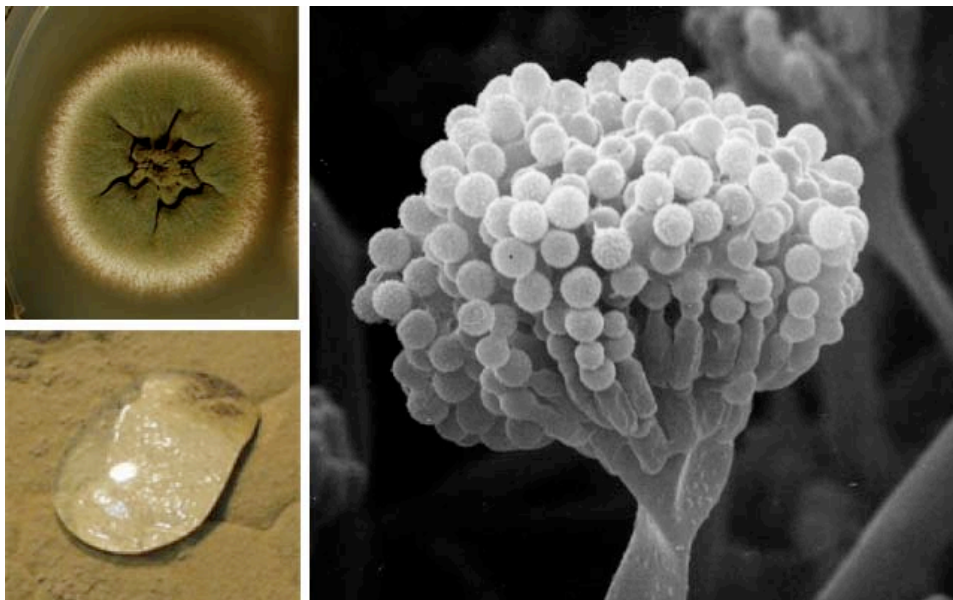


Abschlussbericht zum BMBF-Projekt 03G0723

<i>Zuwendungsempfänger</i> KIT, Campus Süd (früher: Universität Karlsruhe)	<i>Förderkennzeichen</i> 03G0723A
<i>Verbundprojekt</i> HYDROPHOBINE – Hydrophobine zur Funktionalisierung von mineralischen Oberflächen zur Prävention von mikrobiellem Biofilmwachstum	
<i>Vorhabensbezeichnungen</i> <ul style="list-style-type: none">- Herstellung von Hydrophobin- und Hydrophobinderivatproduzierenden <i>E. coli</i> Stämmen; Hydrophobin-Aufreinigung im Pilotmaßstab (KIT Campus Süd)- Bakterielle Populationsanalysen und Transkriptomanalysen – Biofilmwachstum auf Hydrophobin-beschichteten Materialien (KIT Campus Nord)- Einsatz von getesteten <i>E. coli</i> Stämmen für die Gewinnung von Hydrophobinen im größeren Maßstab (BASF SE)	
<i>Laufzeit des Vorhabens</i> 01.08.2008 – 31.12.2011	<i>Berichtszeitraum</i> 01.08.2008 – 31.12.2011



Links oben: Kolonie von *Aspergillus nidulans*, links unten: Wasser perlt von der hydrophoben Kolonie ab. Rechts: Conidiophor mit Sporen. Die Sporen sind mit dem Hydrophobinprotein beschichtet und machen die Oberfläche hydrophob.

1. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

Die Arbeiten im Berichtszeitraum erfolgten in den Teilbereichen:

- Charakterisierung der Pilzpopulation in Biofilmen (1.1)
- Charakterisierung der Bakterien in verschiedenen Habitaten (1.2)
- Modifikation von Hydrophobin mit antimikrobiellen Peptiden (1.3)

1.1 Charakterisierung der Pilzpopulation in Biofilmen

Mikrobielle Biofilme stellen eine spezielle, sehr erfolgreiche Lebensform von Bakterien und Pilzen, aber auch Algen und Protozoen, dar. Die Mikroorganismen profitieren in dieser symbiotischen Organisationsform vom Austausch von Stoffwechselprodukten, von genetischer Flexibilität und vom Schutz, den ein Biofilm im Vergleich zum planktonischen Wachstum bietet. Besonderes Charakteristikum aller Biofilme ist neben der festen Anheftung an einem Ort, ihr weitgehend strukturierter Aufbau (Costerton *et al.* 1999; Costerton *et al.* 2001). Die Etablierung eines bakteriellen Biofilms auf einer Oberfläche verläuft in mehreren Schritten (Abbildung 1).

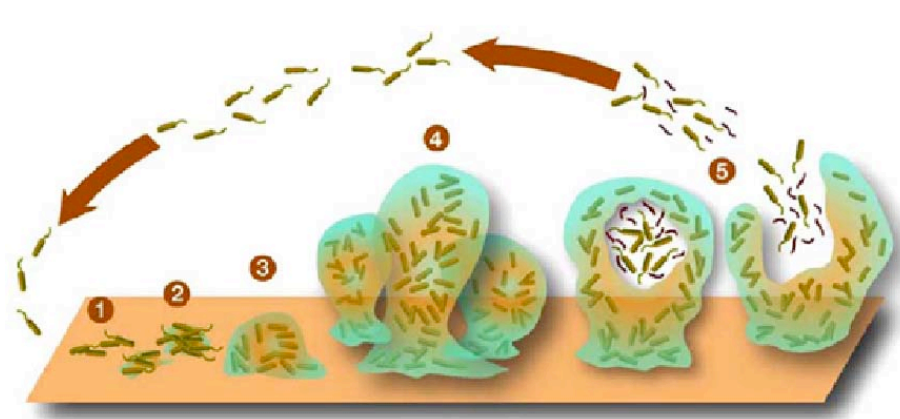


Abbildung 1: Die Entwicklung eines Biofilms verläuft in mehreren Schritten. 1 primäre reversible Adhäsion, verschiedene Zellen besiedeln die Oberfläche 2 irreversible Adhäsion – Start des Biofilmwachstums und Ausbildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), 3 & 4 Biofilmwachstum und Reifung, 5 Freisetzung von Einzelzellen aus dem Biofilm Quelle: Montana State University Center for Biofilm Engineering

Der erste Schritt, die primäre Adhäsion der Mikroorganismen, beim Übergang aus dem planktonischen zum sessilen Wachstum, ist reversibel. Erst durch die anschließende Ausbildung einer extrazellulären Matrix, der beginnenden Teilung und dem Wachstum der Mikroorganismen kommt es zu einer irreversiblen Anheftung. Der Biofilm beginnt zu reifen und eine drei-dimensionale Struktur wird ausgebildet. Aus einem reifen Biofilm werden einzelne Zellen freigesetzt, die erneut an der Oberfläche adhären. Der Zyklus der Biofilmentwicklung beginnt von vorne.

Bakterien und Pilze können auf den unterschiedlichsten natürlichen und synthetischen Oberflächen Biofilme etablieren, d.h. Biofilme entstehen ubiquitär und sind in der Natur und auch in technischen Systemen sehr weit verbreitet. Eine Möglichkeit das Biofilmwachstum zu manipulieren und dadurch gezielt zu steuern, ist die Veränderung der Oberflächeneigenschaften der Materialien z.B. durch Hydrophobine.

Zur Untersuchung des Einflusses der Beschichtung auf die Biofilmbildung wurden im Berichtszeitraum die Pilze im Biofilm molekular identifiziert und mikroskopisch untersucht.

1.1.1 Untersuchung von nativen Biofilmen

Zur direkten Analyse der Pilzpopulation in den verschiedenen Biofilmen wurde ein molekularbiologischer Ansatz gewählt, indem eine Klonbibliothek erstellt wurde. Eine Klonbibliothek ist eine Genbank, die DNA-Sequenzen (Klone) und Informationen dazu enthält. Durch das Erstellen einer Klonbibliothek können auch Pilze erfasst werden, die nicht kultivierbar sind. Außerdem können Aussagen über die relative Häufigkeit einzelner Pilze im Biofilm getroffen werden.

Es wurden Klonbibliotheken von nativen Biofilmen der Kläranlage Karlsruhe-Neureut erstellt. Die Biofilme wurden zu verschiedenen Jahreszeiten aus der Kläranlage an zwei verschiedenen Stellen entnommen, wobei bei der letzten Probenahme im Herbst nur eine Klonbibliothek von der ersten Probenahmestelle vorliegt, da der Ort der zweiten Probenahmestelle zu dieser Zeit umgebaut wurde. Die erste Probenahmestelle befindet sich direkt hinter dem Grobrechen, also noch in der mechanischen Reinigungsstufe und die Zweite direkt nach der biologischen Reinigung, wo das Abwasser nicht mehr so viele Nährstoffe enthält, da diese hier von den Bakterien abgebaut werden (Bodenschatz, W. (1997). Desinfektion 3. Behr's Verlag: Hamburg. 28.2). Des Weiteren wurde auch eine Klonbibliothek von einem mit einem Biofilm bewachsenen Objektträger erstellt, der in Zulauf-Abwasser für vier Wochen inkubiert wurde.

Zum Vergleich des Mikrobioms des Kläranlagen-Biofilms mit anderen Habitaten, wurde an fünf weiteren Stellen Biofilme gesammelt und Probekästen ausgehängt. Die Biofilme für die Klonbibliothek wurden direkt in dem entsprechenden Habitat geerntet. Untersucht wurden Biofilme vom Ablauf der Kläranlage Karlsruhe/Neureut, der in die Alb eingeleitet wird, Biofilme der Alb selbst (langsam fließendes Gewässer), einem Baggersee in Leopoldshafen bei Karlsruhe, dem Rhein bei Karlsruhe und einem Gartenteich. Die Biofilme wurden mit sterilen Zellschabern geerntet, in 50 ml Reagenzgefäße transportiert und anschließend direkt die DNA mittels Innu SPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Jena) isoliert. Es lag somit ein Gemisch an DNA von dem im Biofilm vorkommenden Organismen vor. Anschließend wurde eine PCR mit den ITS1/ITS4 Primer durchgeführt. Diese Primer sind spezifisch für die ITS-Region von Eukaryoten, so dass nur diese amplifiziert werden. Die ITS-Region ist am besten für die Identifizierung von Pilzen geeignet, da sie einen höheren Grad an Variabilität als andere genetische Regionen der rDNA besitzt. Es entstanden je nach Biofilm 2-3 verschieden große Fragmente, da die ITS-Regionen der unterschiedlichen Reiche der Eukaryoten verschieden groß sind. Von jedem Fragment wurde eine Klonbibliothek erstellt. Die PCR-Produkte mit der ITS-Region von verschiedenen Organismen wurde in *Escherichia coli* kloniert, um die einzelnen Kolonien mit Hilfe einer M13/T7 colony PCR und dem Restriktionsenzym *MspI* zu überprüfen. Die Proben, die ein unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen, wurden sequenziert. Des Weiteren wurden Objektträger in entsprechenden Halteboxen in die Gewässer für zwei Monate ausgehängt und anschließend mikroskopisch analysiert.

Die aus den Biofilmen isolierten Pilze und Einzeller sind in Tabelle 1 aufgelistet. Als Kläranlage 1 wurden die Biofilme von der ersten Probestelle direkt nach dem Grobrechen benannt, Kläranlage 2 bezeichnet die zweite Probestelle nach der biologischen Reinigung. Zulauf-Biofilm bedeutet, dass ein Objektträger für einen Monat in einer Glasbox mit Zulauf-Abwasser inkubiert wurde, bis ein Biofilm auf der Oberfläche entstanden war. Anschließend wurde die DNA isoliert und eine Klonbibliothek erstellt.

Tabelle 1: Identifizierte Pilze und Einzeller aus Biofilmen. Zur Isolierung der Pilze wurde eine Klonbibliothek mit den ITS-PCR Produkten in *E. coli* erstellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte mittels Sequenzierung mit dem Primern M13/T7 und anschließender Auswertung mit dem Onlinetool BLAST. Kläranlage 1 und 2 bezeichnen die zwei verschiedenen Probenahmestellen in der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Kläranlage 1 steht für die erste Probenahmestelle direkt hinter dem Grobrechen und Kläranlage 2 für die Entnahmestelle direkt hinter der biologischen Reinigungsstufe. Zulauf-Biofilm beschreibt einen Biofilm der durch Inkubation in Zulauf-Abwasser auf Objektträgern in einem Monat entstanden ist.

Spezies	Ordnung	Jahreszeit	Quelle
<i>Achlya sp.</i>	Saprolegniales	Winter	Kläranlage 1
<i>Anguillospora longissima</i>		Winter	See
uncultured Blastocladiomycota		Frühling	Kläranlage 2
<i>Candida boidinii</i>	Saccharomycetales		Zulauf-Biofilm
<i>Candida pelliculosa</i>	Saccharomycetales	Winter	Kläranlage 1
<i>Candida tropicalis</i>	Saccharomycetales	Winter, Frühling	Kläranlage 1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Capnodiales	Winter	See
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Saccharomycetales	Frühling	Kläranlage 1
<i>Geotrichum (Galactomyces sp.)</i>	sp. Saccharomycetales	Frühling, Herbst	Kläranlage 1
<i>Fusarium merismoides var. merismoides</i>	Hypocreales	Herbst	Kläranlage 1
<i>Nectria lugdunensis</i>	Hypocreales	Winter	See
<i>Mortierella sp.</i>	Mortierellales	Winter	Kläranlage 1
<i>Mucor racemosus</i>	Mucorales		Zulauf-Biofilm
<i>Penicillium commune</i>	Eurotiales		Zulauf-Biofilm
<i>Pichia anomala</i>	Saccharomycetales	Winter	Kläranlage 1
<i>Phoma herbarum</i>		Winter	See
<i>Phythium sp.</i>	Pythiales	Winter	Kläranlage 1
<i>Protoventuria alpina</i>	Helotiales	Sommer	Kläranlage 1
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	Chaetothyriales	Frühling	Kläranlage 1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Sporidiobolales	Frühling	Kläranlage 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	Frühling	Kläranlage 1
<i>Sporobolomyces lactosus</i>	Erythrobasidiales	Herbst	Kläranlage 1

<i>Sporobolomyces symmetricus</i>	Erythrobasidiales	Frühling	Kläranlage 1
uncultured Tremellomycetes		Winter	Kläranlage 1
<i>Trichosporon sp.</i>	Tremellales	Winter, Frühling	Kläranlage 1
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Tremellales	Winter	Kläranlage 1
<i>Trichosporon domesticum</i>	Tremellales	Sommer	Kläranlage 1
<i>Trichosporon montevideense</i>	Tremellales	Winter	Kläranlage 1
<i>Cyclidium glaucoma</i>	Pleuronematida	Frühling	Kläranlage 2
<i>Entamoeba sp.</i>	Entamoebida	Frühling	Kläranlage 1
<i>Oxytricha sp.</i>	Stichotrichida	Frühling	Kläranlage 2
<i>Paramecium tetraurelia</i>	Peniculida	Frühling	Kläranlage 2
<i>Zoothamnium sp.</i>		Winter, Frühling	Kläranlage 1, 2
<i>Zoothamnium plumula</i>		Winter	Kläranlage 1

Die aus dem vom Herbst stammenden Biofilm isolierten Pilze und die von Alb, Ablauf und Rhein, waren alles unbekannte Arten. Zusätzlich zu den in Tabelle 1 aufgeführten Arten wurden 111 Klone sequenziert, die zwar zum Reich der Pilze gehören, jedoch noch nicht beschrieben wurden. Demnach konnte keine eindeutige Bestimmung durchgeführt werden. Des Weiteren kann man sagen, dass die aus der Kläranlage und aus dem See stammenden Pilze am ehesten bestimmbar waren. Wobei bei den Isolaten von der Alb, Rhein und dem Ablauf der Kläranlage die Sequenzen der Klone zuvor noch nicht beschrieben wurden. Man kann jedoch anhand eines erstellten Stammbaumes sagen, dass die meisten der unbekanntesten Arten zur Gattung *Candida* und *Trichosporon* gehören. Diese Pilze sind besonders interessant, da es sich um Pilze handeln könnte, die nur in Biofilmen vorkommen. Diesen Spezies soll in der Folge nachgegangen werden, damit sie besser charakterisiert werden können.

Desweiteren wurden 55 Klone isoliert und sequenziert, deren Sequenz nicht dem Reich der Pilze zuordenbar war und somit von anderen Eukaryoten stammen muss.

Im Vergleich zu den Biofilmen, die direkt aus den jeweiligen Habitaten entnommen wurden, wurden auch die Biofilme vom Ablauf, Zulauf und der Alb auf den Glasoberflächen analysiert. Auch hier wurde von jeder Stelle jeweils eine Klonbibliothek mit den ITS-Primer erstellt. Das Ergebnis der Klonbibliotheken ist in Tabelle 2 aufgeführt. Es wurde nur im Biofilm von der Alb eine schon beschriebene Pilzspezies gefunden, nämlich *Candida tropicalis*. Die anderen Sequenzen waren alles noch nicht beschriebene Pilze, Algen und Einzeller. Die lässt darauf schließen, dass sich filamentöse Pilze und Hefen nicht so schnell an einer neuen Oberfläche ansiedeln können.

1.1.1 Molekulare Identifizierung von Pilzen in ausgereiften, nativen Biofilmen und auf Glasoberflächen im Vergleich

Als *nativ* bezeichnet man einen Biofilm, der in einem natürlichen System vorkommt und nicht nur eine Art von Mikroorganismen enthält. In einem nativen Biofilm kommen Protozoen, Algen, Bakterien und Pilze vor.

Zur direkten Analyse der Pilzpopulation in den verschiedenen Biofilmen wurde ein molekularbiologischer Ansatz gewählt. Es wurde eine Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) durchgeführt

Anhand dieser Methode kann man die möglichen Unterschiede in der Zusammensetzung der Biofilmpopulation feststellen. Zum einen wurde eine DGGE mit Proben von schon vorhandenen ausgereiften Biofilmen aus der Kläranlage (Zulauf und Ablauf) und von der Alb (Fluss bei Karlsruhe) durchgeführt um die Population zwischen den einzelnen Habitaten untereinander zu vergleichen. Im Vergleich dazu wurde eine weitere DGGE von Biofilmen von den gleichen Habitaten, die jedoch auf Glasoberflächen herangezogen wurden, durchgeführt.

Abbildung 2 zeigt das Gel der DGGE mit den vorhandenen ausgereiften Biofilmproben und den auf Glasoberfläche angezogenen im Vergleich. Die nativen Biofilm wurde von der Wand in den Kläranlage an zwei verschiedenen Stellen (Zulauf und Ablauf) und an der Alb von Steinen geerntet und anschließend die DNA isoliert, die dann in die PCR der ITS-Region für die DGGE eingesetzt wurde. Die Proben der Biofilme aus den gleichen Habitaten haben viele ähnliche Banden (siehe Abbildung 2A). Die dominanten Banden wurden ausgeschnitten, in den pJET-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 B dargestellt

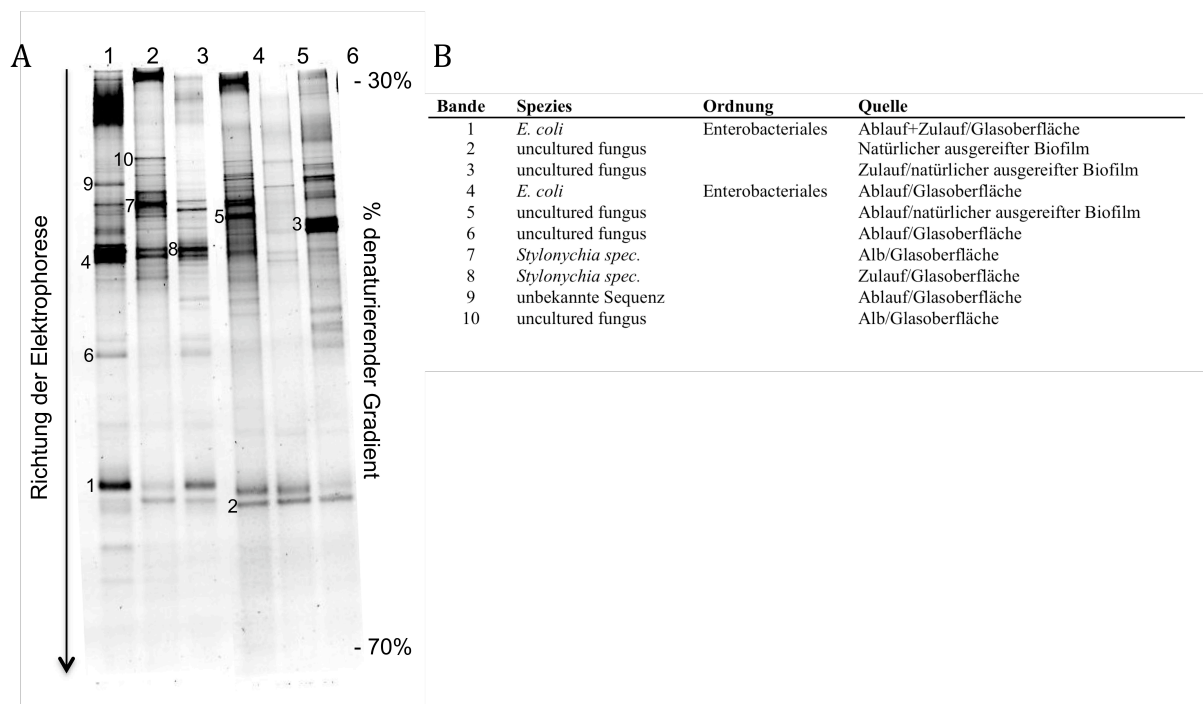


Abbildung 2: A) DGGE von ausgereiften Biofilmen im Vergleich zu auf Glasoberflächen angezogenen Biofilmen. Bahn 1-3 sind Biofilmproben die auf Glasoberflächen in den jeweiligen Habitaten angezogen wurden. 4-6 sind schon ausgereifte Biofilme aus den gleichen Habitaten. Probe 1 und 4 stammen vom Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, Probe 2 und 5 von der Alb in Neureut und Probe 3 und 6 vom Zulauf der Kläranlage. B) Ergebnis der Sequenzierung der dominanten Banden des DGGE-Gels

Wie auch schon das Ergebnis der Klonbibliothek von den verschiedenen Biofilmen zeigte, sind auch hier viele Pilze zu finden, deren Sequenz zuvor noch nicht beschrieben wurde. Das Gel zeigt, dass sowohl im direkten Biofilm, als auch auf den Glasoberflächen eine hohe Artenvielfalt herrscht und auch einige dominante Banden in allen Proben vorkommen.

1.1.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Untersuchung der räumlichen Anordnung des aus dem Zulauf der Kläranlage entstandenen Biofilms, wurde dieser direkt auf den Glasobjektträgern gefärbt. Zuvor wurde die Glasoberfläche noch mit 0,85% NaCl gewaschen, um die am Biofilm nicht anhaftenden Organismen zu entfernen. Hierzu wurde der Fluoreszenz-Farbstoff Calcofluor White verwendet, der an das Chitin und die Cellulose von Eukaryoten bindet. Dazu wurde ein Tropfen 0,1% Calcofluor-White und 15% KOH auf den Biofilm gegeben und anschließend mit 70% Ethanol und dH₂O gewaschen.

Abbildung 6 zeigt ein mit Calcofluor-White gefärbter Objektträger, der vier Wochen lang im Zulauf der Kläranlage ausgebracht war. In der Calcofluor-Aufnahme kann man eine große Pilzhyph erkennen, die durch den Fluoreszenzfarbstoff blau fluoresziert.

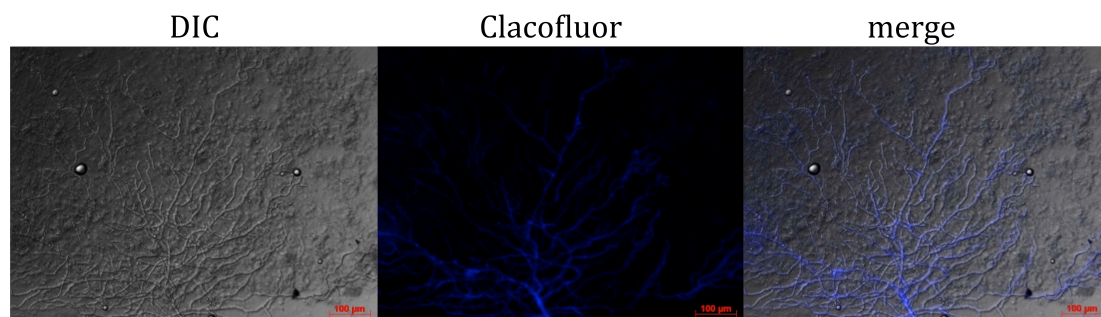


Abbildung 3: Biofilm auf Objektträger gefärbt mit Calcofluor. Der Objektträger wurde vier Wochen lang im Zulauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut inkubiert. Das Calcofluor-Signal wurde mit dem DAPI-Filtersatz betrachtet.

1.1.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Um die räumliche Verteilung der Mikroorganismen innerhalb eines Biofilms zu untersuchen, wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode, können verschiedene Organismengruppen *in situ* im Biofilm auf einem Objektträger sichtbar gemacht werden. Dazu wurden zwei verschiedene Sonden verwendet. EuUni, eine FAM markierte Sonde, die an die 18S rRNA von Eukaryoten bindet und EuB338, markiert mit Cy3, die an die 16S rRNA von Prokaryoten bindet, kamen zum Einsatz. Bei der Durchführung wurde nach BASCHIEN (Baschien *et al.* (2008). In situ detection of freshwater fungi in an alpine stream by new taxon-specific fluorescence in situ hybridisation probes. AEM Oct. 2008, p. 6427-6436) verfahren.

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde mit den im Zulauf und Ablauf der Kläranlage und den in der Alb und Pfalz inkubierten Objektträgern durchgeführt.

Abbildung 12 zeigt Aufnahmen eines Biofilms aus dem Zulauf der Kläranlage Karlsruhe/Neureut. Der Objektträger wurde vier Wochen lang im Zulauf inkubiert und anschließend die FISH mit den für Bakterien und Eukaryoten spezifischen Sonden EuB338

und EuUni durchgeführt. Zu sehen sind Pilzhyphen an die sich Bakterien dicht angelagert haben.

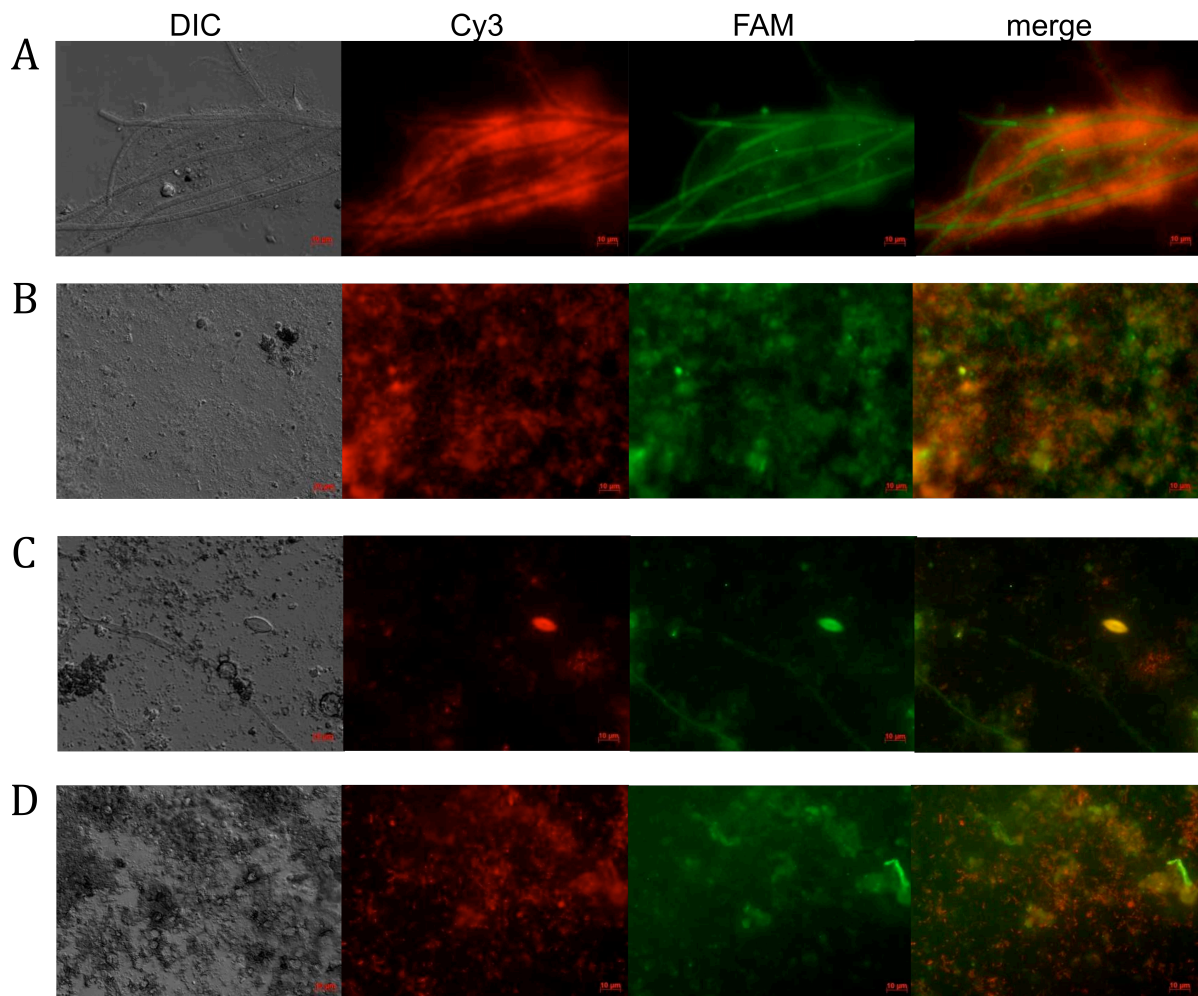


Abbildung 4: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von Biofilmen. Der Objektträger wurde vier Wochen lang in den verschiedenen Habitaten inkubiert und anschließend die FISH mit der für Bakterien spezifischen Sonde EuB338 (in rot dargestellt, Sonde ist an Cy3 gekoppelt) und der für Eukaryoten spezifischen Sonde EuUni (in grün dargestellt, Sonde an FAM gekoppelt) durchgeführt. A) Zulauf B) Ablauf C) Alb D) Pfinz

In Abbildung 13 sind Aufnahmen von einem im Ablauf der Kläranlage bewachsenen Glas-Objektträger zu sehen. Die FISH wurden mit den gleichen Sonden wie zuvor durchgeführt. Im Vergleich zu den Aufnahmen des Biofilms aus dem Zulauf sind hier keine Pilzhyphen zu sehen.

Im Vergleich dazu wurden Biofilme aus natürlichen Systemen mikroskopisch untersucht. Hierfür wurde die Alb, ein Nebenfluss des Rheins, und die Pfinz, ein Zufluss des Rheins, bei Eggenstein-Leopoldshafen ausgewählt. Die Glas-Objektträger wurden wie schon zuvor bei den anderen Probestellen 4 Wochen lang in den Gewässern ausgehängt. Abbildung 14 zeigt die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von einem Objektträger aus der Alb und Abbildung 15 einen aus der Pfinz. Die FISH wurde wie oben beschrieben mit den Sonden EuUni und EuB338 durchgeführt. Auf den Abbildungen kann man erkennen, dass auch Algen im Biofilm vorhanden sind.

1.1.4 *Aspergillus nidulans* im Biofilm

A. nidulans ist ein filamentöser, homothallischer Schimmelpilz, welcher ubiquitär im Boden verbreitet ist. Er gehört zur Klasse der Ascomyceten und ist zur sexuellen, sowie asexuellen Entwicklung fähig (Chutterbuck, A. J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. Genetics 63(2): 317-327).

Wächst ein freilebender Organismus in einem Biofilm, so passt er sich den dortigen Bedingungen an (Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322). Um langfristig zu untersuchen, wie sich ein Pilz an das Leben im Biofilm anpassen kann, wurde *A. nidulans* ausgewählt, da dessen Genom vollständig sequenziert ist und er als Modellorganismus der filamentösen Pilze gilt. Des Weiteren ist sein Genom leicht zugänglich und er ist einfach zu handhaben (Sievers, N., Krüger, M., Fischer R. (1997). Kreuzung von *Aspergillus nidulans*. Biol unserer Zeit: 6). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb überprüft, ob *A. nidulans* in einem Biofilm wachsen kann. Hierfür wurde ein *A. nidulans* Stamm hergestellt, in dem die Zellkerne mit DsRed rot gefärbt sind. Dazu wurde die Kernlokalisierungsdomäne von StuA mit N-terminalem DsRed eintransformiert, um ihn mikroskopisch besser sichtbar zu machen. Um das Biofilmwachstum zu überprüfen, wurde eine Glasbox mit Objektträgern und dem entsprechenden Medium mit ca. 10^5 Sporen dieses Pilzes beimpft. Nach sieben Tagen wurden die Objektträger zuerst mit dH₂O gespült, um alle nicht anhaftenden Organismen zu entfernen und anschließend Fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Jedoch waren nur unausgekeimte Sporen zu erkennen. Weitere drei Monate später konnte auch ein Hyphenwachstum im Biofilm nachgewiesen werden. *A. nidulans* kann somit zwar nachweisbar im Biofilm wachsen, jedoch nur sehr langsam. Deshalb wurden alle weiteren Biofilmuntersuchungen mit Hilfe von *Fusarium oxysporum* durchgeführt, der sich innerhalb weniger Stunden an einer Oberfläche anhaften kann und somit im Biofilm wachsen kann.

In Abbildung 5 kann man erkennen, dass der Pilz im Biofilm auskeimt und kann somit davon ausgehen, dass er sich an der Oberflächen festhaften und vermutlich auch im Biofilm wachsen kann. Der Objektträger wurde zusätzlich mit Calcofluor gefärbt um die Pilze im Biofilm sichtbar zu machen und anschließend bei einer 63-fachen Vergrößerung mikroskopiert.

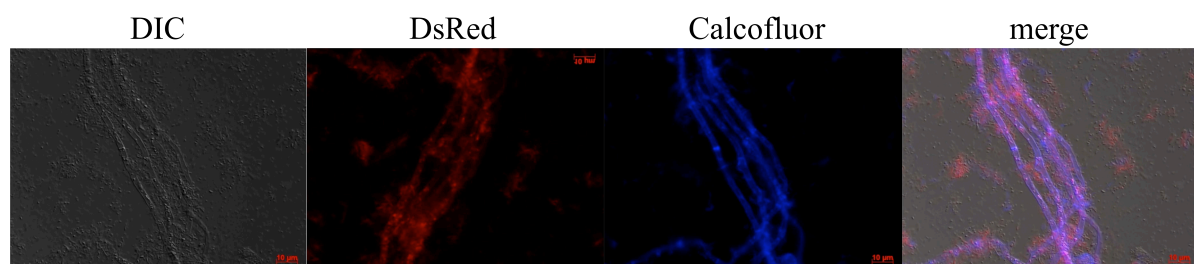


Abbildung 5: *A. nidulans* im Biofilm. In *A. nidulans* wurde die Kernlokalisierungsdomäne von StuA mit N-terminalen DsRed eintransformiert, um ihn mikroskopisch besser zu erkennen. In der Abbildung sind Hyphen von *A. nidulans* zu sehen, die zusätzlich noch mit Calcofluor gefärbt wurden.

1.1.5 *Fusarium oxysporum* im Biofilm

Fusarium oxysporum ist ein filamentöser Schimmelpilz, welcher ein gefürchtetes Pflanzenpathogen darstellt und Fusariosen oder die Fusarium-Welke an verschiedenen Wirtspflanzen auslöst. Er gehört zu der Klasse der Ascomyceten.

Wächst ein freilebender Organismus in einem Biofilm, so passt er sich den dortigen Bedingungen an (Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322). Um langfristig zu

untersuchen, wie sich ein Pilz an das Leben im Biofilm anpassen kann, wurde *F. oxysporum* ausgewählt, da dessen Genom vollständig sequenziert ist und er als Biofilm wachsen kann (Imamura, Y. *et al.* (2008). Fusarium and Candida albicans biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, January 2008, p. 171-182, Vol. 52, No. 1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb überprüft, ob *F. oxysporum* in einem Biofilm wachsen kann und wie er sich verhält. Hierfür wurde ein *F. oxysporum* Stamm hergestellt, in dem die Zellkerne mit GFP grün gefärbt sind. Dazu wurde die Kernlokalisierungsdomäne von StuA mit N-terminalem GFP unter dem natürlichen Promotor *gpd* in den Wildtyp transformiert, um ihn mikroskopisch besser sichtbar zu machen. Zur Selektion der positiven Transformanten wurde zusätzlich eine Hygromycin-Kassette, ebenfalls unter dem natürlichen Promotor *gpd*, eintransformiert. Um das Biofilmwachstum zu überprüfen, wurden Glas-Objektträger mit synthetischem Abwasser mit ca. 10^6 Sporen dieses Pilzes beimpft. Die Proben wurden bei 30°C inkubiert. Das Biofilmwachstum wurde nach 16, 24, 40 und 48 Stunden mikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Objektträger jeweils mit 0,85% NaCl-Lösung gespült, um alle nicht anhaftenden Organismen zu entfernen und anschließend Fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Im Vergleich dazu wurde auch das Biofilmwachstum in Anwesenheit von anderen Mikroorganismen (als Inokulum wurde konzentrierter Ablauf aus der Kläranlage verwendet) mikroskopisch zu den gleichen Zeitpunkten untersucht, wobei diese Proben bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

In Abbildung 6 A und B sind die mikroskopischen Aufnahmen des Biofilmwachstums von *F. oxysporum* von 16 bis 40 Stunden unter verschiedenen Wachstumsbedingungen dargestellt. Das synthetische Abwasser gleicht den Bedingungen in der Kläranlage und im Komplexmedium sind alle Nährstoffe die ein Pilz zum wachsen braucht enthalten. Zwischen den verschiedenen Wachstumsmedien kann man keinen Unterschied erkennen. Bereits nach 40 Stunden ist zu erkennen, dass sich schon größere „Hyphengeflechte“ gebildet haben.

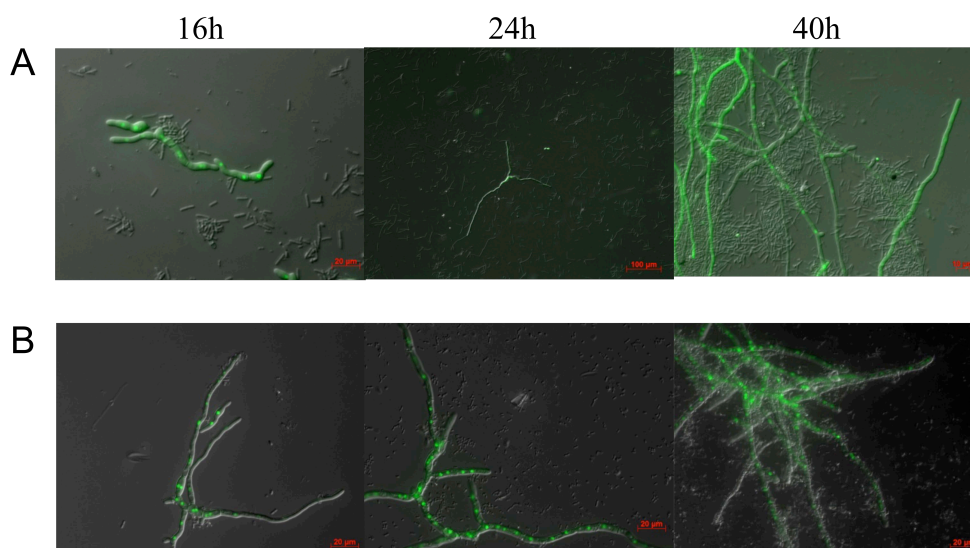


Abbildung 6: **A)** Biofilm mit *F. oxysporum* auf einer Glasoberfläche nach 16, 24 und 40 Stunden. Die Objektträger wurde bei 30°C mit 10^4 Sporen/ μ l und konzentriertem Ablauf Abwasser als Inokulum in synthetischem Abwasser inkubiert. **B)** Biofilm mit *F. oxysporum* auf einer Glasoberfläche nach 16, 24 und 40 Stunden. Die Objektträger wurden bei 30°C mit 10^4 Sporen/ μ l und konzentriertem Ablauf Abwasser als Inokulum in Komplexmedium inkubiert.

Um zu verstehen, welche Gene im Pilz für das Biofilmwachstum von Bedeutung sind, wurden erste Experimente mit Stressgenen von *F. oxysporum* gemacht. In anderen Pilzen wie z. B.

Candida albicans wurde bereits beschrieben, dass Gene für die Stressantwort im Biofilmwachstum vermehrt exprimiert werden (Yeater K. *et al.* (2007). Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology* 153: 2737-2385). Auch in *Escherichia coli* ist schon viel über die Expression der einzelnen Genen während des Biofilm-Wachstums bekannt. Auch hier sind vor allem Stressgene induziert (Ren D. *et al.* (2004). Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 515-524). In *F. oxysporum* gibt es einige Stressgene wobei 6 ausgewählt wurden. Darunter sind zwei pH-Response Regulator Protein (FOXG_09279 und FOXG_11003), sowie ein pH-Response Transkriptions Faktor (FOXG_02222), zwei Response Regulator Receiver Domänen (FOXG_04454 und 06549) und eine Histidin-Kinase (FOXG_01684). Um die Expression im Biofilm dieser Stressgene zu bestimmen, wurde RNA aus *F. oxysporum* Biofilmen und im Vergleich dazu aus planktonischen Kulturen isoliert und anschließend eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Beta-Tubulin dient als Haushalts-Gen, da es immer exprimiert wird. Um RNA aus dem Biofilmstadium vom *F. oxysporum* zu isolieren, wurde eine Sporensuspension hergestellt und in einer Glasbox mit Komplexmedium und Glasobjektträgern, auf diesen er sich anhaften kann, inkubiert. Er wurde für 10 Tage bei 28°C inkubiert.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR dargestellt. Die Diagramme zeigen die n-fache Expression im Vergleich zum Normalzustand (planktonisch=1). Man kann sehen, dass der pH-Response Transkriptionsfaktor pacC/RIM101 (FOX2222) im Biofilm-Wachstum fast 30fach höher exprimiert wird und FOX 11003 und das 15fache.

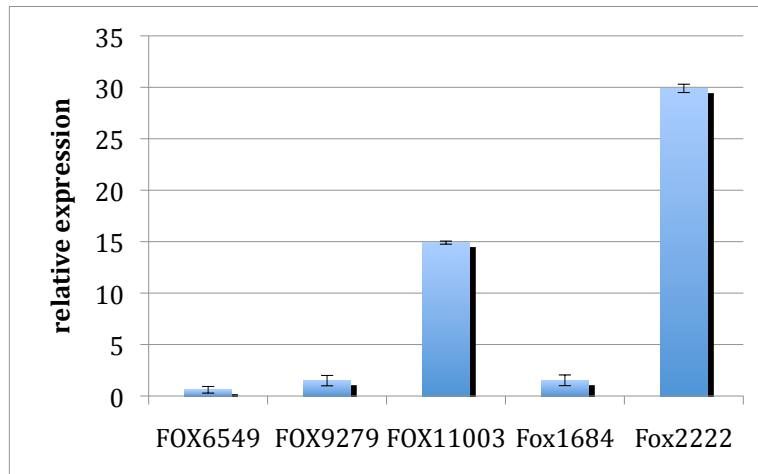


Abbildung 7: Relative Expression der verschiedenen Stressgene im Wildtyp 4287 zum Zeitpunkt 10 Tage nach Inokulation. Das Diagramm veranschaulicht die Resultate einer quantitativen Real-Time RT-PCR. Die hierfür verwendete RNA wurde aus Kulturen isoliert, die auf Glasobjektträgern, also im Biofilm, gewachsen sind. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Analyse von je drei biologischen Replikaten. Als Referenzgen wurde das zum *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *tubB* verwendet. Die Ausgangskonzentration an RNA beträgt 200 ng pro Replikat.

Um herauszufinden wie wichtig diese Gene für das Biofilm-Wachstum sind, werden von allen sechs Genen durch die Fusions-PCR (siehe Abbildung 8) Deletionskonstrukte hergestellt, die dann in *F. oxysporum* Wildtyp transformiert werden. Das Prinzip der Fusions-PCR beruht auf einer rein PCR-basierten Methode, bei der zunächst die drei Sequenzen per PCR amplifiziert werden. Durch geeignetes Primerdesign werden an die zu fusionierenden Enden Adaptersequenzen angehängt, die komplementär zueinander sind (siehe Abbildung 8). In der

anschließenden eigentlichen Fusions-PCR werden alle drei Fragmente als Template eingesetzt und diese durch die Polymerase fusioniert. Dieses Konstrukt wird anschließend über die homologe Rekombination in das Genom von *F. oxysporum* eingebaut.

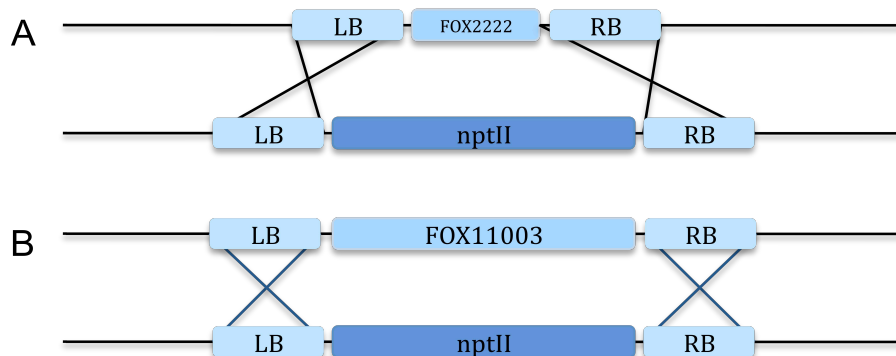


Abbildung 8: Schema der Fusions-PCR. Die Deletionskonstrukte werden mit dem Geneticin-Resistenzgen *nptII* hergestellt.

Die Fusionprodukte von FOX2222 und FOX11003, die in der qReal-Time PCR eine erhöhte Expression im Biofilm zeigten, konnten bereits amplifiziert werden.

1.2 Charakterisierung der Bakterien in verschiedenen Habitaten

Um die Bakterienpopulation in verschiedenen Habitaten (nährstoffreich und nährstoffarm) miteinander zu vergleichen wurde auch hier eine Klonbibliothek erstellt. Es wurden Biofilme von der Alb, dem Zulauf und Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut die direkt an diesen Stellen entnommen wurden und Biofilme, die auf Glasobjektträgern in den entsprechenden Habitaten herangezogen wurden, miteinander verglichen. Die Glasobjektträger wurden für drei Monate in den gleichen Gewässern inkubiert. Dazu wurden die Biofilme mit sterilen Zellschabern geerntet, in 50 ml Reagenzgefäße transportiert und anschließend direkt die DNA mittels Innu SPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Jena) isoliert. Es lag somit ein Gemisch an DNA von dem im Biofilm vorkommenden Organismen vor. Anschließend wurde eine PCR mit den 27F/517R Primer durchgeführt. Mit Hilfe der PCR wird ein definierter Abschnitt eubakterieller 16S rDNA vervielfältigt und es entsteht ein 527 Basenpaare (bp) großes DNA – Fragment, das bei jeder Art eine andere Sequenz hat. Die PCR der verschiedenen Bakterienarten wurde in *Escherichia coli* kloniert, um die einzelnen Kolonien mit Hilfe einer M13/T7 colony PCR und dem Restriktionsenzym *MspI* zu überprüfen. Die Proben, die ein unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen, wurden sequenziert.

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis der Klonbibliothek des Biofilms von den Glasoberflächen, die im Ablauf, dem Zulauf und in der Alb für drei Monate ausgebracht waren. Wider erwarten wurden im Zulauf der Kläranlage nur wenig verschiedene Arten gefunden, jedoch einige Bakterien, deren Art nicht genau zuordenbar ist.

Tabelle 2: Ergebnis der Klonbibliothek der Glasoberflächen. Zur Isolation der Bakterien wurde eine Klonbibliothek mit den 16S rRNA-PCR Produkten in *E. coli* erstellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte mittels M13/T7 PCR und anschließender Auswertung mit dem Onlinetool BLAST. **A)** Gefundenen Bakterien im Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut **B)** gefundene Bakterien in der Alb nahe Karlsruhe-Eggenstein **C)** gefundenen Bakterien im Zulauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut.

A

Spezies	Abteilung	Klasse	Ordnung
<i>Cellvibrio sp.</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
<i>Flavobacterium sp.</i>	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales
<i>Flavobacterium limicola</i>	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales
<i>Rickettsiella symbiont of Asellus aquaticus</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales
unc. Bacteroidetes			
unc. Beta Proteobacterium			
unc. Verrucomicrobia			

B

Spezies	Abteilung	Klasse	Ordnung
<i>Cyanobacterium sp.</i>	Cyanobacteria		Chroococcales
<i>Dechloromonas sp.</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales
<i>Duganella zoogloeoides</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales
unc. Altererythrobacter	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales
unc. Beta Proteobacterium			

C

Spezies	Abteilung	Klasse	Ordnung
<i>Arcobacter sp.</i>	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales
<i>Trichococcus sp.</i>	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales
unc. Bacteroidetes			
unc. Clostridiales	Firmicutes	Clostridia	
unc. Deltaproteobacterium			
unc. Fusobacteria			

Tabelle 3 zeigt das Ergebnis der Klonbibliothek der Biofilme, die direkt aus den verschiedenen Habitaten von den Oberflächen entnommen wurden.

Tabelle 3: Ergebnis der Klonbibliothek der direkten Biofilme. Zur Isolation der Bakterien wurde eine Klonbibliothek mit den 16S rRNA-PCR Produkten in *E. coli* erstellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte mittels M13/T7 PCR und anschließender Auswertung mit dem Onlinetool BLAST. **A)** Gefundenen Bakterien im Zulauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut **B)** gefundene Bakterien im Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut **C)** gefundenen Bakterien in der Alb bei Karlsruhe-Eggenstein

A

<u>Spezies</u>	<u>Abteilung</u>	<u>Klasse</u>	<u>Ordnung</u>
<i>Acinetobacter sp.</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
<i>Brevundimonas sp.</i>	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales
<i>Chryseobacterium sp.</i>	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales
<i>Chryseobacterium hispanicum</i>	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales
<i>Corynebacterium variabile</i>	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales
<i>Duganella sp.</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales
<i>Janthinobacterium sp.</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales
<i>Leptothrix sp.</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales

B

<u>Spezies</u>	<u>Abteilung</u>	<u>Klasse</u>	<u>Ordnung</u>
<i>Arenimonas sp.</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales
<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales
<i>Rickettsiella symbiont of A.a.</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales
unc. Beta Proteobacterium			
unc. Sphingobacteriales	Bacteroidetes		Sphingomonadales

C

<u>Spezies</u>	<u>Abteilung</u>	<u>Klasse</u>	<u>Ordnung</u>
Actinobacterium MSB2127			
<i>Ralstonia sp.</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales
<i>Rhodocyclus sp.</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales
<i>Rickettsiella symbiont of A.a.</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales
unc. Bacteroidetes			
unc. Gamma Proteobacterium			

1.3 Modifikation von Hydrophobinen mit antimikrobiellen Peptiden

Die bisher für die Oberflächenbeschichtungen verwendeten Fusionshydrophobine (Abbildung 9) zeigten nur geringe Effekte auf das Biofilmwachstum von Bakterien und Pilzen (Rieder *et al.*, 2011). Um den Effekt der Hydrophobinbeschichtung zu verstärken und das Biofilmwachstum zu manipulieren, werden diese Fusionshydrophobine mit Hilfe von antimikrobiellen Peptiden modifiziert.

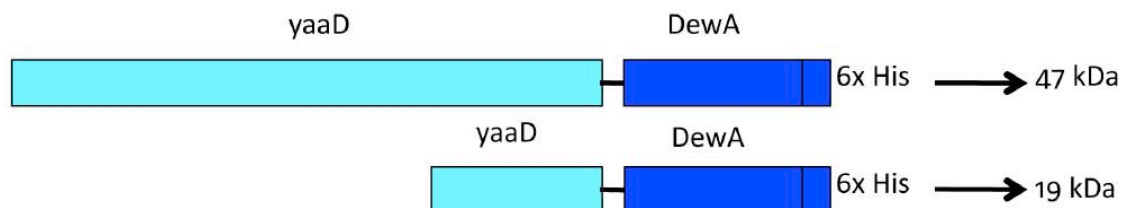


Abbildung 9: Das Hydrophobin DewA des Ascomyceten *Aspergillus nidulans* ist mit der Synthase yaaD aus *Bacillus subtilis* fusioniert. Dies verhilft dem Protein nach Expression in *Escherichia coli* eine Anreicherung in den Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*). Aus den Einschlusskörperchen werden die Fusionshydrophobine aufgereinigt.

Fusions-Hydrophobine sind ein Produkt aus dem pilzlichen Hydrophobin DewA und einer Synthase (YaaD), die vom Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* stammt. Auf Grund dieser Fusion ist es möglich das Hydrophobin in einem bakteriellen System (*Escherichia coli*) zu exprimieren und aufzureinigen. Die Aufreinigung erfolgt aus sogenannten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) in die das Protein durch die Synthase geleitet wird.

Oberflächenbeschichtungen mit diesen Fusions-Hydrophobinen sind äußerst stabil, verhindern allerdings nicht die Anheftung von Mikroorganismen auf eben diesen Oberflächen. Um Biofilmbildungen an mineralischen Oberflächen zu verhindern, wurden kationisch antimikrobielle Peptide (AMPs) an das N-terminale Ende der Fusions-Hydrophobine angefügt (siehe Abbildung 10). AMPs haben ein breites Wirkungsspektrum (Gram-positive und Gram-negative Bakterien, pathogene Hefen, Viren, filamentöse Pilze etc), sind äußerst klein 9-50 Aminosäuren und vermitteln bis beinahe keine Resistenzen.

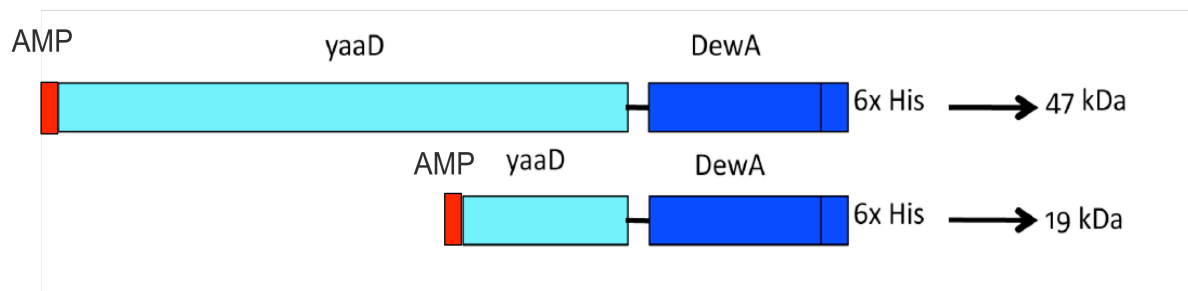


Abbildung 10: Schema der modifizierten Fusions-Hydrophobine. Die Synthase YaaD kann in voller als auch verkürzter Länge als Fusionspartner verwendet werden. Die verkürzte Form kann grade noch ihre Führerfunktion in die Einschlusskörperchen ausüben. An das N-terminale Ende der Synthase YaaD wurde ein AMP fusioniert.

1.3.1 Modifikation mit kationisch antimikrobiellen Peptiden und Funktionsanalysen

In einem ersten Anlauf wurden die AMPs F1 (Sub5) (MRRWKIVVIRWRR) und HHC (MKRWWKWWRR) eingesetzt, da diese sich besonders aktiv gegen *A.nidulans* zeigten (Mania *et al.*, 2010), dem Modellorganismus der Arbeitsgruppe Fischer. Durch die Fusion ging allerdings ihre antimikrobielle Aktivität verloren. Dennoch konnte gezeigt werden, dass modifizierte Fusions-Hydrophobine überexprimiert und aufgereinigt werden können (Abbildung 4).

Die Überexpression erfolgte in *E. coli* BL21, wobei letztendlich mit 0,5mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 1,0 induziert und die Kultur über Nacht wuchs. Durch das Polypeptid wird das Fusionshydrophobin in die inclusion bodies (IB) geleitet und muss aus diesen aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte nach einem von der BASF erprobten Protokoll, indem die Fusionshydrophobine durch einen pH-Shift aus den IBs gelöst werden. Dabei wurde 25%iges NaOH zu dem gewaschenen Pellet gegeben und der pH-Wert mit 20%igem H₃PO₄ auf pH 9,0 eingestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt findet man die gelösten Proteine im Überstand, die gefriergetrocknet und zur weiteren Nutzung wieder in Wasser gelöst wurden.

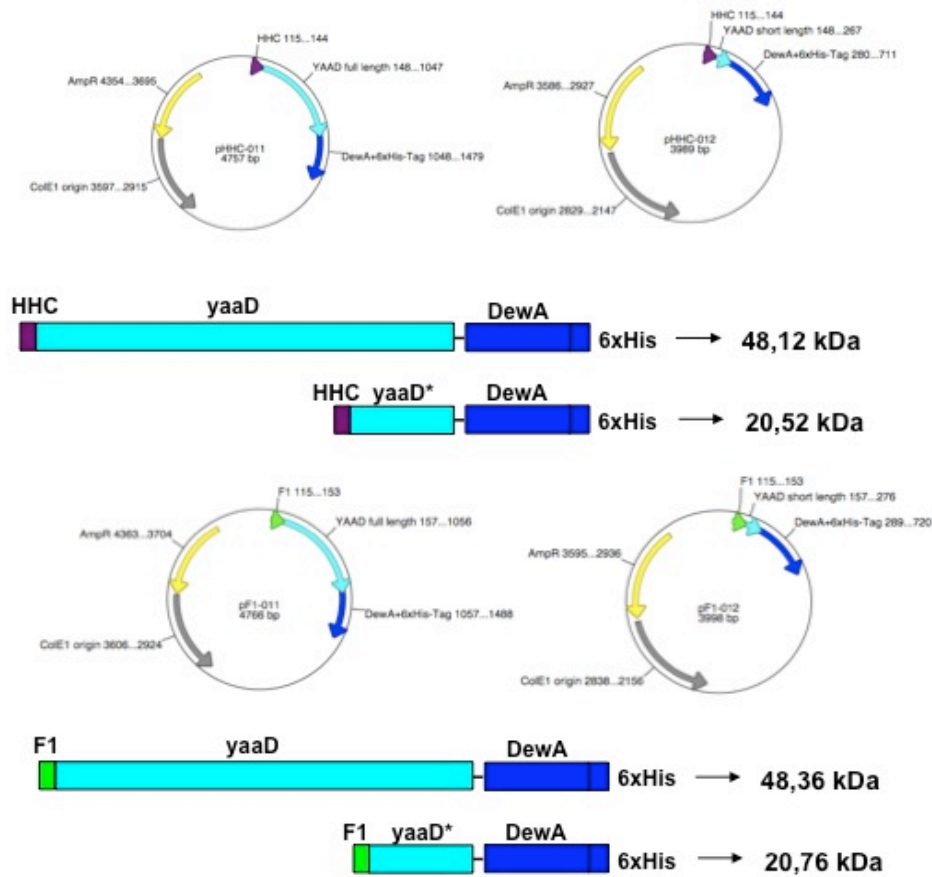


Abbildung 11: Schema der modifizierten Fusionshydrophobine mit den AMPs F1 und HHC. Die jeweilige Größe der Proteine ist in kilo Dalton (kDa) angegeben.

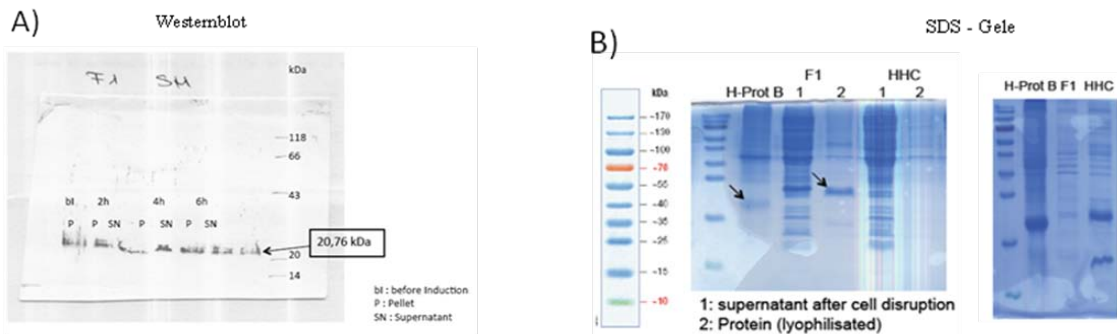


Abbildung 12: Westernblot und SDS-Gele. A) Anhand des Fusionshydrophobins mit kurzem YAAD und dem AMP F1 ein Beispiel für einen Westernblot. Auf der Höhe von ca 20kDa, was der Größe dieses Fusionshydrophobins entspricht, ist deutlich eine Bande sichtbar. B) Auch bei den SDS-Gele ist eine deutliche Bande auf der richtigen Höhe zu erkennen. Hier dargestellt sind die kurzen Fusionshydrophobine mit den angehängten AMPs F1 und HHC.

Um die Funktionalität der modifizierten Hydrophobine festzustellen, wurden verschiedene Stämme (*S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *E.coli*, *P. putida* und *A. nidulans*) genutzt. So wurden sowohl grampositive, also auch gramnegative Bakterien und Eukaryoten abgedeckt. Mit Hilfe von Absterbekurven (*B. subtilis*, *E. coli*, *S. pneumoniae*) und Peptidaktivitätstest (*A. nidulans*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *P. putida*), die in Mikrotiterplatten durchgeführt wurden, wurde dies gemessen.

Bei den Absterbekurven wurde zunächst ermittelt, ob es nur durch das Hydrophobin zu einer Wachstumshemmung kommt (Abbildung 13).

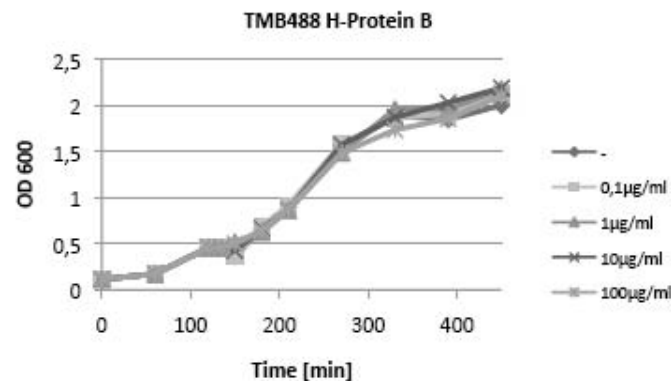


Abbildung 13: Absterbekurve von *B. subtilis* TMB488. Der Stamm TMB488 ist ein Reporterstamm für das Zweikomponentensystem LiaFSR in *B. subtilis*. Dieses System ist durch Zellhüllstress in Form von Antibiotika, die auf den Lipid-II Zyklus einwirken, induzierbar. Die Hydrophobine wirken nicht wachstumshemmend auf den Stamm.

Die Absterbekurve von *B. subtilis* TMB488 zeigt keine Wachstumshemmung durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen des Fusionshydrophins. Die gleichen Ergebnisse sind auch bei den anderen Testorganismen zu erkennen.

Bei Tests mit den AMPs (F1 und HHC) alleine, war eine Hemmung im Wachstum nur bei HHC erkennbar (siehe Abbildung 14). Allerdings konnten keine hohen Konzentrationen gemessen werden, durch die geringe Verfügbarkeit der AMPs.

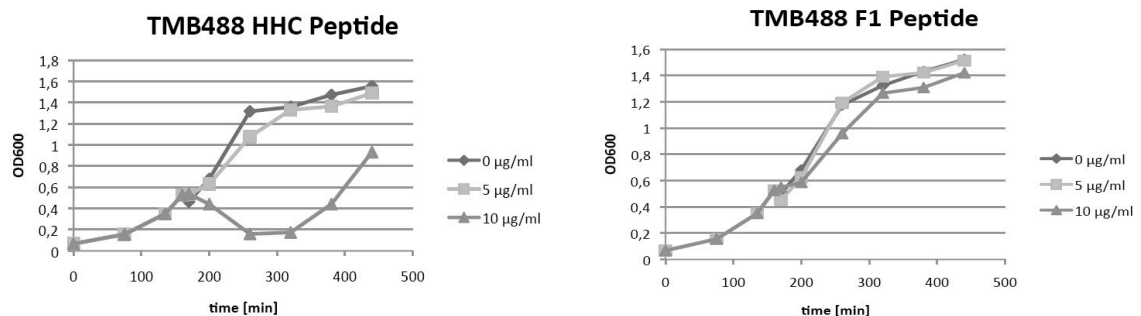


Abbildung 14: Absterbekurven mit AMPs. Mit einer Höchstkonzentration von 10µg/ml wird eine Hemmung des Wachstums bei HHC erkannt, allerdings zeigt sich bei dem AMP F1 keine Änderung um Wachstumsverhalten des Stammes *B. subtilis* TMB488.

Nun wurden ebenfalls Absterbekurven mit den modifizierten Hydrophobinen durchgeführt und dabei ebenfalls keine Veränderung im Wachstum festgestellt, was zumindest für die Organismen in diesem Test (*B. subtilis*, *E. coli*, *S. pneumoniae*) keine Funktionalität der antimikrobiellen Fusionshydrophobine darstellt.

Dadurch, dass die antimikrobielle Aktivität der AMPs in Mikrotiterplattenassays getestet wurde, wurde dieses Assay nun auch mit dem Fusionshydrophobinen durchgeführt. Schon bei der Auswahl der geeigneten AMPs, wurden die gewählt, die die größte Wirkung auf *Aspergillus nidulans* hatten. Dabei wird ein Farbstoff gewählt, der sich von blau nach rosa verfärbt, wenn es zur Respiration in der Kultur kommt. So kann man lebende Kulturen von abgetöteten unterscheiden.

Getestet wurden hierbei *A. nidulans*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae* und *P. putida* immer mit den gleichen Ergebnissen. So wurde keine antimikrobielle Funktionalität der modifizierten Fusionshydrophobine gefunden. Ein Beispiel für diesen Test ist in Abbildung 15 zu sehen.

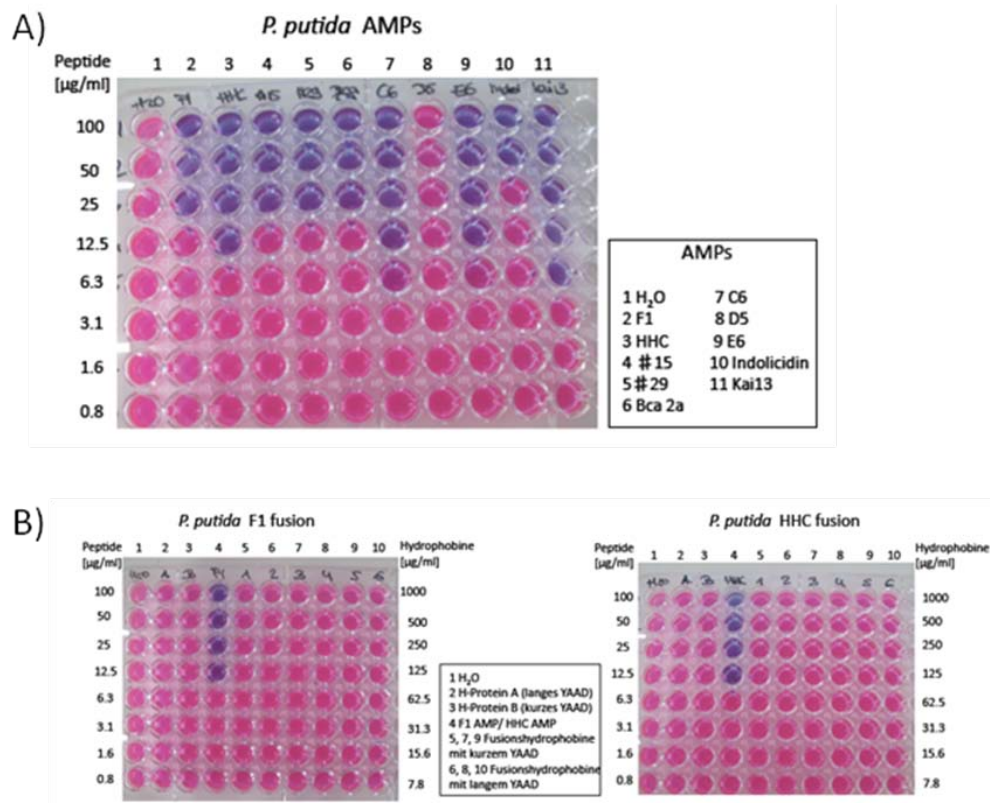


Abbildung 15: Peptidassays mit *Pseudomonas putida*. A) Als erstes wurden die gesamten Peptide, die uns zur Verfügung standen, getestet. Dies geschah um die ungefähre Letalität der AMPs zu definieren. B) In einem zweiten Schritt wurden die Hydrophobine und die modifizierten Fusionshydrophobine mit den angehängten AMPs (5-10) getestet. Allerdings wurde keine Wachstumshemmung gefunden.

Andere AMPs sind bewiesenermaßen im angehefteten Zustand aktiv (Hilpert *et al.*, 2009). So wurden zwei dieser AMPs (Tet009 (RRWKIVVIRWRR) und KaiH (WIVVIWRRKRRR)) verwendet und an das Fusions-Hydrophobin gebunden. Nach mehrmaligem Klonieren gelang es nicht ein richtiges Plasmid mit dem modifizierten Fusions-Hydrophobin zu erhalten. Dies führte zu der Vermutung, dass das Protein zu toxisch für den Klonierungsstamm (*E.coli* TOP10) ist. Es folgte die Klonierung und Transformation mit dem Stamm *E.coli* M15 [pREP4]. Der in diesem Stamm enthaltene Vektor pREP4 kodiert einen Lac-Repressor, der den T5-Promotor vor der Sequenz des modifizierten Fusions-Hydrophobins inhibiert. Bei einer Induktion der Expression mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), wird wiederum der Lac-Repressor inhibiert und der T5-Promotor induziert. (siehe Abbildung 16). Es kam allerdings wiederum zu keiner Expression des modifizierten Fusions-Hydrophobins.

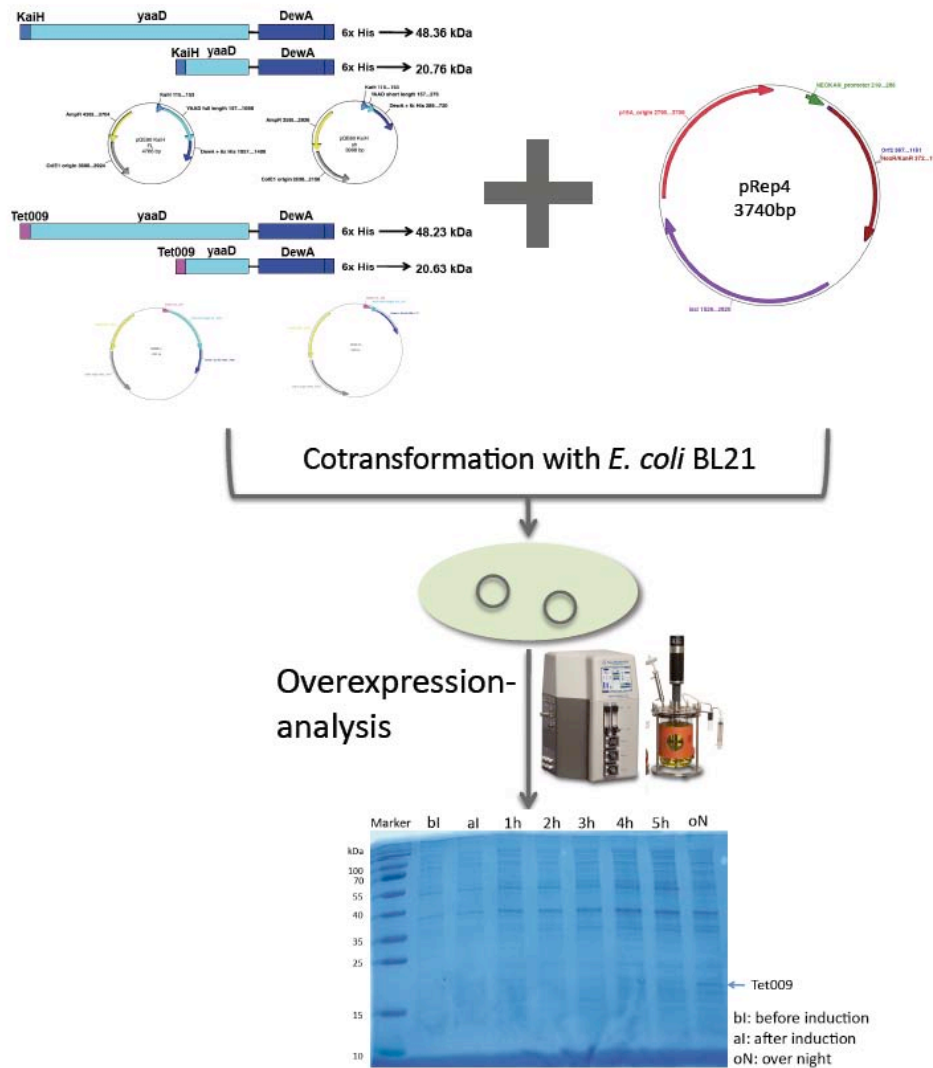


Abbildung 16: Transformations- und Überexpressionsschema. Die konstruierten Plasmide, die die modifizierten Fusions-Hydrophobine enthalten, werden zusammen mit dem Vektor pREP4 transformiert. Es folgt eine Induktion mit IPTG. Eine leichte Bande auf der richtigen Höhe ist erkennbar, kann aber nicht durch einen Western-Blot verifiziert werden.

In einem nächsten Schritt werden die AMPs durch ein Anfügen eines weiteren Proteins (GFP = grün fluoreszierendes Protein) inaktiviert, so dass es zu einer Überexpression kommen kann. Nach der Aufreinigung des Proteins wird mit Hilfe einer TEV-Proteaseschnittstelle (aus dem Tobacco Etch Virus) das GFP abgespalten und somit ein aktives modifiziertes Fusions-Hydrophobin erhalten (siehe Abbildung 17).

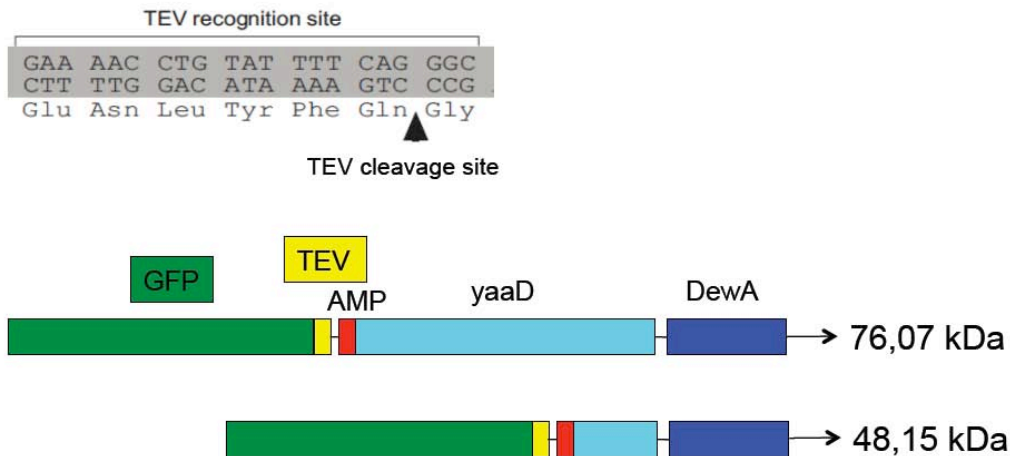


Abbildung 17: Schema der neuen modifizierten Fusions-Hydrophobine. Das antimikrobielle Peptid wird durch ein weiteres Protein in seiner Aktivität gehemmt, so dass es zu keiner Behinderung der Überexpression kommt. Nach der Aufreinigung wird das modifizierte Fusions-Hydrophobin wieder aktiviert, indem GFP abgespalten wird.

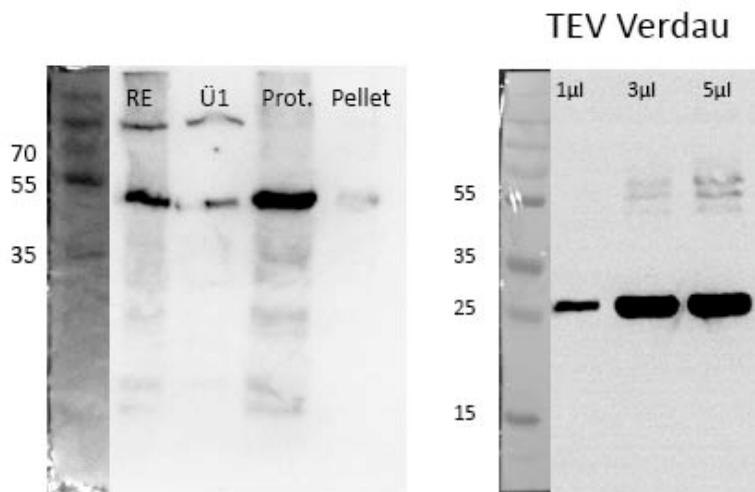


Abbildung 18: Western Blot nach Proteinüberexpression des kurzen modifizierten Fusionshydrophobins mit GFP (48,15 kDa) und Westernblot nach TEV-Verdau mit unterschiedlichen Proteasemengen. Die kleinste Menge reicht aus um 10 mg Protein zu spalten.

Im weiteren Versuchsverlauf wird die antibakterielle Wirkung der modifizierten Fusionshydrophobine untersucht.

1.3.2 Anwendung der vorhandenen Fusionsproteine zur AMP-Gewinnung

Die Peptid-Synthese ist ein wirtschaftlich und zeitlich aufwändiger Prozess. Aminosäuren werden einzeln aufeinander auf Cellulose-Membranen gespottet, so dass nach mehreren Syntheseschritten das fertige Peptid entsteht. Dieses wird dann wiederum von der Membran abgespalten und kann dann getestet werden (Hilpert *et al.*, 2007).

Modifizierte Fusions-Hydrophobine können in einem großen Ansatz im Fermenter überexprimiert werden. So besteht die Möglichkeit antimikrobielle Peptide, die im

angehefteten Zustand deaktiviert sind im großen Maß herzustellen und mittels einer TEV-Proteaseschnittstelle abzuspalten.

Das bereits vorhandene Plasmid mit dem F1-Peptid fusioniert an die *Bacillus* Synthase, wird mit einer TEV-Schnittstelle versehen (siehe Abbildung 11). Dies geschieht in dem das ganze Plasmid mit am 5'-Ende phosphoryliert Primern synthetisiert wird, die die TEV-Schnittstelle enthalten. Das *template*-Plasmid wird mittels des DpnI-Enzyms, das nur methylierte DNA angreift, verdaut. Nun kann das Tochter-Plasmid ligiert und mit *E. coli* transformiert werden.

Nach erfolgter Überexpression und Aufreinigung, muss nun noch das AMP abgespalten und auf seine Aktivität getestet werden.



Abbildung 19: Schema des modifizierten Fusionshydrophobins versehen mit einer TEV-Proteaseschnittstelle und Western Blot nach Proteinexpressionen.

1.3.4 A. *nidulans*-Stressantwort auf AMPs

Bis heute ist wenig bekannt über die Wirkungsweise der kationisch antimikrobiellen Peptide in Bakterien. Wahrscheinliches *target* ist die Zellhülle, wobei Zweikomponentensysteme induziert werden (Pietiäinen *et al.*, 2005; Staron *et al.*, 2010). Zweikomponentensysteme (TCS = two-component systems) bestehen aus einer Histidin-Kinase und einem Response-Regulator. Bei diesen Systemen basiert die Signalübertragung zwischen den beiden Komponenten auf Phosphorylierungen. Dabei stellt eine Histidin-Kinase, die aus zwei Domänen, einer stark variierenden, stimuluspezifischen Sensor-Domäne und einer hochkonservierten Kinase-Domäne besteht, den Sensor dar. Bei der Erkennung eines Signals kommt es zu einer Konformationsänderung der Kinase, die in einer Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes mündet. Die zweite Komponente, der Response-regulator, der neben der regulatorischen Domäne eine Effektor-Domäne, die die zelluläre Reaktion vermittelt, besitzt, wird nun phosphoryliert. Die Phosphatgruppe wird vom Histidinrest der Histidin-Kinase auf einen Aspartatrest innerhalb der regulatorischen Domäne des Response-Regulators übertragen. Die Effektor-Domäne des Response-Regulators ist im Normalfall eine DNA-Binde-Domäne, somit kann man die Response-Regulatoren als Transkriptionsfaktoren bezeichnen. Der Response-Regulator kann nun entweder als Aktivator oder Repressor die Expression der Zielgene regulieren. Die Inaktivierung des Response-Regulators erfolgt durch Dephosphorylierung, welche von dem Response-Regulator selbst, durch die zugehörige Histidin-Kinase oder einer externen Aspartat-Phosphatase katalysiert wird.

Zweikomponentensysteme sind auch in Pilzen zu finden, wobei man zusätzlich ein Histidin-enthaltenes Phosphotransferprotein findet (HPt factor) (Abbildung 20).

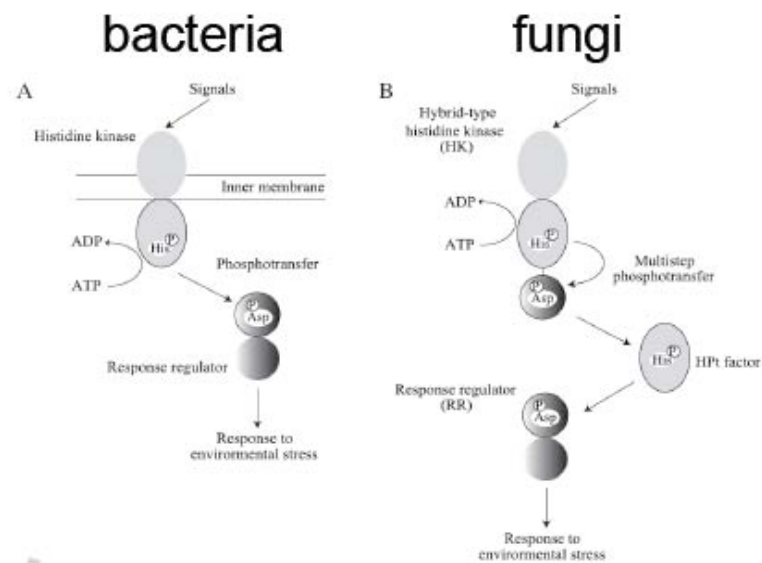


Abbildung 20: Schemata der Zweikomponentensysteme in Bakterien und Pilzen. Beide Systeme besitzen einen Sensor in Form einer Histidin-Kinase und einen Response-Regulator, der durch Autophosphorylierung aktiviert wird.

A. nidulans besitzt 15 Histidin-Kinasen (HKs), 4 Response-Regulatoren und ein Phosphotransferprotein (HPt) (siehe Abbildung 21).

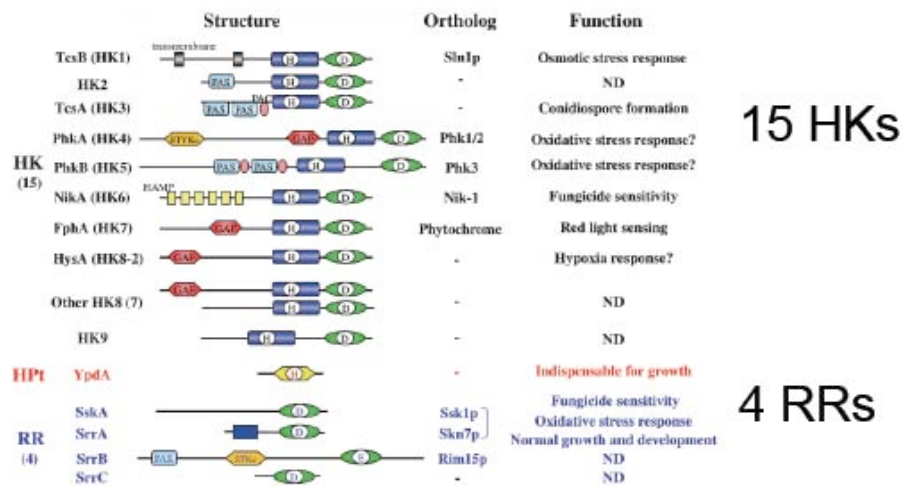


Abbildung 21: Schema der Elemente der *A. nidulans* Zweikomponentensysteme.

Um die Auswirkung der kationisch antimikrobiellen Peptide auf die Zweikomponentensysteme zu erkennen, erhielten wir zu allen HKs und RRs eine jeweilige *knock out* Mutante (Abbildung 22).

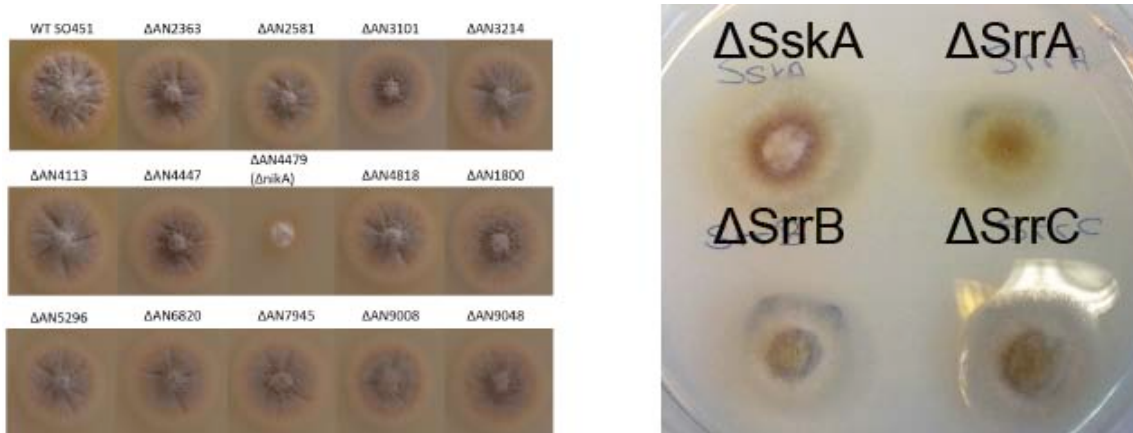


Abbildung 22: Wachstum der *knock out* Mutanten auf Minimalmedium mit den jeweilig benötigten Zusätzen. Links sind die HK-Mutanten zu sehen. Wobei die erste Kolonie oben der Wildtyp ist, worauf die Mutanten beruhen. Rechts sind die Mutanten der Response-Regulatoren zu sehen.

Es wurden Peptidassays in Mikrotiterplatten durchgeführt um Wachstumseinschränkungen der einzelnen Mutanten zu beobachten. Hierbei wurde zunächst mit Amphotericin B ein Fungizid, das die Zellmembran zerstört, induziert. Diese Vortests waren nötig um die knappen Reserven der vorhandenen antimikrobiellen Peptide zu schonen. Getestet wurden verschiedene Konzentrationen von 0,8µg/ml bis zu 100µg/ml. Als Indikator diente Resazurin ein Redoxfarbstoff, der von blau auf pink umschlägt kommt es zur Zellatmung. So bedeutet es, dass keine überlebende Zelle zu finden ist, wenn das Medium blau bleibt. Sporensuspensionen aller Mutanten wurden bei einer Konzentration von $10^4/10\mu\text{l}$ pro Mulde einer Mikrotiterplatte in Resazurin-Medium gegeben und 16 Stunden bei 37°C inkubiert (siehe Abbildung 15). Anhand dieser Tests fiel eine Histidin-Kinase-Mutante (ΔnikA) auf, die im Vergleich zum Wildtyp sensitiver gegenüber Amphotericin B ist. Diese Mutante wurde nun weiter mit einem antimikrobiellen Peptid (Bac2a) getestet. Sie zeigte den gleichen Phänotyp wie bei einer Induktion mit Amphotericin B (siehe Abbildung 23). Getestete Mutanten der Response-Regulatoren zeigten keine Unterschiede zum Wildtyp.

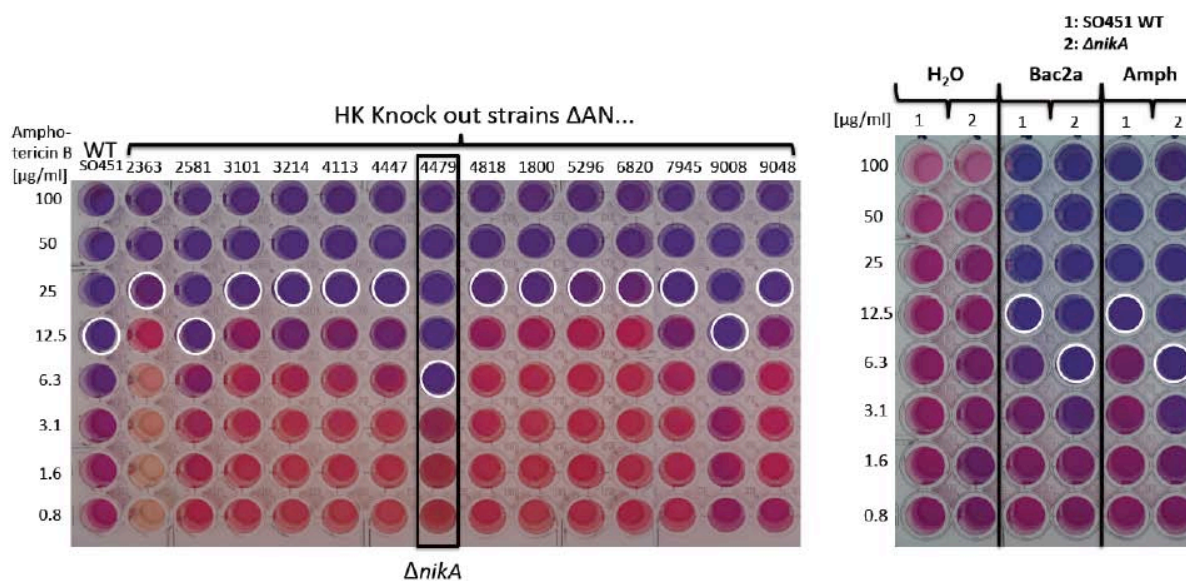


Abbildung 23: Peptidaktivitätsassay in Mikrotiterplatten. Links wurden die HK-Mutanten mit Amphotericin B und auf der rechten Seite nur noch die Mutante ΔnikA mit AmphotericinB und dem AMP Bac2a getestet.

Da keineswegs sicher ist, dass nur Zweikomponentensystem zum *targeting* der AMPs beisteuern und sicherlich mehrere Gene eine Rolle darin spielen, wird in einem nächsten Schritt eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Hierbei wird der Wildtyp mit einem AMP (F1) für 20 Minuten induziert. Die gewonnene RNA wird anhand eines Microarrays untersucht und somit induzierte und reprimierte Gene entdeckt.

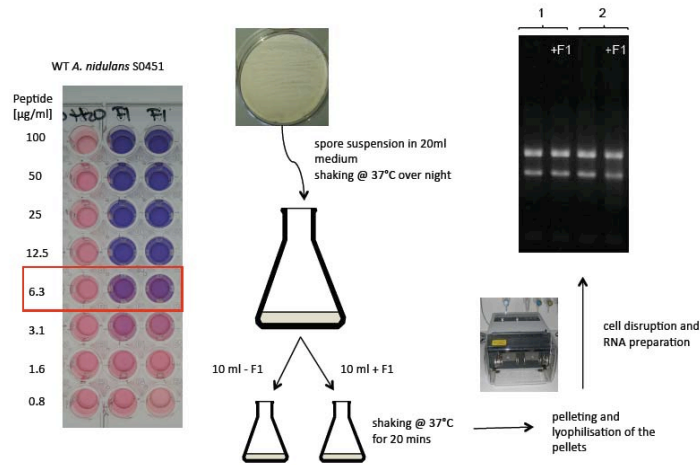


Abbildung 24: Schema der RNA-Gewinnung nach Induktion mit dem AMP F1 für 20 Minuten. Es wurde eine Konzentration gewählt, die gerade noch nicht abtötet. Diese Konzentration liegt bei 6,3 µg/ml F1.

2. Veröffentlichungen

Publikationen

Mania, D., Hilpert, K., Ruden, S., Fischer, R. & Takeshita, N. (2010). Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. *Appl Env Microbiol* 76, 7102-7108.

Rieder, A., Ladnorg, T., Wöll, C., Obst, U., Fischer, R. & Schwartz, T. (2011). The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on *E. coli* and natural mixed culture. *Biofouling* 27, 1073-1085.

Boef, S., Throm, T., Gutt, B. & other authors (2012). Engineering hydrophobin DewA to generate surfaces that enhance adhesion of human but not bacterial cells. *Acta Biomater* 8, 1037-1047.

Vorträge

J. Zoller, B. Gutt, R. Fischer. *Characterization of the fungal population in biofilms - more than 80 new species identified*. 3. Gemeinsame Tagung von DGHM und VAAM, 28.-31. März 2010, Hannover.

Posterpräsentationen

J. Zoller, B. Gutt, R. Fischer. *Characterization of the fungal population in biofilms - more than 110 new isolates identified*. Soil Metagenomics 2010, Braunschweig 8.-10. Dezember 2010

J. Zoller, R. Fischer. *Characterization of the fungal population in biofilms*. VAAM 2011, Karlsruhe 3. - 6. April 2011

B. Gutt, R. Fischer. *Analysis of antimicrobial peptides, their use for biofilm protection and the general stress response in fungi*. VAAM 2011, Karlsruhe 3. - 6. April 2011

Karlsruhe, Juni 2012

R. Fischer