Praktikumsskript Eberl

Inhaltsverzeichnis

1 Reportergene

- 1.1 Bakterielle Biolumineszenz
- 1.2 Das grün fluoreszierende Protein GFP
- 1.3 Das *LacZ* System

2 Stickstoffregulation in Bakterien

3 Zell-Zell-Kommunikation

4 Konjugativer Plasmidtransfer

5 Versuchsbeschreibung

- 5.1 AHL Detektion mittels „cross-streaking“ und Dünnschichtchromatographie
- 5.2 Visualisierung des konjugativen Plasmidtransfer mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins GFP und Identifizierung der Transkonjuganten
- 5.3 Untersuchungen zur Sticksoffregulation mit Hilfe des *lux*-Reportersystems

6 Nähr- und Testmedien

7 Sicherheit

8 Literaturverzeichnis

1 Reportergene

Die Vielfalt der zur Zellsynthese und Zellvermehrung notwendigen Stoffwechselprozesse erfordert ihre bestmögliche Koordination. Jeder Stoffwechselweg erfordert in der Regel mehrere enzymatische Reaktionen. Die Stoffwechselwege haben die Erzeugung nutzbarer Energie, die Synthese von Zellbausteinen und Makromolekülen sowie die Vermehrung der Zelle zum Ergebnis. Das erfolgreiche Bestehen im Konkurrenzkampf der Organismen untereinander hat zu einer Entwicklung von Mechanismen geführt, die einerseits die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen ermöglichen und andererseits den Fluss der Metabolite durch die Stoffwechselwege optimal aufeinander abstimmen. Die Regulation des Zellstoffwechsels erfolgt auf zwei Ebenen: durch Veränderung der Enzymaktivität (die hier nicht näher behandelt werden soll) oder durch Steuerung der Enzymbildung.

Viele Bakterien vermögen auf einer grossen Zahl von verschiedenen Nährstoffen zu wachsen und eine Vielzahl von Substanzen zu synthetisieren. Dies setzt natürlich voraus, dass die dazu benötigten Strukturgene im Genom der Organismen vorhanden sind. Je nach vorherrschenden Umweltbedingungen aktiviert bzw. inaktiviert die Bakterienzelle bestimmte Stoffwechselwege, wobei in der Regel die Bildung mehrerer zu einem Stoffwechselweg gehörenden Enzyme gemeinsam reguliert wird. Ist z.B. nur ein Substrat in der Nährlösung vorhanden, so produziert die Zelle die zum Abbau dieses Substrates (Katabolismus) benötigten Enzyme. Es ist im Sinne der Ökonomie des Zellstoffwechsels, wenn die zur Verwertung eines Nährstoffes benötigten Enzyme nur dann gebildet werden, wenn der betreffende Nährstoff auch tatsächlich vorhanden ist. Zumeist wird die Bildung der benötigten Enzyme induziert, man spricht auch von induzierenden Substraten und induzierenden Enzymen. Ein klassisches Beispiel stellt die Induktion der β-Galactosidase in *Escherichia coli* dar (siehe dazu: Brock, 10. Auflage, Kapitel 8.5). Im Gegensatz dazu ist die Bildung anabolischer Enzyme, die für die Biosynthese von Zellsubstanzen und anderen Bausteinen verantwortlich sind, zumeist durch Repression reguliert. Bei der Repression führt das Vorhandensein oder die Anhäufung bestimmter Substanzen, oft das Endprodukt eines Syntheseweges, zur Verminderung der Syntheserate aller an der Synthese beteiligten Enzyme. Unter dem Aspekt der Stoffwechselökonomie sollten die Enzyme einer Biosynthesekette nicht gebildet werden, wenn das betreffende Endprodukt in der Nährlösung vorliegt (als Beispiel ist hier die Synthese von Aminosäuren, z.B. Arginin, zu nennen (Brock, 10. Auflage, Kapitel 8.5).

Die Regulation der Bildung von Proteinen kann auf zwei Ebenen erfolgen: transkriptionell, d.h. durch Modulation der Promotoraktivität (Induktion, Repression, Sigmafaktoren, etc.) oder post-transkriptionell, d.h. durch eine Veränderung der zellulären mRNA Konzentrationen (mRNA Stabilität, anti-sense RNA) oder der Translationseffizienz der mRNA (Sekundärstruktur der mRNA, „small regulatory“ RNAs).

Oft ist es schwierig die Expression eines Gens direkt nachzuweisen, z.B. wenn das Genprodukt schwer nachweisbar ist oder keine bekannte Funktion hat. Zwar ist es möglich, die Promotoraktivität eines Gens zu bestimmen indem die Menge an vorhandener mRNA in der Zelle bestimmt wird, jedoch ist diese Analysemethode relativ schwierig durchzuführen, zeitintensiv, oft insensitiv und von post-transkriptionellen Einflüssen überlagert. Deshalb werden häufig transiente Versuchssysteme mit chimären Genen (Reportergene) benutzt. Das chimäre Gen besteht gewöhnlich aus den regulatorischen Sequenzen (Promotor), deren Aktivität man untersuchen möchte, und einem Reportergen, das leicht nachzuweisen ist. Die relative Menge des Reporterproteins, das unter den verschiedenen Bedingungen gebildet wird, reflektiert dabei die Promotoraktivität. Chimäre Gene können aber auch so konstruiert werden, dass das zu untersuchende Gen „in frame" mit dem Reportergen fusioniert wird, wodurch ein Fusionsprotein gebildet wird. Damit sind auch Untersuchungen zur post-transkriptionellen Genregulation möglich. Ein gutes Reportersystem sollte sensitiv sowie einfach und schnell zu analysieren sein und es sollte die Physiologie der Zelle nicht beeinflussen. Entscheidend für die Qualität eines Reportersystems ist ein niedriges Detektionslimit, ein möglichst grosser dynamischer Messbereich und eine einfache Handhabung (Lewis *et al.,* 1998).

Zu den klassischen Reportergenen in der Molekularbiologie gehört beispielsweise die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) aus *E. coli*, welche die Acetylierung von Chloramphenicol katalysiert. Eine Detektion des Reportersignals wird durch die Verwendung von ^{14}C- oder fluoreszenzmarkierten Substraten ermöglicht. Weitere Reporterenzyme, wie die alkalische Phosphatase (*phoA*), die *β*-Galaktosidase (*lacZ*) und die *β*-Glukuronidase (*gus*) sind in der Lage, verschiedene Substrate mit hohen Raten umzusetzen, wobei leicht nachzuweisende Signale erzeugt werden (Lewis *et al.,* 1998). Eine Sonderstellung unter den Reportergenen nehmen die Luziferasen ein. Luziferasen katalysieren intrazelluläre Oxidationsreaktionen, welche die Emission von Licht zur Folge hat, ein Phänomen, das als Biolumineszenz bekannt ist. Zwar benötigen Luziferasen spezielle Substrate (so genannte Luziferine), jedoch können diese extern zugegeben werden. Im Falle bakterieller Luziferasen wird zumeist n-Decanal als Substrat verwendet, welches extrem flüchtig ist und praktisch problemlos organische Materialien durchdringt (Meighen, 1991). Schwierigkeiten bezüglich der Substratverfügbarkeit fallen daher bei den bakterielle Luziferasen (LuxAB) weg, wodurch diese Enzyme als Reporter für online Untersuchungen in komplexen Habitaten besonders gut geeignet sind. Nachdem bioluminezente Bakterien weder in terrestischer Umgebung (mit einer Ausnahme: *Photorhabdus luminescens* der symbiotisch in einem entomopathogenen Nematoden lebt) noch im Süsswasser vorkommen, eignen sich Luziferasen besonders gut für *in situ* Analysen von Bakterien in ihrer natürlichen Umgebung. Unter Verwendung der bakteriellen *luxAB* Gene konnten beispielsweise

Reporterstämme konstruiert werden, die auf Stickstoff- oder Phosphatlimitation mit der Emission von Licht reagieren oder es erlauben, den Abbau von Naphtalin in Echtzeit zu verfolgen. Auch konnten entsprechende Stämme erfolgreich dafür eingesetzt werden, Quecksilber und andere Schwermetalle in komplexen Ökosystemen quantitativ nachzuweisen (für einen Review siehe Stewart and Williams, 1992). Durch die Entwicklung höchst sensitiver Kamerasysteme ist es auch möglich geworden, die räumliche Lage biolumineszenter Bakterien in komplexen Biosystemen sichtbar zu machen, und in günstigen Fällen sogar Licht von bakteriellen Einzelzellen zu detektierem. Da jedoch die Biolumineszenz intrinsisch an einen intakten Zellmetabolismus gekoppelt ist, können nur metabolisch aktive Zellen untersucht werden, was die Möglichkeiten eines Einsatzes dieses Reporters einschränkt.

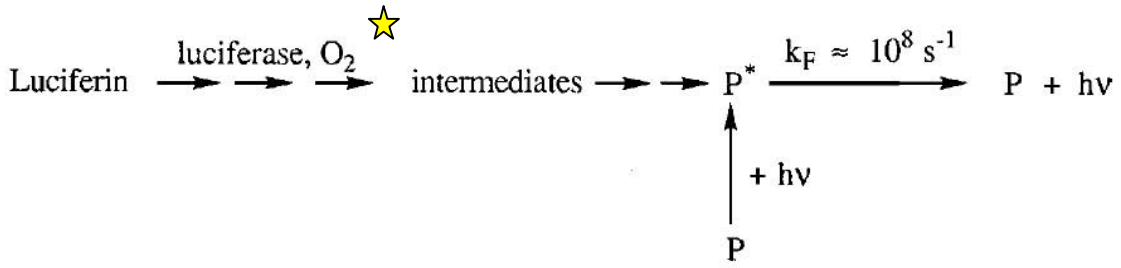
Mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) steht ein vollständig neuer Reporter zur Erfassung der metabolischen Aktivität einzelner bakterieller Zellen zur Verfügung (Chalfie *et al.*, 1994). Da die Detektion von GFP nur einer Bestrahlung mit blauem Licht bedarf, ist dieses Reportersystem vollkommen unabhängig von exogenen Substraten oder Cofaktoren. Zudem ist das Protein extrem stabil und kann auch nach einer Zellfixierung nachgewiesen werden, wodurch es möglich ist, die Detektion von GFP mit der Technik der *in situ* Hybridisierung zu kombinieren.

1.1 Bakterielle Biolumineszenz

Die Biolumineszenz, auch als „Living Light“ beschrieben, gehört wohl zu den faszinierendsten Erscheinungen in der Mikrobiologie. Enzyme, die als Luziferasen bezeichnet werden, sind dabei für die Lichtemission verantwortlich. Mittlerweile wurden über dreissig verschiedene, voneinander unabhängige Systeme beschrieben und man geht davon aus, dass Biolumineszenz im Laufe der Evolution mehrfach entstanden ist. Beispielsweise weisen Luziferasen von Leuchtkäfern, Hohltieren und Bakterien keinerlei Ähnlichkeiten auf, und auch die natürlichen Substrate (Luziferine) dieser Enzyme unterscheiden sich chemisch erheblich (Wilson *et al.,* 1998).

Biolumineszente Bakterien wurden überwiegend in marinen Habitaten beschrieben, wo sie symbiontisch, saprophytisch, parasitisch oder auch freilebend vorkommen. Mittlerweile wurde der genetische und biochemische Hintergrund der bakteriellen Biolumineszenz detailliert aufgeklärt (Meighen, 1994). Die bakterielle Luziferase ist ein heterodimeres Enzym, das aus zwei nicht identischen Untereinheiten α und β, die von den Genen *luxA* und *luxB* kodiert werden, besteht. Die Gene *luxC*, *luxD* und *luxE*, die zusammen mit *luxI*, *luxA* und *luxB* ein Operon bilden, kodieren für Proteine, welche für die Synthese von Tetradecansäuren, die für die Biolumineszenzreaktion als Substrat benötigt werden, aus Bausteinen des Fettsäurebiosyntheseweg verantwortlich sind (Meighen, 1994). In Anwesenheit von molekularem

Sauerstoff werden diese Substrate zusammen mit $FMNH_2$ durch die Luziferase oxidiert. Dabei entsteht ein energetisch angeregtes Zwischenprodukt (4a-Hydroxyflavin), welches beim Übergang auf den energetischen Grundzustand Photonen emittiert (Wilson *et al.,* 1998).



☆ $FMNH_2$ bei bakteriellen bzw. ATP bei eukaryotischen Luziferasen

Abb.1: Biolumineszenzreaktion. Erzeugung eines Moleküls P* in einen elektronisch angeregten Zustand mit sehr kurzer Lebensdauer. Die Reaktionsenergie wird nur einige Nanosekunden gehalten, bevor sie in Form eines Photons freigegeben wird. Siehe Wilson *et al.,* 1998.

Die Expression der Luziferasegene wird von einem Zelldichte-abhängigen Regulationssystem kontrolliert (Meighen, 1994). Die biolumineszenten Bakterien scheiden konstitutiv und in geringen Konzentrationen das Signalmolekül *N*-(3-Oxo-hexanoyl)-Homoserinlacton (3-oxo-C6-HSL) in ihre Umgebung aus.

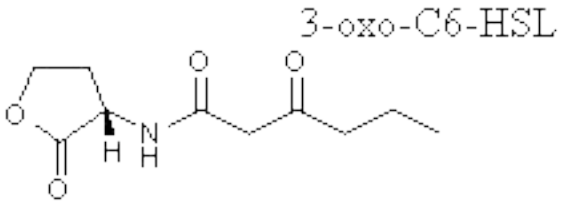


Abb.2: Strukturformel des Signalmoleküls *N*-(3-Oxo-hexanoyl)-Homoserinlacton. Die Länge und Substituierung der Kohlenstoffkette kann bei verschiedenen Bakterienspezies variieren. (von: http://www.nottingham.ac.uk/quorum/AHLs.htm)

Da die bakterielle Zellmembran permeabel für 3-oxo-C6-HSL ist, akkumuliert der Signalstoff im Kulturmedium. Wird nun eine bestimmte Konzentration (welche damit die kritische Zelldichte reflektiert) erreicht, interagiert der Signalstoff mit seinem Rezeptorprotein, LuxR, und aktiviert in weiterer Folge die Expression des *luxICDABE* Operons, das alle für die Biolumineszenz benötigten Gene beinhaltet. Da aber das *luxI* Gen selbst Teil dieses Operons ist, kommt es zu einer positiven Rückkopplung und damit zu einer extrem schnellen Zunahme der Lichtemission. Konsequenterweise ist *V. fischeri* biolumineszent in Leuchtorganen, wo eine hohe Zelldichte vorherrscht, nicht jedoch im umgebenden Meerwasser, wo dieser Organismus in nur geringer Konzentration vorliegt. Dieses Phänomen ist heute als „Quorum sensing" bekannt (siehe Zell-Zell Kommunikation, Punkt 3; Fuqua *et al.,* 1996).

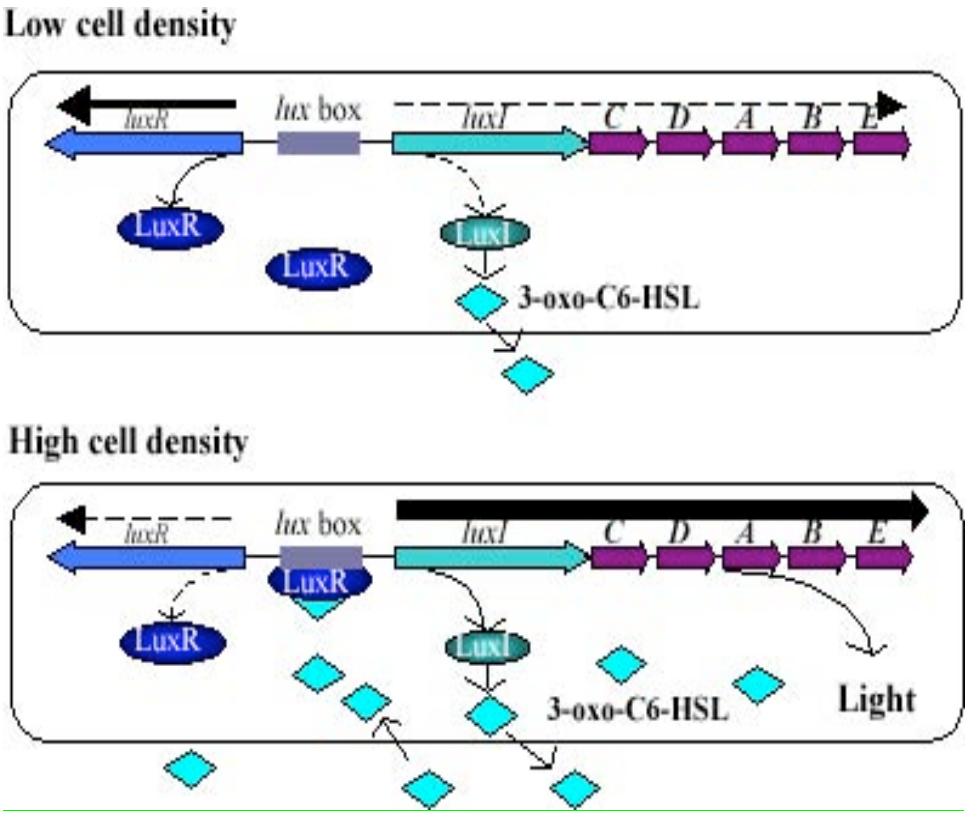


Abb.3: Die Gene des *luxCDABE* Operon werden bei niedriger Zelldichte schwach tranksribiert, weshalb nur geringe Mengen an 3-oxo-C6-HSL produziert werden. Bei hoher Zelldichte akkumuliert 3-oxo-C6-HSL im Kulturüberstand und es erfolgt eine Bindung des Signalmoleküles an den LuxR Rezeptor. Der aus LuxR und 3-oxo-C6-HSL bestehende Komplex bindet daraufhin an eine *lux* box genannte DNA Region und stimuliert die Transkription des *luxICDABE* Operons. Auf diese Weise induziert 3-oxo-C6-HSL nicht nur die Produktion von Licht sondern autoinduziert auch seine eigene Synthese.
(von: http://www.nottingham.ac.uk/quorum/fischeri3.htm)

Als Reporter werden zumeist nur die *luxAB* Gene des *luxICDABE* Operons verwendet. Das für die Lichtreaktion benötigte Substrat (meist n-Decanal) muss dann extern zugegeben werden.

1.2 Das grün fluoreszierende Protein GFP

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde bereits 1962 als Begleitprodukt der Luziferase Aequorin der Qualle *Aequoria victoria* beschrieben. Erst in neuerer Zeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die von der Luziferase Aequorin stammende blaue Biolumineszenz als Anregungsenergie auf ein Antennenprotein, nämlich GFP, übertragen und als grünes Licht wieder abgestrahlt wird. Dies hat zur Folge, dass die Qualle grün leuchtet, obwohl das von der Luziferase emittierte Licht blau ist. Der eigentliche Durchbruch von GFP als Bioreporter in der Molekularbiologie erfolgte erst, als das GFP-Gen aus *A. victoria* kloniert und heterolog in anderen Organismen exprimiert werden konnte (Chalfie *et al.*,

1994). Mit GFP steht nun ein vollständig neuer Reporter zur Erfassung der metabolischen Aktivität einzelner bakterieller Zellen zur Verfügung. Da die Detektion von GFP nur einer Bestrahlung mit blauem Licht bedarf, ist dieses Reportersystem vollkommen unabhängig von exogenen Substraten oder Cofaktoren. Einzig zur autokatalytischen Zyklisierung des Chromophorensystem werden geringe Mengen an Sauerstoff benötigt, die praktisch jedoch immer vorhanden sind.

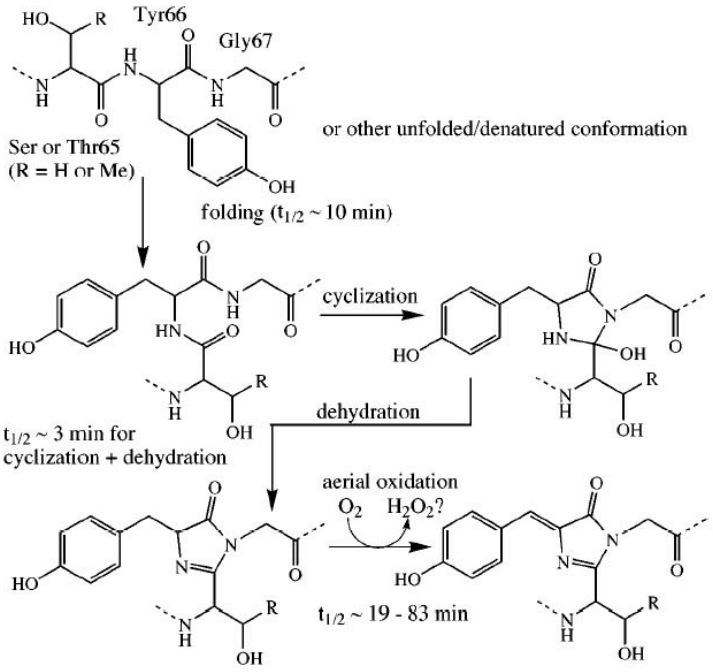


Abb.4: Intramolekulare Biosynthese des GFP Chromophors. (Tsien, 1998)

GFP kann leicht in einem breiten Spektrum von pro- und eukaryotischen Organismen verwendet werden. Wildtyp-GFP absorbiert blaues Licht mit einem Absorptionsmaximum bei 395 nm, das dabei emittierte grüne Licht hat ein Emissionsmaximum bei 509 nm. Heute bedient man sich meist genetisch veränderter GFP-Derivate, besonders dem „red-shifted“ GFP, das veränderte Anregungswellenlängen (480 bis 490 nm) aufweist und ein etwa 20-fach verstärktes Fluoreszenzsignal produziert als das des Wildtyps. Die Möglichkeit, die Expression von GFP in lebenden Organismen in Echtzeit durchzuführen, macht dieses Reportergen zu einer besonders attraktiven Alternative zu anderen Reportersystemen. Die Expression von GFP ist zudem schon auf Einzelzellebene leicht detektierbar, es benötigt ausser Sauerstoff keine zusätzlichen Cofaktoren, ist extrem hitze- und pH-stabil und bleibt sogar nach einer Behandlung mit Detergentien aktiv.

Für Genexpressionsstudien, die den aktuellen Expressionstatus bestimmter Gene wiedergeben sollen, ist diese extreme Stabilität allerdings nachteilig. Für solche Zwecke stehen aber GFP-Derivate mit geringen Halbwertszeiten zur Verfügung.

1.3 Das *LacZ* System

Lactose ist ein Disaccharid, das vor der Einschleusung in die Hexoseabbauwege zunächst mit Hilfe der *β*-Galaktosidase gespalten werden muss (Lactose + H_2O → D-Glucose + D-Galaktose). Seit geraumer Zeit wird das Enzym in der Molekularbiologie als Reportergen verwendet, da einige Substrate von der *β*-Galaktosidase so umgesetzt werden, dass ein Farbstoff entsteht. Das wahrscheinlich am weitesten verbreitete Substrat ist 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-*β*-D-Galactopyranosid, kurz X-Gal genannt, das nach Hydrolyse einen relativ unlöslichen blauen Farbstoff bildet. So lässt sich üblicherweise bei Klonierungen einfach testen, ob die gewünschte DNA in einen Klonierungsvektor, der den *lac*-Promotor und das *lacZ* Gen, welches für die *β*-Galaktosidase kodiert, kloniert wurde: die klonierten DNA-Fragmente zerstören das *lacZ* Gen und verhindern somit die *β*-Galaktosidase Aktivität (farblose statt blaue Klone).

2 Stickstoffregulation in Bakterien

(siehe Brock, 10. Auflage, Kapitel 8.9 und 19.12)

Das Element Stickstoff, N, ist ein Schlüsselbestandteil des Protoplasmas und existiert in mehreren Oxidationszuständen. Im unten gezeigten Redoxkreislauf werden die wichtigen mikrobiellen Stickstofftransformationen Nitrifikation und Denitrifikation (siehe Brock, 10. Auflage, Kapitel 19.12 und 17.14) und andere Stickstoffumwandlungen zusammengefasst. Die mikrobielle Beteiligung am Stickstoffkreislauf ist von großer Bedeutung, weil viele wichtige Redoxreaktionen in der Natur fast ausschließlich von Mikroorganismen ausgeführt werden können. Da N_2 (Stickstoffgas) die stabilste Form von Stickstoff ist, stellt die Atmosphäre der Erde das bedeutendste Stickstoffreservoir (im Gegensatz zum Kohlenstoff). Jedoch ist nur eine kleine Anzahl von Mikroorganismen zur energieaufwendigen Stickstofffixierung ($N_2 + 8\ H^+ + 8\ e^- \rightarrow 2\ NH_3 + H_2$) in der Lage, was erklärt,warum vor allem Ammoniak und Nitrat an der Wiederverwertung von Stickstoff beteiligt sind. Jedoch darf die ökologische Bedeutung der N_2-Fixierung nicht unterschätzt werden, da N_2 das größte Stickstoffreservoir ist, welches Lebewesen zur Verfügung steht.

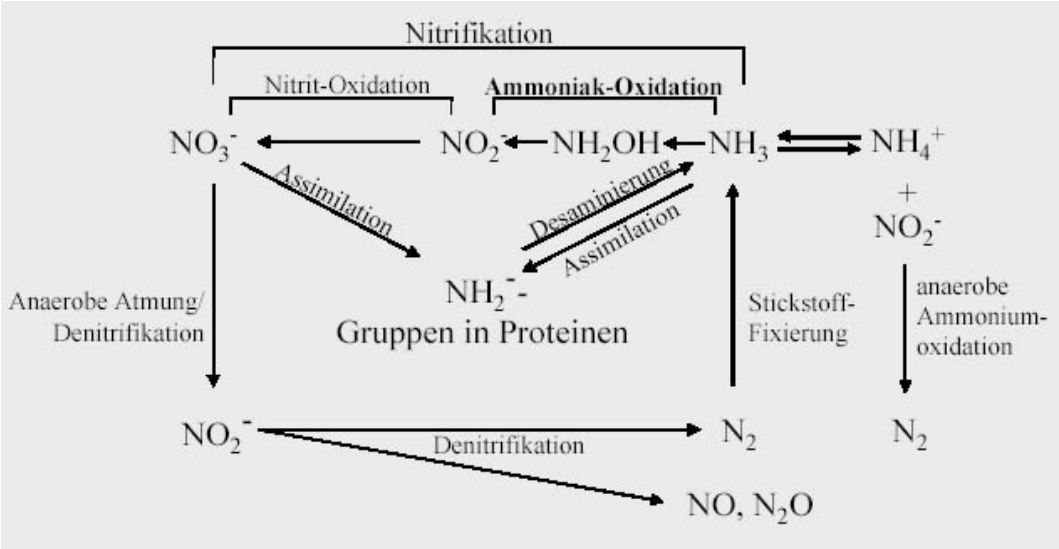


Abb.5: Redoxkreislauf des Stickstoffs (schematisch, modifiziert nach Brock et al., 1997)

Um ihren Stickstoffbedarf zu decken können Bakterien eine Vielzahl stickstoffhaltiger Verbindungen nutzen: so verwerten sie neben einfachen anorganischen Verbindungen wie molekularem Stickstoff, Nitrat oder Harnstoff auch komplexe Stoffklassen wie Aminosäuren oder Nukleoside. Dabei unterteilt man den assimilatorischen Stickstoffmetabolismus in Stoffwechselwege für die Verwertung von extrazellulären alternativen N-Verbindungen und für die Synthese von intrazellulären stickstoffhaltigen Zellbausteinen. In vielen Bakterien unterstehen beide Stoffwechselwege einer strikten Kontrolle durch ein globales Stickstoffregulationssystem (Ntr), welches die koordinierte Expression einer Vielzahl von Genen steuert, die in den Stickstoffmetabolismus involviert sind. Die meisten Bakterien bevorzugen Ammonium (NH_4^+) als N-Quelle, weshalb die Verwertung alternativer N-Verbindungen in der Gegenwart von NH_4^+ reprimiert ist. Erst wenn kein NH_4^+ vorhanden ist, wird die Transkription alternativer Verwertungssysteme aktiviert. In vielen Bakterien (z.B. *Escherichia coli* oder *Pseudomonas putida*) spielt dabei das Regulatorprotein NtrC (auch NRII genannt) eine zentrale Rolle. Liegt nämlich NtrC phosphoryliert in der Zelle vor, kann es an bestimmte Erkennungssequenzen im Promotorbereich von Zielgenen binden und deren Transkription aktivieren. Der Phosphorylierungsgrad von NtrC wird von NtrB (auch NRI genannt) moduliert, einem bifunktionalen Protein mit Kinase- und Phosphatase-Aktivität. Die Phosphataseaktivität von NtrB wiederum wird durch das Regulatorprotein PII stimuliert, dessen Modifikation seinerseits von einem weiteren bifunktionalen Enzym Utase/UR (Uridylyltransferase/Uridyly-removing enzyme) kontrolliert wird, was die De- bzw. Uridylylierung von PII katalysiert. Da Glutamin UR und Ketoglutarat Utase stimuliert, hängt der Uridylylierungszustand von PII von der relativen intrazellulären Konzentration dieser Metaboliten ab, die den Stickstoffstatus der Zelle anzeigen (siehe Abb. 5; Stock *et al*., 1989).

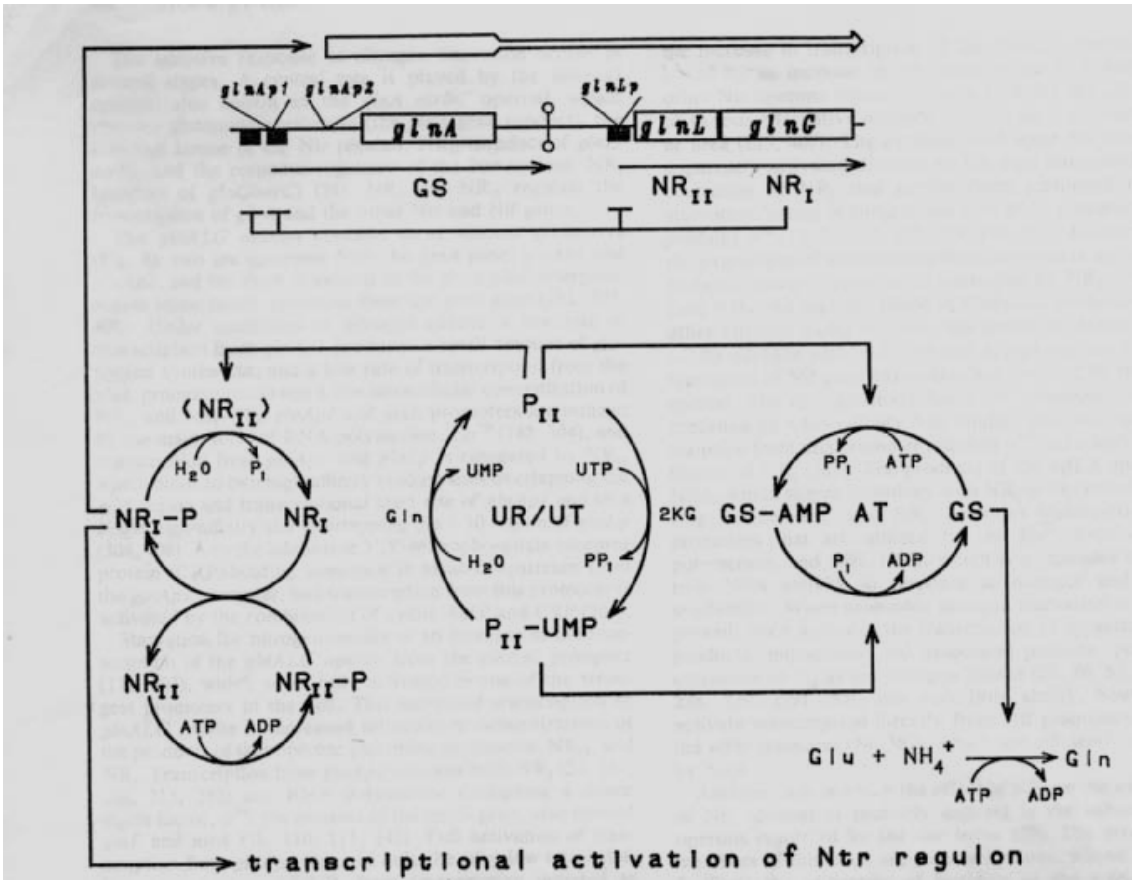


Abb. 6: Stickstoffregulationssystem in *E. coli* und *S. typhimurium*. (aus Stock *et al.,* 1989)

3 Zell-Zell-Kommunikation

Forschungsergebnisse der letzen Jahre haben gezeigt, dass die meisten Bakterien in der Lage sind, die Dichte der eigenen Population mit Hilfe diffiziler Kommunikationssysteme wahrzunehmen. Die Sprache der Bakterien ist zumeist chemischer Natur und basiert auf kleinen diffusionsfähigen Molekülen. Diese bakteriellen Kommunikationssysteme werden unter dem Begriff "Quorum sensing" (QS) zusammengefasst, da sie meist dazu verwendet werden, die Expression gewisser Gene in Abhängigkeit von der Zelldichte zu koordinieren. Es wird davon ausgegangen, dass bestimmte bakterielle Verhaltensweisen nur dann zutage treten, wenn eine entsprechende Anzahl von Bakterien vorliegt. Die kleinste Einheit, die zu koordinierten Aktionen befähigt ist, stellt per Definition das Quorum dar (Fuqua *et al.*, 1994; 1996). Bei den von Gram-negativen Bakterien weitaus am häufigsten eingesetzten Signalmolekülen handelt es sich um eine Gruppe verschiedener *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL), die sich im wesentlichen durch die Länge der *N*-Acyl Seitengruppe (bisher wurden Moleküle mit 4 bis 14 Kohlenstoffatomen beschrieben) sowie durch Modifikationen an der Position C-3 (3-Oxo- oder 3-Hydroxygruppe) unterscheiden.

Viele Jahre wurde angenommen, dass die Produktion von AHL Signalmolekülen auf marine Bakterien der Genera *Vibrio* und *Photobacterium* beschränkt ist, in welchen entsprechende AHL Signalmoleküle die Induktion der Biolumineszenz kontrollieren. Die molekularen Mechanismen der Expression der Biolumineszenzgene sind daher auch besonders intensiv in *Vibrio fischeri*, einem marinen Bakterium, welches symbiotisch in den Leuchtorganen gewisser Fische lebt, untersucht worden (siehe Bakterielle Biolumineszenz). Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Fähigkeit, AHL Signalmoleküle zu produzieren, unter den Gram-negativen Bakterien weit verbreitet ist und bislang für mehr als 70 Bakterienarten zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (Fuqua *et al.*, 1994; Eberl, 1999). QS-Systeme sind an der Regulation einer Vielzahl sehr verschiedener Funktionen beteiligt: der Synthese von Antibiotika, Pigmentstoffen und Poly-3-hydroxybutyrat, der Ausbildung von Biofilmen und Flocken, verschiedener bakterieller Bewegungsformen (nämlich Schwimm-, Schwärm- und ‘twitching’-Motilität), der Überlebensfähigkeit unter Nährstoffmangel, dem konjugativen Plasmidtransfer von Ti Plasmiden und der Produktion von extrazellulären hydrolytischen Enzymen und Virulenzfaktoren.

In humanpathogenen Bakterien wird die Produktion von Virulenzfaktoren oft durch QS-Systeme reguliert. Eine Unterbrechung der Kommunikationssysteme stellt somit ein attraktives Target für die Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe dar. Dieser Therapieansatz zielt nicht darauf ab, das Wachstum der Bakterien zu inhibieren, sondern vielmehr die Ausprägung von pathogenen Merkmalen zu verhindern, weshalb die Hoffnung besteht, dass es nicht zur Ausbildung bakterieller Resistenzen kommt. Ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung stellt daher die Suche nach natürlich vorkommenden QS-Blockern, die keine toxischen Nebeneffekte aufweisen, dar. Tatsächlich konnten in einigen Lebensmitteln, Gewürzen und traditionellen Heilpflanzen hochwirksame Substanzen nachgewiesen werden, die in der Lage sind, Infektionen mit *P. aeruginosa* im Tiermodell effektiv zu bekämpfen.

4 Konjugativer Plasmidtransfer

(Siehe Brock, 10. Auflage, Kapitel 10.9)

Der Begriff der Konjugation wurde 1946 von Lederberg und Tatum beschrieben, nach ihm können zwei mutierte Bakterienstämme durch direkten Zell-Kontakt DNA transferieren. Der konjugative DNA-Transfer ist ein natürlicher Prozess, bei dem Erbinformationen von einem Bakterium auf ein anderes übertragen wird. Beim konjugativen Plasmidtranfer handelt es sich um einen von Plasmiden (seltener Transposons) vermittelten Transfer von genetischem Material von einem Donor (welcher das Plasmid trägt) in einen Rezipienten bei Zellkontakt. Die Plasmide kodieren für Proteine, die für die Herstellung des Zellkontakts und den spezifischen DNA-Metabolismus für den Transfer notwendig sind (konjugative Plasmide). Transferiert werden in der Regel nur diese Plasmide selbst.

Für den Mechanismus der DNA-Übertragung während der Konjugation ist DNA-Synthese notwendig und die experimentellen Befunde zeigen, dass einer der DNA-Stränge von der Spenderzelle (Donorzelle) stammt, während der andere im Empfänger während des Übertragungsvorgangs neu synthetisiert wird. Das Modell in gewissen Bakteriophagen, rolling circle-Replikation genannt (siehe dazu Brock, 10.Auflage, Kapitel 9, Abb. 9.20), erklärt am besten die DNA-Übertragung während der Konjuagtion. Abbildung 7 stellt einen möglichen Mechanismus des Vorgangs dar. Die Reihe an Ereignissen wird wahrscheinlich durch direkten Zellkontakt ausgelöst, wobei ein Strang der Plamid-DNA gebrochen und ein parentaler Strang übertragen wird. Das Strangbruch verursachende Protein hat auch Helikaseaktivität und ist so am Entwinden des zu transferierenden Stranges beteiligt. Im selben Maße, wie DNA übertragen wird, findet sowohl in der Spender- wie auch in der Empfängerzelle über den rolling-circle Mechanismus DNA-Synthese statt.

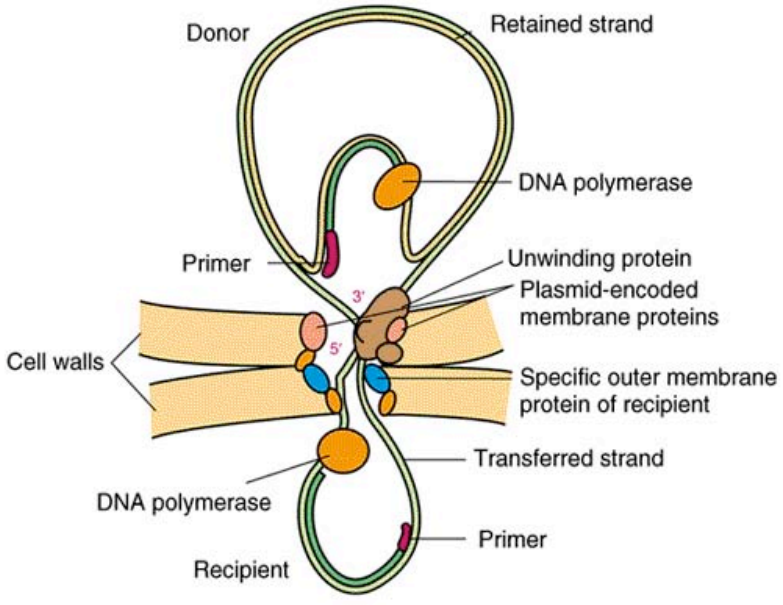


Abb.7: Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation. Details des Replikations- und Übertragungsvorgangs.

Im Praktikum soll der Transfer eines Plasmids via Konjugation gezeigt werden. Zwei unterschiedliche Mutantenstämme können gekreuzt werden, vorausgesetzt, einer der beiden Stämme besitzt Donoreigenschaften. Der Gentransfer in der Kreuzung kann nachgewiesen werden, indem der Marker (das Antibiotikum) zur Selektion für den Genaustausch vom Donor zum Rezipienten (Km^R) und ein Marker (zB Rif^R) zur Gegenselektion (Ausschaltung des Donors) verwendet werden.

Selektion: Km, Rif

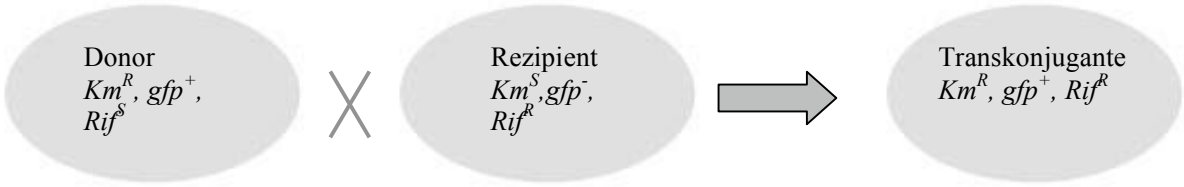


Abb.8: Konjugativer Plasmidtransfer, Selektion mit Hilfe von bestimmten Antibiotika.

5 Versuchsbeschreibung

Die folgende Zeittafel zeigt, welche Stämme im jeweiligen Versuch von den einzelnen Gruppen bearbeitet werden sollen. Die Gruppeneinteilung findet vor Praktikumsbeginn statt. Im Anschluß werden die einzelnen Versuche beschrieben.

Zeittafel

Tag	Versuch	Gruppe	Zu bearbeitende Stämme
1			
	5.1.1 cross-streak		
		1	*P. putida* IsoF & *Serratia* MG1 Sensor: *Chromobact*. & *Agrobact.*
		2	*Serratia* MG1 (Wildtyp & Mutante) Sensor: *Chromobact*. & *Agrobact.*
		3	*Burkholderia* R18194 (Wildtyp & Mutante) Sensor: *Chromobact*. & *Agrobact.*
		4	*P. putida* IsoF (Wildtyp & Mutante) Sensor: *Chromobact*. & *Agrobact.*
	5.1.2 DC	1	Standards und Extrakte: *P. putida* IsoF & *Serratia* MG1; Sensor: *Chromob.*
		2	Standards und Extrakte: *Serratia* MG1 & *Burkholderia* R18194 Sensor: *Chromob.*
		3	Standards und Extrakte: *P. putida* IsoF & *Serratia* MG1 Sensor: *Agrobac.*
		4	Standards und Extrakte: *Burkholderia* R18194 & *P. putida* IsoF Sensor: *Agrobac.*
	5.2 Konj. Transfer	1	Donor & Rhizobium + Donor als Kontrolle
		2	Donor & Acinetobacter + Donor als Kontrolle
		3	Donor & Serratia + Donor als Kontrolle
		4	Donor & Rhizobium + Donor als Kontrolle
2			
	5.3 N-Regulation		
		1	WV *P.putida* N25 mit NH_4^+
		2	WV *P.putida* N25 ohne N
		3	WV *P.putida* N25 mit Nitrit
		4	WV *P.putida* N25 mit Alanin
		alle	Auswertung der Versuche 5.1 – 5.3

5.1 AHL Detektion mittels „cross-streaking" und Dünnschichtchromatographie (Versuchausführung 1. Woche → Auswertung in der 2. Woche)

Für die spezifische und sensitive Detektion von Signalstoffen wie AHL-Molekülen stehen uns verschiedene Monitorplasmide zur Verfügung. Ihnen ist gemeinsam, dass ein Promotor, der durch diese AHL-Moleküle aktivierbar ist, vor ein Reportergen (zB. *lacZ*) kloniert ist, so dass sie auf die Zugabe von externen AHLs mit der Expression des Reportergens reagieren.

In Anwesenheit von AHL-Molekülen exprimiert der AHL-Biosensor *Agrobacterium tumefaciens* A136(pCF218)(pCF372) die von *lacZ* kodierte *β*-Galaktosidase. Diese kann das im Agar enthaltene X-Gal hydrolysieren, wodurch es zur Bildung eines blauen Farbstoffes kommt. In *Chromobacterium violaceum* wird die Produktion des violetten Pigments Violacein in Abhängigkeit von der Zelldichte reguliert. Im Praktikum wird die Mutante *C. violaceum* CV026 verwendet, die eine Mutation in dem *luxI* homologen Gen *cviI* besitzt und nur bei externer AHL Zugabe zur Pigmentproduktion fähig ist.

5. 1.1 Die „Cross-streaking" Methode

Materialien

- Flüssigkulturen der zu untersuchenden Stämme *Pseudomonas putida*, *Serratia liquefaciens* MG1, *Burkholderia cepacia* R18194
- Flüssigkulturen der Sensorstämmen *A. tumefaciens* und *C. violaceum*
- LB Agarplatten, LB Agarplatten mit X-Gal

Durchführung

- Die zu testenden Stämme werden auf einer LB-Agarplatte gegen den jeweiligen Sensorstamm ausgestrichen, ohne ihn direkt zu berühren.
- Eine Aktivierung des Sensors durch durch den Agar diffundierende AHL-Moleküle wird durch Blau- bzw. Violettfärbung nach Inkubation über Nacht bei 30°C angezeigt.

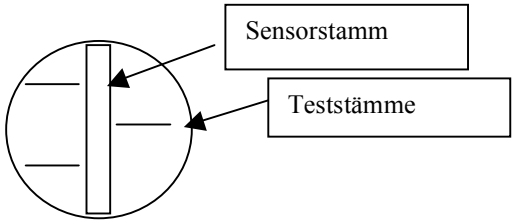


Abb. 9: Cross-streaking.

Vorsicht: niemals mehr als drei Teststämme pro Platte!

Stämme nie direkt gegenüber ausstreichen!

5.1.2 Nachweis von Acylhomoserinlactonen (AHLs) mittels Dünnschicht-chromatographie

Aus Zeitgründen werden vom Betreuer schon vor Praktikumsbeginn AHL-Extrakte aus verschiedenen Stämmen hergestellt:
Pseudomonas putida IsoF, *Serratia liquefaciens* MG1, *Burkholderia pyrrocinia* LMG 21823, *Serratia entomophilia*

Alle folgenden Schritte nur mit geeigneten Schutzhandschuhen durchführen!

Prinzip der Dünnschichtchromatographie
Die Dünnschichtchromatographie stellt ein chromatographisches Verfahren dar, bei dem ein Sorptionsmittel als stationäre Phase, ein Lösungsmittel oder auch Lösungsmittelgemisch („Laufmittel“) als mobile Phase und die Probenmoleküle beteiligt sind. Die stationäre Phase befindet sich bei der beschriebenen Adsorptionschromatographie als dünne Schicht auf einem geeigneten Träger, wie z.B. Glas. Auf dieser Schicht erfolgt die Trennung durch Elution der Probe mit dem Laufmittel (nach Römpp, 1990). Für eine verbesserte Auftrennung hydrophober Substanzen wird die sogenannte Umkehrphasen-Chromatographie verwendet, da hier unpolare Substanzen stärker zurückgehalten werden. Bei dieser Modifikation kommt folglich im Gegensatz zur üblichen Adsorptionschromatographie eine unpolare stationäre Phase zum Einsatz. Die mobile Phase ist dagegen polar. Zur Detektion der extrahierten AHL-Proben werden Umkehrphasen-Dünnschicht-Chromatographie-Platten (RP-18 F254s, 20x20cm, Merck) verwendet.

Durchführung

- Entlang einer Auftragslinie (1,5 cm vom unteren und den beiden Seitenrändern entfernt) im Abstand von 2 cm Extrakte und Standards auftropfen und im kalten Luftstrom trocknen (wichtig: maximal 3 µl auftropfen → kalt föhnen, dann die nächsten 3 µl usw.).
- Standards: BHL, HHL, OHL, OHHL (je 1 µl), Extrakte siehe Zeitplan, je 10 µl auftropfen
- Auftrennung der unterschiedlichen AHL-Moleküle bei Kammersättigung: dazu Seitenwände der Kammer mit Whatmanpapier auskleiden und mit 100 ml Laufmittelmischung (60% Methanol und 40% H_2O_{dest}) bedecken (abgeschlossene Sättigung nach ca. 2 Stunden, zu erkennen an Kondensattropfen am Deckel).
- DC-Platten in die Kammer stellen (Auftragslinie der Proben muss über dem Flüssigkeitsspiegel liegen) und laufen lassen, bis die Lösungsmittelfront ca. 2 cm unter dem oberen Rand entfernt liegt (ca. 3 Stunden).
- Platten aus der Kammer nehmen, exakte Höhe der Lösungsmittelfront markieren und unter kaltem Luftstrom trocknen.

Überschichtung der DC-Platten

- Zur Visualisierung der Position der unterschiedlichen AHL-Moleküle auf der DC-Platte wird diese mit einer dünnen (!) Agarschicht, die zuvor mit Sensorbakterien beimpft worden ist, überlagert.
- Getrocknete DC-Platten in Plexiglasrahmen (zuvor mit Kunststofffolie auslegen!) einsetzen und mit Hilfe der nivellierbaren Unterlage ausbalancieren.
- Dem 42°C warmen Softagar 10 ml einer Sensorkultur zugeben (bei *A. tumefaciens* auch 80 µg/ml X-Gal zugeben!), vorsichtig mischen (möglichst Luftblasen vermeiden) und vorsichtig (vom Rand aus geringer Höhe giessen!) auf der DC-Platte verteilen, so dass ein 3 – 5 mm dicker Film die gesamte Plattenoberfläche bedeckt.
- Nach Verfestigung des Agars (ca. 20 min) Platte aus dem Rahmen nehmen und in ein luftdichtes Gefäss, das mit befeuchtetem Küchenpapier ausgelegt worden ist, bei 30°C inkubieren.

Auswertung der überschichteten DC-Platten

Die Lokalisierung der AHL-Moleküle auf den überschichteten DC-Platten erfolgt je nach verwendetem Sensorsystem auf unterschiedliche Weise:

- Sensorstamm *Chromobacterium violaceum* CV026. Nach einer Inkubation von max. 48 h bei 30°C können die aufgetrennten AHL-Moleküle anhand violetter Pigmentflecken identifiziert werden. Sobald die Indikatorsubstanz ausreichend ausgeprägt ist, werden die überschichteten DC-Platten im Abzug getrocknet und in Plastikfolie verschweisst.
- Sensorstamm: *Agrobacterium tumefaciens* A136(pCF218)(pCF372). Nach einer Inkubation von max. 48 h bei 30°C können die aufgetrennten AHL-Moleküle anhand der *β*-Galaktosidase Aktivität des Sensors als hellblaue Pigmentflecken identifiziert werden.

5.2 Visualisierung des konjugativen Plasmidtransfer mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins GFP und Identifizierung der Transkonjuganten

(Versuchausführung 1. Woche → Auswertung in der 2. Woche)

In diesem Versuch soll der konjugative Transfer des „broad host range" Plasmids RP4 (REF), welches GFP markiert ist (Geisenberger *et al.,* 1999), in verschiedene Bakterien beobachtet werden. Die Transkonjuganten sollen identifiziert werden und die Frequenz der Transkonjugation bestimmt werden.
Um das GFP markierte Plasmid RP4 in die verschiedenen Bakterienstämme einzubringen, wird ein „agar surface mating" durchgeführt. In einem solchen Ansatz werden der Donor, der das zu transferierende Plasmid enthält, und der Rezipient gemischt. Nach Inkubation auf einem Medium, auf dem beide Stämme

wachsen können, wird der Ansatz auf ein Selektivmedium ausplattiert, auf dem i) nur Transkonjuganten und Rezipienten und ii) ausschliesslich Transkonjuganten wachsen können, nicht aber der Donor.

Materialien

- LB-Platten
- Selektiv-Platten mit entsprechendem Antibiotikum (Rifampicilin bzw. Nalidixinsäure für Rezipienten + Transkonjuganten und Rifampicilin bzw. Nalidixinsäure plus Kanamycin für ausschliessliches Wachstum von Transkonjuganten)
- 0,9 % NaCl, steril

Durchführung

- Übernacht-Kulturen von
  - Donor: *Pseudomonas putida* KT2440 (RP4::*gfp*)
  - Rezipienten: *Rhizobium* 38-2 Nal^R (190), *Acinetobacter johnsonii* Rif^R (278), *Serratia liquefaciens* MG1 Nal^R (230)
- Je 2 ml Flüssigkultur ernten (6000 rpm, 5 min) und das Pellet in 1 ml LB-Medium resuspendieren
- Wie oben zentrifugieren und in je 500 µl LB-Medium resuspendieren
- Je 100 µl Donor und Rezipient mischen und 10 min bei RT stehen lassen
- Danach in 50 µl Tropfen auf vorgewärmte und getrocknete LB-Platten pipettieren
- **Kontrolle:** Donor ohne Rezipient
- Die Platten ein bis zwei Stunden bei 30°C inkubieren
- Tropfen mit sterilem Drygalski-Spatel abkratzen und in 1 ml 0,9% NaCl pro Platte resuspendieren
- Verdünnungsreihe (siehe Abb. unten) mit steriler NaCl herstellen, $c = 10^{-1} – 10^{-6}$
- Pro Rezipient drei Platten mit je 100 µl verschiedener Verdünnungen ($10^{-5} – 10^{-7}$) der Suspension auf folgenden Selektivplatten ausplattieren:

  - A. Wachstum der Transkonjuganten und Rezipienten (nicht aber Donor):
    - *Acinetobacter johnsonii*: Rifampicin (50µg/ml)
    - *Serratia liquefaciens* MG1: Nalidixinsäure (50µg/ml)
    - *Rhizobium* 38-2: Nalidixinsäure (50µg/ml)

  - B. Wachstum von ausschliesslich Transkonjuganten (nicht aber Donor und Rezipienten):
    - *A. johnsonii*: Rifampicin (50µg/ml) plus Kanamycin (50µg/ml)
    - *S. liquefaciens*: Nalidixinsäure (50µg/ml) plus Kanamycin (50µg/ml)
    - *Rhizobium*: Nalidixinsäure (50µg/ml) plus Kanamycin (50µg/ml)

- Die Platten über Nacht bei 37°C inkubieren und anschließend bei 4°C lagern
- In der 2. Praktikumswoche kann die Frequenz der Konjugation (Transkonjugant/ Rezipient) bestimmt werden, in dem die Kolonien auf den entsprechenden Selektivplatten gezählt werden
- Zudem sollen Kolonien unter Tageslicht (Anzahl der Rezipienten) und Blaulicht (GFP Expression → Anzahl der Transkonjuganten) gezählt werden

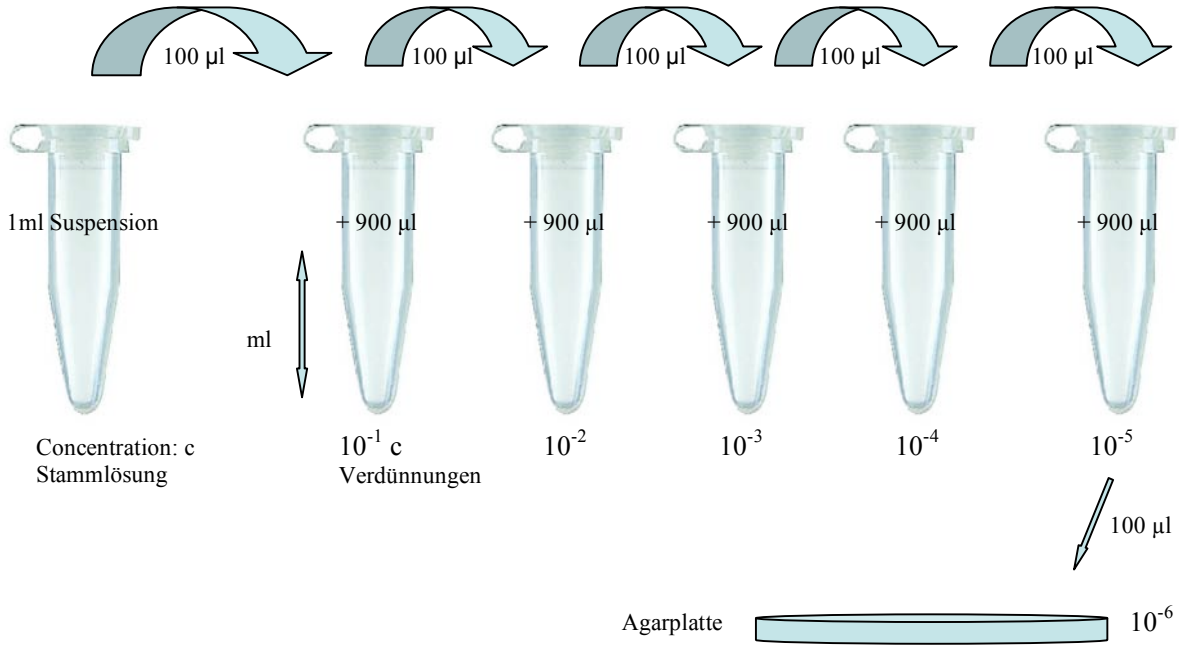


Abb.10: Verdünnungsreihe: 100 µl Probe (Resuspension) in 900 µl sterile NaCl transferieren (entspricht einer Verdünnung von 1:10 bzw 10^{-1}) und gut mischen (Vortex). Aus dieser Konzentration 100 µl entnehmen und wieder mit 900 µl steriler NaCl mischen. Vorgang einige Male wiederholen. Nach Erstellen der Verdünnungsreihe können die gewünschten Konzentrationen ausplattiert werden.

5.3 Untersuchungen zur Sticksoffregulation mit Hilfe des *lux*-Reportersystems (2.Woche)

Für viele Bakterien ist Ammonium die bevorzugte Stickstoffquelle. Da dies aber in natürlichen Habitaten oft nur in geringer Konzentration vorhanden ist, haben die meisten Bakterien (zB *Pseudomonas putida* KT2442) die Fähigkeit, viele verschiedene Stickstoffquellen zu nutzen. Unter Ammonium limitierten Bedingungen erhöht sich die Synthese der am Stickstoffkatabolismus beteiligten Proteine dramatisch. Im Praktikum wird die Mutante N25 von *P. putida* KT2442 verwendet, die eine transkriptionelle *luxAB* Insertion im Gen für die assimilatorische Nitratreduktase (*nasB*) aufweist. Die Expression der assimilatorischen Nitratreduktase kann so anhand der Stärke der Biolumineszenz verfolgt werden.

Im Praktikum sollen die Mutante *P. putida* N25 auf Medien mit verschiedenen, definierten N-Quellen (NH_4^+, NO_2^-, Urea, und Alanin je 5mM) bzw. unter Stickstofflimitation angezogen werden. Während der

Wachstumsversuche sollen Proben zu verschiedenen Zeitpunkten genommen und die Zellzahl anhand der OD_{600} (Photometer) sowie die Biolumineszenz (Luminometer) vermessen werden.

Materialien

- Kölbchen mit Flüssigkulturen von *P. putida* N25 und verschiedenen N-Bedingungen
- n-Dekanal

Durchführung

- 100 ml ABC-Kölbchen (ohne NH_4^+) mit verschiedenen N-quellen vorbereiten
- Kölbchen so mit einer Übernachtkultur beimpfen, dass der Versuch mit einer OD_{600} von 0,1 beginnen kann
- Jede Stunde die OD_{600} bestimmen und je 200 µl Probe entnehmen (genaue OD notieren)
- Je 200 µl Probe mit 1 µl n-Dekanal mischen und die Lumineszenz im Luminometer (Turner TD-20e, Tuner Designs, Calif.) messen und notieren
- Die Lichtemission wird über 10 Sekunden integriert und als relative Lumineszenz Einheiten (RLU) wiedergegeben
- Im Protokoll sollen die RLU über die Zeit und das Wachstum folgend wiedergegeben werden (vgl. Eberl *et al.,* 1999):

- Abb.11: Induktion der Biolumineszenz in der Mutante N25 bei N-Mangel.

6 Nähr- und Testmedien

Für die Herstellung aller Lösungen und Medien wird destilliertes Wasser (H_2O_{dest}) verwendet. Alle Nährmedien werden zwanzig Minuten bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert. Den Festmedien wird vor dem Autoklavieren 18 g Agar pro Liter Flüssigkeit zugegeben. Temperaturempfindliche Hemmstoffe und Zusätze werden nach dem Abkühlen der Medien auf 50 °C (Festmedien) oder vor der Inokulation (Flüssigmedien) zugesetzt.

6.1 LB-Medium (Luria-Bertani)

(modifiziert nach Bertani, 1951)

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	4 g
H_2O_{dest}	ad 1000 ml pH 7,4

6.2 ABC-Medium / ABG-Medium

(Clark und Maaløe, 1967)

A-10

$(NH_4)_2SO_4$	20 g
Na_2HPO_4	60 g
KH_2PO_4	30 g
NaCl	30 g
H_2O_{dest}	ad 1000 ml

B

1 M $MgCl_2$ x 6 H_2O	2 ml
0,5 M $CaCl_2$ x 2 H_2O	0,2 ml
0,01 M $FeCl_3$ x 6 H_2O	0,3 ml
H_2O_{dest}	ad 900 ml

C

1 M Natriumcitrat x 2 H_2O	10 ml/l

Die einzelnen Bestandteile werden getrennt autoklaviert; zu 900 ml B-Komponente 100 ml A-10 und 10 ml Citrat geben und mischen. Bei Untersuchungen zur Stickstoffregulation NH_4^+ in Komponente A weglassen.

6.3 Softagar

Caseinhydrolysat	1,5 g
Hefeextrakt	0,75 g
NaCl	0,75 g
Agar	1 g
H_2O_{dest}	ad 150 ml

7 Sicherheit

Notruf 144

7.1 Allgemeines

- In erster Linie sollen die Grundregeln mikrobiologischer Technik eingehalten werden, insbesondere:
- **Kein Essen, Trinken, Schminken oder Rauchen im Labor**!
- Steril Arbeiten, Bakterien nicht unnötig verbreiten, kontaminierte Gegenstände desinifizieren oder sterilisieren
- Nach allen „Erntevorgängen" Zentrifuge und Rotor anschliessend gründlich desinfizieren und säubern
- Bildung von Aerosolen vermeiden, Sauberkeit am Arbeitsplatz und im Labor (am Ende jedes Arbeitstages alle Flächen mit 70% Ethanol gründlich desinfizieren)
- Bei allen Arbeiten sind **Schutzkittel** zu tragen (bei Spritzgefahr auch Schutzbrille), bei Bedarf (Umgang mit Gefahrenstoffen) auch Handschuhe
- Schutzkleidung nicht ausserhalb der Arbeitsräume tragen (Labormantel muss im Labor verbleiben und nach Praktikum gewaschen werden)
- Verwendete Glaspipetten in Desinfektionslösung geben
- Feste, kontaminierte Abfälle in speziell gekennzeichnete Abfallbehälter geben
- Flüssige, kontaminierte Abfälle in speziell gekennzeichnete, verschliessbare Behälter
- **Nach dem Arbeiten bzw. vor jedem Verlassen des Praktikumsraumes Hände gründlich waschen und desinfizieren!!!**
- Bei Verschütten von Bakterienkultur: sofort kontaminierten Bereich sperren und Betreuer benachrichtigen
- Türen und Fenster geschlossen halten

Zutritt zum Labor haben nur Personen, die vom Betreuer oder von ihm autorisierte Dritte hierzu ermächtigt werden!

7.2 Lagerung und Entsorgung

- Alle Gefässe ausreichend beschriften (Datum, Name des Studenten, Gruppe, Stamm)
- Die Entsorgung von kontaminierten Geräten, Flüssigkeiten und Abfall erfolgt durch den Betreuer

7. 3 Massnahmen bei Stör- und Notfällen

- Bei Verschütten von Kulturen: Flächendesinfektion mit 70% Ethanol, Benachrichtigung des Betreuers und Warnung der Mitarbeiter
- Bei Hautkontakt: Desinfektion mit 70% Ethanol, Betreuer verständigen
- Bei Augenkontakt: Augendusche, Betreuer verständigen
- Bei Verschlucken: rasch möglichst viel Wasser trinken, kein Erbrechen auslösen, Notarzt rufen, Betreuer verständigen
- Bei Einatmen: Betroffenen an frische Luft bringen, Notarzt! Betreuer verständigen
- Bei Verletzungen, Verbrennungen und aussergewöhnliche Vorkommnissen: sofort Betreuer verständigen

7.4 Ansprechpartner

Prof. Dr. Leo Eberl (Institut für Pflanzenbiolgie, Abteilung Mikrobiologie, P3-40)

Julia Wopperer (Institut für Pflanzenbiolgie, Abteilung Mikrobiologie, P3-40)

8 Literaturverzeichnis

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994) Greenfluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* **263**: 802-805.
reductase luxAB transcriptional fusion.

Eberl, L. (1999) N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst. App.l Microbiol.* **22**:493-506.

Eberl, L., Ammendola A., Rothballer M.H., Givskov M., Sternberg C., Kilstrup M., Schleifer K.H., Molin S. (1999) Inactivation of *gltB* abolishes expression of the assimilatory nitrate reductase gene (*nasB*) in *Pseudomonas putida* KT2442. *J. Bacteriol.* **182**:3368-76.

Fuqua, C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 727-751.

Geisenberger, O., Ammendola, A., Christensen, B.B., Molin, S., Schleifer, K.H., Eberl, L. (1999) Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated ludge and in situ identification of the transconjugants. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**: 9-17.

Lewis, J.C., Feltus, A., Ensor, C.M., Ramanathan, S., Daunert, S. (1998) Applications of reporter genes. Anal. Chem. 70: 579A-585A.

Meighen, E.A. (1994) Genetics of bacterial luminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol*. **7**: 1016-1022.

Stewart, G.S., Williams, P. (1992) Lux genes and the applications of bacterial bioluminescence. *J. Gen. Microbiol.* **138:** 1289-300.

Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-490.

Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 509-544.

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