme wurden so gewählt, dass sie sowohl innerhalb des ursprünglichen Gens, als auch in der Selektionskassette sowie hinter der Sequenz schnitten, um für alle Zwischenschritte spezifische Bandenmuster zu erhalten. Zur Detektion diente eine PCR amplifizierte radioaktiv markierte Sonde, die jeweils mit einer 500 bp Region 5' der Promotorregion hybridisierte, welche für die homologe Rekombination verwendet wurde.

Zur Überprüfung des Austauschs von *als1* mit *yEGFP* wurde das Enzym *EcoRI* verwendet (Abbildung 3.14 A). Beim Wildtyp zeigte sich eine Bande bei 2,3 kb, die bei erfolgreicher Transformation von einer weiteren bei 4,0 kb ergänzt wurde. Dieses führte zu den voneinander unabhängigen Stämmen Can792 und Can794, die nach

Entfernung der Resistenzkassetten die *als1Δ-yEGFP* Stämme Can793 und Can795 bildeten.

Der erfolgreiche Austausch von *met3* wurde unter Verwendung des Enzyms *Cac8I* überprüft (Abbildung 3.14 B). Wildtypische Allele zeigten eine Bande bei 2,4 kb. Bei erfolgreicher Integration von *yEGFP* mit der Kassette war eine weitere Bande bei 2,9 kb zu sehen. Nachdem von diesen Stämmen Can788 und Can790 die Kassetten mit Hilfe der Flipase entfernt wurden, entstand eine Bande bei 3,7 kb, welche die beiden *met3Δ-yEGFP* Stämme Can789 und Can791 bestätigte.

Zur Validierung der *adh7Δ-yEGFP* Stämme wurde das Enzym *Cac8I* verwendet, welches zu einer Wildtyp-Bande bei 4,0 kb führte. Die Vorläuferstämme Can784 und Can786 zeigten eine Bande bei 2,2 kb, während die der Stämme ohne Selektionsmarker Can785 und Can787 bei 3,6 kb lag (Abbildung 3.14 C).

Auch für die Überprüfung der *tef2-ΔyEGFP*-Konstrukte wurde auf das Enzym *Cac8I* zurückgegriffen. Hier zeigte sich die wildtypische Bande bei 3,1 kb, die der Vorläuferstämme Can780 und Can782 bei 1,6 kb und die endgültigen Stämme Can781 und Can783 wurden durch eine Bande auf Höhe von 2,5 kb bestätigt (Abbildung 3.14 D).

Es wurden je Integration zwei unabhängige Reporterstämme hergestellt, die jeweils parallel untersucht wurden.

#### **3.1.7.4 Validierung der Reporterstämme**

Zur Validierung der Reporterstämme wurden Biofilme dieser Stämme in Multiwellplatten gezogen und mit dem Wildtyp verglichen (2.2). Da die Fluoreszenzspektren von *yEGFP* und dem standardmäßig für diese Analysen verwendeten FDA überlappen, wurde die metabolische Aktivität der Zellen in den Biofilmen mit Hilfe des XTT-Reduktionsassays bestimmt und auf den Wildtyp Can14 normalisiert (2.3.2). Es zeigte sich, dass sich die Biofilme der Reporterstämme nicht signifikant von dem wildtypischen unterschieden (Abbildung 3.15). Auch bei mikroskopischer Betrachtung der Biofilme konnten Wildtyp und Mutanten nicht unterschieden werden. Somit konnten die Stämme für die weiterführenden Untersuchungen eingesetzt werden.

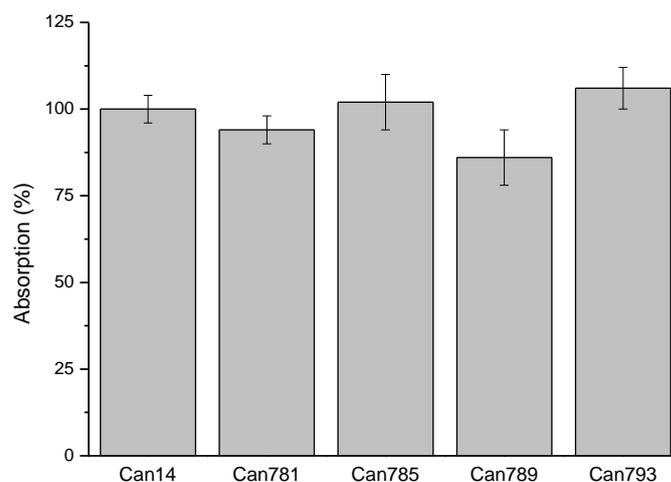


Abbildung 3.15. Vergleich der Biofilme der mutierten Stämme mit dem Wildtyp. Biofilme wurden für 48 h in Mikrotiterplatten inkubiert und die metabolisch aktiven Zellen mit Hilfe des XTT-Reduktionsassays bestimmt und auf den Wildtyp normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je drei biologischen Replikaten, die mindestens im Triplikat vermessen wurden.

Die Entwicklung der Fluoreszenz wurde während der Formation von Biofilmen in einem Fluoreszenzreader verfolgt. Mit Hilfe von Wellenlängenscans wurde das Maximum der Fluoreszenzsignale von *yEGFP* unter den hier gewählten Bedingungen bei 482 nm Anregung und 520 nm Emission bestimmt. Biofilme der Reporterstämme und des Wildtypes wurden in Sensoplatten über 48 h angezogen (2.2) und die Fluoreszenz jede Stunde gemessen. Die Fluoreszenz war in den Stämmen Can785, Can789 und Can793 zu Beginn sehr schwach und kaum vom Wildtyp zu unterscheiden. Erst nach 24 h Wachstum in Biofilmen wurde *yEGFP* in diesen Stämmen signifikant exprimiert. Der Stamm Can781 dagegen zeigte schon zu Beginn eindeutige Fluoreszenzsignale. Auch hier nahm das Signal in reifenden Biofilmen zu (Abbildung 3.16).

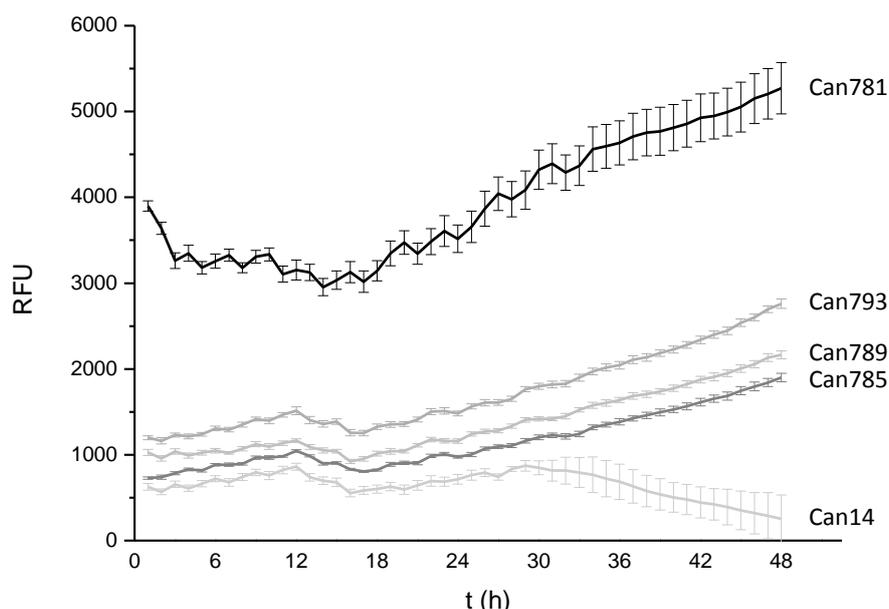


Abbildung 3.16. Verfolgung der Fluoreszenz während der Biofilmbildung der Reporterstämme Can785 (*adh7Δ-yEGFP*), Can781 (*tef2Δ-yEGFP*), Can789 (*met3Δ-yEGFP*) und Can793 (*als1Δ-yEGFP*) im Vergleich zu Can14 (Wildtyp). Biofilme wurden für 48 h bei 37°C in Sensoplatten gezogen und die Fluoreszenz bei 482 / 520 nm einmal die Stunde bestimmt.

Zur weiteren Validierung wurde die Expression von *yEGFP* auf Proteinebene verfolgt. Biofilme der Reporterstämme wurden in Petrischalen angezogen und nach den entsprechenden Zeiträumen geerntet, die Zellen mit Hilfe von Glasperlen in Anwesenheit eines Proteinaseinhibitors aufgeschlossen und je 50 µg der zellfreien Proteinlysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zum Vergleich wurden planktonische Zellen ebenso behandelt. Die Proteine wurden auf eine Membran übertragen und mit einem für GFP spezifischen Antikörper detektiert. Die Menge an aufgetragenem Protein wurde mit Ponceau-Färbung überprüft. Unter planktonischem Wachstum wurde das Reportergen in den Stämmen Can793, Can789 und Can785 sehr schwach exprimiert (Abbildung 3.17 Spur 1), was die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sowie die qRT-PCR bestätigte (3.1.7.2). Die Expression von *yEGFP* erfolgte in den Stämmen unterschiedlich reguliert, abhängig von dem jeweiligen Promotor. So wurde das Reportergen im Stamm Can793 während der Bildung des Biofilms verstärkt gebildet (Abbildung 3.17 A), während es in Stamm Can789 vor allem während der frühen Stadien der Biofilme zu detektieren war (Abbildung 3.17 B). In dem Stamm Can785 dagegen wurde *yEGFP* über den gesamten Zeitraum nur sehr schwach exprimiert, jedoch auch in den frühen Zeitpunkten mehr als in reifen Biofilmen (Abbildung 3.17 C). Im Kontrollstamm Can781 wurde *yEGFP* unter allen Bedingungen in vergleichbar hohen Konzentrationen nachgewiesen (Abbildung 3.17 D).

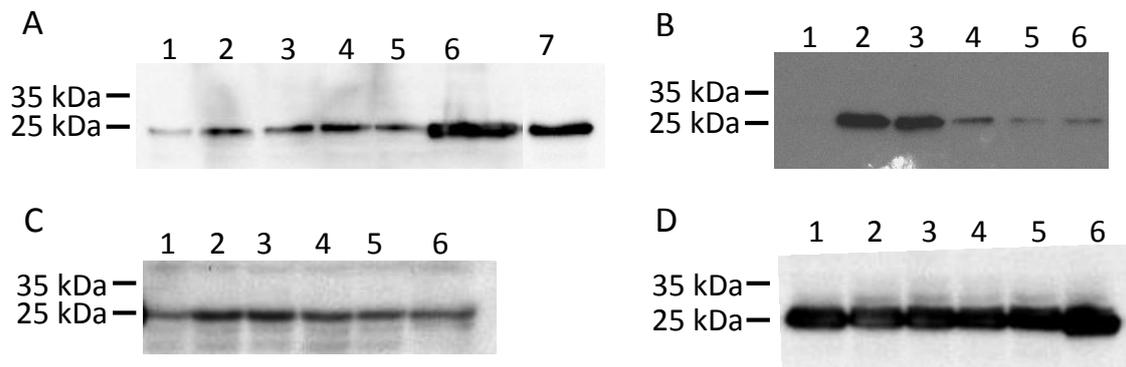


Abbildung 3.17. Immunochemischer Nachweis von yEGFP während der Entwicklung von Biofilmen. Proteinlysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Membran mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper detektiert. A. Can793 (*als1Δ-yEGFP*). B. Can789 (*met3Δ-yEGFP*). C. Can785 (*adh7Δ-yEGFP*). D. Can781 (*tef2Δ-yEGFP*). Spur 1: planktonisch, Spur 2: 1,5 h Biofilm, Spur 3: 3 h Biofilm, Spur 4: 4,5 h Biofilm, Spur 5: 6 h Biofilm, Spur 6: 24 h Biofilm, Spur 7: Positivkontrolle.

### 3.1.7.5 Einsetzen der *C. albicans* Reporterstämme

Nach Überprüfung und Validierung wurden die *C. albicans* Reporterstämme in Versuche eingesetzt. Es wurde getestet, ob die Stämme mit Änderungen der Fluoreszenzintensität auf andere Mikroorganismen reagieren. Hierfür wurde konditioniertes Medium verwendet, da die Quorum sensing Moleküle zum Teil autofluoreszieren. Biofilme der Reporterstämme wurden für 24 h in Sensoplatten gezogen und anschließend für 60 min mit konditioniertem Medium versetzt, das durch Sterilfiltration exponentiell wachsender Kulturen von *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* gewonnen wurde (2.2). Weiterhin wurden planktonisch gewachsene Zellen in konditioniertem Medium inkubiert, um deren Reaktion zu verfolgen. Die Fluoreszenz der Zellen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit einem Filterpaar 480 / 525 nm mindestens im Triplikat beobachtet. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Matlab Programm PixelZaehlen (2.15.1, Abbildung 0.1).

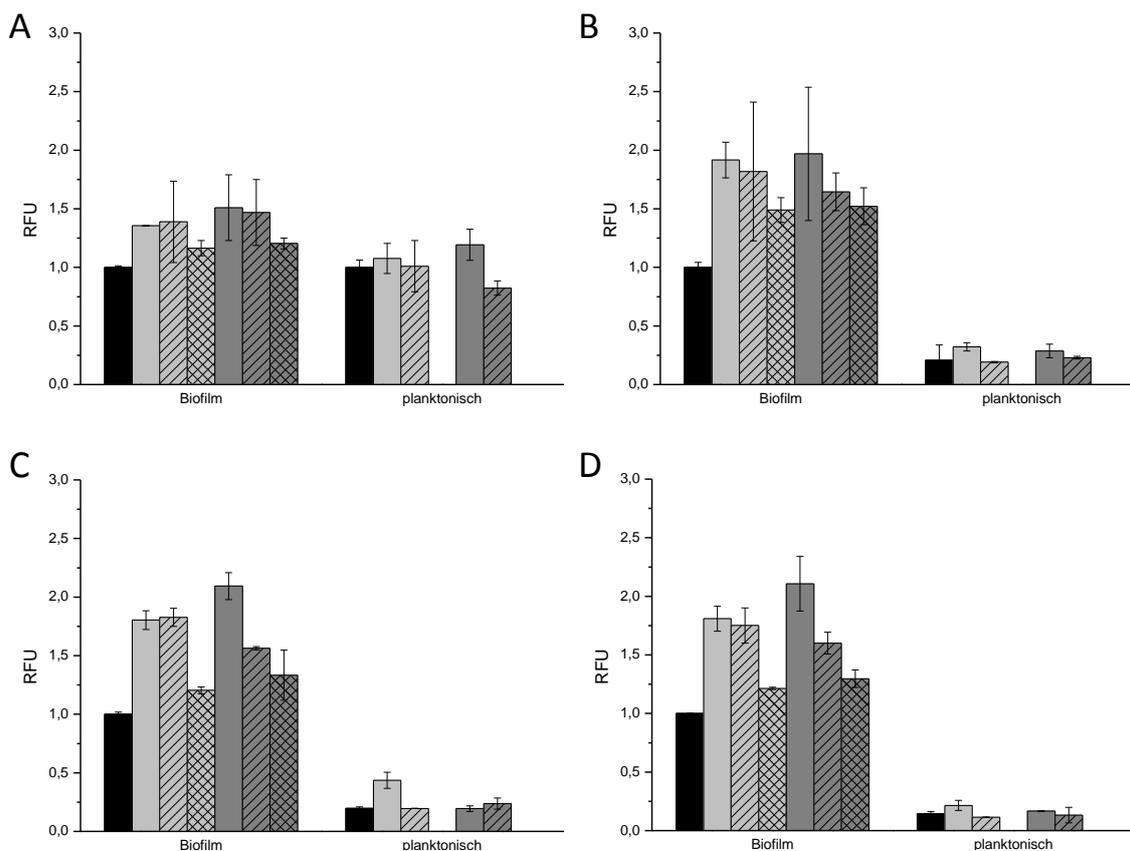


Abbildung 3.18. Einfluss von Mikroorganismen auf die *C. albicans* Reporterstämme Can781 (*tef2Δ-yEGFP*) (A), Can785 (*adh7Δ-yEGFP*) (B), Can789 (*met3Δ-yEGFP*) (C) und Can793 (*als1Δ-yEGFP*) (D).

Biofilme und planktonisch gewachsene Zellen (schwarz) wurden für 60 min mit konditionierten Medien von *C. albicans* Biofilmen (hellgrau), *C. albicans* planktonisch (hellgrau schraffiert), *S. cerevisiae* (hellgrau stark schraffiert), *P. aeruginosa* Biofilmen (dunkelgrau), *P. aeruginosa* planktonisch (dunkelgrau schraffiert) oder *P. fluorescens* (dunkelgrau stark schraffiert) inkubiert. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder erfolgte mit dem Programm PixelZählen. Dargestellt sind jeweils die auf 24 h Biofilme gemittelten Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten, die im Triplikat vermessen wurden.

Die Stämme Can785, Can789 und Can793 zeigten im planktonischen Wachstum geringere Fluoreszenz als in den Biofilmen (Abbildung 3.18, schwarze Balken). Nur die Fluoreszenz des Kontrollstamms Can781 veränderte sich zwischen den beiden Bedingungen kaum und wurde auch durch Zugabe unterschiedlich konditionierter Medien wenig beeinflusst (Abbildung 3.18 A). Dieses stimmt mit den Daten auf Protein- und RNS-Ebene überein (Abbildung 3.17, Tabelle 3.5). In Anwesenheit von mit *C. albicans* konditionierten Medien nahmen die Intensitäten der Fluoreszenz in den Stämmen Can785, Can789 und Can793 um nahezu das Doppelte zu. Während Biofilme der Reporterstämme unabhängig von der Wachstumsform des Pilzes ähnlich stark reagierten, nahm die Fluoreszenz der planktonisch wachsenden Reporterstämme auf von Biofilmen konditioniertes Medium deutlich stärker zu als auf das von planktonischen Zellen (Abbildung 3.18, hellgraue und hellgrau schraffierte Balken).

Beeinflusst von *P. aeruginosa* zeigte sich ebenfalls eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensitäten in den Reporterstämmen. Hier jedoch ist eine deutliche Unterscheidung von durch Biofilme und durch planktonische Zellen konditioniertem Medium zu sehen; die Reaktion auf Biofilme war in allen Stämmen sowohl im Biofilm als auch planktonisch gewachsen ausgeprägter (Abbildung 3.18, dunkelgraue und dunkelgrau schraffierte Balken). Wurde jedoch von *S. cerevisiae* oder *P. fluorescens* konditioniertes Medium zu Biofilmen der Reporterstämmen gegeben, reagierten diese weniger stark (Abbildung 3.18, stark schraffierte Balken). Dieses wurde durch Fluoreszenzmessungen der Expression von  $yEGFP$  während des Wachstums der Reporterstämmen in Multiwellplatten bestätigt (Abbildung 3.19).

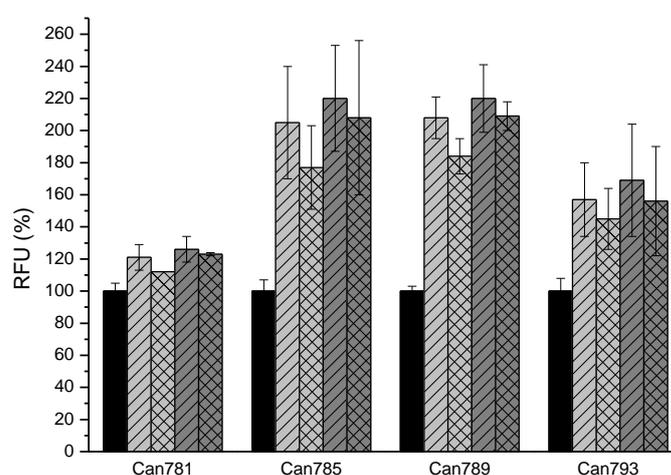


Abbildung 3.19. Beeinflussung der Biofilme der *C. albicans* Reporterstämmen Can781 (*tef2Δ-yEGFP*), Can785 (*adh7Δ-yEGFP*), Can789 (*met3Δ-yEGFP*) und Can793 (*als1Δ-yEGFP*) durch von Mikroorganismen konditionierte Medien. Zu 24 h gewachsenen Biofilmen (schwarz) wurde konditioniertes Medium von planktonisch gewachsenen *C. albicans* (hellgrau schraffiert), *S. cerevisiae* (hellgrau stark schraffiert), *P. aeruginosa* (dunkelgrau schraffiert) und *P. fluorescens* (dunkelgrau stark schraffiert) für 60 min zugegeben und die Fluoreszenzsignale bei 482 / 520 nm detektiert. Dargestellt sind auf die Kontrollen normierte Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten, die mindestens im Triplikat vermessen wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *C. albicans* die Anwesenheit anderer Mikroorganismen sowie die Zunahme der eigenen Population unter anderem anhand der Quorum sensing Moleküle wahrnimmt und dieses mit Hilfe der entwickelten Reporterstämmen detektiert werden kann.

### 3.1.7.6 Auswahl der Promotoren für Reporterstämme in *P. aeruginosa*

Ein weiteres Set an Reporterstämmen wurde in *P. aeruginosa* hergestellt. Das rot fluoreszierende Reportergen *TurboFP602* wurde unter Kontrolle von Promotoren kloniert, die spezifisch in Biofilmen hochreguliert werden. Auch in Bakterien ist die Ausbildung von Biofilmen mit Änderungen des Transkriptionsprofils verbunden, wie Studien auf Protein- und RNS-Ebene zeigen. Während der Biofilmformation werden sowohl Gene der zentralen Stoffwechselwege, wie Aminosäuren- und Kohlenstoffmetabolismus, aber auch der Anpassungs- und Schutzmechanismen, beispielsweise der Antibiotikaresistenz, verstärkt exprimiert (Sauer *et al.*, 2002; Waite *et al.*, 2006; Waite *et al.*, 2005; Whiteley *et al.*, 2001). Ähnliche Regulationen wurden als Reaktion Quorum sensing-defizienter Mutanten auf Zugabe von Quorum sensing Molekülen nachgewiesen (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Whiteley *et al.*, 1999).

Ein Vergleich der Literatur unter Einbeziehung der hier beschriebenen Sekretom-Analyse (3.1.5) führte zu der Auswahl einiger Gene, die in Biofilmen während unterschiedlichen Phasen verstärkt exprimiert werden und verschiedenen funktionellen Klassen zugeordnet werden. Das Lipoprotein-bindende Protein RahU (PA0122), das in die Anpassungsfähigkeit und der Ausbildung von Schutzmechanismen von *P. aeruginosa* involviert ist, wurde während der frühen Phasen der Biofilmbildung im Sekretom gefunden (Tabelle 0.1). Die verstärkte Expression in Biofilmen und durch Quorum sensing Moleküle wurde mittels Transkriptionsanalysen bestätigt (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Waite *et al.*, 2005). Die Promotorsequenz von *rahU* enthält spezifische Quorum sensing Molekül assoziierte Regulationselemente, die sogenannte las Box (Schuster *et al.*, 2003). Weiterhin wurde das Chitin-bindende Protein CbpD (PA0852) anhand der Proteindaten gewählt. Im Sekretom von *P. aeruginosa* Biofilmen wurde es sowohl während der Adhäsion als auch in reifen Biofilmen durch mehrere Peptide vertreten identifiziert (Tabelle 0.1). Die Quorum sensing Molekül-regulierte Expression in Biofilmen des sekretierten Proteins wurde in mehreren Analysen bestätigt (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Waite *et al.*, 2005). Um möglichst vielfältige Reporterstämme zu erhalten, wurden aus den Literaturdaten noch zwei weitere Proteine mit Sekretionsdomäne, der alkalische Proteinaseinhibitor AprI (PA1250) und ein konserviertes hypothetisches Protein PA1657 ausgewählt. Des Weiteren wurde die Chitinase ChiC (PA2300) in die Analysen mit aufgenommen, da die Promotorsequenz ebenfalls eine las Box enthält (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Waite *et al.*, 2005).

Um zu überprüfen, ob auch unter den hier gewählten Biofilm-Bedingungen diese Gene verstärkt exprimiert werden, wurde dieses auf Transkriptebene mit Hilfe einer qRT-PCR untersucht. Hierzu wurden *P. aeruginosa* Biofilme in Pepton Saline und YBNP-Medium für 24 und 48 h in Petrischalen angezogen (2.2), die geernteten Zellen zur

Stabilisierung der RNS umgehend mit *RNA Later* versetzt und die RNS aufgereinigt (2.7). Planktonisch gewachsene Zellen wurden analog behandelt. Nach gelbasierter Überprüfung der Reinheit und photometrischer Messung der Konzentration wurde die RNS in cDNS umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt (2.8). Als Referenz sollte hier der Transkriptionsregulator *ampR* (PA4109) dienen. Da sich dieser jedoch bei ersten Tests auch als differentiell reguliert erwies, wurde er mit in die Analysen aufgenommen und die 16S rRNS (PA0668.1) zur Normalisierung verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression der Gene je nach Medium und Inkubationszeit der Biofilme variiert (Abbildung 3.20). PA0852, PA1657 und PA2300 wurden im Vergleich zu planktonisch gewachsenen Zellen in geringem Maße reguliert. Die Expression von PA0122 war in 24 h in YNBNP inkubierten Biofilmen stark vermehrt. PA4109 wurde vor allem in 48 h in Pepton Saline gewachsenen Biofilmen hochreguliert. Für PA1250 wurde unter allen Bedingungen eine vermehrte Expression festgestellt, vor allem jedoch in 24 h in YNBNP gewachsenen Biofilmen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Promotorregionen von *rahU* (PA0122), *aprI* (PA1250) und *ampR* (PA4109) für die Herstellung von Reporterstämmen in *P. aeruginosa* gewählt.

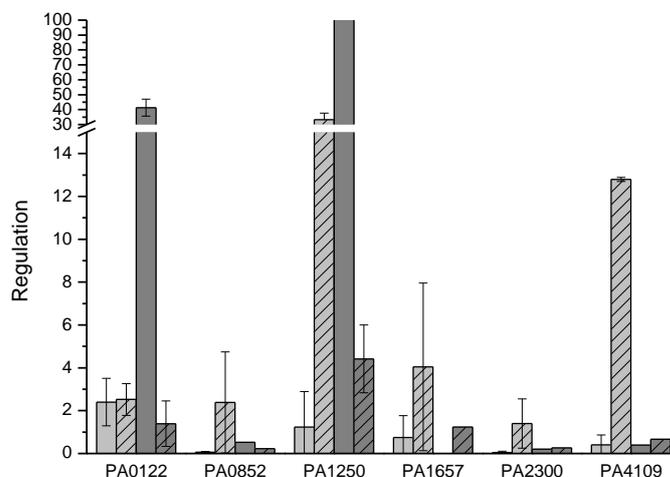


Abbildung 3.20. Auswahl der Promotoren für die *P. aeruginosa* Reporterstämmen durch Überprüfung der Regulationen mittels qRT-PCR. Biofilme wurden in Pepton Saline (hellgrau) oder YNBNP-Medium (dunkelgrau) für 24 h (ausgefüllt) oder 48 h (schraffiert) inkubiert, die RNS isoliert und in cDNS umgeschrieben. Diese diente als Matrize für qRT-PCR-Analysen der Gene PA0122 (*rahU*), PA0852 (*cbpD*), PA1250 (*aprI*), PA1657 (hypothetisches Protein), PA2300 (*chiC*) und PA4109 (*ampR*), die mit Hilfe der 16S RNS normalisiert wurden und im Verhältnis zu planktonisch gewachsenen Zellen berechnet wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Analysen.

### 3.1.7.7 Integration des Reportergens in *P. aeruginosa*

Für die Herstellung von Reporterstämmen in *P. aeruginosa* wurde das rot fluoreszierende Protein TurboFP602 unter Kontrolle der Promotoren der Gene *rahU* (PA0122), *aprI* (PA1250) und *ampR* (PA4109) in die intergenische Region PA5548-*gImS* kloniert. Hierfür wurde zunächst jeweils die Promotorregion und *TurboFP602* in einen mini-Tn7 Vektor kloniert (Choi *et al.*, 2005). Nach Integration der Fragmente an der Tn7-Bindungsstelle durch Co-Transformation der Vektoren mit einem Helferplasmid für die Tn7 spezifische Integration wurde der Selektionsmarker FLP vermittelt entfernt (2.4.2) und die Transformanten mittels Southern Blot Analysen überprüft (2.6). Hierfür wurde die isolierte genomische DNS (2.5) mit dem Restriktionsenzym *KpnI* hydrolysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Zur Detektion wurde eine mit PCR amplifizierte Sonde radioaktiv markiert, die mit PA5548 hybridisierte. Im Wildtyp PAO1 zeigte sich eine Bande bei 2,9 kb. Nach Integration der Promotor-Reporter-Konstrukte erschien eine Bande bei 3,2 kb. Wurde der Resistenzmarker erfolgreich entfernt, lag die Bande bei 2,3 kb (Abbildung 3.21). Es wurden für jede Promotorsequenz zwei unabhängige Mutanten hergestellt.

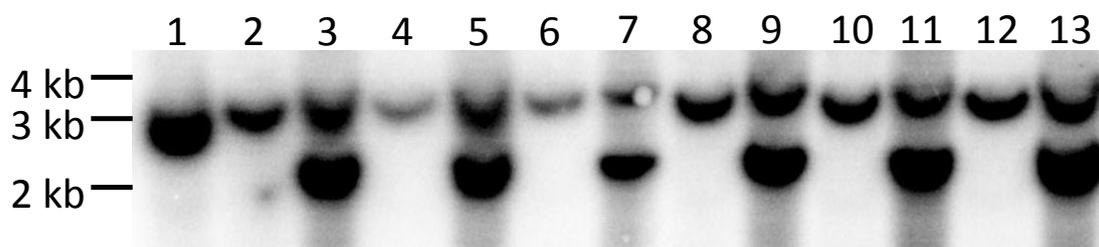


Abbildung 3.21. Southern Blot Analyse zur Validierung der *P. aeruginosa* Reporterstäme. Spur 1: PAO1 (Wildtyp), Spur 2 + 4: S2\_B011 + S2\_B013 (Tn7-pr(*rahU*)-FP602-FLIP), Spur 3 + 5: S2\_B012 + S2\_B014 (Tn7-FRT-pr(*rahU*)-FP602), Spur 6 + 8: S2\_B015 + S2\_B017 (Tn7-pr(*aprI*)-FP602-FLIP), Spur 7 + 9: S2\_B016 + S2\_B018 (Tn7-FRT-pr(*aprI*)-FP602), Spur 10 + 12: S2\_B019 + S2\_B021 (Tn7-pr(*ampR*)-FP602-FLIP), Spur 11 + 13: S2\_B020 + S2\_B022 (Tn7-FRT-pr(*ampR*)-FP602).

### 3.1.7.8 Validierung der Reporterstäme

Um die Reporterstäme mit dem Wildtyp zu vergleichen, wurden Biofilme der verschiedenen Stämme in Mikrotiterplatten gezogen (2.2) und die metabolisch aktiven Zellen mit Hilfe des FDA-Assays bestimmt (2.3.1) und auf den Wildtyp normalisiert. Da sich die Fluoreszenzmaxima von FDA und TurboFP602 nicht überschneiden, konnte in diesem Fall dieser Assay verwendet werden. Es zeigte sich, dass Reporter- und Wildtypstäme vergleichbare Mengen an Fluoreszein bildeten (Abbildung 3.22). Auch mikroskopisch wurden keine Unterschiede beobachtet. Da die Biofilme der Reporterstäme ähnlich der wildtypischen waren, konnten die Stämme für die weiteren Analysen eingesetzt werden.

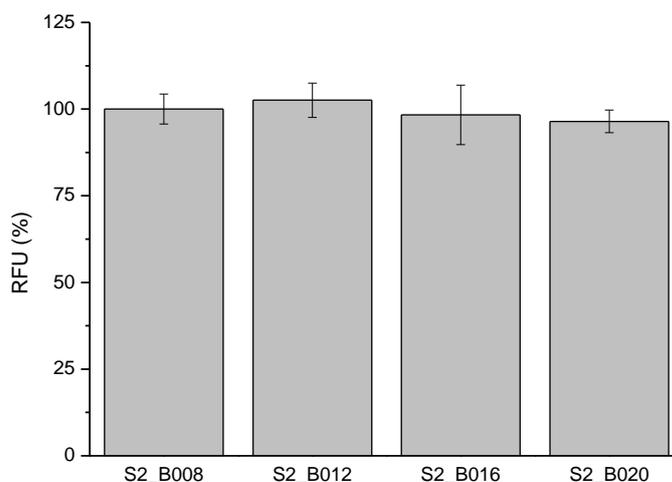


Abbildung 3.22. Vergleich der von den Reporterstämmen S2\_B012, S2\_B016 und S2\_B020 gebildeten Biofilme mit den wildtypischen (S2\_B008). Biofilme der Stämme wurden für 48 h in Mikrotiterplatten gezogen und die metabolisch aktiven Zellen durch die Umsetzung von FDA bestimmt. Diese wurde bei 485 / 535 nm gemessen und auf den Wildtyp normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten, die im Triplikat vermessen wurden.

Mit Hilfe von Wellenlängenscans wurde die maximale Fluoreszenz von TurboFP602 in *P. aeruginosa* mit einer Emission bei 602 nm bei einer Anregung mit 574 nm festgestellt. Die Expression von *TurboFP602* wurde während der Bildung von Biofilmen verfolgt. Hierzu wurden Biofilme der Reporterstämmen in Sensoplatten bei 37°C inkubiert (2.2) und die Fluoreszenz bei 574 nm Anregung und 602 nm Emission jede Stunde bestimmt. Die Fluoreszenzsignale der Reporterstämmen nahmen über die Zeit zu (Abbildung 3.23). Stamm S2\_B020 erreichte nach etwa einem Tag ein Plateau an Signal, während die Expression von *TurboFP602* in den Stämmen S2\_B016 und S2\_B012 weiter zunahm. Aufgrund der bekannten Eigenfluoreszenz von *P. aeruginosa* wurde auch im Wildtyp S2\_B008 ein Signal gemessen, das jedoch vor allem zu den späteren Zeitpunkten klar von den Reporterstämmen zu unterscheiden war.

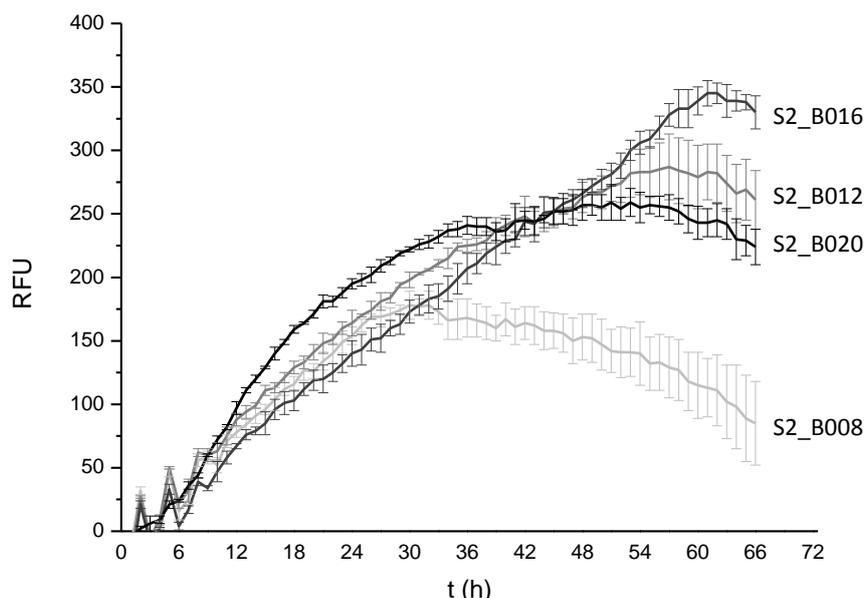


Abbildung 3.23. Verfolgung der *TurboFP602*-Expression während der Biofilmbildung der *P. aeruginosa* Reporterstämme S2\_B012 (Tn7-pr(*rahU*)-FP602), S2\_B016 (Tn7-pr(*aprI*)-FP602) und S2\_B020 (Tn7-pr(*ampR*)-FP602) im Vergleich zum Wildtyp S2\_B008. Biofilme wurden in Sensoplatten bei 37°C inkubiert und die Fluoreszenz bei 574 / 602 nm jede Stunde bestimmt.

Zur weiteren Validierung der Expression von *TurboFP602* in den Reporterstämmen, wurde diese auf Transkriptebene überprüft, um Hintergrundfluoreszenzsignale von *P. aeruginosa* auszuschließen. Eine immunchemische Detektion mittels gegen *TurboFP602* gerichteter Antikörper wurde mit unterschiedlichen Parametern getestet, führte jedoch zu keinen spezifischen Signalen. Eventuell nimmt *P. aeruginosa* Modifikationen an Peptiden vor, die für die Bindung des Antikörpers essentiell sind, was zur Unterbindung der Antikörperreaktion führt. Aus diesem Grund wurde auf RNS-Ebene überprüft, ob *TurboFP602* in den Reporterstämmen exprimiert wird. Biofilme wurden für 24 h in Petrischalen angezogen (2.2), die Zellen mit Hilfe von *RNA protect* stabilisiert, anschließend enzymatisch aufgeschlossen und die RNS isoliert (2.7). Planktonische Zellen wurden äquivalent behandelt. Nach Überprüfung von Reinheit und Konzentration wurde die RNS in cDNS umgeschrieben und die Menge an *TurboFP602* mit Hilfe einer spezifischen Primer-Sonden-Kombination mittels qRT-PCR bestimmt und auf die planktonische Wachstumsbedingung normalisiert. Als Referenzgen diente wiederum die 16S rRNS PA0668.1 (2.8). In jedem Reporterstamm wurde eine erhöhte Menge an *TurboFP602* in Biofilmen festgestellt (Abbildung 3.24). Die Transkriptmenge an *TurboFP602* ist jedoch geringer als die der ursprünglichen Gene *rahU*, *aprI* und *ampR* (Abbildung 3.20), obwohl das Reporter-gen unter Kontrolle derselben Promotoren steht. Dieses könnte darauf beruhen, dass die Promotor-Reporter-gen-Konstrukte in die Tn7-Bindungsstelle in der intergenischen Region PA5548-*glmS* integriert wurden.

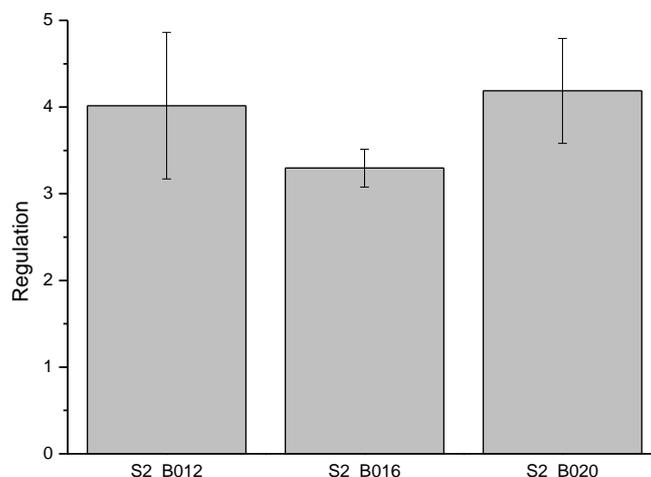


Abbildung 3.24. Überprüfung der Expression von *TurboFP602* in den Reporterstämmen S2\_B012 (Tn7-pr(*rahU*)-FP602), S2\_B016 (Tn7-pr(*aprl*)-FP602) und S2\_B020 (Tn7-pr(*ampR*)-FP602) mittels qRT-PCR. Die RNS 24 h gewachsener Biofilme wurde isoliert, in cDNS umgeschrieben und die Menge an *TurboFP602* normalisiert auf planktonisch gewachsenen Zellen bestimmt.

### 3.1.7.9 Einsetzen der *P. aeruginosa* Reporterstämmе

Nach erfolgreicher Überprüfung und Validierung wurden die Reporterstämmе in Versuche eingesetzt. Die Reaktion auf die Anwesenheit anderer Mikroorganismen wurde *in vivo* fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines Filterpaares mit 550 / 605 nm detektiert und mit Hilfe der PixelZahlen Software ausgewertet (2.15.1). Da die Fluoreszenzsignale der *P. aeruginosa* Reporterstämmе verhältnismäßig schwach waren und nicht mittels immunochemischer Methoden nachgewiesen werden konnten, wurde zunächst die Fluoreszenzintensität während der Entwicklung der Biofilme verfolgt, um das System zu überprüfen. Hierfür wurden Biofilme in Sensoplatten angezogen und die Fluoreszenzsignale detektiert (2.2). Wie in Abbildung 3.25 dargestellt, nahm die Fluoreszenz in den Stämmе S2\_B012, S2\_B016 und S2\_B020 über den Zeitraum von 48 h zu. Dieses bestätigte die Ergebnisse der Verfolgung der Fluoreszenzintensitäten während der Entwicklung von Biofilmen bei 574 / 602 nm (Abbildung 3.23) und validierte zugleich diese Methode.

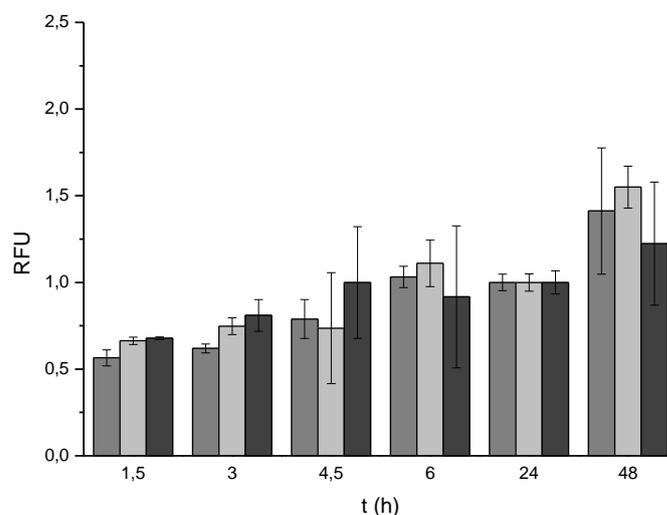


Abbildung 3.25. Fluoreszenzmikroskopische Verfolgung der Expression von *TurboFP602* während der Bildung von Biofilmen der *P. aeruginosa* Reporterstämme S2\_B012 (grau), S2\_B016 (hellgrau) und S2\_B020 (dunkelgrau). Biofilme wurden in Sensoplatten angezogen und die Fluoreszenzintensitäten mit dem Programm PixelZaehlen ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten, die jeweils im Triplikat vermessen wurden und auf 24 h gewachsene Biofilme normiert wurden.

Nach erfolgreicher Validierung der Methode wurde die Reaktion der Reporter auf *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Mikroorganismen wurden planktonisch oder als Biofilm angezogen und anschließend durch Sterilfiltration von dem so konditionierten Medium getrennt. Dieses wurde für 60 min zu in Biofilmen oder planktonisch gewachsenen Reporterstämmen gegeben (2.2), die Fluoreszenzsignale mikroskopisch detektiert und mit dem Programm PixelZaehlen ausgewertet (2.15.1). *TurboFP602* wurde in den Stämmen S2\_B012, S2\_B016 und S2\_B020 während planktonischem Wachstum geringer exprimiert als in 24 h gewachsenen Biofilmen (Abbildung 3.26, schwarze Balken). Dieses bestätigte die Untersuchungen auf Transkriptebeine (Abbildung 3.20, Abbildung 3.22). Unter dem Einfluss von durch *C. albicans* oder *P. aeruginosa* Biofilme konditioniertem Medium nahm die Fluoreszenz in allen Reporterstämmen um etwa 25% zu (Abbildung 3.26, hellgraue und dunkelgraue Balken). Planktonisch gewachsene *C. albicans* und *P. aeruginosa* Kulturen lösten eine geringere Zunahme der Fluoreszenz aus (Abbildung 3.26, hellgrau und dunkelgrau schraffierte Balken). Die Zugabe von durch *S. cerevisiae* konditioniertem Medium führte in den Stämmen zu Verringerung der Signale (Abbildung 3.26, hellgrau stark schraffierte Balken), während *P. fluorescens* die Signalstärken gering beeinflusste (Abbildung 3.26, dunkelgrau stark schraffierte Balken).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reporterstämme S2\_B012, S2\_B016 und S2\_B020 auf die Anwesenheit von *C. albicans* und *P. aeruginosa* in Abhängigkeit der Quorum sensing Moleküle reagieren und zur Detektion dieser Mikroorganismen verwendet werden können.

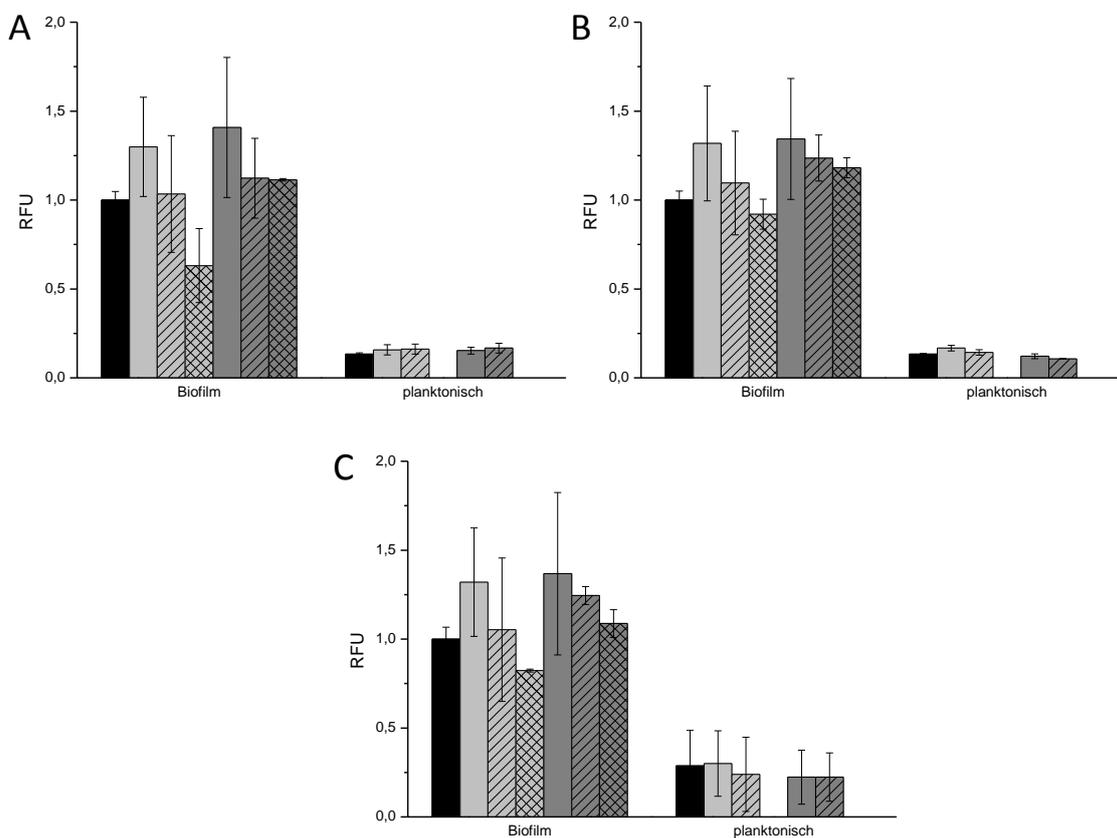


Abbildung 3.26. Reaktion der Reporterstämme S2\_B012 (A), S2\_B016 (B) und S2\_B020 (C) (schwarz) auf *C. albicans* Biofilme (hellgrau) und planktonisch (hellgrau schraffiert), *S. cerevisiae* (hellgrau stark schraffiert), *P. aeruginosa* Biofilme (dunkelgrau) und planktonisch (dunkelgrau schraffiert) sowie *P. fluorescens* (dunkelgrau stark schraffiert). Die Fluoreszenzsignale wurden fluoreszenzmikroskopisch detektiert und mit dem Programm PixelZählen ausgewertet. Dargestellt sind auf 24 h gewachsene Biofilme normierte Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten, die mindestens im Triplikat vermessen wurden.

## 3.2 *Escherichia coli* als Reporter für AI-2

Da *C. albicans* und *P. aeruginosa* fakultativ pathogene Organismen sind und somit der Sicherheitsstufe L2 bzw. S2 zugeordnet werden, wurden die beschriebenen Methoden auf *Escherichia coli* übertragen. *E. coli* dient als Modellorganismus der Mikro- und Molekularbiologie und die Laborstämme werden in die Sicherheitsstufe 1 eingeordnet. In dieser Arbeit wurde der Stamm MG1655 (B4290) verwendet.

### 3.2.1 Anpassung der Wachstumsbedingungen und des *in vitro* Assays

Im Unterschied zu *C. albicans* und *P. aeruginosa*, die Biofilme bevorzugt unter Mangelbedingungen ausbilden, wächst *E. coli* in verschiedenen Medien als Biofilm. Sowohl im Vollmedium LB als auch in Pepton Saline konnten strukturierte Biofilme beobachtet werden. Auch für diesen Organismus wurde eine standardisierte Zellsuspension ( $1 \cdot 10^9$  Zellen / ml) für 90 min inkubiert, die nicht adhären Zellen anschließend abgenommen und durch frisches vorgewärmtes Medium ersetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C unter statischen Bedingungen zeigten sich Mikrokolonien, die sich in den folgenden 24 h durch Zellteilung und Aggregation zu strukturierten dreidimensionalen Biofilmen entwickelten (Abbildung 3.27). Dieses Verhalten wurde sowohl in Pepton Saline als auch in LB-Medium beobachtet. Da jedoch LB durch den hohen Phosphatanteil autofluoresziert, wurde für die weiteren Untersuchungen Pepton Saline bevorzugt.

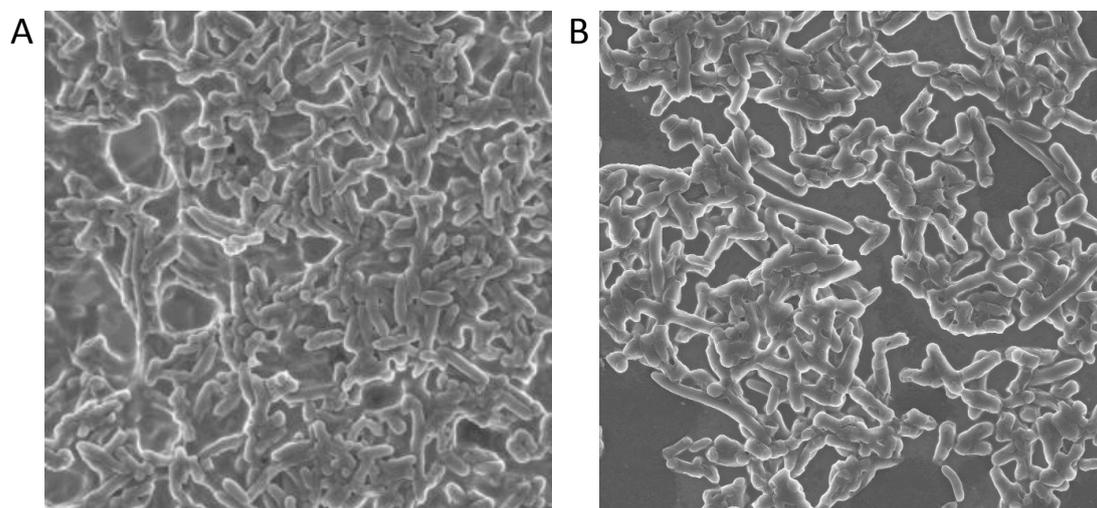


Abbildung 3.27. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme 48 h gewachsener Biofilms des *E. coli* Stammes B4390 in LB-Medium (A) und Pepton Saline (B). Die vertikale Seitenkante entspricht 20 µm.

Für die Quantifizierung von *E. coli* Biofilmen wurden ebenfalls verschiedene in der Literatur beschriebene Verfahren getestet (siehe 3.1.2) (Dehling, 2009). Auch hier zeigte sich, dass der FDA-Assay aufgrund der guten Reproduzierbarkeit, der einfachen

Handhabung und der geringen Kosten geeignet ist. Für 48 h in Mikrotiterplatten gewachsene Biofilme wurden mit PBS gewaschen, 10 µg FDA / ml PBS zugesetzt und das Signal bei 485 / 535 nm ausgelesen (2.3.1). Im Unterschied zu *C. albicans* und *P. aeruginosa* wurden die Platten jedoch für 2 h bei 30°C inkubiert, da bei Raumtemperatur eine geringe Umsetzung des Farbstoffes statt fand. Zur Validierung des FDA-Assays wurden *E. coli* Biofilme mit dem Zucker D-Mannose und dem nicht-metabolisierbaren Derivat  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid inkubiert. Das mannose-spezifische Adhäsion FimH dient der Interaktion mit eukaryotischen Zellwänden, ist aber aufgrund der Bindungskapazitäten an abiotische Oberflächen auch an der Biofilmbildung beteiligt und wird durch Mannose blockiert (Pratt & Kolter, 1998). D-Mannose oder  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 50, 100 mM) gemeinsam mit den Zellen während der initialen Adhärenzphase zugegeben und die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen nach 48 h mit Hilfe des FDA-Assays bestimmt (Abbildung 3.28 A). Die konzentrationsabhängige Biofilm-inhibierende Wirkung von Mannose und  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid konnte bestätigt werden, da das Fluoreszenzsignal verglichen mit den Biofilmen ohne Zugabe der Substanzen abnahm. Die Höhe des Signals wurde nicht beeinflusst, wenn die Substanzen während der gesamten Inkubationszeit von 48 h präsent waren. Daraus lässt sich schließen, dass durch die Substanzen die Adhärenz der Zellen an die abiotische Oberfläche und nicht der Reifeprozess des Biofilms beeinflusst wird. Die Zugabe von  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid zeigte im Vergleich zu Mannose eine leicht verstärkte Reduktion des Biofilms. Dies deutet darauf hin, dass  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid eine höhere Affinität zu FimH besitzt als D-Mannose. Die Konzentration von D-Mannose könnte weiterhin während der Inkubationszeit abnehmen, da es von *E. coli* im Gegensatz zu dem nicht-metabolisierbaren Derivat verstoffwechselt wird. Die Ergebnisse dieser Testreihen zeigen zudem die Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Quantifizierungsmethode mit FDA von *E. coli* Biofilmen. Auch für *E. coli* wurde getestet, ob D-Mannose und  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid das Wachstumsverhalten beeinflussen, indem Wachstumskurven in Anwesenheit der Substanzen aufgenommen wurden. Das Wachstum wurde durch die Substanzen nicht beeinflusst (Abbildung 3.28 B). Somit lässt sich die biofilm-inhibierende Wirkung von D-Mannose und  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid auf die verringerte Adhärenzfähigkeit der Zellen zurückführen, was die Literaturdaten bestätigt (Pratt & Kolter, 1998).

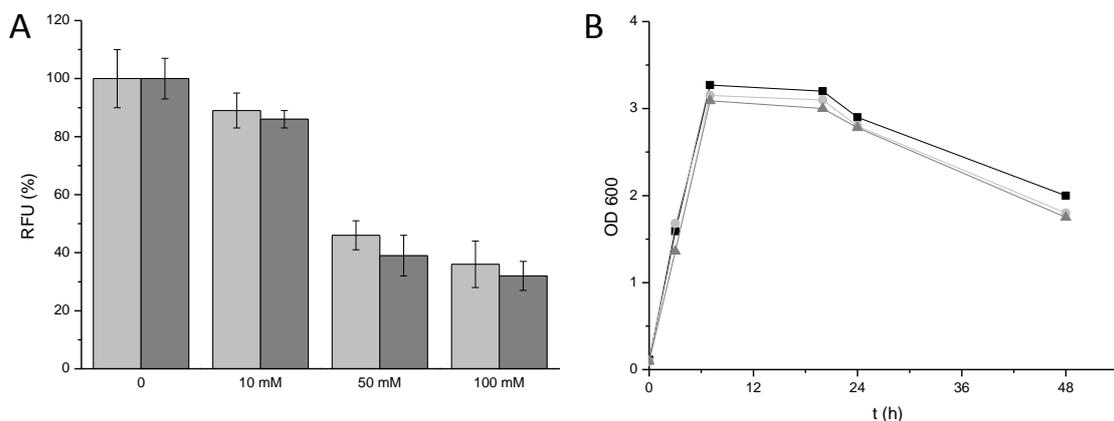


Abbildung 3.28. Einfluss von D-Mannose (hellgrau) und  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid (dunkelgrau) auf Biofilme (A) und Wachstum (B) von *E. coli* B4390. A. Die Substanzen wurden mit Endkonzentrationen von 10, 50 und 100 mM ausschließlich während der Adhärenzphase zugegeben. Die Quantifizierung der für weitere 48 h gewachsenen Biofilme erfolgte mit Hilfe des FDA-Assays, der bei 485 / 535 nm ausgelesen wurde. B. Das Wachstumsverhalten von *E. coli* B4390 (schwarz) wurde unter dem Einfluss von 100 mM Mannose (hellgrau) und  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid (dunkelgrau) photometrisch bei 600 nm bestimmt.

### 3.2.2 Entwicklung von Reporterstämmen in *Escherichia coli*

Um möglichst vielfältige Stämme zur *in vivo* Beobachtung von Biofilmen zu erhalten, wurden auch in *E. coli* Reporterstämme entwickelt (Dehling, 2009). Als Reporter gen wurde hier das grün fluoreszierende *TurboGFP* (Evrogen, Moskau) ausgewählt, das unter Kontrolle von Promotoren kloniert wurde, die ursprünglich in Biofilmen reguliert werden. Unter Verwendung von Transkriptionsanalysen wurde gezeigt, dass in Biofilmen sowohl zentrale Stoffwechselwege, wie der Schwefel- und Tryptophan-Metabolismus reguliert werden, sowie Gene, die in Stress, Motilität und Adhäsion involviert sind (Beloin *et al.*, 2004; Domka *et al.*, 2007; Junker *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2004; Schembri *et al.*, 2003). An diesen Regulationen ist unter anderem das Quorum sensing Molekül AI-2 beteiligt, was Vergleiche der Transkriptionsprofile einer AI-2 defizienten Mutante mit dem Wildtyp zeigten (DeLisa *et al.*, 2001).

Da auch bei *E. coli* Virulenzfaktoren in Biofilmen induziert werden, wurde aus der Literatur das Operon *rfe-wzzE-rffE-rffD-rffG-rffH-rffC-rffA-wzxE-rffT-wzyE-rffM-yifK* (b3784-b3794) gewählt (Domka *et al.*, 2007). Dieses codiert einen Teil der *enterobacterial common antigen* (ECA) Biosynthese, einem Oberflächenprotein, das von Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* synthetisiert wird (Barr & Rick, 1987).

Weiterhin wurde das Operon *cynTSX* (b0339-b0341) gewählt, das in den Katabolismus von Cyanat involviert ist und die Carboanhydrase CynT, die Cyanathydrolase CynS und den Cyanattransporter CynX codiert (Barr & Rick, 1987). Auch die Expression dieses Operons wird in Biofilmen induziert (Domka *et al.*, 2007; Junker *et al.*, 2006).

Zur Überprüfung der Regulationen unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen wurden die Transkriptionsraten der Operons in Biofilmen mit denen planktonisch gewachsener Zellen verglichen (2.8). Hierfür wurde die RNS von 24 h und 48 h gewachsenen Biofilmen sowie planktonischer Zellen isoliert, Konzentration und Reinheit gelelektrophoretisch bestimmt (2.7) und die RNS in cDNS umgeschrieben. Anschließend wurden die Transkript-Raten folgender Gene mittels qRT-PCR bestimmt (2.8). Für die Quantifizierung des Operons b0339-b0341 wurde *cynS* (b0340) gewählt. Aufgrund der Länge und der damit verbundenen Wahrscheinlichkeit posttranskriptionaler Modifikationen wurden für das Operon b3784-b3794 zwei Gene, *rfe* (b3784) und *rffA* (b3791), betrachtet. Als Standard wurde die 16S ribosomale rNS *rrsA* (b3851) verwendet. Die Expression der Gene *cynS*, *rfe* und *rffA* wurde in 24 h und 48 h gewachsenen Biofilmen im Vergleich zu planktonischem Wachstum hochreguliert. Vor allem die Gene des Operons b3784-b3794 wurden in 48 h gewachsenen Biofilmen verstärkt exprimiert (Abbildung 3.29). Dieses bestätigte die Microarray-Daten aus der Literatur sowie die Eignung der Promotoren dieser Operons für die Entwicklung von Reporterstämmen in *E. coli*.

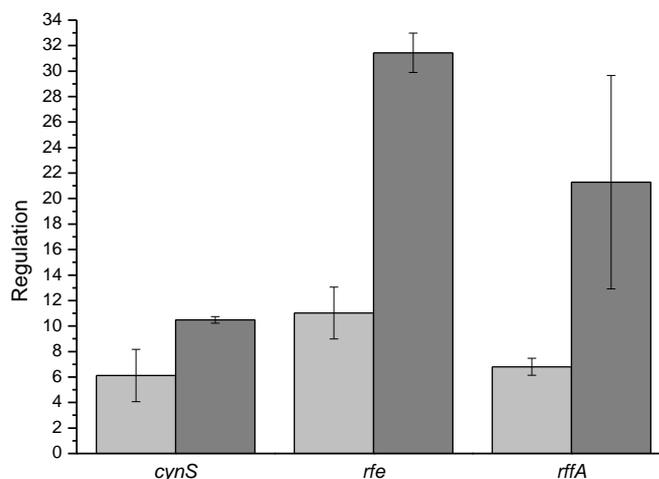


Abbildung 3.29. Ermittlung der Transkriptionsraten der Gene *cynS* (b0340), *rfe* (b3784) und *rffA* (b3791) in 24 h (hellgrau) und 48 h (dunkelgrau) gewachsenen Biofilmen verglichen mit planktonisch gewachsenen Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Replikaten, die auf *rrsA* (b3851) normalisiert wurden.

Das Reportergen *TurboGFP* wurde unter Kontrolle der Promotoren der Operons b0339-0341 und b3784-b3794 in die intergenischen Regionen *codA-cynR* (b0337-b0338) und *rho-rfe* (b3783-b3784) nahe der ursprünglichen Genorte in den Wildtypstamm B4390 integriert. Hierfür wurden zunächst Plasmide konstruiert, in die die

Promotorregionen und *TurboGFP* vor einem Selektionsmarker umgeben von den homologen Sequenzen der intergenischen Regionen kloniert wurden (Datsenko & Wanner, 2000). Nach Red/ET vermittelter Rekombination zur Integration der Fragmente wurden die Selektionsmarker unter Verwendung eines FLP-Expressionsplasmids entfernt (2.4.3) und die Transformanten mittels Southern Blot Analysen überprüft (2.6). Die genomische DNS der Stämme wurde isoliert (2.5) und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolysiert. Die erhaltenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen, auf der die spezifischen Sequenzen mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden detektiert wurden (2.6).

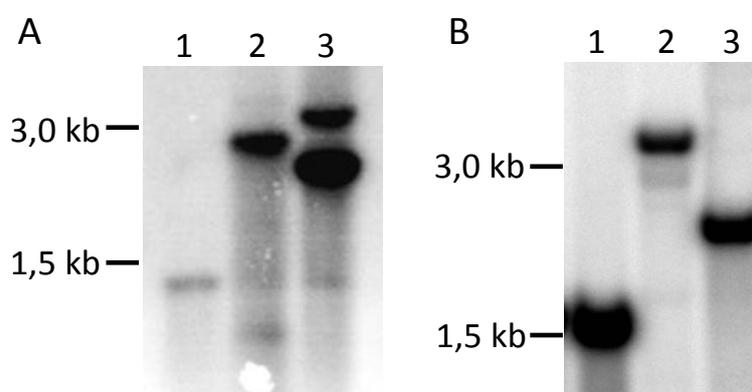


Abbildung 3.30. Southern Blot Analysen zur Verifizierung der *E. coli* Reporterstämme. A. Validierung der Integration von *pr(cynT)-GFP*. Spur 1: B4390 (Wildtyp), Spur 2: B4393 (*pr(cynT)-GFP-FLIP*), Spur 3: B4394 (*pr(cynT)-GFP-FRT*). B. Überprüfung der Integration von *pr(rfe)-GFP*. Spur 1: B4390 (Wildtyp), Spur 2: B4397 (*pr(rfe)-GFP-FLIP*), Spur 3: B4398 (*pr(rfe)-GFP-FRT*).

Zur Überprüfung der Integration von *pr(cynT)-TurboGFP* wurde die genomische DNS mit dem Enzym *BssHII* hydrolysiert (Abbildung 3.30 A). Dieses führte zu einer wildtypischen Bande bei 1,5 kb. Nach Integration des Konstruktes war eine Bande bei 2,7 kb zu sehen, welche den Stamm B4393 bestätigte. Nach dem Entfernen der Kasette wurde diese von einer auf Höhe von 2,3 kb abgelöst, die von einer weiteren Bande (3,1 kb) aufgrund unspezifischer Bindung der Sonde begleitet wurde. Dieses Muster verifizierte den Stamm B4394.

Die Integration von *pr(rfe)-TurboGFP* wurde mit einem Verdau mit dem Enzym *EcoRV* überprüft (Abbildung 3.30 B). Hier zeigte sich das Signal des Wildtyps bei 1,6 kb. Die Integration des Fragmentes führte zu einer Bande bei 4,1 kb im Stamm B4397 und nach erfolgreicher Entfernung der Kasette war eine Bande auf Höhe von 2,5 kb zu sehen, was die korrekte Integration im Stamm B4398 bestätigte.

*Escherichia coli* verwendet das Quorum sensing Molekül Autoinducer-2 (AI-2), das in unterschiedlichen Gram-negativen und Gram-positiven Mikroorganismen identifiziert wurde und als „universelles“ Quorum sensing Molekül für die Kommunikation zwischen verschiedenen Mikroorganismen gilt (Bassler *et al.*, 1997) (1.3). Um Reporterstämmen zu erhalten, die auf externes AI-2 reagieren, ohne durch eigen produziertem beeinflusst zu werden, wurde die Synthese unterbrochen. Wie in Abbildung 1.5 gezeigt, ist der letzte enzymatisch katalysierte Schritt dieser Synthese die Spaltung der Thioesterbindung von S-Ribosylhomocystein zu Homocystein und 2,3-Dihydroxy-2,3-pentandion durch die S-Ribosylhomocystein Lyase LuxS. Die folgenden Schritte erfolgen spontan abhängig von der Verfügbarkeit von Bor (Defoidt *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde in den Reporterstämmen B4394 und B4398 das Gen *luxS* deletiert. Zur Kontrolle wurde dieses auch in dem Wildtypstamm B4390 durchgeführt. Für die Deletion wurde wiederum auf die Red/ET basierte homologe Rekombination zurückgegriffen, da die Selektionsmarker zuvor erfolgreich entfernt worden waren (siehe Abbildung 3.30). Hierfür wurden zu den Regionen 5' und 3' von *luxS* homologe Bereiche an die FRT-PGK-gb2-neo-FRT Kasette kloniert und diese mit Hilfe des pRed/ET in die Stämme B4390, B4394 und B4396 transformiert und integriert. Anschließend erfolgte wiederum die FLP-vermittelte Entfernung der Resistenzkassetten. Die Deletion von *luxS* wurde mit Southern Blot überprüft. Hierzu wurde die isolierte genomische DNS (2.5) mit dem Restriktionsenzym *BstEII* geschnitten, in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit einer PCR-amplifizierten radioaktiv markierten Sonde, die an die Region 5' der deletierten Sequenz band (2.6).

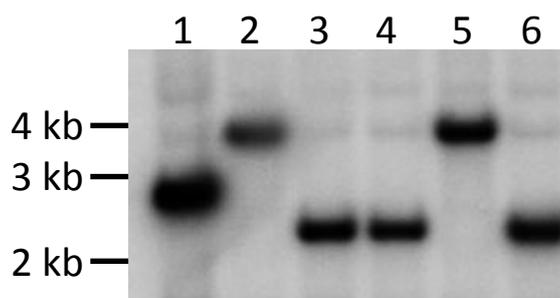


Abbildung 3.31. Southern Blot zur Überprüfung der Deletion von *luxS*. Spur 1: B4390 (Wildtyp), Spur 2: B4395 ( $\Delta luxS$ -FLIP pr(*cynT*)-GFP-FRT), Spur 3+4: B4396 ( $\Delta luxS$ -FRT pr(*cynT*)-GFP-FRT), Spur 5: B4399 ( $\Delta luxS$ -FLIP pr(*rfe*)-GFP-FRT), Spur 6: B4400 ( $\Delta luxS$ -FRT pr(*rfe*)-GFP-FRT). Die Stämme B4391 und B4392 zeigten analoge Bandenmuster.

Es ergab sich eine Bande für den Wildtyp bei 2,9 kb. Nach Integration des Fragmentes zeigte sich eine Bande in Höhe von 4,0 kb, wodurch die Stämme B4391, B4395 und B4399 bestätigt wurden. Die Mutanten B4392, B4396 und B4400 nach Entfernung der Selektionsmarker wurden durch Banden bei 2,4 kb nachgewiesen (Abbildung 3.31).

### 3.2.3 Validierung und Einsetzen der *E. coli* Reporterstämme

Um sicherzustellen, dass sich die erzeugten Stämme in ihrem phänotypischen Verhalten nicht vom Wildtyp unterscheiden, wurden Wachstumskurven aufgenommen und mit dem Wildtyp B4390 verglichen. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den Stämmen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden die Biofilme der Stämme miteinander verglichen. Die Biofilme wurden für 48 h in Mikrotiterplatten angezogen (2.2) und die metabolisch aktiven Zellen mit Hilfe des XTT-Reduktionsassays bestimmt (2.3.2). Wiederum wurde für diesen Vergleich auf XTT ausgewichen, da sich die Fluoreszenzspektren von FDA und TurboGFP überschneiden. Es zeigte sich, dass sich in den Biofilmen der mutierten Stämme vergleichbar viele Zellen befanden wie im Wildtyp B4390, da sich der Umsatz von XTT gering unterschied. Nur der Stamm B4400 bildete um ca. 15% schwächere Biofilme aus (Abbildung 3.32). Dieses stimmt mit Daten aus der Literatur überein, die ebenfalls über keine phänotypischen Auswirkungen einer Deletion von *luxS* berichten (Wang *et al.*, 2005).

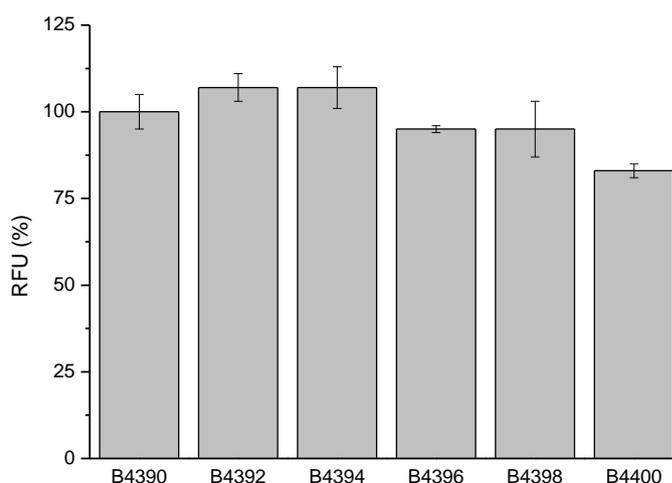


Abbildung 3.32. Vergleich der Biofilme der *E. coli* Stämme. Biofilme wurden in Mikrotiterplatten angezogen und die metabolisch aktiven Zellen mit dem XTT-Reduktionsassay bestimmt, der bei 490 nm ausgelesen wurde. Dargestellt sind auf den Wildtyp B4390 normalisierte Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei im Triplikat gemessenen biologischen Replikaten.

Die so validierten Stämme wurden in Versuche eingesetzt, um zu testen, ob externes AI-2 mit diesen detektiert werden kann. Biofilme der Reporterstämme wurden in Sensoplatten angezogen und die Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit einem Filterpaar von 480 / 525 nm detektiert und mit dem Programm PixelZählen ausgewertet (2.15.1). Zunächst wurde die Entwicklung der Fluoreszenzsignale während der Bildung der Biofilme über 24 h Wachstum verfolgt, um das System

zu validieren. In allen Reporterstämmen nahm die Intensität der Fluoreszenz während der Entwicklung von Biofilmen zu. In den *luxS*-exprimierenden Stämmen B4394 und B4398 waren die Signale vor allem nach 3 h Inkubation erhöht im Vergleich zu den Stämmen B3496 und B4400, welche eine Deletion von *luxS* aufweisen (Abbildung 3.33). Dieses deutet darauf hin, dass die Biofilmentwicklung in Stämmen, die kein AI-2 exprimieren, verlangsamt ist.

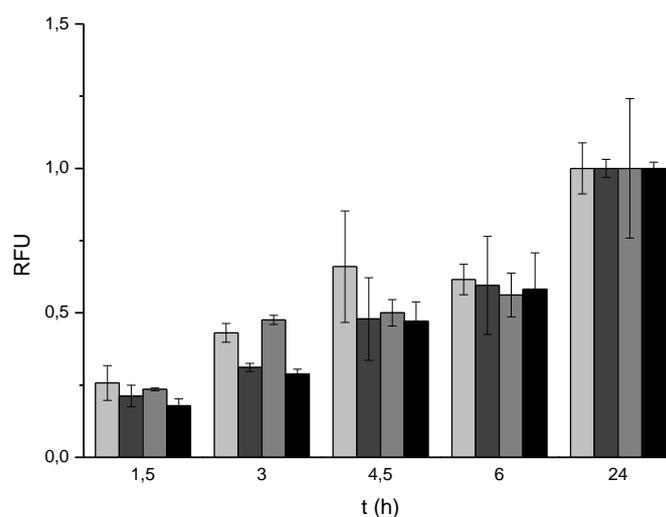


Abbildung 3.33. Entwicklung der Fluoreszenz während der Biofilmbildung der *E. coli* Reporterstämmen B4394 (hellgrau), B4396 (dunkelgrau), B4398 (grau) und B4400 (schwarz). Biofilme wurden in Sensoplatten angezogen, die Fluoreszenzsignale fluorezenzmikroskopisch bei 480 / 525 nm detektiert und mit dem Programm PixelZaehlen ausgewertet. Dargestellt sind jeweils die auf 24 h gewachsene Biofilme normierten Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Replikaten, die jeweils mindestens im Triplikat vermessen wurden.

Nun wurde die Reaktion der Stämme auf externes AI-2 getestet. Da AI-2 kommerziell nicht verfügbar ist, wurde vom Wildtyp B4390 sowie der *luxS* Mutante B4392 als Kontrolle konditioniertes Medium eingesetzt. 24 h gewachsene Biofilme der Reporterstämmen wurden für 60 min mit dem so konditionierten Medium versetzt (2.2). Die Fluoreszenz aller Reporterstämmen wurde durch die Zugabe von konditioniertem Medium induziert. Dieses war unabhängig davon, ob in den Stämmen *luxS* exprimiert wurde und ob AI-2 im Medium vorhanden war. Der Reporterstamm B4394 reagierte stärker auf vom Wildtyp B4390 als von der *luxS*-Mutante B4392 konditioniertes Medium, während sich die Reaktion des  $\Delta luxS$ -Stammes B4396 nicht unterschied (Abbildung 3.34).

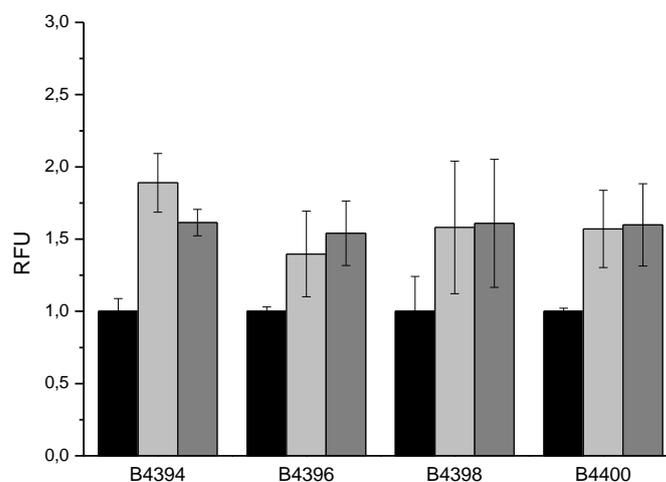


Abbildung 3.34. Reaktion der *E. coli* Reporterstämme auf konditioniertes Medium der Stämme B4390 (Wildtyp, hellgrau) und B4393 ( $\Delta luxS$ , dunkelgrau). Biofilme wurden für 24 h in Sensoplatten inkubiert und anschließend für 60 min mit den konditionierten Medien versetzt. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder dreier im Triplikate gemessener biologischer Replikate, die auf unbehandelte Biofilme (schwarz) normalisiert sind, erfolgte mit dem Programm PixelZählen.

Es konnte gezeigt werden, dass die *E. coli* Reporterstämme auf die Anwesenheit von durch *E. coli* konditioniertem Medium reagieren. Diese Reaktion erfolgt scheinbar unabhängig von AI-2 auf andere Substanzen, die von dem Mikroorganismus sekretiert werden. Da jedoch eine Zunahme der Fluoreszenzintensitäten der Reporterstämme beobachtet wurde, können diese Stämme zur Detektion anderer Mikroorganismen eingesetzt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Verhalten von *C. albicans* und *P. aeruginosa* in gemischten Biofilmen im Vergleich zu reinen Biofilmen

Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass Mikroorganismen planktonisches Wachstum als Einzelzellen bevorzugen, fokussiert die Mikrobiologie heutzutage immer mehr auf die Erforschung von Biofilmen, an Oberflächen adhärierte Populationen von Mikroorganismen, die von einer extrazellulären Matrix umgeben und geschützt sind. Diese Biofilme bestehen meistens jedoch nicht aus einzelnen Spezies, sondern werden vielmehr von verschiedensten Mikroorganismen gebildet, die miteinander kommunizieren, aber auch um Nährstoffe konkurrieren. Die beiden opportunistisch Pathogenen *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa*, die beispielsweise aus Lungen an Mukoviszidose erkrankter Patienten und Brandwunden co-isoliert werden (Bakare *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005; Valenza *et al.*, 2008), interagieren in Biofilmen eher antagonistisch, wie von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt (Bandara *et al.*, 2010; De Sordi & Muhlschlegel, 2009; El-Azizi *et al.*, 2004; Hogan & Kolter, 2002; Hogan *et al.*, 2004). Vergleicht man Reinkultur-Biofilme von *C. albicans* und *P. aeruginosa* mit gemischten Biofilmen aus diesen beiden Spezies visuell, scheinen beide Organismen bevorzugt mehrlagige voneinander unabhängige Biofilme zu bilden, nur an den Grenzflächen zwischen diesen sind von *P. aeruginosa* bedeckte *C. albicans* Hefen und Hyphen zu sehen. Diese Ausbildung gemischter Biofilme ist unabhängig von Wachstumsbedingungen, verwendeten *P. aeruginosa* Stämmen und findet auch statt, wenn die Mikroorganismen auf bereits ausgebildete Zellschichten gegeben wurden. Im Einklang mit früheren Untersuchungen der Interaktionen, die von einer Unterdrückung der Filamentation durch *P. aeruginosa* berichten (Hogan & Kolter, 2002), sind in Co-Kultur jedoch mehr Hefezellen vorhanden, während in einzelnen Biofilmen die Hyphenform überwiegt (3.1.1). In dem hier verwendeten Versuchsaufbau werden Biofilme ausschließlich von den nach 90 min Inkubationszeit adhärierenden Zellen gebildet. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte auf Unterschiede in der Anzahl adhärierender Zellen zurückzuführen ist, die in Co-Kultur um vorhandene Bindungsstellen konkurrieren. Mit Hilfe markierter *P. aeruginosa* Zellen und Messungen der metabolischen Aktivität von *C. albicans* konnte jedoch gezeigt werden, dass Mono- und Cokultur-Biofilme aus einer vergleichbaren Anzahl von Zellen gebildet werden (3.1.4). Unter Verwendung anderer Stämme und Wachstumsbedingungen wurde eine signifikante Reduktion an adhärenzformenden Einheiten beider Spezies berichtet. Im Vergleich zu den einzelnen Biofilmen wurde dieser Effekt auch zu späteren Zeitpunkten beobachtet (Bandara *et al.*, 2010; El-Azizi *et al.*, 2004). Da diese

drastischen Änderungen der Zellzahlen mikroskopisch nicht nachvollziehbar waren und auch keine Zelltrümmer sichtbar waren, wurde die metabolische Aktivität von *C. albicans* während der Biofilmreifung verfolgt, um die Auswirkungen von *P. aeruginosa* auf den Metabolismus des Pilzes zu untersuchen. Im Vergleich mit den reinen Pilz-Biofilmen nahm die *C. albicans* Population an metabolisch aktiven Zellen in gemischten Biofilmen dramatisch ab (3.1.4), was die Beobachtungen aus der Literatur bestätigte.

## 4.2 Auswirkungen der Quorum sensing Moleküle auf Monospezies-Biofilme

An diesen Interaktionen zwischen *C. albicans* und *P. aeruginosa* sind die für die Biofilmformation wichtigen Quorum sensing Moleküle Farnesol sowie 3OC12HSL beteiligt (3.1.3). Mit Hilfe eines *in vitro* Assays konnte gezeigt werden, dass 3OC12HSL die für die Biofilmbildung essentielle Phase der Adhäsion von *C. albicans* wenig beeinflusst, jedoch auf bestehende Biofilme vergleichbar starke Auswirkungen wie Farnesol hat. In früheren Studien wurde berichtet, dass Farnesol (Ramage *et al.*, 2002a) wie auch 3OC12HSL (Hogan *et al.*, 2004) die Filamentierung verhindern, was wiederum für die Ausbildung differenzierter Biofilme essentiell ist. Umso erstaunlicher ist es, dass das von *P. aeruginosa* produzierte Signalmolekül je nach Entwicklungszustand der *C. albicans* Biofilme gegenteilige Effekte auslöst, die nicht mit denen durch exogen zugegebenes Farnesol hervorgerufenen übereinstimmen. Dieses wurde auch durch unterschiedliche Auswirkungen auf Biofilme einer Mutante der Histidinkinase Chk1 belegt, welche für die Weiterleitung des Signals Farnesol verantwortlich ist (Kruppa *et al.*, 2004). 3OC12HSL beeinflusst die Biofilmbildung von *C. albicans* über einen anderen Signalweg als Farnesol, was sich vor allem auf bereits gebildete Biofilme auswirkt (3.1.3). Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe von 3OC12HSL und Farnesol zu etablierten Biofilmen von *P. aeruginosa* eine Vermehrung der metabolischen Aktivität. Während 3OC12HSL auf die initiale Adhäsion kaum Einfluss hatte, bewirkte Farnesol eine Reduktion des Biofilms. Dieses ist wahrscheinlich auf Unterschieden im Adhäsionsverhalten in der Anwesenheit von Farnesol zurückzuführen, da beide Signale über den Transkriptionsregulator LasR (Pearson *et al.*, 1994) wirken, was unter Verwendung einer *lasR* Mutante gezeigt wurde (3.1.3). Aufgrund der Ähnlichkeiten in der chemischen Struktur der beiden Substanzen Farnesol und 3OC12HSL wurde eine analoge Wirkungsweise synthetischer Komponenten mit einem Gerüst aus 12 Kohlenstoffatomen postuliert und gezeigt, dass Dodecanol wie Farnesol und 3OC12HSL die Filamentation von *C. albicans* verhindert (Hogan *et al.*, 2004). Dodecanol reduziert nicht nur die Hyphenausbildung sondern auch Biofilme von *C. albicans*, indem es sowohl die Adhäsion, als auch bereits etablierte Biofilme minimiert. Auf 24 h

gewachsene Biofilme von *P. aeruginosa* hat es wie Farnesol und 3OC12HSL eine verstärkende Wirkung, während es auch in diesem Organismus die Adhäsion beeinflusst (3.1.3). Dodecanol hat jedoch keinerlei Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von *C. albicans* und *P. aeruginosa*, was eine Quorum sensing Molekül ähnliche Wirkung bestätigt.

Die Quorum sensing Moleküle 3OC12HSL und Farnesol sind an der Formation gemischter Biofilme und den Auswirkungen auf die Veränderungen von *C. albicans* und *P. aeruginosa* beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass 3OC12HSL 24 h gewachsene Biofilme des Pilzes unterdrückt, während Farnesol die Reifung bakterieller Biofilme induziert. Die metabolische Aktivität von *C. albicans* wird sowohl durch die Anwesenheit von *P. aeruginosa* in gemischten Biofilmen als auch von 3OC12HSL vermindert.

### 4.3 Online Beobachtung von Biofilmen

Um die Interaktionen zwischen *C. albicans* und *P. aeruginosa* weiter zu untersuchen, wurden Reporterstämme in diesen Organismen hergestellt. Mit Hilfe dieser Stämme kann die Bildung von Biofilmen in zukünftigen Arbeiten über deren Entwicklung hinweg online verfolgt werden sowie Einflüsse auf die Ausbildung von Biofilmen und bereits etablierte Biofilme visualisiert werden. Um das Spektrum an detektierbaren Quorum sensing Molekülen zu erweitern, wurden weiterhin Reporterstämme in *E. coli* entwickelt.

#### 4.3.1 Detektion von *C. albicans* und *P. aeruginosa* anhand der produzierten Quorum sensing Moleküle

Die während der Bildung von Biofilmen durch die Quorum sensing Moleküle regulierten Änderungen der Genexpression wurden verwendet, um Reporterstämme zu erstellen, die spezifisch in Biofilmen Signale liefern (3.1.7). Durch den Austausch je eines Allels des Adhäsins *ALS1* (orf19.5741), der Sulfurylase *MET3* (orf19.5025) sowie der Alkoholdehydrogenase *ADH7* (orf19.5517) durch das grün fluoreszierende *yEGFP* wurden in *C. albicans* Stämme erzeugt, die das Reporter-gen fluoreszenzphotometrisch und fluoreszenzmikroskopisch detektierbar während des Biofilmwachstums exprimieren (3.1.7.4). Dieses stimmt mit den durch Transkriptionsanalysen ermittelten differentiellen Expressionsmustern in Biofilmen überein (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2005; Yeater *et al.*, 2007). Das Adhäsin Als1 gehört zur Familie der GPI-verankerten ALS-Proteine, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind und an Zelladhäsion sowie dem Anhaften an der Wirtsoberfläche involviert sind. Als1 ist an der

Pathogenese beteiligt und wird während der Bildung von Hyphen sowie in Biofilmen verstärkt exprimiert (Hoyer *et al.*, 2008). Als1 wird von *C. albicans* während der Biofilmbildung ständig sekretiert und wurde differentiell reguliert im Sekretom identifiziert (3.1.5). In Anwesenheit von *P. aeruginosa* ändert sich das Sekretionsmuster, was auf Veränderungen in der Expressionsrate zurückzuführen ist (Holcombe *et al.*, 2010). Die ATP-Schwefellyase Met3 dagegen ist am Schwefelmetabolismus beteiligt, da es die Sulfataufnahme in die Zellen aktiviert. Die Expression von *MET3* wird durch Methionin und Cystein inhibiert, dieses gilt jedoch nicht in Biofilmen, in denen es verstärkt gebildet wird (Murillo *et al.*, 2005). Es wurde postuliert, dass Gene des Schwefelmetabolismus in Biofilmen induziert werden, da das Zwischenprodukt SAM an Zellwand-Restrukturierungen beteiligt ist, die für die Ausbildung differenzierter Biofilme wichtig sind (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004). Die Oxidoreduktase *ADH7*, die Homologien zu Alkoholdehydrogenasen aufweist, wird in Biofilmen verstärkt exprimiert (Murillo *et al.*, 2005), was auf die Anwesenheit von Farnesol im Medium zurückzuführen ist (Enjalbert & Whiteway, 2005; Rossignol *et al.*, 2007). Außerdem wird die Expressionsrate durch Überstände von *P. aeruginosa* induziert (Holcombe *et al.*, 2010).

Analog wurden in *P. aeruginosa* Reporterstämme konstruiert, die das rot fluoreszierende *TurboFP602* unter Kontrolle der Promotoren des Lipoprotein-bindenden Proteins *rahU* (PA0122), des alkalischen Proteinaseinhibitors *aprI* (PA1250) und des Transkriptionsregulators *ampR* (PA4109) beinhalten. Auch diese Signale werden in Biofilmen verstärkt und können photometrisch und mikroskopisch detektiert werden (3.1.7.8), was mit früheren Analysen von Biofilm-Transkriptionsprofilen übereinstimmt (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Waite *et al.*, 2006). Das Lipoprotein-bindende Protein RahU ist sowohl an Modulationen der bakteriellen Physiologie wie auch an denen des Immunsystems des Wirtes beteiligt und wird abhängig von diesen und der Wachstumsphase produziert, was zu Änderungen in der Ausbildung von Biofilmen führt (Rao *et al.*, 2011). Dieses scheint über Quorum sensing reguliert zu werden, da im Promotorbereich eine *las* Box identifiziert wurde (Schuster *et al.*, 2003). RahU wurde während der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* sowie in gemischten Biofilmen im Sekretom detektiert (3.1.5). Der Proteinaseinhibitor AprI wird auf klassischem Weg sekretiert und ist an der Quorum sensing-regulierten Biofilmbildung beteiligt (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Dagegen beeinflusst der globale Transkriptionsregulator AmpR die Expression verschiedener Virulenzfaktoren sowie das Quorum sensing mittels *lasI* und *lasR* (Kong *et al.*, 2005). Nachdem in Vorversuchen gefunden wurde, dass die Expression von *ampR* in Biofilmen induziert wird (3.1.7.6), wurde diese Regulation durch Integration des Reportergens genutzt.

Die Reporterstämme von *C. albicans* und *P. aeruginosa* reagieren auf die Zugabe von Überständen *P. aeruginosa* und *C. albicans* Kulturen durch vermehrte Expression von

*yEGFP* bzw. *TurboFP602* (3.1.7.5, 3.1.7.9). Dieses bestätigt die durch *P. aeruginosa* ausgelösten veränderten Expressionsraten von *ALS1* und *ADH7*, die auf Transkriptebene gefunden wurden (Holcombe *et al.*, 2010) und sich in der Sekretion von Als1 manifestieren (3.1.5). Dagegen haben von *P. fluorescens* und *S. cerevisiae* konditionierte Medien schwächere Auswirkungen. Dieses bestätigt, dass die in gemischten Biofilmen beobachteten Reaktionen von *C. albicans* und *P. aeruginosa* spezifisch sind und mit der Anwesenheit der Quorum sensing Moleküle zusammenhängen, da *P. fluorescens* keine HSL produziert und in *S. cerevisiae* die Produktion von Farnesol nicht nachgewiesen wurde. Die Wirkung der Quorum sensing Moleküle allein auf die Reporterstämme konnte aufgrund der autofluoreszierenden Eigenschaften der Moleküle nicht detektiert werden. Die Reporterstämme von *C. albicans* und *P. aeruginosa* können für den Nachweis von Quorum sensing Molekülen eingesetzt werden und zeigen die Formation von Biofilmen sowie Veränderungen dieser an.

#### **4.3.2 Nachweis von AI-2 produzierenden Mikroorganismen unter Verwendung von *E. coli***

Mit dem nicht pathogenen *Escherichia coli*, welcher der Sicherheitsstufe 1 unterliegt, wurden Reporterstämme hergestellt, mit denen AI-2 produzierende Mikroorganismen detektiert werden können (3.2). Das Reporter-gen *TurboGFP* wurde, reguliert von den Promotoren des Operons b3784 – b3794, welches Enzyme der *enterobacterial common antigen* (ECA) Biosynthese codiert, sowie des Cyanat-Katabolismus Operons b0339 – b0341, verstärkt in Biofilmen exprimiert. Dieses stimmt mit Daten von Transkriptionsanalysen aus Biofilmen überein (Domka *et al.*, 2007; Junker *et al.*, 2006). Der Stamm B4394, welcher *TurboGFP* unter Kontrolle des b3784 – b3794 Promotors trägt, zeigt im Vergleich zum Stamm B4398 vor allem in 6 h gewachsenen Biofilmen erhöhte Fluoreszenzsignale. Das ECA ist ein Glykolipid auf der Außenseite der äußeren Membran, welches an Adhärenz und Kolonisation der Zellen an Oberflächen beteiligt ist und folglich zu Beginn der Biofilmbildung exprimiert wird (Huang *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 1988). Das Operon b0339 – b0341 dagegen wird durch Cyanat induziert, welches durch die Cyanase CynT und die Carboanhydrase CynS zu Ammoniak und Hydrogencarbonat umgesetzt wird (Kozliak *et al.*, 1994). Das Zellgift Cyanat kann als Nebenprodukt durch Nährstoffmangel induzierter Stoffwechselwege entstehen, welcher im Inneren von Biofilmen herrscht (Morris & Koffron, 1967). Um sicherzustellen, dass externes AI-2 detektiert wird, wurde zusätzlich die S-Ribosylhomocystein Lyase *luxS* in den Stämmen deletiert, welche den letzten enzymatisch katalysierten Schritt in der AI-2 Biosynthese darstellt (Defoirdt *et al.*, 2007). In diesen Stämmen zeigte sich, dass die Expression von *TurboGFP* im Vergleich zu den Stämmen mit Wildtyp-Hintergrund verspätet erfolgt, was auf Änderungen in der Regulation der Biofilmbildung deutet. Wurden die Stämme von *E. coli* konditioniertem Medium ausgesetzt, erhöhten sich die

Fluoreszenzsignale. Somit kann mit Hilfe dieser Reporter die Anwesenheit von *E. coli* nachgewiesen werden. Da jedoch ähnliche Reaktionen auf wildtypische AI-2 enthaltene Medien wie auf Medien der Deletionsmutante B4392 erfolgten, sollte überprüft werden, ob in den Stämmen kein AI-2 produziert wird. Für diesen Zweck wird in der Literatur der *Vibrio harveyi* Stamm BB170 verwendet (Bassler *et al.*, 1997). Es wurde berichtet, dass AI-2 LuxS-unabhängig spontan aus Ribulose-5-phosphat gebildet werden kann (Tavender *et al.*, 2008), was jedoch in anderen  $\Delta luxS$ -Stämmen nicht nachgewiesen wurde (Sperandio *et al.*, 2001). Weiterhin sollte die Reaktion der Stämme auf artifizielles AI-2 getestet werden, das jedoch kommerziell nicht verfügbar ist.

#### **4.4 Weitere Interaktionen zwischen *C. albicans* und *P. aeruginosa***

Um weitere Einblicke zu bekommen, wie die Bildung von Biofilmen von *C. albicans* und *P. aeruginosa* durch die Anwesenheit des anderen beeinflusst werden, wurde das Sekretom individueller und gemischter Biofilme analysiert (3.1.5). Es wurden erhebliche Unterschiede sowohl in der Anzahl als auch in der Identität der ins Medium sekretierten Proteine gefunden. Nur 39 der 131 in gemischten Biofilmen identifizierten Proteine konnten *C. albicans* zugeordnet werden, während die restlichen 92 zu *P. aeruginosa* gehörten. Außerdem wurden nur 4 *C. albicans* ausschließlich in Präsenz von *P. aeruginosa* gefunden, wohingegen *P. aeruginosa* 16 Proteine in signifikant größerer Menge oder zusätzlich bei Wahrnehmung des Pilzes sekretierte. In Monospezies-Biofilmen wurde von beiden Organismen eine größere Diversität an Proteinen abgegeben, 73 Proteine sekretierte *C. albicans* während der analysierten Zeit, *P. aeruginosa* 154. Allein diese Zahlen deuten darauf hin, dass beide Mikroorganismen mit Änderungen von Charakter und Anzahl der freigesetzten Proteine aufeinander reagieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* in gemischten Biofilmen im Vergleich zu reinen Biofilmen den Stoffwechsel herabsetzt, während *P. aeruginosa* die Produktion spezifischer Proteine initiiert, um den Pilz zu beherrschen. Dieses wurde sowohl anhand der metabolischen Aktivität des Pilzes als auch durch die Gesamtzahl der Proteine gezeigt.

In einzelnen und gemischten Biofilmen wurden Proteine ohne Sekretionsdomäne sowie Zellwand-Proteine bemerkt, die nicht im Sekretom zu erwarten sind. Es wurden jedoch vor kurzem sowohl eukaryotische als auch prokaryotische *moonlighting* Proteine beschrieben, die mehrere Bestimmungsorte in der Zelle haben (Henderson & Martin, 2011). Weiterhin werden unterschiedliche Transportprozesse zu unkonventionellen Sekretionsmechanismen diskutiert, wie Autophagie oder spezifische

Transporter. Es könnte jedoch auch Zellyse zu der Anwesenheit der cytosolischen Proteine außerhalb der Zellen beitragen, was im Folgenden genauer diskutiert wird.

Für *C. albicans* wurde der größere Anteil der Proteine in Monospezies-Biofilmen identifiziert. Im Sekretom wurden unter anderem GPI verankerte Proteine gefunden, die durch unvollständige Verankerung oder Abrieb von der Zellwand gelöst werden könnten. Vor allem die ALS- (*agglutin-like sequence*) Familie spielt in der Biofilmbildung von *C. albicans* eine wichtige Rolle, aber auch an Interaktionen von *C. albicans* mit Bakterien (Klotz *et al.*, 2007; Silverman *et al.*, 2010). Im Sekretom der *C. albicans* Biofilme wurden von Als1 (orf19.5741), Als2 (orf19.1097) und Als3 (orf19.1816) stammende Peptide in unterschiedlicher Anzahl zu den verschiedenen Zeitpunkten gefunden. Als3 ist für Adhäsion und Biofilmbildung wichtig. Die Transkription von *ALS3* wird während der initialen Adhäsion mehr als 10-fach erhöht und in reifenden 48 h gewachsenen Biofilmen reprimiert (Nailis *et al.*, 2009). Dieses stimmt überein mit der über die Zeit beobachteten Zunahme der zu Als3 gehörenden sekretierten Peptide. Diese Zunahme könnte auf die Stabilität des Proteins hindeuten, was mit dessen strukturellen Funktion kompatibel ist (Tabelle 3.3). Auch *ALS1* wird in Biofilmen exprimiert (Nailis *et al.*, 2009) und gehörte zu den Proteinen, die zu allen Zeitpunkten in größeren Mengen im Sekretom vorhanden waren (Tabelle 3.3). Auch in gemischten Biofilmen waren beide ALS Proteine mit mehreren Peptiden vertreten. Zu späteren Reifestadien der gemischten Biofilme nahmen die Peptidzahlen jedoch ab, was mit der generellen Reduktion des Metabolismus von *C. albicans* zusammenhängt. In Transkriptionsanalysen, in denen die Auswirkungen von *P. aeruginosa* Überständen auf frühe Stadien der *C. albicans* Biofilmbildung (6 h) untersucht wurden, wurde ebenfalls eine Reduktion der Expression der ALS Gene berichtet (Holcombe *et al.*, 2010). Andere Proteine mit Adhäsion-ähnlichen Funktionen, wie Als4 (orf19.4555), der auch an Adhäsion und Cohäsion beteiligte Pheromon-induzierte Biofilmregulator Pbr1 (orf19.6274) oder Sim1 (orf19.5032) wurden in *C. albicans* Biofilmen identifiziert, jedoch nicht in gemischten Biofilmen. Die Regulation von Als1 in Biofilmen wurde für die Herstellung eines Reporterstammes in *C. albicans* genutzt, der spezifisch diesen Wachstumsmodus anzeigt. Aufgrund der veränderten Expression sowie Sekretion in Anwesenheit von *P. aeruginosa* kann dieser außerdem zur Detektion des Bakteriums verwendet werden (3.1.7).

Weiterhin wurden an der Morphogenese beteiligte Proteine, wie Pga45 (orf19.2451), Pir1 (orf19.220), Ece1 (orf19.3374) und die RBT Proteine Rbt4 (orf19.6202) und Rbt5 (orf19.5636) in reinen Biofilmen durch mehr Peptide vertreten gefunden als in gemischten. Es wurde zuvor gezeigt, dass die Transkription Morphologie-verwandter Gene wie *RBT4* und *RBT5* durch *P. aeruginosa* beeinflusst wird, was mit unseren Daten übereinstimmt (Holcombe *et al.*, 2010). Während des Wachstums in gemischten

Biofilmen mit *P. aeruginosa* verändert *C. albicans* nicht nur die Expression der Adhäsine, sondern die Zellwandzusammensetzung insgesamt. Dieses bestätigt auch auf Proteinebene, dass der morphologische Wandel von *C. albicans* durch die Anwesenheit von *P. aeruginosa* betroffen ist.

Gleichermaßen wurden in *P. aeruginosa* Biofilmen einige Proteine identifiziert, von denen schon zuvor eine Beteiligung an Biofilmformation und Adhäsion berichtet wurde. Beispielsweise sind Flagellen und die *twitching* Motilität für die Bildung von Biofilmen notwendig (O'Toole & Kolter, 1998b). So wurden Proteine im Sekretom in zunehmender Menge gefunden, die Flagellen (Pa1086 FliK, PA1087 FlgL, PA1092 FliC, PA1094 FliD) oder Typ IV Pili (Pa4525 Pila und PA4554 PilY1) zugeordnet werden. Typ IV Pili sind an der *twitching* Motilität und der Adhärenz an eukaryotische Zellen beteiligt. Außerdem sind Mutanten mit Defekten in *pilY1* nicht in der Lage, Biofilme zu bilden. Gene der Pili- und Flagellensynthese werden in reifen Biofilmen im Vergleich zum planktonischen Wachstum gehemmt (Whiteley *et al.*, 2001). In Anwesenheit von *C. albicans* gibt *P. aeruginosa* Proteine für Flagellen und Pili in geringeren Mengen ins Medium ab, was aus der Anzahl der diesen Proteinen zuordenbaren Peptide geschlossen werden kann. Somit scheinen Flagellen und Pili keine Vorteile in gemischten Biofilmen zu gewähren.

In *P. aeruginosa* Biofilmen wurden auch zytosolische Proteine der Protein- und Aminosäurebiosynthese identifiziert. Das Vorhandensein dieser zytosolischen Proteine könnte mit der in Biofilmen nachgewiesenen Zelllyse zusammenhängen, die durch Prophagen vermittelt wird. Diese trägt zur Hohlrumbaueung innerhalb von Mikrokolonien bei, die Differenzierung und Dispersionen von Unterpopulationen fördert (Webb *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass der filamentöse Prophage vom Pf1-Typ, der im *P. aeruginosa* Genom vorhanden ist, in die Zelllyse in Biofilmen involviert ist (Rice *et al.*, 2009; Webb *et al.*, 2003). Es wird jedoch die Beteiligung weiterer Faktoren an der Zelllyse diskutiert, beispielsweise andere Bakteriophagen (Rice & Bayles, 2008). In der Sekretomanalyse wurden Proteine mit Homologien zu Proteinen der Phagen Phi CTX (PA0620) und PS17 (PA0622 und PA0623) identifiziert, die mit dem Bakteriocin R2 Pyocin zusammenhängen (Michel-Briand & Baysse, 2002). Diese Proteine wurden im Vergleich zu gemischten Biofilmen vermehrt in 24 h und 48 h gewachsenen *P. aeruginosa* Biofilmen detektiert, gemeinsam mit mehr Peptiden zytosolischer Proteine, wie von ArcB (PA5172). Pyocine werden von *P. aeruginosa* Biofilmen unter anaeroben Bedingungen produziert (Waite & Curtis, 2009). Entgegen der allgemeinen Annahme, dass Mikroorganismen gegen ihre eigenen Bacteriocine unempfindlich sind, wurden gegenteilige Effekte für das *P. aeruginosa* Pyocin beobachtet, welches mit Autolyse zusammenzuhängen scheint (Chang *et al.*, 2005; Goodwin *et al.*, 1972). In gemischten Biofilmen wurden signifikant weniger Pyocin zuordenbare Peptide

gefunden wie auch weniger zytosolische Proteine, die in zentrale metabolische Aktivitäten involviert sind, wie z. B. ribosomale Proteine. Dieses deutet darauf hin, dass die Prophagen-vermittelte Zellyse von *P. aeruginosa* in gemischten Biofilmen mit *C. albicans* eher unterdrückt als induziert wird.

In gemischten Biofilmen war eine auffallende Beobachtung, dass die Überstände im Vergleich zu den einzelnen Biofilmen eine gelbliche Farbe annahmen. Diese gelbliche Substanz konnte mit Hilfe von MS und photometrischen Messungen als das für *Pseudomonas* spezifische Siderophor Pyoverdin identifiziert werden. In *P. aeruginosa* wirkt Pyoverdin als hochaffines Eisenakquisitionssystem, das unter Eisenmangel synthetisiert und sekretiert wird (Cox & Adams, 1985). Die Biofilme wurden in eisenhaltigem Medium gezogen (200 µg / l) und in den Einzelspezies-Biofilmen von *C. albicans* und *P. aeruginosa* wurden keinerlei Hinweise auf Eisenlimitierung gefunden. Nur in Co-Kultur mit *C. albicans* gab *P. aeruginosa* das mit Virulenz assoziierte Siderophor Pyoverdin in die Umgebung ab, was auf eine Eisenlimitierung hindeutet, die wahrscheinlich durch den verstärkten Verbrauch durch die beiden Organismen bedingt ist. Dieses wurde durch Zugabe von zusätzlichem Eisen (10 mM FeCl<sub>3</sub>) zum Medium bestätigt, was zu keinerlei Produktion von Pyoverdin führte. Einen weiteren Hinweis auf die Induktion des Pyoverdin-Systems lieferte die Identifizierung des Ferripyoverdin Rezeptors FpvA (PA2398) in gemischten Biofilmen, der für den Transport des Ferripyoverdin-Komplexes (Fe<sup>3+</sup> mit Pyoverdin komplexiert) in die Bakterienzelle notwendig ist (Poole *et al.*, 1993). Ein funktionelles Pyoverdin-System ist für die Biofilmreifung unter Eisenlimitierung notwendig (Banin *et al.*, 2005). Außerdem wurde PchD (PA4228), ein Protein der Pyochelin-Biosynthese in 90 min gewachsenen gemischten Biofilmen identifiziert. Pyochelin ist ein weiteres Siderophor mit geringerer Affinität zu Eisen (Cox & Graham, 1979). Die beiden Proteine waren durch je ein Peptid repräsentiert, das den MASCOT Kriterien entsprach und deren entsprechenden PSD Daten manuell überprüft wurden. Das Häm-Akquisition-Protein HasAp (PA3407), das mit zunehmenden Peptidzahlen in gemischten Biofilmen identifiziert wurde, lieferte einen weiteren Beweis für die Eisenmangelbedingungen. Die Expression dieses Hämophors wird wiederum unter Eisenlimitierung induziert und durch einen ABC Transporter sekretiert. *P. aeruginosa* kann Häm und Hämoglobin durch die Bindung an HasAp als Eisenquelle nutzen (Letoffe *et al.*, 1998). Zwei hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion, PA2451 und PA2452, wurden im Sekretom gemischter Biofilme mit über die Zeit zunehmenden Peptidzahlen identifiziert (Tabelle 3.4). Die Proteine sind laut DOOR Vorhersagen in einem Operon angeordnet (Mao *et al.*, 2009). Obwohl nur PA2452 eine postulierte Sekretionsdomäne beinhaltet, scheint die Sekretion des anderen Proteins ähnlich reguliert zu erfolgen. Homologievergleiche identifizierten Domänen ähnlich zu Enterobaktin und Eisen-Enterobaktin Esterasen (Winsor *et al.*, 2011). Enterobaktin wirkt in Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* als ein weiteres

Siderophor, das von *P. aeruginosa* als Eisenquelle genutzt werden kann (Ghysels *et al.*, 2005).

Die Produktion der wichtigen Virulenzfaktoren Exotoxin A ToxA und der Proteasen PrpL und AprA werden ebenfalls über den Pyoverdin-abhängigen Signaltransduktionsweg unter Eisenmangelbedingungen induziert (Lamont *et al.*, 2002). Folglich wurde die Sekretion von Exotoxin A ToxA (PA1148) beginnend nach 6 h Wachstum im gemischten Biofilm nachgewiesen und war nach 48 h mit 22 Peptiden vertreten. In dem rein bakteriellen Biofilm wurde nur ein ToxA zugeordnetes Peptid gefunden. Exotoxin A ist ein wichtiger von *P. aeruginosa* produzierter Virulenzfaktor, der für lokale Gewebeschäden, bakterieller Invasion und Immunsuppression innerhalb des eukaryotischen Wirtes verantwortlich ist. Vorläufer von AprA (PA1249) wurden ebenfalls im Sekretom identifiziert.

Die massive Induktion der Eisenakquisitionssysteme von *P. aeruginosa* führte zu einer drastischen Reduktion des *C. albicans* Metabolismus, was mit Hilfe des XTT Assays gezeigt wurde. Obwohl *C. albicans* von anderen Organismen produzierte Siderophore verwerten kann (Heymann *et al.*, 2002), findet dieses hier nicht statt. Im Gegenteil, in Anwesenheit von *P. aeruginosa* erfolgte eine generelle Abnahme der Anzahl von Peptiden und identifizierten Proteinen. Die metabolische Aktivität von *C. albicans* war in gemischten Biofilmen im Vergleich zu reinen Pilzbiofilmen schon zu Beginn reduziert und nahm nach 24 h um mehr als 80% ab, während in Monospezies Biofilmen noch über 50% der Anfangsaktivität nachgewiesen wurde. Dieser Effekt könnte sogar noch verstärkt sein, da die Aktivität der *C. albicans* XTT-Reduktase unter Bedingungen mit wenig Eisen verglichen mit Eisensättigung induziert ist (Knight & Dancis, 2006). Die reduzierte metabolische Aktivität von *C. albicans* ist jedoch nicht auf eine von *P. aeruginosa* verursachte Zellyse zurückzuführen, da in gemischten Biofilmen nicht mehr zytosolische Proteine detektiert wurden. Dieses deutet darauf hin, dass zumindest die Zellintegrität während der betrachteten Zeit nicht beeinträchtigt ist. Weiterhin waren in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemischter Biofilme keine Zelltrümmer sichtbar (Abbildung 3.2). Weitere Studien von Co-Kulturen mit anderen Laborstämmen und Wachstumsbedingungen beschrieben dagegen tote und lysierte *C. albicans* Zellen (Hogan & Kolter, 2002), was mit der hier berichteten Dominanz von *P. aeruginosa* über *C. albicans* übereinstimmt.

Die über die Zeit reduzierte XTT-Aktivität wird von einer verminderten Expression fast aller in gemischten Biofilmen identifizierter Proteine begleitet, unter anderem die der GPI verankerten Zelloberflächenproteine der Hämoglobin-Rezeptor-Familie, die in die Eisenverwertung aus Hämin und Hämoglobin involviert ist. Obwohl Peptide, die dieser Familie zugeordnet werden, nämlich Rbt5 (orf19.5636), Pga10 (orf19.5674), Csa1 (orf19.7114) und Csa2 (orf19.3117), sowohl in einzelnen als auch gemischten Biofilmen

gefunden wurden, waren diese in den gemischten Proben sehr viel geringer vertreten. Dieses deutet auf einen großen Einfluss von *P. aeruginosa* hin, der vermutlich auf die Reduktion des Eisens auf eine Konzentration unterhalb des Levels, das für die Induktion dieser Proteine und der generellen Aufrechterhaltung des Metabolismus erforderlich ist, zurückzuführen ist.

*P. aeruginosa* kann das Wachstum anderer Mikroorganismen effizient unterbinden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Überstände von Co-Kulturen von *P. aeruginosa* und *Aeromonas hydrophila* Rhamnolipide und die Siderophore Pyoverdin und Pyocyanin enthalten, die zu einer Inaktivierung von *A. hydrophila* führen (Jagmann *et al.*, 2010). Weiterhin wurde berichtet, dass eine Kombination von Pyocyanin und 1-Hydroxyphenazin das Wachstum sowie die Hefe-Hyphen-Transformation von *C. albicans* und *Aspergillus fumigatus* unterbindet (Kerr *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass *C. albicans* und *P. aeruginosa* in Biofilmen antagonistisch miteinander agieren. Dieses wird auf der einen Seite durch die Quorum sensing Moleküle vermittelt. Während 3OC12HSL, das für Biofilmbildung von *P. aeruginosa* hauptregulatorische Molekül, zu einer Verringerung von *C. albicans* Biofilmen führt, wirkt der Pilz-Autoinducer Farnesol zwar adhäsionsvermindernd jedoch zu späteren Zeitpunkten biofilminduzierend auf *P. aeruginosa*. Ein wesentlicher weiterer Mechanismus der antagonistischen Interaktion konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. *P. aeruginosa* reagiert auf die Anwesenheit von *C. albicans* mit der Induktion von Eisenakquisitionssystemen. Einerseits synthetisiert es die Siderophore Pyoverdin und Pyochelin, um Eisenionen zu binden und die Verfügbarkeit des essentiellen Metalls für den Pilz zu unterbinden. Andererseits induziert das Bakterium Enzyme, die für die Nutzung des an Chelatoren gebundenen Eisens verantwortlich sind, die, wie Hämoglobin, vom Wirt oder, wie Enterobaktin, von potentiell konkurrierenden Mikroorganismen verwendet werden. Zusätzlich verstärkt es die Expression von Virulenzfaktoren wie Exotoxin A. In anderen Studien wurde auch die Präsenz von antimikrobiellen Substanzen wie Phenazin-Derivaten berichtet, die effizient das Wachstum der mikrobiellen Konkurrenten blockieren (Morales *et al.*, 2010). *C. albicans* scheint diesen Angriffen nicht effektiv entgegenwirken zu können, was zu einer generellen Reduzierung des Metabolismus bis hin zum Zelltod führt, wie von anderen berichtet (Hogan & Kolter, 2002). Somit ist *P. aeruginosa* in der Lage, durch eine Kombination verschiedener Mittel, inklusive der Ausschüttung antimikrobieller Substanzen und der Beschlagnahme von Eisen, über *C. albicans* die Oberhand zu gewinnen. Diese Arbeit bestätigt, dass Mikroorganismen nicht nur mit dem Wirt um essentielle Nährstoffe konkurrieren, sondern auch mit der vorhandenen Mikroflora.

Die Änderungen der Transkriptionsprofile in Biofilmen wurden genutzt, um in *C. albicans*, *P. aeruginosa* und *E. coli* Reporterstämme herzustellen, die das Reporter-gen in Biofilmen exprimieren und somit eine fluoreszenzbasierte Detektion dieses Wachstumsmodus erlauben. Mit Hilfe dieser Stämme kann eine Regulation der Biofilme und die Anwesenheit anderer Mikroorganismen über die Quorum sensing Moleküle detektiert werden. Weiterhin wurde ein einfach und schnell durchzuführender *in vitro* Assay etabliert, mit dessen Hilfe die Einflüsse von Substanzen oder Mikroorganismen auf die Ausprägung von Biofilmen gezeigt werden kann. Dieser Assay wurde für *C. albicans*, *P. aeruginosa* und *E. coli* etabliert. In weiteren Projekten wurde dieser auch auf Biofilme von *Caulobacter crescentus* und *Staphylococcus aureus* angepasst, und sollte mit geringen Modifikationen auf weitere Mikroorganismen übertragbar sein. Somit steht eine Toolbox zur Verfügung, um Biofilme und Einflüsse auf diese zu charakterisieren und online zu verfolgen. Durch die Detektion Quorum sensing Molekül produzierender Organismen ist diese Toolbox ein wichtiger Beitrag in der Forschung zur Verhinderung von Biofilmen. Hierdurch können in Zukunft durch Biofilme verursachte wirtschaftliche Schäden verringert werden, wie beispielsweise Biofouling und Biokorrosion, aber ebenso Biofilm-bedingte Infektionen vermieden werden.

## 5 Literaturverzeichnis

- Ahmer, B.M.M. (2004) Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 52 (4): 933-945.
- Al-Fattani, M.A. and Douglas, L.J. (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 55 (8): 999-1008.
- Alem, M.A.S., Oteef, M.D.Y., Flowers, T.H. and Douglas, L.J. (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, 5 (10): 1770-1779.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59 (4): 1114-1128.
- Ausubel, F.M., Hirata, A., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1988) *Current protocols in molecular biology*. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Azoulay, E., Timsit, J.-F., Tafflet, M., de Lassence, A., Darmon, M., Zahar, J.-R., Adrie, C., Garrouste-Orgeas, M., Cohen, Y., Mourvillier, B. and Schlemmer, B. (2006) *Candida* Colonization of the Respiratory Tract and Subsequent *Pseudomonas* Ventilator-Associated Pneumonia\*. *Chest*, 129 (1): 110-117.
- Bakare, N., Rickerts, V., Bargon, J. and Just-Nübling, G. (2003) Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*, 46 (1-2): 19-23.
- Bandara, H.M., Yau, J.Y., Watt, R.M., Jin, L.J. and Samaranyake, L.P. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *in-vitro* *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol*, 10 (1): 125.
- Banin, E., Vasil, M.L. and Greenberg, E.P. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (31): 11076-81.
- Barr, K. and Rick, P.D. (1987) Biosynthesis of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. *In vitro* synthesis of lipid-linked intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 262 (15): 7142-7150.
- Bassler, B.L. (2002) Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, 109 (4): 421-424.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P. and Stevens, A.M. (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 179 (12): 4043-4045.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E. and Silverman, M.R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology*, 9 (4): 773-786.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B. and Ghigo, J.-M. (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology*, 51 (3): 659-674.

- Booy, A., Lewis-Torpey, K. and Hunter, C. (2010) Effects of intelligent data acquisition and fast laser speed on analysis of complex protein digests.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Bredenbruch, F., Geffers, R., Nimtz, M., Buer, J. and Haussler, S. (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ Microbiol*, 8 (8): 1318-29.
- Burns, J.L., van Dalphen, J.M., Shawar, R.M., Otto, K.L., Garber, R.L., Quan, J.M., Montgomery, A.B., Albers, G.M., Ramsey, B.W. and Smith, A.L. (1999) Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 179 (5): 1190-1196.
- Calera, J.A. and Calderone, R. (1999) Flocculation of hyphae is associated with a deletion in the putative CaHK1 two-component histidine kinase gene from *Candida albicans*. *Microbiology*, 145:1431-1442.
- Cao, Y.Y., Cao, Y.B., Xu, Z., Ying, K., Li, Y., Xie, Y., Zhu, Z.Y., Chen, W.S. and Jiang, Y.Y. (2005) cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*, 49 (2): 584-9.
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. and Sudbery, P.E. (1999) The *met3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Molecular Microbiology*, 34 (4): 792-798.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T. and Ghannoum, M.A. (2001a) Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*, 183 (18): 5385-5394.
- Chandra, J., Mukherjee, P.K., Leidich, S.D., Faddoul, F.F., Hoyer, L.L., Douglas, L.J. and Ghannoum, M.A. (2001b) Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro. *Journal of Dental Research*, 80 (3): 903-908.
- Chang, W., Small, D.A., Toghrol, F. and Bentley, W.E. (2005) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC Genomics*, 6 (1): 115.
- Chen, H. and Fink, G.R. (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development*, 20 (9): 1150-1161.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. and Fink, G.R. (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (14): 5048-5052.
- Choi, K.-H., Gaynor, J.B., White, K.G., Lopez, C., Bosio, C.M., Karkhoff-Schweizer, R.R. and Schweizer, H.P. (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods*, 2:443-448.
- Cleary, P. and Retnoningrum, D. (1994) Group A streptococcal immunoglobulin-binding proteins: adhesins, molecular mimicry or sensory proteins? *Trends in Microbiology*, 2 (4): 131-136.

- Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A.R., Falkow, S. and Brown, A.J.P. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, 143 (2): 303-311.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49 (1): 711-45.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284 (5418): 1318-22.
- Cox, C.D. and Adams, P. (1985) Siderophore activity of pyoverdinin for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 48 (1): 130-8.
- Cox, C.D. and Graham, R. (1979) Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 137 (1): 357-64.
- Cugini, C., Calfee, M.W., Farrow, J.M., 3rd, Morales, D.K., Pesci, E.C. and Hogan, D.A. (2007) Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 65 (4): 896-906.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (12): 6640-6645.
- Davies, D.G. and Geesey, G.G. (1995) Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3): 860-867.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Igleski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280 (5361): 295-8.
- Davis-Hanna, A., Piispanen, A.E., Stateva, L.I. and Hogan, D.A. (2008) Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Molecular Microbiology*, 67 (1): 47-62.
- De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J. and Klis, F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast*, 20 (9): 781-96.
- de Kievit, T.R. (2009) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol*, 11 (2): 279-88.
- De Sordi, L. and Muhlschlegel, F.A. (2009) Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Res*, 9 (7): 990-9.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R. and DeLuca, M. (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (23): 7870-3.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. and Bossier, P. (2007) Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME Journal*, 2 (1): 19-26.
- Dehling, M. (2009) Erstellung von Reporterstämmen in *Escherichia coli* zur phänotypischen Untersuchung von Biofilmen., Georg-Simon-Ohm Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Nürnberg.
- DeLisa, M.P., Wu, C.-F., Wang, L., Valdes, J.J. and Bentley, W.E. (2001) DNA Microarray-Based Identification of Genes Controlled by Autoinducer 2-Stimulated Quorum Sensing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183 (18): 5239-5247.

- Diggle, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L., Kong, X., Hider, R.C., Cornelis, P., Camara, M. and Williams, P. (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol*, 14 (1): 87-96.
- Dingman, J.R., Rayner, M.G., Mishra, S., Zhang, Y., Ehrlich, M.D., Post, J.C. and Ehrlich, G.D. (1998) Correlation between Presence of Viable Bacteria and Presence of Endotoxin in Middle-Ear Effusions. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (11): 3417-3419.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T. and Wood, T.K. (2007) Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol*, 9 (2): 332-46.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Centers of Disease Control and Prevention*, 8 (9).
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2): 167-193.
- Douglas, L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11 (1): 30-36.
- Driffield, K., Miller, K., Bostock, J.M., O'Neill, A.J. and Chopra, I. (2008) Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (5): 1053-1056.
- Dubern, J.-F. and Diggle, S.P. (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular BioSystems*, 4 (9): 882-888.
- El-Azizi, M.A., Starks, S.E. and Khardori, N. (2004) Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol*, 96 (5): 1067-73.
- Engbrecht, J., Nealson, K. and Silverman, M. (1983) Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 32 (3): 773-781.
- Enjalbert, B. and Whiteway, M. (2005) Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. *Eukaryotic Cell*, 4 (7): 1203-10.
- Friedman, L. and Kolter, R. (2004) Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *Journal of Bacteriology*, 186 (14): 4457-4465.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Stoodley, P. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*, 13 (1): 34-40.
- Gallagher, L.A., McKnight, S.L., Kuznetsova, M.S., Pesci, E.C. and Manoil, C. (2002) Functions Required for Extracellular Quinolone Signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 184 (23): 6472-6480.
- Gambello, M.J. and Iglewski, B.H. (1991) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology*, 173 (9): 3000-3009.

- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M. and d'Enfert, C. (2004) *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic Cell*, 3 (2): 536-45.
- Garrett, E.S., Perlegas, D. and Wozniak, D.J. (1999) Negative Control of Flagellum Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* Is Modulated by the Alternative Sigma Factor AlgT (AlgU). *Journal of Bacteriology*, 181 (23): 7401-7404.
- Ghim, C.M., Lee, S.K., Takayama, S. and Mitchell, R.J. (2010) The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Rep*, 43 (7): 451-60.
- Ghysels, B., Ochsner, U., Mollman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P. and Matthijs, S. (2005) The *Pseudomonas aeruginosa pirA* gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiol Lett*, 246 (2): 167-74.
- Gibson, J., Sood, A. and Hogan, D.A. (2009) *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (2): 504-13.
- Gilbert, P., Das, J. and Foley, I. (1997) Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. *Advances in Dental Research*, 11 (1): 160-167.
- Gillum, A.M., Tsay, E.Y. and Kirsch, D.R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Molecular and General Genetics*, 198 (1): 179-82.
- Goodwin, K., Levin, R.E. and Doggett, R.G. (1972) Autosensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to its own pyocin. *Infect Immun*, 6 (5): 889-92.
- Görisch, H. (2003) The ethanol oxidation system and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1647 (1-2): 98-102.
- Govan, J.R. and Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological reviews*, 60 (3): 539-574.
- Guggenheim, B., Giertsen, E., Schupbach, P. and Shapiro, S. (2001) Validation of an in vitro Biofilm Model of Supragingival Plaque. *Journal of Dental Research*, 80 (1): 363-370.
- Gupta, N., Haque, A., Mukhopadhyay, G., Narayan, R.P. and Prasad, R. (2005) Interactions between bacteria and *Candida* in the burn wound. *Burns*, 31 (3): 375-378.
- Hakenbeck, R. and Stock, J.B. (1996) Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation, in Sankar, A. (Ed.): *Methods in Enzymology*, Academic Press, 281-300.
- Henderson, B. and Martin, A. (2011) Bacterial Moonlighting Proteins and Bacterial Virulence. *Curr Top Microbiol Immunol*.
- Hermann, C., Hermann, J., Munzel, U. and Ruchel, R. (1999) Bacterial flora accompanying *Candida* yeasts in clinical specimens. *Mycoses*, 42 (11-12): 619-27.

- Herzberg, M., Kaye, I.K., Peti, W. and Wood, T.K. (2006) YdgG (TqsA) Controls Biofilm Formation in *Escherichia coli* K-12 through Autoinducer 2 Transport. *Journal of Bacteriology*, 188 (2): 587-598.
- Heymann, P., Gerads, M., Schaller, M., Dromer, F., Winkelmann, G. and Ernst, J.F. (2002) The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infection and Immunity*, 70 (9): 5246-5255.
- Hiller, E., Heine, S., Brunner, H. and Rupp, S. (2007) *Candida albicans* Sun41p, a putative glycosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation. *Eukaryotic Cell*, 6 (11): 2056-65.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. and Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 212 (1): 77-86.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57 (2-3): 267-272.
- Hogan, D.A. (2006) Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic Cell*, 5 (4): 613-9.
- Hogan, D.A. and Kolter, R. (2002) *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*, 296 (5576): 2229-32.
- Hogan, D.A., Vik, A. and Kolter, R. (2004) A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular Microbiology*, 54 (5): 1212-23.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35 (4): 322-332.
- Holcombe, L.J., McAlester, G., Munro, C.A., Enjalbert, B., Brown, A.J., Gow, N.A., Ding, C., Butler, G., O'Gara, F. and Morrissey, J.P. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*. *Microbiology*, 156 (Pt 5): 1476-86.
- Hornby, J.M., Jacobitz-Kizzier, S.M., McNeel, D.J., Jensen, E.C., Treves, D.S. and Nickerson, K.W. (2004) Inoculum Size Effect in Dimorphic Fungi: Extracellular Control of Yeast-Mycelium Dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3): 1356-1359.
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. and Nickerson, K.W. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7): 2982-92.
- Hoyer, L.L. (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9 (4): 176-180.
- Hoyer, L.L., Green, C.B., Oh, S.-H. and Zhao, X. (2008) Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family – a sticky pursuit. *Medical Mycology*, 46 (1): 1-15.

- Hoyer, L.L., Payne, T.L., Bell, M., Myers, A.M. and Scherer, S. (1998) *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Current Genetics*, 33 (6): 451-459.
- Huang, Y., Leming, C.L., Suyemoto, M. and Altier, C. (2007) Genome-Wide Screen of *Salmonella* Genes Expressed during Infection in Pigs, Using In Vivo Expression Technology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (23): 7522-7530.
- Hyde, J.A., O., D.R. and Costerton, J.W. (1998) Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. *Journal of Heart Valve Disease*, 7 (3): 316-326.
- Jagmann, N., Brachvogel, H.P. and Philipp, B. (2010) Parasitic growth of *Pseudomonas aeruginosa* in co-culture with the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol*, 12 (6): 1787-802.
- James, A.L., Perry, J.D., Ford, M., Armstrong, L. and Gould, F.K. (1996) Evaluation of cyclohexenoesculetin-beta-D-galactoside and 8-hydroxyquinoline-beta-D-galactoside as substrates for the detection of beta-galactosidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (10): 3868-3870.
- Junker, L.M., Peters, J.E. and Hay, A.G. (2006) Global analysis of candidate genes important for fitness in a competitive biofilm using DNA-array-based transposon mapping. *Microbiology*, 152 (Pt 8): 2233-45.
- Karp, N.A., Spencer, M., Lindsay, H., O'Dell, K. and Lilley, K.S. (2005) Impact of replicate types on proteomic expression analysis. *J Proteome Res*, 4 (5): 1867-71.
- Kawaguchi, T., Chen, Y.P., Norman, R.S. and Decho, A.W. (2008) Rapid Screening of Quorum-Sensing Signal N-Acyl Homoserine Lactones by an In Vitro Cell-Free Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12): 3667-3671.
- Kendzioriski, C., Irizarry, R.A., Chen, K.S., Haag, J.D. and Gould, M.N. (2005) On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (12): 4252-7.
- Kerr, J.R. (1994) Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (2): 525-527.
- Kerr, J.R., Taylor, G.W., Rutman, A., Hoiby, N., Cole, P.J. and Wilson, R. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol*, 52 (5): 385-7.
- Kim, J. and Sudbery, P. (2011) *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*, 49 (2): 171-7.
- Kleymann, G. and Werling, H.-O. (2004) A generally applicable, high-throughput screening-compatible assay to identify, evaluate, and optimize antimicrobial agents for drug therapy. *Journal of Biomolecular Screening*, 9 (7): 578-587.
- Klotz, S.A., Gaur, N.K., De Armond, R., Sheppard, D., Khardori, N., Edwards, J.E., Jr., Lipke, P.N. and El-Azizi, M. (2007) *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med Mycol*, 45 (4): 363-70.
- Knight, S.A. and Dancis, A. (2006) Reduction of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) is dependent on CaFRE10 ferric reductase for *Candida albicans* grown in unbuffered media. *Microbiology*, 152 (Pt 8): 2301-8.

- Kong, K.-F., Jayawardena, S.R., Indulkar, S.D., del Puerto, A., Koh, C.-L., Hoiby, N. and Mathee, K. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB  $\beta$ -lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (11): 4567-4575.
- Kozliak, E.I., Guilloton, M.B., Gerami-Nejad, M., Fuchs, J.A. and Anderson, P.M. (1994) Expression of proteins encoded by the *Escherichia coli cyn* operon: carbon dioxide-enhanced degradation of carbonic anhydrase. *Journal of Bacteriology*, 176 (18): 5711-5717.
- Kruppa, M., Krom, B.P., Chauhan, N., Bambach, A.V., Cihlar, R.L. and Calderone, R.A. (2004) The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 3 (4): 1062-1065.
- Kügler, S., Sebghati, T.S., Eissenberg, L.G. and Goldman, W.E. (2000) Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (16): 8794-8798.
- Kuhn, H.-M., Meier-Dieter, U. and Mayer, H. (1988) ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiology Letters*, 54 (3): 195-222.
- Kumar, C.G. and Anand, S.K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1-2): 9-27.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I. and Vasil, M.L. (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (10): 7072-7.
- Lan, C.-Y., Rodarte, G., Murillo, L.A., Jones, T., Davis, R.W., Dungan, J., Newport, G. and Agabian, N. (2004) Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 53 (5): 1451-1469.
- Lawrence, J.R., Delaquis, P.J., Korber, D.R. and Caldwell, D.E. (1987) Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microbial Ecology*, 14 (1): 1-14.
- Lee, H., Chang, Y.C., Nardone, G. and Kwon-Chung, K.J. (2007a) TUP1 disruption in *Cryptococcus neoformans* uncovers a peptide-mediated density-dependent growth phenomenon that mimics quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 64 (3): 591-601.
- Lee, J., Jayaraman, A. and Wood, T. (2007b) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology*, 7 (1): 42.
- Lee, S.A., Wormsley, S., Kamoun, S., Lee, A.F.S., Joiner, K. and Wong, B. (2003) An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms. *Yeast*, 20 (7): 595-610.
- Letoffe, S., Redeker, V. and Wandersman, C. (1998) Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Molecular Microbiology*, 28 (6): 1223-1234.
- Lewenza, S., Gardy, J.L., Brinkman, F.S. and Hancock, R.E. (2005) Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* exported proteins using a consensus

- computational strategy combined with a laboratory-based PhoA fusion screen. *Genome Res*, 15 (2): 321-9.
- Li, Y.-H., Lau, P.C.Y., Lee, J.H., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G. (2001) Natural Genetic Transformation of *Streptococcus mutans* Growing in Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 183 (3): 897-908.
- Lingappa, B.T., Prasad, M., Lingappa, Y., Hunt, D.F. and Biemann, K. (1969) Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science*, 163 (863): 192-194.
- Liu, H., Sadygov, R.G. and Yates, J.R., 3rd (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*, 76 (14): 4193-201.
- Llamas, I., Keshavan, N. and Gonzalez, J.E. (2004) Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of long-chain *N*-acyl homoserine lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6): 3715-3723.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 (1): 265-75.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K. and Wozniak, D.J. (2009) Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathog*, 5 (3): e1000354.
- Mao, F., Dam, P., Chou, J., Olman, V. and Xu, Y. (2009) DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res*, 37 (Database issue): D459-63.
- Martinez-Gomariz, M., Perumal, P., Mekala, S., Nombela, C., Chaffin, W.L. and Gil, C. (2009) Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *PROTEOMICS*, 9 (8): 2230-52.
- Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S.M., Coimbra, M.A. and Oliveira, R. (2007) Morphogenesis Control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through Signaling Molecules Produced by Planktonic and Biofilm Cells. *Eukaryotic Cell*, 6 (12): 2429-2436.
- McAlester, G., O'Gara, F. and Morrissey, J.P. (2008) Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol*, 57 (Pt 5): 563-9.
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143 (12): 3703-3711.
- Michel-Briand, Y. and Baysse, C. (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84 (5-6): 499-510.
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55 (1): 165-99.
- Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (3): 255-261.
- Morales, D.K., Jacobs, N.J., Rajamani, S., Krishnamurthy, M., Cubillos-Ruiz, J.R. and Hogan, D.A. (2010) Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas*

- aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Molecular Microbiology*, 78 (6): 1379-92.
- Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *Journal of Cellular Physiology*, 77 (3): 305-311.
- Morris, D.R. and Koffron, K.L. (1967) Urea Production and Putrescine Biosynthesis by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 94 (5): 1516-1519.
- Morschhäuser, J., Michel, S. and Staib, P. (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 32 (3): 547-556.
- Mosel, D.D., Dumitru, R., Hornby, J.M., Atkin, A.L. and Nickerson, K.W. (2005) Farnesol Concentrations Required To Block Germ Tube Formation in *Candida albicans* in the Presence and Absence of Serum. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8): 4938-4940.
- Murillo, L.A., Newport, G., Lan, C.Y., Habelitz, S., Dungan, J. and Agabian, N.M. (2005) Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 4 (9): 1562-73.
- Nailis, H., Coenye, T., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D. and Nelis, H. (2006) Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7 (1): 25.
- Nailis, H., Vandembroucke, R., Tilleman, K., Deforce, D., Nelis, H. and Coenye, T. (2009) Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia*, 167 (1): 9-17.
- Neely, A.N., Law, E.J. and Holder, I.A. (1986) Increased susceptibility to lethal *Candida infections* in burned mice preinfected with *Pseudomonas aeruginosa* or pretreated with proteolytic enzymes. *Infection and Immunity*, 52 (1): 200-204.
- Nickerson, K.W., Atkin, A.L. and Hornby, J.M. (2006) Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (6): 3805-3813.
- Nobile, C.J. and Mitchell, A.P. (2005) Regulation of Cell-Surface Genes and Biofilm Formation by the *C. albicans* Transcription Factor Bcr1p. *Current Biology*, 15 (12): 1150-1155.
- Nobile, C.J. and Mitchell, A.P. (2006) Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cellular Microbiology*, 8 (9): 1382-1391.
- Nobile, C.J., Nett, J.E., Hernday, A.D., Homann, O.R., Deneault, J.-S., Nantel, A., Andes, D.R., Johnson, A.D. and Mitchell, A.P. (2009) Biofilm Matrix Regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biology*, 7 (6): e1000133.
- Nouwens, A.S., Willcox, M.D., Walsh, B.J. and Cordwell, S.J. (2002) Proteomic comparison of membrane and extracellular proteins from invasive (PAO1) and cytotoxic (6206) strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *PROTEOMICS*, 2 (9): 1325-46.
- Nseir, S., Jozefowicz, E., Cavestri, B., Sendid, B., Di Pompeo, C., Dewavrin, F., Favory, R., Roussel-Delvallez, M. and Durocher, A. (2007) Impact of antifungal treatment

- on *Candida* – *Pseudomonas* interaction: a preliminary retrospective case-control study. *Intensive Care Medicine*, 33 (1): 137-142.
- O'Connor, L., Lahiff, S., Casey, F., Glennon, M., Cormican, M. and Maher, M. (2005) Quantification of ALS1 gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler™. *Molecular and Cellular Probes*, 19 (3): 153-162.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998a) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30 (2): 295-304.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998b) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28 (3): 449-461.
- Odds, F.C. (1994) Pathogenesis of *Candida* infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31 (3): 1.
- Oh, K.-B., Miyazawa, H., Naito, T. and Matsuoka, H. (2001) Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (8): 4664-4668.
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91 (1): 197-201.
- Peeters, E., Nelis, H.J. and Coenye, T. (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72 (2): 157-165.
- Perlroth, J., Choi, B. and Spellberg, B. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*, 45 (4): 321-46.
- Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P. and Iglewski, B.H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (20): 11229-34.
- Pierce, G.E. (2005) *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and device-related nosocomial infections: implications, trends, and potential approaches for control. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32 (7): 309-18.
- Poole, K., Neshat, S., Krebs, K. and Heinrichs, D.E. (1993) Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fvpA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 175 (15): 4597-604.
- Pratt, L.A. and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30 (2): 285-293.
- Prüss, B.M., Besemann, C., Denton, A. and Wolfe, A.J. (2006) A Complex Transcription Network Controls the Early Stages of Biofilm Development by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188 (11): 3731-3739.

- Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L. and Lopez-Ribot, J.L. (2002a) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11): 5459-63.
- Ramage, G., VandeWalle, K., López-Ribot, J.L. and Wickes, B.L. (2002b) The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 214 (1): 95-100.
- Rao, J., Elliott, M.R., Leitinger, N., Jensen, R.V., Goldberg, J.B. and Amin, A.R. (2011) RahU: An inducible and functionally pleiotropic protein in *Pseudomonas aeruginosa* modulates innate immunity and inflammation in host cells. *Cellular Immunology*, 270 (2): 103-113.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Thomas, S.M., Ye, R.W. and Wood, T.K. (2004) Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (4): 515-524.
- Reuß, O., Vik, Å., Kolter, R. and Morschhäuser, J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene*, 341:119-127.
- Rice, K.C. and Bayles, K.W. (2008) Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72 (1): 85-109, table of contents.
- Rice, S.A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J.S. and Kjelleberg, S. (2009) The biofilm life-cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *The ISME Journal*, 3 (3): 271-282.
- Rossignol, T., Logue, M.E., Reynolds, K., Grenon, M., Lowndes, N.F. and Butler, G. (2007) Transcriptional Response of *Candida parapsilosis* following Exposure to Farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (7): 2304-2312.
- Saeed, A.I., Bhagabati, N.K., Braisted, J.C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E.A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J.A. and Quackenbush, J. (2006) TM4 Microarray Software Suite, in Alan, K. and Brian, O. (Eds.): *Methods in Enzymology*, Academic Press, 134-193.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V. and Quackenbush, J. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, 34 (2): 374-8.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sato, T., Watanabe, T., Mikami, T. and Matsumoto, T. (2004) Farnesol, a Morphogenetic Autoregulatory Substance in the Dimorphic Fungus *Candida albicans*, Inhibits Hyphae Growth through Suppression of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27 (5): 751-752.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. and Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184 (4): 1140-1154.

- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G. and Bassler, B.L. (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 41 (2): 463-476.
- Schembri, M.A., Kjærsgaard, K. and Klemm, P. (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 48 (1): 253-267.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T. and Greenberg, E.P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, 185 (7): 2066-2079.
- Semmler, A.B.T., Whitchurch, C.B. and Mattick, J.S. (1999) A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 145 (10): 2863-2873.
- Shank, E.A. and Kolter, R. (2009) New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 12 (2): 205-214.
- Sheth, C.C., Hall, R., Lewis, L., Brown, A.J., Odds, F.C., Erwig, L.P. and Gow, N.A. (2011) Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med Mycol*, 49 (5): 513-24.
- Shirtliff, M.E., Krom, B.P., Meijering, R.A.M., Peters, B.M., Zhu, J., Scheper, M.A., Harris, M.L. and Jabra-Rizk, M.A. (2009) Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (6): 2392-2401.
- Silverman, R.J., Nobbs, A.H., Vickerman, M.M., Barbour, M.E. and Jenkinson, H.F. (2010) Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species communities. *Infect Immun*, 78 (11): 4644-52.
- Sorgo, A.G., Heilmann, C.J., Dekker, H.L., Brul, S., de Koster, C.G. and Klis, F.M. (2010) Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. *Yeast*, 27 (8): 661-72.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98 (3): 503-517.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A. and Kaper, J.B. (2001) Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology*, 183 (17): 5187-5197.
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D. and Lappin-Scott, H.M. (1998) Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (5): 536-544.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W. (2001) Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12): 5608-5613.
- Sundstrom, P., Smith, D. and Sypherd, P.S. (1990) Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 172 (4): 2036-2045.
- Surette, M.G., Miller, M.B. and Bassler, B.L. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (4): 1639-1644.

- Tavender, T., Halliday, N., Hardie, K. and Winzer, K. (2008) LuxS-independent formation of AI-2 from ribulose-5-phosphate. *BMC Microbiology*, 8 (1): 98.
- Thomas, D.P., Bachmann, S.P. and Lopez-Ribot, J.L. (2006) Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *PROTEOMICS*, 6 (21): 5795-804.
- Urban, C., Xiong, X., Sohn, K., Schroppel, K., Brunner, H. and Rupp, S. (2005) The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 57 (5): 1318-41.
- Valenza, G., Tappe, D., Turnwald, D., Frosch, M., König, C., Hebestreit, H. and Abele-Horn, M. (2008) Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7 (2): 123-127.
- van Houdt, R. and Michiels, C.W. (2005) Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156 (5-6): 626-633.
- Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Verzili, D., Orsi, N. and Chiancone, E. (1992) Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (9): 2886-2893.
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. and Iglewski, B.H. (2003) Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons: Effects of Growth Phase and Environment. *Journal of Bacteriology*, 185 (7): 2080-2095.
- Waite, R., Pacanaro, A., Papakonstantinou, A., Hurst, J., Saqi, M., Littler, E. and Curtis, M. (2006) Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles. *BMC Genomics*, 7 (1): 162.
- Waite, R.D. and Curtis, M.A. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pyocin production affects population dynamics within mixed-culture biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191 (4): 1349-54.
- Waite, R.D., Papakonstantinou, A., Littler, E. and Curtis, M.A. (2005) Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Growth: Comparison of Gene Expression in Planktonic Cultures and Developing and Mature Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187 (18): 6571-6576.
- Wang, L., Li, J., March, J.C., Valdes, J.J. and Bentley, W.E. (2005) *luxS*-Dependent Gene Regulation in *Escherichia coli* K-12 Revealed by Genomic Expression Profiling. *Journal of Bacteriology*, 187 (24): 8350-8360.
- Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L. and Kolter, R. (2001) The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology*, 39 (2): 223-235.
- Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. and Kjelleberg, S. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 185 (15): 4585-92.
- Wendenbaum, S., Demange, P., Dell, A., Meyer, J.M. and Abdallah, M.A. (1983) The Structure of Pyoverdine Pa, the Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Tetrahedron Letters*, 24 (44): 4877-4880.

- Wessel, D. and Flügge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138 (1): 141-143.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. and Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295 (5559): 1487.
- Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S. and Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413 (6858): 860-4.
- Whiteley, M., Lee, K.M. and Greenberg, E.P. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (24): 13904-13909.
- Winsor, G.L., Lam, D.K., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., Hancock, R.E. and Brinkman, F.S. (2011) *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res*, 39 (Database issue): D596-600.
- Winsor, G.L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M.D., Hancock, R.E. and Brinkman, F.S. (2009) *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res*, 37 (Database issue): D483-8.
- Yang, L., Nilsson, M., Gjermansen, M., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2009) Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 74 (6): 1380-1392.
- Yeater, K.M., Chandra, J., Cheng, G., Mukherjee, P.K., Zhao, X., Rodriguez-Zas, S.L., Kwast, K.E., Ghannoum, M.A. and Hoyer, L.L. (2007) Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology*, 153 (Pt 8): 2373-85.
- ZoBell, C.E. and Anderson, D.Q. (1936) Observation on the multiplication of bacteria in different volumens of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *The Biological Bulletin*, 71 (2): 324-342.

## Abkürzungsverzeichnis

3OC12HSL	N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserinlacton
AI-2	Autoinducer 2
AIP	<i>autoinducing peptide</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNS	<i>copy / complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CNF	5-Carboxynaphthofluorescein succinimidyl Ester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPD	2,3-dihydroxy-pentandion
ECA	<i>enterobacterial common antigen</i>
eDNS	extrazelluläre Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	Fluoreszeindiacetat
FRT	<i>FLP recognition target</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymimtsäure
HSL	Homoserinlacton
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	tandem Massenspektrometrie
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer mit Salz ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PSD	<i>post source decay</i>
RNS	Ribonukleinsäure
SAM	S-Adenosylhomocystein
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecylsulfate</i> )

---

TCEP	Triscarboxyethylphosphin
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
upm	Umdrehungen pro Minute
v / v	Volumenprozent ( <i>volume / volume</i> )
w / w	Gewichtsprozent ( <i>weight / weight</i> )
XTT	(2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid Hydroxid
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YNBNP	<i>yeast nitrogen base</i> / N-Acetylglucosmin / Phosphatpuffer
YPD	<i>yeast extract / peptone / dextrose</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Anzahl der Publikationen mit dem Begriff "Biofilm" pro Jahr	7
Abbildung 1.2. Stadien der Biofilmbildung	11
Abbildung 1.3. Quorum sensing in Gram-negativen Bakterien	14
Abbildung 1.4. Quorum sensing in Gram-positiven Bakterien	15
Abbildung 1.5. Biosynthese des Autoinducer 2	16
Abbildung 1.6. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms von <i>C. albicans</i> SC5314	18
Abbildung 1.7. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen der <i>P. aeruginosa</i> Stämme PA14 und PAO1.	21
Abbildung 3.1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen von <i>C. albicans</i> Can14 und <i>P. aeruginosa</i> S2_B004 in verschiedenen Medien	46
Abbildung 3.2. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemischter Biofilme von <i>C. albicans</i> Can14 und <i>P. aeruginosa</i> S2_B004	48
Abbildung 3.3. Vergleich verschiedener <i>in vitro</i> Assays zur Quantifizierung von Biofilmen	49
Abbildung 3.4. Einfluss von Farnesol, 3OC12HSL und Dodecanol auf Biofilme von <i>C. albicans</i>	51
Abbildung 3.5. Einfluss von Farnesol, 3OC12HSL und Dodecanol auf Biofilme von <i>P. aeruginosa</i>	52
Abbildung 3.6. Bestimmung der adhärennten Zellen nach Vorinkubation	53
Abbildung 3.7. Metabolische Aktivität von Can14 und S2_B008 Biofilmen im Vergleich zu gemischten	54
Abbildung 3.8. Gesamtmenge an Protein sekretiert von Monospezies-Biofilmen von Can14 und S2_B008 im Vergleich zu gemischten Biofilmen	56
Abbildung 3.9. Anzahl der Proteine, die von <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> oder gemischten Biofilmen sekretiert wurden	57
Abbildung 3.10. Absorptionsscan von Filter-sterilisierten Überständen von Biofilmen von <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> und gemischten Biofilmen	68
Abbildung 3.11. Massenspektrometrische Untersuchungen von Überständen der gemischten Biofilme	69
Abbildung 3.12. Pyoverdin-Produktion während der Entwicklung von <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> und gemischten Biofilmen	70
Abbildung 3.13. Pyoverdin-Signale von zellfreien Überständen gemischter Biofilme aus <i>C. albicans</i> und <i>P. aeruginosa</i>	70
Abbildung 3.14. Southern Blot Analysen zur Verifizierung der Integration der Reportergene in <i>C. albicans</i> .	75
Abbildung 3.15. Vergleich der Biofilme der mutierten Stämme mit dem Wildtyp.	77

Abbildung 3.16. Verfolgung der Fluoreszenz während der Biofilmbildung der Reporterstämme	78
Abbildung 3.17. Immunochemischer Nachweis von $\gamma$ EGFP während der Entwicklung von Biofilmen	79
Abbildung 3.18. Einfluss von Mikroorganismen auf die <i>C. albicans</i> Reporterstämme	80
Abbildung 3.19. Beeinflussung der Biofilme der <i>C. albicans</i> Reporterstämme durch von Mikroorganismen konditionierte Medien	81
Abbildung 3.20. Auswahl der Promotoren für die <i>P. aeruginosa</i> Reporterstämme durch Überprüfung der Regulationen mittels qRT-PCR	83
Abbildung 3.21. Southern Blot Analyse zur Validierung der <i>P. aeruginosa</i> Reporterstämme	84
Abbildung 3.22. Vergleich der von den Reporterstämmen gebildeten Biofilme mit den wildtypischen	85
Abbildung 3.23. Verfolgung der <i>TurboFP602</i> -Expression während der Biofilmbildung der <i>P. aeruginosa</i> Reporterstämme	86
Abbildung 3.24. Überprüfung der Expression von <i>TurboFP602</i> in den Reporterstämmen mittels qRT-PCR	87
Abbildung 3.25. Fluoreszenzmikroskopische Verfolgung der Expression von <i>TurboFP602</i> während der Bildung von Biofilmen der <i>P. aeruginosa</i> Reporterstämme	88
Abbildung 3.26. Reaktion der Reporterstämme auf <i>C. albicans</i> Biofilme und planktonisch, <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. aeruginosa</i> Biofilme und planktonisch, sowie <i>P. fluorescens</i>	89
Abbildung 3.27. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> Biofilmen	90
Abbildung 3.28. Einfluss von D-Mannose und $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid auf Biofilme und Wachstum von <i>E. coli</i>	92
Abbildung 3.29. Ermittlung der Transkriptionsraten der Gene <i>cynS</i> , <i>rfe</i> und <i>rffA</i> in Biofilmen verglichen mit planktonisch gewachsenen Zellen	93
Abbildung 3.30. Southern Blot Analysen zur Verifizierung der <i>E. coli</i> Reporterstämme	94
Abbildung 3.31. Southern Blot zur Überprüfung der Deletion von <i>luxS</i>	95
Abbildung 3.32. Vergleich der Biofilme der <i>E. coli</i> Stämme	96
Abbildung 3.33. Entwicklung der Fluoreszenz während der Biofilmbildung der <i>E. coli</i> Reporterstämme	97
Abbildung 3.34. Reaktion der <i>E. coli</i> Reporterstämme auf konditioniertes Medium	98
Abbildung 0.1. Matlab Programm PixelZaehlen zur Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.	145

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1. Humane Infektionen, die mit Biofilmen assoziiert werden	9
Tabelle 1.2. Chemische Strukturen von Autoinduktoren	13
Tabelle 2.1. Verwendete Stämme	27
Tabelle 2.2. Oligonukleotide für die Konstruktion von Mutationen	32
Tabelle 2.3. Primer für die Herstellung der Sonden für Southern Blot Analysen	37
Tabelle 2.4. Primer und Sonden für die qRT-PCR	38
Tabelle 3.1. Anzahl der sekretierten Proteine im Vergleich zwischen einzelnen und gemischten Biofilmen	57
Tabelle 3.2. <i>P. aeruginosa</i> zugeordnete Proteine	58
Tabelle 3.3. <i>C. albicans</i> zugeordnete Proteine	63
Tabelle 3.4. Ausschließlich in gemischten Biofilmen identifizierte Proteine.	67
Tabelle 3.5. Regulation der Transkripte an <i>adh7</i> und <i>grp2</i> in Biofilmen verglichen mit planktonisch gewachsenen Zellen	74
Tabelle 0.1. Von Biofilmen sekretierte Proteine.	131
Tabelle 0.2. Vergleich der biologischen und technischen Replikate	139

## Anhang

Tabelle 0.1. Von Biofilmen sekretierte Proteine.

Genbank Nummer	Name	SCS314 + PAO1												ANOVA p-Werte		
		1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	Wachstum	Zeit	Interaktion
orf19.1097	Als2	2,5	2,0	1,5	1,0	1,0	1,5	0,5						0,027	0,333	0,926
orf19.1110	orf19.1110				0,5	0,5								NaN	NaN	NaN
orf19.1239	orf19.1239				0,5									NaN	NaN	NaN
orf19.1442	Pib45				5,5									0,029	0,029	0,029
orf19.1490	Msb2	1,5	3,0	4,0	3,0	4,5	5,5	1,5	3,5	4,0	2,5	5,5	6,0	0,000	0,030	0,506
orf19.1589	orf19.1589									0,5				NaN	NaN	NaN
orf19.1671	Utr2	1,0	3,0	2,0	3,5	5,0	7,0	0,5	2,0	0,5	3,5	3,5		0,000	0,004	0,018
orf19.1690	Tos1	11,0	23,5	27,0	19,0	27,0	24,5	20,5	34,0	33,5	27,0	22,5	20,5	0,000	0,000	0,000
orf19.1779	Mp65	6,0	15,5	18,5	15,0	19,5	22,5	15,5	26,0	21,0	16,0	19,5	13,5	0,000	0,020	0,012
orf19.1816	Als3	2,5	5,0	5,5	5,5	7,5	10,5	3,5	8,0	8,0	5,0	5,5	4,5	0,000	0,056	0,024
orf19.2060	Sod5	0,5	1,0	1,0	2,0	3,5	3,5	0,5	0,5	0,5	0,5			0,000	0,002	0,000
orf19.220	Pir1				1,5	2,5								0,017	0,055	0,044
orf19.2451	Pga45	0,5	0,5	1,5	1,5	3,0	2,5							0,006	0,368	0,290
orf19.2460	orf19.2460					1,0								NaN	NaN	NaN
orf19.251	orf19.251				0,5	1,0								NaN	NaN	NaN
orf19.2551	Met6				0,5									NaN	NaN	NaN
orf19.2706	Crh11	0,5	2,0	1,5	2,5	4,5	0,5							0,001	0,074	0,063
orf19.2770.1	Sod1				2,0	1,0								0,026	0,026	0,026
orf19.2870	orf19.2870	0,5	0,5											NaN	NaN	NaN
orf19.2941	Scw4	0,5	1,0		0,5	1,5	1,0	0,5	0,5	1,5	1,0	1,0	0,5	1,000	1,000	0,602
orf19.2973	orf19.2973													NaN	NaN	NaN
orf19.2990	Xog1	0,5	2,0	1,5	2,0	2,0	4,0	0,5	1,5			1,0	0,5	0,002	0,153	0,123
orf19.3010.1	Ecm33	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0				1,0				0,152	0,080	0,045
orf19.3066	Eng1	0,5	1,0	1,5	1,5	1,0	1,5		0,5			1,5		0,530	1,000	0,474
orf19.3087	Ubi3					2,0								0,029	0,029	0,029
orf19.3117	Csa2				3,0	4,5					2,5	2,5		0,000	0,000	0,000
orf19.3374	Ece1	1,5	2,5	4,5	3,5	2,5	1,5	1,0	1,0	1,0	0,5			0,000	0,003	0,009
orf19.3445	Hoc1							0,5						NaN	NaN	NaN
orf19.3499	orf19.3499					3,5	3,5							0,001	0,002	0,001
orf19.3618	Ywp1	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	2,0			0,525	0,375	0,914
orf19.3642	Sun41	2,5	6,0	9,0	5,0	13,0	12,0	6,5	12,0	14,5	12,0	10,0	8,5	0,000	0,002	0,005
orf19.3829	Phr1	2,0	6,0	5,0	8,0	12,0	0,5	1,5	0,5	1,0	2,5	2,0		0,000	0,002	0,001
orf19.3893	Scw11	1,5	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0	1,5	1,0	1,5		0,178	0,926	0,928
orf19.3895	Cht2	0,5	3,0	3,5	3,5	6,0	4,5	1,0	1,5	1,0	1,0			0,000	0,024	0,003
orf19.395	Eno1				2,0	2,0	3,0	0,5						0,046	0,408	0,291
orf19.4035	Pga4	1,0	3,5	4,0	2,5	4,0	6,5		3,0	2,0	1,0	4,0	5,0	0,003	0,049	0,592

Genbank Nummer	Name	SC5314										SC5314 + PAO1										ANOVA p-Werte	
		1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	Wachstum	Zeit	Interaktion	
orf19.4309	Grp2						1,0														NaN	NaN	NaN
orf19.4393	Cit1					5,5															0,026	0,026	0,026
orf19.4555	Als4		0,5	0,5	0,5		1,0														1,000	1,000	1,000
orf19.4565	Bgl2	1,0	3,0	3,0	2,0	3,0	4,0	1,5	1,0	1,5	1,0	1,0									0,003	0,868	0,862
orf19.4573	Zcf26																				1,000	1,000	1,000
orf19.4755	Kex2																				0,343	1,000	0,888
orf19.4781	Grp1																				NaN	NaN	NaN
orf19.4886	orf19.4886	0,5	0,5	0,5	0,5		1,0														NaN	NaN	NaN
orf19.4893	orf19.4893						0,5														NaN	NaN	NaN
orf19.4899/ orf19.999	Gca1/Gca2		1,0	0,5	0,5	1,5	9,0				2,5	1,5									0,010	0,007	0,023
orf19.4934	Op4																				NaN	NaN	NaN
orf19.4975	Hyr1					1,0	1,5	1,5	3,5												0,005	0,041	0,182
orf19.5032	Sim1					0,5															NaN	NaN	NaN
orf19.5063	Coil1						3,5	5,0													0,000	0,000	0,000
orf19.5089	Tert								0,5												NaN	NaN	NaN
orf19.5133	Zcf29					0,5															NaN	NaN	NaN
orf19.5305	Rhd3	0,5	1,0	1,0	1,0																1,000	1,000	1,000
orf19.5542	Sap6		0,5	1,0		6,0	7,5			1,0	4,5	2,0	3,0	4,5							0,000	0,000	0,001
orf19.562	Fgr13																				1,000	1,000	1,000
orf19.5636	Rbt5		0,5	0,5	0,5	2,0	2,5						0,5	0,5							0,000	0,002	0,000
orf19.5674	Pga10																				0,345	1,000	0,890
orf19.5716	Sap4									1,0	1,0										0,302	1,000	0,897
orf19.5741	Als1	6,0	9,5	6,5	6,5	5,5	9,0	5,5	8,5	8,5	7,0	3,0	4,0	0,5							0,000	0,609	0,856
orf19.5760	lhd1		0,5	0,5	0,5	1,5	1,5			0,5			0,5								1,000	1,000	1,000
orf19.5806	Ald5					4,5	2,0														0,000	0,000	0,000
orf19.5823	Sgt2						0,5														NaN	NaN	NaN
orf19.6081	Phr2	1,5	1,5	1,0	1,0	1,0	2,0														0,020	0,209	0,172
orf19.6202	Rbt4	1,0	5,5	8,0	7,0	11,0	12,5	2,0	4,0	1,5	2,0	4,0	0,5								0,000	0,002	0,000
orf19.6214	Atc1		0,5	0,5																	NaN	NaN	NaN
orf19.6274	Pbr1	1,0	3,5	4,0	3,5	4,0	4,5	1,0	2,5	3,0	2,0	2,5	2,0								0,000	0,010	0,051
orf19.6673	Hex1	5,5	10,0	8,0	6,5	5,0	5,0	5,0	7,5	5,0	2,0	3,5	3,0								0,000	0,002	0,132
orf19.6844	lcl1					3,5															0,026	0,026	0,026
orf19.7030	Ssr1		1,0	1,0	1,0	0,5	1,5			1,0											0,102	0,866	0,911
orf19.7114	Csa1						2,0														0,029	0,029	0,029
orf19.7218	Rbe1	1,0	3,5	2,5	1,5	3,0	3,5			1,0	1,0	0,5									0,000	0,180	0,271

Genbank Nummer	Name	SC5314										SC5314 + PAO1										ANOVA p-Werte	
		1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	Wachstum	Zeit	Interaktion	
orf19.7398.1/ orf19.7417	Tsa1/Tsa1B					0,5														NaN	NaN	NaN	
orf19.756	Sap7					2,0	4,0													0,026	0,082	0,068	
orf19.7574	orf19.7574					2,0	1,0													0,019	0,082	0,069	
orf19.7586	Cht3					2,5	4,5	5,0	3,5	3,0	1,0	0,5							0,000	0,006	0,007		
orf19.7619	orf19.7619					0,5													NaN	NaN	NaN		
orf19.783	orf19.783					0,5													NaN	NaN	NaN		
orf19.903	Gpm1					1,5	3,0												0,028	0,087	0,077		
orf19.913.2	orf19.913.2					1,0	1,0												NaN	NaN	NaN		
orf19.953.1	Cof1					1,0													NaN	NaN	NaN		
PA0002	dnaN											2,5							0,028	0,028	0,028		
PA0007																			NaN	NaN	NaN		
PA0049																			0,016	0,054	0,051		
PA0122								0,5					1,5	0,5	0,5				1,000	1,000	1,000		
PA0146																			0,003	0,024	0,021		
PA0173																			NaN	NaN	NaN		
PA0283	sbp												1,5						1,000	1,000	1,000		
PA0300	spuD												1,5	0,5					0,008	0,006	0,024		
PA0347	glpQ												0,5	1,5					0,062	0,007	0,053		
PA0419																			NaN	NaN	NaN		
PA0423	pasP								0,5										NaN	NaN	NaN		
PA0456								4,5	9,0	5,0	4,5	12,0	19,0	9,0	6,0	12,5	4,5	11,5	0,000	0,000	0,000		
PA0468								1,0	1,5					1,0	0,5				1,000	1,000	1,000		
PA0518	nirM																		0,024	0,024	0,024		
PA0572								1,0	4,5	2,5	4,5	29,5	16,5	3,0	0,5				NaN	NaN	NaN		
PA0604																			0,000	0,000	0,001		
PA0607	rpe																		NaN	NaN	NaN		
PA0620																			NaN	NaN	NaN		
PA0622																			0,024	0,024	0,024		
PA0623								1,0	1,5	0,5	2,5	3,0							0,000	0,001	0,000		
PA0807	ampDh3							1,0	3,0	2,0	1,5	3,5	2,0	3,5	2,5	6,5	3,5	9,0	0,007	0,006	0,076		
PA0852	cbpD							1,0	3,5	1,5	2,0	6,5	6,0	10,0	1,0	1,5	0,5	4,5	0,000	0,000	0,161		
PA0888	aotJ							2,0	2,0	1,5	1,5	1,5	2,0	3,0	0,5	0,5	1,0	1,0	0,000	0,000	0,000		
PA0893	argR							0,5											1,000	1,000	1,000		
PA0958	oprD																		1,000	1,000	1,000		
PA0962																			0,000	0,000	0,001		



Genbank Nummer	Name	SC5314										SC5314 + PAO1										ANOVA p-Werte		
		1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	0,5	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	Wachstum	Zeit	Interaktion	
PA2071	fusA2																				NaN	NaN	NaN	
PA2377						3,5	2,5														0,309	1,000	0,891	
PA2398	fpvA						0,5														NaN	NaN	NaN	
PA2439						1,0															1,000	1,000	1,000	
PA2451								8,5	4,5	5,5	24,5	20,0									0,000	0,000	0,000	
PA2452								8,5	9,0	15,0	33,0	25,5									0,000	0,006	0,005	
PA2453								1,0	0,5	1,0	0,5	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,002	0,009	0,023		
PA2462												2,0								1,000	0,138	1,000		
PA2493	mexE							1,0												1,000	1,000	1,000		
PA2616	trxB1											1,0								1,000	1,000	1,000		
PA2623	icd																			0,000	0,006	0,006		
PA2624	idh																			1,000	1,000	1,000		
PA2659																				NaN	NaN	NaN		
PA2758																				NaN	NaN	NaN		
PA2760	oprQ																			0,761	1,000	0,627		
PA2787	cpg2																			0,028	0,028	0,028		
PA2828																				1,000	1,000	1,000		
PA2862	lipA																			0,001	0,024	0,020		
PA2939																				0,000	0,000	0,000		
PA2966	acpP																			0,540	0,656	0,840		
PA2970	rpmF																			NaN	NaN	NaN		
PA3029	moaB2																			0,028	0,028	0,028		
PA3031																				NaN	NaN	NaN		
PA3117	asd																			NaN	NaN	NaN		
PA3123																				NaN	NaN	NaN		
PA3166	pheA																			0,302	1,000	0,889		
PA3181																				1,000	1,000	1,000		
PA3183	zwf																			NaN	NaN	NaN		
PA3190																				1,000	1,000	1,000		
PA3301																				NaN	NaN	NaN		
PA3313																				0,008	0,000	0,000		
PA3319	plcN																			NaN	NaN	NaN		
PA3328																				NaN	NaN	NaN		
PA3361	lecB																			NaN	NaN	NaN		
PA3397	fpr																			NaN	NaN	NaN		
PA3407	hasAp																			0,000	0,000	0,001		

Genbank Nummer	Name	SC5314										SC5314 + PAO1										ANOVA p-Werte		
		1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	Wachstum	Zeit	Interaktion		
PA3421																				1,000	1,000	1,000		
PA3441																				NaN	NaN	NaN		
PA3529																				0,028	0,028	0,028		
PA3531	bfrB																			1,000	1,000	1,000		
PA3635	eno																			NaN	NaN	NaN		
PA3652	upps																			1,000	1,000	1,000		
PA3724	lasB																			0,000	0,000	0,001		
PA3785																				0,330	1,000	0,878		
PA3807	ndk																			1,000	1,000	1,000		
PA3836																				1,000	0,128	1,000		
PA3922																				0,000	0,000	0,000		
PA3923																				1,000	1,000	1,000		
PA4031	ppa																			0,083	0,052	0,118		
PA4067	oprG																			NaN	NaN	NaN		
PA4175	piv																			0,000	0,000	0,000		
PA4226																				1,000	1,000	1,000		
PA4228	pchD																			1,000	1,000	1,000		
PA4235	bfrA																			NaN	NaN	NaN		
PA4236	katA																			0,001	0,060	0,033		
PA4237	rplQ																			NaN	NaN	NaN		
PA4239	rpsD																			NaN	NaN	NaN		
PA4241	rpsM																			NaN	NaN	NaN		
PA4248	rplF																			NaN	NaN	NaN		
PA4251	rplE																			NaN	NaN	NaN		
PA4255	rpmC																			NaN	NaN	NaN		
PA4256	rplP																			NaN	NaN	NaN		
PA4257	rpsC																			NaN	NaN	NaN		
PA4258	rplV																			NaN	NaN	NaN		
PA4263	rplC																			NaN	NaN	NaN		
PA4265	tufA																			0,353	0,073	0,044		
PA4266	fusA1																			1,000	1,000	1,000		
PA4269	rpoC																			1,000	1,000	1,000		
PA4356	xenB																			NaN	NaN	NaN		
PA4366	sodB																			0,048	0,740	0,663		
PA4370	icmP																			1,000	1,000	1,000		
PA4385	groEL																			0,312	0,276	0,742		

Genbank Nummer	Name	SC5314 + PA01												ANOVA p-Werte		
		1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	Wachstum	Zeit	Interaktion
PA4386	groES													NaN	NaN	NaN
PA4431	rplM													NaN	NaN	NaN
PA4433	rplM													NaN	NaN	NaN
PA4489														NaN	NaN	NaN
PA4497														1,000	1,000	1,000
PA4525	pilA													0,003	0,024	0,021
PA4554	pilY1													NaN	NaN	NaN
PA4568	rplU													0,003	0,001	0,012
PA4602	glyA3													NaN	NaN	NaN
PA4625	cdrA													NaN	NaN	NaN
PA4648														0,003	0,003	0,003
PA4694	ihvC													NaN	NaN	NaN
PA4761	dnaK													0,028	0,028	0,028
PA4792														1,000	0,128	1,000
PA4847	accB													1,000	1,000	1,000
PA4858														0,000	0,004	0,001
PA4913														0,000	0,000	0,000
PA4922	azu													0,000	0,086	0,041
PA4934	rpsR													NaN	NaN	NaN
PA4977														NaN	NaN	NaN
PA4978														1,000	1,000	1,000
PA5033														0,001	0,002	0,002
PA5046														1,000	1,000	1,000
PA5053														NaN	NaN	NaN
PA5067	hisE													NaN	NaN	NaN
PA5076														NaN	NaN	NaN
PA5119	glnA													0,342	1,000	0,882
PA5153														NaN	NaN	NaN
PA5171	arcA													0,001	0,000	0,002
PA5172	arcB													1,000	1,000	0,615
PA5214	gcvH1													0,000	0,000	0,004
PA5240	trxA													NaN	NaN	NaN
PA5243	hemB													NaN	NaN	NaN
PA5288	glnK													1,000	1,000	1,000
PA5303														0,000	0,086	0,056
PA5316	rpmB													1,000	1,000	1,000

Genbank Nummer	Name	SC5314										SC5314 + PAO1					PAO1					ANOVA p-Werte		
		1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h	48h	Wachstum	Zeit	Interaktion		
PA5317																				NaN	NaN	NaN		
PA5339																				0,393	0,556	0,831		
PA5348																			1,0	NaN	NaN	NaN		
PA5359																			0,5	NaN	NaN	NaN		
PA5378																			3,0	0,024	0,024	0,024		
PA5489	dsbA																		1,5	0,297	1,000	0,883		
PA5505																			2,0	1,000	0,138	1,000		
PA5545																			2,0	0,561	0,300	0,986		
PA5554	atpD																		1,0	1,000	1,000	1,000		
PA5556	atpA																		0,5	NaN	NaN	NaN		

Tabelle 0.2. Vergleich der biologischen (1-3) und technischen (4-5) Replikate.

Genbank Nummer	Name	SC5314					t-Test p-Wert
		Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	
orf19.1097	Als2			2		2	1,0000
orf19.1110	orf19.1110				1		NaN
orf19.1239	orf19.1239	1	1	3	1		1,0000
orf19.1442	Plb4.5	5	4	5	6	5	1,0000
orf19.1490	Msb2	5	7	7	6	5	1,0000
orf19.151	Tpo5	1					NaN
orf19.1671	Utr2	9	6	7	7	7	1,0000
orf19.1690	Tos1	25	19	20	25	24	1,0000
orf19.1779	Mp65	22	23	22	22	23	1,0000
orf19.1816	Als3	12	10	11	11	10	1,0000
orf19.2060	Sod5	4	3	4	4	3	1,0000
orf19.2062	Sod4			1			NaN
orf19.220	Pir1	1	1	1	2	3	1,0000
orf19.2451	Pga45	4	3	3	2	3	1,0000
orf19.2460	orf19.2460	1	1		1	1	NaN
orf19.251	orf19.251	1	1	1	1	1	NaN
orf19.2551	Met6					1	NaN
orf19.2706	Crh11	4	3	5	4	5	1,0000
orf19.2770.1	Sod1		1	1	1	1	NaN
orf19.2941	Scw4	2	2	2	1	1	0,0000
orf19.2990	Xog1	4	3	3	4	4	1,0000
orf19.3010.1	Ecm33	1	1	1	2	2	0,0000
orf19.3066	Eng1	1		2	2	1	1,0000
orf19.3087	Ubi3			2	2	2	1,0000
orf19.3117	Csa2	3	6	4	5	4	1,0000
orf19.3374	Ece1	3	2	2	2	1	1,0000
orf19.3499	orf19.3499	3	2	4	4	3	1,0000
orf19.3618	Ywp1	1	1	1	2	1	1,0000
orf19.3642	Sun41	13	7	11	11	13	1,0000
orf19.3651	Pgk1			2			1,0000
orf19.3829	Phr1	14	7	10	13	11	1,0000
orf19.3893	Scw11	1		2		1	1,0000
orf19.3895	Cht2	4	4	4	5	4	1,0000
orf19.395	Eno1		3	4		1	1,0000

Genbank Nummer	Name	SC5314					t-Test
		Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	p-Wert
orf19.4035	Pga4	7	5	5	6	7	1,0000
orf19.4309	Grp2	1	1	1	1	1	NaN
orf19.4393	Cit1		3	5			1,0000
orf19.4555	Als4		2	1	2		1,0000
orf19.4565	Bgl2	4	2	4	5	3	1,0000
orf19.4886	orf19.4886		1	1	1	1	NaN
orf19.4893	orf19.4893				1		NaN
orf19.4899/ orf19.999	Gca1/Gca2	9	4	10	10	8	1,0000
orf19.4934	Op4				1		NaN
orf19.4975	Hyr1	1	2	2	3	4	1,0000
orf19.5024	Gnd1			1			NaN
orf19.5063	Coi1	2	5	6	5	5	1,0000
orf19.5130	Pdi1			1			NaN
orf19.5542	Sap6	7	7	8	7	8	1,0000
orf19.5636	Rbt5				2	3	1,0000
orf19.5645	Met15			1			NaN
orf19.5716	Sap4			2			1,0000
orf19.5718	orf19.5718	3					1,0000
orf19.5741	Als1	8	8	8	10	8	1,0000
orf19.5760	lhd1	1	1	2	2	1	1,0000
orf19.5806	Ald5	2	3	3	2	2	1,0000
orf19.5823	Sgt2				1		NaN
orf19.6081	Phr2	1	1	1	2	2	0,0000
orf19.6202	Rbt4	12	10	12	12	13	1,0000
orf19.6274	Pbr1	5	3	3	5	4	1,0000
orf19.6673	Hex1	4	7	6	4	6	1,0000
orf19.6844	lcl1	1	2	2			1,0000
orf19.7030	Ssr1	2		2	1	2	1,0000
orf19.7114	Csa1	3	2	4	2	2	1,0000
orf19.7130	orf19.7130	1					NaN
orf19.7218	Rbe1	3	2	2	4	3	1,0000
orf19.7398.1/ orf19.7417	Tsa1/Tsa1B		1	1	1	1	NaN
orf19.756	Sap7	4			4	4	1,0000

Genbank Nummer	Name	SC5314					t-Test
		Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	p-Wert
orf19.7574	orf19.7574	2	2	1		2	1,0000
orf19.7586	Cht3	6	3	5	5	5	1,0000
orf19.7619	orf19.7619		1	1			NaN
orf19.903	Gpm1	4	2	3	3	3	1,0000
orf19.913.2	orf19.913.2				1	1	NaN
orf19.953.1	Cof1	1	1	1	1	1	NaN
PA1150		2	3		1	2	1,0000
PA1249		5			4	4	1,0000
PA1589					1		NaN
PA1733			1				NaN
PA2452		1			1	1	NaN
PA2828				1	2	1	1,0000
PA4228			1				NaN

Genbank Nummer	Name	SC5314 + PAO1					t-Test
		Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	p-Wert
orf19.1110	orf19.1110		1				NaN
orf19.136	orf19.136	1					NaN
orf19.1490	Msb2	7	6	3	7	5	1,000
orf19.1514	orf19.1514		3				1,000
orf19.1671	Utr2	3	3	3	4	3	1,000
orf19.1690	Tos1	18	16	14	21	20	1,000
orf19.1779	Mp65	19	12	16	19	8	1,000
orf19.1816	Als3	5	4	5	5	4	1,000
orf19.2941	Scw4		1	1	1		NaN
orf19.2990	Xog1				1		NaN
orf19.3010.1	Ecm33			1			NaN
orf19.3117	Csa2	2	2	2	2	3	1,000
orf19.3618	Ywp1		1			1	NaN
orf19.3642	Sun41	9	9	10	9	8	1,000
orf19.3829	Phr1	3	2		2	2	1,000
orf19.3893	Scw11	1			2	1	1,000
orf19.4035	Pga4	5	4	4	7	3	1,000
orf19.4565	Bgl2		2		2		1,000

Genbank Nummer	Name	SC5314 + PA01					t-Test
		Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	p-Wert
orf19.4899/ orf19.999	Gca1/Gca2	3			1	2	1,000
orf19.4975	Hyr1	1	1	1	1	3	1,000
orf19.5542	Sap6	3	4	3	6	3	1,000
orf19.5636	Rbt5	1			1		NaN
orf19.5674	Pga10					2	1,000
orf19.5741	Als1	3	3	3	4	4	0,000
orf19.5760	lhd1	1				1	NaN
orf19.6202	Rbt4	1	4	2	1		1,000
orf19.6274	Pbr1	2	2	2	2	2	NaN
orf19.6673	Hex1	3			3	3	1,000
orf19.7114	Csa1			3			1,000
orf19.7218	Rbe1			2			1,000
orf19.7586	Cht3	1				1	NaN
PA0002	dnaN				3	2	1,000
PA0283	sbp					3	1,000
PA0300	spuD	1	2	1	2	1	1,000
PA0347	glpQ				1	2	1,000
PA0423	pasP	14	15	15	19	19	0,223
PA0572		15	23		20	13	1,000
PA0622					1		NaN
PA0623						6	1,000
PA0807	ampDh3				2	2	0,000
PA0852	cbpD	9	7	8	9	3	1,000
PA0888	aotJ	2	3	2	2	2	1,000
PA0893	argR					2	1,000
PA0973	oprL	2	1	2	3	1	1,000
PA1074	braC				5	1	1,000
PA1086	flgK	4	3	2	4	3	1,000
PA1092	fliC	2		1			1,000
PA1094	fliD	5	3	3	4	6	1,000
PA1148	toxA	17	14	14	22	21	1,000
PA1249	aprA	27	20	23	43	35	1,000
PA1342		4	4	3	4	2	1,000
PA1574			1	1			NaN

Genbank Nummer	Name	SC5314 + PAO1					t-Test
		Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	p-Wert
PA1777	oprF	1		1	1	1	NaN
PA1871	lasA				2		1,000
PA1982	exaA	13	12	3	17	12	1,000
PA2377		6	2		4	1	1,000
PA2395		3	3				1,000
PA2398	fpvA					1	NaN
PA2451		15	15	2	19	21	1,000
PA2452		28	28	3	29	22	1,000
PA2453		1			1	2	1,000
PA2462						4	1,000
PA2616	trxB1	1			2		1,000
PA2714		3		2			1,000
PA2787	cpg2				2	3	1,000
PA2939		34	25	22	34	33	1,000
PA3029	moaB2	2	1	2	3	2	1,000
PA3031					1	1	NaN
PA3117	asd	1	1		1	1	NaN
PA3123						1	NaN
PA3181						1	NaN
PA3190						1	NaN
PA3301		2			1		1,000
PA3313		4	3	3	5	5	1,000
PA3407	hasAp	25	15	13	28	28	1,000
PA3441					1		NaN
PA3529		3			3	2	1,000
PA3724	lasB	10	7	7	8	5	1,000
PA3807	ndk	2	1		1		1,000
PA3836		1	1	1	2	1	1,000
PA3922			3		2	2	1,000
PA4031	ppa	2	1		4	2	1,000
PA4175	piv	25	13	17	26	22	1,000
PA4226		2					1,000
PA4265	tufA	4	1		3	1	1,000
PA4266	fusA1	1			1	3	1,000

Genbank Nummer	Name	SC5314 + PAO1					t-Test
		Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	p-Wert
PA4370	icmP				2		1,000
PA4385	groEL	3			2	2	1,000
PA4386	groES					1	NaN
PA4554	pilY1	16	7	6	16	10	1,000
PA4625	cdrA	15	9	10	14	11	1,000
PA4648						1	NaN
PA4694	ilvC	1			1		NaN
PA4761	dnaK	3	2	2	3	2	1,000
PA4792		1	2		2	1	1,000
PA4847	accB	1	1	1		1	NaN
PA4922	azu	2	3	2	1		1,000
PA5033		4			3	3	1,000
PA5076		1	1	1	1	1	NaN
PA5153		2	1	1	3	3	1,000
PA5172	arcB	3	2		4	2	1,000
PA5240	trxA	1		1	1	1	NaN
PA5288	glnK					2	1,000
PA5303		1				1	NaN
PA5339		2	2	2	3	1	1,000
PA5505		2	2	1	1	5	1,000
PA5545						2	1,000

Abbildung 0.1. Matlab Programm PixelZaehlen zur Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

```

function PixelZaehlen
clear all; close all; clc
global Imin Imax tB
d=dir(pwd); d(~[d.isdir])=[]; d(1:2)=[];
sel=listdlg('ListString',{d.name});
d=d(sel);

for i=1:length(d);
    Folder=d(i).name;
    FileSt =strrep(d(i).name, '.tif_Files','_c1.tif');
    FileBF =strrep(d(i).name, '.tif_Files','_c3.tif');
    FileSave=strrep(d(i).name, '.tif_Files','_');
    FileMeta='_meta.xml';

    % Plotting
    figure
    [fill,out1,rgb]=cellDetection(fullfile(Folder,FileBF));
    % Zeichnen des modifizierten Hellfeldbild
    imshow(rgb)
    saveas(gcf,fullfile(Folder,FileSave),'emf')

    % Calculations
    I=imread(fullfile(Folder,FileSt));
    tB=Belichtung(fullfile(Folder,FileMeta),1);

    % Auf Belichtung normieren
    tBsoll=500;
    I=double(I)*tBsoll/tB;
    in=mean(I(fill))*100/255;

    % Fluoreszenzbild mit Konturen aus HF
    I=uint8(I);
    rgb(:,:,1)=out1*255;
    rgb(:,:,2)=I;
    rgb(:,:,3)=0*I;
    imshow(rgb)
    saveas(gcf,fullfile(Folder,[FileSave,'_F']),'emf')

    % Excel-Daten Schreiben
    if i==1
        % Spaltenbeschriftung
        Tab={'Name','Intensität p. Px. [%/Px]'};
    end
    Tab=[Tab;{FileSave,in}];
end

%
xlswrite(['Auswertung_',SondeRot,'_',SondeGruen,'_Korrigiert.xlsx'],Tab)
xlswrite('Auswertung.xlsx',Tab)
end

function [ varargout ] = cellDetection(File, varargin)
    % Detektionsparameter zur Zellerkennung
    LininenLaenge=5;

```

```
fudgeFactor = 1;

% Detects cells from brightfield
I=imread(File);
[~, threshold] = edge(I, 'sobel');
BW = edge(I, 'sobel', threshold * fudgeFactor);

se90 = strel('line', LininenLaenge, 90);
se0 = strel('line', LininenLaenge, 0);
se45 = strel('line', LininenLaenge, 45);
se125 = strel('line', LininenLaenge, 125);

BWdilate = imdilate(BW, [se90 se0 se45 se125]);
Bwnobord = imclearborder(BWdilate, 4);
BWopen = bwareaopen(BWnobord, 200);
BWclose = bwmorph(BWopen, 'close');
BWfill = imfill(BWclose, 'holes');
BWoutline = bwperim(BWfill);

Ifill=I;
Ifill(BWfill)=255;

rgb(:,:,1)=Ifill;
rgb(:,:,2)=I;
rgb(:,:,3)=I;

varargout{1}=BWfill;
varargout{2}=BWoutline;
varargout{3}=rgb;
end

function tB=Belichtung(File,Channel)
    xDoc = xmlread(File);
    V43 = xDoc.getElementsByTagName('V43');

    st0 = char(V43.item(Channel).getFirstChild.getData);
    tB = str2double(strrep(st0, ',', '.'));
end
```

## Danksagung

Herzlich danken möchte ich...

Prof. Dr. Thomas Hirth für die Möglichkeit meine Promotion am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik durchzuführen.

PD Dr. Steffen Rupp für die Betreuung dieser Arbeit und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Prof. Dr. Bernhard Hauer für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Iris Trick für die Betreuung und das große Interesse an diesem Projekt.

Dr. Ekkehard Hiller für die vielseitigen wissenschaftlichen Diskussionen, Ideen und Ratschläge und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Marco Dehling für sein Interesse und der engagierten Arbeit mit *E. coli* im Rahmen einer Diplomarbeit.

den Kollegen der Abteilungen MBT und UBT, besonders den Arbeitsgruppen Infektionsbiologie und Arraytechnologie, Molekulare Zelltechnologie und Grenzflächenbiologie für die Hilfsbereitschaft, das nette Arbeitsklima und die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche. Besonderer Dank gilt Monika Riedl für die Hilfe mit den rasterelektronischen Aufnahmen und Tino Elter für die Unterstützung mit Matlab.

meinen Eltern und meiner Familie für die immerwährende Unterstützung und dafür, dass ihr immer für mich da seid!



## Lebenslauf

Frauke Gina Purschke

geboren am 21. März 1982 in München

- seit 01/2008                      Promotion am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik IGVT der Universität Stuttgart und dem Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (PD Dr. Steffen Rupp)
- 03/2007 – 07/2007              Wissenschaftliche Angestellte am Department of Biochemistry, Cellular and Molecular Biology der University of Tennessee, USA (Assistant Professor Gladys Alexandre, PhD)
- 02/2007                              Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg (PD Dr. Birgit Scharf)
- 04/2006 – 01/2007              Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg zum Thema (PD Dr. Birgit Scharf)  
Untersuchungen zur Funktion von CheX in der chemotaktischen Signalkette von *Sinorhizobium meliloti*
- 10/2002 – 01/2007              Studium der Biologie an der Universität Regensburg  
Abschluß: Diplom Biologin  
Prüfungsfächer: Genetik, Mikrobiologie, Zoologie
- 1992 – 2002                        Edith-Stein-Gymnasium in München  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## Veröffentlichungen:

Purschke, F.G., E. Hiller, I. Trick, S. Rupp. Flexible survival strategies of *Pseudomonas aeruginosa* result in increased fitness compared to *Candida albicans* in biofilms. Submitted to Molecular & Cellular Proteomics

## Konferenzbeiträge:

Purschke, F.G., E. Hiller, I. Trick, S. Rupp. Flexible survival strategies of *Pseudomonas aeruginosa* result in increased fitness compared to *Candida albicans* in biofilms. 2012. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Berlin

Purschke, F., A. Burger-Kentischer, S. Rupp, I. Trick, T. Hirth. 2011. Analysis of the secretome during the formation of biofilms by *Candida albicans*. HFP 2011, La Colle sur Loup, Frankreich

Purschke, F., A. Burger-Kentischer, S. Rupp, I. Trick, T. Hirth. 2010. Development of reporter strains to analyse biofilms. Biofilms IV, Winchester, UK

Purschke, F., A. Burger-Kentischer, S. Rupp, I. Trick, T. Hirth. 2010. Communication in biofilms between different species: *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. 3. gemeinsame Tagung von VAAM und DGHM, Hannover

Purschke F., I. Trick, A. Burger-Kentischer, S. Rupp, T. Hirth. 2009. Communication in biofilms between different species: *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. Eurobiofilms, Rom, Italien

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Stuttgart, August 2012

Frauke Purschke