

Die Funktion der c-di-GMP modulierenden
Membranproteine NbdA und MucR in
Pseudomonas aeruginosa

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der
Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

angefertigt im

Fachbereich Biologie
Abteilung Mikrobiologie

vorgelegt von

Martina Rüger

Wissenschaftliche Aussprache: Kaiserslautern, 08.07.2019

Referent: Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel
Korreferent: Prof. Dr. Matthias Hahn
Vorsitz: Prof. Dr. Johannes Herrmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Der Modellorganismus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 Motilität und Biofilmbildung bei <i>P. aeruginosa</i>	2
1.3 <i>Quorum Sensing</i> bei <i>P. aeruginosa</i>	3
1.4 Sekundäre Botenstoffe	6
1.5 Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP	6
1.5.1 Synthese und Hydrolyse von c-di-GMP	6
1.5.2 Effektoren von c-di-GMP	7
1.5.3 Die physiologische Bedeutung von c-di-GMP	8
1.6 Die Membranproteine NbdA und MucR	10
1.6.1 Die NO-induzierte Dispersion	10
1.6.2 Die Struktur von NbdA und MucR	11
1.6.3 Bekannte Funktionen von MucR	12
1.6.4 Die putative Rolle von NbdA bei der NO-induzierten Dispersion	14
1.7 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Bakterienstämme	17
2.2 Vektoren	18
2.3 Oligonukleotide	20
2.4 Chemikalien und Enzyme	21
2.5 Nährmedien und Lösungen	22
2.6 Medienzusätze und Antibiotika	25
2.7 Antikörper	25
2.8 Kits	25
2.9 Verbrauchsmaterial	26
2.10 Geräte	26
2.11 Mikrobiologische Methoden	27
2.11.1 Kultivierung von Bakterienstämmen	27
2.11.2 Lagerung von Bakterien	27
2.11.3 Bestimmung der Zelldichte	27
2.11.4 Untersuchung des Wachstums	27
2.11.5 Untersuchung der Biofilmbildung	27
2.11.6 Auflösung von statischen Biofilmen mit Stickstoffmonoxid	27
2.11.7 Kristallviolett-Färbung	28
2.11.8 Nachweis von Exopolysacchariden der EPS	28
2.11.9 Untersuchung der Schwimmbewegung	28
2.11.10 Untersuchung der Schwärmbewegung	28
2.11.11 Untersuchung der Twitching-Bewegung	29

2.11.12	Phänotypische Charakterisierung der Überproduktion von NbdA und NbdA-AAL	29
2.12	Molekularbiologische Methoden	31
2.12.1	Polymerase-Kettenreaktion	31
2.12.2	<i>Splicing-by-Overlap-Extension-PCR</i>	32
2.12.3	Kolonie-PCR	32
2.12.4	Reinigung von PCR-Produkten	33
2.12.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.12.6	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.12.7	Gelextraktion	34
2.12.8	Restriktion von DNA	34
2.12.9	Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.12.10	<i>Gibson Assembly</i>	35
2.12.11	Ortsspezifische Mutagenese	35
2.12.12	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.12.13	Herstellung elektrokompeter <i>P. aeruginosa</i> -Zellen	35
2.12.14	Transformation in chemokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.12.15	Transformation in elektrokompeter <i>P. aeruginosa</i> -Zellen	36
2.12.16	Diparentales <i>Mating</i>	36
2.12.17	Präparation von Plasmid-DNA	36
2.12.18	Präparation von chromosomaler DNA aus <i>P. aeruginosa</i>	36
2.12.19	Sequenzanalyse von DNA	36
2.12.20	Konstruktion markerloser Deletionsmutanten	37
2.12.21	Konstruktion markerhaltiger Deletionsmutanten	37
2.13	Proteinbiochemische und bioanalytische Methoden	37
2.13.1	Heterologe Proteinproduktion in <i>E. coli</i>	37
2.13.2	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen enzymatischer Aktivität in <i>E. coli</i>	38
2.13.3	<i>In-vivo</i> -Nachweis einer putativen NO-Sensor-Funktion	38
2.13.4	Homologe Proteinproduktion in <i>P. aeruginosa</i>	39
2.13.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.13.6	Coomassie-Färbung	40
2.13.7	Kolloidale-Coomassie-Färbung	40
2.13.8	Western-Blot-Transfer	40
2.13.9	Immunologischer Nachweis von Strep- <i>tagII</i> -Fusionsproteinen	41
2.13.10	Tryptischer In-Gel-Verdau	41
2.13.11	Elektrospray-Ionisations-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie	42
2.13.12	Extraktion von Metaboliten aus <i>P. aeruginosa</i> -Flüssigkulturen	42
2.13.13	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	43
2.13.14	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Charakterisierung der Mutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$	45
3.1.1	Untersuchung des Wachstums	46
3.1.2	Nachweis der Exopolysaccharidproduktion	47
3.1.3	Untersuchung der statischen Biofilmbildung	47
3.1.4	Untersuchung der NO-induzierten Auflösung statischer Biofilme	48
3.1.5	Untersuchung der Motilität	49
3.1.6	Bestimmung des intrazellulären c-di-GMP- und GMP-Spiegels	51
3.2	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen enzymatischer Aktivität	51
3.2.1	Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität von NbdA und MucR	52
3.2.2	Nachweis der Diguanylatzyklase-Aktivität von MucR	55

3.2.3	Etablierung eines <i>in-vivo</i> -Systems zur Wahrnehmung von NO	56
3.2.4	Nachweis der putativen NO-Sensor-Funktion von NbdA und MucR	56
3.3	Charakterisierung der homologen Überproduktion von NbdA	58
3.3.1	Detektion des homolog überproduzierten NbdA in PAO1	58
3.3.2	Untersuchung des Wachstums	59
3.3.3	Untersuchung der Motilität	60
3.3.4	Nachweis der Sekretion von Rhamnolipiden	62
3.3.5	Untersuchung der Adhäsion und der Biofilmbildung	63
3.3.6	Bestimmung des intrazellulären c-di-GMP- und GMP-Spiegels	65
3.4	Charakterisierung der homologen Überproduktion von NbdA-AAL	66
3.4.1	Nachweis des Aktivitätsverlusts von NbdA-AAL	66
3.4.2	Untersuchung des Wachstums	68
3.4.3	Untersuchung der Motilität	68
3.4.4	Nachweis der Sekretion von Rhamnolipiden	71
3.4.5	Untersuchung der Adhäsion und der Biofilmbildung	72
4	Diskussion	74
4.1	Einblick in die transkriptionelle Regulation von <i>nbdA</i>	74
4.2	Charakterisierung der Deletionsmutanten	76
4.2.1	Die Deletion von <i>nbdA</i> hat keine Auswirkung auf den globalen c-di-GMP-Spiegel	76
4.2.2	Ist MucR ein bifunktionelles Enzym?	78
4.2.3	NbdA und MucR sind nicht in die NO-induzierte Dispersion involviert	79
4.3	Regulation der enzymatischen Aktivität von NbdA und MucR	80
4.3.1	Die AGDEF-Domäne ist essentiell für die PDE-Aktivität von NbdA	80
4.3.2	Die GGDEF-Domäne inhibiert die <i>in-vivo</i> -PDE-Aktivität von MucR	82
4.4	Welche Rolle spielt die MHYT-Domäne bei NbdA und MucR?	84
4.5	NbdA - Mehr als nur eine Phosphodiesterase?	86
	Zusammenfassung	90
	Summary	91
	Literaturverzeichnis	VI
	Danksagung	XXIV
	Curriculum vitae	XXV
	Eidesstattliche Erklärung	XXVI

Abkürzungsverzeichnis

5'-RACE	5'-rapid-amplification-of-cDNA-ends
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
ÜN	über Nacht
AHL	N-Acyl-Homoserin-Lakton
AmrZ	<i>alginate and motility regulator Z</i>
BM2	Basal Medium 2
c-di-GMP	bis-(3'-5')-zyklisches di-Guanosinmonophosphat
CAA	Casaminosäuren
DGC	Diguanylatzyklase
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanz
ESI-LC-MS	Elektrospray-Ionisations-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H-NOX	<i>heme-nitric oxide/oxygen</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IQS	<i>Integrated Quorum Sensing</i>
LB	Luria Bertani
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
MorA	<i>motility regulator A</i>
NbdA	<i>NO-induced biofilm dispersion locus A</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OD _x	Optische Dichte bei x nm
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAS	Per-Arnt-Sim
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pGpG	5'-Phosphoguananylyl-(3'-5')-guanosin
PQS	<i>Pseudomonas</i> Quinolon Signal
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RbdA	<i>regulation of biofilm disposal A</i>
RBS	ribosomale Bindestelle
RT	Raumtemperatur
SadC	<i>surface attachment defective C</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNP	Sodiumnitroprussid
SOE-PCR	<i>Splicing-by-Overlap-Extension-PCR</i>

sRNA	kleine RNA
Tet150	150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tetrazyklin
TLS	Translationsstart
TSS	Transkriptionsstart
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Pseudomonas aeruginosa*

Die Gattung *Pseudomonas* gehört einer der vielfältigsten Gruppen im Bakterienreich an [122] und wird der Klasse der γ -Proteobakterien zugeordnet [21]. Einer der bislang am besten untersuchten Vertreter der Gattung ist *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* ist ein Gram-negatives, monotrich begeißeltes Bakterium mit einer stäbchenförmigen Struktur [224]. Sein Genom umfasst 5,5 Mbp bis 7 Mbp [215, 137] und zählt zu den größten bakteriellen Genomen [227]. Das Genom des Stammes PAO1 wurde im Jahr 2001 vollständig sequenziert und erreicht mit 5570 offenen Leserahmen (ORFs) die Komplexität niederer Eukaryoten [227].

Neben seiner aeroben Lebensweise ist das Bakterium unter anaeroben Bedingungen zur Denitrifikation und zur Gärung befähigt. Zudem ist es in der Lage viele Nährstoffquellen wie unter anderem Aminosäuren, aliphatische Alkohole und Zuckerderivate zu nutzen [224]. Durch seine metabolische Vielseitigkeit und seine hohe Anpassungsfähigkeit ist es ubiquitär verbreitet. Als opportunistisches Pathogen nutzt es Tiere und Menschen als Wirt [25]. Vorallem geschwächte Personen mit einer Immunsuppression oder mit Brandwunden sowie Krebspatienten und Neugeborene gehören zu den Risikogruppen für Infektionen mit dem Keim [25]. *P. aeruginosa* verursacht nosokomiale Erkrankungen der Atem- und Harnwege [87, 230], Infektionen von Kathetern [149] sowie Sepsis [186]. Bei Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) tritt oftmals eine chronische Infektion der Lunge mit dem Pathogen auf [100], welche meist die Ursache für ein Lungenversagen ist [148].

P. aeruginosa-Infektionen sind schwierig zu behandeln, da das Bakterium neben seiner intrinsischen Antibiotika-Resistenz [83] ebenso die Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzt. Diese vermittelt eine erhöhte Resistenz gegenüber antibakteriellen Substanzen und der Immunabwehr des Wirts [148]. Dazu trägt auch das Repertoire an zahlreichen Regulatoren, Virulenzfaktoren, Zwei-Komponenten-Systemen [227] und Transportern [83] des Pathogens bei.

1.2 Motilität und Biofilmbildung bei *P. aeruginosa*

Die bakterielle Chemotaxis ermöglicht eine schnelle Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen [33]. Sie spielt sowohl bei der Fortbewegung, als auch bei der Ausbildung von pathogenen Biofilmen von *P. aeruginosa* eine entscheidende Rolle [12, 164, 214]. *P. aeruginosa* unterscheidet sich von den meisten Bakterien, da es in der Lage ist verschiedene Arten der Bewegung auszuführen. Neben passiven Motilitätsformen, die unabhängig von Zellanhängseln sind und lediglich auf der Produktion von Biotensiden zur Verringerung der Oberflächenspannung basieren [165], werden prinzipiell die drei Motilitätsformen Schwimmen, Schwärmen und Twitching unterschieden.

Die Schwimmbewegung findet im wässrigen Milieu statt und wird über die polare Flagelle des Bakteriums vermittelt. Die Flagelle sowie das Chemotaxis-System ist ähnlich zu dem Bewegungsmechanismus in *Escherichia coli* [118, 153]. Im Gegensatz zum Taumeln bei *E. coli* beruht das Schwimmen bei *P. aeruginosa* jedoch auf einer Vorwärts- und Rückwärtsbewegung, welche über die Rotation der Flagelle im oder gegen den Uhrzeigersinn vermittelt wird [234]. Einige Gram-negative Bakterien sind außerdem fähig sich auf halb-festen Oberflächen fortzubewegen, was als Schwärmen bekannt ist [86]. Im Gegensatz zum Schwimmen, das von einem einzelnen Bakterium gesteuert wird, ist die Schwärmbewegung ein multizelluläres Verhalten [68]. Diese Bewegungsform beruht neben der polaren Flagelle auch auf der Verwendung von Typ IV Pili und Rhamnolipiden. Rhamnolipide sind anionische Tenside, die von Bakterien in die Umgebung sezerniert werden. Ihre Funktion ist die Verringerung der Oberflächenspannung, wodurch die Fortbewegung auf halb-festen Oberflächen ermöglicht wird [126]. Schwärmende Zellen zeigen eine veränderte Morphologie. Sie sind für gewöhnlich verlängert, weisen mehrere Flagellen auf und liegen in kompakten Aggregaten vor [110, 120, 126].

Auf festen Oberflächen nutzt das Pathogen ausschließlich Typ IV Pili zu Fortbewegung. Anhand deren Extension und Retraktion wird eine kriechende Bewegung, das Twitchen, ermöglicht. Typ IV Pili sind lange, haarähnliche Strukturen auf der Zelloberfläche von Bakterien [31]. Neben ihrer Bedeutung für die Motilität sind die Zellanhängsel zudem bei der Anheftung an biotische und abiotische Oberflächen sowie der Ausbildung von Biofilmen von Bedeutung [123]. Der Begriff 'Biofilm' ist hierbei definiert als Gemeinschaft von Mikroorganismen, die an Oberflächen adhärirt und von einer selbst-produzierten Extrazellulären Polymeren Substanz (EPS) umgeben ist [45]. Es wird geschätzt, dass etwa 90 % aller Bakterien sessil leben, da dies ihnen im Vergleich zur planktonischen Lebensweise Schutz bietet [45]. Der Lebenszyklus eines Biofilms kann in fünf verschiedene Stadien eingeteilt werden (Abbildung 1.1). Zunächst kommt es zur reversiblen Adhäsion einzelner Zellen an eine Oberfläche. Diese wird über die polare Flagelle von *P. aeruginosa* vermittelt (1) [207]. Die Anheftung über die gesamte Länge der Bakterien erfolgt über Typ IV Pili [172]. Die Bakterien vermehren sich und umhüllen sich mit der EPS, welche vorwiegend aus Wasser, Proteinen, extrazellulärer DNA und Exopolysacchariden besteht [71]. Dies hat die irreversible Anheftung der Zellen zur Folge (2). Die Biofilmmatrix lagert sich zuneh-

ment zwischen die Einzelzellen ein und Mikrokolonien entstehen (3). Dies führt zu einer dreidimensionalen Struktur und allmählich zur Bildung von Makrokolonien (3) sowie zur Reifung des Biofilms. Der reife Biofilm (4) ist zur besseren Nährstoffversorgung und zum Abtransport von Stoffwechselprodukten mit feinen Gängen durchzogen [45, 61]. Aufgrund der zunehmend limitierenden Bedingungen im Biofilm findet letztlich die Dispersion (5) statt. In diesem Stadium lösen sich Einzelzellen ab und können neue Habitate besiedeln [44].

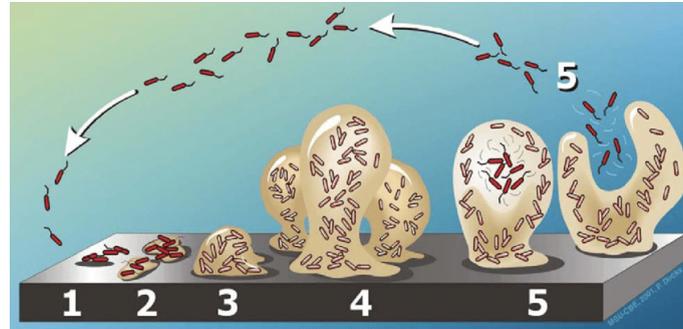


Abbildung 1.1: Lebenszyklus eines Biofilms. Die Biofilmbildung verläuft in fünf Stadien: Nach der reversiblen Adhäsion einer Zelle an eine Oberfläche (1) reproduziert sich diese und die EPS wird synthetisiert (2). Im weiteren Verlauf entstehen Mikrokolonien, welche sich zu Makrokolonien entwickeln (3). Es kommt zur Bildung des reifen Biofilms (4) und schließlich zur Auflösung durch zunehmend limitierende Bedingungen im Biofilm. Zellen des Biofilms lösen sich ab (5) und können erneut Biofilme bilden. Abbildung modifiziert nach [226], entnommen aus der Doktorarbeit von Sohinee Sarkar [206] mit Genehmigung der Autorin.

Während die Auflösung auch passiv durch physikalische Kräfte während allen Stadien der Biofilmentwicklung ausgelöst werden kann, wird die aktive Dispersion als Reaktion auf Umweltsignale durch die Bakterien selbst verursacht [183]. Zu diesen externen Reizen zählen die Verfügbarkeit von Sauerstoff [6] und Nährstoffen [79, 104, 166, 208, 210], Temperaturschwankungen [115, 127] sowie geringe Konzentrationen des zweiatomigen Gases Stickstoffmonoxid (NO) [14, 15, 142, 209].

Bei *P. aeruginosa* spielt während des Biofilm-Lebenszyklus ein bakterielles Kommunikationssystem, das *Quorum Sensing* (QS), eine wichtige Rolle und ist unter anderem bei der Motilität [80], der Produktion von Rhamnolipiden [179], der Kontrolle der DNA-Freisetzung [3] sowie der Biofilmauflösung [49] von Bedeutung.

1.3 *Quorum Sensing* bei *P. aeruginosa*

QS ist ein Zelldichte-abhängiges Zell-Zell-Kommunikationssystem, das Bakterien ermöglicht ab einem kritischen Wert der Populationsdichte Veränderungen im Verhalten auszulösen [72, 246]. Dies beruht auf Signalmolekülen, den sogenannten Autoinduktoren, welche ab einem Schwellenwert relativ zur Zelldichte (*Quorum*), die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bewirken. QS kann innerhalb einer Bakterienspezies oder zwischen verschie-

denen Bakterienarten auftreten. Zudem kann das Kommunikationssystem die Immunantwort des Wirts modulieren [66]. Es wurde 1979 in dem Photobakterium *Vibrio fischeri* entdeckt, welches planktonisch lebt [72] oder als Symbiont die Leuchtorgane einiger marinen Fischen besiedelt [72, 157, 202]. Bei einer hohen Zelldichte erzeugt das Bakterium mithilfe des Enzyms Luciferase Biolumineszenz [168]. Diese wird über die QS-Moleküle LuxI und LuxR des *lux*-Operons reguliert. LuxI ist eine Autoinduktor-Synthase, die das Signalmolekül N-3-oxo-hexanoyl-Homoserin-Lakton bildet [57]. Dies bindet spezifisch an den Transkriptionsfaktor LuxR [2, 84], wodurch die Expression der Gene des *lux*-Operons aktiviert wird. Das gebundene LuxR induziert zudem die Transkription des *luxI*-Gens, was in einem Anstieg der Autoinduktor-Konzentration resultiert und somit einen positiven Rückkopplungsmechanismus zur Folge hat [60].

Ungefähr 10 % der Gene von *P. aeruginosa* werden über QS reguliert [250]. Das Bakterium besitzt zwei QS-Systeme, die auf N-Acyl-Homoserin-Laktonen (AHLs) basieren: Das Las- und das Rhl-System. Diese bestehen jeweils aus einer AHL-Synthase (LasI und RhlI) und einem AHL-Rezeptorprotein (LasR und RhlR) [175, 169]. Der Autoinduktor des Las-Systems ist N-3-Oxododecanoylhomoserin-Lakton (3-oxo-C12-HSL) [218]. 3-oxo-C12-HSL bindet an LasR, woraufhin der entstandene Komplex als Transkriptionsfaktor agiert und die Transkription der Zielgene reguliert [218]. Dies führt zu einer verstärkten Expression von *lasI* und induziert die Produktion von Virulenzfaktoren wie der Elastase LasB [113], der Protease LasA [238] und dem Exotoxin A [75].

Beim zweiten AHL-System, dem Rhl-System, ist N-Butanoylhomoserin-Lakton (C4-HSL) als Autoinduktor beteiligt [179, 178]. Die Interaktion von C4-HSL mit dem Transkriptionsfaktor RhlR bewirkt eine erhöhte *rhlI*-Expression, was zu einer zunehmenden Synthese von Rhamnolipiden [179], Pyocyanin [136], Lektinen [252] sowie der Elastase LasB [179] führt. Der Komplex aus RhlR und C4-HSL inhibiert zudem die Transkription von Genen des QS-Systems *Pseudomonas*-Quinolon-Signal (PQS) [34]. Das Rhl-System unterliegt außerdem der Regulation des Las- und des PQS-Systems (Abbildung 1.2) [135, 156].

Im Jahr 1999 wurde in *Pseudomonas aeruginosa* PQS als weitere Komponente von QS entdeckt [181]. PQS ist ein 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolon, welches gemeinsam mit seinem Vorläufermolekül 2-Heptyl-4-quinolon (HHQ) als Autoinduktor für den Transkriptionsfaktor PqsR fungiert [53]. Die Enzyme des Genclusters *pqsABCD* synthetisieren ausgehend von Anthranilat HHQ. Dies wird in einem weiteren Schritt durch PqsH in PQS umgewandelt (Abbildung 1.2) [73]. PQS wird unter Stressbedingungen in das QS-Netzwerk inkorporiert und ist für die Produktion einiger Virulenzfaktoren wie Pyocyanin [34, 73], Elastase [181], Lektin PA-IL [54] und Rhamnolipiden [156] von Bedeutung. Zudem fördert es die Adhäsion und die Biofilmbildung [54]. Das PQS-System steht wie das Rhl-System in regulatorischer Abhängigkeit von LasR, wodurch die QS-Systeme miteinander verknüpft sind [54]. Im Gegenzug kann PQS die Transkription des *rhlI*-Gens erhöhen (Abbildung 1.2) [156].

Das zuletzt entdeckte System *Integrated Quorum Sensing* (IQS) beruht auf einer neuar-

tigen Autoinduktor-Klasse, dem 2-(2-Hydroxyphenyl)-thiazol-4-carbaldehyd, welches von den Enzymen des *ambBCDE*-Operons gebildet wird [138]. Das IQS-System ist in die Regulation der Bildung von PQS, Pyocyanin, Rhamnolipiden sowie der Elastase involviert. Wie die übrigen QS-Systeme ist es LasR untergeordnet (Abbildung 1.2). Das IQS-System wird bei Stress durch Phosphatmangel induziert, was sich positiv auf das untergeordnete PQS- und Rhl-System auswirkt [138].

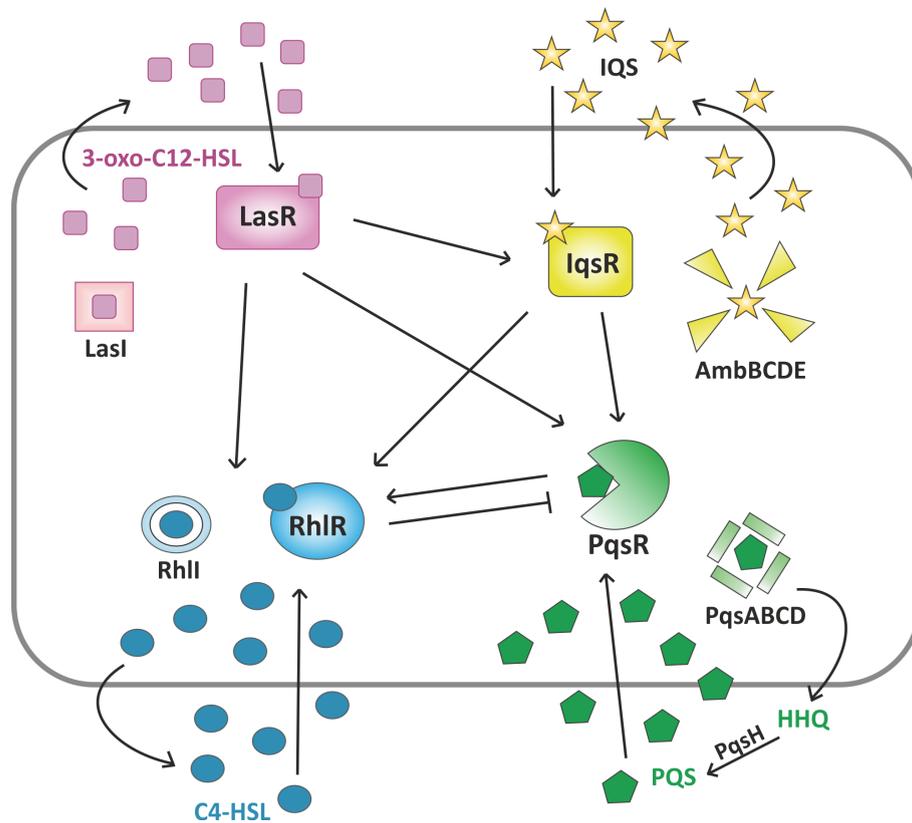


Abbildung 1.2: Überblick über die Quorum-Sensing-Systeme in *P. aeruginosa*. Die QS-Systeme unterliegen einer hierarchischen Ordnung. Das Las-System (LasI und LasR, violett) befindet sich an der Spitze dieser Hierarchie. LasI produziert den Autoinduktor 3-oxo-C12-HSL, der an den Regulator LasR bindet. Der Komplex aktiviert daraufhin die Transkription von *rhlI* und *rhlR* des Rhl-Regulons (blau). Weiterhin unterliegen das IQS- (gelb) und das PQS-System (grün) der Kontrolle von LasR. Der von RhlI gebildete Autoinduktor C4-HSL geht eine Bindung mit dem Transkriptionsregulator RhlR ein und inhibiert das PQS-System. Die Quinolone HHQ und PQS dienen als Autoinduktoren für PqsR. Das Vorläufermolekül HHQ wird ausgehend von Anthranilat durch die Genprodukte des Operons *pqsABCD* synthetisiert und durch das Enzym PqsH zu PQS umgesetzt. PqsR ist in der Lage die Transkription von *rhlI* zu steigern, was sich positiv auf das Rhl-System auswirkt. Bei Phosphatmangel reguliert IqsR das unterliegende PQS- und Rhl-System. Die Biosynthese des Autoinduktors 2-(2-Hydroxyphenyl)-thiazol-4-carbaldehyd (IQS) wird durch die Genprodukte des *ambBCDE*-Operons vorgenommen.

1.4 Sekundäre Botenstoffe

Sekundäre Botenstoffe leiten wahrgenommene Signale an der Zelloberfläche an Zielmoleküle im Zellinneren weiter. Oftmals wird durch diesen Prozess eine Signalverstärkung bewirkt, so dass grundlegende biochemische Veränderungen in der Zelle ausgelöst werden [231]. Ein durch sekundäre Botenstoffe vermitteltes Signaltransduktionssystem besteht grundsätzlich aus vier Komponenten: Den für die Synthese und den Abbau des Botenstoffs verantwortlichen Enzymen, einem bindenden Effektormolekül sowie einem Zielmolekül, das nach der Interaktion mit dem Effektormolekül für eine Signalantwort sorgt [93]. Zu den sekundären Botenstoffen zählen beispielsweise Calcium [121], NO [58] sowie zyklische Nucleotide [43, 103, 197, 229, 254].

Zyklische Nucleotide wurden in ihrer Funktion als sekundäre Botenstoffe bislang hauptsächlich wegen ihrer regulatorischen Funktionen in Eukaryoten untersucht. Einige von ihnen spielen jedoch auch in Bakterien eine große Rolle. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) in *E. coli*. Das Nucleotid bindet an den Transkriptionsfaktor CRP (*catabolite repressor protein*). Daraufhin aktiviert der Komplex aus cAMP und CRP die Expression zahlreicher Gene, die unter anderem für die Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen relevant sind [59]. Ein weiterer bedeutender sekundärer Botenstoff aus der Klasse der zyklischen Nucleotide ist das bis-(3'-5')-zyklische di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP). Dies wurde im Jahr 1987 als erstes zyklisches Dinucleotid im Zusammenhang mit der Regulation des Enzyms Cellulosesynthase in *Gluconacetobacter xylinus* entdeckt [197]. Das Prinzip der c-di-GMP vermittelten Signaltransduktion entspricht im Wesentlichen dem von cAMP, ist jedoch aufgrund der Vielseitigkeit der beteiligten Komponenten komplexer [93].

1.5 Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP

1.5.1 Synthese und Hydrolyse von c-di-GMP

Das Dinucleotid c-di-GMP gilt als der am häufigsten vorkommende sekundäre Botenstoff in Bakterien [196]. Das c-di-GMP-Monomer besteht aus zwei Molekülen Guanosinmonophosphat (GMP), welche über 5'-3'-Phosphodiesterverbindungen zyklisch verknüpft sind [197]. Intrazelluläre Konzentrationen von c-di-GMP werden als Reaktion auf interne und äußere Bedingungen von zwei antagonistisch wirkenden Enzymklassen reguliert. Das Nucleotid wird aus zwei Molekülen Guanosintriphosphat (GTP) von Diguanylatzyklasen (DGCs) synthetisiert und von Phosphodiesterasen (PDEs) hydrolysiert (Abbildung 1.3).

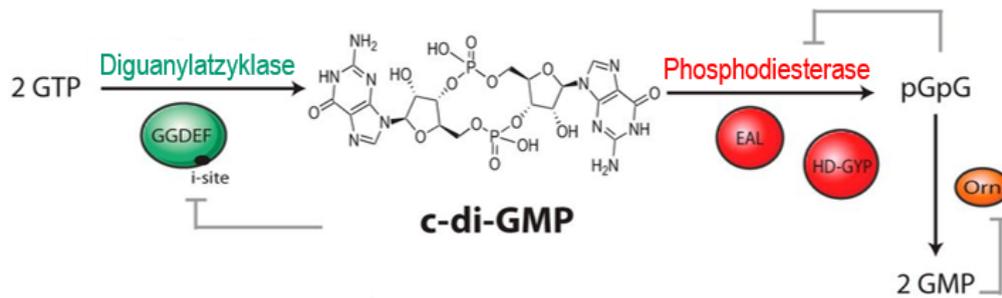


Abbildung 1.3: Synthese und Hydrolyse von c-di-GMP. Das Dinucleotid c-di-GMP wird aus zwei GTP-Molekülen von DGCs (grün) synthetisiert, welche ein konserviertes GGDEF-Motiv besitzen. Über die *i-site* der GGDEF-Domäne wird eine allosterische, nicht kompetitive Produktinhibition der DGC-Aktivität gesteuert. Die Hydrolyse von c-di-GMP erfolgt über PDEs (rot). PDEs mit einem EAL-Motiv linearisieren c-di-GMP zu 5'-Phosphoguanlyl-(3'-5')-guanosin (pGpG), welches daraufhin von der Oligoribonuklease Orn (orange) zu zwei GMP-Molekülen hydrolysiert wird. Die enzymatische Aktivität von Orn kann über eine Produktinhibition unterbunden werden. PDEs, die ein HD-GYP-Motiv tragen, sind in der Lage c-di-GMP direkt zu zwei Molekülen GMP umzusetzen. Abbildung modifiziert nach [241].

Beide Enzymklassen enthalten charakteristische Domänen mit jeweils einem konservierten Motiv. Die Aktivität von DGCs wird mit der GGDEF-Domäne assoziiert. Diese ist nach der korrespondierenden Aminosäuresequenz Gly-Gly-Asp-Glu-Phe benannt und stellt eine essentielle Komponente des aktiven Zentrums dar [177]. Die aktive DGC ist ein Homodimer aus zwei Untereinheiten mit jeweils einer GGDEF-Domäne. Die meisten DGCs unterliegen einer allosterischen Produktinhibition. Bei dieser wird das Produkt an die Bindestelle mit dem charakteristischen Motiv RXXD der GGDEF-Domäne gebunden (*i-site*). Dieser Mechanismus erlaubt die Regulation des GTP-Verbrauchs [40]. C-di-GMP-spezifische PDEs besitzen eine konservierte EAL-Domäne oder eine HD-GYP-Domäne. Bei PDEs mit einer EAL-Domäne ist neben dem konservierten EAL-Motiv das Motiv DDFGTG(YSS) für die Aktivität von Bedeutung [213]. PDEs mit einer HD-GYP-Domäne sind in der Lage c-di-GMP in einer zweistufigen Reaktion direkt zu zwei Molekülen GMP umzusetzen [200]. Bei einer c-di-GMP-Hydrolyse über EAL-spezifische PDEs wird das lineare Produkt 5'-Phosphoguanlyl-(3'-5')-guanosin (pGpG) von der Oligoribonuklease Orn zu zwei Molekülen GMP umgesetzt [171] (Abbildung 1.3).

1.5.2 Effektoren von c-di-GMP

C-di-GMP regulierte Signalwege beruhen auf bindenden Effektormolekülen sowie auf deren Zielmolekülen. Aufgrund des globalen Einfluss von c-di-GMP auf die bakterielle Zellphysiologie wird davon ausgegangen, dass zahlreiche solcher Effektoren und Zielmoleküle vorhanden sind. Mehrere Familien von Effektorproteinen und RNAs wurden in der Vergangenheit identifiziert und hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion charakterisiert [39]. Zu den Effektoren zählen Proteine mit einer PilZ-Domäne, anhand welcher diese in der Lage sind c-di-GMP zu binden. Die Domäne wurde nach dem Protein PilZ aus

P. aeruginosa benannt und ist in die Assemblierung der Typ IV Pili involviert [4]. PilZ-Domänen enthalten zwei konservierte Motive: Ein RXXXR-Motiv mit zwei konservierten Arginin-Resten und ein DXSXXG-Motiv [5]. Ein weiteres Beispiel ist Alg44, ein membranverankertes Protein mit einer cytoplasmatischen PilZ-Domäne, das für die Alginatproduktion in *P. aeruginosa* benötigt wird [158, 170].

Zudem wurden einige Transkriptionsregulatoren als c-di-GMP-bindende Moleküle identifiziert. FleQ ist ein sogenanntes *Enhancer-Binding-Protein* aus *P. aeruginosa*, dessen Aktivität von c-di-GMP kontrolliert wird [9]. Der sekundäre Botenstoff interagiert mit der ATP-Bindestelle von FleQ, wodurch dessen Konformation und transkriptionelle Aktivität modifiziert wird [155]. So fungiert FleQ bei niedrigen c-di-GMP-Konzentrationen als Repressor von Genen des *pel*-Operons, während es bei einem erhöhtem c-di-GMP-Spiegel deren Expression aktiviert [10].

Weiterhin ist bekannt, dass c-di-GMP ein Ligand für eine Klasse von *Riboswitches* ist [228]. *Riboswitches* sind RNA-Elemente, die sich in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) von Genen befinden und dazu fähig sind ihre eigene Expression zu modulieren [221]. Der Effektor ist hierbei eine konservierte RNA-Domäne mit dem Motiv GEMM, welche in der 5'-UTR verschiedener mRNAs auftritt. GEMM steht hierbei für *Genes for the Environment, for Membranes and for Motility*. Das Motiv wird mit Genen assoziiert, die essentiell sind für die natürliche Kompetenz von *Vibrio cholerae* oder der Verwendung von Metalionen als Elektronenakzeptor in *Geobacter sulfurreducens* [248].

1.5.3 Die physiologische Bedeutung von c-di-GMP

Das Signalmolekül c-di-GMP gilt als eine Schlüsselkomponente, die den Wechsel zwischen der planktonischen und der sessilen Lebensweise von einigen Bakterien wie zum Beispiel *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium und *P. aeruginosa* reguliert [220]. Entscheidend hierfür ist der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel: Niedrige Konzentrationen werden mit der Biofilmauflösung, der Motilität sowie der Produktion von Virulenzfaktoren verbunden, wohingegen hohe c-di-GMP-Konzentrationen mit der Adhäsion und der Ausbildung von Biofilmen assoziiert werden (Abbildung 1.4).



Abbildung 1.4: Die Regulation verschiedener physiologischer Funktionen ist abhängig von der c-di-GMP-Konzentration. Niedrige c-di-GMP-Konzentrationen (hellblau) fördern die Motilität, die Dispersion sowie die Synthese von Virulenzfaktoren. Im Gegensatz dazu werden die Adhäsion und die Biofilmbildung, die für die Sessilität nötig sind, durch einen hohen c-di-GMP-Spiegel (dunkelblau) induziert.

Die Motilität ist einer der Hauptprozesse, der von c-di-GMP kontrolliert wird. So wird

die Assemblierung und die Aktivität des bakteriellen Flagellenmotors strikt über den sekundären Botenstoff reguliert. Dies umfasst die Modulation der Expression flagellen-spezifischer Gene [9, 128], die Biosynthese [50, 240] sowie die Funktionalität des Motors [26, 199].

Bei *E. coli* sorgt ein Anstieg der intrazellulären c-di-GMP-Konzentration für die Blockierung des Flagellenmotors durch die Interaktion des c-di-GMP-gebundenen Effektors YcgR mit der Rotor-Stator-Schnittstelle [26, 64, 176]. Zur Hemmung von YcgR und zur Förderung der flagellenabhängigen Schwimmbewegung werden das für die PDE PdeH codierende Gen *pdeH* sowie flagellen-spezifische Gene co-exprimiert (Abbildung 1.5). Bei *P. aeruginosa* hingegen kontrolliert das YcgR-Homolog FlgZ die Schwärmbewegung durch die Wechselwirkung mit dem MotC-MotD-Stator der Flagelle [8].

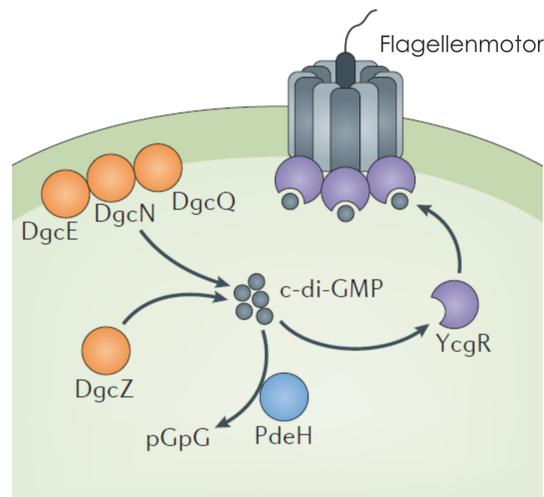


Abbildung 1.5: C-di-GMP-abhängige Regulation des Flagellenmotors in *E. coli*. Die DGCs DgcE, DgcN, DgcQ und DgcZ synthetisieren c-di-GMP, welches an YcgR bindet. Daraufhin interagiert YcgR mit der Rotor-Stator-Schnittstelle des Flagellenmotors, was zu einer Blockierung der Motorfunktion führt. Die PDE-Aktivität von PdeH und die damit verbundene Abnahme des c-di-GMP-Spiegels inaktiviert den Effektor YcgR, wodurch die Funktionalität des Motors wiederhergestellt wird. Abbildung modifiziert nach [109].

Es wird vermutet, dass das Umschalten zwischen der planktonischen und der sessilen Lebensweise nicht schlagartig erfolgt. Vielmehr wird postuliert, dass c-di-GMP während den einzelnen Stadien der Biofilmbildung in komplexen, regulatorischen Schritten involviert ist [241]. Geraten Bakterien in Kontakt mit einer Oberfläche verändert sich ihr Verhalten maßgeblich. Sie exponieren Adhäsine [163], aktivieren Oberflächen-Organellen [46, 147] und produzieren die EPS [96]. Diese Anpassungen werden durch c-di-GMP koordiniert. Der sekundäre Botenstoff reguliert unter anderem die Assemblierung von Typ IV Pili, den bei der Adhäsion relevanten Zellanhängseln, bei einigen Bakterien wie *V. cholerae* [112], *Caulobacter crescentus* [1], *Clostridium difficile* [30] und *P. aeruginosa* [119].

Bezüglich der Dispersion ist bekannt, dass bei *Pseudomonas fluorescens* der c-di-GMP-Effektor LapD bei sinkenden c-di-GMP-Konzentrationen inaktiviert wird. Dies setzt die

Protease LapG frei, welche das Adhäsın LapA schneidet und den Biofilm schwächt [36].

1.6 Die Membranproteine NbdA und MucR

1.6.1 Die NO-induzierte Dispersion

NO ist ein farbloses, zweiatomiges Gas, welches ungehindert in eu- und prokaryotische Zellen diffundieren kann. Aufgrund eines ungepaarten Elektrons ist es sehr reaktiv und kann verschiedene Zellschäden wie die Nitrierung, die Lipidperoxidation sowie die S-Nitrosylierung von Proteinen verursachen [223]. Das Gas kann von exo- oder endogener Herkunft sein: NO wird von eukaryotischen Wirtszellen im Rahmen der Immunabwehr synthetisiert [63]. Zudem kann es von einigen Bakterien wie *P. aeruginosa* als Intermediat oder Nebenprodukt von Stoffwechselwegen wie der Denitrifikation gebildet werden [256].

Es ist bekannt, dass geringe Konzentrationen von NO die Biofilmauflösung über die Stimulation c-di-GMP-spezifischer PDEs auslösen können [14]. In vielen Bakterienarten wie zum Beispiel *Shewanella woodyi* oder *Legionella pneumophila* dienen Häm-basierte Domänen namens H-NOX (*heme-nitric oxide/oxygen*) zur Wahrnehmung des Gases [28, 117, 180]. Diese befinden sich oft in unmittelbarer Nähe von Domänen mit PAS- (Per-Arnt-Sim), HD-GYP-, GGDEF- und EAL-Motiven [7, 29, 107, 183]. Bindet NO an bakterielle H-NOX-Domänen ruft dies Konformationsänderungen hervor, welche die Wechselwirkung mit c-di-GMP-modulierenden Enzymen ermöglicht. Dies bewirkt letztlich die Reduktion des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels und kann die Dispersion induzieren [146]. Es gibt jedoch einige Bakterien wie *P. aeruginosa*, die nicht im Besitz von H-NOX-Proteinen sind, aber trotzdem fähig sind auf das Gas zu reagieren [13]. Bisher wurden bei *P. aeruginosa* die PDEs DipA (*dispersion-induced phosphodiesterase A*) und RbdA (*regulation of biofilm disposal A*) als Sensoren einiger Umweltsignale einschließlich von NO entdeckt [6, 182]. Beide Proteine sind Komponenten des Netzwerks um das zentrale Chemotaxis-Protein BdlA (*biofilm dispersion locus A*), welches eine wichtige Rolle bei der Perzeption äußerer Reize einnimmt [164]. BdlA ist ein Multi-Domänenprotein mit zwei benachbarten PAS-Domänen und einer C-terminalen TarH-Domäne. Es wird vermutet, dass die beiden PAS-Domänen des Proteins für die Wahrnehmung von NO zuständig sind [183]. Obwohl BdlA keine c-di-GMP-modulierende Domänen enthält, führte der Verlust des Proteins in Anwesenheit niedriger NO-Konzentrationen zu einer beeinträchtigten Biofilmauflösung [14].

Kürzlich wurde das Hämoprotein NosP (*NO-sensing protein*) als neuartige Klasse von NO-Sensoren entdeckt. Die Bindung von NO an NosP wird über das Eisen-Ion des Häm-Cofaktoren koordiniert. Daraufhin wird die Aktivität der co-cistronischen Kinase NahK inhibiert, die an der Biofilmregulation beteiligt ist. Der fehlende Phosphotransfer induziert über einen nachgeschalteten, noch unbekanntem Mechanismus die Dispersion [101].

Obwohl einige NO-Sensoren bekannt sind, wurde bislang kein Protein von *P. aeruginosa* identifiziert, das sowohl die NO-Wahrnehmung, als auch die darauf folgende physiologische Antwort in sich vereint. Es wird vermutet, dass die Proteine NbdA und MucR eine derartige Funktion ausüben [142].

1.6.2 Die Struktur von NbdA und MucR

Das Genom von *P. aeruginosa* umfasst eine Vielzahl an DGCs und PDEs. Es wurden bislang drei Proteine mit einer vorhergesagten HD-GYP-Domäne, 18 Proteine mit einer GGDEF-, fünf mit einer EAL-Domäne sowie 16 Hybrid-Proteine mit einem GGDEF/EAL-Motiv entdeckt. Diese Domänen können für sich alleine stehen oder in Verbindung mit einer Empfänger- oder Transmissionsdomäne auftreten, was auf die Modulation ihrer Enzymaktivität als Reaktion auf einen Stimulus hindeutet [241].

Im Jahr 2001 wurde eine neuartige Sensordomäne beschrieben, welche nach ihren konservierten Aminosäureresten MHYT benannt ist. Sie ist membranverankert und besteht aus sechs vorhergesagten Transmembransegmenten, welche über peri- und cytoplasmatische Schleifen verknüpft sind. Drei dieser Transmembransegmente enthalten konservierte Histidin- und Methioninreste auf der periplasmatischen Seite (Abbildung 1.6). Je drei der Histidinreste bilden gemeinsam mit einem Methioninrest eine putative Bindestelle für Kupfer- (Cu^{2+}) Ionen. Es wird vermutet, dass diese Metallionen zweiatomige Gase binden können, weshalb die MHYT-Domäne als Sensor für Sauerstoff (O_2), Kohlenstoffmonoxid (CO) oder NO fungieren könnte [74].

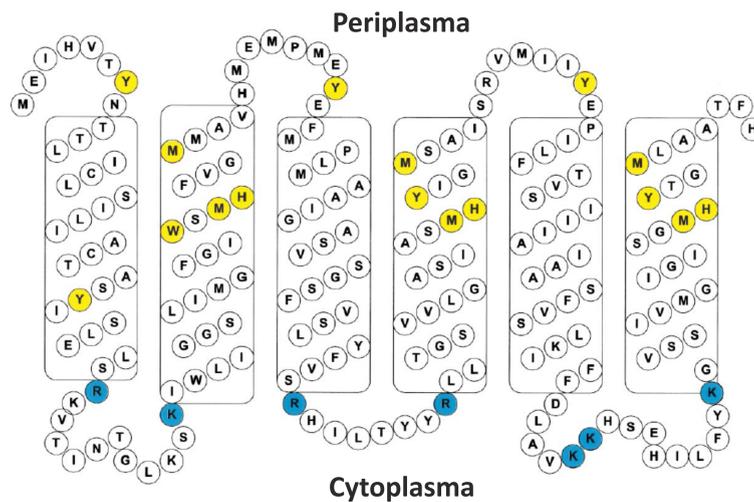


Abbildung 1.6: Hypothetische Membrantopologie der MHYT-Domäne. Konservierte Aminosäurereste, die möglicherweise an der Bindung von Metallionen beteiligt sind, sind gelb markiert. Konservierte Arginin- und Lysinreste der cytoplasmatischen Schleifen sind in blau dargestellt. Abbildung modifiziert nach [74].

Die MHYT-Domäne wurde bisher bei Vertretern der α -, β - und γ -Proteobakterien, bei zwei Gram-positiven Bakterien, einem Cyanobakterium [74] sowie bei filamentösen Pilzen gefunden (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR005330/proteins-matched?start=40>). Dazu zählen unter anderem *Bacillus subtilis*, *C. crescentus* und *Synechocystis* sp., die jeweils ein Protein mit einer solchen Domäne besitzen. Die Genome von *Mesorhizobium loti* und *Oligotropha carboxidovorans* enthalten zwei Kopien der MHYT-Domäne [74].

P. aeruginosa besitzt zwei Membranproteine, die eine MHYT-Domäne aufweisen: NbdA

und MucR. Beide Proteine besitzen eine ähnliche Domänenorganisation mit einer N-terminal lokalisierten MHYT-Domäne und zwei im Cytoplasma befindlichen Domänen. Weiterhin verfügen die Proteine über ein zusätzliches Transmembransegment, das in das Cytoplasma führt (Abbildung 1.7). NbdA enthält eine EAL-Domäne und eine degenerierte GGDEF-Domäne mit einem AGDEF-Motiv [142], wohingegen sich MucR durch eine GGDEF- sowie einer EAL-Domäne mit intakten, konservierten Motiven auszeichnet [88].

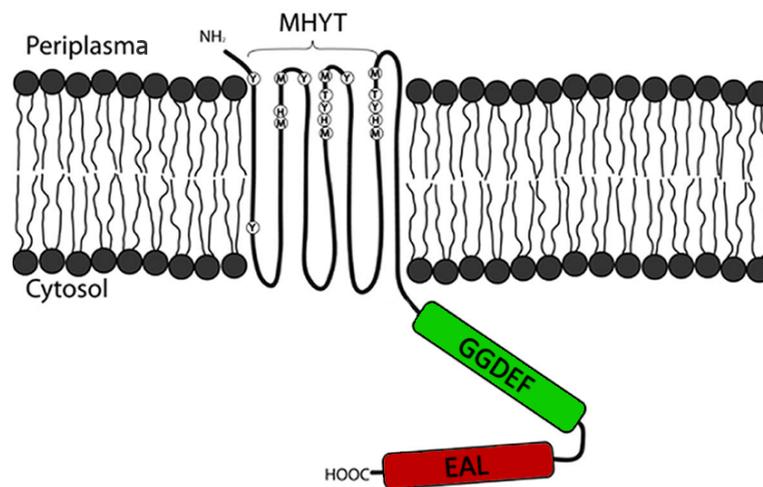


Abbildung 1.7: Vorhergesagte Domänenorganisation der Membranproteine NbdA und MucR. Die nach SMART- und Pfam-Datenbankanalysen abgeleitete Struktur der Membranproteine ist schematisch dargestellt. Die MHYT-Domäne ist in der Membran verankert und das N-terminale Ende (NH₂) ragt in das Periplasma. Am C-Terminus (HOOC) befinden sich die GGDEF- (grün) und die EAL-Domäne (rot). Abbildung modifiziert nach [88].

1.6.3 Bekannte Funktionen von MucR

Das Gen *mucR* (PA1727) des Stammes PAO1 hat eine Größe von 2058 bp und wird von den Genen PA1728 und *bglX* (PA1726) flankiert [227]. Das stromaufwärts lokalisierte *bglX*-Gen codiert für eine periplasmatische β -Glukosidase, die in den Kohlenstoffmetabolismus involviert ist [105]. Der intergenische Bereich zwischen *mucR* und *bglX* beträgt 169 bp. PA1728 befindet sich 351 bp stromabwärts von PA1727 und codiert für ein hypothetisches Protein mit bislang unbekannter Funktion [251].

Im Jahr 2006 wurde erstmals die DGC-Aktivität von MucR im Stamm PA14 beschrieben [132]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Protein ein positiver Regulator der Alginatebiosynthese ist. Diese wird über einen lokal generierten c-di-GMP-Pool von MucR in der Nähe des Alginatebiosyntheseproteins Alg44 moduliert [88]. MucR ist ein bifunktionelles Enzym [245], da sowohl die GGDEF-Domäne, als auch die EAL-Domäne katalytisch aktiv sind [142]. Wang *et al.* zeigten bei dem mukoiden *P. aeruginosa*-Stamm PDO300, dass nicht nur die DGC-, sondern auch die PDE-Aktivität von MucR für die Produktion von Alginate notwendig ist [245]. In diesem Zusammenhang wurde erschlossen, dass die Regulation der Alginatebiosynthese von Nitrat (NO₃⁻) beeinflusst wird. In Anwesenheit

von NO_3^- wird dies zu molekularem Stickstoff reduziert. Das dabei freigesetzte NO führt womöglich zu nitrosaktivem Stress und zu einer Änderung des Redoxpotentials [245]. Diese Veränderungen oder NO könnten von der MHYT-Domäne wahrgenommen werden und beeinträchtigen daraufhin die DGC-Aktivität von MucR. Dies reprimiert zunächst die Produktion von Alginat, jedoch ist die EAL-Domäne fähig die DGC-Aktivität der GGDEF-Domäne zu steigern [245]. Das synthetisierte c-di-GMP bindet an die PilZ-Domäne von Alg44 und aktiviert den Multi-Proteinkomplex der Alginatbiosynthese (Abbildung 1.8) [5, 158]. Eine weitere Studie zeigte, dass die DGC-Aktivität von der EAL-Domäne erhöht werden kann. Es wurde von Li *et al.* [142] postuliert, dass MucR im sessilen Modus als DGC und im planktonischen Status als PDE fungiert. Demzufolge wird vermutet, dass die EAL-Domäne selbst bifunktionell ist. Sie soll eine regulatorische Funktion im Biofilm einnehmen, wohingegen sie bei planktonischen Zellen als PDE aktiv ist [245].

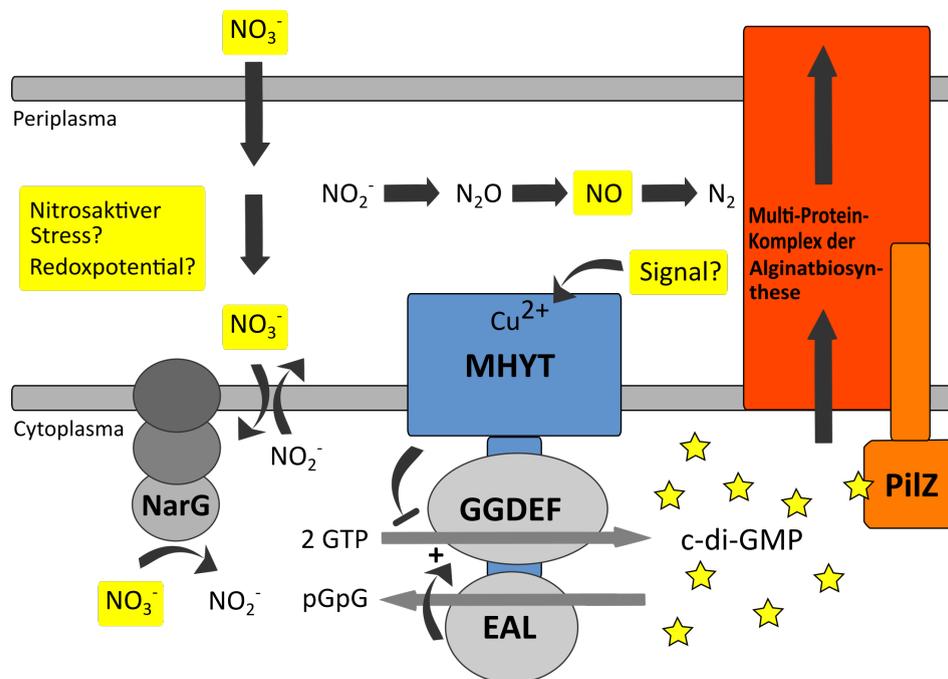


Abbildung 1.8: Modell der MucR-abhängigen Regulation der Alginatbiosynthese in Anwesenheit von Nitrat. MucR erzeugt einen lokalen c-di-GMP-Pool (gelbe Sterne). Das gebildete c-di-GMP bindet an die cytoplasmatische PilZ-Domäne von Alg44 (hellorange), woraufhin der Multi-Proteinkomplex der Alginatbiosynthese aktiviert wird (orange). In Anwesenheit von Nitrat (NO_3^-) wird dies von der Nitratreduktase NarG (hellgrau) zu Nitrit (NO_2^-) reduziert und in das Periplasma transportiert. Dort wird es letztlich zu molekularem Stickstoff (N_2) umgesetzt, wobei NO als Intermediat entsteht. Dies führt möglicherweise zu nitrosaktivem Stress und einem veränderten Redoxpotential. Diese zellulären Veränderungen oder auch NO_3^- via NO könnten von der MHYT-Domäne wahrgenommen werden. Das Signal wird hierbei vermutlich über die in der MHYT-Domäne lokalisierten Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) transferiert und führt zu einer Beeinträchtigung der DGC-Aktivität von MucR. Die EAL-Domäne steigert daraufhin die enzymatische Aktivität der GGDEF-Domäne. Potentielle Signale, die von MucR wahrgenommen werden könnten, sind gelb unterlegt.

Neben seiner Rolle bei der Alginatproduktion soll das Protein auch in die Glutamat und

die NO-induzierte Dispersion involviert sein. Biofilme einer $\Delta mucR$ -Mutante zeigten keine Auflösung nach der Behandlung mit Glutamat oder NO [142].

1.6.4 Die putative Rolle von NbdA bei der NO-induzierten Dispersion

Das für NbdA codierende Gen PA3311 hat eine annotierte Größe von 2351 bp und wird von den Genen PA3310 und PA3312 flankiert. Das stromaufwärts lokalisierte Gen PA3310 wird in entgegengesetzter Leserichtung transkribiert und codiert für ein hypothetisches Membranprotein [141]. Der intergenische Bereich zwischen PA3310 und *nbdA* beträgt 154 bp. Das 4 bp stromabwärts liegende Gen PA3312 codiert für eine 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase [251].

NbdA besitzt neben der konservierten EAL-Domäne eine degenerierte GGDEF-Domäne mit dem Motiv AGDEF [142]. Es ist bekannt, dass üblicherweise das konservierte Motiv GG(D/E)EF für die Funktionalität einer DGC notwendig ist [177, 201]. Die Aminosäure an der dritten Position (Asp oder Glu) bildet den katalytisch aktiven Rest, wohingegen die übrigen Reste an der Substratbindung und der Koordination von einem der zwei zweiwertigen Kationen beteiligt sind [35]. Demzufolge ist für NbdA lediglich eine enzymatische Aktivität als PDE zu erwarten, was anhand biochemischer Studien für die EAL-Domäne bestätigt werden konnte. Diese zeigten zudem, dass die PDE-Aktivität über die Bindung von GTP an die AGDEF-Domäne verstärkt wird (Abbildung 1.9) [142].

Wie MucR wird NbdA eine Rolle bei der NO-induzierten Biofilmauflösung bei *P. aeruginosa* zugeschrieben. Eine Deletion des *nbdA*-Gens führte zu einem Verlust der Dispersionsfähigkeit von Biofilmen nach der Behandlung mit dem NO-Donor Sodiumnitroprussid (SNP). Aufgrund dessen wurde das Protein nach seiner putativen Funktion *NO-induced biofilm dispersion locus A*, kurz NbdA, genannt [142]. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen PDEs könnte die Hydrolyse von c-di-GMP direkt über die NO-Wahrnehmung moduliert werden. Hierbei soll das zweiatomige Gas über die putative MHYT-Sensordomäne von NbdA wahrgenommen werden. Die Bindung von NO wird vermutlich über Cu^{2+} -Ionen der Membrandomäne koordiniert, woraufhin das Signal über die degenerierte GGDEF-Domäne zu der EAL-Domäne weitergeleitet wird. Infolgedessen wird deren PDE-Aktivität stimuliert und die c-di-GMP-Hydrolyse zu pGpG gefördert. Der damit verbundene sinkende c-di-GMP-Spiegel induziert schließlich die Biofilmauflösung. Zudem wurde eine erhöhte mRNA-Menge von *nbdA* in dispergierten Biofilmzellen nach der Behandlung mit NO detektiert. Dies impliziert, dass NO einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription von *nbdA* innehat (Abbildung 1.9) [142].

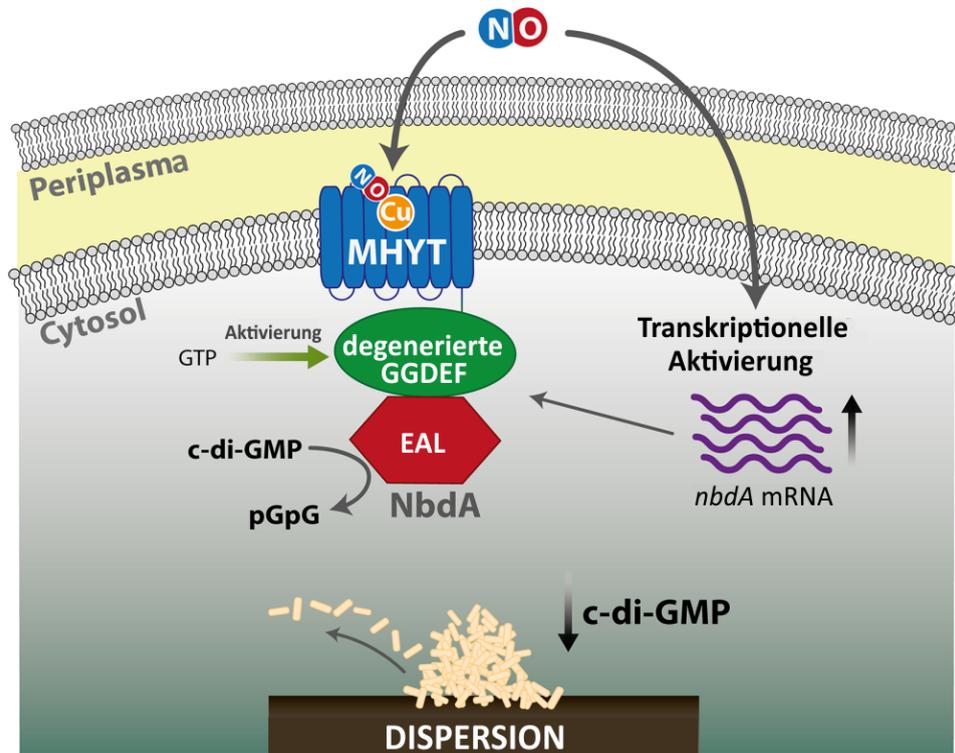


Abbildung 1.9: Modell der NO-induzierten Dispersion über NbdA. Die Bindung von NO wird über Kupfer-Ionen (Cu) koordiniert, die in der membranverankerten MHYT-Domäne (blau) lokalisiert sind. Das Signal wird über die degenerierte GGDEF-Domäne (grün) zu der EAL-Domäne (rot) transferiert. Daraufhin wird deren PDE-Aktivität stimuliert, was die Hydrolyse von c-di-GMP zu pGpG zur Folge hat. Der sinkende c-di-GMP-Spiegel löst die Dispersion aus. Das Nukleotid GTP ist vermutlich in der Lage über die Bindung an die degenerierte GGDEF-Domäne die PDE-Aktivität der EAL-Domäne zu steigern. Parallel dazu könnte die Transkription von *nbdA* durch NO über einen noch unbekanntem Mechanismus aktiviert werden. Abbildung modifiziert nach [47].

1.7 Zielsetzung

Biofilme bilden die bevorzugte und häufigste Lebensform, die Mikroorganismen einnehmen können [45]. Die erhöhte Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen macht sie zu einem bedeutenden Problem im klinischen Bereich. Das humanpathogene Bakterium *P. aeruginosa* verursacht schwerwiegende nosokomiale Infektionen bei immunkomprimierten Patienten [87, 100, 149, 186, 230]. Aufgrund seiner Fähigkeit zur Biofilmbildung gilt es als Modellorganismus für die Untersuchung von Biofilmen [85]. Hierbei ist die Dispersion ein besonderes Augenmerk, da deren Erforschung einen Anhaltspunkt zur Behandlung akuter und chronischer Infektionen darstellt. Die Biofilmauflösung kann über verschiedene Signale induziert werden. Es ist bekannt, dass geringe Konzentrationen des Gases NO die Dispersion von Biofilmen von *P. aeruginosa* sowie von anderen Prokaryoten auslösen [13]. Die Wahrnehmung von NO bewirkt die Stimulation c-di-GMP-spezifischer PDEs, deren enzymatische Aktivität für eine Senkung des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels sorgt und die Biofilmauf-

lösung verursachen kann [14]. Mit NbdA und MucR wurden zwei c-di-GMP-modulierende Enzyme entdeckt, denen eine Rolle bei der NO-induzierten Dispersion zugeschrieben wird [142]. Ein besonderes Merkmal der Proteine ist der Besitz der neuartigen, membranständigen MHYT-Domäne, die als putative Sensordomäne für zweiatomige Gase wie CO, O₂ und NO fungieren könnte [74]. NbdA und MucR sind die einzigen bislang identifizierten Proteine von *P. aeruginosa*, die die MHYT-Domäne enthalten. Es wird postuliert, dass diese bei dem Bakterium in die Wahrnehmung von NO involviert sind [142]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der Membranproteine hinsichtlich ihrer Beteiligung bei der Biofilmauflösung durch NO untersucht werden. Dazu wurden markerlose, genomische Deletionsmutanten des *P. aeruginosa*-Stammes PAO1 generiert und phänotypisch charakterisiert. Weiterhin sollte die enzymatische Aktivität der Vollängenproteine NbdA und MucR verifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1:

<i>Escherichia coli</i> -Stämme		
Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> AB607	$\Delta pdeH::Frt$	[26]
<i>E. coli</i> AB607::pCYB1	$\Delta pdeH::Frt$ mit pCYB1, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE01	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE01, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE02	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE02, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE03	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE03, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE04	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE04, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE05	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE05, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE06	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE06, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE07	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE07, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE08	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE08, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pMRE09	$\Delta pdeH::Frt$ mit pMRE09, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> AB607::pSZE02	$\Delta pdeH::Frt$ mit pSZE02, Amp ^R	S. Zehner
<i>E. coli</i> AB607::pSZE03	$\Delta pdeH::Frt$ mit pSZE03, Amp ^R	S. Zehner
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ $\varphi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺)</i> <i>phoA supE44 $\lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$</i>	[82]
<i>E. coli</i> JM83	<i>ara $\Delta lac-pro strA thi [\varphi 80lacZ\Delta M15]$</i>	[243]
<i>E. coli</i> MG1655	Wildtyp, Derivat von <i>E. coli</i> K-12, F ⁻ $\lambda^- rph^-$	[24]
<i>E. coli</i> MG1655::pCYB1	Wildtyp mit pCYB1, Amp ^R	[18]
<i>E. coli</i> MG1655::pMRE07	Wildtyp mit pMRE07, Amp ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MG1655::pSZE04	Wildtyp mit pSZE04, Amp ^R	[18]
<i>E. coli</i> S17-I	Ec294::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] <i>pro res recA, Tp^R, Sm^R</i>	[51]

Tabelle 2.2: *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
PAO1	Wildtyp, DSM-22644	[56]
PAO1 $\Delta mucR$	$\Delta mucR$	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta mucR$ M	$\Delta mucR::[Gm]$	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta nbdA$	$\Delta nbdA$	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta nbdA::pHERD26T$	$\Delta nbdA$ mit pHERD26T, Tc ^R	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta nbdA::pMRP13$	$\Delta nbdA$ mit pMRP13, Tc ^R	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta nbdA::pMRP14$	$\Delta nbdA$ mit pMRP14, Tc ^R	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta nbdA$ M	$\Delta nbdA::[Tc]$	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta nbdA \Delta mucR$	$\Delta nbdA \Delta mucR$	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta nbdA \Delta mucR$ M	$\Delta nbdA::[Tc] \Delta mucR::[Gm]$	Diese Arbeit
PAO1 $\Delta nosP$	$\Delta nosP$	Diese Arbeit
PAO1::pHERD26T	Wildtyp mit pHERD26T, Tc ^R	Diese Arbeit
PAO1::pMRP12	Wildtyp mit pMRP12, Tc ^R	Diese Arbeit
PAO1::pMRP13	Wildtyp mit pMRP13, Tc ^R	Diese Arbeit
PAO1::pMRP14	Wildtyp mit pMRP14, Tc ^R	Diese Arbeit

2.2 Vektoren

Tabelle 2.3: Vektoren

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pASP01	pEX18Ap-Derivat, Tc-Kassette aus pKB8-I flankiert von EcoRI und BamHI, up- und downstream-Bereich von <i>nbdA</i> , Amp ^R , Tc ^R	[211]
pCYB1	heterologe Expression in <i>E. coli</i> , Amp ^R	New England Biolabs
pEXG2	allelischer Austauschvektor zur Konstruktion von Deletionsmutanten in <i>P. aeruginosa</i> , Gm ^R	[195]
pHERD26T	<i>E. coli</i> / <i>P. aeruginosa</i> shuttle vector, homologe Überproduktion in <i>P. aeruginosa</i> , Tc ^R	[188]
pMRE01	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>pdeH</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pMRE02	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> -AGDEF-EAL, Amp ^R	Diese Arbeit
pMRE03	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> -EAL, Amp ^R	Diese Arbeit
pMRE04	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> mit C-terminalem Strep-tagII, Amp ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pMRE05	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>mucR</i> -GGDEF-EAL, Amp ^R	Diese Arbeit
pMRE06	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>mucR</i> -EAL, Amp ^R	Diese Arbeit
pMRE07	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>mucR</i> mit C-terminalem Strep-tagII, Amp ^R	Diese Arbeit
pMRE08	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> mit N-terminalem Strep-tagII, Amp ^R	Diese Arbeit
pMRE09	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> -E494A mit C-terminalem Strep-tagII, Amp ^R	Diese Arbeit
pMRP04	pEXG2-Derivat, 588 bp <i>upstream</i> und 528 bp <i>downstream</i> von <i>mucR</i> , verkürzter kodierender Bereich von <i>mucR</i> (96 bp), Gm ^R	Diese Arbeit
pMRP05	pEXG2-Derivat, 498 bp <i>upstream</i> und 498 bp <i>downstream</i> von <i>nbdA</i> , verkürzter kodierender Bereich von <i>nbdA</i> (69 bp), Gm ^R	Diese Arbeit
pMRP06	pEXG2-Derivat, 459 bp <i>upstream</i> und 412 bp <i>downstream</i> von <i>nosP</i> , verkürzter kodierender Bereich von <i>nosP</i> (132 bp), Gm ^R	Diese Arbeit
pMRP12	pHERD26T-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> mit C-terminalem Strep-tagII, Tc ^R	Diese Arbeit
pMRP13	pHERD26T-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> , Tc ^R	Diese Arbeit
pMRP14	pHERD26T-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> -E494A mit C-terminalem Strep-tagII, Tc ^R	Diese Arbeit
pSHP02	pEX18Ap-Derivat, Gm-Kassette von pYPRUB10-I, flankiert von EcoRI/SacI und SacI/BamHI, up- und <i>downstream</i> -Bereich von <i>mucR</i> , Amp ^R , Gm ^R	[142]
pSZE02	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>mucR</i> , Amp ^R	S. Zehner
pSZE03	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>nbdA</i> , Amp ^R	S. Zehner
pSZE04	pCYB1-Derivat, kodierender Bereich von <i>dgc1-h-nox</i> aus <i>D. shibae</i> DFL12 ^T , Amp ^R	[18]

2.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics bezogen.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')
LH-PA3311for	GCATCATATGATGGATTGGCAAGGCCTGC
LH-PA3311for	CGATCGAATTCTCAGGCCTGGTTCAGGCTGC
MM-PA1727for	GCATCATATGATGCTTATCAGCAGCTACAAC
MM-PA1727rev	GCATCATATGATGCTTATCAGCAGCTACAAC
MR_EAL_for	GCATCATATGCAGTTCTTCAGCCGGCAACT
MR_GGDEF_EAL_for	GCATCATATGAAAAACAGCCGGGTCAACG
MucR_EAL_for	GCATCATATGGAACAGTTGCAACTACTGCATGACC
MucR_GGDEF_EALfw	GCATCATATGCTCGCACGAGCCAACCGCG
MucR_Strep_MR_rev	CGATCGAATTCTCATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAG GCGACGCTGGCGAGCAA
NbdA_QC_AAL_for	GTACACCAGTTGGCAGCATTGGTGCG
NbdA_QC_AAL_rev	CGCACCAATGCTGCCAACTGGTGTAC
NbdA_Strep_MR_for	GCATCATATGGCTAGCTGGAGCCACCC
NbdA_Strep_MR_rev	CGATCGAATTCTTATTATTTTTTCGAACTGCGGGTGG
NbdA_Strep_ÜE_rev	CTCGAATTCTTATCAGATCCTTATTTTTTCGAACTGCGGG
NbdA_ÜE_MR_for	TTTAAGAAGGAGATATACATACCATGGATTGGCAAGGCCTG
NbdA_ÜE_MR_rev	CTCGAATTCTTATCAGATCCTCAGGCCTGGTTCAGGCTG
OT_PA3310_for	TTCCCTGCCTTCCCTTGC
PA1726mark_rev_2	TATATTGGATCCGAAAGATGGTGCGGTGCCC
PA1726_intern_for	GTGTTTCAGCGAGACCATCAC
PA1727mark_for_2	ATCAGCAGCCGCCTCGGCTGCAATTTCG
PA1727mark_rev_1	GCCGAGGCGGCTGCTGATAAGCATGAAAGCGTC
PA1728mark_for_1	GCATTAGAATTTCGCATGGGTGGCATAACATCACC
PA1728_downstream_rev	TACCTCCTTCCCCAGTCTGA
PA1974mark_for_1	GCATTAGGATCCGGCGGCTTCTCCGTGACC
PA1974_intern_for	ATCTTCCTCGACGAACTGCT
PA1975mark_for_2	AGGGGCATGAACACCTACGGAGAGCAATTCAATGG
PA1975mark_rev_1	GTAGGTGTTTCATGCCCTGCAGACCCC
PA1976mark_rev_2	TATATTGAATTCACGCGCCAGCCGGTGCAGT
PA1976_intern_rev	AGTTCGTCGCTGAGATAGGC
PA3310	GTTGGTTCGGGTTGATGAAGTGG
PA3312	CAGTTGCTGGTGGACTTCTCCA
PA3310mark_for_1	GCATTAGGATCCACGCCGCGAACGAGGCGAAGA
PA3311mark_for_2	TCTCCCGTCCCGCTGCGCAGCCTGAACCA
PA3311mark_rev_1	GCGCAGCGGGACGGGAGACTCTCCGAG
PA3312mark_rev_2	TATATTGAATTCGCGGAAAGCGGCAGCCTG
pCYB_seq1	CCCATGACCTTATTACCAACCTC
pEXG2-seqF	CGACCTCATTCTATTAGACTCTCGTTTGGATTGC
pEXG2-seqR	GTTTCGCTCGGTATCGGTGATTTCATTCTG
ptac_seq	GAGCGGATAACAATTTACACAG
RT_PA3310_rev	CCTTCTTGTCGCTGTAGTCC
seq_yhjH_for	CGACATCATAACGGTTCTGGC
seq_yhjH_rev	CTGCCATCTTTACCCATGACC
yhjH_EcoRI_rev	CGATCGAATTCTTATAGCGCCAGAACCGC
yhjH_NdeI_for	GCATCATATGATAAGGCAGGTTATCCAGCG

2.4 Chemikalien und Enzyme

Weitere, nicht aufgeführte Chemikalien und Enzyme wurden in Analysequalität von den Firmen AppliChem, Carl Roth, Merck, NEB, Sigma Aldrich und Thermo Fisher erworben.

Tabelle 2.5: Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
β -Mercaptoethanol	Sigma
Agarose	Axon
Albumin Fraktion V	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	BioChemica
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
Bromphenolblau	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma
Casaminosäuren (CAA)	Becton Dickinson
Carbenicillin-Dinatriumsalz	AppliChem
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth
Coomassie Brilliantblau G250	Sigma
CutSmart Restriktionsendonukleasen	NEB
D(+)-Glucose	Merck
D(+)-Saccharose	Roth
Difco-Agar	Becton Dickinson
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher
DreamTaq TM Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	Roth
FastDigest Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher
GelRed TM Nukleinsäuren-Gel-Farbstoff	Biotium
GeneRuler TM DNA Ladder Mix	Thermo Fisher
Gentamicinsulfat	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	BioChemica
Kongo Rot	Sigma
Kristallviolett	Riedel-de-Haen
L(+)-Arabinose	Roth
Methylenblau	AppliChem
<i>p</i> -Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher
Pfu DNA Polymerase	Thermo Fisher
Phusion High-Fidelity Polymerase	Thermo Fisher
<i>Pseudomonas Isolation</i> Agar	Becton Dickinson
Rotiphorese Gel 30	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva
SNP	Merck
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Tetrazyklinhydrochlorid	Sigma
Trypton	Becton Dickinson

2.5 Nährmedien und Lösungen

Tabelle 2.6: Nährmedien und Lösungen

Bezeichnung	Rezept
Adhäsions-Medium	Basal Medium 2 (BM2) 0,5 % (w/v) CAA
Alkalischer-Phosphatase-Puffer (AP-Puffer)	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 5 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl
BCIP-Lösung	5 % (w/v) in DMF
Basal Medium 2	BM2-Lösung (1x) 0,4 % (w/v) Glucose 2 mM MgSO ₄ 0,01 mM FeSO ₄
Biofilm-Medium	BM2 0,1 % (w/v) CAA
BM2-Lösung (10x)	0,07 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,4 M K ₂ HPO ₄ 0,22 M KH ₂ PO ₄ pH 7,0 einstellen
Blockierlösung	TBS-T-Puffer (1x) 3 % (w/v) Albumin Fraktion V
CTAB-Methylenblau-Agar	1,5 % (w/v) Difco-Agar 0,1 g/l CaCl ₂ · 2 H ₂ O 0,2 g/l CTAB 2 % (w/v) Glucose 0,7 g/l KH ₂ PO ₄ 0,005 g/l Methylenblau 0,4 g/l MgSO ₄ · 7 H ₂ O 2 g/l NaNO ₃ 0,9 g/l Na ₂ HPO ₄ 2 ml Spurenelemente-Lösung pH 6,7 einstellen
Detektionslösung	AP-Puffer (1x) 0,33 % (v/v) NBT-Lösung 0,66 % (v/v) BCIP-Lösung
Entfärbelösung	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure

2.5. Nährmedien und Lösungen

Bezeichnung	Rezept
Extraktionslösung	40 % (v/v) Acetonitril 40 % (v/v) Methanol
Färbelösung	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250
Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Kolloidale-Coomassie-Lösung	100 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 % (v/v) H ₃ PO ₄ 0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250
Kongo-Rot-Agar	10 g/l Trypton 20 g/l LB (Lennox) 1 % (w/v) Difco-Agar 1 % (v/v) Kongo-Rot-Lösung
Kongo-Rot-Lösung	4 % (w/v) Kongo Rot in 70 % (v/v) Ethanol 2 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250 in 70 % (v/v) Ethanol
Laufpuffer (10x)	240 mM Tris-Base 1,9 M Glycin 10 g/l SDS
LB-Agar	LB-Medium 20 g/l Agar
LB-Medium (Lennox)	5 g/l NaCl 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt
Mineralsalz-Medium	0,1 g/l CaCl ₂ · 2 H ₂ O 0,2 g/l CTAB 2 % (w/v) Glucose 0,7 g/l KH ₂ PO ₄ 0,4 g/l MgSO ₄ · 7 H ₂ O 2 g/l NaNO ₃ 0,9 g/l Na ₂ HPO ₄ 2 ml Spurenelemente-Lösung pH 6,7 einstellen
NBT-Lösung	10 % NBT (w/v) in 70 % (v/v) DMF
<i>Pseudomonas</i> -Isolations-Agar	45 g/l <i>Pseudomonas Isolation Agar</i> 2 % (v/v) Glycerin

2.5. Nährmedien und Lösungen

Bezeichnung	Rezept
Sammelgel-Puffer (4x)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,4 % (w/v) SDS
Schwärm-Agar	0,25 % (w/v) CAA 0,5 % Difco-Agar BM2-Lösung $[-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (1x) 0,4 % (w/v) Glucose 2 mM MgSO_4 0,01 mM FeSO_4
Schwimm-Agar (<i>E. coli</i>)	0,3 % (w/v) Difco-Agar 5 g/l NaCl 10 g/l Trypton
Schwimm-Agar (<i>P. aeruginosa</i>)	0,3 % (w/v) Difco-Agar 20 g/l LB (Lennox)
Schwimm-Medium (<i>E. coli</i>)	5 g/l NaCl 10 g/l Trypton
SDS-Probenpuffer (4x)	100 mM Tris-HCl (pH 6,8) 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol 40 % (v/v) Glycerin 8 % (w/v) SDS 1 % (w/v) Bromphenolblau
Spurenelemente-Lösung	2 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat (pH 8,0) 50 mM EDTA
TBS-Puffer (10x)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 140 mM NaCl
TBS-T-Puffer (1x)	TBS-Puffer (10x) (pH 7,4) 0,1 % (v/v) Tween 20
Transfer-Puffer (1x)	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin
Trenngel-Puffer (4x)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,4 % (w/v) SDS
Trypton-Medium	10 g/l Trypton 20 g/l LB (Lennox)
Twitching-Agar	1 % (w/v) Difco-Agar 20 g/l LB (Lennox)

2.6 Medienzusätze und Antibiotika

Tabelle 2.7: Antibiotika

Antibiotikum	<i>E. coli</i> [$\mu\text{g/ml}$]	<i>P. aeruginosa</i> [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin	100	-
Carbenicillin	-	200
Gentamicin	10	300
Tetrazyklin	5	150

Tabelle 2.8: Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
CAA	5 % (w/v)	0,1/0,5 % (w/v)
D(+)-Saccharose	50 % (w/v)	5/15 % (w/v)
IPTG	100 mM	100 μM
L(+)-Arabinose	10 % (w/v)	0,1 % (w/v)

2.7 Antikörper

Tabelle 2.9: Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Antikörper-Konjugat	
Strep-Tactin Alkalische Phosphatase	IBA GmbH

2.8 Kits

Tabelle 2.10: Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
NEBuilder [®] Hifi DNA Assembly Cloning Kit	NEB
NucleoSpin [®] Gel and PCR Purification Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin [®] Microbial DNA Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin [®] Plasmid EasyPure Kit	Macherey-Nagel
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies

2.9 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.11: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
Einmal-Küvetten (Halbmikro)	Hartenstein
Elektroporations-Küvetten (0,2 cm Lücke)	Bio-Rad
Mikrotiterplatten F (96 Wells)	Nunc
Mikrotiterplatten U (96 Wells)	Nunc
Roti [®] -PVDF-Membran	Carl Roth
Sterile Spritzenvorsatzfilter (PVDF, 0,2 μ m)	Carl Roth

2.10 Geräte

Tabelle 2.12: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
Agarose-Gelelektrophorese-Geräte	Com Phor L Mini	Biozym
	Com Phor L Midi	Biozym
Blot-Apparaturen	Semidry Blot Trans-Blot [®] SD	Bio-Rad
Elektroporator	MicroPulser [™]	Bio-Rad
Feinwaage	Research	Sartorius
Geldokumentationsanlage	GeliX20 Imager	Intas
HPLC-Anlage	Ekspert nanoLC 425	Sciex
Inkubationsschüttler	Innova 44R	New Brunswick
Massenspektrometer	API4000	Sciex
	Triple-TOF6600	Sciex
	Basic pH Meter P-11	Sartorius
pH-Meter	Genesys 10S UV-Vis	Thermo Fisher
Photometer	NanoDrop [™] Lite	Thermo Fisher
	LabSystems Multiskan MS	Tecan
Plattenlesegerät	infinite F200 PRO	
	MilliQ [®] Integral Water Purification System	Merck Millipore
Rotoren	A-4-62	Eppendorf
	F45-30-11	Eppendorf
	F45-24-11	Eppendorf
	12/032	Hermle
SDS-PAGE-Apparatur	Mini-Protean [®] Tetra Cell System	Bio-Rad
	PowerPac 300	Bio-Rad
	PowerPac [™] HC	Bio-Rad
Tageslichtlampe	-	Elektronikwerkstatt, TUK
Thermocycler	T1 Thermocycler	Biometra
	TGradient	Biometra
	TPersonal	Biometra
Thermoblock	CHB-202	ThermoCell
Zentrifugen	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	Eppendorf
	Z32HK	Hermle

2.11 Mikrobiologische Methoden

2.11.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme wurden mit Hilfe einer sterilen Impföse aus einer Gefrierkultur auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht (ÜN) bei 37 °C inkubiert. Die Kultivierung einer Flüssigkultur erfolgte je nach Volumen in Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern und bei Bedarf unter Zugabe von Selektionsantibiotika (Tabelle 2.7).

2.11.2 Lagerung von Bakterien

Für eine langfristige Lagerung wurden Bakterien bei -80 °C eingefroren. Kulturen von *P. aeruginosa* PAO1 wurden in 7,5 % (v/v) DMSO und *E. coli* in 20 % (v/v) Glycerin konserviert [203].

2.11.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde photometrisch über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) ermittelt. Als Referenz wurde die OD_{600} des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Die $OD_{600} = 1,0$ einer Flüssigkultur entspricht etwa einer Zelldichte von 10^9 Zellen/ml [203].

2.11.4 Untersuchung des Wachstums

Das Wachstum von *P. aeruginosa*-Stämmen wurde bei einer Temperatur von 37 °C und 160 Umdrehungen pro Minute (UpM) (Innova 44R, New Brunswick) untersucht. LB-ÜN-Kulturen mit einem Volumen von 8 ml wurden auf die $OD_{600} = 0,1$ in 50 ml LB-Medium eingestellt. Die OD_{600} wurde stündlich bis zum Zeitpunkt $t = 10$ h sowie nach ca. 24 h Wachstum gemessen.

2.11.5 Untersuchung der Biofilmbildung

Der Assay wurde nach O'Toole und Kolter [173] durchgeführt. Eine BM2-ÜN-Kultur wurde im Verhältnis 1:100 in 1 ml Biofilm-Medium verdünnt. Davon wurden sechs Wells à 100 μ l befüllt und für 24 h und 48 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Daraufhin folgte eine Kristallviolett-Färbung.

2.11.6 Auflösung von statischen Biofilmen mit Stickstoffmonoxid

Die Auflösung von statischen Biofilmen nach 24 h (Kapitel 2.11.5) erfolgte in Mikrotiterplatten mit rundem Boden (96 Wells von Nunc) durch die Zugabe des NO-Donors SNP. Zunächst wurden die planktonischen Zellen verworfen und die adhärennten Bakterien mit 100 μ l einer 500 μ M SNP-Lösung versetzt. Als Kontrolle diente die Zugabe von 100 μ l Biofilm-Medium. Der Zerfall von SNP zu NO wurde durch die Bestrahlung der geschlossenen Mikrotiterplatte mit einer Tageslichtlampe (6500 K) für 1 h bei Raumtemperatur (RT) angeregt. Im Anschluss wurde die quantitative Analyse mithilfe einer Kristallviolett-Färbung vorgenommen.

2.11.7 Kristallviolett-Färbung

Diese Methode dient zur kolorimetrischen Analyse der Biomasse von adhärenierten Bakterien und wurde im Anschluss an den Adhäsions- und Biofilm-Assay sowie der Auflösung von statischen Biofilmen durchgeführt. Der Farbstoff Kristallviolett interagiert mit negativ geladenen Molekülen wie Lipopolysacchariden und Peptidoglykan der Zellwand sowie mit der DNA von Bakterien [167]. Das Protokoll wurde modifiziert von O'Toole und Kolter [173] übernommen. Die Zellen wurden aus der Mikrotiterplatte entfernt, die Wells vorsichtig mit 300 μl ddH₂O gewaschen und der Überstand verworfen. Es wurden 125 μl einer 0,1%igen Kristallviolett-Lösung hinzugegeben und mit geschlossenem Deckel für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entleeren der Platte wurden die Wells zwei Mal mit 150 μl ddH₂O gewaschen und ca. 5 min getrocknet. Daraufhin wurden 200 μl 95 % (v/v) Ethanol hinzugefügt und mit geschlossenem Deckel für 20 min bei RT inkubiert. Der Inhalt wurde durch auf- und abpipettieren gemischt und die Absorption bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt.

2.11.8 Nachweis von Exopolysacchariden der EPS

Der Kongorot-Assay wurde zum morphologischen Nachweis der EPS nach Friedman und Kolter [69] angewandt. Die Methode basiert auf der Fähigkeit des Farbstoffs Kongorot Exopolysaccharide zu adsorbieren. Die Färbung der Kolonien korreliert direkt mit der Menge an gebundenen Exopolysacchariden [69]. Hierzu wurde eine LB-Trypton-ÜN-Kultur auf die optische Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,025$ in LB-Trypton-Medium eingestellt. Die verdünnte Bakterienkultur wurde in einem Volumen von 5 μl auf LB-Trypton-Agarplatten mit dem Zusatz von Kongorot (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Coomassie Brilliant Blue G (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aufgetragen und für 5 d bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte rein visuell über die Betrachtung der Kolonie-Morphologie im Vergleich zum Wildtyp.

2.11.9 Untersuchung der Schwimmbewegung

Der Nachweis der Flagellenbewegung wurde nach der Methode von Marr *et al.* [150] durchgeführt. Von einer LB-ÜN-Kultur wurde 1 μl auf eine LB-Platte mit 0,3 % (w/v) Difco-Agar aufgetragen. Die Schwimmplatten wurden für 24 h bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung über die Bestimmung des Querschnitts der Schwimm-Zone.

2.11.10 Untersuchung der Schwärmbewegung

Zur Untersuchung des Schwärmens wurde das Protokoll von Overhage *et al.* [174] übernommen. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 160 UpM und 37 °C in BM2 kultiviert (Innova 44R, New Brunswick) und am nächsten Tag in einem Verhältnis von 1:100 in BM2 verdünnt. Die BM2-Kultur wurde unter konstantem Schütteln bei 170 UpM und 37 °C (Innova 44R, New Brunswick) bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Von der Kultur wurde 1 μl auf eine Schwärmplatte mit 0,5 % (w/v) Difco-Agar

aufgetragen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm ImageJ analysiert. Hierzu wurde die gesamte Schwärm-Zone markiert und prozentual im Verhältnis zur Gesamtfläche berechnet.

2.11.11 Untersuchung der Twitching-Bewegung

Für die Untersuchung der Twitching-Bewegung [150] wurden dünn gegossene LB-Agarplatten mit 1%igem Difco-Agar verwendet. Von einer LB-ÜN-Kultur wurde 1 μ l durch den Agar-Nährboden auf den Boden der Petrischale gegeben. Die Platten wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Agar entfernt und die Twitching-Zone zur besseren Visualisierung mit 1 - 2 ml einer 0,1 % (w/v) Kristallviolett-Lösung angefärbt und für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Petrischalen mit 1 - 2 ml ddH₂O gewaschen und für 30 min bei RT getrocknet. Zur Auswertung wurde der Durchmesser der Twitching-Zone gemessen.

2.11.12 Phänotypische Charakterisierung der Überproduktion von NbdA und NbdA-AAL

Untersuchung des Wachstums

Das Wachstum von *P. aeruginosa*-Kulturen wurde in LB-Medium ermittelt. Hierzu wurden LB-ÜN-Kulturen im Verhältnis von 1:20 in LB-Medium mit dem Zusatz von 150 μ g/ml Tetrazyklin (Tet150) verdünnt. Nach dem Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Stämme nach dem Abkühlen auf RT mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Daraufhin wurde die OD₆₀₀ stündlich bis zum Zeitpunkt t = 21 h gemessen.

Untersuchung der Schwimmbewegung

Zur Untersuchung der Schwimmbewegung wurden LB-ÜN-Kulturen im Verhältnis von 1:20 in LB-Medium + Tet150 verdünnt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) kultiviert. Nach der Induktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose und der Inkubation bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) für 5 h wurden die Stämme auf OD₆₀₀ = 1,5 in LB-Medium eingestellt. Anschließend wurden Schwimm-Platten (+ 0,1 % w/v L-Arabinose, + Tet150) mit jeweils 1 μ l Kultur inokuliert und 18 h bei 30 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Messung des Durchmessers der Schwimm-Zone.

Untersuchung der Schwärmbewegung

Für die Untersuchung des Schwärmens wurden BM2-ÜN-Kulturen im Verhältnis von 1:20 in BM2 + Tet150 verdünnt und bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) bis OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose induziert und die BM2-Kulturen bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New

Brunswick) für 5 h kultiviert. Nach dem Einstellen der Bakterienstämme auf $OD_{600} = 0,5$ wurden Schwärmplatten mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose mit jeweils 1 μ l Kultur versetzt. Nach einer Inkubation für 18 h bei 37 °C wurde die Schwärmzone betrachtet.

Untersuchung der Twitching-Bewegung

Zur Analyse der Twitching-Bewegung wurden LB-ÜN-Kulturen im Verhältnis von 1:20 in LB-Medium + Tet150 verdünnt und bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Beim Erreichen der $OD_{600} = 0,5$ wurde die Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose induziert und die Bakterienstämme 5 h bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) kultiviert. Daraufhin wurde 1 μ l durch den Agar auf den Boden der Petrischale pipettiert. Die Twitching-Platten (+ 0,1 % w/v L-Arabinose, + Tet150) wurden für 40 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Agar entfernt, die Twitching-Zone mit 0,1%iger Kristallviolett-Lösung angefärbt und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Petrischalen mit ddH₂O gewaschen und bei RT getrocknet. Zur Auswertung wurde der Durchmesser der Kolonie-Diameter bestimmt.

Detektion von Rhamnolipiden

Die Sekretion von Rhamnolipiden wurde mithilfe einer semi-quantitativen Methode von Siegmund und Wagner [219] nachgewiesen. Hierbei bilden die von den Bakterien sezernierten Rhamnolipide mit dem im Mineralagar enthaltenen Tensid CTAB und dem Farbstoff Methylenblau einen Komplex, der sich in der Bildung eines dunkelblauen Hofes um die Kolonie äußert [219]. ÜN-Kulturen wurden im Verhältnis von 1:20 in Mineralmedium + Tet150 verdünnt und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Nach der Induktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose sowie der Kultivierung bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) für 5 h wurden jeweils 5 μ l Kultur auf eine CTAB-Methylenblau-Agarplatte (+ Tet150, + 0,1 % w/v L-Arabinose) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C und weiteren 48 h bei RT über die optische Analyse der Koloniefärbung sowie der Hofbildung.

Untersuchung der Adhäsion

Für die Untersuchung der Adhäsion wurden BM2-ÜN-Kulturen 1:20 in BM2 verdünnt und bis zum Erreichen der $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Nach der Induktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose und der Kultivierung bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) wurden die Stämme auf $OD_{600} = 1,0$ in Adhäsions-Medium mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose eingestellt. Danach wurden jeweils 100 μ l in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben und 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Kristallviolett-Färbung (Kapitel 2.11.7) durchgeführt.

Untersuchung der Biofilmbildung

Die Bildung statischer Biofilme wurde in Mikrotiterplatten untersucht. Hierfür wurden BM2-ÜN-Kulturen im Verhältnis von 1:20 in BM2 mit dem Zusatz von Tet150 verdünnt und bis zum Erreichen von $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) kultiviert. Weiterhin erfolgte die Induktion mit $0,1\%$ (w/v) L-Arabinose sowie die Kultivierung für 5 h bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick). Daraufhin wurden die Kulturen auf $OD_{600} = 0,03$ in Biofilm-Medium (+ Tet150, + $0,1\%$ w/v L-Arabinose) eingestellt. Es wurden zwanzig Wells mit jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ befüllt und für 24 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurde eine Kristallviolett-Färbung durchgeführt (Kapitel 2.11.7).

Nachweis der Pellikelbildung

Der Nachweis der Pellikelbildung wurde verändert nach Friedman und Kolter [70] vorgenommen. BM2-ÜN-Kulturen wurden im Verhältnis von 1:20 in BM2 + Tet150 verdünnt und bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) kultiviert. Beim Erreichen einer $OD_{600} = 0,5$ wurde die Proteinproduktion durch die Zugabe von $0,1\%$ (w/v) L-Arabinose induziert und die Kulturen 5 h bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Anschließend wurden die Stämme auf $OD_{600} = 0,03$ in Biofilm-Medium (+ Tet150, + $0,1\%$ w/v L-Arabinose) eingestellt. Es wurden pro Stamm drei Reagenzgläser mit jeweils 4 ml Kultur befüllt und diese 1 d statisch bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Auswertung über die optische Analyse vorgenommen. Eine optische Trübung des Mediums an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche deutet auf eine Pellikelbildung hin.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen [106]. Bei Anwendung der PhusionTM High-Fidelity Polymerase von Thermo Fisher wurde exemplarisch folgender Ansatz verwendet:

Matrize	1 pg - 10 ng
Forward Primer	0,5 μM
Reverse Primer	0,5 μM
dNTPs	jeweils 0,2 mM
Phusion TM HF Puffer (5x)	10 μl
Phusion TM High-Fidelity Polymerase	1 U
DMSO	5 % (v/v)
H ₂ O	ad 50 μl

Ein exemplarisches PCR-Protokoll des Thermocyclers lautet wie folgt:

initiale Denaturierung	98 °C	2 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	98 °C	10 s	
Primeranlagerung	$T_m - 5$ °C	30 s	
Elongation	72 °C	20 s/kb	
finale Elongation	72 °C	7 min	
Lagerung	4 °C	∞	

2.12.2 Splicing-by-Overlap-Extension-PCR

Die Erstellung der Deletionskonstrukte für die Generierung markerloser *P. aeruginosa*-Deletionsmutanten wurde anhand der Methode *Splicing-by-Overlap-Extension-PCR* (SOE-PCR) nach Hmelo *et al.* [98] vorgenommen. Für die *in-frame*-Deletion von PA1727 und PA3311 wurden zunächst jeweils ca. 500 bp der flankierenden *up*- und *downstream*-Region der Zielgene amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide (Up-R und Down-F) wurden so gewählt, dass ihre 5'-Enden ein Vielfaches von drei Nukleotiden (3n) des Start und Stopp des Zielgens betragen. Zur Konstruktion des Deletionsallels wurden die beiden Fragmente der PCR unter Verwendung der flankierenden Oligonukleotide (Up-F und Down-R) in der SOE-PCR als Matrize eingesetzt (Abbildung 2.1).

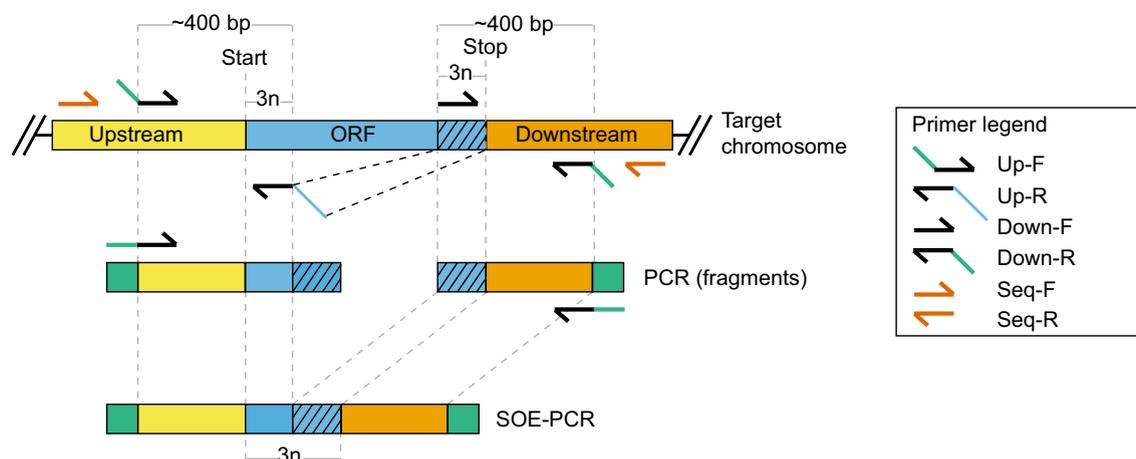


Abbildung 2.1: Prinzip der SOE-PCR. In zwei einzelnen Reaktionen wurden zunächst die flankierenden Bereiche stromaufwärts (gelb, *upstream*) und stromabwärts (orange, *downstream*) des offenen Leserahmens (blau, ORF) des Zielgens amplifiziert. Die PCR-Produkte dienen in einer weiteren Reaktion als Matrize, in der ein fusioniertes Konstrukt mit verkürztem Zielgen generiert wurde. Abbildung modifiziert nach [98].

2.12.3 Kolonie-PCR

Die Verifizierung der *P. aeruginosa*-Deletionsmutanten sowie die erfolgreiche Generierung von Klonierungskonstrukten in *E. coli* DH5 α wurde mit Hilfe von Kolonie-PCR durchgeführt [253]. Dazu wurde der jeweilige Stamm auf einer LB-Agarplatte vereinzelt und über

Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte entnommen, in 100 µl H₂O resuspendiert und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Als Matrize für die PCR mit der DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher) wurde 1 µl der Suspension eingesetzt. Es wurde exemplarisch folgender Ansatz verwendet:

Matrize	1 µl Suspension
Forward Primer	0,5 µM
Reverse Primer	0,5 µM
DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2x)	25 µl
DMSO	5 % (v/v)
H ₂ O	ad 50 µl

Ein exemplarisches PCR-Protokoll des Thermocyclers lautete wie folgt:

initiale Denaturierung	95 °C	5 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Primeranlagerung	T _m -5 °C	30 s	
Elongation	72 °C	60 s/kb	
finale Elongation	72 °C	10 min	
Lagerung	4 °C	∞	

2.12.4 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten wurde nach dem Herstellerprotokoll des NucleoSpin® Gel and PCR Purification Kits von Macherey-Nagel vorgenommen.

2.12.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte am Spektralphotometer NanoDrop™ Lite mit der entsprechenden Software. Die Ratio der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm zeigt hierbei die Reinheit der Probe an. Diese sollte für DNA-Proben einen Wert von ca. 1,8 betragen [236].

2.12.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Technik, um DNA-Fragmente im elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihres Molekulargewichts aufzutrennen [203]. Dazu wurde die entsprechende Menge an TopVision™ Agarose abgewogen und in TAE-Puffer (1x) aufgekocht. Daraufhin wurde die Agarose in einen Gelschlitten mit einem Kamm zur Taschenbildung gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer (1x) überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Loading Dye (6x) im Verhältnis 5:1

gemischt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Kammergröße bei einer konstanten Spannung von ca. 80 - 120 V. Die DNA-Banden wurden unter Bestrahlung mit Ultraviolett- (UV) Licht (312 nm) mit der Geldokumentationsanlage GeliX20 Imager betrachtet. Die Größe der Fragmente wurde über den Vergleich mit dem DNA-Längenstandard GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher) abgeschätzt.

2.12.7 Geextraktion

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Bestrahlung (312 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und nach der Anleitung des NucleoSpin® Gel and PCR Purification Kits von Macherey-Nagel isoliert.

2.12.8 Restriktion von DNA

Das sequenzspezifische Schneiden doppelsträngiger DNA [203] erfolgte mit Hilfe von Typ II Restriktionsendonukleasen nach den Angaben des Herstellers Thermo Fisher. Bei Verdau mit mehreren Enzymen wurde die Restriktion nacheinander einschließlich eines zwischenzeitlichen Inaktivierungsschritts vorgenommen. Ein exemplarischer Restriktionsansatz enthielt:

DNA	0,1 - 1 μ g
FastDigest Puffer (10x)	5 μ l
Enzym	5 - 10 U
H ₂ O	ad 50 μ l

Die Restriktionsansätze wurden 30 - 45 min bei 37 °C inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit zur Analyse auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen.

2.12.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mithilfe der T4 DNA Ligase von Thermo Fisher durchgeführt. Ein exemplarischer Ligationsansatz enthielt:

Insert	3x molarer Überschuss zu Vektor
Vektor	100 ng
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	2,5 μ l
T4 DNA Ligase	5 U
Nuklease freies H ₂ O	ad 25 μ l

Nach Ablauf der Inkubationszeit (16 h bei 17 °C) wurde die T4 DNA Ligase durch die Erhitzung des Ligationsansatzes auf 65 °C für 10 min inaktiviert.

2.12.10 *Gibson Assembly*

Die Plasmide pMRE09, pMRP12 und pMRP13 wurden mithilfe von *Gibson Assembly* unter Anwendung des NEBuilder[®]Hifi DNA Assembly Cloning Kits von NEB nach dem Herstellerprotokoll erstellt. Die Konstrukte wurden vor der weiteren Verwendung über Sequenzanalyse überprüft.

2.12.11 Ortsspezifische Mutagenese

Die Plasmide pMRE09 und pMRP14 wurden über ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung des *QuikChange II Lightning* Kits XL von Agilent gemäß den Herstellerangaben konstruiert. Die Plasmide wurden vor dem Gebrauch über Sequenzanalyse überprüft.

2.12.12 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen nach Sambrook *et al.* [203] wurde eine LB-ÜN-Kultur 1:100 in 100 ml LB verdünnt und bei 37 °C und 170 UpM bis zum Erreichen der $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf jeweils 50 ml aufgeteilt und die Zellen 5 min bei 1485 g und 4 °C sedimentiert. Die Pellets wurden in 50 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 1485 g und 4 °C wurden die Sedimente in 5 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$ /15 % (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert und in Aliquots von 200 μ l bei -80 °C gelagert.

2.12.13 Herstellung elektrokompenter *P. aeruginosa*-Zellen

Die Herstellung elektrokompenter *P. aeruginosa*-Zellen erfolgte nach Choi *et al.* [38]. Es wurden 3 ml einer LB-ÜN-Kultur 2 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde zwei Mal mit 1 ml eiskalter 0,3 M Saccharose-Lösung gewaschen und nach der Zentrifugation von 2 min bei 8000 g und 4 °C in 200 μ l eiskalter 0,3 M Saccharose-Lösung resuspendiert. Die elektrokompenten *P. aeruginosa*-Zellen wurden direkt zur Transformation eingesetzt.

2.12.14 Transformation in chemokompetente *E. coli*-Zellen

Chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l Plasmid-DNA oder 10 μ l Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min im Heizblock vorgenommen und die Zellen für 2 min auf Eis gestellt. Zur Regeneration wurden 700 μ l LB-Medium zugegeben und die Zellen für 60 min bei 37 °C und unter konstantem Schütteln bei 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Zur Selektion von positiven Klonen wurden 100 μ l der transformierten *E. coli*-Zellen auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.12.15 Transformation in elektrokompetente *P. aeruginosa*-Zellen

Frisch hergestellten elektrokompetenten *P. aeruginosa*-Zellen wurden 500 ng Plasmid-DNA zugegeben und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (BioRad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer elektrischen Kapazität von 25 μF . Daraufhin wurde 1 ml auf 37 °C temperiertes LB-Medium hinzugefügt und die Zellen 2 h bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Nach der Regeneration wurden 50 μl sowie 100 μl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.12.16 Diparentales *Mating*

Die Konjugation von Plasmid-DNA zur Erstellung markerloser Mutanten erfolgte anhand von *E. coli* S17-I. Dafür wurden der Stamm *E. coli* S17-I mit dem entsprechenden Plasmid sowie der jeweilige *P. aeruginosa*-Stamm über Nacht bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) in LB-Medium inkubiert. Für das diparentale *Mating* wurden die Stämme im Verhältnis von 9:1 (Donor:Empfänger) miteinander vermengt und der Konjugationsansatz 30 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 1 min bei 1485 g wurde das Zell-Pellet vorsichtig in 100 μl LB-Medium resuspendiert, auf eine LB-Agarplatte aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellmaterial mit einer sterilen Impföse von der Agarplatte abgekratzt und eine Verdünnungsreihe in 0,9 % (w/v) Saline erstellt. Jeweils 100 μl der Verdünnungen wurden auf *Pseudomonas*-Isolations-Agar mit dem Zusatz von Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.12.17 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Stämmen wurde nach dem Herstellerprotokoll des NucleoSpin[®]Plasmid EasyPure Kits von Macherey-Nagel durchgeführt. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch ermittelt (Kapitel 2.12.5).

2.12.18 Präparation von chromosomaler DNA aus *P. aeruginosa*

Die Präparation chromosomaler DNA aus *P. aeruginosa* wurde gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls des NucleoSpin[®]Microbial DNA Kits von Macherey-Nagel vorgenommen. Die Konzentration der isolierten genomischen DNA wurde photometrisch gemessen (Kapitel 2.12.5).

2.12.19 Sequenzanalyse von DNA

Für die Sequenzanalyse wurde präparative Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 80 - 100 ng/ μl und gereinigte PCR-Produkte mit einer Konzentration von 20 - 80 ng/ μl verwendet. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins Genomics durchgeführt.

2.12.20 Konstruktion markerloser Deletionsmutanten

Zur Herstellung der markerlosen Deletionsmutanten PAO1 $\Delta nbdA$, PAO1 $\Delta mucR$ und PAO1 $\Delta nbdA \Delta mucR$ wurden die Plasmide pMRP04 und pMRP05 verwendet. Diese Konstrukte basieren auf dem Suizidvektor pEXG2 und beinhalten die verkürzten Gene PA1727 und PA3311 sowie die jeweiligen flankierenden Regionen. Die Plasmide wurden zunächst in *E. coli* S17-I-Zellen transformiert und anhand von diparentalem *Mating* (Kapitel 2.12.16) in *P. aeruginosa* PAO1 übertragen. Die Selektion von *P. aeruginosa* erfolgte über Gentamicin-haltige *Pseudomonas*-Isolations-Agarplatten. Von der Selektionsplatte wurden Einzelkolonien zuerst auf LB-Agarplatten und zur Gegenselektion auf LB-Agarplatten mit 15 % (v/v) Saccharose ausgestrichen. Daraufhin wurden diese ein zweites Mal auf LB-Agarplatten mit 15 % (v/v) Saccharose sowie parallel auf LB-Agarplatten mit und ohne den Zusatz von Gentamicin überimpft. Hierbei dient das auf dem Suizidvektor enthaltene *sacB*-Gen als negativer Selektionsmarker. Das Gen codiert für das Enzym Levansucrase, welches Saccharose in ein toxisches Produkt umsetzt. Folglich können nur die Kolonien überleben, bei denen das *sacB*-Gen über homologe Rekombination herausgeschnitten wurde. Für das Screening über Kolonie-PCR (Kapitel 2.12.3) wurden nur Gentamicin-sensitive Klone in Betracht gezogen, da bei diesen über ein doppeltes homologes Rekombinationsereignis der überschüssige Plasmidteil entfernt wurde.

2.12.21 Konstruktion markerhaltiger Deletionsmutanten

Für die Konstruktion der markerhaltigen Deletionsmutanten PAO1 $\Delta nbdA$ M, PAO1 $\Delta mucR$ M und PAO1 $\Delta nbdA \Delta mucR$ M wurden die Plasmide pASP01 und pSHP02 verwendet, die auf dem Suizidvektor pEX18Ap basieren. Hierfür wurden die Plasmide zunächst in *E. coli* S17-I transformiert und mithilfe von Konjugation in *P. aeruginosa* PAO1 transferiert (Kapitel 2.12.16). Die Selektion von *P. aeruginosa*-Zellen wurde anhand von *Pseudomonas-Isolation-Agar* mit Gentamicin bzw. Tetrazyklin vorgenommen. Daraufhin wurden Einzelkolonien zwei Mal auf LB-Agarplatten mit dem Zusatz von 5 % (v/v) Saccharose und Gentamicin bzw. Tetrazyklin überimpft und anschließend auf Gentamicin- bzw. Tetrazyklin-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Verifizierung der Mutanten erfolgte über Kolonie-PCR (Kapitel 2.12.3) und Sequenzierung des PCR-Produkts (Kapitel 2.12.19).

2.13 Proteinbiochemische und bioanalytische Methoden

2.13.1 Heterologe Proteinproduktion in *E. coli*

Für die heterologe Proteinproduktion von N- und C-terminalen Strep-*tagII*-Fusionsproteinen in *E. coli* $\Delta pdeH$ wurden Konstrukte auf Basis des Vektors pCYB1 verwendet. Die Plasmide pMRE04, pMRE07, pMRE08 und pMRE09 wurden in *E. coli* $\Delta pdeH$ transformiert und in 8 ml Schwimm-Medium unter Selektionsdruck (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) über Nacht

bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Daraufhin wurden 50 ml LB-Medium mit dem Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin (+ Amp100) im Verhältnis von 1:100 mit der entsprechenden ÜN-Kultur inokuliert und bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Bei Erreichen einer $OD_{600} = 0,5$ wurden 400 µl Probe entnommen, die Kultur auf RT abgekühlt und die Proteinproduktion durch die Zugabe von 100 µM IPTG induziert. Nach den Zeitpunkten 1 h, 3 h und 5 h wurden weitere Proben ($OD_{600} = 0,5$) entnommen und bis zur Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.13.2 *In-vivo*-Untersuchungen enzymatischer Aktivität in *E. coli*

Der *in-vivo*-Nachweis der PDE-Aktivität von NbdA und MucR sowie der DGC-Aktivität von MucR erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 2.1 aufgelisteten *E. coli*-Stämme. Die Stämme *E. coli* AB607 und *E. coli* MG1655 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Urs Jenal (Biozentrum, Universität Basel) und Dr. Alexander Böhm zur Verfügung gestellt.

Der Test auf PDE-Aktivität basiert auf der Verwendung der $\Delta pdeH$ -Mutante *E. coli* AB607. PdeH gilt als die Hauptphosphodiesterase in *E. coli* [205], deren Verlust aufgrund des erhöhten intrazellulären c-di-GMP-Spiegels die Schwimmbewegung hemmt.

Die entsprechenden Plasmide (Tabelle 2.3) wurden in den Stamm *E. coli* AB607 transformiert, um eine Komplementation des Schwimm-Defekts bei einer PDE-Aktivität der Vollängenproteine sowie der Ein- und Zwei-Domänen-Varianten von NbdA und MucR zu untersuchen. Für den Nachweis der DGC-Aktivität von MucR wurde das Plasmid pMRE07 in den WT *E. coli* MG1655 eingebracht. ÜN-Kulturen in Schwimm-Medium (Adler) wurden auf die $OD_{600} = 1,0$ in Schwimm-Medium (Adler) eingestellt und jeweils 1 µl auf Schwimm-Agarplatten mit dem Zusatz von 100 µM IPTG aufgetragen. Die Schwimmplatten wurden für 5 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Schwimmverhalten der Stämme dokumentiert.

2.13.3 *In-vivo*-Nachweis einer putativen NO-Sensor-Funktion

Für den Test auf NO-Sensor-Funktion von NbdA und MucR wurde zunächst ein *in-vivo*-Nachweis-System für den Gebrauch der physiologisch relevanten Konzentration des NO-Donors SNP etabliert. Hierfür wurde das auf dem Plasmid pSZE04 codierte bicistronische Operon *dgc1-h-nox* aus *Dinoroseobacter shibae* DFL12^T in den Stamm *E. coli* MG1655 eingebracht. H-NOX ist als NO-Sensor in der Lage geringe Konzentrationen des Gases wahrzunehmen und hemmt daraufhin die Aktivität der DGC DGC-1. Dies führt zu einem erniedrigten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel und fördert die Schwimmbewegung des Stammes *E. coli* MG1655::pSZE04 im flüssigen Milieu (0,3 % w/v Agarkonzentration). Im Gegensatz dazu ist DGC-1 in Abwesenheit von NO aktiv, was in einem vermindertem Schwimmverhalten von *E. coli* MG1655::pSZE04 resultiert (Abbildung 2.2).

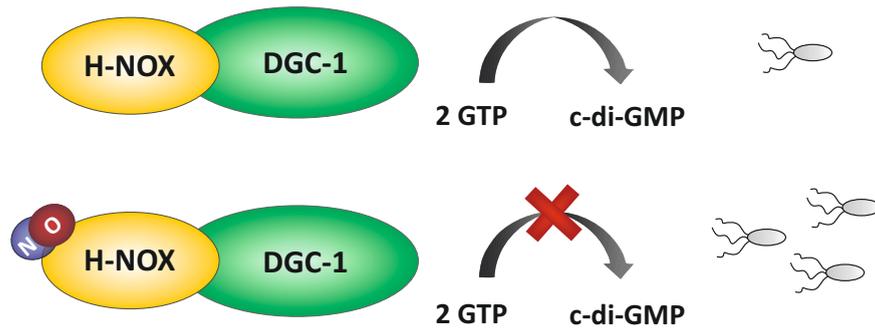


Abbildung 2.2: Einfluss von NO auf die Schwimmbewegung von *E. coli*. In Abwesenheit von NO ist die DGC DGC-1 aktiv und synthetisiert aus zwei Molekülen GTP c-di-GMP. Aufgrund eines hohen, internen c-di-GMP-Spiegels ist die Schwimmbewegung der Bakterien reduziert. Geringe NO-Konzentrationen werden von dem Sensorprotein H-NOX wahrgenommen, woraufhin die Aktivität von DGC-1 gehemmt wird. Dies führt zu einer Abnahme der intrazellulären c-di-GMP-Konzentration und zu einer Stimulation des Schwimmverhaltens.

Die in Tabelle 2.1 aufgelisteten *E. coli*-Stämme wurden über Nacht in Schwimm-Medium (Adler) bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) kultiviert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte bei 600 nm auf 1,0 in Schwimm-Medium (Adler) eingestellt. Nach der Induktion mit 100 μ M IPTG für 20 min bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) wurden Schwimm-Agarplatten mit einer finalen Konzentration von 250 nM SNP und 100 μ M IPTG mit 1 μ l einer Bakterienkultur inokuliert. Als Kontrolle wurden 0,3%ige Schwimm-Agarplatten ohne den Zusatz von SNP verwendet. Die Schwimmbewegung wurde nach 5 h bei 37 °C betrachtet.

2.13.4 Homologe Proteinproduktion in *P. aeruginosa*

Die homologe Produktion des NbdA-Strep-tagII-Fusionsproteins in *P. aeruginosa* erfolgte mit Hilfe des Vektors pMRP12, welcher über Elektroporation (Kapitel 2.12.15) in den Stamm PAO1 eingebracht wurde. Für die Proteinproduktion wurde eine LB-ÜN-Kultur von PAO1::pMRP12 1:20 in 50 ml LB-Medium mit dem Zusatz von Tetracyclin verdünnt und bei 37 °C und 170 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Bei Erreichen einer $OD_{600} = 0,5$ wurde die erste Probe (0 h) entnommen. Die Genexpression von *nbdA* wurde nach dem Abkühlen der Kultur auf RT durch die Zugabe von 0,1 % (w/v) L-Arabinose induziert. Nach der Induktion wurde die Kultur bei 17 °C und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert und nach 1 h, 3 h, 5 h, 7 h und 23 h 1 ml Zellen ($OD_{600} = 0,5$) geerntet (1 min, RT, 15685 g). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.13.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Technik, um Proteine im elektrischen Feld unter reduzierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen [133]. Hierfür wurden 5,25 % (w/v) Sammelgele (pH 6,8) zur Fokussierung und

10 % (w/v) Trenngele (pH 8,8) zur Auftrennung der Proteine verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer (2x) versetzt, 15 min bei 60 °C inkubiert und 10 min bei 15685 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel mit 10 µl Probe pro Geltasche beladen. Die Elektrophorese erfolgte ca. 60 min bei einer konstanten Spannung von 170 V in Elektrophorese-Puffer. Als Größenreferenz diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher.

Sammelgel 5,25 % (w/v)	2 Minigele	Trenngel 10 % (w/v)	2 Minigele
APS 10 % (w/v)	0,08 ml	APS 10 % (w/v)	0,15 ml
Rotiphorese Gel 30	0,67 ml	Rotiphorese Gel 30	3,4 ml
Sammelgel-Puffer (4x)	1,3 ml	Trenngel-Puffer (4x)	2,7 ml
TEMED	8 µl	TEMED	15 µl
H ₂ O	2,975 ml	H ₂ O	3,8 ml

2.13.6 Coomassie-Färbung

Diese Methode wurde von Fazekas *et al.* [65] etabliert und dient zur Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamidgel im Anschluss an die SDS-PAGE (Kapitel 2.13.5). Das Polyacrylamidgel wurde für 5 min mit der Coomassie-Färbelösung unter konstantem Schwenken behandelt. Zur Kontrastverbesserung wurde diese entfernt und das Gel drei Mal für jeweils 20 min in der Entfärbelösung geschwenkt.

2.13.7 Kolloidale-Coomassie-Färbung

Die Kolloidale-Coomassie-Färbung wurde im Vorfeld eines tryptischen In-Gel-Verdaus für die massenspektrometrische Analyse von NbdA des Stamms *E. coli* $\Delta pdeH::pSZE03$ angewandt.

Das Polyacrylamidgel wurde zunächst zwei Mal für jeweils 10 min in Fixierlösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel zwei Mal 5 min mit ddH₂O gewaschen und die Arbeitslösung hergestellt. Hierfür wurde der kolloidalen Coomassie-Lösung Methanol in einer finalen Konzentration von 20 % (v/v) zugegeben. Nach der Färbung über Nacht wurde die Lösung entfernt und das Gel in ein neues Gefäß mit 1%iger Essigsäurelösung überführt und bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrunds unter Schwenken behandelt.

2.13.8 Western-Blot-Transfer

Der Western-Blot-Transfer ist eine Technik, um Proteine auf eine Membran zu immobilisieren [239] und wird im Anschluss an die SDS-PAGE durchgeführt. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Verfahren für den Protein-Transfer verwendet: Die *Tank-Blot*- und die *Semi-Dry*-Methode. Vor dem Transfer wurde die Membran durch die Behandlung mit Methanol aktiviert und das Polyacrylamidgel in Transfer-Puffer äquilibriert. Nach der Aktivierung wurde die Membran zusammen mit zwei Blotting-Paper in Transfer-Puffer

überführt und das Blot-Sandwich aufgebaut. Hierzu wurden das Polyacrylamidgel sowie die aktivierte Membran zwischen zwei Blot-Papiere gelegt und das Sandwich zwischen die Anode und Kathode der *Semy-Dry-Blot*-Apparatur platziert. Der Transfer erfolgte 20 min bei einer konstanten Spannung von 15 V.

Bei Anwendung des *Tank-Blot*-Verfahrens wurden die Membran und das Polyacrylamidgel wie zuvor beschrieben behandelt, zwischen zwei Blot-Papiere in eine Kassette eingespannt und in die mit Transfer-Puffer gefüllte Apparatur übertragen. Der Transfer erfolgte 1 h bei 4 °C und einer konstanten Spannung von 100 V. Im Anschluss wurde ein immunologischer Nachweis vorgenommen (Kapitel 2.13.9).

2.13.9 Immunologischer Nachweis von Strep-tagII-Fusionsproteinen

Im Anschluss an den Western-Blot-Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen 1 h mit 3 % (w/v) BSA-Lösung bei RT oder über Nacht bei 4 °C blockiert. Danach wurde die Membran drei Mal mit TBS-T-Puffer gewaschen und 10 min mit Avidin (2 µg/ml) behandelt. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem Antikörperkonjugat Strep-Tactin Alkalische Phosphatase (1:4000 in TBS-T-Puffer) wurde die Membran zwei Mal mit TBS-T-Puffer und zwei Mal mit TBS-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Behandlung mit der Substrat-Lösung (NBT/BCIP in AP-Puffer) bis zum Auftreten eines bläulichen Niederschlages. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von ddH₂O gestoppt. Letztlich wurde die Membran drei Mal mit ddH₂O gewaschen und getrocknet.

2.13.10 Tryptischer In-Gel-Verdau

Der tryptische In-Gel-Verdau wurde im Rahmen einer Kooperation von Dr. Frederik Sommer (Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, TU Kaiserslautern) nach Veyel *et al.* [242] durchgeführt. Bei dem tryptischen In-Gel-Verdau nach Leube *et al.* [139] und Prussak *et al.* [187] werden aus dem ein- oder zweidimensionalen Gel ausgeschnittene Proteinbanden durch enzymatischen Verdau in Peptide zerlegt [95].

Zunächst wurde die gefärbte Gelbande mit einem Skalpell aus dem Polyacrylamidgel isoliert und in 1 mm x 1 mm große Würfel zerkleinert. Anschließend wurden die Gelstücke drei Mal mit 25 mM NH₄HCO₃-Puffer gewaschen und mit 100 µl 50 % (v/v) Acetonitril (ACN) für je 15 min behandelt. Daraufhin erfolgte die Reduktion der Disulfidbrücken zum Thiol sowie die Alkylierung der SH-Gruppen mit einer 10 mM Dithiothreitol/25 mM NH₄HCO₃-Lösung bei 50 °C und 500 UpM (Innova 44R, New Brunswick) für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und die Gelstücke durch die Zugabe von ACN geschrumpft. Danach wurden die Gelstücke in 55 mM Jodacetamid/25 mM NH₄HCO₃-Lösung unter Lichtausschluss bei RT für 30 min inkubiert. Es wurde wie zuvor beschrieben drei Mal im Wechsel für jeweils 15 min mit 100 µl 25 mM NH₄HCO₃ und 100 µl ACN gewaschen und die Gelfragmente im Vakuumkonzentrator bei 45 °C getrocknet. Daraufhin wurde die Probe auf Eis mit 30 µl einer 12,5 ng/µl Trypsin/25 mM NH₄HCO₃-Lösung 1 h verdaut. Nach

der Aufnahme der Trypsinlösung wurden die Gelstücke mit 25 mM NH_4HCO_3 -Puffer überschichtet und mindestens 6 h bei 37 °C unter konstantem Schütteln bei 500 UpM (Innova 44R, New Brunswick) bei RT inkubiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit zwei Überständen eines einstündigen Verdaus mit 100 μl 50 % (v/v) ACN/1 % (v/v) Essigsäure vereinigt. Nach der Vakuumkonzentration wurden die Peptide gemäß den Angaben von Rappsilber *et al.* [190] entsalzen und im Vakuumkonzentrator getrocknet.

2.13.11 Elektrospray-Ionisations-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisations-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (ESI-LC-MS) wurde in Kooperation mit Dr. Frederik Sommer (Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, TU Kaiserslautern) vorgenommen. Bei der ESI-MS werden über ein Elektrospray gasförmige Ionen erzeugt, welche in dem Massenanalysator nach ihrem Masse-Lade-Verhältnis aufgetrennt werden. In dem nachgeschalteten Detektor wird ein Massenspektrum generiert [55], welches im Abgleich mit einer Datenbank zur Identifikation der Makromoleküle führt.

Nach dem tryptischen In-Gel-Verdau (Kapitel 2.13.10) wurde die ESI-MS-Analyse an dem Gerät Eksport nanoLC 425 (Sciex) in Kombination mit dem Triple-TOF6600-System (Sciex) angewandt. Die Auftrennung über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde im *trap-elution*-Modus durch den Gebrauch von Triart-C18-Säulen (YMC Co.) durchgeführt. Hierbei wurde eine konstante Flussrate von 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet. Der Gradient wurde innerhalb von 40 min von 2 % (v/v) auf 35 % (v/v) des HPLC-Puffers B (90 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) Ameisensäure) beschleunigt, gefolgt von mehrmaligem Waschen und Äquilibrieren. Das Massenspektrometer wurde im IDA-Modus betrieben, in welchem ein *Survey Scan* (250 ms, 350-1250 m/z) und Fragment-Spektren (100-1500 m/z) der 20 meist relevanten Mutter-Ionen (70 ms, Ladezustand >2, Intensität >400 cps) aufgenommen wurden.

2.13.12 Extraktion von Metaboliten aus *P. aeruginosa*-Flüssigkulturen

Für die Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Analyse (LC-MS/MS) von c-di-GMP und pGpG aus den Stämmen PAO1 WT, PAO1 $\Delta nbdA$, PAO1::pHERD26T und PAO1::pMRP13 wurde eine Metabolitextraktion aus bakteriellen Flüssigkulturen nach der Vorschrift 8.3.1.2 von Prof. Dr. Volkhard Kaefer (ZFA Metabolomics, Medizinische Hochschule Hannover) vorgenommen.

Hierfür wurden die LB-ÜN-Kulturen im Verhältnis von 1:20 in LB-Medium verdünnt. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wurde die Proteinproduktion von PAO1::pHERD26T und PAO1::pMRP13 nach Abkühlen auf RT mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose induziert und die Stämme 5 h bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Die Kulturen des WT und der *nbdA*-Mutante wurden mit Ausnahme der Zugabe von Tetrazyklin und

L-Arabinose gleichermaßen behandelt. Im Anschluss wurden die Kulturen auf Eis gekühlt und eine OD₆₀₀ von 1,5 in 5 ml LB-Medium eingestellt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren für 20 min bei 4 °C und 2500 g sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Sedimente wurden zwei Mal mit je 500 µl LB-Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 20 min bei 4 °C und 2500 g wurden die Niederschläge mit 300 µl Extraktionslösung behandelt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben für 10 min bei 95 °C erhitzt, kurz auf Eis gestellt und 10 min bei 4 °C und 20800 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert. Daraufhin wurden die Extraktionsschritte mit Ausnahme der Inkubation bei 95 °C mit jeweils 200 µl Extraktionslösung zwei Mal wiederholt. Die Extrakte wurden vereinigt und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Die restlichen Sedimente wurden für eine spätere Proteinbestimmung bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Extrakte 10 min bei 4 °C und 20800 g zentrifugiert und die Überstände in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zum Versand auf Trockeneis bei -80 °C.

2.13.13 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration der metabolischen Extrakte von PAO1 WT, PAO1 $\Delta nbdA$, PAO1::LV und PAO1::pMRP13 wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits nach Angaben des Herstellers Thermo Fisher ermittelt.

2.13.14 Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

Die LC-MS/MS-Analyse wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Volkhard Kaever (ZFA Metabolomics, Medizinische Hochschule Hannover) vorgenommen. Hierbei handelt es sich um ein analytisches Verfahren zur Molekülbestimmung, das eine Kombination aus der Flüssigkeitschromatographie und der Massenspektrometrie darstellt.

Die Flüssigextrakte der Bakterienstämme PAO1 WT, PAO1 $\Delta nbdA$, PAO1::pHERD26T und PAO1::pMRP13 wurden zunächst im Vakuumkonzentrator bei 40 °C eingetrocknet und mit 200 µl HPLC-reinem Wasser gelöst. Anschließend wurden die Proben 30 sec mit Hilfe des Vortexers gemischt und 10 min bei 4 °C und 20800 g zentrifugiert. Zu 40 µl HPLC-reinem Wasser mit dem Zusatz von 200 ng/ml ¹³C₂₀¹⁵N₁₀-c-di-GMP, 200 ng/ml ¹³C₂₀¹⁵N₁₀-c-di-AMP und 100 ng/ml Tenofovir wurden 40 µl der Überstände in Schraubgewindefläschchen mit Einsatz gegeben und gemischt. Daraufhin erfolgte die Präparation des c-di-NMP-Metaboliten-Kalibrationsstandards cdM0, 4-13. Nach der Zugabe von 40 µl HPLC-reinem Wasser und 50 µl HPLC-reinem Wasser (+ 200 ng/ml ¹³C₂₀¹⁵N₁₀-c-di-GMP, + 200 ng/ml ¹³C₂₀¹⁵N₁₀-c-di-AMP, + 100 ng/ml Tenofovir) zu 10 µl Kalibrationsstandard wurde 30 sec mit dem Vortexer gemischt. Im Anschluss wurde die Kalibrierlösung für 10 min bei 95 °C erhitzt und kurz auf Eis gekühlt. Zur optimalen Proteinfällung wurde der Kalibrationsstandard über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde der

Standard für 10 min bei 4 °C und 20800 g zentrifugiert und in ein Schraubgewindefläschchen mit Einsatz überführt. Die Analyse wurde am Massenspektrometer API 4000™ von Sciex vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der *P. aeruginosa*-Mutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$

Zur Untersuchung der Funktion der Membranproteine NbdA und MucR aus *P. aeruginosa* wurde eine phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und der Doppelmutante $\Delta nbdA \Delta mucR$ im Vergleich zu dem PAO1 Wildtyp (WT) vorgenommen.

In einer vorherigen Arbeit wurden bereits die Insertionsmutanten PAO1 $\Delta nbdA$ und PAO1 $\Delta mucR$ hergestellt [142]. Phänotypische Analysen zeigten jedoch, dass der hierfür verwendete WT einen Motilitätsdefekt aufwies und mutiert war [77]. Aus diesem Grund wurde der WT PAO1 DSM-22644 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen angefordert. Auf Basis dieses Stamms wurden die Insertionsmutanten PAO1 $\Delta nbdA$ M, PAO1 $\Delta mucR$ M sowie die Doppelmutante PAO1 $\Delta nbdA \Delta mucR$ M unter Verwendung der vorhandenen Deletionsplasmide erstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mutanten nochmals markerlos konstruiert, da die Doppelmutante PAO1 $\Delta nbdA \Delta mucR$ M aufgrund der integrierten Antibiotika-Resistenzkassetten polare Effekte zeigte. Weiterhin deuteten Transkriptomdaten daraufhin, dass der auf der *Pseudomonas*-Datenbank [251] hinterlegte Translationsstart (TLS) von *nbdA* falsch annotiert ist (Kommunikation mit S. Häussler). Daher wurde eine *5'-rapid-amplification-of-cDNA-ends*-Analyse (5'-RACE) durchgeführt und basierend auf dem ermittelten Transkriptionsstart (TSS) der neue TLS von *nbdA* festgelegt (S. Zehner, unveröffentlichte Daten). Dieser ist 168 bp stromabwärts des annotierten TLS lokalisiert. Somit wurde bei den zuvor generierten Insertionsmutanten $\Delta nbdA$ M und $\Delta nbdA \Delta mucR$ M ein Teil der intergenischen Region deletiert. Aus den genannten Gründen wurden neue Konstrukte für eine markerlose *in-frame*-Deletion der Gene *mucR* und *nbdA* erstellt und chromosomal in den WT integriert.

Der Übersicht halber sind im Folgenden nur die Ergebnisse der Charakterisierung der

markerlosen Deletionsmutanten aufgeführt. Neben dem Wachstum wurden die Motilität, die Biofilmbildung sowie die Produktion von Exopolysacchariden der Biofilmmatrix untersucht. Weiterhin wurde die intrazelluläre Konzentration des sekundären Botenstoffs c-di-GMP und dessen Abbauprodukts GMP bestimmt. Hinsichtlich der putativen Funktion von NbdA und MucR als Sensoren für zweiatomige Gase wurde zudem die NO-induzierte Auflösung von Biofilmen im statischen System analysiert.

3.1.1 Untersuchung des Wachstums

Aus Microarray-Analysen ist bekannt, dass das Gen PA3311 (*nbdA*) des Stammes PAO1 unter anaeroben Bedingungen nicht exprimiert wird [244]. Daher war die Charakterisierung der $\Delta nbdA$ - und $\Delta nbdA \Delta mucR$ -Mutante unter anaeroben Bedingungen nicht relevant. Folglich wurde das Wachstumsumsverhalten der Stämme $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ im Vergleich zum WT über einen Zeitraum von 24 h lediglich unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C in LB-Medium untersucht (Abbildung 3.1).

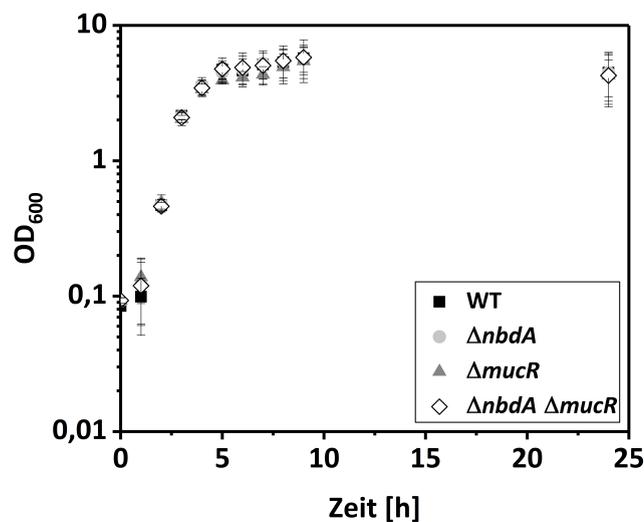


Abbildung 3.1: Wachstum der Mutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ im Vergleich zum WT bei 37 °C. Die LB-ÜN-Kulturen von PAO1 (WT), $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ wurden auf die $OD_{600} = 0,1$ in LB-Medium eingestellt und für 24 h bei 37 °C und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Die OD_{600} wurde stündlich bis zum Zeitpunkt $t = 10$ h sowie nach einem Zeitraum von 24 h gemessen. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit einem technischem Replikat pro Stamm durchgeführt.

Aus dem Verlauf der Wachstumskurven wird deutlich, dass die Mutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp besitzen. Anhand dieses Experiments ist ersichtlich, dass eine Deletion der Gene *nbdA* und *mucR* keine Auswirkung auf das aerobe Wachstumsverhalten bei 37 °C in LB-Medium hat. Um mögliche Effekte der Gendelektionen von *nbdA* und *mucR* auf physiologische Funktionen zu detektieren, wurden weitere phänotypische Analysen vorgenommen.

3.1.2 Nachweis der Exopolysaccharidproduktion

Im Laufe der Biofilmbildung werden die Bakterienzellen in eine selbst produzierte EPS eingebettet, die dem Schutz sowie der Stabilität des Biofilms dient [45]. Exopolysaccharide sind eine kritische Komponente der EPS, deren Bildung mithilfe von Kongorot-haltigem Agar nachgewiesen werden kann. Der Farbstoff ist in der Lage vorhandene Exopolysaccharide zu adsorbieren. Dabei korreliert die Färbung der Kolonien mit der Menge an gebundenen Exopolysacchariden [69].

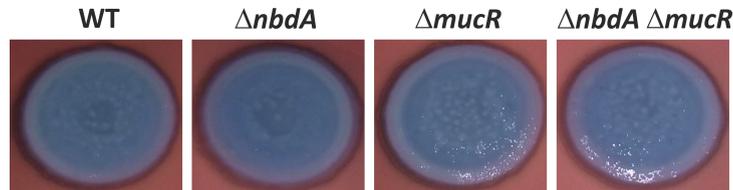


Abbildung 3.2: Kolonie-Morphologie der Mutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ im Vergleich zum WT auf Kongorot-Agar. Die LB-Trypton-ÜN-Kulturen wurden auf die $OD_{600} = 0,025$ in LB-Trypton-Medium eingestellt. Jeweils $5 \mu\text{l}$ der verdünnten Kulturen wurden auf Kongorot-Coomassie-Agarplatten (1 % w/v) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte nach 5 d Inkubation bei RT. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit fünf technischen Replikaten durchgeführt.

Die Kolonien der Stämme WT, $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ wiesen einen ähnlichen Phänotyp auf Kongorot-Agarplatten auf. Alle Stämme besaßen eine glatte Oberfläche mit einem bläulich gefärbten Zentrum und einem dunkelroten Außenring (Abbildung 3.2). Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass sowohl der WT, als auch die Mutanten gleichermaßen in der Lage sind Kongorot zu binden. Es besteht somit kein offensichtlicher Unterschied zwischen den untersuchten Stämmen bezüglich der Bildung von Exopolysacchariden.

Dieser Test liefert lediglich eine qualitative Aussage über die Exopolysaccharidproduktion der Biofilmmatrix und gibt einen Hinweis auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung. Um eine quantitative Aussage hinsichtlich der Biofilmbildung treffen zu können, wurde im Weiteren die Biomasse von statischen Biofilmen nach einem Zeitraum von 24 h und von 48 h analysiert.

3.1.3 Untersuchung der statischen Biofilmbildung

Die Untersuchung der statischen Biofilmbildung der Stämme $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ relativ zum WT nach 24 h und 48 h wurde in Mikrotiterplatten vorgenommen. Die Quantifizierung der adhärennten Biomasse erfolgte über eine Kristallviolett-Färbung und der Messung der Absorption bei 595 nm (Abbildung 3.3).

Die Mutanten $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ zeigten im Vergleich zum WT eine Zunahme der Biomasse nach einem Zeitraum von 24 h. Diese war bei $\Delta mucR$ 1,34-fach und bei

$\Delta nbdA \Delta mucR$ 1,57-fach erhöht. Im Gegensatz dazu wies die $\Delta nbdA$ -Mutante eine ähnliche Biofilmbildung wie der WT auf (Abbildung 3.3 A). Die Auswertung der adhärennten Biomasse nach 48 h (Abbildung 3.3 B) lieferte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Deletionsmutanten und dem WT. Die Resultate dieses Experiments sind somit konsistent mit den zuvor erzielten Ergebnissen der Untersuchung der Exopolysaccharidproduktion.

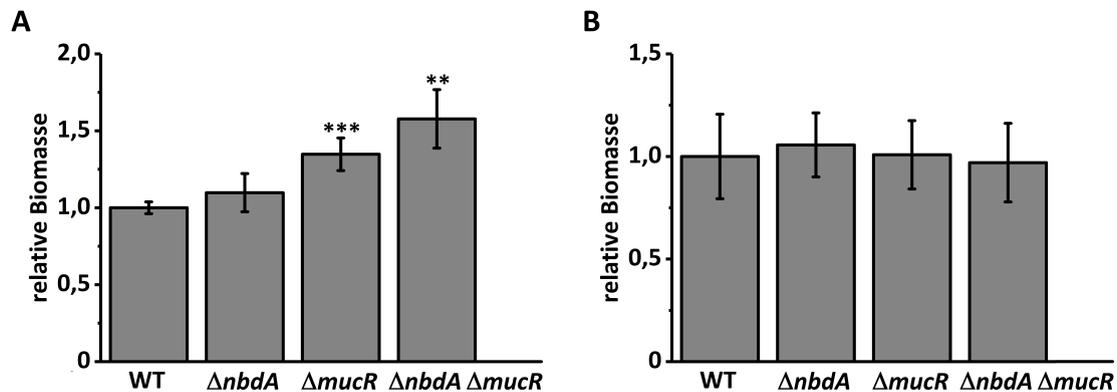


Abbildung 3.3: Biofilmbildung der Mutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ im Vergleich zum WT bei 37 °C. Die BM2-ÜN-Kulturen wurden auf die $OD_{600} = 0,03$ in Biofilm-Medium eingestellt und für 24 h (A) und 48 h (B) in Mikrotiterplatten in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Biomasse wurde mit Kristallviolett (0,1 % w/v) photometrisch bei 595 nm quantifiziert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel der Biomasse normalisiert auf den WT. Das Experiment wurde im biologischen Triplikate mit sechs technischen Replikaten durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde über den Student T-Test bestimmt (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

3.1.4 Untersuchung der NO-induzierten Auflösung statischer Biofilme

Für Insertionsmutanten von $\Delta nbdA$ und $\Delta mucR$ wurde bereits eine Rolle bei der NO-induzierten Auflösung im Schlauchreaktor beschrieben [142]. Diese Ergebnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit im statischen System mit den markerlosen Deletionsmutanten reproduziert werden. Zusätzlich sollte der Phänotyp einer $\Delta nbdA \Delta mucR$ -Doppelmutante untersucht werden. Hierzu wurden in Mikrotiterplatten kultivierte Biofilme nach 24 h Wachstum mit dem NO-Donor SNP behandelt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der adhärennten Biomasse über eine Kristallviolett-Färbung (Abbildung 3.4).

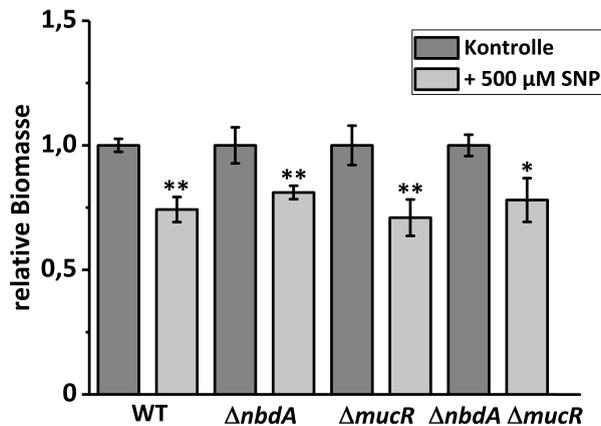


Abbildung 3.4: NO-induzierte Auflösung der statischen Biofilme von $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ im Vergleich zum WT. Die BM2-ÜN-Kulturen wurden auf die $OD_{600} = 0,03$ in Biofilm-Medium eingestellt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurden die planktonischen Zellen verworfen. Die Auflösung der Biofilmzellen wurde durch die Zugabe von 500 μ M des NO-Donors SNP unter Bestrahlung mit Tageslicht (6500 K) für 1 h bei RT angeregt. Als Kontrolle wurde Biofilm-Medium hinzugefügt. Die Biomasse wurde mit Kristallviolett (0,1 % w/v) photometrisch bei 595 nm quantifiziert. Dargestellt ist das arithmetische Mittel der Biomasse normalisiert auf die jeweilige Kontrolle. Das Experiment wurde im biologischen Triplikate mit zwanzig technischen Replikaten durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde über den Student T-Test bestimmt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Bei allen untersuchten Stämmen war eine deutliche Verringerung der Biomasse nach Zugabe von 500 μ M SNP zu beobachten. Die Reduktion der Biomasse des WTs betrug ca. 26 %. Die Mutanten wiesen mit erniedrigten Biomassen um 19 % ($\Delta nbdA$), 22 % ($\Delta nbdA \Delta mucR$) und 29 % ($\Delta mucR$) ein WT-ähnliches Verhalten auf. Folglich konnte bei allen Deletionsmutanten eine NO-induzierte Biofilmauflösung festgestellt werden.

Da Bakterienzellen für das Verlassen des Biofilms während der Dispersion ihre Motilität wiedererlangen müssen, wurde zudem die Fortbewegung der Deletionsmutanten untersucht.

3.1.5 Untersuchung der Motilität

P. aeruginosa ist in der Lage verschiedene Formen der Motilität zu nutzen. Dazu zählen das Schwimmen, das Twitchen und das Schwärmen. Das Schwimmen ist eine flagellenabhängige Fortbewegung und beruht auf der Rotation der polaren Flagelle [33]. Sie findet im flüssigen Milieu statt und kann bei Verwendung einer niedrigen Agarkonzentration induziert werden. Im Gegensatz dazu wird das Twitchen über die Adhäsion und die Retraktion der Typ IV Pili vermittelt und ist bei der Fortbewegung auf festen Oberflächen von Bedeutung [31], weshalb dies auf dem Boden einer Agarplatte untersucht wurde. Für die dritte untersuchte Bewegungsform, dem Schwärmen, sind neben der polaren Flagelle und Typ IV Pili auch Rhamnolipide relevant. Aufgrund seines Auftretens auf halbfesten Oberflächen unter Stickstoffmangel wurde das Schwärmverhalten auf stickstoffarmen, viskosen

Agarplatten analysiert [68, 126].

Die Mutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ wiesen bei allen drei Motilitätsformen ein WT-ähnliches Verhalten auf (Abbildung 3.5). Weiterhin konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

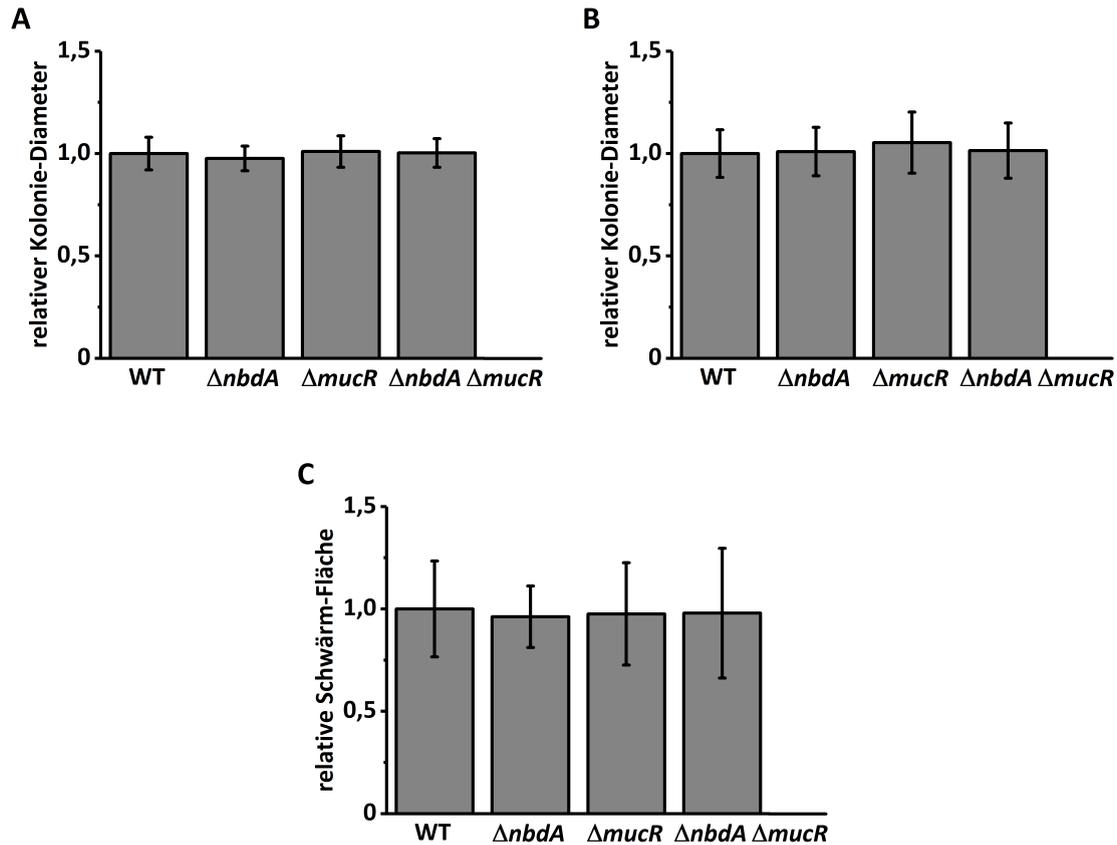


Abbildung 3.5: Motilität der Mutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ im Vergleich zum WT. (A) Für die Analyse der Schwimmbewegung wurde jeweils $1 \mu\text{l}$ einer LB-ÜN-Kultur auf eine 0,3%ige LB-Agarplatte aufgetragen und für 24 h bei 30°C inkubiert. (B) Für die Untersuchung des Twitchens wurde jeweils $1 \mu\text{l}$ einer LB-ÜN-Kultur auf den Boden einer LB-Agarplatte (1 % w/v) aufgetragen. Nach der Inkubation von 48 h bei 37°C wurde der Agar entfernt und die Twitching-Zone mit Kristallviolett (0,1 % w/v) gefärbt. (C) Für die Analyse des Schwärmens wurde eine Schwärmplatte mit einer Agarkonzentration von 0,5 % (w/v) mit jeweils $1 \mu\text{l}$ einer BM2-Kultur ($\text{OD}_{600} = 0,5$) inokuliert. Die Auswertung erfolgte nach der Inkubation von 24 h bei 37°C über die prozentuale Bestimmung der bewachsenen Schwärm-Fläche zur Gesamtfläche der Petrischale. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel der Diameter der Schwimm- und Twitching-Zonen sowie der Schwärm-Fläche normalisiert auf den WT. Die Experimente wurden im biologischen Triplikat mit fünf technischen Replikaten durchgeführt.

Die Ergebnisse der Analyse belegen, dass eine Deletion von $nbdA$ und $mucR$ keine Auswirkung auf die verschiedenen Bewegungsformen der Mutanten hat. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl die polare Flagelle, als auch die Typ IV Pili der Stämme $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ intakt und funktionell sind.

3.1.6 Bestimmung des intrazellulären c-di-GMP- und GMP-Spiegels

Die Exopolysaccharidproduktion, die Biofilmbildung sowie die Motilität werden über den sekundären Botenstoff c-di-GMP reguliert [220]. Die erzielten Resultate der phänotypischen Analyse deuteten auf einen WT-ähnlichen internen c-di-GMP-Spiegel der $\Delta nbdA$ -Mutante hin. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die globale c-di-GMP-Konzentration von $\Delta nbdA$ und dem WT untersucht. Zusätzlich sollte auch die intrazelluläre Konzentration von pGpG bestimmt werden. Dies ist das Produkt der c-di-GMP-Hydrolyse, welche über EAL-Domänen-tragende Phosphodiesterasen vermittelt wird. Der Metabolit konnte jedoch in der massenspektrometrischen Analyse nicht detektiert werden. Dies ist vermutlich auf die weitere enzymatische Umsetzung zu dem Nukleotid GMP zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde stattdessen der globale GMP-Spiegel der Stämme ermittelt.

Für die massenspektrometrische Analyse wurde eine Metabolitextraktion aus Flüssigkulturen von $\Delta nbdA$ und dem WT in stationärer Phase durchgeführt. Die Extrakte wurden von Prof. Dr. Volkhard Kaefer (ZFA Metabolomics, Medizinische Hochschule Hannover) weiter bearbeitet und massenspektrometrisch über LC-MS/MS analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Intrazellulärer c-di-GMP- und GMP-Spiegel der $\Delta nbdA$ -Mutante und des WTs. Aus LB-Kulturen mit $OD_{600} = 1,5$ wurde eine Metabolitextraktion vorgenommen. Die Messung von c-di-GMP und GMP über LC-MS/MS erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Volkhard Kaefer (ZFA Metabolomics, Medizinische Hochschule Hannover). Das Experiment wurde mit einem biologischen Replikate und drei technischen Replikaten durchgeführt.

Stamm	c-di-GMP [pmol/mg]	GMP [pmol/mg]
WT	67,6	2287
$\Delta nbdA$	70,9	1865

Die Resultate der Untersuchung zeigen, dass die intrazellulären c-di-GMP- und GMP-Spiegel der $\Delta nbdA$ -Mutante und des WT nur geringfügig voneinander abweichen. Die c-di-GMP-Konzentrationen der beiden Stämme ($\Delta nbdA$: 67,6 pmol/mg, WT: 70,9 pmol/mg) sind nahezu gleich. Die Abweichung der GMP-Konzentrationen ist im Vergleich dazu deutlich höher.

Aus der massenspektrometrischen Analyse geht hervor, dass der globale c-di-GMP-Spiegel der $\Delta nbdA$ -Mutante in etwa dem des WT entspricht. Somit hat eine Deletion des Gens *nbdA* keine Auswirkung auf die globale c-di-GMP-Konzentration.

3.2 *In-vivo*-Untersuchungen enzymatischer Aktivität

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivitäten von NbdA und MucR wurde ein heterologes *in-vivo*-System in *E. coli* genutzt. Hierfür wurden die von Prof. Dr. Urs Jenal (Biozentrum, Universität Basel) und Dr. Alexander Böhm überlassenen Stämme *E. coli* MG1655 (WT) und *E. coli* AB607 ($\Delta pdeH$) verwendet.

3.2.1 Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität von NbdA und MucR

Der Stamm *E. coli* AB607 besitzt eine Deletion des *pdeH*-Gens und weist aufgrund des Verlusts der Master-Phosphodiesterase PdeH einen hohen, intrazellulären c-di-GMP-Spiegel auf [205]. Dies äußert sich in einem stark verminderten Schwimmverhalten der *E. coli*-Mutante. Über eine Transformation von Expressionsplasmiden in die $\Delta pdeH$ -Mutante und der Überproduktion verschiedener Varianten von NbdA und MucR wurde auf eine funktionelle Komplementation des Schwimmdefekts getestet. Somit konnten Rückschlüsse auf eine vorhandene PDE-Aktivität gezogen werden. Als Negativkontrolle wurde die Mutante mit dem Leervektor pCYB1 transformiert.

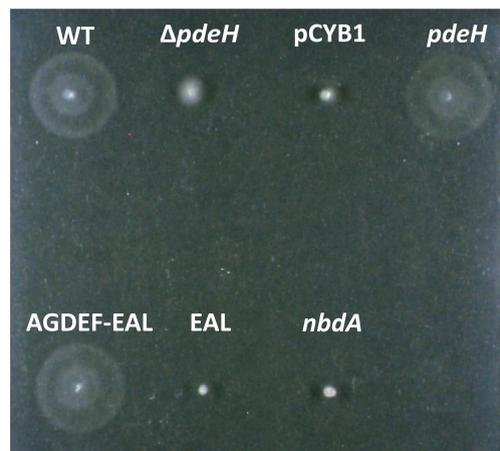


Abbildung 3.6: Funktionelle Komplementation des Schwimmdefekts der $\Delta pdeH$ -Mutante mit verkürzten Varianten von NbdA und dem Volllängenprotein. Jeweils 1 μ l der Trypton-Kulturen mit $OD_{600} = 1,0$ von MG1655 (WT), AB607 ($\Delta pdeH$), AB607::pCYB1 (pCYB1), AB607::pMRE01 (*pdeH*), AB607::pMRE02 (AGDEF-EAL), AB607::pMRE03 (EAL) und AB607::pSZE03 (*nbdA*) wurde auf eine Schwimm-Agarplatte (0,3 % w/v) mit 100 μ M IPTG aufgetragen und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Das Experiment wurde im biologischen Triplikat mit fünf technischen Replikaten durchgeführt.

Die Analyse ergab, dass lediglich die Zwei-Domänen-Variante AGDEF-EAL von NbdA die Schwimmfähigkeit von $\Delta pdeH$ wiederherstellen konnte (Abbildung 3.6). Die Ein-Domänen-Variante EAL sowie das NbdA-Volllängenprotein waren nicht in der Lage den Verlust von PdeH zu komplementieren. Dies deutete zunächst auf einen inhibitorischen Einfluss der Membrandomäne auf die AGDEF- und die EAL-Domäne hin. Die Komplementation der Zwei-Domänen-Variante in Abwesenheit der Membrandomäne implizierte eine regulatorische Funktion der AGDEF-Domäne.

Um das Ergebnis der fehlenden Komplementation des Volllängenproteins zu verifizieren, wurde die Aktivität des N- (Strep-NbdA) und C-terminal Strep-*tagII*-markierten (NbdA-Strep) Proteins analysiert. Die Produktion der Fusionsproteine NbdA-Strep und Strep-NbdA wurde zudem über Western Blot und einem Immuno-Nachweis detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass beide Fusionsproteine den Schwimmdefekt der $\Delta pdeH$ -Mutante komplementieren konnten (Abbildung 3.7). Dies war

widersprüchlich zu dem zuvor erzielten Resultat und wies daraufhin, dass das Volllängenprotein im Stamm *E. coli* AB607::pSZE03 nicht produziert wurde. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde das Vorhandensein des NbdA-Proteins im Vergleich zum NbdA-Strep-Fusionsprotein des Stammes AB607::pMRE04 anhand von ESI-LC-MS in Kooperation mit Dr. Frederik Sommer (Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, TU Kaiserslautern) untersucht. Die massenspektrometrische Analyse (Daten nicht gezeigt) ergab, dass das NbdA-Protein aus *E. coli* AB607::pSZE03 im Gegensatz zum NbdA-Strep-Protein aus *E. coli* AB607::pMRE04 nicht produziert wurde. Somit konnte belegt werden, dass das Schwimmdefizit des Stammes *E. coli* AB607::pSZE03 im Komplementationstest auf die fehlende Proteinproduktion zurückzuführen war. Weiterhin führte dies zu dem Schluss, dass nicht nur die Zwei-Domänen-Variante AGDEF-EAL, sondern auch das Volllängenprotein eine PDE-Aktivität besitzt. Die Membrandomäne hat demnach keinen inhibitorischen Effekt auf die cytosolischen Domänen.

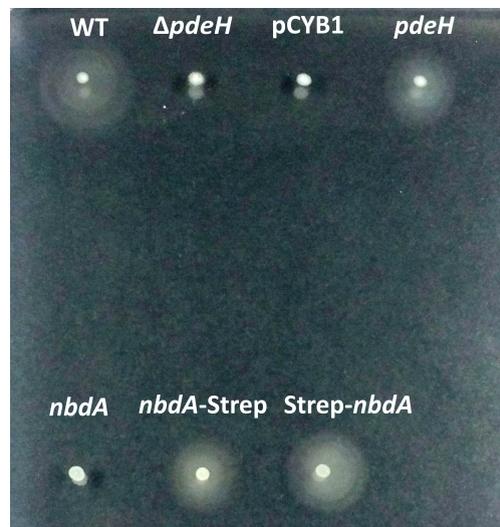


Abbildung 3.7: Funktionelle Komplementation des Schwimmdefekts der $\Delta pdeH$ -Mutante mit verschiedenen Varianten von NbdA. Jeweils 1 μ l der Trypton-Kulturen mit $OD_{600} = 1,0$ von *E. coli* MG1655 (WT), AB607 ($\Delta pdeH$), AB607::pCYB1 (pCYB1), AB607::pMRE01 (*pdeH*), AB607::pSZE03 (*nbdA*), AB607::pMRE04 (*nbdA*-Strep) und AB607::pMRE08 (Strep-*nbdA*) wurde auf eine Schwimm-Agarplatte (0,3 % w/v) mit 100 μ M IPTG aufgetragen und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Das Experiment wurde im biologischen Triplikat mit fünf technischen Replikaten vorgenommen.

Analog zu den *in-vivo*-Untersuchungen von NbdA wurde auf eine putative PDE-Aktivität verschiedener Varianten des MucR-Proteins getestet (Abbildung 3.8). Allein die Ein-Domänen-Variante EAL von MucR komplementierte den Schwimmdefekt der $\Delta pdeH$ -Mutante, obgleich der Phänotyp der geretteten *E. coli*-Mutante AB607::pMRE01 nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte. Dahingegen konnte weder für die Zwei-Domänen-Variante GGDEF-EAL, noch für die Volllängenproteine MucR und MucR-Strep eine PDE-Aktivität nachgewiesen werden. Die EAL-Domäne von MucR besitzt demnach nur

eine schwache enzymatische Aktivität. Diese scheint in Anwesenheit der GGDEF-Domäne inhibiert zu werden.

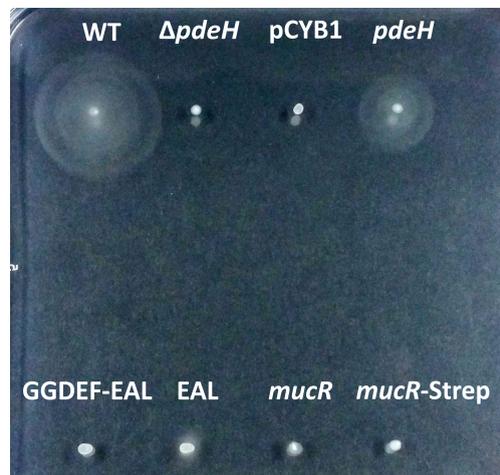


Abbildung 3.8: Funktionelle Komplementation des Schwimndefekts der $\Delta pdeH$ -Mutante mit verkürzten Varianten von MucR und dem Volllängenprotein. Jeweils 1 μ l der Trypton-Kulturen mit $OD_{600} = 1,0$ von MG1655 (WT), AB607 ($\Delta pdeH$), AB607::pCYB1 (pCYB1), AB607::pMRE01 (*pdeH*), AB607::pMRE05 (GGDEF-EAL), AB607::pMRE06 (EAL), AB607::pSZE02 (*mucR*) und AB607::pMRE07 (*mucR*-Strep) wurde auf eine Schwimm-Agarplatte (0,3 % w/v) mit 100 μ M IPTG aufgetragen und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Das Experiment wurde im biologischen Triplikate mit fünf technischen Replikaten vorgenommen.

Zur Verifizierung der zuvor erzielten Resultate wurde die Produktion des C-terminal Strep-tagII-markierten MucR-Proteins mittels SDS-PAGE und Immuno-Blot aus dem Zellysate von *E. coli* AB607::pMRE07 nachgewiesen.

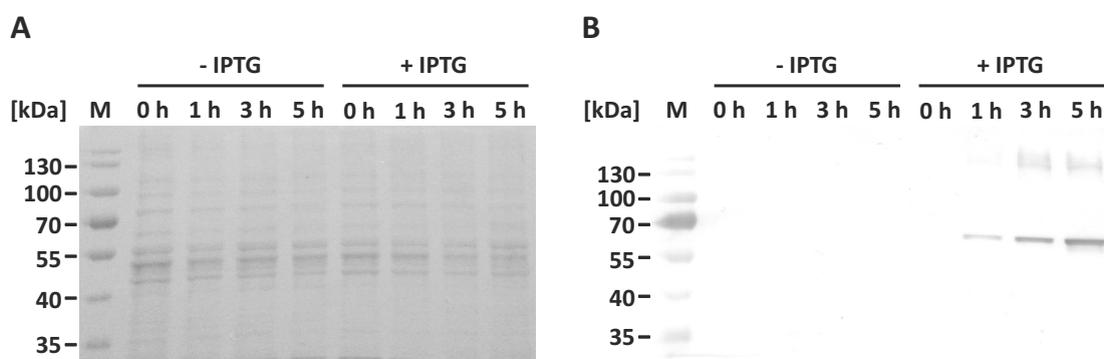


Abbildung 3.9: SDS-PAGE und immunologische Detektion von MucR-Strep aus Zellysate von *E. coli* AB607::pMRE07. Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel (10 % w/v) nach der SDS-PAGE (**A**). Zu (**A**) korrespondierender immunologischer Nachweis anhand des Strep-Tactin-Alkalische-Phosphatase Antikörper-Konjugats nach Transfer auf eine PVDF-Membran (**B**). Es wurden jeweils 10 μ l Probe aufgetragen. M: Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher); - IPTG: Keine Zugabe des Induktors IPTG zum Zeitpunkt t = 0 h (Kontrolle); + IPTG: Zugabe des Induktors IPTG (100 μ M) zum Zeitpunkt t = 0 h; 0 h, 1 h, 3 h, 5 h: Zeitpunkte der Probenahme.

Anhand des Immuno-Blots gegen das Strep-*tagII* des Fusionsproteins wurde bereits eine Stunde nach der Induktion ein Protein bei ungefähr 70 kDa detektiert (Abbildung 3.9 B). Dies entspricht in etwa dem theoretischen Molekulargewicht von MucR (74,4 kDa) [88]. Zudem wurde nach einem Zeitraum von einer Stunde neben MucR ein Protein bei ca. 140 kDa nachgewiesen. Hierbei handelt es sich vermutlich um MucR-Strep-Dimere.

3.2.2 Nachweis der Diguanylatzyklase-Aktivität von MucR

Die Aktivität von MucR als DGC wurde von Kuleskara *et al.* [132] im *P. aeruginosa*-Stamm PA14 beschrieben. Eine biochemische Charakterisierung der DGC-Aktivität erfolgte bisher nur in Bezug auf die cytosolischen Domänen von MucR aus dem PAO1 WT [142]. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit über ein *in-vivo*-System die putative DGC-Funktion des Volllängenproteins untersucht werden. Hierzu wurde das Expressionsplasmid pMRE07 in den WT *E. coli* MG1655 transformiert und MucR-Strep überproduziert. Bei dem Vorliegen einer DGC-Aktivität von MucR und dem damit verbundenen erhöhten c-di-GMP-Spiegel in *E. coli* MG1655::pMRE07 sollte dieser Stamm im Vergleich zum WT und der Kontrolle *E. coli* MG1655::pCYB1 ein verringertes Schwimmverhalten zeigen.

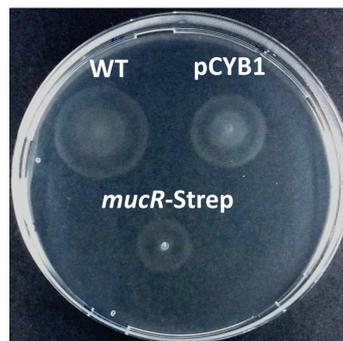


Abbildung 3.10: *In-vivo*-Nachweis der DGC-Aktivität von MucR-Strep. Jeweils 1 μ l der Trypton-Kulturen mit $OD_{600} = 1,0$ von *E. coli* MG1655 (WT), MG1655::pCYB1 (pCYB1) und MG1655::pMRE07 (*mucR*-Strep) wurde auf eine Schwimm-Agarplatte (0,3 % w/v) mit 100 μ M IPTG aufgetragen und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Das Experiment wurde im biologischen Triplikat mit fünf technischen Replikaten durchgeführt.

Aus der Untersuchung geht hervor, dass *E. coli* MG1655::pMRE07 eine deutlich reduzierte Schwimmbewegung im Vergleich zum WT und der Kontrolle aufwies (Abbildung 3.10). Dies lässt sich auf die DGC-Aktivität von MucR-Strep zurückführen. Die *in-vivo*-Analyse des heterolog überproduzierten MucR-Strep-Proteins unterstützt somit die Ergebnisse vorheriger Arbeiten [132, 142].

3.2.3 Etablierung eines *in-vivo*-Systems zur Wahrnehmung von NO

Zur Klärung der Frage, ob NbdA und MucR NO-Sensoren sind, wurde ein *in-vivo*-System zur Wahrnehmung von Stickstoffmonoxid in *E. coli* etabliert. Hierfür wurde das auf dem Expressionsplasmid pSZE04 codierte bicistronische Operon *dgc1-h-nox* aus *Dinoroseobacter shibae* DFL12^T in den WT *E. coli* MG1655 transformiert. Das NO-Sensorprotein H-NOX ist in der Lage niedrige Konzentrationen des Gases wahrzunehmen und inhibiert daraufhin die Aktivität der DGC DGC-1. Dies führt zu einer Erniedrigung des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels und fördert die Schwimmbewegung des Stammes *E. coli* MG1655::pSZE04 auf 0,3%igen Agarplatten. In Abwesenheit von NO wird DGC-1 nicht von H-NOX gehemmt, was sich in einem verminderten Schwimmverhalten äußert [18].

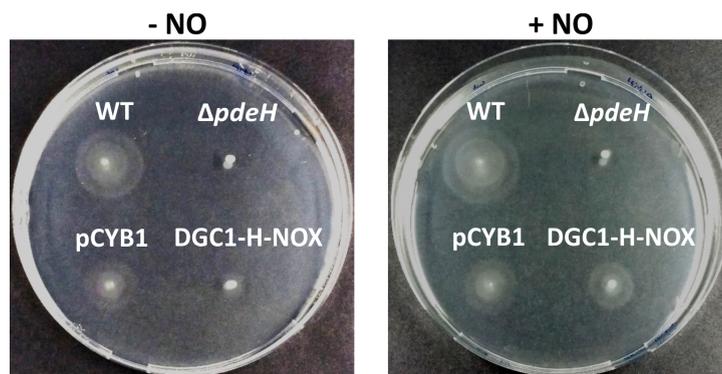


Abbildung 3.11: Schwimmbewegung verschiedener *E. coli*-Stämme in An- und Abwesenheit von Stickstoffmonoxid. Jeweils 1 μ l der Trypton-Kulturen mit $OD_{600} = 1,0$ von *E. coli* MG1655 (WT), AB607 ($\Delta pdeH$), MG1655::pCYB1 (pCYB1) und MG1655::pSZE04 (DGC1-H-NOX) wurde auf 0,3%ige Schwimm-Agarplatten mit 100 μ M IPTG aufgetragen und für 5 h bei 37 °C inkubiert (- NO). Für Schwimmtests in Anwesenheit von NO (+ NO) wurden 0,3%ige Agarplatten mit einer finalen Konzentration von 100 μ M IPTG und 250 nM SNP verwendet. Abbildung modifiziert nach [18].

Für die Untersuchung der Schwimmbewegung in Anwesenheit von NO wurden Konzentrationen zwischen 250 nM und 500 μ M des NO-Donors SNP getestet (Daten nicht gezeigt). Eine Konzentration von 250 nM erwies sich für die Anwendung am besten geeignet und erzielte ein sichtbar gesteigertes Schwimmverhalten des Stammes *E. coli* MG1655::pSZE04 (Abbildung 3.11). Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente ebenfalls mit einer Konzentration von 250 nM SNP vorgenommen.

3.2.4 Nachweis der putativen NO-Sensor-Funktion von NbdA und MucR

In Anlehnung an das zuvor etablierte System zum Nachweis NO-sensorischer Proteine wurde das Schwimmverhalten der *E. coli*-Stämme AB607::pMRE04, AB607::pMRE08 und AB607::pMRE07 auf Schwimmplatten mit einer finalen SNP-Konzentration von 250 nM im Vergleich zu Agarplatten ohne den Zusatz des NO-Donors analysiert. Ziel des Versuchs war die Überprüfung der Hypothese, dass die membranverankerte MHYT-Domäne den

Vollängenproteinen NbdA und MucR eine NO-Sensor-Funktion vermittelt [142]. Ist dies der Fall, sollte nach der Wahrnehmung des Gases der interne c-di-GMP-Spiegel der Kulturen aufgrund einer gesteigerten PDE-Aktivität reduziert werden, was sich förderlich auf das Schwimmen auswirkt.

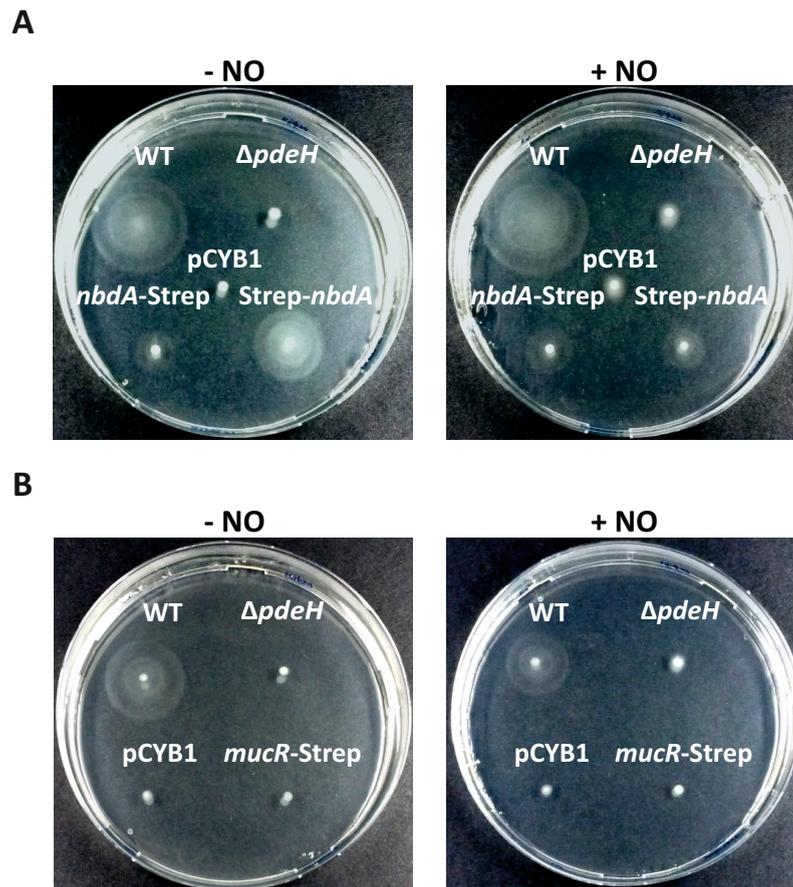


Abbildung 3.12: Heterologe Komplementation des Schwimmdefekts der $\Delta pdeH$ -Mutante mit Strep-tagII-markierten NbdA und MucR in An- und Abwesenheit von Stickstoffmonoxid. Die auf $OD_{600} = 1,0$ eingestellten Trypton-Kulturen von *E. coli* MG1655 (WT), AB607 ($\Delta pdeH$), AB607::pCYB1 (pCYB1), AB607::pMRE04 (*nbdA*-Strep), AB607::pMRE08 (Strep-*nbdA*) und AB607::pMRE07 (*mucR*-Strep) wurden auf 0,3%ige Schwimm-Agarplatten mit 100 μ M IPTG aufgetragen und für 5 h bei 37 °C inkubiert (- NO). Für Schwimmtests in Anwesenheit von NO (+ NO) wurden 0,3%ige Agarplatten mit einer finalen Konzentration von 100 μ M IPTG und 250 nM SNP verwendet. **(A)** Heterologe Komplementation von $\Delta pdeH$ mit NbdA-Strep und Strep-NbdA. **(B)** Heterologe Komplementation von $\Delta pdeH$ mit MucR-Strep.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen (Abbildung 3.12), dass keiner der Expressionsstämme durch die Anwesenheit von NO positiv in seiner Schwimmfähigkeit beeinflusst wurde. Demzufolge hat das Gas im Rahmen dieses Tests keinen ersichtlichen Effekt auf die intrazelluläre c-di-GMP-Konzentration der analysierten Stämme. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass der *in-vivo*-Test aufgrund leicht variierender Bedingungen von qualitativer Natur ist. Nichtsdestotrotz bestätigten die Resultate dieses Experiments den zuvor beobachteten Phänotyp der NO-induzierten Biofilmauflösung der *P. aeruginosa*

$\Delta nbdA$ - und $\Delta mucR$ -Mutanten.

3.3 Charakterisierung der homologen Überproduktion von NbdA

Nachdem die phänotypische Untersuchung der $\Delta nbdA$ -Mutante im Vergleich zum WT in Kapitel 3.1 keine wesentlichen Unterschiede zeigte, wurde die Überproduktion von NbdA im PAO1 WT betrachtet. Als Referenz diente der mit dem Leervektor transformierte WT (PAO1::pHERD26T). Dabei stand die Analyse physiologischer Funktionen wie das Wachstumsverhalten, die Motilität, die Sekretion von Rhamnolipiden sowie die Fähigkeit zur Adhäsion und der Bildung statischer Biofilme im Fokus.

3.3.1 Detektion des homolog überproduzierten NbdA in PAO1

Um die nötigen Bedingungen für die homologe Proteinproduktion von NbdA im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung zu ermitteln, wurde zunächst die Bildung des NbdA-Proteins untersucht. Hierfür wurde das Expressionsplasmid pMRP12 zur homologen Überproduktion in *P. aeruginosa* auf Basis des Vektors pHERD26T konstruiert und in den WT eingebracht. Über ein C-terminal fusioniertes Strep-tagII war es möglich die Proteinproduktion von NbdA zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Immunodetektion nachzuweisen (Abbildung 3.13 B).

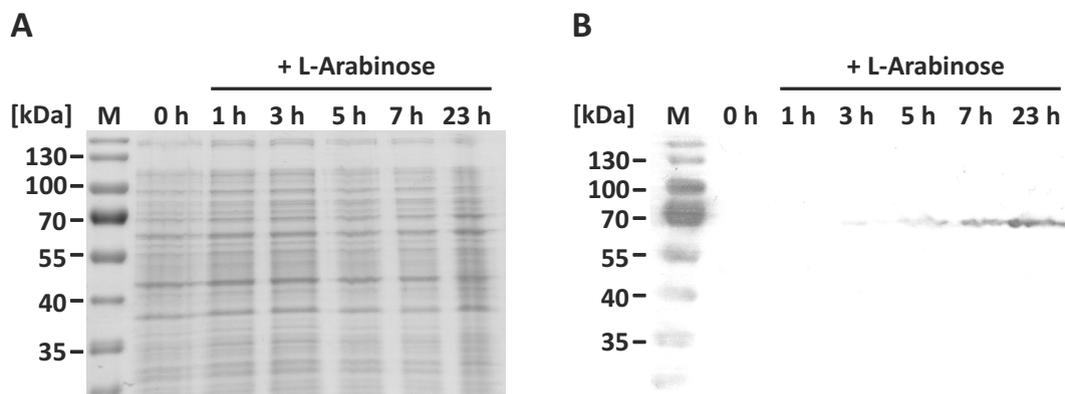


Abbildung 3.13: SDS-PAGE und immunologische Detektion von NbdA-Strep aus Zelllysaten von *P. aeruginosa* PAO1::pMRP12. (A) Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel (10 % w/v) nach der SDS-PAGE. (B) Zu (A) korrespondierender immunologischer Nachweis anhand des Strep-Tactin-Alkalische-Phosphatase Antikörper-Konjugats nach Transfer auf eine PVDF-Membran. Es wurden jeweils 15 μ l Probe aufgetragen. M: Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher); + L-Arabinose: Zugabe des Induktors L-Arabinose (0,1 % w/v) zum Zeitpunkt $t = 0$ h; 0 h, 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 23 h: Zeitpunkte der Probennahme.

Anhand der SDS-PAGE konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtproteinzusammensetzung erschlossen werden (Abbildung 3.13 A), während mittels des immunologischen Nachweisverfahrens drei Stunden nach Induktion der Proteinproduktion ein Protein bei

ca. 70 kDa detektiert wurde (Abbildung 3.13 B). Dessen Menge nimmt über den erfassten Zeitraum kontinuierlich bis zum Zeitpunkt der letzten Probennahme ($t = 23$ h) zu. Das Molekulargewicht des detektierten Strep-*tagII*-markierten Proteins entspricht nicht dem theoretischen Molekulargewicht des NbdA-Strep-Proteins von ca. 81,6 kDa. Dies wurde bereits zuvor im Rahmen des Nachweises von N- und C-terminalen NbdA-Strep-Fusionsproteinen (Daten nicht gezeigt) sowie in anderen Arbeiten beobachtet [27, 89]. Anhand der massenspektrometrischen Analyse in Kapitel 3.2.1 wurde die Identität von NbdA-Strep aus dem Zellysate von *E. coli* AB607::pMRE04 verifiziert. Da die zugrunde liegenden Aminosäuresequenzen der Konstrukte pMRE04 und pMRP12 identisch sind, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um NbdA-Strep handelt. Zudem ist bekannt, dass das Migrationsverhalten von Membranproteinen während der SDS-PAGE verändert sein kann [191].

Aufgrund der guten Nachweisbarkeit des NbdA-Strep-Proteins nach fünf Stunden Produktion bei 17 °C wurde für die nachfolgenden phänotypischen Analysen derselbe Zeitraum bei RT gewählt.

3.3.2 Untersuchung des Wachstums

Um Stress durch die Produktion von Membranproteinen als Faktor für die phänotypische Charakterisierung ausschließen zu können, wurde das Wachstumsverhalten von PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 vergleichend zu dem Stamm PAO1::pHERD26T nach Induktion der Proteinproduktion bei RT unter aeroben Bedingungen analysiert (Abbildung 3.14).

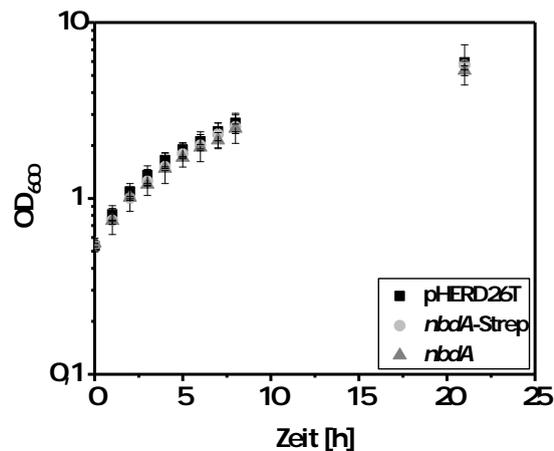


Abbildung 3.14: Wachstum der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im Vergleich zu der Kontrolle PAO1::pHERD26T bei RT. Die LB-ÜN-Kulturen von PAO1::pHERD26T (pHERD26T), PAO1::pMRP12 (*nbdA*-Strep) und PAO1::pMRP13 (*nbdA*) wurden 1:20 in 50 ml LB-Medium mit dem Zusatz von Tet150 verdünnt und bei 37 °C und 160 UpM kultiviert. Bei Erreichen der $OD_{600} = 0,5$ wurde die Proteinproduktion durch die Zugabe von 0,1 % (w/v) L-Arabinose induziert und die Kulturen für 21 h bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Nach der Induktion wurde die OD_{600} stündlich bis zum Zeitpunkt $t = 8$ h sowie nach einem Zeitraum von 21 h gemessen. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit einem technischen Replikat pro Stamm durchgeführt.

Aus den Ergebnissen der Analyse wird ersichtlich, dass die Stämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 über den betrachteten Zeitraum von 21 h ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Kontrolle PAO1::pHERD26T besitzen. Das Wachstum der Stämme verläuft steigend bis zum Zeitpunkt $t = 21$ h. Eine Zuordnung in definierte Wachstumsphasen ist in den ersten zehn Stunden des Wachstums nicht möglich. Die Ergebnisse der Analyse belegen, dass eine Überproduktion der Membranproteine NbdA und NbdA-Strep keinen negativen Effekt auf die Wachstumsfähigkeit bei RT ausübt.

3.3.3 Untersuchung der Motilität

Zur Klärung der Fragestellung, ob sich die Überproduktion von NbdA auf die Motilität von *P. aeruginosa* auswirkt, wurden die Bewegungsformen Schwimmen, Twitchen und Schwärmen der Stämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im direkten Vergleich zu dem Kontrollstamm PAO1::pHERD26T analysiert (Abbildung 3.15).

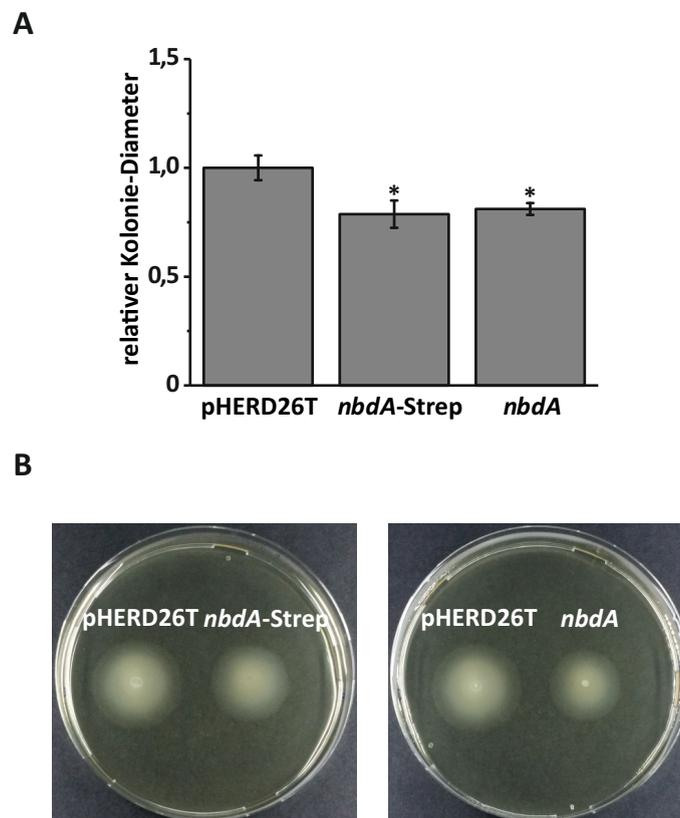


Abbildung 3.15: Schwimmbewegung der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im Vergleich zu der Kontrolle PAO1::pHERD26T. LB-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von PAO1::pHERD26T (pHERD26T), PAO1::pMRP12 (*nbdA*-Strep) und PAO1::pMRP13 (*nbdA*) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 μ l einer LB-Kultur mit $OD_{600} = 1,5$ auf eine 0,3%ige Agarplatte mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose aufgetragen und für 18 h bei 30 °C inkubiert. (A) Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung des Kolonie-Diameters normalisiert auf die Kontrolle. Die statistische Signifikanz wurde über den Student T-Test bestimmt (*, $p < 0,05$). (B) Schwimmplatten nach 18 h Inkubation bei 30 °C. Das Experiment wurde im biologischen Triplikat mit acht technischen Replikaten durchgeführt.

Die Morphologie von PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 ähnelt der der Kontrolle. Bei allen Stämmen sind trübe, hellgelb gefärbte Schwimmzonen auf den Agarplatten zu erkennen. Diese äußern sich durch konzentrische Ringe um den weißen Auftragspunkt der Bakterienkultur. Vom Zentrum bis zum äußeren Ring der Kolonien nimmt die Trübung der Schwimmzonen ab (Abbildung 3.15 B). Die Überexpressionsstämme zeigten hinsichtlich ihres Schwimmverhaltens Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle. Die Bestimmung der relativen Kolonie-Diameter ergab eine Reduktion der Schwimmzone um ca. 20 %. Somit beeinträchtigt die Überproduktion der Proteine NbdA-Strep und NbdA das Schwimmverhalten.

Bei der Untersuchung der Twitching-Bewegung (Abbildung 3.16) konnte bei den Stämmen PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 kein Twitching mehr beobachtet werden. Lediglich der Auftragspunkt der jeweiligen Bakterienkultur auf dem Boden der Petrischale konnte über Kristallviolett angefärbt und visualisiert werden. Demnach hat eine Überproduktion von NbdA und NbdA-Strep einen Verlust der Twitching-Bewegung zur Folge.

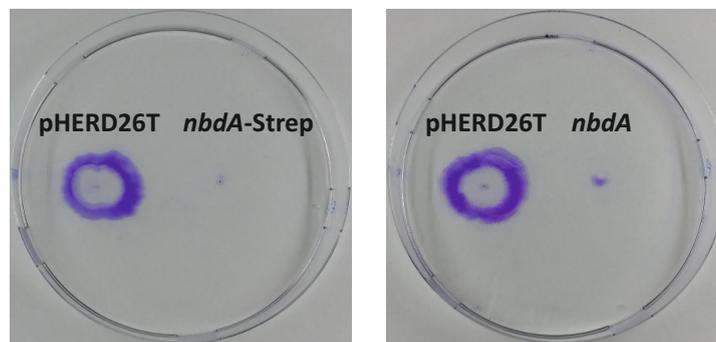


Abbildung 3.16: Twitching-Bewegung der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im Vergleich zu der Kontrolle PAO1::pHERD26T. LB-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von PAO1::pHERD26T (pHERD26T), PAO1::pMRP12 (*nbdA*-Strep) und PAO1::pMRP13 (*nbdA*) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 μ l einer LB-Kultur mit $OD_{600} = 1,5$ auf eine 1%ige (w/v) Agarplatte mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose aufgetragen und für 40 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der LB-Agar entfernt und die Twitching-Zonen mit 0,1 % (w/v) Kristallviolett gefärbt. Das Experiment wurde im biologischen Triplikate mit acht technischen Replikaten durchgeführt.

Im Weiteren wurde die dritte Bewegungsform, das Schwärmen, betrachtet (Abbildung 3.17). Die Untersuchung ergab, dass neben dem Twitchen auch das Schwärmverhalten bei einer Überproduktion von NbdA stark beeinträchtigt ist. Es war lediglich der Auftragspunkt der Kultur auf der Agarplatte zu sehen, wohingegen die Kontrolle die typischen dendritenförmigen Fortsätze der Schwärmbewegung aufwies.

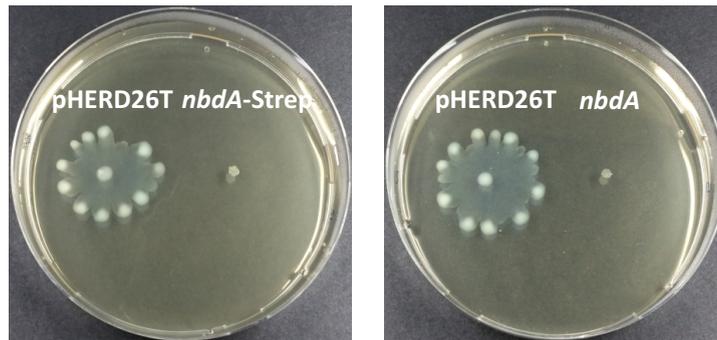


Abbildung 3.17: Schwärmbewegung der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im Vergleich zu der Kontrolle PAO1::pHERD26T. BM2-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von PAO1::pHERD26T (pHERD26T), PAO1::pMRP12 (*nbdA*-Strep) und PAO1::pMRP13 (*nbdA*) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Jeweils 1 μ l einer BM2-Kultur mit $OD_{600} = 0,5$ wurde auf eine Schwärmplatte mit einer Agarkonzentration von 0,5 % (w/v) und dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose aufgetragen und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Das Experiment wurde im biologischen Triplikат mit acht technischen Replikaten durchgeführt.

Aus der Analyse der Motilität geht hervor, dass sich die Überproduktion von NbdA negativ auf alle untersuchten Fortbewegungsformen auswirkt. Über die Untersuchung des Schwimmverhaltens konnte eine Beeinträchtigung der polaren Flagelle festgestellt werden. Der Twitching-Defekt der Stämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 impliziert eine Fehlregulation der Typ-IV-Pili-Assemblierung oder den fehlerhaften Bewegungsablauf der Zellanhängsel. Bei der Schwärmbewegung handelt es sich hingegen um eine komplexe Motilitätsform, bei der neben den Typ IV Pili und dem Flagellum auch Rhamnolipide eine Rolle spielen [126]. Die Ursache für den Schwärmdefekt könnte somit auf dem Mangel an funktionellen Typ IV Pili und der beeinträchtigten Flagelle beruhen. Es können jedoch keine weiteren Rückschlüsse auf die Bildung von Rhamnolipiden gezogen werden, weshalb dies nachfolgend genauer betrachtet wurde.

3.3.4 Nachweis der Sekretion von Rhamnolipiden

Für den Nachweis sezernierter Rhamnolipide der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 wurden Plattentests auf CTAB-Methylenblau-haltigem Agar vorgenommen. Die von den Bakterien ausgeschiedenen anionischen Biotenside bilden hierbei mit dem kationischen Tensid CTAB und dem Farbstoff Methylenblau unlösliche, farbige Komplexe. Dies äußert sich in der Bildung eines Hofes um die Kolonie [219].

Hinsichtlich der Rhamnolipidproduktion konnten deutliche Unterschiede zwischen den Überexpressionsstämmen und der Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 3.18). Die Kolonie von PAO1::pHERD26T wies eine gelb-grüne Färbung mit einem dunkelgrün-blauen Ring in der Peripherie auf. Im umgebenden Agar war die Bildung eines gelben Hofes zu erkennen. Die Kolonien von PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 waren dunkelblau gefärbt und besaßen einen dunkelblauen Ring im äußeren Bereich der Kolonien. Bei beiden

Stämmen war ein blauer Hof um die Kolonien sichtbar.

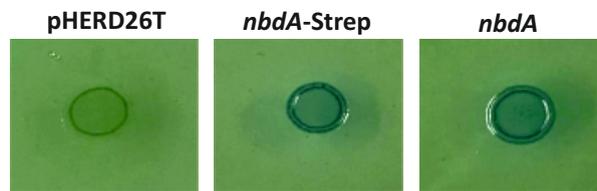


Abbildung 3.18: Kolonie-Morphologie der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im Vergleich zu der Kontrolle PAO1::pHERD26T auf CTAB-Methylenblau-Agar. Mineralsalz-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von PAO1::pHERD26T (pHERD26T), PAO1::pMRP12 (*nbdA*-Strep) und PAO1::pMRP13 (*nbdA*) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 μ l der Kulturen von PAO1::pHERD26T (pHERD26T), PAO1::pMRP12 (*nbdA*-Strep), PAO1::pMRP13 (*nbdA*) in der frühen stationären Phase auf 1,5%ige CTAB-Methylenblau-Agarplatten mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose aufgetropft. Nach der Inkubation für 24 h bei 37 °C und weiteren 48 h bei RT wurde die Auswertung vorgenommen. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit acht technischen Replikaten durchgeführt.

Die morphologischen Unterschiede der Kolonien führen zu dem Schluss, dass eine Überproduktion von *NbdA* und *NbdA*-Strep die Sekretion von Rhamnolipiden fördert. Somit lässt sich festhalten, dass der zuvor beobachtete Schwärmdedefekt der Stämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 nicht auf einem Mangel an Rhamnolipiden beruht, sondern in erster Linie mit den Typ IV Pili assoziiert ist.

3.3.5 Untersuchung der Adhäsion und der Biofilmbildung

Die Bewegung über die Retraktion der Typ IV Pili ist nicht nur für das Schwärmen und Twitching wichtig, sondern auch für die Anheftung an feste Oberflächen [172]. Die Adhäsion bildet den ersten Schritt der Biofilmbildung und wird durch eine erhöhte, intrazelluläre c-di-GMP-Konzentration gefördert.

Die Adhäsionsfähigkeit der Stämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im Vergleich zum Referenzstamm PAO1::pHERD26T wurde bei 37 °C in Mikrotiterplatten untersucht (Abbildung 3.19). Es konnte bei beiden Überexpressionsstämmen ein stark reduziertes Adhäsionsvermögen mit einer Verringerung der Biomasse um ca. 86 % im Vergleich zu der Kontrolle nachgewiesen werden. Somit bewirkt die Überproduktion von *NbdA* eine beeinträchtigte Anheftung an feste Oberflächen.

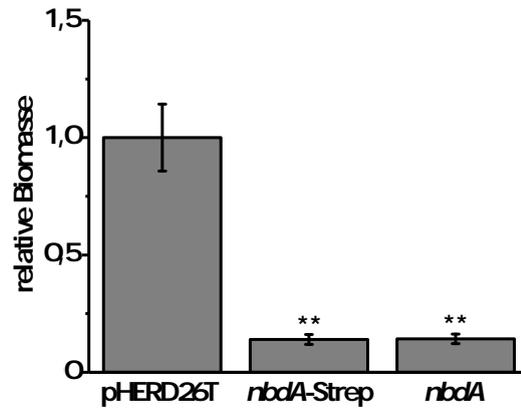


Abbildung 3.19: Adhäsion der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im Vergleich zu der Kontrolle PAO1::pHERD26T bei 37 °C. BM2-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von PAO1::pHERD26T (pHERD26T), PAO1::pMRP12 (*nbdA*-Strep) und PAO1::pMRP13 (*nbdA*) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Danach wurden die Kulturen auf die $OD_{600} = 1,0$ in Adhäsions-Medium mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose eingestellt und für 1 h in einer Mikrotiterplatte in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Biomasse wurde mit 0,1 % (w/v) Kristallviolett photometrisch bei 595 nm quantifiziert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel der Biomasse normalisiert auf die Kontrolle. Das Experiment wurde im biologischen Triplikate mit zwanzig technischen Replikaten durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde über den Student T-Test bestimmt (**, $p < 0,01$).

Weiterhin wurde untersucht, ob der Adhäsionsdefekt der Überexpressionsstämme ebenfalls die Fähigkeit zur Biofilmbildung beeinflusst. Hierzu wurde die Anheftung von Zellen auf festen Oberflächen sowie an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche nach 24 h betrachtet. Die Stämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 wiesen nach 24 h Wachstum in Mikrotiterplatten eine deutlich verringerte Fähigkeit zur Biofilmbildung im Vergleich zu der Kontrolle auf. Die Reduktion der adhärenen Biomasse beträgt in etwa 55 % (Abbildung 3.20 A). Analog zu der Untersuchung von Biofilmen auf festen Oberflächen verhielt sich die Pellikelbildung in Reagenzglasern. Die Überproduktion von NbdA verhinderte hierbei die Ausbildung von Biofilmen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche, den sogenannten Pellikeln (Abbildung 3.20 B).

Die Ursache für die verminderte Adhäsions- und Biofilmbildungsfähigkeit könnte auf einem geringen c-di-GMP-Spiegel beruhen. Um diesem Sachverhalt nachzugehen, wurde die intrazelluläre Konzentration von c-di-GMP des Überexpressionsstamms PAO1::pMRP13 und des Referenzstamms PAO1::pHERD26T massenspektrometrisch bestimmt.

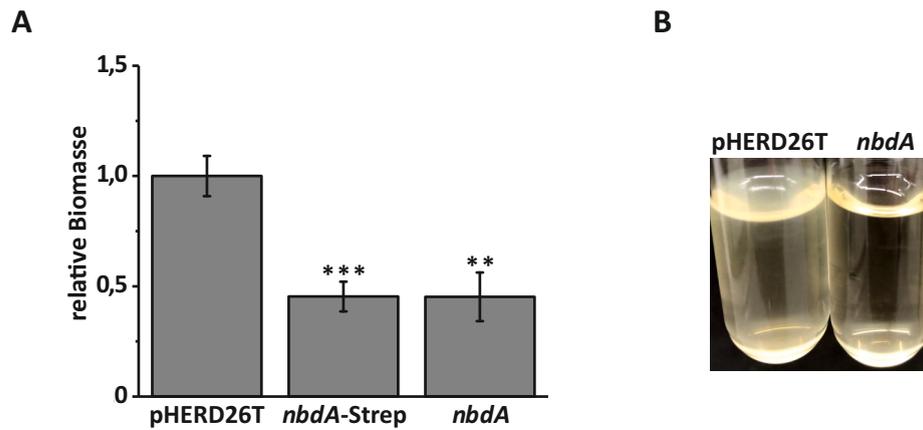


Abbildung 3.20: Biofilmbildung der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 im Vergleich zu der Kontrolle PAO1::pHERD26T. BM2-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von PAO1::pHERD26T (pHERD26T), PAO1::pMRP12 (*nbdA*-Strep) und PAO1::pMRP13 (*nbdA*) wurden zur Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Im Anschluss wurden die Kulturen auf die $OD_{600} = 0,03$ in Biofilm-Medium mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose eingestellt und für 24 h in Mikrotiterplatten in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Biomasse wurde mit 0,1 % (w/v) Kristallviolett photometrisch bei 595 nm quantifiziert. Das Experiment wurde im biologischen Triplikate mit zwanzig technischen Replikaten durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde über den Student T-Test bestimmt (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) (A). Zur Untersuchung der Pellicelbildung (B) wurden die Kulturen in Biofilm-Medium (+ Tet150, + 0,1 % (w/v) L-Arabinose) in Reagenzgläsern für 24 h bei RT inkubiert. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit drei technischen Replikaten durchgeführt.

3.3.6 Bestimmung des intrazellulären c-di-GMP- und GMP-Spiegels

Für die massenspektrometrische Analyse wurde zunächst eine Metabolitextraktion aus Flüssigkulturen von PAO1::pHERD26T und PAO1::pMRP13 vorgenommen. Hierzu wurden die LB-Kulturen nach einer fünfstündigen Proteinproduktion bei RT auf $OD_{600} = 1,5$ verdünnt und mehrmals mit einer Extraktionslösung behandelt. Die metabolischen Extrakte wurden massenspektrometrisch von Prof. Dr. Volkhard Kaefer (ZFA Metabolomics, Medizinische Hochschule Hannover) untersucht.

Tabelle 3.2: Intrazellulärer c-di-GMP- und GMP-Spiegel des Überexpressionsstamms PAO1::pMRP13 und des Referenzstamms PAO1::pHERD26T. Aus LB-Kulturen mit $OD_{600} = 1,5$ wurde nach einer fünfstündigen Proteinproduktion bei RT eine Metabolitextraktion vorgenommen. Die Messung von c-di-GMP und GMP über LC-MS/MS erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Volkhard Kaefer (ZFA Metabolomics, Medizinische Hochschule Hannover). Das Experiment wurde mit einem biologischen Replikat und drei technischen Replikaten durchgeführt.

Stamm	c-di-GMP [pmol/mg]	GMP [pmol/mg]
PAO1::pHERD26T	86,0	2099
PAO1::pMRP13	7,47	2747

Die c-di-GMP-Konzentration des Stamms PAO1::pMRP13 war im Vergleich zur Referenz deutlich erniedrigt. Mit einer Konzentration von 7,47 pmol/mg wurden nur ca. 8,7 % des

c-di-GMP-Spiegels von PAO1::pHERD26T erreicht (Tabelle 3.2). Demzufolge bewirkt die Überproduktion von NbdA eine Senkung des globalen c-di-GMP-Spiegels, was auf dessen enzymatische Aktivität als PDE zurückgeführt werden kann. Unterstützend hierfür ist der Anstieg der intrazellulären Konzentration von GMP, dem Abbauprodukt von c-di-GMP.

3.4 Charakterisierung der homologen Überproduktion von NbdA-AAL

In den Motilitätsstudien der Überexpressionsstämme PAO1::pMRP12 und PAO1::pMRP13 (Kapitel 3.3.3) wurden Phänotypen nachgewiesen, die nicht der Funktion einer überproduzierten PDE zugeschrieben werden können. Die Beeinträchtigung der Motilität deutete auf eine zusätzliche Rolle von NbdA hin. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurde über ortsgerichtete Mutagenese das Expressionsplasmid pMRP14 zur homologen Überproduktion in *P. aeruginosa* konstruiert. Mithilfe dessen konnte eine inaktive Variante des NbdA-Proteins (MHYT-AGDEF-AAL) produziert werden, welche anstelle des konservierten EAL-Motivs der PDE-Domäne ein AAL-Motiv trägt.

3.4.1 Nachweis des Aktivitätsverlusts von NbdA-AAL

Es ist bekannt, dass der Austausch des konservierten Glutamatrests des EAL-Motivs durch ein Alanin üblicherweise zu einem Verlust der PDE-Aktivität führt [247]. Um zu überprüfen, ob dies auch für NbdA gilt, wurde das Konstrukt pMRE09 hergestellt. Dies codiert wie der Vektor pMRP14 für die NbdA-Variante mit einem AAL-Motiv der PDE-Domäne und eignet sich für die heterologe Expression in *E. coli*. Nach der Transformation in die schwimmdefiziente Mutante $\Delta pdeH$ wurde über den *in-vivo*-Aktivitätstest die Schwimmfähigkeit des Stammes *E. coli* AB607::pMRE09 untersucht (Abbildung 3.21).

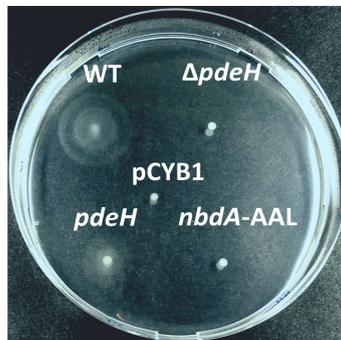


Abbildung 3.21: *In-vivo*-Nachweis des Aktivitätsverlusts von NbdA-AAL aus *E. coli* AB607::pMRE09. Jeweils 1 μ l der Trypton-Kulturen mit $OD_{600} = 1,0$ von *E. coli* MG1655 (WT), AB607 ($\Delta pdeH$), AB607::pCYB1 (pCYB1), AB607::pMRE01 (*pdeH*) und AB607::pMRE09 (*nbdA*-AAL) wurde auf eine 0,3%ige Schwimm-Agarplatte mit 100 μ M IPTG aufgetragen und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit fünf technischen Replikaten durchgeführt.

3.4. Charakterisierung der homologen Überproduktion von NbdA-AAL

Der Stamm *E. coli* AB607::pMRE09 wies ebenso wie die $\Delta pdeH$ -Mutante einen Schwimmdefekt auf. Dies impliziert, dass die Variante NbdA-AAL aufgrund der fehlenden PDE-Aktivität nicht in der Lage war das Schwimmvermögen von $\Delta pdeH$ wiederherzustellen. Zur Verifizierung dieses Resultats wurde die Produktion des NbdA-AAL-Proteins aus dem Zelllysate von *E. coli* AB607::pMRE09 mittels eines immunologischen Nachweisverfahrens detektiert.

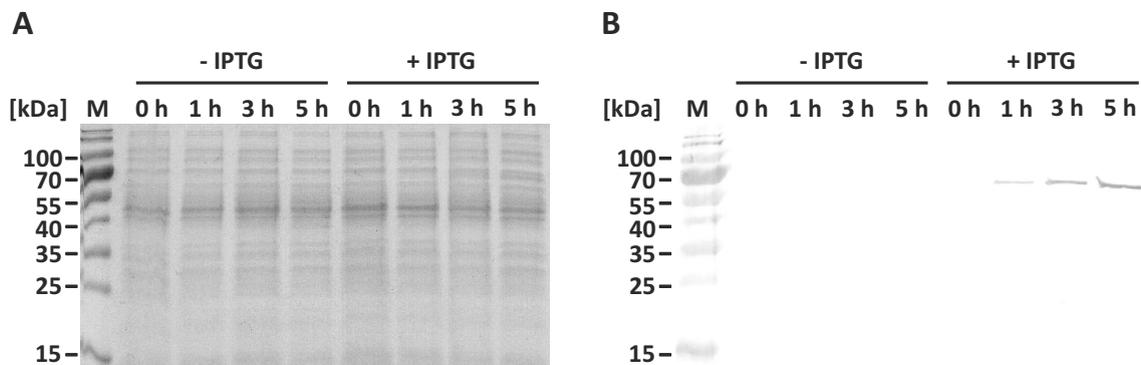


Abbildung 3.22: SDS-PAGE und immunologische Detektion von NbdA-AAL aus Zelllysate von *E. coli* AB607::pMRE09. (A) Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel (10 % w/v) nach der SDS-PAGE. Zu (A) korrespondierender immunologischer Nachweis anhand des Strep-Tactin-Alkalische-Phosphatase Antikörper-Konjugats nach Transfer auf eine PVDF-Membran (B). Es wurden jeweils 10 μ l Probe aufgetragen. M: Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher); - IPTG: Keine Zugabe des Induktors IPTG zum Zeitpunkt $t = 0$ h (Kontrolle); + IPTG: Zugabe des Induktors IPTG (100 μ M) zum Zeitpunkt $t = 0$ h; 0 h, 1 h, 3 h, 5 h: Zeitpunkte der Probennahme.

Anhand des Immuno-Blots konnte das Strep-*tagII*-markierte NbdA-AAL-Protein bereits nach einer Stunde Produktion bei ca. 70 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 3.22 B). Die Proteinmenge nahm über den erfassten Zeitraum bis zum Zeitpunkt der letzten Probennahme zu. Die Ergebnisse dieses Experiments unterstützen die Hypothese, dass die mangelnde Komplementation des Schwimmdefekts der $\Delta pdeH$ -Mutante auf die Inaktivität von NbdA-AAL und nicht auf eine fehlerhafte Produktion des Proteins zurückzuführen ist.

Nachdem der Verlust der PDE-Aktivität des NbdA-AAL-Proteins erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurde das Expressionsplasmid pMRP14 für die homologe Überproduktion in die $\Delta nbdA$ -Mutante eingebracht. Zum Vergleich wurden der Stamm $\Delta nbdA$::pMRP13, mithilfe dessen die aktive PDE NbdA überproduziert werden kann, sowie die mit dem Leervektor pHERD26T transformierte Mutante $\Delta nbdA$::pHERD26T herangezogen. Im Hinblick auf die Fragestellung, welche phänotypischen Eigenschaften abhängig von der PDE-Aktivität von NbdA sind, wurden dieselben physiologischen Eigenschaften wie bei der Charakterisierung der homolog überproduzierten aktiven PDE in Kapitel 3.3 betrachtet.

3.4.2 Untersuchung des Wachstums

Das aerobe Wachstumsverhalten der Stämme $\Delta nbdA::pMRP14$ und $\Delta nbdA::pMRP13$ wurde im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$ nach Induktion der Proteinproduktion bei RT untersucht (Abbildung 3.23).

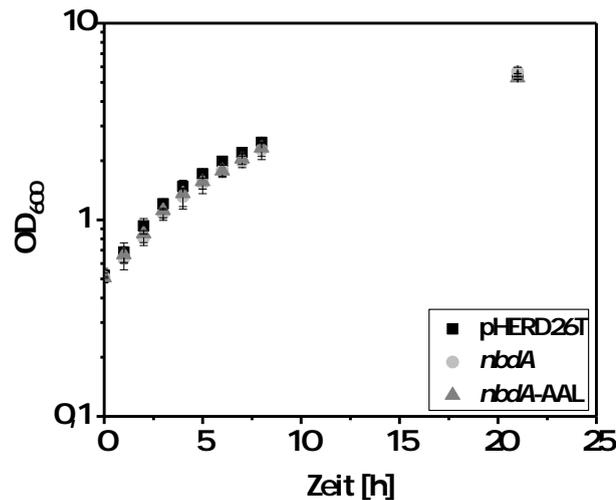


Abbildung 3.23: Wachstum der Überexpressionsstämme $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$ bei RT. Die LB-ÜN-Kulturen von $\Delta nbdA::pHERD26T$ (pHERD26T), $\Delta nbdA::pMRP13$ (*nbdA*) und $\Delta nbdA::pMRP14$ (*nbdA-AAL*) wurden 1:20 in 50 ml LB-Medium mit dem Zusatz von Tet150 verdünnt und bei 37 °C und 160 UpM kultiviert. Bei Erreichen der $OD_{600} = 0,5$ wurde die Proteinproduktion durch die Zugabe von 0,1 % (w/v) L-Arabinose induziert und die Kulturen für 21 h bei RT und 160 UpM (Innova 44R, New Brunswick) inkubiert. Nach der Induktion wurde die OD_{600} stündlich bis zum Zeitpunkt $t = 8$ h sowie nach einem Zeitraum von 21 h gemessen. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit einem technischen Replikate pro Stamm durchgeführt.

Unter den getesteten Bedingungen konnte kein Unterschied im Wachstumsverhalten der Überexpressionsstämme $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$ festgestellt werden. Folglich hat die Überproduktion von NbdA und NbdA-AAL in der $\Delta nbdA$ -Mutante keine Auswirkung auf das Wachstum unter aeroben Bedingungen.

3.4.3 Untersuchung der Motilität

Zur Überprüfung, ob die Beeinträchtigung der Motilität bei der Überproduktion von NbdA mit dessen enzymatischen Aktivität als PDE korreliert, wurden Motilitätsstudien bei Überproduktion des inaktiven NbdA-AAL vorgenommen. Hierzu wurden die Bewegungsformen Schwimmen, Twitchen und Schwärmen der Stämme $\Delta nbdA::pHERD26T$, $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ betrachtet.

Das Schwimmverhalten beider Überexpressionsstämme war im Vergleich zu dem Kontrollstamm deutlich beeinträchtigt (Abbildung 3.24 B). Während die Überproduktion von NbdA eine Reduktion der Schwimmzone um etwa 25 % erzielte, verringerte die Überproduktion des inaktiven NbdA-AAL mit ca. 58 % den Kolonie-Diameter mehr als doppelt so viel (Abbildung 3.24 A).

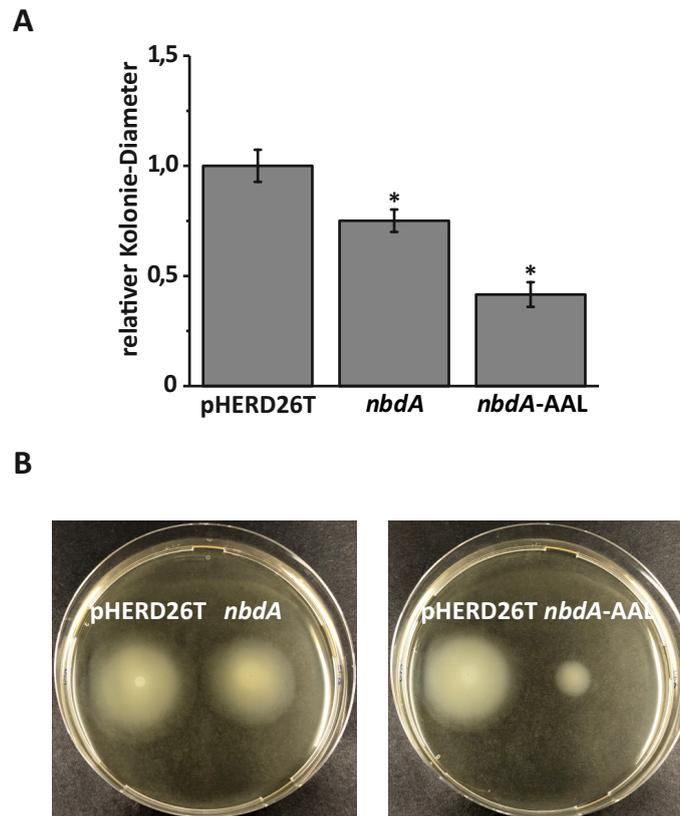


Abbildung 3.24: Schwimmbewegung der Überexpressionsstämme $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$. LB-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von $\Delta nbdA::pHERD26T$ (pHERD26T), $\Delta nbdA::pMRP13$ (*nbdA*) und $\Delta nbdA::pMRP14$ (*nbdA*-AAL) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 μ l einer LB-Kultur mit $OD_{600} = 1,5$ auf eine 0,3%ige Agarplatte mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose aufgetragen und für 18 h bei 30 °C inkubiert. **(A)** Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung des Kolonie-Diameters normalisiert auf die Kontrolle. Die statistische Signifikanz wurde über den Student T-Test bestimmt (*, $p < 0,05$). **(B)** Schwimmplatten nach 18 h Inkubation bei 30 °C. Das Experiment wurde im biologischen Triplikat mit acht technischen Replikaten durchgeführt.

Im Gegensatz zu der Untersuchung der Schwimmbewegung konnten bei der Analyse des Twitch-Verhaltens keine Unterschiede zwischen $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ ermittelt werden. Bei beiden Überexpressionsstämmen war jeweils nur der mit Kristallviolett angefärbte Auftragspunkt der Bakterienkultur auf dem Boden der Petrischale zu sehen (Abbildung 3.25). Allein die Überproduktion des inaktiven NbdA-AAL-Proteins ist ausreichend, um einen Defekt der Twitching-Bewegung zu erreichen. Folglich steht der

beobachtete Phänotyp nicht im Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität als PDE.

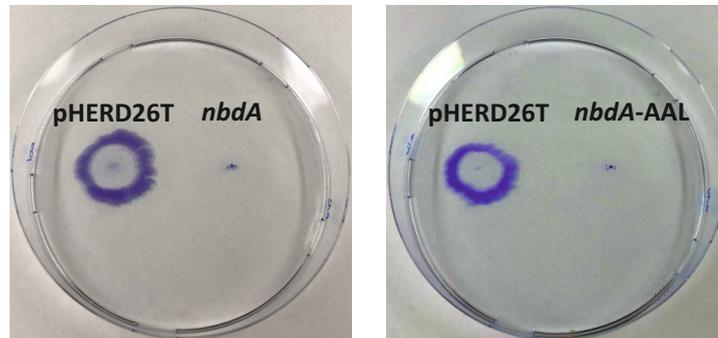


Abbildung 3.25: Twitching-Bewegung der Überexpressionsstämme $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$. LB-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von $\Delta nbdA::pHERD26T$ (pHERD26T), $\Delta nbdA::pMRP13$ (*nbdA*) und $\Delta nbdA::pMRP14$ (*nbdA-AAL*) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 μ M inkubiert. Danach wurde jeweils 1 μ l einer LB-Kultur mit $OD_{600} = 1,5$ auf eine 1%ige (w/v) Agarplatte mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose aufgetragen und für 40 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der LB-Agar entfernt und die Twitching-Zonen mit 0,1 % (w/v) Kristallviolett gefärbt.

Interessanterweise war die Schwämbewegung bei einer Überproduktion des NbdA-AAL-Proteins (Abbildung 3.26) ebenso vermindert wie zuvor bei der Überproduktion der aktiven PDE im WT (Abbildung 3.17). Dies impliziert, dass das Schwärmdéfizit von $\Delta nbdA::pMRP14$ nicht auf der enzymatischen Aktivität von NbdA beruht.

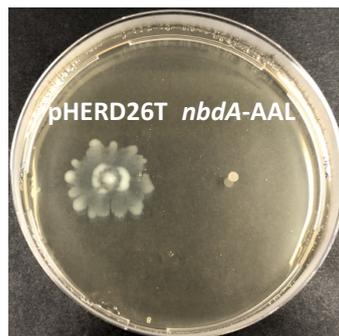


Abbildung 3.26: Schwämbewegung des Überexpressionsstamms $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$. BM2-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von $\Delta nbdA::pHERD26T$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ wurde zur Induktion der Proteinproduktion 0,1 % (w/v) L-Arabinose zugegeben und für 5 h bei RT und 160 μ M inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 μ l einer BM2-Kultur mit $OD_{600} = 0,5$ auf eine Schwärmpfplatte mit einer Agarkonzentration von 0,5 % (w/v) und dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose aufgetragen und für 18 h bei 37 °C inkubiert.

Die Untersuchung der Motilität erwies, dass die Überproduktion des enzymatisch inaktiven NbdA-AAL-Proteins im Vergleich zu der Kontrolle einen negativen Einfluss auf die

betrachteten Bewegungsformen ausübt. Das mangelnde Twitch- und Schwärmvermögen ist mit der Motilität bei Überproduktion der aktiven PDE NbdA in der $\Delta nbdA$ -Mutante bzw. im WT vergleichbar. Die erhöhte Reduktion der Schwimmbewegung von $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu $\Delta nbdA::pMRP13$ scheint nicht im Zusammenhang mit der Aktivität von NbdA zu stehen.

3.4.4 Nachweis der Sekretion von Rhamnolipiden

Um offenzulegen, ob die erhöhte Rhamnolipidsynthese bei der Überproduktion von NbdA im WT (Kapitel 3.3.4) durch die enzymatische Aktivität von NbdA bedingt ist, wurde die Morphologie der Stämme $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$ auf CTAB-Methylenblau-haltigen Agarplatten untersucht (Abbildung 3.27).

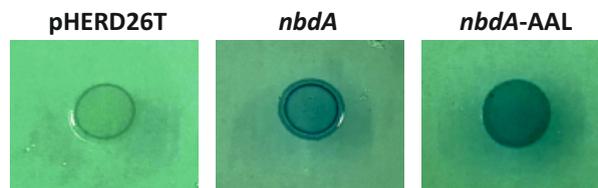


Abbildung 3.27: Kolonie-Morphologie der Überexpressionsstämme $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$ auf CTAB-Methylenblau-Agar. Mineralsalz-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von $\Delta nbdA::pHERD26T$ (pHERD26T), $\Delta nbdA::pMRP13$ (*nbdA*) und $\Delta nbdA::pMRP14$ (*nbdA-AAL*) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Jeweils 5 μ l der Kulturen wurden in der frühen stationären Phase auf 1,5%ige CTAB-Methylenblau-Agarplatten mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose aufgetropft. Nach der Inkubation für 24 h bei 37 °C und weiteren 48 h bei RT wurde die Auswertung vorgenommen. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit acht technischen Replikaten durchgeführt.

Die untersuchten Stämme wiesen deutliche morphologische Unterschiede nach der Inkubation auf CTAB-Methylenblau-Agarplatten auf. Die Kolonie von $\Delta nbdA::pHERD26T$ besaß eine gelb-grüne Färbung mit einem äußeren grün-blauen Ring. Um diese war ein gelber Hof sichtbar. Im Gegensatz dazu waren die Kolonien von $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ dunkelblau gefärbt, wobei $\Delta nbdA::pMRP14$ eine dunklere und homogene Färbung der Kolonie zeigte. Der Stamm $\Delta nbdA::pMRP13$ besaß zudem einen dunkelblauen Ring im Randbereich der Kolonie. Bei beiden Überexpressionsstämmen war die Bildung eines blauen Hofes um die Kolonien zu erkennen. Dieser erschien bei der NbdA-AAL produzierenden $\Delta nbdA$ -Mutante deutlicher ausgeprägt zu sein, was auf eine vergleichbar höhere Sekretion von Rhamnolipiden hindeutet.

Die morphologischen Unterschiede zwischen $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ auf CTAB-Methylenblau-Agar können nicht erklärt werden. Die erzielten Ergebnisse implizieren, dass die PDE-Aktivität von NbdA keinen Einfluss auf die Rhamnolipidproduktion

hat.

3.4.5 Untersuchung der Adhäsion und der Biofilmbildung

Zur Verifizierung des Phänotyps der Adhäsion sowie der Biofilmbildung der Überproduktion von NbdA im WT, wurden der Adhärenz- und der Pellicelbildungstest mit den Überexpressionsstämmen $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ vergleichend zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$ vorgenommen.

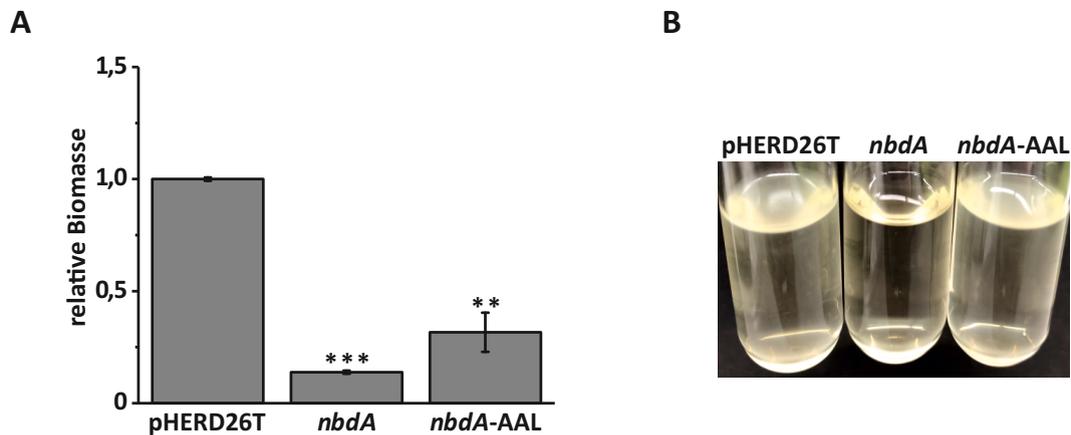


Abbildung 3.28: Adhäsion und Biofilmbildung der Überexpressionsstämme $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ im Vergleich zu der Kontrolle $\Delta nbdA::pHERD26T$. BM2-ÜN-Kulturen mit $OD_{600} = 0,5$ von $\Delta nbdA::pHERD26T$ (pHERD26T), $\Delta nbdA::pMRP13$ (nbdA) und $\Delta nbdA::pMRP14$ (nbdA-AAL) wurden zur Induktion der Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose versetzt und für 5 h bei RT und 160 UpM inkubiert. Die Kulturen wurden für die Untersuchung der Adhäsion (A) auf die $OD_{600} = 1,0$ in Adhäsions-Medium mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose verdünnt. Die Zellen wurden für 1 h in Mikrotiterplatten in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Biomasse wurde mit Hilfe von 0,1 % (w/v) Kristallviolett photometrisch bei 595 nm quantifiziert. Das Experiment wurde im biologischen Triplikate mit zwanzig technischen Replikaten durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde über den Student T-Test bestimmt (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Zur Untersuchung der Pellicelbildung (B) wurden die Kulturen auf die $OD_{600} = 0,03$ in Biofilm-Medium mit dem Zusatz von Tet150 und 0,1 % (w/v) L-Arabinose eingestellt und in Reagenzgläsern für 24 h bei RT inkubiert. Das Experiment wurde im biologischen Duplikat mit drei technischen Replikaten durchgeführt.

Die Adhäsionsfähigkeit der Stämme $\Delta nbdA::pMRP13$ und $\Delta nbdA::pMRP14$ war im Vergleich zur Referenz $\Delta nbdA::pHERD26T$ stark beeinträchtigt (Abbildung 3.28 A). Die Verringerung der Biomasse von $\Delta nbdA::pMRP13$ betrug etwa 86 %, während der Stamm $\Delta nbdA::pMRP14$ eine Reduktion der Biomasse um ca. 68 % aufwies. Bezüglich der Pellicelbildung nach 24 h konnte hingegen ein unterschiedliches Verhalten der Überexpressionsstämme beobachtet werden (Abbildung 3.28 B). Die Überproduktion von NbdA resultierte in einer mangelnden Ausbildung von Biofilmen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche, wohingegen bei Überproduktion des inaktiven NbdA-AAL-Proteins dieser Defekt nicht festgestellt wurde. Der Stamm $\Delta nbdA::pMRP14$ zeigte ein ähnliches Verhalten wie die Kontrolle und war in der Lage Pellicel zu bilden. Dies impliziert, dass die Fähigkeit zur

Pellikelbildung unter den gewählten Bedingungen aufgrund der PDE-Aktivität des NbdA-Proteins gehemmt wird. Diese Beobachtung wurde auch in Mikrotiterplatten gemacht, konnte aber mithilfe von Kristallviolett nicht quantifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

P. aeruginosa verfügt über eine Vielzahl an c-di-GMP-modulierenden Enzymen, zu denen auch NbdA und MucR gehören. Beide Proteine enthalten eine membranverankerte MHYT-Domäne mit einer putativen Sensorfunktion für zweiatomige Gase wie NO [74]. Entgegen den Ergebnissen einer Untersuchung von Li *et al.* [142] konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Einfluss von NbdA und MucR auf die NO-induzierte Dispersion detektiert werden. Ebenso wurde anhand eines neu etablierten *in-vivo*-Systems zur NO-Wahrnehmung [18] kein Einfluss von NO auf die Aktivität nachgewiesen. Weiterhin wurde gezeigt, dass NbdA als PDE fungiert und MucR eine DGC- sowie eine PDE-Aktivität aufweist, was die Ergebnisse vorheriger Studien bestätigte [132, 142]. Die N-terminale MHYT-Domäne nahm hierbei keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität. Zudem wurde mithilfe der Überexpressionsanalyse von *nbdA* ein unerwarteter Phänotyp beobachtet. Dieser impliziert, dass NbdA neben seiner PDE-Aktivität eine weitere Funktion einnimmt.

4.1 Einblick in die transkriptionelle Regulation von *nbdA*

Zu Beginn dieser Arbeit bestand bereits die Vermutung, dass der auf der *Pseudomonas*-Datenbank [251] annotierte TLS von NbdA nicht korrekt sein könnte (Kommunikation mit S. Häussler). Daher wurden 5'-RACE-Analysen durchgeführt (S. Zehner, unveröffentlichte Daten). Anhand dieser kann der TSS in der 5'-UTR detektiert werden, was Rückschlüsse auf den tatsächlichen TLS ermöglicht. Die Untersuchung ergab, dass der neu bestimmte TLS 168 bp stromabwärts des annotierten TLS liegt (Abbildung 4.1). Der neue TLS impliziert, dass der ORF von *nbdA* 171 bp kleiner ist und eine Größe von 2181 bp umfasst. Weiterhin befindet sich in der -10-Region relativ zum TSS die Sequenz CTATACT, die einen 100%igen Konsens mit der Bindestelle für den alternativen Sigmafaktor RpoS (σ^S oder σ^{38}) hat. Eine RpoS-abhängige Regulation von *nbdA* wurde bereits zuvor von Schuster *et al.* [217] festgestellt. σ -Faktoren sind eine wichtige Komponente der Signaltransduktion auf Transkriptom-Ebene. Ein σ -Faktor ist definiert als eine Untereinheit der RNA-

Polymerase, die für die Erkennung des Promotors zum TSS erforderlich ist [91]. Dieser bindet an die Haupt-RNA-Polymerase und bildet mit dieser ein Holoenzym aus, das zur Initiation der Transkription befähigt ist [90]. Der alternative σ -Faktor RpoS ist stationärphasenabhängig und reguliert unter anderem Gene des QS [135, 249] sowie Gene, die in Adaptationsprozesse [134], Zwei-Komponenten-Systemen und der Chemotaxis involviert sind [216].

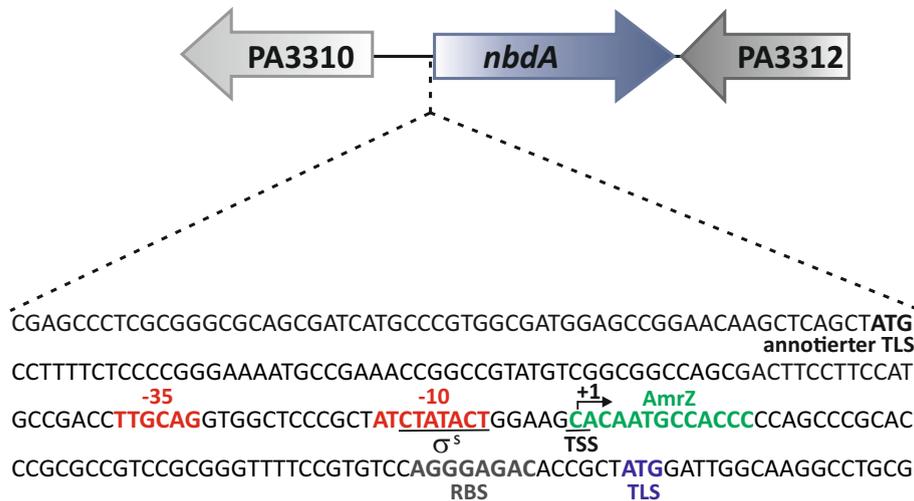


Abbildung 4.1: Genomische Region von PA3310, *nbdA* und PA3312 in *P. aeruginosa* PAO1. Die Pfeile zeigen die ORFs der Gene PA3310, *nbdA* und PA3312. Darunter befindet sich ein Ausschnitt um den neuen Transkriptionsstart (TSS, +1) von *nbdA*, welcher über 5'-RACE bestimmt wurde. Am TSS befindet sich eine Bindestelle für den Transkriptionsregulator AmrZ (grün). Die putative Promotorregion -35 und -10 ist rot markiert. Eine konservierte RpoS-Bindestelle (σ^S) wurde in der -10-Region identifiziert. Der neue Translationsstart (TLS, blau) liegt 168 bp stromabwärts des annotierten TLSs, womit der ORF von *nbdA* 171 bp kleiner ist. Die putative ribosomale Bindestelle (RBS) ist grau hinterlegt.

Zudem wurde eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AmrZ identifiziert [111], welche sich in der +1-Region des neuen TSS von *nbdA* befindet (Abbildung 4.1). Diese ist an der gleichen Position bei dem *nbdA*-Gen des Stammes PA14 PA14.21190 vorhanden, wurde jedoch noch nicht in der *Pseudomonas*-Datenbank annotiert. AmrZ gilt als hochkonservierter Regulator bei den Pseudomonaden [152] und wurde ursprünglich als Transkriptionsaktivator AlgZ der Alginatproduktion in *P. aeruginosa* entdeckt [17]. Es wurde später ein Zusammenhang mit der Regulation der Bewegungsform Twitching erschlossen, was die Umbenennung zu *alginate and motility regulator Z* zur Folge hatte [16]. Zudem fungiert AmrZ als Repressor der Flagellensynthese über die Hemmung der Transkription des Masterregulators FleQ bei mukoiden CF-Isolaten von *P. aeruginosa* [233]. Eine derartige Regulation der Flagelle wurde auch bei *P. fluorescens* F113 beobachtet [151]. Weiterhin reprimiert es bei *P. aeruginosa* das *pel*-Operon und nimmt Einfluss auf die Kolonimorphologie sowie die Biofilmbildung [111]. Folglich ist AmrZ in der Lage sowohl als Aktivator, als auch als Repressor der Transkription verschiedener Gene zu agieren [111].

Reprimierte Promotoren enthalten für gewöhnlich eine Bindestelle zwischen der -100- und der +15-Region relativ zum TSS. Dies deutet daraufhin, dass AmrZ im Zuge der Repression die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor beeinträchtigt. Die Lage der Bindesequenz relativ zum neuen TSS von *nbdA* impliziert, dass AmrZ eine reprimierende Wirkung auf die Transkription von *nbdA* hat. Dies wurde bereits über *RNA-Seq*-Analysen (*RNA sequencing*) von Jones *et al.* [111] nachgewiesen und bestätigt somit die Reannotation des TSSs.

Außerdem ergaben Analysen mit der Anwendung *RNAstructure* (<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html>), dass sich in der 5'-UTR von *nbdA* in unmittelbarer Nähe zu der RBS möglicherweise eine RNA-Sekundärstruktur befindet. Aufgrund der Lokalisation in der 5'-UTR und der Sequenzlänge des Motivs könnte es sich um ein regulatorisches Element handeln. Um diesbezüglich eine genauere Aussage treffen zu können, sind jedoch weitere Experimente nötig.

4.2 Charakterisierung der Deletionsmutanten

4.2.1 Die Deletion von *nbdA* hat keine Auswirkung auf den globalen c-di-GMP-Spiegel

Basierend auf diesem Wissen wurden bei der Konstruktion der markerlosen $\Delta nbdA$ -Mutante und der Doppelmutante $\Delta nbdA \Delta mucR$ die regulatorischen Bindestellen für RpoS und AmrZ in der 5'-UTR von *nbdA* intakt gelassen. Die Charakterisierung der $\Delta nbdA$ -Mutante ergab einen WT-ähnlichen Phänotyp im Hinblick auf die Motilität, die Exopolysaccharidproduktion sowie die Biofilmbildung nach 24 h und 48 h. Sowohl die Motilität, als auch die Fähigkeit zur Besiedlung von Oberflächen und die Synthese von Exopolysacchariden korrelieren mit dem intrazellulären c-di-GMP-Spiegel [42]. Die erzielten Ergebnisse der phänotypischen Tests weisen daraufhin, dass sich die globalen c-di-GMP-Konzentrationen der Mutante und des WT nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Dies konnte anhand von LC-MS/MS-Messungen verifiziert werden. Li *et al.* [142] konnten zuvor bei einer Insertionsmutante von *nbdA* in PAO1 den gleichen Effekt beobachten: Weder der c-di-GMP-Gehalt in planktonischen, noch in sessilen Zellen zeigte eine signifikante Abweichung zum WT [142]. Interessanterweise wurden im Stamm PA14 diverse Phänotypen bezüglich der Ausbildung von Biofilmen von $\Delta nbdA$ beobachtet. Die Zugabe von Arginin erzielte keine Änderung der adhärennten Biomasse, wohingegen die Anwesenheit von Glutamat und CAA eine Zunahme der Biomasse bewirkte [81]. Dies deutet daraufhin, dass die Zusammensetzung des Kulturmediums unterschiedliche Auswirkungen auf die Biofilmbildung hat. In einer früheren Studie wurde bereits ein Zusammenhang mit bestimmten Aminosäuren und der Fähigkeit zur Biofilmbildung gezeigt [22].

Weiterhin führte die Inaktivierung von *nbdA* in PA14 zu einer Hemmung der Bewegungsformen Schwimmen, Schwärmen und Twitchen [81], was im Gegensatz zu den Resultaten der Motilität in PAO1 steht. Dies kann auf die genetische Varianz zwischen PAO1 und

PA14, auf die unterschiedliche Konstruktionsweise der Mutanten oder auf beidem beruhen. Wie schon zuvor erwähnt, ist der TLS von NbdA in der Datenbank falsch annotiert, so dass ein Teil der intergenischen Region zwischen dem stromaufwärts liegenden Gen PA3310 und *nbdA* als codierender Bereich von *nbdA* annotiert ist. Die Sequenzierung des Stamms PA14 $\Delta nbdA$ [81] (von George O’Toole zur Verfügung gestellt) ergab, dass der gesamte ORF von *nbdA* sowie ein Teil der intergenischen Region inklusive der Bindestellen für AmrZ und RpoS deletiert wurden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in diesem Bereich weitere Bindestellen für regulatorische Elemente wie zum Beispiel für eine kleine RNA (sRNA) befinden. Diese können eine Vielzahl an Zielmolekülen modulieren, was Bakterien eine schnelle Reaktion auf Stress- oder veränderte Umweltbedingungen ermöglicht [62]. Der Einfluss von sRNAs auf die Regulation von Prozessen wie Motilität und Biofilmbildung in *P. aeruginosa* ist bekannt [62, 67]. Die Deletion einer sRNA-Bindestelle im intergenischen Bereich könnte einen Effekt auf die Regulation des flankierenden Gens PA3310 oder an einer anderen Stelle des Genoms bewirken. Dies könnte einen abweichenden Phänotyp der PA14 $\Delta nbdA$ -Mutante zur Folge haben.

Weiterhin ist der genetische Hintergrund einer Mutante für die Ausprägung eines Phänotyps von Bedeutung. Frühere Analysen zeigten, dass die Deletion des codierenden Gens *rbdA* (PA14_53140) für die PDE RbdA in den Stämmen PAO1 und PA14 ebenfalls unterschiedliche Phänotypen generierte [81]. Während die $\Delta rbdA$ -Mutante in PAO1 in einen Hyperbiofilm-Phänotyp resultierte [6, 132], verursachte die Mutation des Homologs in PA14 keine veränderte Biofilmbildung im Vergleich zum WT [81].

Im Gesamten sprechen die erfassten Daten der $\Delta nbdA$ -Mutante zunächst nicht für eine PDE-Aktivität von NbdA. Es gilt generell, dass DGCs die intrazelluläre c-di-GMP-Konzentration erhöhen, was mit einer Zunahme der Adhäsion und der Biofilmbildung sowie der Hemmung der Motilität korreliert. C-di-GMP-modulierende PDEs wirken antagonistisch und erzielen den gegenteiligen Effekt [88]. Folglich wird die Inaktivierung einer PDE mit einer erhöhten Biofilmbildung und einer reduzierten Motilität assoziiert. Li *et al.* [142] konnten zuvor anhand biochemischer Analysen eine enzymatische Aktivität der cytosolischen Domänen von NbdA nachweisen. Ebenso war die Senkung des c-di-GMP-Spiegels bei einer homologen Überexpression von *nbdA* in PAO1 ein Hinweis darauf, dass auch das Vollängenprotein eine PDE-Aktivität besitzt [142]. Daher besteht Grund zur Annahme, dass unter nativen Bedingungen der c-di-GMP-Pool lediglich lokal durch die PDE-Aktivität von NbdA moduliert wird. Seit einigen Jahren besteht die Hypothese, dass sich Veränderungen der c-di-GMP-Konzentration nicht zwingend phänotypisch äußern müssen. Es wird angenommen, dass oftmals nicht nur der globale c-di-GMP-Spiegel eine Rolle spielt. Vielmehr wird vermutet, dass parallel lokale c-di-GMP-Subpools in der Zelle vorherrschen. Diese könnten zur Regulation der Aktivität einiger Proteine beitragen, die in der Synthese, der Degradation und/oder der Bindung von c-di-GMP involviert sind [93, 160]. Die Analyse der DGC-Mutanten $\Delta sadC$ und $\Delta roeA$ zeigte beispielsweise, dass die gleichwertige Reduktion des globalen c-di-GMP-Spiegels der jeweiligen Mutanten unter-

schiedliche phänotypische Effekte erzielte. Während $\Delta sadC$ eine fünffache Steigerung des Schwärms und eine geringe abweichende EPS-Produktion hervorrief, konnte bei $\Delta roeA$ ein vollständiger Mangel des Exopolysaccharids Pel sowie eine Zunahme der Schwärmbewegung um das Zweifache festgestellt werden [160].

Außerdem könnten die WT-ähnlichen phänotypischen Effekte der Mutante auf den Mangel eines externen Signals hindeuten. Dafür würde der Besitz der N-terminalen MHYT-Domäne sprechen, welche als putative Sensordomäne beschrieben wurde [74].

4.2.2 Ist MucR ein bifunktionelles Enzym?

Die Deletionsmutanten $\Delta mucR$ sowie die Doppelmutante $\Delta nbdA \Delta mucR$ zeigten hinsichtlich der Motilität, der EPS-Produktion sowie der Biofilmbildung nach 48 h keine Unterschiede im Vergleich zum WT. Die Deletion von $mucR$ sowie der Verlust von $nbdA$ und $mucR$ erzielte lediglich einen Anstieg der adhärenen Biomasse nach einem Zeitraum von 24 h. Dies impliziert, dass MucR unter den gewählten Bedingungen einen Einfluss auf die Manifestation des frühen Biofilms nimmt. Ob dieser Effekt durch den zusätzlichen Mangel an NbdA verstärkt wird, kann nicht ausgeschlossen werden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die $\Delta nbdA$ -Mutante eine ähnliche Biomasse wie der WT aufwies.

Die Ergebnisse der $\Delta mucR$ -Mutante waren zunächst unerwartet, da diese nicht für eine DGC-Aktivität von MucR sprechen. Frühere Studien belegten jedoch, dass MucR eine aktive DGC ist [132, 88, 142]. Zudem wurde kürzlich postuliert, dass MucR ein bifunktionelles Enzym ist und abhängig vom bakteriellen Lebensstil als DGC oder PDE fungiert. So wurde in planktonischen Zellen einer PAO1 $\Delta mucR$ -Mutante ein reduzierter c-di-GMP-Spiegel nachgewiesen, wohingegen in sessilen Zellen die c-di-GMP-Konzentration erhöht war [142]. Dementsprechend könnte die Zunahme der Biomasse von $\Delta mucR$ innerhalb der ersten 24 h auf einer mangelnden PDE-Aktivität von MucR beruhen, wohingegen der Defekt von MucR während der fortwährenden Reifung des Biofilms durch andere DGCs komplementiert werden könnte. Trifft die Hypothese von Li *et al.* [142] zu, sollte im planktonischen Modus die Deletion von $mucR$ eine gesteigerte Motilität zur Folge haben. Dies wurde bei der Untersuchung der Motilität nicht detektiert. Hay *et al.* [88] beobachteten bei einer markerlosen $\Delta mucR$ -Mutante in PAO1 ebenso einen wildtypischen Phänotyp hinsichtlich der Motilität. Zudem wurde bei der Untersuchung der Pelikelbildung in LB-Medium nach 16 h ein WT-ähnlicher Phänotyp festgestellt [88].

Eine Studie von Ha *et al.* [81] ergab, dass ein Verlust von MucR im Stamm PA14 sich positiv auf die Schwimm- und Schwärmbewegung auswirkt und die Fähigkeit zur Biofilmbildung beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu waren das Twitchen sowie die Exopolysaccharidsynthese unverändert [81]. Die abweichenden Resultate zwischen den markerlosen $\Delta mucR$ -Mutanten in PAO1 und PA14 können auf variierende experimentelle Bedingungen oder auch auf die genetische Varianz zwischen PAO1 und PA14 zurückgeführt werden. Obwohl PAO1 und PA14 eine hohe Sequenzhomologie besitzen [137], lassen diese Daten darauf schließen, dass es Stamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Funktion von

MucR bei der Biofilmbildung gibt.

4.2.3 NbdA und MucR sind nicht in die NO-induzierte Dispersion involviert

In einer zuvor durchgeführten Studie der Arbeitsgruppe Frankenberg-Dinkel wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Karin Sauer postuliert, dass NbdA und MucR eine Rolle bei der NO-induzierten Dispersion im Stamm PAO1 spielen. In einem dynamischen Modell von Schlauchreaktoren wurde gezeigt, dass die Behandlung von Biofilmen von $\Delta nbdA$ und $\Delta mucR$ mit dem NO-Donor SNP keine Auflösung bewirkte. Im Gegensatz dazu konnte bei dem WT eine Reduktion der Biomasse um das 10-Fache detektiert werden [142]. Eine Doppelmutante wurde in der Studie nicht analysiert. Die Untersuchung von Biofilmen der markerlosen Mutanten im statischen System erzielte gegensätzliche Ergebnisse. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Inaktivierung von *nbdA* und *mucR* keinen Effekt auf die Fähigkeit zur Biofilmauflösung in Anwesenheit von NO hat. Die Stämme $\Delta nbdA$ und $\Delta mucR$ zeigten beide eine WT-ähnliche Reduktion der Biomasse um ca. 30 %. Die Doppelmutante $\Delta nbdA \Delta mucR$ war ebenso in der Lage auf niedrige NO-Konzentrationen zu reagieren. Im Falle einer NO-sensorischen Funktion von NbdA und MucR wäre zumindest eine mangelnde Auflösung der Doppelmutante zu erwarten gewesen. Daraus lässt sich schließen, dass beide Proteine nicht bei der NO-induzierten Dispersion beteiligt sind.

Die abweichenden Ergebnisse der Analysen sind vermutlich auf die unterschiedliche Konstruktionsweise der Mutanten zurückzuführen. Li *et al.* [142] verwendeten Insertionsmutanten mit chromosomal integrierten Antibiotika-Resistenzmarkern. Zudem wurde bei der $\Delta nbdA$ -Mutante ein Teil der 5'-UTR von *nbdA* deletiert. Die *phiSITE*-Datenbankanalyse [125, 225] unter Anwendung des *PromoterHunter*-Tools ergab, dass der vorhergesagte Promotorbereich des benachbarten Gens PA3310 bei der Mutante von Li *et al.* [142] mit hoher Wahrscheinlichkeit intakt ist. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die Transkription von PA3310 beeinträchtigt wurde. In Anbetracht dessen ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Phänotypen der Mutanten auf polaren Effekten der Resistenzmarker auf die jeweiligen stromabwärts befindlichen Gene beruhen. Solche polare Effekte treten häufig bei der Generierung von Insertionsmutanten auf und erzeugen artifizielle Phänotypen. Diese erschweren die richtige Bezugnahme auf die zugrunde liegende Gendeletion [193].

Weiterhin kann ein Einfluss des gewählten experimentellen Systems nicht ausgeschlossen werden. In der Masterarbeit von K. Gerbracht wurde bereits diskutiert, dass das dynamische Biofilm-Modell Schwächen bei der Kultivierung von Biofilmen und der Untersuchung der Dispersion aufweist und im Vergleich dazu das statische System wesentlich stabiler ist [78].

4.3 Regulation der enzymatischen Aktivität von NbdA und MucR

4.3.1 Die AGDEF-Domäne ist essentiell für die PDE-Aktivität von NbdA

Die heterologen Komplementationstests in *E. coli* AB607 belegten, dass NbdA eine aktive PDE ist. Die enzymatische Aktivität wurde wie erwartet durch die cytosolische EAL-Domäne vermittelt. Hierbei ist das Glutamat des EAL-Motivs an Position 494 essentiell, da der Austausch des Glutamats mit Alanin zu einem Aktivitätsverlust führte. Dies ist im Konsens mit Resultaten von Analysen anderer EAL-spezifischer PDEs [232, 237, 247]. Die PDE-Aktivität konnte *in vivo* jedoch nur in Anwesenheit der benachbarten AGDEF-Domäne nachgewiesen werden, wohingegen die alleinstehende EAL-Domäne von NbdA in einer *in-vitro*-Analyse aktiv war. In derselben Studie wurde gezeigt, dass die AGDEF-Domäne von NbdA fähig ist GTP zu binden und infolgedessen die PDE-Aktivität der EAL-Domäne induziert wird [142], was mit den Resultaten der *in vivo*-Untersuchung übereinstimmt. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die AGDEF-Domäne eine regulatorische Funktion ausübt und aktivierend auf die EAL-Domäne von NbdA wirkt.

Es wurde von Christen *et al.* [41] postuliert, dass GGDEF-Domänen dualer Enzyme abhängig von ihrer Sequenzkonservierung oder ihrem Oligomerisierungsgrad zwei alternative biologische Funktionen einnehmen: Sie können bei der Synthese oder bei der Regulation der Hydrolyse von c-di-GMP beteiligt sein. In *C. crescentus* wurde nachgewiesen, dass die degenerierte GGDEF-Domäne mit dem Motiv GEDEF des Proteins CC3396 GTP am aktiven Zentrum bindet, dies aber nicht zu c-di-GMP umsetzt, sondern die Aktivität der benachbarten EAL-Domäne stimuliert [41]. Das Membranprotein RbdA aus *P. aeruginosa* mit der cytosolischen Domänenorganisation PAS-GGDEF-EAL [145] besitzt trotz des konservierten GGDEF-Motivs ausschließlich eine PDE-Aktivität. Es wurde festgestellt, dass diese ebenso über die GTP-vermittelte Bindung der GGDEF-Domäne verstärkt wird [6].

Der Vergleich mit der Literatur deutet daraufhin, dass c-di-GMP-spezifische PDEs in Bakterien strikt reguliert werden. Die allosterische Kontrolle der PDE-Aktivität scheint ein generell auftretendes Phänomen bei dieser Enzymklasse zu sein [41]. Es wird angenommen, dass dies ein Mechanismus ist, um den GTP-Verbrauch in der Zelle zu regulieren [41]. Simm *et al.* [220] zufolge ändert sich in *Salmonella typhimurium* nach der Expression des Gens *adrA*, das für die DGC AdrA codiert, die Ratio von GTP zu c-di-GMP von 100:1 zu 1:10. Folglich ist möglich, dass die vollständige Induktion der c-di-GMP-Produktion eine unkontrollierte Hydrolyse von c-di-GMP zu pGpG und GMP nach sich ziehen würde. Im Zuge dessen wäre der GTP-Gehalt in der Zelle erschöpft. Um dies zu verhindern, werden spezifische PDEs bei einer kritischen GTP-Konzentration ausgeschaltet [41]. Auf Basis von Kristallstrukturanalysen wurde kürzlich postuliert, dass die PDE-Aktivität von RbdA über solch einen GTP-abhängigen Mechanismus reguliert wird (Abbildung 4.2) [145].

Es ist bekannt, dass aktive EAL-Domänen Dimere ausbilden [11, 37, 161, 235]. Im auto-

inhibitorischen Zustand liegen Interaktionen zwischen den α_6 -Helices der EAL-Domänen und den Signal-Helices (S-Helices) der Monomere vor, wobei sich die S-Helix jeweils N-terminal der GGDEF-Domäne befindet. Aufgrund dieser stabilen Konfiguration ist lediglich eine geringe PDE-Aktivität nachweisbar. Die Bindung von GTP an das aktive Zentrum der GGDEF-Domänen verursacht lokale Konformationsänderungen und führt zu einer Aufhebung der auto-inhibitorischen Interaktionen. Dies ermöglicht die Bildung des kanonischen Dimers durch die EAL-Domänen und die Hydrolyse von c-di-GMP. Ein alternativer Weg der PDE-Aktivierung involviert die Wahrnehmung eines Signals über eine putative Sensordomäne im Periplasma. Dies resultiert in Konformationsänderungen der Transmembran- und der S-Helices und erreicht schließlich die cytoplasmatischen PAS-Domänen, was wiederum die Ausbildung des kanonischen Dimers zur Folge hat (Abbildung 4.2) [145].

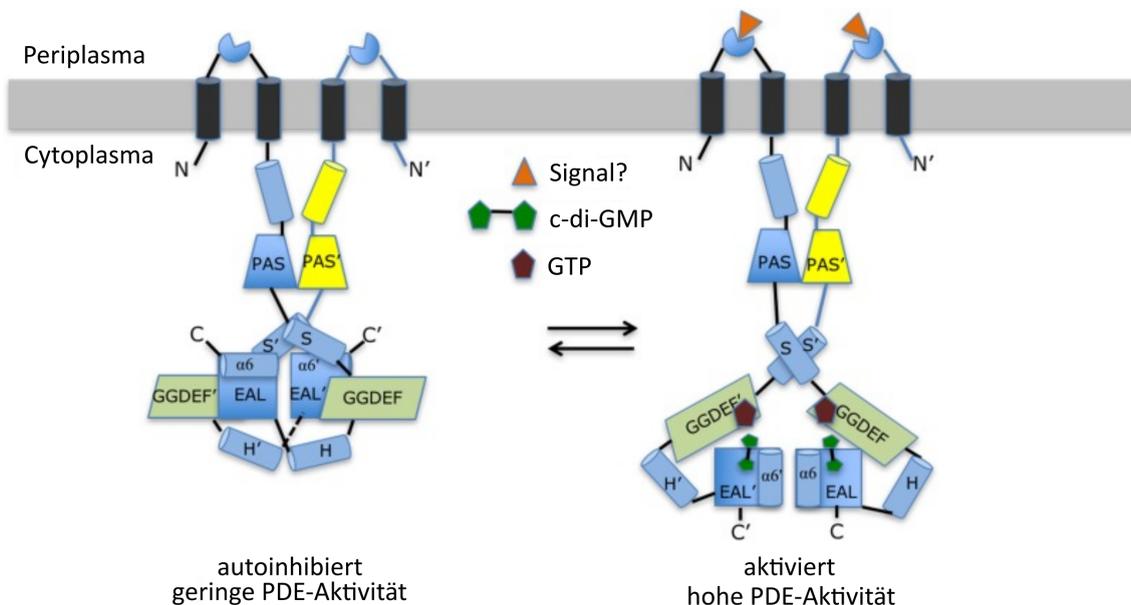


Abbildung 4.2: Postulierter allosterischer Mechanismus der Regulation der PDE-Aktivität von RbdA. RbdA bildet wie andere PDEs Dimere aus. Links ist der putative autoinhibitorische Zustand dargestellt, der in der Kristallstruktur der cytosolischen Domänen von RbdA beobachtet wurde. Dieser ruhende Zustand wird durch Interaktionen zwischen der Helix α_6 der EAL-Domäne und der S'-Helix (Signal-Helix), welche N-terminal der GGDEF'-Domäne (hellgrün) lokalisiert ist, sowie gleichermaßen zwischen der Helix α'_6 und der S-Helix des anderen Monomers stabilisiert. Dadurch befinden sich beide EAL-Domänen des RbdA-Dimers in einer nicht-kanonischen Konfiguration. Durch die Wahrnehmung eines Signals (orange) über die putative, periplasmatische Sensordomäne oder durch die Bindung von GTP (lila) an das aktive Zentrum der GGDEF-Domänen finden lokale Konformationsänderungen statt. Diese führen zu einer Freisetzung aus der auto-inhibitorischen Konfiguration, was die Umlagerung der EAL-Domänen in ein kanonisches Dimer zur Folge hat. In diesem Zustand ist das Dimer in der Lage c-di-GMP-Moleküle zu hydrolysieren und zeigt eine erhöhte PDE-Aktivität. N bzw. N': N-Terminus, C bzw. C': C-Terminus, H bzw. H': zwischen der GGDEF- und der EAL-Domäne lokalisierte *hinge*-Helix. Abbildung modifiziert nach [145].

Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der cytosolischen GGDEF-Domäne von RbdA (schwarz) und NbdA (türkis) zeigte, dass die meisten für die GTP-Bindung relevanten Aminosäuren identisch sind (Abbildung 4.3) [145]. Weiterhin verfügt NbdA über viele stark konservierte Aminosäurereste. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass NbdA über einen ähnlichen Regulationsmechanismus der PDE-Aktivität wie RbdA verfügt.

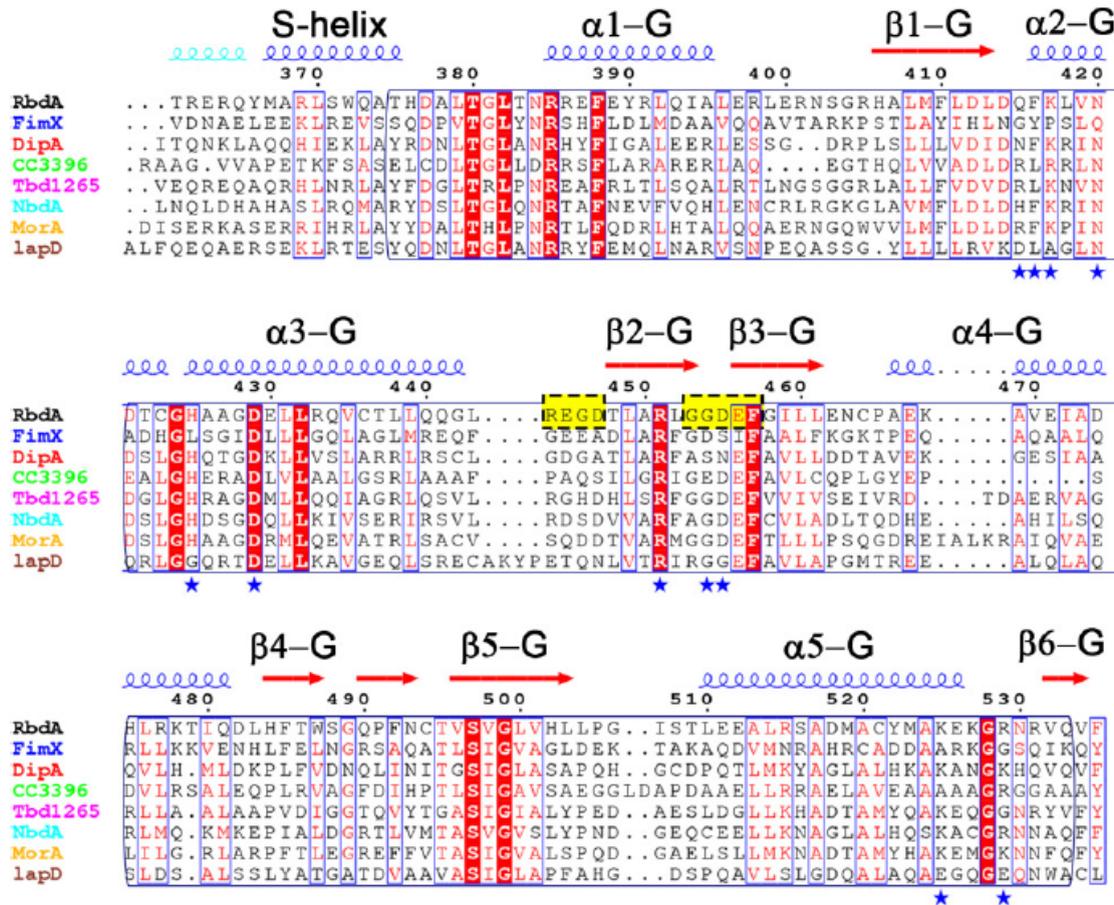


Abbildung 4.3: Ausschnitt aus dem sequenzspezifischen Alignment von RbdA und anderen bakteriellen Proteinen mit homologen GGDEF-EAL-Domänen. Sekundärstrukturelemente der GGDEF-Domäne basieren auf der Kristallstruktur der cytosolischen Segmente von RbdA. Stark konservierte Aminosäurereste sind rot hinterlegt. Die katalytischen Motive der Domäne (GGDEF-Motiv und *i-site* (REGD)) befinden sich in gelben Boxen. Schlüsselemente der Struktur einschließlich der S-Helix (Verbindungselement zwischen der cytoplasmatischen PAS- und GGDEF-Domäne) sind über dem Alignment angegeben. Die blauen Sterne markieren die für die GTP-Bindung relevanten Aminosäurereste. RbdA, FimX, DipA, NbdA und MorA stammen aus *P. aeruginosa*, CC3396 aus *Caulobacter crescentus*, Tbd1265 aus *Thiobacillus denitrificans* und LapD aus *P. fluorescens*. Abbildung modifiziert nach [145].

4.3.2 Die GGDEF-Domäne inhibiert die *in-vivo*-PDE-Aktivität von MucR

Im Gegensatz zu NbdA konnte bei MucR nur in Abwesenheit der GGDEF-Domäne eine schwache PDE-Aktivität der EAL-Domäne nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass die

GGDEF-Domäne neben ihrer DGC-Aktivität eine regulatorische Funktion einnimmt. Diese scheint der EAL-Domäne hierarchisch übergeordnet zu sein und übt *in vivo* unter den getesteten Bedingungen einen inhibitorischen Effekt auf die PDE-Aktivität aus. *In-vitro*-Studien der cytoplasmatischen Domänen von MucR unterstützen diese Hypothese. In diesen wurde ebenso eine schwache Enzymaktivität der alleinstehenden EAL-Domäne nachgewiesen. Die Zwei-Domänen-Variante GGDEF-EAL wies ebenfalls eine PDE-Aktivität auf. Diese war jedoch deutlich geringer als die der Ein-Domänen-Variante. Weiterhin konnte kein Umsatz des Substrats GTP über c-di-GMP zu pGpG bei der Zwei-Domänen-Variante, sondern lediglich die Synthese von c-di-GMP detektiert werden [142]. Dies ist ein Indiz dafür, dass in Anwesenheit von GTP die DGC-Aktivität dominiert. Es ist bekannt, dass GTP die PDE-Aktivität inhibieren kann [197]. Die Studie von Li *et al.* [142] deutet daraufhin, dass dies auch für MucR zutreffen könnte.

Zudem konnte anhand der heterologen Überexpression von *mucR* in *E. coli* MG1655 gezeigt werden, dass im planktonischen Modus eine DGC-Aktivität des Volllängenproteins vorliegt. Die Untersuchung der Biofilmbildung von $\Delta mucR$ in *P. aeruginosa* zeigte, dass MucR in den ersten 24 h vermutlich als PDE relevant ist. Somit konnte die Hypothese von Li *et al.* [142], dass MucR ein bifunktionelles Enzym sei, bestätigt werden.

MorA (*motility regulator A*) ist eine weitere membranverankerte Tandem-DGC-PDE in *P. aeruginosa* [184] und weist neben der GGDEF- und EAL-Domäne vier sensorische PAS-Domänen im cytosolischen Segment auf [162]. Biochemische Analysen zeigten, dass bei MorA die PDE-Aktivität dominiert. Die Zugabe von GTP zu der Zwei-Domänen-Variante GGDEF-EAL resultierte in einer vollständigen Umsetzung zu dem Produkt pGpG. Das Umschalten zwischen den beiden Aktivitäten erfordert Konformationsänderungen im Bereich der Helix α_5 , der sogenannten Repressor-Helix (R-Helix) der PDE-Domäne. Dies bewirkt das Entfernen des DDFGTG-Motivs aus dem aktiven Zentrum, wodurch die katalytische Aktivität reprimiert wird. Die Dimerbildung von MorA sorgt für eine verkürzte Struktur der R-Helix und erlaubt den Zugang der katalytisch nötigen Aminosäurereste des DDFGTG-Motivs in die Substrat-Bindetasche im aktiven Zentrum [184].

In dieser Arbeit konnte anhand SDS-PAGE die Ausbildung hochmolekularer Komplexe nach der Expression von MucR-Strep detektiert werden, was ein Hinweis auf die Dimerbildung war. Die Lösung der Kristallstruktur der EAL-Domäne von MucR zeigte, dass dessen EAL-Domänen dimerisieren. Bellini *et al.* [20] postulierten, dass die PDE-Aktivität von MucR über einen analogen Mechanismus wie bei MorA aktiviert wird.

Wie der Wechsel zwischen der DGC- und der PDE-Aktivität von MucR in Abhängigkeit von GTP auf molekularer Ebene abläuft, ist noch unerschlossen. In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass die EAL-Domäne von MucR auch einen regulatorischen Effekt auf die GGDEF-Domäne haben kann [142, 245]. Aus diesen Erkenntnissen kann folgendes Modell hergeleitet werden: Bei einer hohen GTP-Konzentration wird die PDE-Aktivität der EAL-Domäne gehemmt und die Domäne nimmt eine regulatorische Funktion ein. Durch sich ändernde Bedingungen oder die Wahrnehmung eines bestimmten Signals findet ein

Umschalten von der DGC- auf die PDE-Aktivität statt und die c-di-GMP-Hydrolyse wird eingeleitet.

Zudem wurde kürzlich das Motiv GCXXXQGF in der EAL-Domäne des bifunktionellen Enzyms DcpA aus *Mycobacterium smegmatis* entdeckt, welches bei der Homöostase von c-di-GMP beteiligt sein soll. Es wurde postuliert, dass eine Substrat-induzierte Konformationsänderung der GCXXXQGF-enthaltenden Schleife den Umsatz von c-di-GMP kontrollieren soll [23]. Die Sequenzanalyse ergab, dass MucR ebenso ein solches Motiv mit der Aminosäuresequenz GCNSLQGF in der EAL-Domäne aufweist. Um daraus entsprechende Schlüsse ziehen zu können, sind jedoch weitere Experimente erforderlich.

4.4 Welche Rolle spielt die MHYT-Domäne bei NbdA und MucR?

Aus den heterologen Komplementationstests in *E. coli* geht hervor, dass die N-terminale MHYT-Domäne keinen regulatorischen Einfluss auf die Enzymaktivität von NbdA und MucR unter aeroben Bedingungen ausübt. Damit kann ein inhibitorischer Effekt der Domäne auf die Aktivität in Anwesenheit von Sauerstoff ausgeschlossen werden. Weiterhin zeigte die Zugabe des NO-Donors SNP keine ersichtliche Wirkung auf die PDE-Aktivität der beiden Proteine. Es ist möglich, dass der NO-Sensor DGC1-H-NOX eine höhere Bindungsaffinität zu dem Gas als NbdA und MucR hat. Zudem ist das etablierte *in-vivo*-System von qualitativer Natur und unterliegt Schwankungen. Nichtsdestotrotz sind diese Ergebnisse im Konsens mit denen der NO-induzierten Dispersion und implizieren, dass die Proteine nicht fähig sind über die MHYT-Domäne NO wahrzunehmen. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass das Gas frei durch die Membran diffundieren kann und somit ein membranständiger NO-Sensor nicht zwingend notwendig ist. In der Tat sind die meisten bekannten NO-Sensoren löslich [92, 101, 146, 185]. Weiterhin ist bekannt, dass Häm-gebundene PAS-Domänen unter anderem NO wahrnehmen können [14, 52]. Die MHYT-Domäne ist interessanterweise oftmals mit PAS-Domänen assoziiert wie zum Beispiel bei den Proteinen CC0091 aus *C. crescentus*, Mlr3504 aus *M. loti*, Slr2098 aus *Synechocystis* sp. und DgcW aus *B. subtilis* [74]. Dies wirft Zweifel auf, ob in Anwesenheit der PAS-Domäne eine weitere putative Sensordomäne für NO von Bedarf ist.

Die Proteine DgcW aus *B. subtilis* und CC0091 aus *C. crescentus* enthalten neben der MHYT- und der PAS-Domäne eine C-terminale GGDEF- und EAL-Domäne [74]. Die Deletion von CC0091 hatte einen positiven Effekt auf die Oberflächenadhäsion von *C. crescentus*. In diesem Zusammenhang wurde eine erhöhte Bildung des Haftorgans sowie eine verstärkte, zelluläre Aggregation beobachtet [140]. Die Inaktivierung von DgcW zeigte, dass das Enzym nicht in die Perzeption von Sauerstoff involviert ist. Folglich kann eine O₂-sensorische Funktion der MHYT-Domäne von DgcW ausgeschlossen werden [74], was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Da sich die bioinformatische Vorhersage von Galperin *et al.* [74] über die putative Bindungsfähigkeit der MHYT-Domäne generell

4.4. Welche Rolle spielt die MHYT-Domäne bei NbdA und MucR?

auf diatomische Gase bezieht, kommt auch CO als putativer Ligand in Frage. In dem carboxidotrophen Organismus *Oligotropha carboxidovorans* ist die MHYT-Domäne in die Proteine CoxC und CoxH inkorporiert. Die zugrunde liegenden Gene *coxC* und *coxH* sind Komponenten des Genclusters *coxBCMSLDEFGHIK* [204], das für die membranständige CO-Dehydrogenase (CODH) codiert [114, 129, 204]. Eine CO-sensorische Funktion der Proteine wurde bislang noch nicht erschlossen. Es wird vermutet, dass die Membranproteine CoxC und CoxH zur Lokalisation der CODH an der Innenseite der cytoplasmatischen Membran beitragen [97, 222]. Dies könnte auch eine putative Funktion der MHYT-Domäne bei MucR und NbdA sein, zumal NbdA als PDE anscheinend nur den lokalen c-di-GMP-Spiegel in *P. aeruginosa* verändert. Zudem ist bekannt, dass MucR lokal eine Rolle bei der Alginatproduktion spielt [88]. Diese Fakten implizieren, dass die Membranverankerung über die MHYT-Domäne für die physiologische Funktion von NbdA und MucR von Bedeutung ist.

Es ist möglich, dass diese zusätzlich eine sensorische Funktion in *P. aeruginosa* ausübt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass NbdA und MucR mit insgesamt sieben Transmembransegmenten eine energetisch aufwendige Domäne enthalten. Wang *et al.* [245] stellten fest, dass das zweite MHYT-Motiv von MucR bei der Wahrnehmung von Nitrat in dem mukoiden *P. aeruginosa*-Stamm PDO300 beteiligt ist. Der Austausch des Histidins durch Alanin (H122A) in Motiv II verhinderte die ansonsten auftretende Nitrat-induzierte Hemmung der Alginatsynthese [245]. Das sequenzspezifische Alignment der MHYT-Domäne von NbdA und MucR zeigte, dass das Motiv II auch bei NbdA konserviert ist (Abbildung 4.4).



Abbildung 4.4: Sequenzspezifisches Alignment der MHYT-Domäne von NbdA und MucR. Das Alignment wurde unter Anwendung des *T-COFFEE-Webservers* (<http://tcoffee.crg.cat/>) erstellt und anhand des Portals *BoxShade* (https://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) visualisiert. Die MHYT-Motive der Membrandomäne sind rot umrandet. MucR_MHYT: MHYT-Domäne von MucR, NbdA_MHYT: MHYT-Domäne von NbdA.

Nichtsdestotrotz weisen die MHYT-Domänen lediglich eine Sequenzidentität von ca. 41 % auf. *NbdA* enthält zudem zwei degenerierte Motive (Motiv I und Motiv III), wohingegen bei *MucR* nur das Motiv I von der konservierten Sequenz abweicht (Abbildung 4.4). In Anbetracht dessen ist ungewiss, ob die Membrandomänen von *NbdA* und *MucR* die gleiche putative sensorische Funktion einnehmen.

4.5 *NbdA* - Mehr als nur eine Phosphodiesterase?

Die Untersuchung der Überexpression von *nbdA* im *P. aeruginosa* WT zeigte teilweise unerwartete Phänotypen. Die Fähigkeit zur Adhäsion sowie zur Biofilm- und Pellicelbildung waren deutlich vermindert, was im Konsens mit dem reduzierten c-di-GMP-Spiegel ist. Interessanterweise wurde ein massiver Motilitätsdefekt des Überexpressionsstamms PAO1::pMRP13 festgestellt. Dies war unerwartet, da die Überproduktion einer PDE klassischerweise mit einer verstärkten Motilität in Verbindung gebracht wird. Um einzugrenzen, welche Phänotypen auf der PDE-Aktivität von *NbdA* beruhen, wurde die inaktive *NbdA*-Variante *NbdA*-AAL (MHYT-AGDEF-AAL) in der $\Delta nbdA$ -Mutante überproduziert.

Tabelle 4.1: Übersicht über die Ergebnisse der homologen Überexpression von *nbdA* und *nbdA*-AAL in *P. aeruginosa*. ↓: Reduktion im Vergleich zur Kontrolle, ↑: Steigung im Vergleich zur Kontrolle, →: unverändert zur Kontrolle, -: nicht getestet, ×: unabhängig von der PDE-Aktivität, ✓: abhängig von der PDE-Aktivität.

Funktion	<i>nbdA</i> (aktive PDE)	<i>nbdA</i> -AAL (inaktiv)	Bezug zur PDE-Aktivität
Motilität	↓	↓	×
Adhäsion	↓	↓	×
Biofilmbildung	↓	(→)	✓
Pellicelbildung	↓	→	✓
Rhamnolipidsynthese	↑	↑	×
c-di-GMP-Spiegel	↓	-	✓
GMP-Spiegel	↑	-	✓

Der Vergleich der Ergebnisse der Überexpression von *nbdA* im WT mit den Resultaten der Überexpression von *nbdA*-AAL in $\Delta nbdA$ (Tabelle 4.1) zeigt, dass die Pellicelbildung mit der PDE-Aktivität von *NbdA* korreliert. Ähnliches wurde bei der Analyse von statischen Biofilmen festgestellt. Die adhärenente Biomasse konnte jedoch bei der inaktiven *NbdA*-Variante nicht quantifiziert werden. Die Senkung bzw. die Zunahme intrazellulärer c-di-GMP- bzw. GMP-Konzentrationen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenso auf die Aktivität zurückzuführen. Allerdings konnte die Quantifizierung der Metabolite in dem Stamm $\Delta nbdA$::pMRP14 (*nbdA*-AAL) nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden. Generell wird bei einer Überexpression einer EAL-spezifischen PDE die Abnahme interner c-di-GMP-Konzentrationen sowie der Anstieg von GMP erwartet. So wurde in einer früheren Studie bei der heterologen Überexpression von PdeH in *P. aeruginosa*

ebenso eine Reduktion des internen c-di-GMP-Spiegels detektiert. Weiterhin wurde eine verminderte Ausbildung von Biofilmen in Mikrotiterplatten beobachtet [42]. Dies stimmt mit den erzielten Ergebnissen überein und bestätigt die Annahme, dass diese Phänotypen auf der erhöhten Aktivität von NbdA beruhen. Dem liegt zugrunde, dass die Biofilmbildung in *P. aeruginosa* hauptsächlich von der Bildung der Exopolysaccharide Psl und Pel [70, 108, 154] und bei einigen klinischen Isolaten von Alginate abhängig ist [99]. Die Biosynthese dieser Polysaccharide wird zu einem gewissen Grad durch c-di-GMP reguliert [96]. Bei einem niedrigen c-di-GMP-Spiegel wird deren Ausbildung beeinträchtigt, was sich negativ auf die Biofilmbildung auswirkt.

Die beobachteten Phänotypen deuten daraufhin, dass NbdA neben seiner PDE-Aktivität noch eine andere Funktion einnehmen könnte. Seit einigen Jahren besteht die Vermutung, dass spezifische PDEs [189], aber auch DGCs, mit verschiedenen Prozessen in Verbindung stehen [198]. Diese umfassen die Kontrolle der Flagellen- und Pilifunktion bis hin zur Regulation der Expression von Adhäsinen, Exopolysaccharid-Operons und Virulenzgenen [96, 131, 143, 155, 220]. Es stellte sich zum Beispiel heraus, dass das GGDEF-EAL-Protein FimX die Twitching-Bewegung sowie die Biofilmbildung kontrolliert [102, 119]. Die PDE BifA reguliert hingegen die Biofilmbildung und das Schwärmen [130]. Die phänotypische Analyse von Transposonmutanten oder der Überexpression der gesamten GGDEF- und EAL enthaltenden Gene aus *P. aeruginosa* PA14 implizierte, dass nicht alle DGCs oder PDEs dieselbe Rolle bei der Biofilmbildung und der Cytotoxizität spielen [132]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das c-di-GMP-abhängige Signalnetzwerk wesentlich komplexer ist als bislang vermutet wurde [198].

Kürzlich wurde die Überproduktion der membranständigen EAL-spezifischen PDE FcsR (*Flagellar, chemotaxis and type III secretion Regulator*) in *P. aeruginosa* PAK charakterisiert [198], welche ähnliche Phänotypen wie die Überexpression von NbdA in PAO1 hervorbrachte. Rossello *et al.* [198] beobachteten eine PDE-abhängige Reduktion der Biofilmbildung und zugleich eine Beeinträchtigung der Motilität. Zudem hat das Protein einen regulatorischen Effekt auf die Chemotaxis und das Typ-III-Sekretionssystem. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Flagellenbewegung, die Chemotaxis sowie das Typ-III-Sekretionssystem über einen PDE-unabhängigen Mechanismus reguliert werden. Demzufolge wurde postuliert, dass FcsR eine putative Trigger-Phosphodiesterase ist [198]. Trigger-PDEs sind aktive PDEs, die mehrere Funktionen übernehmen. Die primäre Funktion solcher Enzyme ist die Kontrolle der Aktivität anderer Zielmoleküle wie Proteine oder einer Promotorregion der DNA über direkte und spezifische Interaktionen. Die c-di-GMP hydrolysierende Aktivität ist hingegen zweitrangig und dient der Modulation der primären Aktivität [94].

In *E. coli* sind bis *dato* zwei Trigger-PDEs bekannt: PdeL und PdeR. PdeR ist eine Schlüsselkomponente, welche die Produktion der Biofilmmatrix kontrolliert. Das Protein nimmt steigende c-di-GMP-Konzentrationen wahr und interagiert daraufhin mit dem Transkriptionsfaktor MlrA. Dies führt zur Hemmung der Expression des Biofilmregulators CsgD und

der stromabwärts lokalisierten Gene, die in der Synthese von Amyloidfasern involviert sind. Beim Erreichen eines bestimmten c-di-GMP-Spiegels werden diese Interaktionen gelöst, da PdeR spezifisch c-di-GMP bindet und hydrolysiert [144]. Das Protein PdeL enthält am N-Terminus ein LuxR-ähnliches Helix-Turn-Helix-Motiv, über welches es direkt an DNA bindet und die Transkription spezifischer Gene kontrolliert. Die Funktion als c-di-GMP-Sensor und der damit verbundene Abbau des Substrats ist von sekundärer Natur [192]. Bisher gibt es bis auf FcsR keine weiteren Kandidaten für putative Trigger-PDEs in *P. aeruginosa*. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erste Hinweise, dass NbdA als Trigger-PDE fungieren könnte. Dabei ist eine Regulation anderer Proteine über die direkte Interaktion möglich. In einer früheren Arbeit wurde anhand des *Bacterial Two Hybrid*-Systems (BACTH) erschlossen, dass NbdA mit anderen Proteinen interagiert. Hierbei wurde unter anderem SadC als möglicher Interaktionspartner identifiziert [19]. SadC (*surface attachment defective C*) ist ein Membranprotein mit einer GGDEF-Domäne, welches als aktive DGC fungiert [159] und in der Regulation der frühen Biofilmbildung involviert ist [212, 255]. Unter anaeroben Bedingungen ist die DGC-Aktivität von SadC deutlich erhöht und stimuliert die Alginateproduktion [212]. Eine Interaktion der Homologe von NbdA (Pfl01_1252) und SadC (Pfl01_4451) in dem Stamm *P. fluorescens* Pf0-1 wurde zuvor von Dahlstrom *et al.* [48] postuliert. BACTH-Studien ergaben, dass Pfl01_1252 acht weitere Interaktionspartner mit einer GGDEF- und/oder EAL-Domäne hat. Unter diesen befindet sich interessanterweise auch das MucR-Homolog Pfl01_2525 [48]. Da SadC und MucR bei der Alginsynthese eine Rolle spielen, ist nicht auszuschließen, dass beide Proteine Komponenten des gleichen regulatorischen Netzwerks sind. Während SadC unter anaeroben Bedingungen relevant ist (Abbildung 4.5 C) [212], könnte MucR vorrangig unter aeroben Bedingungen für die Alginateproduktion von Bedeutung sein (Abbildung 4.5 A). In welchem Zusammenhang steht dies mit NbdA? Es ist bekannt, dass SadC im Anaeroben aktiver ist [212], während *nbdA* unter diesen Bedingungen nicht exprimiert wird (Abbildung 4.5 C) [244]. Dies ist ein Indiz dafür, dass NbdA einen regulatorischen Effekt auf SadC ausüben könnte. SadC wird möglicherweise unter aeroben Bedingungen von NbdA inhibiert [19]. Somit wird die Aktivität einer der Master-DGCs in *P. aeruginosa* unterbunden, was lokal durch andere DGCs wie MucR komplementiert werden könnte. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass MucR im Planktonischen als DGC aktiv ist. Die Ergebnisse der Überexpression weisen daraufhin, dass NbdA unter denselben Bedingungen als Trigger-PDE fungiert. Daher ist denkbar, dass NbdA MucR über eine direkte Interaktion stimuliert (Abbildung 4.5 A), wodurch die Motilität beeinträchtigt wurde. Im Biofilm ist NbdA vermutlich als PDE aktiv (Abbildung 4.5 B), weshalb die Biofilmbildung aufgrund des niedrigen c-di-GMP-Spiegels bei der Überexpression gehemmt wurde.

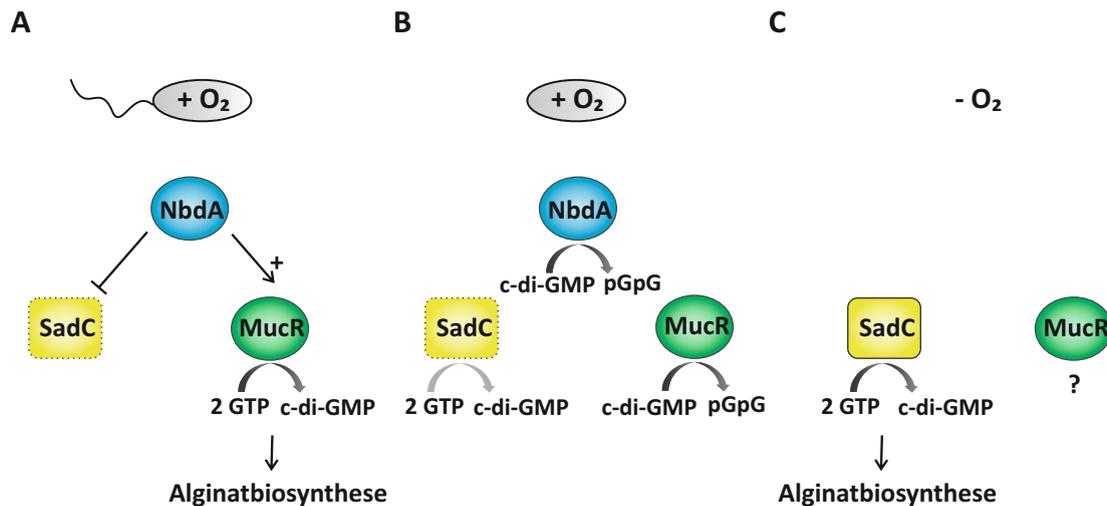


Abbildung 4.5: Putative Proteininteraktionen von NbdA als Trigger-Phosphodiesterase in *P. aeruginosa*. Unter aeroben Bedingungen und im planktonischen Modus ist NbdA als Trigger-PDE aktiv. Es hemmt die Aktivität von SadC und stimuliert die DGC-Aktivität von MucR, welche wichtig für die Alginatbiosynthese ist (A). Im Biofilm besitzt NbdA eine PDE-Aktivität und ist an der lokalen c-di-GMP-Hydrolyse beteiligt (B). Unter anaeroben Bedingungen wird NbdA nicht produziert, was sich förderlich auf die DGC-Aktivität von SadC und die Alginatproduktion auswirkt. Welche Funktion MucR im Anaeroben einnimmt, ist unbekannt (C).

Nichtsdestotrotz muss berücksichtigt werden, dass die Hemmung der Motilität bei der homologen Überexpression von *nbdA* und *nbdA*-AAL auch andere Ursachen haben könnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Überproduktion von NbdA bzw. NbdA-AAL die Homöostase der Membranproteine stört. Zudem ist möglich, dass durch die Überproduktion eines Membranproteins die Ausbildung der Zell-assoziierten Typ IV Pili beeinträchtigt wird, was die Inhibition der Bewegungsformen Schwärmen und Twitching erklären würde. Weiterhin könnte aufgrund des vermehrt vorhandenen NbdA-Proteins ein Ungleichgewicht bei Protein-Protein-Interaktionen entstehen, was sich reprimierend auf die Motilität auswirken könnte. Um diesbezüglich genauere Aussagen treffen zu können, bedarf es jedoch weiterer Experimente.

Zusammenfassung

NbdA und MucR sind Multi-Domänenproteine aus *Pseudomonas aeruginosa*. Beide Proteine besitzen eine ähnliche Domänenorganisation mit einer N-terminalen, membranständigen MHYT-Domäne sowie einer GGDEF- und einer EAL-Domäne im Cytoplasma. Die cytosolischen Domänen von MucR sind beide aktiv, während NbdA neben der intakten EAL-Domäne eine degenerierte GGDEF-Domäne mit dem Motiv AGDEF aufweist. Bioinformatischen Vorhersagen zufolge soll die MHYT-Domäne eine sensorische Funktion für diatomische Gase wie Stickstoffmonoxid oder Sauerstoff vermitteln.

Die phänotypische Charakterisierung der markerlosen PAO1-Deletionsmutanten $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ und $\Delta nbdA \Delta mucR$ zeigte, dass NbdA und MucR nicht in die NO-induzierte Dispersion involviert sind. Ebenso konnte in einem neu etablierten heterologen *in-vivo*-System in *E. coli* keine NO-sensorische Funktion der Proteine detektiert werden. Im Weiteren wurde festgestellt, dass die MHYT-Domäne keinen ersichtlichen Einfluss auf die Enzymaktivität von NbdA und MucR unter aeroben Bedingungen hat. Demzufolge fungiert die Membrandomäne vermutlich weder als Sensor für Sauerstoff, noch für NO.

Anhand heterologer Komplementationstests konnte eine PDE-Aktivität des NbdA-Volllängenproteins nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass die degenerierte AGDEF-Domäne einen regulatorischen Effekt auf die EAL-Domäne hat, der essentiell für die *in-vivo*-Aktivität von NbdA ist. *In-vivo*-Untersuchungen bestätigten die postulierte DGC-Aktivität von MucR. Weiterhin konnte belegt werden, dass MucR ein bifunktionelles Enzym ist. Entgegen den Erwartungen scheint es jedoch im Planktonischen als DGC und im Biofilm als PDE zu fungieren.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Charakterisierung der homologen Überexpression von *nbdA* in *P. aeruginosa*, welche teilweise unerwartete Phänotypen ergab. Anhand der homologen Überproduktion einer inaktiven NbdA-Variante stellte sich heraus, dass die Hemmung der Motilität unabhängig von der Aktivität von NbdA auftritt. Massenspektrometrische Analysen deuteten daraufhin, dass NbdA lokal c-di-GMP hydrolysiert. Diese Ergebnisse implizieren, dass NbdA eine Trigger-PDE ist, deren primäre Funktion die Regulation anderer makromolekularer Zielmoleküle ist. In *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 ist bekannt, dass das NbdA-Homolog Pf0_1252 mit den Homologen von MucR (Pf01_2525) und SadC (Pf01_4451) interagiert. Ergebnisse einer früheren Arbeit lassen eine Interaktion von NbdA und SadC ebenso in *P. aeruginosa* vermuten. Daher ist denkbar, dass sich NbdA im gleichen Netzwerk wie MucR und SadC befindet und deren Aktivität reguliert.

Summary

NbdA and MucR are multi-domain-proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. They both share a similar domain organisation consisting of a N-terminal memran-anchored MHYT-domain, as well as a GGDEF- and EAL-domain in the cytoplasm. Both cytosolic domains of MucR are active, whereas NbdA possesses besides its active EAL-domain a degenerated GGDEF-domain with an AGDEF-motif. According to bioinformatic predictions the MHYT-domain is proposed to sense diatomic gases such as nitric oxide or oxygen.

The phenotypic characterisation of the markerless PAO1 deletion mutants $\Delta nbdA$, $\Delta mucR$ and $\Delta nbdA \Delta mucR$ revealed that NbdA and MucR are not involved in the NO-induced dispersion. Moreover, no NO-sensory function of the proteins was detected using the newly established heterologous *in-vivo*-system in *E. coli*. It turned out that the MHYT-domain has no obvious influence on the enzymatic activity of NbdA and MucR under aerobic conditions. Hence, the membrane domain probably serves neither as a sensor for oxygen, nor for nitric oxide.

The phosphodiesterase activity of full length NbdA was confirmed by heterologous complementation tests. It was also shown that the degenerated AGDEF-domain has a regulatory impact on the EAL-domain which is essential for *in vivo* activity of NbdA. *In vivo* studies reassured the postulated diguanylate cyclase activity of MucR. The hypothesis, that MucR was a bifunctional enzyme, was confirmed. Contrary to expectations, MucR acts as a diguanylate cyclase in planctonic mode and as a phosphodiesterase in biofilms.

Another aspect of this work was the characterisation of the homologous overexpression of *nbdA* revealing unexpected phenotypes. Analysis of the homologous overproduction of an inactive NbdA variant revealed that the inhibition of motility is independent of NbdA activity. In addition to that, mass spectrometric data implied only local c-di-GMP hydrolysis by NbdA. These results indicate that NbdA might be a trigger phosphodiesterase whose primary function is the regulation of macromolecular targets. In *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, it is known that the NbdA homologue Pff01_1252 interacts with the homologues of MucR (Pff01_2525) and SadC (Pff01_4451). Results of a former study also suggested the interaction of NbdA and SadC in *P. aeruginosa*. Thus, the presence of NbdA in the same network as MucR and SadC, as well as the regulation of their activity by NbdA is possible.

Literaturverzeichnis

- [1] **Abel, S., T. Bucher, M. Nicollier, I. Hug, V. Kaefer, P. Abel Zur Wiesch, and U. Jenal.** 2013. Bi-modal distribution of the second messenger c-di-GMP controls cell fate and asymmetry during the caulobacter cell cycle. *PLoS Genet.* **9**:e1003744.
- [2] **Adar, Y. Y., and S. Ulitzur.** 1993. GroESL proteins facilitate binding of externally added inducer by LuxR protein-containing *E. coli* cells. *J. Biolumin. Chemilumin.* **8**:261-266.
- [3] **Allesen-Holm, M, K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** 2005. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**:1114-1128.
- [4] **Alm, R. A., A. J. Boder, P. D. Free, and J. S. Mattick.** 1996. Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**:46-53.
- [5] **Amikam, D., and M. Y. Galperin.** 2006. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics.* **22**:3-6.
- [6] **An, S., J. Wu, and L. H. Zhang.** 2010. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:8160-8173.
- [7] **Arora, D. P., and E. M. Boon.** 2012. Nitric oxide regulated two-component signaling in *Pseudoalteromonas atlantica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**:521-526.
- [8] **Baker, A. E., A. Diepold, S. L. Kuchma, J. E. Scott, D. G. Ha, G. Orazi, J. P. Armitage, and G. A. O'Toole.** 2016. PilZ domain protein FlgZ mediates cyclic di-GMP-dependent swarming motility control in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **198**:1837-1846.
- [9] **Baraquet, C., and C. S. Harwood.** 2013. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**:18478-18483.
- [10] **Baraquet, C., K. Murakami, M. R. Parsek, and C. S. Harwood.** 2012. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic. Acids. Res.* **40**:7207-7218.
- [11] **Barends, T. R. M., E. Hartmann, J. J. Griese, T. Beitlich, N. V. Kirienko, D. A. Ryjenkov, D. A. Reinstein, R. I. Shoeman, M. Gomelsky, and I. Schlichting.** 2009. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature.* **459**:1015-1018.

- [12] Barken, K. B., S. J. Pamp, L. Yang, M. Gjermansen, J. J. Bertrand, M. Klausen, M. Givskov, C. B. Whitchurch, J. N. Engel, and T. Tolker-Nielsen. 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10**:2331-2343.
- [13] Barraud, N., D. J. Hassett, S. H. Hwang, S. A. Rice, S. Kjelleberg, and J. S. Webb. 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**:7344-7353.
- [14] Barraud, N., D. Schleheck, J. Klebensberger, J. S. Webb, D. J. Hassett, S. A. Rice, and S. Kjelleberg. 2009. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J. Bacteriol.* **191**:7333-7342.
- [15] Barraud, N., M. V. Storey, Z. P. Moore, J. S. Webb, S. A. Rice, and S. Kjelleberg. 2009. Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb. Biotechnol.* **2**:370-378.
- [16] Baynham, P. J., D. M. Ramsey, B. V. Gvozdyev, E. M. Cordonnier, and D. J. Wozniak. 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili. *J. Bacteriol.* **188**:132-140.
- [17] Baynham, P. J., and D. J. Wozniak. 1996. Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA-binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa* algD transcription. *Mol. Microbiol.* **22**:97-108.
- [18] Bedrunka, P., F. Olbrisch, M. Ruger, S. Zehner, and N. Frankenberg-Dinkel. 2018. Nitric oxide controls c-di-GMP turnover in *Dinoroseobacter shibae*. *Microbiology.* **164**:1405-1415.
- [19] Beganovic, S. 2018. Investigating the protein interaction network responsible for nitric oxide induced biofilm dispersal in *Pseudomonas aeruginosa*. Masterarbeit. TU Kaiserslautern.
- [20] Bellini, D., S. Horrell, A. Hutchin, C. W. Phippen, R. W. Strange, Y. Cai, A. Wagner, J. S. Webb, I. Tews, and M. A. Walsh. 2017. Dimerisation induced formation of the active site and the identification of three metal sites in EAL-phosphodiesterases. *Sci. Rep.* **7**:42166.
- [21] Bergey, D. 1994. Genus *Pseudomonas*. In D. Bergey, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore, Lippencott Williams & Wilkins.
- [22] Bernier, S. P., D. G. Ha, W. Khan, J. H. Merritt, and G. A. O'Toole. 2011. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Res. Microbiol.* **162**:680-688.
- [23] Bharati, B. K., R. Mukherjee, and D. Chatterji. 2018. Substrate-induced domain movement in a bifunctional protein, DcpA, regulates cyclic di-GMP turnover: Functional implications of a highly conserved motif. *J. Biol. Chem.* **293**:14065-14079.
- [24] Blattner, F. R., G. 3rd Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**:1453-1462.

- [25] **Bodey, G. P., R. Bolivar, V. Fainstein, and L. Jadeja.** 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. **5**:279-313.
- [26] **Boehm, A., M. Kaiser, H. Li, C. Spangler, C. A. Kasper, M. Ackermann, V. Kaever, V. Sourjik, V. Roth, and U. Jenal.** 2010. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. Cell. **141**:107-116.
- [27] **Bohn, E.** 2017. Untersuchung der membrangebundenen Phosphodiesterase NbdA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Masterarbeit. TU Kaiserslautern.
- [28] **Boon, E. M., J. H. Davis, R. Tran, D. S. Karow, S. H. Huang, D. Pan, M. M. Miazgowicz, R. A. Mathies, and M. A. Marletta.** 2006. Nitric oxide binding to prokaryotic homologs of the soluble guanylate cyclase beta1 H-NOX domain. J. Biol. Chem. **281**:21892-21902.
- [29] **Boon, E. M., and M. A. Marletta.** 2005. Ligand discrimination in soluble guanylate cyclase and the H-NOX family of heme sensor proteins. Curr. Opin. Chem. Biol. **9**:441-446.
- [30] **Bordeleau, E., and V. Burrus.** 2015. Cyclic-di-GMP signaling in the Gram-positive pathogen *Clostridium difficile*. Curr. Genet. **61**:497-502.
- [31] **Bradley, D. E.** 1980. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. Can. J. Microbiol. **26**:146-154.
- [32] **Buchholz, U., H. Bernard, D. Werber, M. M. Böhmer, C. Remschmidt, H. Wilking, Y. Deleré, M. an der Heiden, C. Adlhoch, J. Dreesman, J. Ehlers, S. Ethelberg, M. Faber, C. Frank, G. Fricke, M. Greiner, M. Höhle, S. Ivarsson, U. Jark, M. Kirchner, J. Koch, G. Krause, P. Lubber, B. Rosner, K. Stark, and M. Kühne.** 2011. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. N. Engl. J. Med. **365**:1763-1770.
- [33] **Cai, Q., Li, Z., Ouyang, Q., Luo, C., and V. D. Gordon.** 2016. Singly flagellated *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxes efficiently by unbiased motor regulation. mBio. **7**:e00013-16.
- [34] **Cao, H., G. Krishnan, B. Goumnerov, J. Tsongalis, R. Tompkins, and L. G. Rahme.** 2001. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**:14613-14618.
- [35] **Chan, C., R. Paul, D. Samoray, N. C. Amiot, B. Giese, U. Jenal, and T. Schirmer.** 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **101**:17084-17089.
- [36] **Chatterjee, D., R. B. Cooley, C. D. Boyd, R. A. Mehl, G. A. O'Toole, and H. Sondermann.** 2014. Mechanistic insight into the conserved allosteric regulation of periplasmic proteolysis by the signaling molecule cyclic-di-GMP. Elife. **3**:e03650.
- [37] **Chen, M. W., M. Kotaka, C. Vonnrhein, G. Bricogne, F. Rao, M. L. C. Chuah, D. Svergun, G. Schneider, Z. X. Liang, and J. Lescar.** 2012. Structural insights into the regulatory mechanism of the response regulator RocR from *Pseudomonas aeruginosa* in cyclic di-GMP signaling. J. Bacteriol. **184**:4837-4846.
- [38] **Choi, K.-H., Kumar, A., and H. P. Schweizer.** 2006. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. J. Microbiol. Methods. **64**:391-397.

- [39] **Chou, S. H., and M. Y. Galperin.** 2016. Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms. *J. Bacteriol.* **198**:32-46.
- [40] **Christen, B., M. Christen, R. Paul, F. Schmid, M. Folcher, P. Jenoe, M. Meuwly, and U. Jenal.** 2006. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J. Biol. Chem.* **281**:32015-32024.
- [41] **Christen, M., B. Christen, M. Folcher, A. Schauerte, and U. Jenal.** 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J. Biol. Chem.* **280**:30829-30837.
- [42] **Christensen, L. D., M. van Gennip, M. T. Rybtke, H. Wu, W. C. Chiang, M. Alhede, N. Høiby, T. E. Nielsen, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** 2013. Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* foreign-body biofilm infections through reduction of the cyclic di-GMP level in the bacteria. *Infect. Immun.* **81**:2705-2713.
- [43] **Corrigan, R. M., J. C. Abbott, H. Burhenne, V. Kaefer, and A. Gründling.** 2011. c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. *PLoS Pathog.* **7**:e1002217.
- [44] **Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:435-464.
- [45] **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:711-745.
- [46] **Couturier, M. R., and M. Stein.** 2008. *Helicobacter pylori* produces unique filaments upon host contact *in vitro*. *Can. J. Microbiol.* **54**:537-548.
- [47] **Cutruzzolà, F., and N. Frankenberg-Dinkel.** 2016. Origin and impact of nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* **198**:55-65.
- [48] **Dahlstrom, K. M., A. J. Collins, G. Doing, J. N. Taroni, T. J. Gauvin, C. S. Greene, D. A. Hogan, and G. A O'Toole.** 2018. A multimodal strategy used by a large c-di-GMP network. *J. Bacteriol.* **200**:e00703-17.
- [49] **Davies, D., M. Parsek, J. Pearson, B. Iglewski, J. Costerton, and E. Greenberg.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **280**:295-298.
- [50] **Davis, N. J., Y. Cohen, S. Sanselicio, C. Fumeaux, S. Ozaki, J. Luciano, R. C. Guerrero-Ferreira, E. R. Wright, U. Jenal, and P. H. Viollier.** 2013. De- and repolarization mechanism of flagellar morphogenesis during a bacterial cell cycle. *Genes Dev.* **27**:2049-2062.
- [51] **de Lorenzo, V., and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386-405.
- [52] **Delgado-Nixon, V. M., G. Gonzalez, M. A. Gilles-Gonzalez.** 2000. Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry.* **39**:2685-2691.
- [53] **Déziel, E., F. Lépine, S. Milot, J. He, M. N. Mindrinos, R. G. Tompkins, and L. G. Rahme.** 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**:1339-1344.

- [54] **Diggle, S. P., K. Winzer, S. R. Chhabra, K. E. Worrall, M. Cámara, and P. Williams.** 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* **50**:29-43.
- [55] **Dole, M., H. L. Cox, and J. Gieniec.** 1973. Electrospray Mass Spectrometry. *Adv. Chem. Ser.* **125**:73-84.
- [56] **Dunn, N. W., and B. W. Holloway.** 1971. Pleiotrophy of p-fluorophenylalanine-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet. Res.* **18**:185-197.
- [57] **Eberhard, A., A. L. Burlingame, C. Eberhard, G. L. Kenyon, K. H. Nealson, and N. J. Oppenheimer.** 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry.* **20**:2444-2449.
- [58] **Edelman, G. M., and J. A. Gally.** 1992. Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:11651-11652.
- [59] **Emmer, M., D. de Crombrughe, I. Pastan, and R. Perlman.** 1970. Cyclic AMP receptor protein of *E.coli*:its role in the synthesis of inducible enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **66**:480-487.
- [60] **Engebrecht, J., K. Nealson, and M. Silverman.** 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell.* **32**:773-781.
- [61] **Espinosa-Urgel, M.** 2003. Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J. Bacteriol.* **185**:699-700.
- [62] **Falcone, M., S. Ferrara, E. Rossi, H. K. Johansen, S. Molin, and G. Bertoni.** 2018. The small RNA *ErsA* of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to biofilm development and motility through post-transcriptional modulation of *AmrZ*. *Front. Microbiol.* **9**:238.
- [63] **Fang, F. C.** 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* **99**:2818-2825.
- [64] **Fang, X., and M. Gomelsky.** 2010. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol. Microbiol.* **76**:1295-1305.
- [65] **Fazekas, D. S., S. Groth, R. G. Webster, and A. Datyner.** 1963. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys. Acta.* **71**:377-385.
- [66] **Feng, L., Q. Xiang, Q. Ai, Z. Wang, Y. Zhang, Q. Lu.** 2016. Effects of quorum sensing systems on regulatory T cells in catheter-related *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection rat models. *Mediators. Inflamm.* **2016**:4012912.
- [67] **Ferrara, S., S. Carloni, R. Fulco, M. Falcone, R. Macchi, and G. Bertoni.** 2015. Post-transcriptional regulation of the virulence-associated enzyme *AlgC* by the σ^{22} -dependent small RNA *ErsA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **17**:199-214.
- [68] **Fraser, G. M., and C. Hughes.** 1999. Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:630-635.
- [69] **Friedman, L., and R. Kolter.** 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**:657-690.

- [70] **Friedman, L., and R. Kolter.** 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* **186**:4457-4465.
- [71] **Frølund, B., R. Palmgren, K. Keiding, and P. H. Nielsen.** 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* **30**:1749-1758.
- [72] **Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275.
- [73] **Gallagher, L. A., S. L. McKnight, M. S. Kuznetsova, E. C. Pesci, and C. Manoil.** 2002. Functions required for extracellular quinolone signalling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**:6472-6480.
- [74] **Galperin, M. Y., T. A. Gaidenko, A. Y. Mulkidjanian, M. Nakano, and C. W. Price.** 2001. MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:17-23.
- [75] **Gambello, M. J., S. Kaye, and B. H. Iglewski.** 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.* **61**:1180-1184.
- [76] **Gastmeier, P., C. Geffers, D. Sohr, F. Schwab, M. Behnke, and H. Rüdén.** 2003. Surveillance of nosocomial infections in intensive care units. Current data and interpretations. *Wien. Klin. Wochenschr.* **115**:99-103.
- [77] **Gerbracht, K.** 2014. Etablierung der Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen. Bachelorarbeit. Ruhr-Universität-Bochum.
- [78] **Gerbracht, K.** 2016. Die Rolle von NbdA in der NO-induzierten Biofilmauflösung von *Pseudomonas aeruginosa*. Externe Masterarbeit. Ruhr-Universität-Bochum/TU Kaiserslautern.
- [79] **Gjermansen, M., P. Ragas, C. Sternberg, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen.** 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Microbiol.* **7**:894-906.
- [80] **Glessner, A., R. S. Smith, B. H. Iglewski, and J. B. Robinson.** 1999. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J. Bacteriol.* **181**:1623-1629.
- [81] **Ha, D. G., M. E. Richman, and G. A. O'Toole.** 2014. Deletion mutant library for investigation of functional outputs of cyclic diguanylate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:3384-3393.
- [82] **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- [83] **Hancock, R.** 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **27** Suppl 1:S93-99.
- [84] **Hanzelka, B. L., and E. P. Greenberg.** 1995. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *J. Bacteriol.* **177**:815-817.
- [85] **Harmsen, M., L. Yang, S. J. Pamp, and T. Tolker-Nielsen.** 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**:253-268.

- [86] **Harshey, R. M.** 1994. Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **13**:389-394.
- [87] **Hart, C. A., and C. Winstanley.** 2002. Persistent and aggressive bacteria in the lungs of cystic fibrosis children. *Br. Med. Bull.* **61**:81-96. *tetraspis*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **13**:255-258.
- [88] **Hay, I. D., U. Remminghorst, and B. H. Rehm.** (2009) MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:1110-1120.
- [89] **Heieck, K.** 2019. Untersuchung der c-di-GMP-abhängigen Phosphodiesterase NbdA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Masterarbeit. TU Kaiserslautern.
- [90] **Helmann, J. D.** Regulation by Alternative Sigma Factors. In: Storz, G., and Hengge R. (Ed.) 2011. *Bacterial Stress Responses*. 2nd ed. Washington, D.C. ASM Press.
- [91] **Helmann, J. D., and M. J. Chamberlin.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:839-872.
- [92] **Henares, B. M., K. E. Higgins, and E. M. Boon.** 2012. Discovery of a nitric oxide responsive quorum sensing circuit in *Vibrio harveyi*. *ACS Chem. Biol.* **7**:1331-1336.
- [93] **Hengge, R.** 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:263-273.
- [94] **Hengge, R.** 2016. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **371**:20150498.
- [95] **Henzel, W. J., C. Watanabe, and J. T. Stults.** 2003. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **14**:931-942.
- [96] **Hickman, J. W., D. F. Tifrea, and C. S. Harwood.** 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:14422-14427.
- [97] **Hille, R., S. Dingwall, and J. Wilcoxon.** 2015. The aerobic CO dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**:243-251.
- [98] **Hmelo, L. R., B. R. Borlee, H. Almblad, M. E. Love, T. E. Randall, B. S. Tseng, C. Lin, Y. Irie, K. M. Storek, J. J. Yang, R. J. Siehnel, P. L. Howell, P. K. Singh, T. Tolker-Nielsen, M. R. Parsek, H. P. Schweizer, and J. J. Harrison.** 2015. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat. Protoc.* **10**:1820-1841.
- [99] **Høiby, N.** 1974. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: relationship between mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humoral immune response. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. B. Microbiol. Immunol.* **82**:551-558.
- [100] **Høiby, N., O. Ciofu, and T. Bjarnsholt.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future. Microbiol.* **5**:1663-1674.
- [101] **Hossain, S., and E. M. Boon.** 2017. Discovery of a novel nitric-oxide binding protein and nitric-oxide-responsive signaling pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **3**:454-461.
- [102] **Huang, B., C. B. Whitchurch, and J. S. Mattick.** 2003. FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**:7068-7076.

- [103] **Huang, C. L., H. E. Ives, and M. G. Cogan.** 1986. *In vivo* evidence that cGMP is the second messenger for atrial natriuretic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:8015-8018.
- [104] **Hunt, S. M., E. M. Werner, B. Huang, M. A. Hamilton, and P. S. Stewart.** 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7418-7425.
- [105] **Imperi, F., F. Ciccocanti, A. B. Perdomo, F. Tiburzi, C. Mancone, T. Alonzi, P. Ascenzi, M. Piacentini, P. Visca, and G. M. Fimia.** 2009. Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics.* **9**:1901-1915.
- [106] **Innis, M. A., K. B. Myambo, D. H. Gelfand, and M. A. Brow.** 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:9436-9440.
- [107] **Iyer, L. M., V. Anantharaman, and L. Aravind.** 2003. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics.* **4**:5.
- [108] **Jackson, K. D., M. Starkey, S. Kremer, M. R. Parsek, and D. J. Wozniak.** 2004. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**:4466-4475.
- [109] **Jenal, U., A. Reinders, and C. Lori.** 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**:271-284.
- [110] **Julkowska, D., M. Obuchowski, B. Holland, and S. J. S  ror.** 2004. Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: detection of different cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology.* **150**:1839-1849.
- [111] **Jones, C. J., D. Newsom, B. Kelly, Y. Irie, L. K. Jennings, B. Xu, D. H. Limoli, J. J. Harrison, M. R. Parsek, P. White, and D. J. Wozniak.** 2014. ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **10**:e1003984.
- [112] **Jones, C. J., A. Utada, K. R. Davis, W. Thongsomboon, D. Zamorano Sanchez, V. Banakar, L. Cegelski, G. C. Wong, and F. H. Yildiz.** 2015. C-di-GMP Regulates Motile to Sessile Transition by Modulating MshA Pili Biogenesis and Near-Surface Motility Behavior in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* **11**:e1005068.
- [113] **Jones, S., B. Yu, N. J. Bainton, M. Birdsall, B. W. Bycroft, S. R. Chhabra, A. J. R. Cox, P. Golby, P. J. Reeves, S. Stephens, M. K. Winson, G. P. C. Salmond, G. S. A. B. Stewart, and P. Williams.** 1993. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* **12**:2477-2482.
- [114] **Kang, B. S., and Y. M. Kim.** 1999. Cloning and molecular characterization of the genes for carbon monoxide dehydrogenase and localization of molybdopterin, flavin adenine dinucleotide, and iron-sulfur centers in the enzyme of *Hydrogenophaga pseudoflava*. *J. Bacteriol.* **181**:5581-5590.
- [115] **Kaplan, J. B., and D. H. Fine.** 2002. Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4943-4950.

- [116] **Karas, M., and F. Hillenkamp.** 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**:2299-2301.
- [117] **Karow, D. S., D. Pan, R. Tran, P. Pellicena, A. Presley, R. A. Mathies, and M. A. Marletta.** 2004. Spectroscopic characterization of the soluble guanylate cyclase-like heme domains from *Vibrio cholerae* and *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Biochemistry.* **43**:10203-10211.
- [118] **Kato, J., T. Nakamura, A. Kuroda, and H. Ohtake.** 1999. Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**:155-161.
- [119] **Kazmierczak, B. I., M. B. Lebron, and T. S. Murray.** 2006. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **60**:1026-1043.
- [120] **Kearns, D. B., and R. Losick.** 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49**:581-590.
- [121] **Keppens, S., J. R. Vandenhede, and H. De Wulf.** 1977. On the role of calcium as second messenger in liver for the hormonally induced activation of glycogen phosphorylase. *Biochim. Biophys. Acta.* **496**:448-457.
- [122] **Kiil, K., T. T. Binnewies, H. Willenbrock, S. K. Hansen, L. Yang, L. Jelsbak, D. W. Ussery, and C. Friis.** Comparative Genomics of *Pseudomonas*. 2008. In B. H. A. Rehm (ed.), *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. Weinheim. WILEY-VCH.
- [123] **Klausen, M., A. Aes-Jorgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen.** 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* **50**:61-68.
- [124] **Klockgether, J., N. Cramer, L. Wiehlmann, C. F. Davenport, and B. Tümmler.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front. Microbiol.* **2**:150.
- [125] **Klucar, L., M. Stano, and M. Hajduk.** 2010. phiSITE: Database of gene regulation in bacteriophages. *Nucleic Acids. Res.* **38(Database Issue)**:D366-D370.
- [126] **Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden C., and J. C. Pechère.** 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**:5990-5996.
- [127] **Kolodkin-Gal, I., D. Romero, S. Cao, J. Clardy, R. Kolter, and R. Losick.** 2010. D-Amino acids trigger biofilm disassembly. *Science.* **328**:627-629.
- [128] **Krasteva, P. V., J. C. Fong, N. J. Shikuma, S. Beyhan, M. V. Navarro, F. H. Yildiz, and H. Sondermann.** 2010. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science.* **327**:866-868.
- [129] **Kraut, M., I. Hugendieck, S. Herwig, and O. Meyer.** 1989. Homology and distribution of CO dehydrogenase structural genes in carboxydotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **152**:335-341.
- [130] **Kuchma, S. L., K. M. Brothers, J. H. Merritt, N. T. Liberati, F. M. Ausubel, and G. A. O'Toole.** 2007. BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **189**:8165-8178.

- [131] **Kulasekara, H. D., I. Ventre, B. R. Kulasekara, A. Lazdunski, A. Filoux, and S. Lory.** 2005. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol. Microbiol.* **55**:368-380.
- [132] **Kulasekara, H., V. Lee, A. Brenic, N. Liberati, J. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, A. N. Neely, M. Hyodo, Y. Hayakawa, F. M. Ausubel, and S. Lory.** 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**:2839-2844.
- [133] **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- [134] **Lange, R, and R. Hengge-Aronis.** 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:49-59.
- [135] **Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, and A. Lazdunski.** 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* **21**:1137-1146.
- [136] **Latifi, A., M. K. Winson, M. Foglino, B. W. Bycroft, G. S. Stewart, A. Lazdunski, and P. Williams.** 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **17**:333-343.
- [137] **Lee, D. G., J. M. Urbach, G. Wu, N. T. Liberati, R. L. Feinbaum, S. Miyata, L. T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Déziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel.** 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* **7**:R90.
- [138] **Lee, J., J. Wu, Y. Deng, J. Wang, C. Wang, J. Wang, C. Chang, Y. Dong, P. Williams, and L. H. Zhang.** 2013. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chem. Biol.* **9**:339-343.
- [139] **Leube, R. E., P. Kaiser, A. Seiter, R. Zimbelmann, W. W. Franke, H. Rehm, P. Knaus, P. Prior, H. Betz, H. Reinke, K. Beyreuther, and B. Wiedenmann.** 1987. Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *EMBO J.* **6**:3261-3268.
- [140] **Levi, A. Y.** 2007. Genetic Dissection of *Caulobacter crescentus* surface colonization. Dissertation. Universität Basel.
- [141] **Lewenza, S., J. L. Gardy, F. S. Brinkman, and R. E. Hancock.** 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**:321-329.
- [142] **Li, Y., S. Heine, M. Entian, K. Sauer, and N. Frankenberg-Dinkel.** 2013. NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *J. Bacteriol.* **195**:3531-3542.
- [143] **Li, Y., O. E. Petrova, S. Su, G. W. Lau, W. Panmanee, R. Na, D. J. Hassett, D. G. Davies, and K. Sauer.** 2014. BdlA, DipA and induced dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **10**:e1004168.

- [144] **Lindenberg, S., G. Klauck, C. Pesavento, and E. Klauck, and R. Hengge.** 2013. The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J.* **32**:2001-2014.
- [145] **Liu, C., C. W. Liew, Y. H. Wong, S. T. Tan, W. H. Poh, M. S. S. Manimekalai, S. Rajan, L. Xin, Z. X. Liang, G. Grüber, S. A. Rice, and J. Lescar.** 2018. Insights into biofilm dispersal regulation from the crystal structure of the PAS-GGDEF-EAL Region of RbdA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **200**:e00515-17.
- [146] **Liu, N., Y. Xu, S. Hossain, N. Huang, D. Coursolle, J. A. Gralnick, and E. M. Boon.** 2012. Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry.* **51**:2087-2099.
- [147] **Lower, S. K., R. Yongsunthon, N. N. Casillas-Ituarte, E. S. Taylor, A. C. DiBartola, B. H. Lower, T. J. Beveridge, A. W. Buck, and V. G. Jr. Fowler.** 2010. A tactile response in *Staphylococcus aureus*. *Biophys. J.* **99**:2803-2811.
- [148] **Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier.** 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:194-222.
- [149] **Manfredi, R., A. Nanetti, M. Ferri, and F. Chiodo.** 2000. *Pseudomonas* spp. complications in patients with HIV disease: an eight-year clinical and microbiological survey. *Eur. J. Epidemiol.* **16**:111-118.
- [150] **Marr, A. K., J. Overhage, M. Bains, and R. E. Hancock.** 2007. The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiology.* **153**:474-482.
- [151] **Martínez-Granero, F., A. Navazo, E. Barahona, M. Redondo-Nieto, R. Rivilla, and M. Martín.** 2012. The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One.* **7**:e31765.
- [152] **Martínez-Granero, F., M. Redondo-Nieto, P. Vesga, M. Martín, and R. Rivilla.** AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaption in *P. fluorescens* F113. *BMC Genomics.* **15**:237.
- [153] **Masduki, A., J. Nakamura, T. Ohga, R. Umezaki, J. Kato, and H. Ohtake.** 1995. Isolation and characterization of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**:948-952.
- [154] **Matsukawa, M., and E. P. Greenberg.** 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* **186**:4449-4456.
- [155] **Matsuyama, B. Y., P. V. Krasteva, C. Baraquet, C. S. Harwood, H. Sondermann, and M. V. Navarro.** 2016. Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**:E209-218.
- [156] **McKnight, S. L., B. H. Iglewski, and E. C. Pesci.** 2000. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**:2702-2708.
- [157] **Meighen, E. A.** 1993. Bacterial bioluminescence: organisation, regulation, and application of the *lux* genes. *FASEB J.* **7**:1016-1022.

- [158] **Merighi M., V. T. Lee, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and S. Lory.** 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **65**:876-895.
- [159] **Merritt, J. H., K. M. Brothers, S. L. Kuchma, and G. A. O'Toole.** 2007. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J. Bacteriol.* **189**:8154-8164.
- [160] **Merritt, J. H., D. G. Ha, K. N. Cowles, W. Lu, D. K. Morales, J. Rabinowitz, Z. Gitai, and G. A. O'Toole.** 2010. Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *MBio.* **1**:e00183-10.
- [161] **Minasov, G., S. Padavattan, L. Shuvalova, J. S. Brunzelle, D. J. Miller, A. Basler, C. Massa, F. R. Collart, T. Schirmer, and W. F. Anderson.** 2009. Crystal structures of YkuI and its complex with second messenger cyclic di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains. *J. Biol. Chem.* **284**:13174-13184.
- [162] **Möglich, A., R. A. Ayers, and K. Moffat.** 2009. Structure and signaling mechanism of Per-Arnt-Sim domains. *Structure.* **17**:1282-1294.
- [163] **Monds, R. D., P. D. Newell, R. H. Gross, and G. A. O'Toole.** 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol. Microbiol.* **63**:659-679.
- [164] **Morgan, R., S. Kohn, S. H. Hwang, D. J. Hassett, and K. Sauer.** 2006. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**:7335-7343.
- [165] **Murray, T. S., and B. I. Kazmierczak.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J. Bacteriol.* **190**:2700-2708.
- [166] **Musk, D. J., D. A. Banko, and P. J. Hergenrother.** 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* **12**:789-796.
- [167] **National Center for Biotechnology Information.** PubChem Database. Crystal violet, CID=11057. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11057>. (aufgerufen am 19.04.2019).
- [168] **Nealson, K. H., and J. W. Hastings.** 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* **43**:496-518.
- [169] **Ochsner, U. A., A. K. Koch, A. Fiechter, and J. Reiser.** 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**:2044-2054.
- [170] **Oglesby, L. L., S. Jain, and D. E. Ohman.** 2008. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology.* **154**:1605-1615.
- [171] **Orr, M. W., G. P. Donaldson, G. B. Severin, J. Wang, H. O. Sintim, C. M. Waters, and V. T. Lee.** 2015. Oligoribonuclease is the primary degradative enzyme for pGpG in *Pseudomonas aeruginosa* that is required for cyclic-di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**:E5048-5057.

- [172] **O’Toole, G. A., and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**:295-304.
- [173] **O’Toole, G. A., and R. Kolter.** 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**:449-461.
- [174] **Overhage, J., M. Bains, M. D. Brazas, and R. E. Hancock.** 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **190**:2671-2679.
- [175] **Parsek, M. R., A. L. Schaefer, and E. P. Greenberg.** 1997. Analysis of random and site-directed mutations in *rhII*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Mol. Microbiol.* **26**:301-310.
- [176] **Paul, K., V. Nieto, W. C. Carlquist, D. F. Blair, and R. M. Harshey.** 2010. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol. Cell.* **38**:128-139.
- [177] **Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese, and U. Jenal.** 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* **18**:715-727.
- [178] **Pearson, J. P., L. Passador, B. H. Iglewski, and E. P. Greenberg.** 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:1490-1494.
- [179] **Pearson, J. P., E. C. Pesci, and B. H. Iglewski.** 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**:5756-5767.
- [180] **Pellicena, P., D. S. Karow, E. M. Boon, M. A. Marletta, and J. Kuriyan.** 2004. Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**:12854-12859.
- [181] **Pesci, E. C., J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, and B. H. Iglewski.** 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:11229-11234.
- [182] **Petrova, O. E., and K. Sauer.** 2012. PAS domain residues and prosthetic group involved in BdlA-dependent dispersion response by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* **194**:5817-5828.
- [183] **Petrova, O. E., and K. Sauer.** 2016. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr. Opin. Microbiol.* **30**:67-78.
- [184] **Phippen, C. W., H. Mikolajek, H. G. Schlaefli, C. W. Keevil, J. S. Webb, and I. Tews.** 2014. Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator. *FEBS Lett.* **588**:4631-4636.
- [185] **Plate, L., and M. A. Marletta.** 2012. Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network. *Mol. Cell.* **46**:449-460.
- [186] **Pruitt, B. A., Jr., A. T. McManus, S. H. Kim, and C. W. Goodwin.** 1998. Burn wound infections: current status. *World J. Surg.* **22**:135-145.

- [187] **Prussak, C. E., M. T. Almazan, and B. Y. Tseng.** 1989. Peptide production from proteins separated by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **178**:233-238.
- [188] **Qiu, D., F. H. Damron, T. Mima, H. P. Schweizer, and H. D. Yu.** 2008. P_{BAD} -Based shuttle vectors for functional analysis of toxic and highly regulated genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. and other bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:7422-7426.
- [189] **Rao, F., Y. Yang, Y. Qi, and Z. X. Liang.** 2008. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**:3622-3631.
- [190] **Rappsilber, J., Y. Ishihama, and M. Mann.** 2003. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* **75**:663-670.
- [191] **Rath, A., M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen, and C. M. Deber.** 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**:1760-1765.
- [192] **Reinders, A., C. S. Hee, S. Ozaki, A. Mazur, A. Boehm, T. Schirmer, and U. Jenal.** 2015. Expression and genetic activation of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterases in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **198**:448-462.
- [193] **Reyrat, J. M., V. Pelicic, B. Gicquel, and R. Rappuoli.** 1998. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.* **66**:4011-4017.
- [194] **Richter, A. M., T. L. Povolotsky, L. H. Wieler, and R. Hengge.** 2014. Cyclic di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. *EMBO Mol. Med.* **6**:1622-1637.
- [195] **Rietsch, A., I. Vallet-Gely, S. L. Dove, and J. J. Mekalanos.** 2005. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:8006-8011.
- [196] **Römling, U., Z. X. Liang, and J. M. Dow.** 2017. Progress in understanding the molecular basis underlying functional diversification of cyclic dinucleotide turnover proteins. *J. Bacteriol.* **199**:e00790-16.
- [197] **Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, and M. Benziman.** 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature.* **325**:279-281.
- [198] **Rossello, J., A. Lima, M. Gil, J. Rodríguez Duarte, A. Correa, P. C. Carvalho, A. Kierbel, and R. Durán.** 2017. The EAL-domain protein FcsR regulates flagella, chemotaxis and type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* by a phosphodiesterase independent mechanism. *Sci. Rep.* **7**:10281.
- [199] **Russell, M. H., A. N. Bible, X. Fang, J. R. Gooding, S. R. Campagna, M. Gomelsky, and G. Alexandre.** 2013. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *MBio.* **4**:e00001-13.
- [200] **Ryan, R. P., Y. Fouhy, J. F. Lucey, L. C. Crossman, S. Spiro, Y. W. He, L. H. Zhang, S. Heeb, M. Cámara, P. Williams, and J. M. Dow.** 2006. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**:6712-6717.

- [201] **Ryjenkov, D. A., M. Tarutina, O. V. Moskvina, and M. Gomelsky.** 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol.* **187**:1792-1798.
- [202] **Salmond, G. P. C., B. W. Bycroft, G. S. A. B. Stewart, and P. Williams.** 1995. The bacterial 'enigma:' cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.* **16**:615-624.
- [203] **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- [204] **Santiago, B., U. Schübel, C. Egelseer, and O. Meyer.** 1999. Sequence analysis, characterization and CO-specific transcription of the *cox* gene cluster on the megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*. *Gene.* **236**:115-124.
- [205] **Sarenko, O., G. Klauck, F. M. Wilke, V. Pfiffer, A. M. Richter, S. Herbst, V. Kaefer, and R. Hengge.** 2017. More than enzymes that make or break cyclic di-GMP-local signaling in the interactome of GGDEF/EAL domain proteins of *Escherichia coli*. *MBio.* **8**:e01639-17.
- [206] **Sarkar, S.** 2013. Investigating the virulence potential of the multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* ST131 clone. Dissertation. University of Queensland.
- [207] **Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, and D. G. Davies.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**:1140-1154.
- [208] **Sauer, K., M. C. Cullen, A. H. Rickard, L. A. Zeef, D. G. Davies, and P. Gilbert.** 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* **186**:7312-7326.
- [209] **Schlag, S., C. Nerz, T. A. Birkenstock, F. Altenberend, and F. Gotz.** 2007. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *J. Bacteriol.* **189**:7911-7919.
- [210] **Schleheck, D., N. Barraud, J. Klebensberger, J. S. Webb, D. McDougald, S. A. Rice, and S. Kjelleberg.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch cultures and disperses upon starvation. *PLoS One.* **4**:e5513.
- [211] **Schmidt, A.** 2012. Die Rolle von Stickstoffmonoxid bei der c-di-GMP-vermittelten Auflösung von *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen. Masterarbeit. Ruhr-Universität-Bochum.
- [212] **Schmidt, A., A. S. Hammerbacher, M. Bastian, K. J. Nieken, J. Klockgether, M. Merighi, K. Lapouge, C. Poschgan, J. Kölle, K. R. Acharya, M. Ulrich, B. Tümmler, G. Unden, V. Kaefer, S. Lory, D. Haas, S. Schwarz, and G. Döring.** 2016. Oxygen-dependent regulation of c-di-GMP synthesis by SadC controls alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **18**:3390-3402.
- [213] **Schmidt, A. J., D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky.** 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* **187**:4774-4781.
- [214] **Schmidt, J., M. Müsken, T. Becker, Z. Magnowska, D. Bertinetti, S. Möller, B. Zimmermann, F. W. Herberg, L. Jänsch, and S. Häussler.** 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis methyltransferase cheR1 impacts on bacterial surface sampling. *PLoS One.* **6**:e18184.

- [215] **Schmidt, K. D., B. Tümmler, and U. Römling.** 1996. Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J. Bacteriol.* **178**:85-93.
- [216] **Schulz, S., D. Eckweiler, A. Bielecka, T. Nicolai, R. Franke, A. Dötsch, K. Hornischer, S. Bruchmann, J. Düvel, and S. Häussler.** 2015. Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLoS Pathog.* **11**:e1004744.
- [217] **Schuster, M., A. C. Hawkins, C. S. Harwood, and E. P. Greenberg.** 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **51**:973-985.
- [218] **Seed, P. C., L. Passador, and B. H. Iglewski.** 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* **177**:654-659.
- [219] **Siegmund, I., and F. Wagner.** 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas aeruginosa* species during growth on mineral agar. *Biotechnol. Tech.* **5**:265-268.
- [220] **Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, and U. Römling.** 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* **53**:1123-1134.
- [221] **Smith, K. D., S. V. Lipchock, T. D. Ames, J. Wang, R. R. Breaker, and S. A. Strobel.** 2009. Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**:1218-1223.
- [222] **Spreitler, F., C. Brock, A. Pelzmann, O. Meyer, and J. Köhler.** 2010. Interaction of CO dehydrogenase with the cytoplasmic membrane monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *ChemBiochem.* **11**:2419-2423.
- [223] **Stamler, J. S., D. J. Singel, and J. Loscalzo.** 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* **258**:1898-1902.
- [224] **Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff.** 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**:159-271.
- [225] **Stano, M., and L. Klucar.** 2011. phiGENOME: An integrative navigation throughout bacteriophage genomes. *Genomics.* **98**:376-380.
- [226] **Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:187-209.
- [227] **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406**:959-964.
- [228] **Sudarsan, N., E. R. Lee, Z. Weinberg, R. H. Moy, J. N. Kim, K. H. Link, and R. R. Breaker.** 2008. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science.* **321**:411-413.
- [229] **Sutherland, E. W., and T. W. Rall.** 1957. The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles ATP, Mg⁺⁺, and epinephrine or glucagon. *J. Am. Chem. Soc.* **79**:3608.

- [230] **Takeyama, K., Y. Kunishima, M. Matsukawa, S. Takahashi, T. Hirose, I. Kobayashi, and T. Tsukamoto.** 2002. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine of patients with urinary tract infection. *J. Infect. Chemother.* **8**:59-63.
- [231] **Tamayo, R., J. T. Pratt, and A. Camilli.** 2007. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:131-148.
- [232] **Tamayo, R., A. D. Tischler, and A. Camilli.** 2005. The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **280**:33324-33330.
- [233] **Tart, A. H., M. J. Blanks, and D. J. Wozniak.** 2006. The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J. Bacteriol.* **188**:6483-6489.
- [234] **Taylor, B. L., and D. E. Koshland.** 1974. Reversal of flagellar rotation in monotrichous and peritrichous bacteria: generation of changes in direction. *J. Bacteriol.* **119**:640-642.
- [235] **Tchigvintsev, A., X. Xu, A. Singer, C. Chang, G. Brown, M. Proudfoot, H. Cui, R. Flick, W. F. Anderson, A. Joachimiak, M. Y. Galperin, A. Savchenko, and A. F. Yakunin.** 2010. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J. Mol. Biol.* **402**:524-538.
- [236] **Thermo Fisher Scientific.** NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual unter: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>
- [237] **Tischler, A. D., and A. Camilli.** 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **53**:857-869.
- [238] **Toder, D. S., M. J. Gambello, and B. H. Iglewski.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Mol. Microbiol.* **5**:2003-2010.
- [239] **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:4350-4354.
- [240] **Trampari, E., C. E. Stevenson, R. H. Little, T. Wilhelm, D. M. Lawson, and J. G. Malone.** 2015. Bacterial rotary export ATPases are allosterically regulated by the nucleotide second messenger cyclic-di-GMP. *J. Biol. Chem.* **290**:24470-24483.
- [241] **Valentini, M., and A. Filloux.** 2016. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *J. Biol. Chem.* **291**:12547-12555.
- [242] **Veyel, D., F. Sommer, L. S. Muranaka, M. Rütgers, S. D. Lemaire, and M. Schroda.** 2014. *In vitro* characterization of bacterial and chloroplast Hsp70 systems reveals an evolutionary optimization of the co-chaperones for their Hsp70 partner. *Biochem. J.* **460**:13-24.
- [243] **Vieira J., and J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19**:259-268.
- [244] **Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks, and B. H. Iglewski.** 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* **185**:2080-2095.

- [245] **Wang, Y., I. D. Hay, Z. U. Rehman, and B. H. Rehm.** 2015. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**:7253-7265.
- [246] **Waters, C. M., and B. L. Bassler.** 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:319-346.
- [247] **Waters, C. M., W. Lu, J. D. Rabinowitz, and B. L. Bassler.** 2008. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *J. Bacteriol.* **190**:2527-2536.
- [248] **Weinberg, Z., J. E. Barrick, Z. Yao, A. Roth, J. N. Kim, J. Gore, J. X. Wang, E. R. Lee, K. F. Block, N. Sudarsan, S. Neph, M. Tompa, W. L. Ruzzo, and R. R. Breaker.** 2007. Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic. Acids. Res.* **35**:4809-4819.
- [249] **Whiteley, M., M. R. Parsek, and E. P. Greenberg.** 2000. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**:4356-4360.
- [250] **Williams, P., and M. Cámara.** 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:182-191.
- [251] **Winsor, G. L., E. J. Griffiths, R. Lo, B. K. Dhillon, J. A. Shay, and F. S. Brinkman.** 2016. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic. Acids. Res.* **44**(D1):D646-53.
- [252] **Winzer, K., C. Falconer, N. C. Garber, S. P. Diggle, M. Cámara, and P. Williams.** 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* **182**:6401-6411.
- [253] **Woodman, M. E.** 2008. Direct PCR of intact bacteria (colony PCR). *Curr. Protoc. Microbiol.* **9**:A.3D.1-A.3D.6.
- [254] **Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, and Z. J. Chen.** 2013. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science.* **339**:826-330.
- [255] **Zhu, B., C. Liu, S. Liu, H. Cong, Y. Chen, L. Gu, and L. Z. Ma.** 2016. Membrane association of SadC enhances its diguanylate cyclase activity to control exopolysaccharides synthesis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **18**:3440-3452.
- [256] **Zumft, W. G.** 1993. The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch. Microbiol.* **160**:253-264.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen bedanken. Ich danke ihr dafür, dass sie stets bereit war sich meiner Fragen und Probleme anzunehmen und jederzeit offen für fachliche Diskussionen war.

Bei Prof. Dr. Matthias Hahn bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Johannes Herrmann für die Bereiterklärung den Vorsitz der Promotionskommission zu übernehmen.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Urs Jenal von der Universität Basel sowie dem verschiedenen Dr. Alexander Böhm für die Bereitstellung von *E. coli*-Stämmen.

Zudem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Volkhart Kaefer von der Medizinischen Hochschule Hannover für die Zusammenarbeit bezüglich der massenspektrometrischen Analyse von Metaboliten. Ebenso danke ich Dr. Frederik Sommer von der TU Kaiserslautern für die Durchführung der ESI-LC-MS-Analyse. Großer Dank gilt zudem Christine Förster-Schorr für die technische Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei den „Pseudomonaden“ Julia, Susanne, Katrin, Selma und Kevin für die tolle Diskussionsrunde und die interessanten Denkanstöße bedanken.

Vielen Dank an die alten FKBler Marco, Natascha und Kerstin für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Meinen Laborkollegen Eric, Christina, Anne, Bin, Tanja und Lo danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt und an mich geglaubt hat. Vielen Dank Mama, Papa, Oma und Käthe! Meinen Freunden danke ich für ihren Beistand und ihr Verständnis während der Doktorarbeit. Herzlichen Dank richte ich letztlich an meinen Freund Benni für seine fortwährende Geduld und Unterstützung in allen Belangen.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name Martina Rüger

AUSBILDUNG

Seit 06/2015	Technische Universität Kaiserslautern Doktorandin in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie von Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel
10/2012 - 03/2015	Karlsruher Institut für Technologie Master of Science in Biologie
10/2009 - 09/2012	Karlsruher Institut für Technologie Bachelor of Science in Biologie mit Auszeichnung
09/1999 - 06/2008	St.-Ursula-Schule Würzburg Allgemeine Hochschulreife

PUBLIKATIONEN

Bedrunka, P., F. Olbrisch, M. Rüger, S. Zehner, and N. Frankenberg-Dinkel. 2018. Nitric oxide controls c-di-GMP turnover in *Dinoroseobacter shibae*. *Microbiology*. **164**:1405-1415.

Neidig, A., A. T. Yeung, T. Rosay, B. Tettmann, N. Stempel, M. Rueger, O. Lesouhaitier, and J. Overhage. 2013. TypA is involved in virulence, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* **13**:177.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind ausnahmslos als solche kenntlich gemacht. Die Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie der TU Kaiserslautern ist mir in der derzeit gültigen Fassung bekannt. Die Ergebnisse anderer Mitarbeiter sowie anderer Autoren wurden klar gekennzeichnet. Die Dissertation oder Teile daraus wurden in keinem anderem Fachbereich oder keiner anderen Fakultät als Prüfungsarbeit eingereicht. Ich habe zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Universität ein Promotionsverfahren beantragt.

Kaiserslautern, den 14.05.2019

Martina Rüger